NACHWEIS UND REAKTIVITÄT EPITHELIALER UND MESENCHYMALER ZIELZELLEN FÜR *ESCHERICHIA COLI* SHIGATOXIN IN DEN KOLONKRYPTEN DES RINDES

MELANIE MOHR

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

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

Nachweis und Reaktivität epithelialer und mesenchymaler Zielzellen für *Escherichia coli* Shigatoxin in den Kolonkrypten des Rindes

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

eingereicht von

MELANIE MOHR
Tierärztin aus Fulda

Gießen 2007

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

Dekan:	Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Bülte

Tag der Disputation:	27. April 2007

meinen Eltern Günter und Monika Mohr

Damit das Mögliche entsteht,
muss immer wieder das Unmögliche versucht werden.
(Hermann Hesse)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Melanie Mohr, Ivonne Stamm, Matthias König, Georg Baljer, ChristianMenge
Identifizierung mesenchymaler Zellen aus bovinen Kolonkrypten als Zielzellen für Shigatoxin 1 von *Escherichia coli*.
Als Poster präsentiert auf der DVG-Fachgruppentagung „Bakteriologie und Mykologie“ 2006 in Wetzlar.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 535.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 2

1. Die Rolle von Epithelzellen im Immunsystem der Darmschleimhaut 2

1.1. Barrierefunktion der Darmschleimhaut 2

1.1.1. Physische Barriere der Enterozyten selbst 2
1.1.2. Glykokalyx 3
1.1.3. Schleimschicht (Mukus) 3

1.1.3.1. Muzine 4
1.1.3.2. Peptide der „Trefoil“-Faktor Familie 5

1.1.4. Antimikrobielle Peptide 5

1.1.4.1. Defensine 6
1.1.4.2. Kathelizidine 8
1.1.4.3. Histone 9

1.1.5. Apoptose 9

1.2. Zusammenwirken von Epithelzellen und organisiertem lymphatischen Gewebe in der Darmschleimhaut 10

1.2.1. Organisiertes lymphatisches Gewebe in der Darmschleimhaut 11
1.2.2. Besonderheiten des Follikel-assoziierten Epithels 11
1.2.3. Die Schlüsselfunktion der M-Zellen 13
1.2.4. Die Schlüsselfunktion der dendritschen Zellen 14

1.3. Bedeutung der resorptiven Epithelzelle im Immunsystem 15

1.3.1. Die Epithelzelle als Antigen-präsentierende Zelle 15
1.3.2. Zusammenarbeit mit intraepithelialen Lymphozyten 17
1.3.3. Transport von sekretorischen Immunglobulinen 18

1.3.3.1. Herkunft und Aufbau der Immunglobuline 18
1.3.3.2. Der polymerische Immunglobulinrezeptor (pIgR) 18
1.3.3.3. Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) 19
1.3.3.4. Funktionen der sekretorischen Immunglobuline 19

1.3.4. Rolle von „Pattern Recognition Receptors“ in der Immunregulation der Darmschleimhaut 21
1.3.5. Expression von Chemokinen 25

2. Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (STEC) 29

2.1. Epidemiologie, Pathologie und Klinik von STEC-Infektionen 29

2.1.1. Infektionen des Rindes 29
2.1.2. Infektionen des Menschen 30

2.2. Kolonisation des Darmtraktes durch STEC 31

2.3. Die Shigatoxine ... 33
2.3.1. Aufbau der Shigatoxine ... 34
2.3.2. Shigatoxin-Rezeptor und enzymatische Wirkung ... 35
3. Wirkung des Shigatoxins auf intestinale Epithelzellen ... 36
3.1. Kaninchen, Schwein und Maus ... 36
3.2. Mensch ... 37
3.2.1. Epithelzelllinien ... 37
3.2.1.1. Translokation des Toxins über die epitheliale Barriere ... 37
3.2.1.2. „Ribotoxic stress response“ und Chemokin-Induktion ... 38
3.2.1.3. Bedeutung der neutrophilen Infiltration ... 39
3.2.1.4. Auslösung der Apoptose ... 39
3.2.2. Primärkulturen und Explantate ... 39
3.2.3. Pathogenese-Modell der EHEC-Erkrankungen des Menschen ... 40
3.3. Rind ... 41

III. MATERIAL UND METHODEN ... 43
1. Gewinnung und Kultivierung von Zellen ... 43
1.1. Primäre bovine Kolonepithelzellen ... 43
1.1.1. Gewinnung von Kolonkrypten ... 43
1.1.2. Kultivierung der Zellen auf Plastikoberflächen ... 45
1.1.3. Kultivierung der Zellen auf Filtern ... 47
1.2. Angereicherte bovine Kolonmesenchymzellen ... 47
1.3. Immortalisierte Kolonmesenchymzellen ... 48
1.4. BUVEC ... 48
1.5. Etablierte Zelllinien ... 49
1.5.1. Kultivierung nicht-adhärenter Zelllinien ... 49
1.5.2. Kultivierung adhärenter Zelllinien ... 49
2. Zellkulturtest zum Nachweis der Wirkung von Shigatoxin auf die Stoffwechselaktivität von Zellen (Zytotoxizitätstest) ... 50
3. Untersuchungen zum Nachweis der Transkription boviner Zytokingene ... 52
3.1. Inkubation der Zellen ... 52
3.2. Ernte der Zellen ... 52
3.3. RNA-Isolierung ... 53
3.3.1. Quantitative RNA-Bestimmung im Photometer ... 55
3.3.2. Qualitative Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese ... 55
3.4. Reverse Transkription ... 56
3.5. PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen ... 58
3.6. „Real time“ TaqMan® PCR ... 59
4. Durchflusszytometrie ... 64
4.1. Zur Detektion verwendete Antikörper ... 64

4.2. Probenvorbereitung zur Untersuchung der Zytoskelettausstattung 65
4.3. Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz auf nativen Zellen 66
4.4. Probenvorbereitung für den intrazellulären CD77-Nachweis 67
4.5. Probenvorbereitung für den Apoptose-Nachweis 68
4.6. Probenanalyse 69

5. Immunfluoreszenz-Mikroskopie 71

5.1. Präparatevorbereitung zur Untersuchung der Zytoskelettausstattung 71
5.2. Präparatevorbereitung für den Nachweis von CD77 bzw. Aktin 72
5.3. Präparatevorbereitung für den ZO-1-Nachweis 73
5.4. Herstellung von Mowiol-Mounting-Medium 74

6. Rasterelektronenmikroskopie 74
7. Test zur Aufnahmefähigkeit von LDL 75
8. Charakterisierung von Zellen bezüglich ihrer Enzymausstattung 76

8.1. Induktionsphase 76
8.2. Quantifizierung der Enzymaktivitäten 77

8.2.1. Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ-GT) 77
8.2.2. Alkalische Phosphatase (AP) 78
8.2.3. Saccharase und Laktase 78

9. Migrationsstudien mit bovinen Granulozyten 79

9.1. DiO-Färbung von BL-3-Zellen 79
9.2. Isolation der Granulozyten aus Rinderblut 80
9.3. Migrationsversuch 81
9.4. Probenanalyse 82

10. Statistische Auswertung 84

IV. ERGEBNISSE 85

1. Untersuchungen an Primärkulturen boviner Kolonepithelzellen 85

1.1. Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild 85
1.2. Zytoskelettausstattung 86
1.3. Versuche zur Optimierung der Kulturbedingungen 92
1.4. Funktionelle Charakterisierung 93

1.4.1. Polarisationsvermögen 93
1.4.2. Expression von Leitenzymen 97
1.4.3. Transkription von Zytokin-und Chemokingenen 101
1.4.4. Shigatoxin-Rezeptorexpression 102

1.5. Untersuchungen zur Wirkung von Shigatoxin auf funktionelle Parameter 109

1.5.1. Stoffwechselaktivität 109
1.5.2. Shigatoxin-Rezeptorexpression 110
1.5.3. Apoptoserate der Epithelzellen 114
1.5.4. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen 115

1.5.5. Freisetzung chemoattraktiver Substanzen 117

2. Untersuchungen an Primärkulturen angereicherter boviner Kolonmesenchymzellen in An- und Abwesenheit von Stx1 119

2.1. Zytoskelettausstattung und Stoffwechselaktivität 119
2.2. Expression des Shigatoxin-Rezeptors und anderer Oberflächenmarker 120

3. Untersuchungen an Kulturen immortalisierter boviner Kolonmesenchymzellen 124

3.1. Charakterisierung verschiedener mesenchymaler Kolonzell-Klone 124

3.1.1. Zytoskelettausstattung 124
3.1.2. Expression von Leitenzymen 127
3.1.3. Fähigkeit zur Aufnahme von LDL 128
3.1.4. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen 130
3.1.5. Expression von CD77 und anderer Oberflächenmarker 132

3.2. Wirkung von Shigatoxin 1 auf funktionelle Parameter des mesenchymalen Kolonzell-Klons 12 139

3.2.1. Stoffwechselaktivität 139
3.2.2. Expression von CD77 140
3.2.3. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen 142
3.2.4. Freisetzung chemoattraktiver Substanzen 145

4. Vergleichende Untersuchungen an Endothelzellen 147

4.1. Zytoskelettausstattung, Expression des Shigatoxin-Rezeptors und anderer Oberflächenmarker 147
4.2. Transkription von Zytokin-, Chemokin- und Adhäsionsmolekülgenen 149
4.3. Wirkung von Shigatoxin auf funktionelle Parameter 151

4.3.1. Einfluss von Shigatoxin auf die Stoffwechselaktivität 151
4.3.2. Expression von CD77 152
4.3.3. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen 154

V. DISKUSSION 156

VI. ZUSAMMENFASSUNG 172

VII. SUMMARY 174

VIII. LITERATURVERZEICHNIS 176

IX. ANHANG 195

1. Reagenzien und Materialien 195
2. Puffer, Medien und Lösungen 199

X. TABELLEN 203

XI. ABBILDUNGEN 204

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino Actinomycin D
Abb.	Abbildung
A. bidest.	*Aqua bidestillata*
A/E	attaching/effacing
ALVC	afferent lymph veiled cells
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigen-presenting cell
BL-3	bovine lymphoma-3
bo	bovin
bp	Basenpaar
BUVEC	bovine umbilical vein endothelial cells
CD	cluster of differentiation
CD_{50}	zytotoxische Dosis 50 %
DC	dendritic cell
DEPC-Wasser	Diethyl-Pyrocarbonat-behandeltes Wasser
DiO	Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagels Medium
DNA	Desoxiribonucleic acid, Desoxiribonukleinsäure
dsRNA	double-stranded RNA, doppelsträngige RNA
ECACC	European collection of animal culture cells
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EHEC	Enterohämorrhagische *Escherichia coli*
EIEC	Enteroinvasive *Escherichia coli*
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
EPEC	Enteropathogene *Escherichia coli*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Esp	*Escherichia coli* secreted protein
et al.	*et alii* (und andere)
EVOM	Epithelial Voltohmmeter

Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
f.c.	final concentration, Endkonzentration
FCS	fetal calf seum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
Gb_3/CD77	Globotriaosylzeramid
Gb_4	Globotetraosylzeramid
h	Stunde(n)
HBSS	Hank´s Buffered Salt Solution
HC	Hämorrhagische Kolitis
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IE	internationale Einheit
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDL	low densitiy lipoprotein
LEE	locus of enterocyte effacement
LPL	Lamina propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	major histocompatibility complex
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Miligramm
ml	Mililiter
mm	Milimeter
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA, Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NF-κB	nuclear factor κB
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykan
PI	Propidiumjodid
pIg	polymerisches Immunglobulin
pIgR	polymerischer Immunglobulinrezeptor
PMN	polymorphnuclear cells
PRR	pattern recognition receptor
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rStxB1	rekombinante B-Untereinheit von Shigatoxin 1
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription/Transkriptase
SC	sekretorische Komponente

SD	standard difference, Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SIg	sekretorisches Immunglobulin
SIRP	signal regulatory protein
ssRNA	single-stranded RNA, einzelsträngige RNA
stab.	stabilisiert
STEC	Shigatoxin bildende *Escherichia coli*
Stx	Shigatoxin(e)
StxB1	B-Untereinheit des Shigatoxin 1
T	Kultivierungstag
Tab.	Tabelle
TCR	T-cell receptor
TEER	trans epithelial electrical resistance
Tir	translozierter Intiminrezeptor
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrose Faktor α
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TTP	Thrombotisch thrombozytopenische Purpura
U	Unit, Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
vgl.	vergleiche
ZK	Zellkultur
ZO	zonula occludens

I. EINLEITUNG

Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (STEC) sind bedeutende Zoonoseerreger, die beim Menschen hämorrhagische Kolitiden und das lebensbedrohliche Hämolytisch Urämische Syndrom (HUS) auslösen können (113). Die als Hauptvirulenzfaktoren der STEC wirkenden Shigatoxine 1 und 2 (Stx1 und Stx2) (176) bestehen aus einer katalytisch aktiven A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten. Die B-Untereinheiten vermitteln die Bindung der Toxine an den Oberflächenrezeptor Globotriaosylzeramid (Gb_3/CD77) auf eukaryontischen Zellen (134, 175). Während des folgenden retrograden Transportes wird die A_1-Untereinheit enzymatisch abgespalten (66) und in das Zytosol translozierd. Dort inaktiviert sie die 60S-Untereinheit der Ribosomen. Die Hemmung der Proteinbiosynthese führt häufig zum Tod der Zelle (187, 224).

Im Zentrum der Pathogenese STEC-bedingter Erkrankungen des Menschen steht die zytoletale Wirkung der Stx auf mikrovaskuläre Endothelzellen (187). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Stx in verschiedenen Zellarten auch Zellfunktionen modulieren können ohne Zelltod zu induzieren (155, 159). Toxin-geschädigte Zellen bleiben dadurch im Gewebe über einen längeren Zeitraum erhalten, so dass die Wirkung der Stx protrahiert wird. Den modulierenden Wirkungen der Stx, vor allem der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, wird zunehmend eine große Bedeutung in der Pathogenese eingeräumt (202). Bei humanen Epithelzelllinien induzieren Stx die Synthese verschiedener Chemokine (258, 259). Die daraufhin vermehrt transmigrierenden Granulozyten erhöhen die Permeabilität der Schleimhaut (95). Zusätzlich lösen die bakteriziden Mechanismen der Granulozyten in den STEC eine gesteigerte Stx-Bildung aus (266). Derzeit geht man davon aus, dass erst die durch Entzündungsvorgänge verstärkte intestinale Toxinresorption zu den schweren Veränderungen extraintestinaler Organe bei HUS führt (202).

Bei adulten Rindern führt die STEC-Infektion nicht zur intestinalen Entzündung (164). Die Beschreibung von Stx-Rezeptoren auf Zellen im Kryptenbereich der Kolonschleimhaut des Rindes (88) warf deshalb die Frage nach der lokalen Wirkung der Stx beim Rind auf. Nach der Etablierung und Charakterisierung eines *in vitro*-Modells zur Kultivierung und Phänotypisierung von Primärkulturen boviner Kolonzellen war es das Ziel dieser Arbeit, die Wirkung des Stx1 auf die Vitalität dieser Zellen sowie die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine zu untersuchen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Rolle von Epithelzellen im Immunsystem der Darmschleimhaut

Für eindringende Krankheitserreger sind die Epithelzellen der Darmschleimhaut erste Kontaktstellen mit dem Wirtsorganismus. Es gibt viele Berichte darüber, dass die Darmepithelzelle als solche aktiv am Geschehen der angeborenen Immunabwehr teilnimmt (12). Somit erfüllt die Epithelzelle nicht nur passive Aufgaben als starre physische Barriere zwischen Außenwelt und innerem Wirtsmilieu, sondern repräsentiert vielmehr einen aktiven Teil im Kommunikationsnetzwerk aus Epithelzellen, Mikroben sowie Immun- und Entzündungszellen des Wirtes (109).

1.1. Barrierefunktion der Darmschleimhaut

Der dreischichtiger Aufbau der Darmschleimhaut (Mukosa) umfasst das *Epithelium mucosae* (Schleimhautepithel), die *Lamina propria mucosae* (Schleimhautbindegewebe) und die *Lamina muscularis mucosae* (Schleimhautmuskulatur) (239). Das einschichtige, hochprismatische *Epithelium mucosae* setzt sich je nach Darmregion aus verschiedenen Subpopulationen von Epithelzellen zusammen (112), die alle aus den in den Krypten gelegenen multipotenten Stammzellen hervorgehen. **Saumzellen** (absorptive Enterozyten), **Becherzellen** (schleimproduzierende Enterozyten) und **enteroendokrine Zellen** (hormonproduzierende Enterozyten) kommen sowohl im Dünn- als auch im Dickdarm vor. **Körnerzellen** (Paneth´sche Zellen) sind gewöhnlich nur in den Lieberkühn´schen Krypten des Dünndarms anzutreffen, und **M-Zellen** treten typischerweise nur im Schleimhautepithel über lymphoretikulären Immuneinrichtungen der *Lamina propria* des Dünn- und Dickdarmes auf (140).

1.1.1. Physische Barriere der Enterozyten selbst

Aufgrund ihrer physischen Struktur und ihrer dichten Zell-zu-Zell-Verbindungen („tight junctions“ (*zonulae occludentes*)) stellen die Enterozyten selbst einen Schutzwall gegen eindringende Krankheitserreger dar. Um an die Orte der Plasmamembran zu gelangen,

an denen Invagination stattfindet, müssen Antigene und Mikroorganismen zuerst den Mikrovilli-Rasen überwinden, der dicht gepackt und hin und her pendelnd den Zugang zur Enterozytenoberfläche erschwert. Selbst die Plasmamembran, ein Lipidbilayer mit integrierten Proteinen, wirkt aufgrund ihrer physischen Struktur als Grenzschicht (178). Die selektive Passage von Wasser, Ionen und verschiedenen Makromolekülen durch den parazellulären Raum wird durch die Barrierefunktion der „tight junctions“ reguliert. Diese apikalsten aller Zell-zu-Zell-Verbindungen umschließen die Epithelzellen wie ein gürtelartiges Band und sichern damit zugleich die Zellpolarität, indem sie apikale und basolaterale Domänen der Zellmembran voneinander separieren. „Tight junctions“ sind dynamische Strukturen, deren Funktion durch externe Stimuli, z.B. durch Zytokine, beeinflusst werden kann. Als Multiproteinkomplexe sind sie sowohl aus integralen Membranproteinen (z.B. Okkludin, Klaudin, „junctional adhesion molecules“ (JAMs)), als auch aus zytoplasmatischen Anteilen (ZO-1, ZO-2, ZO-3, „multi-PDZ-domain protein 1“ (MUPP1), Zingulin) aufgebaut (227).

1.1.2. Glykokalyx

Die Spitzen der Mikrovilli sind mit einer filamentösen Bürstensaumglykokalyx bedeckt. Diese stellt eine 400 bis 500 nm dicke Schicht aus verschiedensten Kohlenhydratketten membrangebundener Glykoproteine, Glykolipide und Mukopolysaccharide dar, die einen kontinuierlichen, unbewegten Schutzfilm auf der Enterozytenoberfläche bilden (148). In der Glykokalyx finden sich spezielle Rezeptoren für Antikörper und Hormone. Sie erlaubt die Diffusion von Nährstoffen und Verdauungsprodukten, schließt aber die meisten intakten Makromoleküle und Mikroorganismen aus. Auf diese Weise minimiert die Bürstensaumglykokalyx den Kontakt von Antigenen und Pathogenen mit der Enterozytenoberfläche (123).

1.1.3. Schleimschicht (Mukus)

Hauptbestandteil der das Darmepithel schützend überziehenden Schleimschicht (Mukus) ist mit über 95 % das Wasser. An Proteinen enthält der Mukus Albumin, Immunglobuline, α_1-anti-Trypsin, Lysozym, Laktoferrin und „epidermal growth factor“ (EGF). Charakteristische Komponenten sind Muzin, eine hoch visköse und elastische Lösung aus Glykoproteinen, sowie bestimmte Peptide der „Trefoil“-Peptid Familie

(219). Sowohl Muzin als auch das Peptid der „Trefoil“-Faktor Familie TFF3 werden von Becherzellen des Dünn- und Dickdarmes produziert (120, 196). Aufgrund seiner Resistenz gegenüber verschiedenen Enzymen wird der Mukus nicht verdaut und schützt als zähe Gelschicht die darunterliegenden Epithelzellen vor der Einwirkung von Verdauungsenzymen, Pankreas- und Gallensekreten sowie gegen die Adhärenz von pathogenen Mikroorganismen. Die Viskosität der Schleimschicht erschwert die Penetration durch Mikroorganismen und setzt die Beweglichkeit der Mikroorganismen herab. Gefangen im Schleimbett werden diese dann von der Peristaltik fortgetragen. Schutz gegen Krankheitserreger bieten auch diverse antibakteriell wirksame Mukusbestandteile wie Lysozym, Laktoferrin und sekretorisches IgA. Weiterhin reduziert der zähe Mukus die Diffusion von Molekülen in Richtung Epitheloberfläche. Da dieser Effekt vornehmlich größere Moleküle betrifft, wird vorrangig die Absorption von Antigenen limitiert und weniger die von Nährstoffmolekülen, welche kleiner sind. Außerdem führt die Mukusfreisetzung in das Darmlumen zur Bildung eines Sekretstromes, der potentielle Pathogene von den Epithelzellen wegströmen lässt (178).

1.1.3.1. Muzine

Muzine sind Glykoproteinmoleküle und bestehen aus Kohlenhydratseitenketten, die über N-Azetylgalaktosamine an ein Proteinskelett gebunden sind. Dieses enthält hohe Anteile an Serin-, Threonin- und Prolin-Resten (57). Die detailierte Zusammensetzung der Muzinmoleküle ist jedoch nicht nur tierartlich sehr verschieden, sondern auch in unterschiedlichen Darmabschnitten. Die Kohlenhydratanteile der Muzinmoleküle sind analog zu den Glykoprotein- und Glykolipidrezeptoren, die auf der Oberfläche von vielen Darmepithelzellen vorkommen. Viele Krankheitserreger heften sich mit Hilfe von speziellen Oberflächenbestandteilen (Fimbrien, Pili, Flagellen) an diese Epithelzellrezeptoren an. Muzin-Glykoproteine können deshalb als Kompetitoren bei der Bindung von Proteinen und Mikroorganismen an Enterozyten fungieren und auf diese Weise Mikroben abfangen, bevor diese mit dem Epithel in Kontakt kommen. Die Rolle von Muzinen im Verteidigungssystem des Darmes wird durch den protektiven Effekt von probiotischen Organismen wie z. B. *Lactobacillus* Spezies unterstrichen, die befähigt sind, die Muzinproduktion zu stimulieren (137).

1.1.3.2. Peptide der „Trefoil“-Faktor Familie

Die drei bisher bei Säugern beschriebenen Mitglieder der „Trefoil“-Faktor Familie werden von schleimproduzierenden Zellen im Gastrointestinaltrakt synthetisiert.

TFF1 (früher pS2) und TFF2 (früher SP, Spasmolytisches Polypeptid) kommen typischerweise in der Schleimhaut des Magens vor (54, 103), während TFF3 (früher Intestinaler Trefoil Faktor) ein Sekretionsprodukt der Becherzellen in Dünn- und Dickdarm ist (196) und sich in der Mukusschicht über dem Epithelzellrasen findet. Die Disulfid-Brückenbildung zwischen sechs konservierten Zysteinresten innerhalb der Aminosäurenkette führt zur charakteristischen Drei-Schleifen-Kleeblatt (Trefoil)-Struktur dieser Peptide. Diese kompakte Struktur des Kleeblatt-Motivs ist vermutlich für die bemerkenswerte Resistenz der „Trefoil“-Peptide gegen proteolytische Verdauung verantwortlich. „Trefoil“-Peptide bilden im Mukus Komplexe mit Muzin-Glykoproteinen und sollen so die physischen Eigenschaften der mukoviskösen Schleimschicht stabilisieren, die schützend über der Darmschleimhaut liegt (219). Dieser zytoprotektive Effekt wirkt der Bildung von Schleimhautulzerationen entgegen (14). Außerdem soll das synergistische Zusammenspiel von „Trefoil“-Peptiden und Muzinen die Restitution fördern. Restitution ist ein Reparaturprozess, der die schnellstmögliche Heilung von Epitheldefekten ermöglicht. Dabei wandern die der Wunde benachbarten Epithelzellen unter Abflachung in die entstandene Lücke ein und sorgen so für die rasche Wiederherstellung der Kontinuität und Integrität der Epithelschicht (219). Im Gegensatz zu Zytokinen ist der wundheilungsfördernde Effekt der „Trefoil“-Peptide unabhängig von TGF-β (47) und scheint eine allgemeine Eigenschaft dieser Peptide zu sein.

1.1.4. Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide sind Polypeptide kleiner als 100 Aminosäuren, die an Orten der Immunabwehr auftreten und in physiologischen Konzentrationen in ihrem Herkunftsgewebe antimikrobielle Wirkungen entfalten (61). Sie finden sich in den verschiedensten Verteidigungssystemen, von Pflanzensamen über die Hämolymphe von Arthropoden bis hin zu den neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen von Säugetieren und Menschen (146). Obwohl sie in ihrer Molekülstruktur sehr unterschiedlich sein können, haben alle antimikrobiellen Peptide gemeinsam, dass sie bereits in mikromolekularen Konzentrationen ein breites Wirkspektrum gegen

Mikroben besitzen. Verschiedenste Arten von Bakterien, Protozoen und Pilzen sowie in manchen Fällen auch virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zeigen sich empfänglich für die Effekte dieser Peptide (282).
Defensine und Kathelizidine repräsentieren die beiden Hauptgruppen antimikrobieller Peptide bei Menschen und Säugetieren. Histatine, Dermzidin und sog. anionische Peptide sind dagegen auf wenige Tierarten und Gewebe beschränkt (61).

1.1.4.1. Defensine

Aufgrund struktureller Unterschiede werden die Defensine der Säuger in die drei Hauptgruppen der α-, β- und θ-Defensine unterteilt (230).
α- und β-Defensine unterscheiden sich in der Länge der Peptidsegmente zwischen ihren sechs Zystein-Resten und der Paarung der Zystein-Reste, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (61). Obwohl in ihrer Disulfidbrücken-Bildung recht unterschiedlich, gleichen sich α- und β-Defensine doch in ihrer Tertiärstruktur, dem β-Faltblatt (18).
θ-Defensine hingegen sind grundsätzlich anders aufgebaut.

α-Defensine

α-Defensine sind Hauptbestandteile der Primärgranula von Säuger-Granulozyten (63) und werden nach der Fusion der Granula mit Phagosomen gegen die darin eingeschlossenen Mikroorganismen eingesetzt. Die Konzentration der Defensine in den Leukozyten-Granula kann mehr als 10 mg/ml betragen (61). Aber auch humane Monozyten und NK-Zellen exprimieren α-Defensine (230). Andere α-Defensine werden von den Paneth´schen Zellen der Lieberkühn´schen Krypten im Dünndarm sezerniert (181). Bei der Maus heißen sie deshalb Kryptdine und sind in der Vergangenheit intensiv untersucht worden. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass Maus-Leukozyten keine Defensine produzieren (50). Beim Menschen sind bislang Humanes Defensin 5 (HD5) und 6 (HD6) als Paneth-Zell-α-Defensine identifiziert worden (17). HD5 kommt auch in Epithelzellen des weiblichen Genitaltraktes vor (204).

β-Defensine

β-Defensine sind zuerst beim Rind als antimikrobielle Peptide des Atemwegsepithels beschrieben worden (45). Seitdem ist es gelungen, β-Defensine in vielen anderen

Spezies und diversen Epithelzelltypen nachzuweisen (44). Die bislang bekannten humanen β-Defensine 1, 2, 3 und 4 (HBD1-4) kommen in Epithelzellen und Leukozyten weit verbreitet vor (230).

θ-Defensine

Die θ-Defensine stammen von mutierten α-Defensinen ab und sind zuerst in Leukozyten von Rhesus-Affen entdeckt worden (252). Diese von drei Disulfidbrücken stabilisierten Moleküle repräsentieren das einzige bislang bei Tieren bekannte zyklische Polypeptidmotiv (230). θ-Defensine kommen bei verschiedenen Spezies von Alt-Welt-Affen vor, sind bisher aber nicht beim Menschen identifiziert worden (173).

Die Produktion der Defensine kann sowohl konstitutiv als auch nach Induktion erfolgen (230). Die Regulation der Defensin-Synthese und ihrer Freisetzung wird gewebsspezifisch durch mikrobielle Signale, Zytokine und manchmal auch durch neuroendokrine Signale gesteuert (61). Defensine werden zunächst als inaktive Präpropeptide synthetisiert und später durch posttranslationale proteolytische Abspaltung eines anionischen Peptidsegmentes aktiviert (62). Bei Mäusen ist die Metalloproteinase Matrilysin (MMP7), ein Enzym, das ebenfalls von den Paneth´schen Zellen synthetisiert wird, essentiell für die Kryptdin-Aktivierung aus inaktiven Vorläuferpeptiden (271). Paneth´sche Zellen des Menschen hingegen produzieren kein Matrilysin. Stattdessen übernimmt Trypsin die Rolle des Schlüsselenzyms, das für die Prozessierung von HD5 verantwortlich ist. HD5 und vermutlich auch HD6 werden als Propeptide in den Paneth´schen Zellen gespeichert. Von den gleichen Zellen wird Trypsin exprimiert, als Zymogen gespeichert, nach Sekretion von einer bislang unbekannten Protease aktiviert und wandelt dann HD5 in seine aktive Form um (70).
Paneth-Zell-α-Defensine zeigen gegenüber einer Reihe von Krankheitserregern mikrobizide Wirksamkeit. Rekombinantes humanes Paneth-Zell-HD5 ist aktiv gegen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und auch gegen *Candida albicans* (197). Neben der Unterbrechung des Energiestoffwechsels und der Störung von Biosynthesevorgängen in Mikroorganismen besteht ihr Hauptfunktionsmechanismus in der Zerstörung der bakteriellen Membranintegrität durch Permeabilisation (17, 61). Die initiale Bindung kommt zustande durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Peptidresten und

den negativ geladenen Molekülen, die auf der Oberfläche der Zielzellen vorkommen. Aufgrund ihres amphiphilen Molekülcharakters ist es den Defensinen daraufhin möglich, sich in die mikrobiellen Membranen einzuschleusen, deren Integrität zu stören und Poren zu formen (61). Die Wirtsmembranen, welche neutrale Phospholipide und Cholesterol enthalten, werden hingegen nicht angegriffen (18).

Zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Wirkung können Defensine auch andere Effekte auf Zellen ausüben. Bestimmte α-Defensine der Maus, Kryptdin-2 und -3, lösen bei Epithelzellen Chlorid-Sekretion aus (130). Das damit verbundene Ausspülen der Krypten könnte eine Verteidigungsstrategie gegen eingedrungene Krankheitserreger sein. Andere Defensine wiederum wirken chemotaktisch auf Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen (255, 278) und können so angeborene und erworbene Immunmechanismen verbinden.

Die geschätzte Defensin-Konzentration in den Krypten liegt mit mehr als 10 mg/ml weit über der für antimikrobielle Effekte ausreichenden Konzentration (13). Deshalb bieten die Defensine im Darmlumen sogar in verdünntem Zustand noch ausreichend Schutz für die von den Krypten entfernt gelegenen Epithelzellen auf den Villi. Defensine sorgen also für die Erhaltung der Epithelzellintegrität und wenden Schaden von den Stammzellen in den Krypten ab, die unabdingbar für die kontinuierliche Erneuerung der Epithelzellschicht sind (13). Weiterhin limitieren und beeinflussen sie Zahl und Zusammensetzung der Mikroben, die Krypten und Darmlumen besiedeln und tragen so zur Modellierung der natürlichen Darmflora bei (17).

1.1.4.2. Kathelizidine

Peptide der Kathelizidin-Familie kommen bei vielen verschiedenen Säugerspezies vor und nehmen aktiv an der Regulierung der antimikrobiellen Wirtsabwehr teil. Ihr Name leitet sich von dem zuerst aus Leukozyten des Schweines isolierten „Cathelin“ (cathepsin L inhibitor) ab (211). Sie werden in unprozessierter Form als zweiteilige Holoproteine in Zellen gespeichert, wobei eine strukturell äußerst variable C-terminale antimikrobielle Sequenz mit einer evolutionär konservierten N-terminalen Prosequenz, der „Cathelin-Domäne“, verbunden ist (282). Diese intrazelluläre Speicherform wird aktiv, wenn Cathelin-Domäne und antimikrobielle Domäne durch proteolytische Spaltung voneinander getrennt werden (281). Der Mensch besitzt nur ein einziges Kathelizidin-Gen, dessen Produkt hCAP-18 (human cationic antimicrobial protein 18)

hauptsächlich in den Sekundärgranula von neutrophilen Granulozyten vorkommt. Nach proteolytischer Spaltung zerfällt es in das C-terminale antimikrobielle Peptid LL-37 und die Cathelin-Domäne (129), die beide in komplementärer Weise antimikrobielle Aktivitäten entfalten (280). Außer in neutrophilen Granulozyten wird hCAP-18 auch in Monozyten, Mastzellen und γδ-T-Zellen (7, 43) sowie in Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen exprimiert (108). Im Gegensatz zum Menschen sind Rinder mit vielen verschiedenen Kathelizidin-Peptiden ausgestattet, von denen BMAP-28 (bovine myeloid antimicrobial peptide) das bekannteste ist (281).

1.1.4.3. Histone

Nicht nur die Paneth´schen Zellen der Lieberkühn´schen Krypten, auch die Enterozyten auf den Villi sind mit antimikrobiellen Molekülen ausgerüstet und können zusätzlich zu dem permanent bestehenden Verteidigungssystem der Defensine speziell nach Verletzung des Epithels antimikrobielle Aktivitäten entfalten. Rose et al. haben aus der terminalen Ileumschleimhaut des Menschen Histon H1-Proteine und deren Fragmente isoliert und gezeigt, dass diese Proteine antimikrobielle Wirkung gegen *Salmonella typhimurium* und gegen Bakterien, die normalerweise im menschlichen Dickdarm vorkommen, ausüben. Histon H1-Proteine werden hauptsächlich in eukaryontischen Zellkernen exprimiert. Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben H1-Proteine aber auch im Zytoplasma von intestinalen Villusenterozyten detektiert. Weiterhin ist festgestellt worden, dass abgeschilferte Villuszellen Histon H1 und Histonfragmente in das Darmlumen freisetzen, wenn sie in Apoptose übergehen. Während das Histon H1-Protein im Zytoplasma die Enterozyten der Villi vor invasiven Mikroorganismen schützt, gewähren das von abgeschilferten Zellen freigesetzte Histon H1 und dessen Fragmente einen weitläufigeren Schutz gegen luminale Pathogene (215).

1.1.5. Apoptose

Von einer Reihe von Krankheitserregen ist bekannt, dass sie die Apoptose von Wirtszellen induzieren. Beispielsweise lösen invasive Pathogene wie *Salmonella* und *Shigella in vitro* bei einem Teil von intestinalen Epithelzellen des Menschen Apoptose aus (33, 119). Als Schutzmechanismus des Epithels, mit dem es infizierte Zellen abstößt und sich so der Krankheitserreger entledigt, könnte der pathogeninduzierte

programmierte Zelltod eine Verteidigungs-strategie des Wirtes darstellen (80). Ebenso scheint die von Rose et al. beschriebene Histonfreisetzung durch apoptotische Epithelzellen eine protektive Reaktion zu sein, um antimikrobielle Wirkung zu vermitteln (215).

1.2. Zusammenwirken von Epithelzellen und organisiertem lymphatischen Gewebe in der Darmschleimhaut

Die Mehrheit der an der Immunabwehr beteiligten Zellen verteilt sich diffus über das subepitheliale Verbindungsgewebe. Als Effektorzellen gehören dazu namentlich differenzierte B-Zellen, zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen, Schleimhautmakrophagen und dendritische Zellen. Diese Zellen verhindern das Eindringen von Kommensalen und Pathogenen über die Schleimhautschranke und zerstören Krankheitserreger und infizierte Zellen, falls doch eine Invasion stattgefunden hat (123). Die *Lamina propria* der Darmschleimhaut enthält mehr Antikörper-produzierende B-Zellen als jedes andere Organ im Körper (24). Der Großteil der Antigene im Darmtrakt entstammt jedoch der Nahrung oder der natürlichen Mikroflora, und diese Antigene lösen normalerweise keine Immunantwort aus. Dies ist möglich, weil antigenpräsentierende Zellen, Lymphozyten und Epithelzellen der Schleimhaut befähigt sind, Immunreaktionen auf Nahrungsantigene und Kommensalen zu unterdrücken. Diese modulierte Immunantwort führt schließlich zu dem Phänomen der „oralen Toleranz“ (178).

Trotz und neben seiner mannigfaltigen Schutzfunktionen beliefert das Epithel das Schleimhautimmunsystem beständig mit Informationen aus und über die Umwelt. Im Dienste einer effektiven Immunüberwachung der Schleimhautoberfläche muss das Epithel auch Wege bereithalten, auf denen Antigene und Mikroorganismen dem Darmimmunsystem zugeführt werden können, um eine adäquate Immunantwort auszulösen. Diese enge Zusammenarbeit zwischen Epithel- und Immunzellen des Darmes geschieht an spezialisierten Orten mit organisiertem lymphatischen Gewebe (142, 171).

1.2.1. Organisiertes lymphatisches Gewebe in der Darmschleimhaut

Spezielle „sentinel sites" in der Mukosa sind charakterisiert durch das Vorkommen von organisiertem lymphatischen Gewebe und einem darüberliegenden spezialisierten Epithel, dem sog. Follikel-assoziierten Epithel (FAE). An diesen Orten kommt es zu Transport, Prozessierung und Präsentation von Antigenen sowie zur Induktion von antigenspezifischen Effektorlymphozyten (123). Die Lokalisation des organisierten lymphatischen Gewebes der Schleimhäute ist genetisch festgelegt und häuft sich besonders an den Körperöffnungen als potentiellen Eintrittspforten für Krankheitserreger. Das Kennzeichen Mukosa-assoziierten organisierten lymphatischen Gewebes (MALT) ist das Vorhandensein von Lymphfollikeln. Solitäre Lymphknötchen treten über den gesamten Darmtrakt verteilt auf und nehmen in Abhängigkeit vom Vorkommen der natürlichen Darmflora im distalen Ileum und im Kolon an Häufigkeit zu. Im distalen Ileum verdichten sich die Lymphfollikel zu makroskopisch sichtbaren Platten, den sog. „Peyer´schen Plaques" (171). Die Lymphfollikel der Peyer´schen Plaques bestehen aus einer Ansammlung naiver B-Zellen und einem Netzwerk aus follikulären dendritischen Zellen. Jeder Follikel wird von T-Zell-reichen Arealen flankiert, in welche hochendotheliale Venen eingebettet sind, die als Eingangs- und Ausgangspunkte für wandernde Zellen dienen (115, 171). Im Darm exprimieren diese Venen das Schleimhaut-Adressin MadCAM-1, welches von Zellen erkannt wird, die das $\alpha_4\beta_7$-Integrin tragen, den Schleimhaut-„Homing"-Rezeptor, der die in der Mukosa induzierten Lymphozyten aus der Zirkulation wieder zurück in die Darmschleimhaut dirigiert (30). Oberhalb jeden Follikels befindet sich eine subepitheliale Domregion, die reich an B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen ist, die sowohl untereinander als auch mit dem darüberliegenden FAE interagieren (123).

1.2.2. Besonderheiten des Follikel-assoziierten Epithels

Das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) ist spezialisiert auf die Aufnahme von Antigenen und Mikroorganismen aus dem Darmlumen. Es unterscheidet sich in wesentlichen Punkten vom Villusepithel, dessen vornehmliche Aufgabe die Absorption und Verdauung von Nährstoffen ist. Während das Villusepithel hauptsächlich aus absorptiven Enterozyten, schleimproduzierenden Becherzellen und enteroendokrinen Zellen besteht, enthält das FAE fast keine Becherzellen oder enteroendokrinen Zellen

(183). Obwohl es durchaus strukturelle Gemeinsamkeiten wie Säulenform und Ausbildung von Bürstensaum und Bürstensaumglykokalyx gibt, unterscheiden sich die Enterozyten des FAE doch erheblich von den absorptiven Enterozyten der Villi. Der Bürstensaum der Enterozyten des FAE enthält viel weniger Membran-assoziierte Hydrolasen, die unabdingbar für die Verdauung sind (123). Die solchermaßen herabgesetzte Digestionsaktivität erlaubt es vielen Antigenen, intakt zu bleiben (226). Außerdem wird im FAE nur in geringem Maße Mukus produziert (183), und in den Follikel-assoziierten Krypten kommen nur wenige Defensin- und Lysozym-produzierende Paneth´sche Zellen vor (71). Weiterhin fehlt es dem gesamten FAE an polymerischem Immunglobulinrezeptor, weshalb es nicht in der Lage ist, protektives Immunglobulin A (IgA) aus dem Interstitium in das Darmlumen zu transportieren (185). All diese Eigenschaften fördern den direkten Kontakt von intakten Antigenen und Pathogenen mit der Oberfläche des FAE. Schließlich fehlen dem FAE die subepithelialen Myofibroblasten, und auch die Basallamina ist anders aufgebaut als die der Villusenterozyten. Ihr fehlt das Laminin-2, und sie ist von einer Vielzahl von Poren durchbohrt, was möglicherweise das schnelle Ein- und Auswandern von Zellen in das Epithel ermöglicht (150).

Eine weitere Besonderheit ist die Expression FAE-spezifischer Chemokine. Die FAE-Enterozyten exprimieren spezielle „Homing“-Chemokine, die wichtig für die Formation und Strukturerhaltung des organisierten lymphatischen Gewebes sind (123). Im Gegensatz zu pro-inflammatorischen Chemokinen, die als Antwort auf Alarmsignale abgegeben werden, werden diese „Homing“-Chemokine kontinuierlich sezerniert (15). Das „Homing“-Chemokin TECK (thymus expressed chemokine), ein CC-Chemokin, wird von Villusenterozyten des Dünndarmes und von FAE-Zellen exprimiert (274). Es wirkt chemotaktisch auf $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten, die den CCR9-Rezeptor tragen, und fördert somit deren Wanderung in die *Lamina propria* und in das Epithel von Villi und FAE.

Ein anderes CC-Chemokin, MIP3α (macrophage inhibitory protein), wird von FAE-Zellen des Menschen und der Maus produziert (251) und gilt als erster Marker für das FAE. Es induziert die Chemotaxis naiver B- und T-Zellen sowie dendritischer Zellen, die CCR6-Rezeptoren tragen.

Einzigartig für das FAE ist das Vorkommen von hochspezialisierten Antigen-sammelnden membranösen oder Mikrofaltenzellen (M-Zellen). Sie liefern

Fremdmaterial aus dem Darmlumen durch aktiven transepithelialen vesikulären Transport direkt an intraepitheliale Lymphozyten und an das subepitheliale organisierte lymphatische Gewebe (170).

1.2.3. Die Schlüsselfunktion der M-Zellen

M-Zellen sind hochspezialisierte Epithelzellen, die charakteristischerweise im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) über organisiertem lymphatischen Gewebe der Schleimhäute vorkommen. M-Zellen sind dahingehend typische Epithelzellen, dass sie „tight junctions“ ausbilden und durch diese Polarisation eine apikale und eine basolaterale Membran definiert werden kann. Die apikale Membran der M-Zellen scheint dazu bestimmt zu sein, das Anhaften und die Aufnahme von Makromolekülen, Partikeln und Mikroorganismen zu fördern. Ein typischer Bürstensaum mit Glykokalyx fehlt generell. Stattdessen tragen die M-Zellen kurze, irreguläre Mikrofalten („microfold cells“), zwischen denen weite Plasmamembrandomänen dem Darmlumen ausgesetzt sind (123). M-Zellen besitzen zwar keine polymerischen Immunglobulinrezeptoren an ihrer basolateralen Membran, exprimieren aber IgA-bindende Rezeptoren auf ihrer darmlumenseitigen Zelloberfläche (143). Diese Morphologie erlaubt Antigenen und Mikroorganismen leichten Zugang zur apikalen Membran der M-Zellen, wo sie internalisiert und anschließend zum darunterliegenden lymphatischen Gewebe transportiert werden (142). Die Aufnahmemechanismen sind abhängig von der Partikelgröße: Makromoleküle und Bakterien lösen Phagozytose aus (183), Viren und andere anheftende Partikel werden über Klathrin-ummantelte Vesikel endozytiert (172), während nicht-anhaftendes Material durch Flüssigphase-Endozytose aufgenommen wird (67, 182).

Ein besonderes Charakteristikum der M-Zellen ist ihre intraepitheliale Tasche, die durch tiefe Einstülpungen der basolateralen Membran entsteht und die Zelloberfläche immens vergrößert. Darin beherbergen die M-Zellen verschiedene Subpopulationen von Lymphozyten und Makrophagen, die aus dem Lymphgewebe in dieses einzigartige Kompartiment einwandern (169). Bisher ist relativ wenig über die Funktion dieser Zellen bekannt. M-Zell-Taschen enthalten B- und T-Lymphozyten und gelegentlich auch dendritische Zellen, wobei die T-Zellen anders als die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) aus dem Villusepithel größtenteils $CD4^+$ sind (53, 99). Die Entwicklung der B- und T-Zellansammlungen scheint abhängig von der mikrobiellen

Keimflora des Darmes zu sein, jedenfalls fehlt sie bei keimfrei aufgezogenen Tieren (276).

Der Hauptpassageweg für endozytiertes Fremdmaterial in M-Zellen ist der transepitheliale vesikuläre Transport. Fast keine aufgenommenen Partikel werden in Lysosomen dirigiert (123). Die Strecke, die transzytotische Vesikel nehmen müssen, um das Epithel zu passieren, wird erheblich verkürzt durch die Nähe der basolateralen Tasche zur apikalen Zellmembran (170). Der Transport über den 1 bis 2 µm großen Spalt kann sich bereits innerhalb von 10 bis 15 Minuten vollziehen (123, 172). Die endosomalen Kompartimente der M-Zellen sind sauer (9) und enthalten die Protease Kathepsin E (55), trotzdem ist es bislang nicht bekannt, inwieweit endozytiertes Material während des transepithelialen Transportes degradiert wird oder ob M-Zellen an der Prozessierung und Präsentation von Antigenen beteiligt sind (171).

Die speziellen Eigenschaften von M-Zellen sind wichtig für die Auslösung von protektiven Immunantworten in der Schleimhaut, indem sie Anheftung, Aufnahme und immunologische Überwachung von Mikroorganismen erleichtern. Andererseits aber machen sie den Organismus verwundbar für die Invasion bestimmter Krankheitserreger, die den M-Zell-Transport als Eintrittspforte in die Schleimhaut ausnutzen und so die Epithelschranke überwinden (170). Viele Pathogene überleben die M-Zell-Transzytose und können danach Schleimhautzellen oder das Epithel selbst infizieren (193) oder verbreiten sich in manchen Fällen auch systemisch.

1.2.4. Die Schlüsselfunktion der dendritschen Zellen

Direkt unter dem FAE, in der subepithelialen Domregion (115), sowie in der *Lamina propria* des gesamten Darmes finden sich verschiedene Subpopulationen von dendritischen Zellen. Von M-Zellen transportierte Antigene werden möglicherweise von unreifen dendritischen Zellen in der Domregion endozytiert und zu den interfollikulären T-Zell-Arealen verbracht, wo es zur Reifung der dendritischen Zellen und zur Antigenpräsentation kommt (98, 115). Durch ihre Wanderung können dendritische Zellen so die Verbreitung der durch M-Zellen eingedrungenen Pathogene erleichtern. Dendritische Zellen können aber auch selbst Antigene und Mikroorganismen aus dem Darmlumen sammeln (93, 208). *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass dendritische Zellen dazu befähigt sind, die „tight junctions“ zwischen den Epithelzellen zu öffnen und daraufhin Zellfortsätze in das Darmlumen vorzustrecken,

mit denen sie direkt Partikel internalisieren können. Dabei bleibt die Integrität des Epithels erhalten, weil die dendritischen Zellen „tight junction“-Proteine wie Klaudin-1, Okkludin und Zonula occludens-1 exprimieren, während sie ihre Dendriten zwischen den Epithelzellen hindurchstrecken (208).

1.3. Bedeutung der resorptiven Epithelzelle im Immunsystem

1.3.1. Die Epithelzelle als Antigen-präsentierende Zelle

In der Darmschleimhaut stehen Epithelzellen in engem Kontakt mit zwei grundsätzlich verschiedenen Populationen von T-Lymphozyten: Dabei handelt es sich vor allem um intraepitheliale Lymphozyten (IEL), die direkt innerhalb des Schleimhautepithels gelegen sind (Kapitel 2.3.2) und um *Lamina propria* Lymphozyten (LPL), die sich unterhalb der Basalmembran befinden. Basolaterale Zellprojektionen, die von den Epithelzellen durch Poren in der Basalmembran gesandt werden, erleichtern den direkten Kontakt zwischen dem Epithel und den Immunzellen in der *Lamina propria* (86). Epithelzellen empfangen Signale aus dem Darmlumen, verarbeiten sie und leiten diese Informationen an IEL und LPL weiter. Umgekehrt erhalten auch Epithelzellen Signale von Lymphozyten, welche ihre Barrierefunktion oder ihren Differenzierungsgrad ändern können (231). Diese Konversation geschieht nicht nur indirekt über die Sekretion löslicher Moleküle (z.B. Chemokine), sondern auch direkt, indem Epithelzellen luminale Antigene prozessieren und antigenspezifischen Lymphozyten präsentieren. Die dafür notwendigen Oberflächenmoleküle werden entweder konstitutiv oder induziert auf den Epithelzellen exprimiert und erlauben es diesen, als nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen zu fungieren.

Wie die Mehrzahl aller kernhaltigen Zellen exprimieren intestinale Epithelzellen klassische MHC-Moleküle der Klasse I, mit denen intrazelluläre Peptid-Antigene $CD8^+$ T-Zellpopulationen präsentiert werden können (195). Die große Mehrheit der IEL sind $CD8^+$ T-Zellen, denen somit große Bedeutung in der Kontrolle intrazellulärer Vorgänge wie Virusinfektion, zellulärer Stress und tumoröser Entartung zukommt (22). Aber auch MHC-Moleküle der Klasse II sind auf intestinalen Epithelzellen von Mensch, Maus und Ratte beschrieben worden (21, 110, 149) und ermöglichen Interaktionen mit $CD4^+$ T-Zellen, die vorwiegend in der *Lamina propria* zu finden sind,

in begrenzter Anzahl aber auch als IEL vorkommen (86). Als Antwort auf pro-inflammatorische Signale (z.B. IFN-γ) kann die Expression der MHC-Moleküle hochreguliert werden (231). Die Antigen-Prozessierung in Epithelzellen geschieht in einer höchst polarisierten Weise, indem die apikal meist durch Flüssigphase-Pinozytose (240) aufgenommenen Antigen-Moleküle sortiert, prozessiert und schließlich basolateral präsentiert werden (84, 85). Wie anderen nicht-professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) fehlen Epithelzellen aber die klassischen co-stimulierenden Moleküle (z.B. CD80 (B7-1), CD86 (B7-2)), die für die Aktivierung naiver T-Zellen benötigt werden (231).

Neben den klassischen Antigen-präsentierenden Molekülen der MHC-Klassen I und II exprimieren intestinale Epithelzellen eine Vielfalt an nicht-klassischen MHC-I-Molekülen, die in der Darmschleimhaut auffallend häufiger vorkommen als in anderen Geweben (22). Dazu gehören beim Menschen das Humane Leukozyten Antigen E (HLA-E), MICA und MICB (MHC-class I-chain-related genes A and B), CD1d und ULBP (unique long 16-binding protein). Die Expression dieser Moleküle erlaubt es den Epithelzellen, mit einer Vielzahl von Zelltypen zu kommunizieren, die sowohl dem angeborenen als auch dem erworbenen Immunsystem angehören, und Antigene vor allem immunsupprimierenden $CD8^+$ T-Zellen zu präsentieren (86). Sowohl MICA und MICB als auch ULBP interagieren mit dem natürlichen Killerrezeptor (NK-Rezeptor) NKG2D, der auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), $CD8^+$ αβ T-Zellen, γδ T-Zellen und Makrophagen vorkommt, NK-Zellen aktiviert und T-Zellen co-stimuliert (231). HLA-E bindet an die Rezeptoren NKG2A, B und C, die von NK-Zellen und bestimmten $CD8^+$ T-Zellen expimiert werden (27).

In der Darmschleimhaut wird CD1d in zwei biochemisch unterschiedlichen Formen exprimiert: Eine nicht mit β2-Mikroglobulin (β2-m) assoziierte Form ist auf die apikale Oberfläche beschränkt, während die vollständig glykosilierte β2-m-assoziierte Variante sowohl apikal als auch basolateral vorkommt (241). Andere Mitglieder der CD1-Familie sind bekannt dafür, dass sie mykobakterielle Glykolipid-Antigene präsentieren (201). Ebenso könnte CD1d bakterielles Glykolipid- oder Glykoprotein-Antigen den T-Lymphozyten in der Darmschleimhaut präsentieren.

Die Antigen-Präsentation durch intestinale Epithelzellen dient unter physiologischen Umständen offenbar der Inaktivierung oder Unterdrückung der normalen Immunantwort. Im Krankheitsfall funktionieren diese Regulationsmechanismen aber oft

nicht. So führt der Verlust der Epithel-Integrität zur unkontrollierten Entzündung, weil Antigene, die nun auf parazellulärem Wege in die *Lamina propria* gelangen, dort von professionellen APCs (DCs, Makrophagen) aufgenommen werden und eine aktive Immunantwort auslösen, die durch Epithelzell-vermittelte Antigen-Präsentation verhindert worden wäre (232).

1.3.2. Zusammenarbeit mit intraepithelialen Lymphozyten

Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) siedeln sich nach ihrer Einwanderung durch die Basalmembran direkt innerhalb der Epithelschicht an, wo sie eng verzahnt mit den lateralen Zellwänden der benachbarten Epithelzellen vorkommen. Dabei kommt etwa ein IEL auf fünf Epithelzellen. IEL sind die ersten Immunzellen, die sich eindringenden Pathogenen entgegenstellen, und sie rezirkulieren nicht, was ihre besondere Aufgabe in der lokalen Immunüberwachung der Mukosa betont (86). Bezüglich Phänotyp, Entwicklung und Funktion stellen die IEL eine äußerst heterogene Gruppe dar (34), meist aber handelt es sich um T-Zellen mit αβ- oder γδ-T-Zellrezeptor (TCR) (78). Allen IEL gemeinsam ist die Expression des $\alpha_E\beta_7$-Integrins, welches an das auf Epithelzellen vorkommende E-Kadherin bindet (31, 86).

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben, ist die Kommunikation zwischen Epithelzellen und IEL wesentlich für die Aufrechterhaltung einer immunologischen Homöostase in der Darmschleimhaut (275). Darüberhinaus überwachen IEL ihre epithelialen Nachbarn und spielen eine zentrale Rolle bei der epithelialen Wundheilung sowie bei der Elimination kranker und geschädigter Epithelzellen. Besonders intraepitheliale γδ-T-Zellen sind an der Heilung beschädigten Epithelgewebes beteiligt, indem sie epitheliale Wachstumsfaktoren wie z. B. das Mitogen KGF-1 (keratinocyte growth factor 1) produzieren, welches die Proliferation und die Differenzierung von Epithelzellen unterstützt (32, 78). Über ihren Vδ1 TCR (76) erkennen sie MICA und MICB, die nicht nur Liganden für den NK-Rezeptor NKG2D darstellen, der ebenfalls auf γδ-T-Zellen vorkommt (206), sondern auch von intestinalen Epithelzellen nach Schädigung, Erkrankung oder tumoröser Entartung exprimiert werden (75). Solchermaßen geschwächte und in ihrer Funktion beeinträchtigte Epithelzellen können von den γδ-T-Zellen durch Lyse aussortiert werden. Diese IEL leisten damit einen weiteren Beitrag zur Erhaltung der Integrität der Epithelzellschicht.

1.3.3. Transport von sekretorischen Immunglobulinen

Immunglobulin A (IgA) ist der klassische Schleimhautantikörper. IgA gelangt über einen speziellen Transportmechanismus, bei dem der polymerische Immunglobulinrezeptor (pIgR) eine bedeutende Rolle spielt, in die Schleimhautsekrete. Auf der Oberfläche der Mukosa übt IgA extrazelluläre Antikörperfunktionen aus. In enger Zusammenarbeit mit angeborenen unspezifischen Verteidigungsmechanismen sorgt es in einer „first line defence“ für nicht-inflammatorischen adaptiven Schleimhautschutz („immune exclusion“), der die initiale Kolonisierung der Epithelzelloberfläche durch Pathogene verhindern kann (127).

1.3.3.1. Herkunft und Aufbau der Immunglobuline

Sekretorische Schleimhäute und exokrine Drüsen beherbergen die meisten aktivierten B-Zellen des Körpers. Unterstützt von dendritischen Zellen werden $CD4^+$-T-Zellen durch mikrobielle und andere Antigene aktiviert und sezernieren Zytokine wie z. B. TGF-β und IL-10, wodurch sie antigenspezifische B-Zellen aktivieren (26). Solchermaßen geprägte B-Zellen proliferieren und differenzieren auf ihrem Weg durch regionale Lymphknoten, bevor sie über das periphere Blut wieder zu den Effektor-Kompartimenten der Schleimhaut zurückkehren. An diesen Orten schließen sie ihre endgültige Differenzierung ab und werden zu lokalen IgA-produzierenden Plasmazellen (25).

IgA wird zum überwiegenden Teil als Dimer sezerniert, kommt aber auch als größeres Polymer (pIgA) vor. Die Immunglobulinuntereinheiten der Dimere bzw. Polymere, jeweils bestehend aus zwei H- (heavy) und zwei L- (light) Polypeptidketten, werden von der sog. J-Kette (joining chain) miteinander verbunden. Dieses ca. 15 kDa große Peptid wird ebenfalls von Plasmazellen exprimiert und ist essentiell für die korrekte Polymerisation von IgA und pIgA und auch von pentamerischem IgM (104, 105) sowie für die Bindung dieser Immunglobuline an den polymerischen Immunglobulinrezeptor.

1.3.3.2. Der polymerische Immunglobulinrezeptor (pIgR)

Der polymerische Immunglobulinrezeptor ist ein ca. 100 kDa großes transmembranöses Glykoprotein, welches an der basolateralen Membran von Epithelzellen exprimiert wird. Er besteht aus einer externen IgA-Bindungseinheit, einer intramembranösen Domäne und einer zytoplasmatischen Fraktion (127). Die Ligand-Rezeptor-Komplexe

werden endozytiert, in Vesikeln durch die Epithelzelle geschleust und am apikalen Zellpol proteolytisch gespalten. Der ca. 80 kDa große extrazelluläre Anteil des pIgR bleibt als sog. gebundene sekretorische Komponente (SC) an sekretorisches IgA (SIgA) und IgM (SIgM) gebunden und stabilisiert die sekretorischen Antikörper im Darmlumen (25). Speziell die kovalente Bindung zwischen der sekretorischen Komponente und einer α-Kette des pIgA macht SIgA zum stabilsten Antikörper des Immunsystems (26, 105). Der gespaltene, aber nicht mit Imminglobulinen besetzte extrazelluläre Anteil des pIgR wird als sog. freie sekretorische Komponente entlassen. Obwohl die pIgR-Expression konstitutiv erfolgt, kann sie auf transkriptioneller Ebene auch von den immunregulatorischen Zytokinen IFN-γ und IL-4 und ebenso von den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF-α und IL-1 hochreguliert werden (26).

1.3.3.3. Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn)

Als neonataler Immunglobulinrezeptor schleust FcRn Immunlobuline über die Plazenta und den neonatalen Darm und sorgt für die passive Immunisierung des Neugeborenen (124, 128, 246). Aber auch auf dem Darmepithel adulter Individuen wird FcRn exprimiert (97). Dort kann FcRn anders als z. B. pIgR IgG bidirektional zwischen dem apikalen und dem basolateralen Pol der Epithelzelle transportieren (46). Auf diese Weise wird IgG-gebundenes Antigen durch FcRn zu den APCs in der *Lamina propria* überführt und die Antigenpräsentation ermöglicht.

1.3.3.4. Funktionen der sekretorischen Immunglobuline

Im Darmlumen kann SIgA an Antigene und Mikroben binden und so verhindern, dass diese sich an die Schleimhautoberfläche anheften oder den Monolayer penetrieren. Das Vermögen, Mikroorganismen zu agglutinieren, mit ihren Flagellen zu reagieren und sie damit weniger beweglich zu machen sowie Interaktionen zwischen mikrobiellen Adhäsinen und deren Rezeptoren auf der Epithelzelloberfläche zu blockieren, spielt dabei eine wesentliche Rolle (127). Wegen der mukophilen Eigenschaften seiner gebundenen sekretorischen Komponente (192) kann SIgA außerdem das Festkleben von Bakterien und anderen Antigenen im zähen Schleim verstärken und sie so der anschließenden Reinigung durch peristaltische Wellen zuführen. Weitere Schutzfunktionen bietet die Fähigkeit von SIgA-Antikörpern, den Verlust von bakteriellen Plasmiden zu induzieren, die für Adhäsionsmoleküle und

Antibiotikaresistenz kodieren (198). Im MALT unterstützen IgA-bindende Rezeptoren auf M-Zellen die Antigenaufnahme, was zur positiven Beeinflussung der Induktionsphase der Schleimhautimmunität beiträgt (143). Außerdem kann SIgA an lösliche bakterielle Produkte binden und deren Effekte blockieren (127).

Sowohl pIgA als auch pIgM, die von pIgR internalisiert worden sind, können bereits intrazellulär Viren (z. B. Rotavirus, Influenzavirus, humanes Immundefizienzvirus) inaktivieren, wenn spezifische Immunglobuline auf ihrem Transzytoseweg durch die Zelle auf bereits eingedrungene Viren treffen. Sie befördern diese Pathogene und ihre Produkte zurück ins Darmlumen und vermeiden so Beschädigungen des Epithels. Genauso ist es denkbar, dass IgA-Dimere mit eingedrungenen Antigenen in der *Lamina propria* reagieren und diese dann mittels pIgR-vermitteltem Transport durch das Epithel zurück in das Darmlumen schaffen (25). Das ist möglich, weil die Fab-Regionen des IgA, die Antigen binden, von den Fc-Regionen, die an pIgR binden, separiert sind. So können Epithelzellen nicht nur freies IgA, sondern auch IgA-Antikörper transportieren, die Antigen gebunden haben. Dieser Antigen-Exkretionsmechanismus trägt ebenso zur „immune exclusion“ bei wie die generell anti-inflammatorischen Eigenschaften von IgA: Die Fc-Komponenten der Antikörper haben sekundäre Funktionen, die erst eine Rolle spielen, nachdem die Fab-Teile Antigen gebunden haben. IgG- und IgM-Antikörper können dann effizient das Komplementsystem aktivieren, und IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Gewebsmastzellen und Blutbasophilen können die Freisetzung von Histamin oder anderen Entzündungsmediatoren auslösen. Im Falle von IgA aber ist das Fc-Fragment verantwortlich für die Bindung an pIgR und löst den transepithelialen Transportmechanismus aus. IgA kann den klassischen Weg des Komplementsystems nicht aktivieren und den alternativen Weg nur sehr ineffizient. So kommt es selbst in Gegenwart von Antigen-Antikörper-Komplexen nicht zur Auslösung einer Entzündungsreaktion in der Schleimhaut, die Zellen und Gewebe schädigen würde. Vor diesem Hintergrund macht es Sinn, IgA als anti-inflammatorisches Immunglobulin zu sehen, dessen Hauptaufgabe in der „immune exclusion“ liegt, da der exzessive Kontakt von Darmschleimhaut und Antigenen sonst zu einem Zustand der chronischen Entzündung führen würde (127). Ebenso gewährt die freie SC Schutz vor Infektionen, ohne dabei Gewebeschäden durch Auslösung einer Entzündungsreaktion zu verursachen. Sie kann die Adhäsion von *Escherichia coli* an Epithelzellen verhindern

(74) und das Toxin von *Clostridium difficile* binden (39). SC bindet und inhibiert auch IL-8, das ein potenter chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten ist (145).
Beim Menschen gibt es zwei Unterklassen von IgA, IgA1 und IgA2, die zu unterschiedlichen Anteilen in unterschiedlichen Geweben vorkommen. Bestimmte Bakterien exprimieren IgA-Proteasen, extrazelluläre Enzyme, die speziell IgA1 spalten und so Fab- und Fc-Fragmente produzieren. IgA2 ist resistent gegenüber diesen Enzymen. Weil IgA-Proteasen nur von einer begrenzten Gruppe von Bakterien synthetisiert werden, die Schleimhautoberflächen besiedeln, könnten sie als Virulenzfaktoren gesehen werden, die die Infektion fördern, indem antibakterielle Antikörper abgebaut werden. Zu diesen Bakterien gehören *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeea* (127).
Das pentamerische Immunglobulin M (IgM) bindet ebenso wie IgA an den pIgR und wird selektiv in die Schleimhautsekrete abgegeben; allerdings wirkt es nicht so effizient wie IgA. IgM ist jedoch ein potenter Komplementaktivator. Bei Patienten mit selektiver IgA-Defizienz kann IgM den reduzierten Schleimhautschutz teilweise kompensieren.
Immunglobulin G (IgG), hauptsächlich ein systemischer Antikörper, wird von einer kleinen Minderheit von Plasmazellen in der Schleimhaut sezerniert. Es gibt keinen speziellen Transportmechanismus für IgG, es kann aber bei Entzündung und anderer Schleimhautschädigung auf die Epithelzelloberfläche diffundieren. Dort aktiviert IgG Komplement oder bindet an die Rezeptoren von Phagozyten.
IgE-produzierende Zellen sind häufiger in den lymphatischen Geweben der Schleimhäute als in den systemischen vertreten. Mastzellen, die zahlreich in der *Lamina propria* vorkommen, tragen hochaffine Rezeptoren für IgE und können dadurch zur Freisetzung potenter Entzündungsmediatoren wie Histamin oder Zytokine veranlasst werden. Bei Patienten mit vermehrter IgE-Produktion kann es auf diese Weise zur Auslösung allergischer Reaktionen kommen. Welche Rolle IgE bei der Bekämpfung von Parasiten spielt, ist noch nicht restlos geklärt (127).

1.3.4. Rolle von „Pattern Recognition Receptors“ in der Immunregulation der Darmschleimhaut

Im angeborenen Immunsystem wird die Erkennung von Pathogenen durch sog. „pattern recognition receptors“ (PRRs) vermittelt. Diese Rezeptoren erkennen konservierte Molekülstrukturen, die breitgefächert unter den Mikroorganismen, nicht aber im

eukaryontischen Wirt vorkommen. Zu diesen sog. „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) zählen beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan (PGN), Lipoproteine, Flagellin, CpG-reiche DNA und dsRNA. Folglich umfasst die Definition von PAMPs nicht nur „echte“ Pathogene, sondern die gesamte Welt der Mikroben, einschließlich der kommensalen mikrobiellen Darmflora (168).
Bei Säugern sind es vor allem die transmembranösen „Toll-like“ Rezeptoren (TLRs) und die intrazytoplasmatischen NOD-Proteine (nucleotide-binding oligomerization domain), die eine bedeutende Rolle als PRRs spielen (8).

Tab. 1: TLRs des Menschen und ihre Liganden

TLR	Liganden
TLR1	Lipopeptide
TLR2	Lipoproteine, Peptidoglykan, Lipoteichonsäuren
TLR3	dsRNA
TLR4	Lipopolysaccharide
TLR5	Flagellin
TLR6	unbekannt
TLR7	ssRNA-Viren ?*
TLR8	unbekannt
TLR9	unmethylierte CpG DNA
TLR10	unbekannt

* (136)

Die Bezeichnung TOLL bezieht sich ursprünglich auf einen Zelloberflächenrezeptor der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (243). Bei Säugetieren werden die zu Drosophila-TOLL homologen Rezeptoren als „Toll-like“ Rezeptoren (TLRs) bezeichnet (153). Hauptsächlich sollen TLRs bei Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommen, aber auch bei Gefäßendothelzellen, Adipozyten,

Herzmuskelzellen und intestinalen Epithelzellen sind sie entdeckt worden (8). Obwohl die einzelnen TLRs über unterschiedliche Signaltransduktionswege funktionieren, führen sie letztendlich doch alle zur Induktion pro-inflammatorischer Gene über die Aktivierung des NF-κB-Signalweges (152, 250).

In ihren intrazytoplasmatischen Anteilen ähneln TLRs den IL-1-Rezeptoren (Toll-IL-1R-(TIR-)Domäne). In ihren extrazellulären Anteilen weisen sie jedoch Leuzin-reiche Wiederholungen (leucin rich repeats, LRR-Domäne) auf, während IL-1-Rezeptoren dort drei Immunglobulin-artige Domänen besitzen (8). Die LRR-Domänen erkennen und binden PAMPs, während die TIR-Komponenten zytoplasmatische Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Diese Signalwege sind am besten für TLR4 untersucht worden, und dieses Beispiel soll hier repräsentativ erklärt werden.

Die Bindung eines PAMP an einen TLR führt zur Aktivierung der TLR-TIR-Domäne, die daraufhin einen Signalkomplex mit dem zytoplasmatischen Adapterprotein MyD88, der Serin-Threonin-Kinase IRAK und dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) bildet. Anschließend kommt es zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Kaskade und des IKK-Komplexes. Der IKK-Komplex wiederum induziert die Phosphorilierung von IκB, was zur Ubiquitinierung und Degradierung von IκB führt. Nun kann NF-κB in den Kern transloziert werden, wo es die Expression bestimmter Gene induziert (269).

Speziell für TLR4 existiert noch ein MyD88-unabhängiger Signalweg, der letztendlich aber auch in der Aktivierung von NF-κB mündet (8, 250).

Während einer Infektion aktivieren PAMPs die angeborene Wirtsabwehr, indem sie über TLR-Signalkaskaden innerhalb weniger Minuten die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten induzieren. TLR-Signalwege stimulieren aber auch die erworbene Immunität durch die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und kostimulierender Moleküle, die wiederum APCs aktivieren. TLRs sind folglich nicht nur in der Frühphase der Infektion zur Aktivierung der angeborenen Abwehrmechanismen von Bedeutung, sondern sie verbinden auch angeborene und erworbene Immunmechanismen während der gesamten Dauer der Abwehrreaktion (269).

Im Darm resultiert die Erkennung von PAMPs durch TLRs in der Expression antimikrobieller Peptide, Verstärkung der Barrierefunktion und Proliferation von Epithelzellen. Ebenso bedarf die Heilung verletzten Epithels und die Vernichtung

eingedrungener Krankheitserreger der intakten TLR-Signalkaskaden (3). Auf der einen Seite muss das intestinale Immunsystem den Organismus vor Krankheitserregern schützen, auf der anderen Seite aber friedlich mit den zahlreichen Kommensalen der natürlichen Darmflora koexistieren. Im Säugerdarm gehören dazu vor allem Bakterien, aber auch Pilze und Protozoen. Ihre Dichte kann im Dickdarm 10^{12} Organismen pro Gramm Darminhalt erreichen (138). Das prokaryontisch-eukaryontische Verhältnis im Darmtrakt kann als Mutualismus bezeichnet werden, weil beide Partner davon profitieren (138). Es funktioniert aber nur, weil das Darmimmunsystem bestimmte Mechanismen entwickelt hat, um sich in Gegenwart der Vielzahl von Kommensalen-PAMPs gegen eine dauerhafte und unkontrollierte Entzündung in Abwesenheit von Pathogenen zu schützen. So exprimieren Kolonepithelzellen nur geringe Mengen an TLR4 und dem Hilfsprotein MD2 und reagieren nur schwach auf LPS (4). Ebenso abgeschwächt ist die Antwort auf TLR2-Liganden (154), sowie die Expression von TLR1 und TLR6 (3). Eine andere Möglichkeit, die TLR-Signalkaskaden im Darm zu unterdrücken, stellt deren Hemmung dar. Das Hemmprotein Tollip (Toll-inhibierendes Protein) beispielweise bindet an IRAK (29) und wird in Epithelzellen exprimiert, die kaum auf LPS reagieren (2). Ein anderes von intestinalen Epithelzellen exprimiertes Hemmprotein ist SIGIRR (single IgIL-1R-related molecule) (267).

Im Gegensatz zu der niedrigen Expression von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 scheinen intestinale Epithelzellen aber basolateral größere Mengen an TLR5 auszubilden (69). TLR5 erkennt Flagellin, und jedes Bakterium, das basolateral angetroffen wird, muss die Epithelbarriere überwunden haben und ist deshalb als Pathogen anzusehen. Die TLR5-Aktivierung stimuliert die Sekretion der Chemokine IL-8 und MIP3α (209), so dass Flagellin über die TLR5-Signalkaskade letztendlich zur Anlockung von Entzündungszellen und zur Initiierung einer adaptiven Immunantwort gegenüber dem Pathogen führt. Diese auf die basolaterale Zellmembran begrenzte Expression von TLR5 wird jedoch in jüngsten Veröffentlichungen in Frage gestellt, denn Miyamoto et al. (160) beschreiben die TLR5-Verteilung bei humanen Kolonepithelzellen *in vivo* als vorwiegend intrazellulär.

Im Dünndarm, wo physiologischerweise nur sehr geringe Mengen an Bakterien vorkommen, ist eine Dämpfung der Immunantwort nicht notwendig. Untersuchungen von Hornef et al. lassen vermuten, dass Villusenterozyten im Dünndarm auf die Anwesenheit von PAMPs reagieren (91, 92). Die Tatsache, dass Paneth´sche Zellen auf

Stimulation durch PAMPs mit vermehrter Defensin-Sekretion reagieren, legt nahe, dass diese Epithelzellen mit TLRs ausgestattet sind (13). Als Antwort auf CpG Oligodeoxynucleotide, die von TLR9 erkannt werden, entleeren Paneth´sche Zellen ihre Sekretgranula (216). Aber auch andere intestinale Epithelzellen werden durch PAMPs zur Produktion antimikrobieller Peptide stimuliert, wie die TLR2- und TLR4-abhängige β2-Defensin-Sekretion zeigt (264).

Nod1 und Nod2 vermitteln Wirtszellreaktionen auf Peptidoglykan durch RIP2/RICK Kinase, was letztendlich auch in der Aktivierung von NF-κB mündet (122). Nod1 kommt in intestinalen Epithelzellen vor und erkennt speziell nur das Peptidoglykan invasiver gramnegativer Bakterien wie *Shigella flexneri* und Enteroinvasiver *E. coli* (EIEC). Nod2 hingegen interagiert mit Peptidoglykan sowohl von gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien und wird in großen Mengen von Monozyten und Paneth´schen Zellen exprimiert (73, 126).

1.3.5. Expression von Chemokinen

In der gesunden Darmschleimhaut ist das regulierte Ein- und Auswandern von Leukozyten ein normales Geschehen. Dieser Zustand der „physiologischen Entzündung“ (225) beruht wahrscheinlich auf der konstitutiven Produktion homöostatischer Chemokine durch gastrointestinale Zellen. Pathologische Entzündung aufgrund von Infektion oder Allergie hingegen ist stets mit verstärkter Einwanderung von Leukozyten in die Darmschleimhaut und deren Aktivierung verbunden. An diesem Prozess sind vorwiegend induzierbare Chemokine mit inflammatorischem Charakter beteiligt, die die gerichtete Wanderung von Entzündungszellen in die Mukosa steuern (48, 125).

Chemokine sind chemotaktische Zytokine („CHEMOtactic cytoKINES“), die die gerichtete Wanderung von Immun- und Entzündungszellen regeln. Damit obliegen ihnen wichtige Funktionen bei der Einleitung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion. Ihre Expression wird nach der PAMPs-Erkennung durch TLRs über die Aktivierung der Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren gesteuert (140). Chemokine sind kleine, nur 8 bis 10 kDa große Proteine, die abhängig von Anzahl und Anordnung ihrer N-terminalen Cysteinreste in vier Unterfamilien eingeteilt werden (125). Bei CC-Chemokinen liegen zwei Cysteinreste direkt nebeneinander, während CXC-Chemokine dazwischen eine trennende Aminosäure aufweisen. Die beiden

Angehörigen der C-Chemokin-Subfamilie, Lymphotaktin α (CL1) und Lymphotaktin β (CL2), besitzen nur einen einzigen N-terminalen Cysteinrest, und bei CX_3C-Chemokinen liegen drei andere Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinresten. Bisher ist das auf T-Zellen und Monozyten chemotaktisch wirkende CX_3CL1 (Fraktalkine) das einzige bekannte Mitglied der CX_3C-Chemokin-Unterfamilie (48, 125). CXC-Chemokine können je nach Vorhandensein oder Abwesenheit eines N-terminalen Glutaminsäure-Leuzin-Arginin (Glu-Leu-Arg)-Tripeptid Motivs (ELR) weiter unterteilt werden. CXC-Chemokine mit ELR-Motiv wirken vorwiegend chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, während CXC-Chemokine ohne ELR-Motiv bevorzugt Lymphozyten und Monozyten anlocken und nur schwach auf Neutrophile wirken (125). Mitglieder der CC-Chemokin-Subfamilie entfalten chemoattraktive Wirkung vor allem auf Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten sowie auf bestimmte T-Lymphozyten Subpopulationen (125). Die C-Chemokine sind hauptsächlich an der T-Zellanlockung beteiligt (116).

Chemokine werden als inaktive Propeptide synthetisiert und erst während der Sekretion in ihre aktive Form überführt. Ihre biologische Wirkung wird durch spezielle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf den Zielzellen vermittelt. Die meisten CC- und manche CXC-Chemokin-Rezeptoren (CCR, CXCR) können mehr als nur ein bestimmtes Chemokin binden. Intestinale Epithelzellen exprimieren beispielsweise die Chemokin-Rezeptoren CXCR4, CCR5 oder CX_3CR1 und weisen sich somit als Ziele parakriner oder autokriner Regulation in der Darmschleimhaut aus (48).

Darmepithelzellen können aber auch selbst Chemokine produzieren. So reagieren humane Kolonepithelzelllinien als Antwort auf Infektion oder pro-inflammatorische Zytokine (TNF-α, IL-1, IFN-γ) mit der raschen, aber vorübergehenden Expression und Sekretion verschiedener Chemokine, die vornehmlich chemoattraktiv auf neutrophile Granulozyten und Monozyten wirken (279). In der Frühphase der Infektion werden vor allem in großen Mengen CXC-Chemokine sezerniert, die das angeborene Immunsystem aktivieren. CXCL8 (IL-8), CXCL5 (ENA-78) und CXCL1, 2 und 3 (GRO-α, β, und γ) sind potente Lockstoffe für neutrophile Granulozyten, die wichtige Verteidigungsfunktionen zu Beginn der Entzündungsreaktion erfüllen. In geringerem Maße produzieren intestinale Epithelzellen die CC-Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES) und CCL20 (MIP-3α) sowie CXCL10 (IP-10) und CXCL9 (Mig), welche eine Vielzahl von Immunzellen anlocken, die

wichtig für die Wirtsverteidigung sind und angeborene und erworbene Immunantworten verknüpfen. Dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Basophile, Eosinophile, NK-Zellen, dendritische Zellen und T-Zellen (48). Generell tritt die Chemokinfreisetzung durch Darmepithelzellen als rasche Antwort auf Pathogene ein, die Expression einiger Chemokine ist allerdings verzögert. Auf diese Weise kann das Epithel den Einstrom von Immuneffektorzellen adäquat für die frühe und für spätere Phasen der akuten Entzündungsreaktion steuern. Durch diese regulierte Produktion eines Repertoires an induzierbaren/inflammatorischen und an konstitutiven/homöostatischen Chemokinen sind die intestinalen Epithelzellen wesentlich an Wanderung und Aktivierung, aber auch an der Verlängerung der Lebensspanne oder Apoptose spezieller Immun- und Entzündungszelltypen beteiligt (48).

Tab. 2: Chemokine der Säugetiere und des Menschen

Familie	offizieller Name	Synonym
CXC	CXCL1	GROα
	CXCL2	GROβ
	CXCL3	GROγ
	CXCL4	PF-4
	CXCL5	ENA-78
	CXCL6	GCP-2
	CXCL7	NAP-2
	CXCL8	IL-8
	CXCL9	MIG
	CXCL10	IP-10
	CXCL11	I-TAC
	CXCL12	SDF-1
	CXCL13	BCA-1
	CXCL14	BRAK
	CXCL15	Lungkine
	CXCL16	CXCL16
C	CL1	Lymphotaktin α
	CL2	Lymphotaktin β
CX_3C	CX_3CL1	Fraktalkine/ Neurotaktin

Familie	offizieller Name	Synonym
CC	CCL1	I-309
	CCL2	MCP-1
	CCL3	MIP-1α
	CCL4	MIP-1β
	CCL5	RANTES
	CCL6	C10
	CCL7	MCP-3
	CCL8	MCP-2
	CCL9	MIP-1γ
	CCL10	CCL10
	CCL11	Eotaxin
	CCL12	MCP-5
	CCL13	MCP-4
	CCL14	CC-1
	CCL15	Leukotaktin-1
	CCL16	LEC
	CCL17	TARC
	CCL18	PARC
	CCL19	ELC
	CCL20	LARC
	CCL21	SLC
	CCL22	MDC
	CCL23	MPIF-1
	CCL24	MPIF-2
	CCL25	TECK
	CCL26	Eotaxin-3
	CCL27	ESkine
	CCL28	MEC

2. Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (STEC)

Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (STEC) sind eine heterogene Gruppe von Organismen, deren gemeinsame Eigenschaft die Fähigkeit zur Produktion von Shigatoxin (Stx) ist. Allerdings ist nicht jeder STEC-Stamm zwangsläufig pathogen. Obwohl mehr als 200 Serotypen von *E. coli* Shigatoxin bilden, sind die meisten davon noch nicht im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen oder bei Tieren nachgewiesen worden.

Eine Untergruppe der STEC mit pathogenem Charakter stellen die erst 1982 entdeckten Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) dar, die von Fällen menschlicher Erkrankung isoliert worden sind, Stx produzieren und oft eine spezielle chromosomale Pathogenitätsinsel, den „locus of enterocyte effacement“ (LEE), besitzen (111, 166). EHEC sind bedeutende darmbewohnende Zoonoseerreger, die beim Menschen sowohl blutige als auch nicht-blutige Durchfälle verursachen können. In manchen Fällen entwickeln sich diese Diarrhöen zu Hämmorrhagischer Kolitis (HC) oder dem lebensbedrohlichen Hämolytisch Urämischen Syndrom (HUS) weiter (244). EHEC-Stämme vom Serotyp O157:H7 spielen eine wichtige Rolle als Krankheitserreger in Nordamerika, Großbritannien und Japan, aber auch andere Serotypen, besonders die der O26 und O111 Serogruppe, können Krankheiten verursachen und sind in vielen Ländern noch bedeutender als *E. coli* O157:H7 (111). Die Inzidenz menschlicher EHEC-Infektionen ist zwar relativ niedrig, aber der Schweregrad der Symptome und Langzeitschäden ist gravierend, und bis heute mangelt es an adäquaten Therapiemaßnahmen.

2.1. Epidemiologie, Pathologie und Klinik von STEC-Infektionen

2.1.1. Infektionen des Rindes

Persistent infizierte Haus- und Wildwiederkäuer gelten als natürliches Reservoir der STEC, deren Hauptkolonisationsorte die distalen Darmabschnitte Zäkum, Kolon und Rektum sind (244). Aber auch aus dem Darmtrakt von Kaninchen, Schweinen, Pferden, Hunden, Katzen und Vögeln sind STEC isoliert worden (65, 166). *E. coli* O157:H7 besiedelt bevorzugt den Intestinaltrakt von Rindern und kommt am zahlreichsten im

Dickdarm, besonders im FAE des terminalen Rektums vor (38, 167). Ein einzelnes Tier kann Träger mehrerer verschiedener STEC-Stämme sein. Abhängig von Land und Detektionsmethode variiert die vermutete Prävalenz bei Rindern zwischen 0,1 und 63 % beim Einzeltier und zwischen 0,3 und 87 % bei Herden (141). Eine genaue Prävalenzbestimmung wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass die Ausscheidung der Keime mit dem Kot nicht regelmäßig sondern intermittierend ist, und von einer Reihe von Faktoren beeinflusst wird. Dazu gehören Diät, Stress, Populationsdichte, geographische Region und Jahreszeit (187). Die Prävalenz von STEC ist höher bei jüngeren Tieren und bei Tieren, die Transport, Futterwechsel oder Antibiotikatherapie ausgesetzt sind (244).

Obwohl die Zahl der mit dem Kot ausgeschiedenen Keime 10^5 bis 10^6 pro Gramm betragen kann, zeigen ausgewachsene Wiederkäuer normalerweise keinerlei klinische Anzeichen einer Infektion (36, 38, 273). Histologische Schnitte der Darmschleimhaut von experimentell mit *E. coli* O157:H7 infizierten Kälbern und Rindern zeigen enge bakterielle Adhärenz in einigen, aber nicht in allen Fällen und milde Entzündungserscheinungen, charakterisiert durch diffuse neutrophile Infiltration der *Lamina propria* (244). Die Infektion neugeborener, kolostrumfrei aufgezogener Kälber mit O157:H7 dagegen führt zu Durchfall und Kolonödemen (40). Außerdem sind nach natürlicher und experimenteller STEC-Infektion bei Kälbern Villusatrophie, Epithelschädigung, neutrophile Infiltration und Bildung von Pseudomembranen beobachtet worden (189).

2.1.2. Infektionen des Menschen

Die Ansteckung des Menschen erfolgt in vielen Fällen über direkten oder indirekten Kontakt mit Wiederkäuerfäzes, wobei die Infektionsdosis für *E. coli* O157:H7 beim Menschen geringer ist als 100 Kolonie-bildende Einheiten. Infektionen sind beschrieben worden nach dem Verzehr kontaminierten Fleisches sowie von Milch und Molkereiprodukten, im besonderen von Lebensmitteln, die vom Rind stammen. Aber auch der Genuss von Wasser, unpasteurisiertem Apfelsaft und Gemüse, die mit Rinderkot verunreinigt worden sind, soll zu Erkrankungen geführt haben. Ebenso gilt direkter Kontakt mit Wiederkäuerkot auf Bauernhöfen, Weiden und in Streichelzoos sowie der Kontakt mit infizierten Personen als Quelle der Ansteckung (244). Viele Patienten leiden anfänglich meist an wässriger Diarrhoe, die in manchen Fällen

innerhalb von ein bis zwei Tagen in blutigen Durchfall und Hämorrhagische Kolitis (HC) übergeht (257). Meistens erholen sich die Erkrankten ohne weitere Komplikationen von der Infektion. Bei etwa 5 bis 10 % der Fälle jedoch entwickelt sich die EHEC-Infektion zum Hämolytisch Urämischen Syndrom (HUS) weiter, einer lebensbedrohlichen Krankheit, die durch akutes Nierenversagen, mikroangiopathische hämolytische Anämie und Thrombozytopenie charakterisiert ist. Manchmal treten dabei auch neurologische Symptome auf. Der Großteil der histopathologischen Veränderungen bei HC und HUS ist eine Folge der Endothelzellschädigung durch Stx in den Zielorganen (187). HUS kommt bei allen Altersgruppen vor, die Inzidenz ist jedoch am höchsten bei Säuglingen, Kleinkindern und alten Menschen (257). Eine Variante von HUS, die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP), tritt häufiger bei Erwachsenen als bei Kindern auf. Obwohl die Mortalität in den letzten dreißig Jahren von über 50 % auf weniger als 10 % gesenkt werden konnte, leiden schätzungsweise 30 % der Überlebenden an schweren Folgeschäden wie chronischer Niereninsuffizienz, Bluthochdruck oder neurologischen Defiziten (187).

2.2. Kolonisation des Darmtraktes durch STEC

Die offensichtlich nicht vorhandene Pathogenität bei ausgewachsenen Rindern lässt annehmen, dass Rinder nicht empfänglich für die Wirkung des Stx sind oder aber, dass das Toxin unterschiedliche Wirkungen bei Menschen und Wiederkäuern entfaltet. Es wird vermutet, dass Stx eine entscheidende Rolle in der STEC-Infektion des Rindes spielt und zu der weiten Verbreitung des Erregers in seinem Wirt beiträgt (235).
STEC sind eng verwandt mit den Enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und haben mit ihnen viele Virulenzgene gemeinsam (58). Die Mechanismen, mit denen STEC- und EPEC-Stämme die Darmschleimhaut kolonisieren, sind zwar nicht völlig identisch, können grundsätzlich aber als analog betrachtet werden. Ein entscheidender Unterschied liegt in der Fähigkeit der STEC, Shigatoxine zu produzieren, eine Virulenzeigenschaft, die den EPEC fehlt. In einem mehrstufigen Schema der Pathogenese kommt es nach der oralen Aufnahme der Keime und Umgehung der Wirtsabwehr zur Schleimhautbesiedlung und anschließend zur Vermehrung und Produktion von Shigatoxinen.

STEC führen an Darmenterozyten zu charakteristischen histopathologischen Veränderungen, den sog. „attaching and effacing“ Läsionen (A/E) (166). Diese Phänomene beruhen auf ultrastrukturellen Veränderungen des Zytoskeletts, welche zur lokalen Zerstörung der Bürstensaummikrovilli, zur Ausbildung der typischen Zellpodeste und zur engen bakteriellen Adhäsion auf der Wirtszelloberfläche führen (58, 187). Die Podestformation beruht auf der Akkumulation von Zytoskelettbestandteilen wie α-Aktinin, Ezrin, Kortaktin, Talin, Fimbrin, Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP), neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein (N-WASP) und dem Aktin-bezogenen Protein (Arp) 2/3 Komplex (213). Die für den A/E-Phänotyp verantwortlichen Gene entstammen einer 35 bis 45 kb großen chromosomalen Pathogenitätsinsel, die als „locus of enterocyte effacement“ (LEE) bezeichnet wird (166). Auf der linken Seite des LEE liegen die Gene *esc* und *sep*, die für ein Typ III Sekretionssystem kodieren. Mit Hilfe dieses komplexen „Nadel-Spritze“ Apparates aus mehr als 20 Proteinen können bakterielle Effektorproteine direkt in das Wirtszellzytoplasma oder in die apikale Wirtszellmembran appliziert werden (58). Die Gene für diese Typ III-sezernierten Effektorproteine (*esp*-Gene) sind im rechten Teil des LEE lokalisiert. Dazwischen finden sich das *eae*-Gen („*E. coli* attaching and effacing“), das für das bakterielle Adhäsin Intimin kodiert, und das *tir*-Gen, dessen Produkt der translozierte Intiminrezeptor (Tir) ist (141). Der Kontakt des Bakteriums mit der Wirtszelle stimuliert die Expression der LEE-kodierten Proteine und die Anordnung des Translokationsapparates (Translokon) (58). Nachdem EscC eine Pore in der äußeren Bakterienzellmembran gebildet hat, formiert EspA einen hohlen, zylindrischen Translokationsapparat, über den EspB, EspD und Tir in die Wirtszelle injiziert werden (49). Dann formen EspB und EspD 3 bis 5 nm große Poren in die Wirtszellmembran, durch die weitere Proteine transloziert werden können (164). EspB löst im Zytosol der Wirtszelle eine Signaltransduktionskaskade aus, die schließlich zum Verschwinden („effacement“) der Mikrovilli und zu deren Ersatz durch Sockel- oder Podest-artige Strukturen („pedestals“) führt (117). In der apikalen Enterozytenmembran wird Tir inseriert und dient nun als Rezeptor für das bakterielle äußere Membranprotein Intimin (42), das schließlich die enge Anheftung der Bakterien an die nunmehr nackte Enterozytenmembran der Podeste vermittelt. Von Intimin sind viele verschiedene Subtypen beschrieben worden, die jeweils von spezifischen STEC- und EPEC-Stämmen produziert werden und möglicherweise den Gewebstropismus im Darm beeinflussen

(164). Beispielsweise produzieren Stämme des EHEC-Serovars O157:H7 Intimin γ (6). Intimine kommen bei allen Bakterien vor, die A/E-Läsionen verursachen (EPEC, EHEC, *Hafnia alvei, Citrobacter rodentium*) (166), allerdings findet sich das *eae*-Gen nicht bei allen STEC, die sowohl von durchfallkranken Kälbern als auch von gesunden Rindern isoliert worden sind (270). Dies lässt vermuten, dass es neben Intimin noch andere Faktoren gibt, die die Kolonisation und Persistenz der Bakterien im bovinen Intestinaltrakt beeinflussen. Stevens et al. (245) haben jüngst ein Gen, *efa 1* („EHEC factor for adherence“) identifiziert, das die Besiedlung des Rinderdarmes durch non-O157 EHEC zu vermitteln scheint. Es ist nahezu identisch mit einem EPEC-Gen, *lif A*, welches für den Lymphozytenhemmfaktor Lymphostatin kodiert. Efa 1 werden Funktionen als Adhäsin *per se*, aber auch immunsupprimierende Effekte zugeschrieben, deshalb könnte es die EHEC-Kolonisation im Rinderdarm unterstützen (164, 245).
Die Bedeutung von Stx für die Etablierung und Persistenz der klinisch inapparenten Infektion des Rinderdarmes ist bisher noch nicht entschlüsselt. Nahezu alle O157:H7 Stämme, die in Großbritannien von Schlachttieren isoliert worden sind, enthielten das *stx2*-Gen (97,8 % der Rinder- und 100 % der Schafisolate) und 19,9 % bzw. 1,4 % trugen sowohl das *stx1*- als auch das *stx2*-Gen (184). Diese Beobachtung suggeriert eine enge Korrelation zwischen dem Besitz der *stx*-Gene und dem Vermögen, den Darm von Wiederkäuern zu besiedeln. Rezeptoren für Stx sind auf bovinen intestinalen Kryptenzellen entdeckt worden (88), und Menge et al. (159) haben gezeigt, dass aufgereinigtes Stx1 die Aktivierung und Proliferation boviner Lymphozyten hemmen kann. Stx könnte folglich beim Rind die intestinale Kolonisation durch Modulation der Schleimhautimmunantwort erleichtern.

2.3. Die Shigatoxine

Hauptvirulenzfaktoren der STEC bei Infektionen des Menschen sind die Shigatoxine, die in der Literatur ebenso als „Shiga-like“ Toxine, Verotoxine oder Verozytotoxine bezeichnet werden. Die Shigatoxin-Familie besteht aus zwei Hauptgruppen, Stx1 und Stx2, die immunologisch nicht kreuzreagieren. Als Prototyp gilt das Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1, welches sich höchstens in einer Aminosäure von Stx1 von *E. coli* unterscheidet (166). Stx2 ist nur zu etwa 55 % homolog zu Stx1, und es

existieren mehrere biologische Varianten: Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e und Stx2f (141). Während humanpathogene STEC Stx1, Stx2 oder auch beide gleichzeitig produzieren können, wird Stx2e vornehmlich mit Erkrankungen beim Schwein assoziiert (Ödemkrankheit). Besonders Stx2-bildende Stämme werden mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von HUS in Verbindung gebracht (257).

Anders als bei *Shigella dysenteriae* Typ 1, bei der das *stx*-Gen normalerweise im Chromosom liegt, werden die Stx der STEC von lambdoiden Bakteriophagen kodiert. Diese können in zwei verschiedenen Phasen vorliegen, die „lysogen“ bzw. „lytisch“ genannt werden. In der lysogenen Phase wird der Phage in das bakterielle Chromosom eingebaut und unterläuft die Replikation mit der Wirtszell-DNA. In der lytischen Phase löst sich der Phage aus dem Wirtschromosom und repliziert unabhängig, erstellt viele Kopien von sich selbst und bringt die Wirtszelle letztendlich zum Platzen. Die Induktion dieser lytischen Phase erhöht die Stx-Produktion erheblich. Ein Signal, das die Bakteriophagen induziert, in die lytische Phase überzugehen, ist beispielsweise die Schädigung bakterieller DNA (257).

2.3.1. Aufbau der Shigatoxine

Die Mitglieder der Shigatoxin-Familie sind nach dem A1:B5-Bauprinzip zusammengesetzte Toxine, die strukturell anderen Toxinen wie dem Choleratoxin oder dem hitzelabilen Toxin der Enterotoxischen *E. coli* ähneln (175). Das ca. 70 kDa große Holotoxin besteht aus einer einzelnen katalytischen A-Untereinheit (32 kDa), die den aktiven Teil des Toxins darstellt, und 5 B-Untereinheiten (7,7 kDa je Monomer), die für die Bindung des Toxins an spezifische Glykolipid-Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen verantwortlich sind (175). Die B-Untereinheiten bilden einen pentamerischen Ring um eine α-Helix am C-terminalen Ende der A-Untereinheit (59). Die A-Untereinheit setzt sich aus den beiden Fragmenten A_1 und A_2 zusammen, die durch eine Disulfidbrücke verbunden werden. Erst nachdem diese Disulfidbrücke von Enzymen im ER oder im Zytosol proteolytisch gespalten worden ist, kann die für die enzymatische Aktivität des Stx verantwortliche 27 kDa große A_1-Untereinheit wirksam werden (66).

2.3.2. Shigatoxin-Rezeptor und enzymatische Wirkung

Der Oberflächenrezeptor eukaryontischer Zellen für Mitglieder der Stx-Familie ist das Glykosphingolipid Globotriaosylzeramid (Gb_3, Galα(1-4)Galβ(1-4)Glc-ceramid) (134). Das Pentamer der B-Untereinheit bindet spezifisch an die terminale Galabiose im Trisaccharid des Gb_3 (101, 133). Als einzige Stx-Variante erkennt Stx2e hauptsächlich Globotetraosylzeramid (Gb_4, GalNAcβ(1-3)Galα(1-4)Galβ(1-4)Glc-ceramid) als Rezeptor, bindet aber auch an Gb_3 (218).

Gebundene Toxinmoleküle werden durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über Klathrin-ummantelte Gruben internalisiert (224). Der darauf folgende vollständige retrograde Transport des Toxin-Rezeptor-Komplexes zum ER und zur Kernhülle scheint stets mit Zytotoxizität verbunden zu sein (11, 221, 222). Während des retrograden Transportes wird die A-Untereinheit von der Protease Furin (66) in ein katalytisch aktives N-terminales A_1-Fragment (27 kDA)und in ein C-terminales A_2-Fragment (4 kDA) gespalten, die zunächst noch durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (224). Kalpain und möglicherweise andere Proteasen im Zytosol stellen einen alternativen, allerdings weniger effizienten Mechanismus der proteolytischen Spaltung dar (177). Nach Spaltung der Disulfidbrücke entfaltet die freigesetzte A_1-Komponente im Zytosol RNA-N-Glykosidase-Aktivität und inaktiviert die 60S-Untereinheit der Ribosomen, die in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Diese große ribosomale Untereinheit besteht wiederum aus drei Fragmenten von 5S, 5,8S und 28S rRNA. Ähnlich dem Pflanzentoxin Rizin (228) spaltet die A_1-Untereinheit des Stx einen Adeninrest von der 28S rRNA ab und verhindert so die Elongationsfaktor-1-abhängige Bindung der Aminoazyl-t-RNA an die 60S Untereinheit der Ribosomen. Auf diese Weise hemmt Stx den Peptidketten-Verlängerungsschritt der Proteinbiosynthese, was letztendlich zum Tod der Zelle führt (187).

Jedoch reagieren verschiedene Gb_3-exprimierende Zellarten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber der Wirkung des Shigatoxins. Der intrazelluläre Transportweg, der nach Internalisierung des Toxins eingeschlagen wird, scheint dabei entscheidend für dessen biologische Effekte zu sein. In Zellen, die resistent gegenüber dem zytotoxischen Effekt sind, fusionieren die Toxin-beladenen Vesikel mit Lysosomen, in denen es schließlich zum Abbau des Toxins kommt (224). In sensitiven Zellen dagegen wird das Holotoxin in Endosomen auf retrogradem Transportweg via Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum zur Kernhülle befördert, bevor es ins

Zytosol entlassen wird (11). Der Transportprozess scheint von der spezifischen Rezeptorstruktur und –lokalisation abhängig zu sein. Typischerweise haben Toxin-empfindliche Zellen höhere Dichten an Gb_3 mit kürzeren Fettsäureketten (C:16 und C:18), während der Rezeptor von resistenten Zellen längere Fettsäureketten aufweist (11, 222). Außerdem soll die Organisation von Gb_3 in Lipidmikrodomänen (sog. „lipid rafts“) mit der Stx-Sensitivität der Zellen korrelieren (52). Dagegen sind Zellen, bei denen Gb_3 über die gesamte Zellmembran verteilt ist, relativ insensitiv. In Zellen mit diffuser Rezeptorverteilung und längeren Gb_3-Fettsäureketten kommt es entweder zum frühzeitigen Abbruch des retrograden Transportweges im Golgi-Apparat (11, 221, 222) oder das Toxin wird in lysosomale Kompartimente transportiert (52). Beide Abwandlungen der Transportroute resultieren in verminderter Sensitivität oder sogar Resistenz der Zelle gegenüber dem Stx.
Die Inkubation von Zellen mit Butyrat stimuliert Biosynthesewege, die für die Gb_3-Produktion verantwortlich sind, und sorgt durch die Verkürzung der Fettsäurekettenlänge im Gb_3-Molekül dafür, dass ehemals resistente Zellen sensitiv gegenüber der Stx-Wirkung werden (11, 102).

3. Wirkung des Shigatoxins auf intestinale Epithelzellen

3.1. Kaninchen, Schwein und Maus

Versuche mit Stx1 bzw. EHEC O153 zeigen, dass in den Geweben des Kaninchens die Verteilung der pathologischen Veränderungen durch Stx mit der Gb_3-Expression übereinstimmt (64, 210). Außerdem scheint beim Kaninchen die Ausbildung des Stx-Rezeptors altersabhängig zu sein. Während im Ileum säugender Jungtiere noch kein Gb_3 vorkommt und die Darmschleimhaut dementsprechend unempfindlich gegenüber der Wirkung des Stx ist, werden nach dem Absetzen Rezeptoren auf dem Villusepithel ausgebildet, was sich in einer zunehmenden Empfänglichkeit für die enterotoxischen und zytotoxischen Effekte des Stx äußert (161). Ebenso spiegeln die bei Schweinen durch das Stx2e verursachten Krankheitserscheinungen im Kolon die Verteilung von Gb_4 auf dem intestinalen Epithel wider (23, 41). Bei Mäusen dagegen gibt es bislang keine Hinweise auf das Vorkommen von Stx-Rezeptoren im Darm (217, 256).

3.2. Mensch

3.2.1. Epithelzelllinien

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkung des Stx auf humane Darmepithelzellen basieren hauptsächlich auf Studien mit immortalisierten humanen Kolonkarzinom-Zelllinien. Diese Zelllinien unterscheiden sich erheblich dahingehend, ob und in welchem Maße sie Gb_3 exprimieren.

Tab. 3: Gb_3-Expression durch humane Kolonkarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Gb_3-Expression	Referenz
CaCo-2A	+	(5, 102)
HT-29	+	(102)
HCA-7	+	(160)
Hct-8	?*	(214, 259)
T-84	-	(5, 102)

* keine Angaben durch die Autoren

3.2.1.1. Translokation des Toxins über die epitheliale Barriere

Da STEC allgemein als nicht-invasive Krankheitserreger angesehen werden, muss das im Darmlumen sezernierte Stx zunächst die Epithelbarriere überwinden, um zu seinen Hauptzielzellen, den Endothelzellen, zu gelangen. Tatsächlich ist in einem *in vitro*-Modell demonstriert worden, dass biologisch aktives Stx polarisierte T84- und CaCo-2-Monolayer passieren kann, ohne dabei die Epithelzellen oder die Barrierefunktion der „tight junctions“ zu zerstören (5). Dabei soll die Gb_3-Expression der Zellen hemmend auf die Geschwindigkeit der Translokation des Stx1 über das polarisierte Epithel wirken. Weiterhin untermauert die Feststellung von Philpott et al. (194), dass Stx auf seinem Passageweg in Endosomen und nicht im parazellulären Raum nachweisbar ist, die Hypothese eines transzellulären Transportes von Stx über die Epithelzellschicht. Möglicherweise gibt es sogar unterschiedliche Translokationsmechanismen für Stx1

und Stx2 (94). Welche Rolle dabei der Stx-Rezeptor spielt, ist bislang noch ungeklärt, da das Stx sowohl bei Gb_3-exprimierenden Zelllinien als auch bei Zelllinien ohne Shigatoxinrezeptor-Expression intrazellulär nachgewiesen worden ist (194, 229). Obwohl Stx zytotoxisch auf CaCo-2-, nicht aber auf T84-Zellen wirkt, werden bei beiden Zelllinien sowohl Stx1 als auch Stx2 zum ER transportiert und die A-Untereinheit in Furin-abhängiger Art und Weise gespalten (229). Folglich muss in T84-Zellen ein Gb_3-unabhängiger retrograder Transportweg für Stx existieren, der nicht zum Tod der Zelle führt.

3.2.1.2. „Ribotoxic stress response“ und Chemokin-Induktion

Schon lange ist bekannt, dass Stx die Freisetzung bestimmter Zytokine von verschiedenen Zelltypen stimuliert (87). Solche Zytokin-induzierenden bakteriellen Komponenten werden als zusätzliche Klasse bakterieller Virulenzfaktoren angesehen und als „Moduline“ bezeichnet, da sie die Zellfunktionen durch die Induktion der autokrinen Zytokine modulieren (81, 82). In humanen Hct-8-Zellen beispielsweise induziert Stx1 die CXC-Chemokine IL-8, GRO-α, -β, -γ, MIP-2α, MIP-2β und ENA-78 auf mRNA-Ebene (214, 259). Paradoxerweise kommt es trotz des inhibierenden Effektes von Stx auf die Proteinbiosynthese der Zelle zur Produktion der Chemokine IL-8 und GRO-α (259). Dafür scheint die N-glykosidische Aktivität der A-Untereinheit essentiell zu sein. Dies belegt ein Versuch mit CaCo-2-Zellen, bei denen sowohl durch Stx1 als auch durch Stx2 die mRNA-Expression von IL-8, TNF-α, MCP-1, GRO-β und GRO-γ ausgelöst worden ist, nicht aber durch eine Stx1-Mutante ohne N-glykosidische Aktivität (277). Zelllinien, denen das für die Gb_3-Synthese notwendige Enzym α-1,4-Galaktosyltransferase (Gb_3-Synthase) und damit auch der Stx-Rezeptor fehlen, produzieren keine pro-inflammatorischen Chemokine als Antwort auf die Stimulation mit Stx (160).

Durch Schädigung der 28S rRNA führt Stx ebenso wie die Proteinbiosynthesehemmer Anisomyzin und Rizin zu einer ribotoxischen Stressreaktion der Zelle (96). Im Verlauf dieser „ribotoxic stress response“ kommt es zur Initiierung von Signaltransduktions-kaskaden, zur Aktivierung von MAP-Kinasen und zur Induktion von pro-inflammatorischen Chemokingenen. Die Stx-induzierte IL-8-Expression in intestinalen Epithelzellen kann durch spezifische Hemmung des p38-MAP-Kinase Signalweges gehemmt werden (258).

3.2.1.3. Bedeutung der neutrophilen Infiltration

Man vermutet, dass die während der „ribotoxic stress response“ produzierten Chemokine (wie z.B. IL-8) polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) an den Ort der Infektion locken und zur Aktivierung dieser Zellen beitragen. Die mikrobiziden Produkte der PMN (NO, H_2O_2) fördern durch Zerstörung der Darmschleimhaut nicht nur die intestinale Entzündung (121), sondern führen durch Schädigung der bakteriellen DNA auch zur Phageninduktion und damit zur vermehrten Produktion von Stx (266). Weiterhin werden Ergebnisse aus Untersuchungen mit Zellkulturen als Hinweis darauf gewertet, dass die Transmigration der PMN durch das Epithel hindurch vorübergehend dessen Barrierefunktion reduziert und die parazelluläre Permeabilität verstärkt, was wiederum zur erhöhten Aufnahme von Stx aus dem Darmlumen in das subepitheliale Gewebe führt (95). Anschließend könnten neutrophile Granulozyten (254), Makrophagen (205, 272) und Erythrozyten (19, 147) das Stx binden und mit dem Blutstrom systemisch verteilen. Die Stx-vermittelte Chemokininduktion und die daraus resultierende neutrophile Infiltration der Mukosa werden somit von mehreren Autoren in das Zentrum der Pathogenese der STEC-Erkrankungen des Menschen gestellt (202).

3.2.1.4. Auslösung der Apoptose

Stx tötet Zellen nicht nur durch die Blockierung der Proteinbiosynthese (Kapitel 3.3.2), sondern induziert in humanen Gb_3-exprimierenden Darmepithelzelllinien (CaCo-2 und HEp-2) auch die Apoptose. Dabei resultiert die erhöhte Expression des proapoptotischen Proteins Bax in der Aktivierung der Kaspase-Kaskade. Auch die B-Untereinheit des Stx führt zum programmierten Zelltod, allerdings in geringerem Maße als das Holotoxin. Bei intestinalen Epithelzelllinien (T84), die keinen Stx-Rezeptor exprimieren, löst Stx auch keine Apoptose aus (106, 229).

3.2.2. Primärkulturen und Explantate

Im Gegensatz zu intestinalen Zelllinien ist weder das Vorkommen von Gb_3 noch die Bindung von Stx jemals im Zusammenhang mit humanen intestinalen Epithelzellen *in situ* oder *ex vivo* demonstriert worden (20, 90, 229). Jüngste Studien von Miyamoto et al. (160) bestätigen ältere biochemische Untersuchungen und postulieren, dass humanes Kolonepithel *in vivo* im Gegensatz zu manchen Kolonkarzinom-Zelllinien nicht in der Lage ist, das für die Synthese des Gb_3-Moleküls notwendige Enzym zu exprimieren. In

Übereinstimmung mit dieser Tatsache ist auch keine Bindung von Stx an das normale oder entzündete Epithel menschlicher Kolonbioptate oder an das Epithel humanen Kolonkarzinomgewebes nachgewiesen worden. Obwohl humane intestinale Epithelzellen somit dem T84-Phänotyp ähneln, und dementsprechend eine Resistenz gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Stx zu erwarten wäre, gibt es Veröffentlichungen, die Gegenteiliges berichten. Moyer et al. beschreiben die Zytotoxizität des Stx auf Primärkulturen humaner Kolon- und Ileumepithelzellen durch Hemmung der Proteinbiosynthese (165). Neuere Untersuchungen hingegen ergeben, dass die Behandlung mit Stx1 keine morphologischen Veränderungen an Biopsien humaner Darmepithelzellen verursacht und erklären diese folglich als unempfänglich gegenüber der Wirkung des Stx (229). Dennoch darf nicht unerwähnt bleiben, dass in der gleichen Veröffentlichung ein Stx2-spezifischer Effekt auf *in vitro* Organkulturen humaner intestinaler Epithelzellen beschrieben wird, der sich in verstärkter Zellabschilferung und Anoikis (Apoptose von Zellen, die den Kontakt mit der extrazellulären Matrix verloren haben) äußert. Dabei ist jedoch unklar, ob es sich um einen direkten Effekt des Stx auf Epithelzellen oder um eine Störung der intestinalen Homöostase durch Schädigung nicht-epithelialer Zellen handelt. In der Tat konnten Schüller et al. eine starke Stx-Rezeptor-Expression bei Myofibroblasten-artigen Zellen in den Kryptenregionen nachweisen.

3.2.3. Pathogenese-Modell der EHEC-Erkrankungen des Menschen

Im Wesentlichen basierend auf Untersuchungen mit humanen Zelllinien und Primärkulturen wird derzeit folgendes Modell für die Pathogenese EHEC-assoziierter Erkrankungen des Menschen favorisiert:

Das im Darmlumen gebildete Stx passiert sowohl auf transzellulärem als auch auf parazellulärem Wege die Epithelzellschranke. In den Epithelzellen induziert Stx die Produktion von IL-8 (259), welches Granulozyten anlockt, deren mikrobizide Produkte Läsionen in der Mukosa verursachen und durch Phageninduktion die Stx-Produktion steigern (121, 266). Während ihrer Migration erhöhen die Granulozyten die Schleimhautpermeabilität, was eine Erhöhung der Toxinaufnahme in die darunterliegenden Gewebe verursacht (95). Dort wiederum stimuliert Stx Makrophagen zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF-α, IL-1), die zusammen mit den Stx-induzierten Chemokinen der Epithelzellen einerseits die

Schleimhautentzündung verschlimmern und andererseits zu einer Hochregulation der Stx-Rezeptor-Expression auf den Endothelzellen der intestinalen Mikrovaskulatur führen. Die Bindung des Toxins an seinen Rezeptor resultiert in der Schädigung der Endothelzellen und mündet schließlich in der Thrombosierung kleiner und mittlerer Gefäße, der Infarzierung der Darmschleimhaut sowie in blutiger Diarrhoe. Über den Blutstrom verteilt sich das Toxin aber auch systemisch und verursacht thrombotische Mikroangiopathien in den Nieren und im Gehirn. Durch die mechanische Schädigung der Erythrozyten aufgund von Fibrin-Ablagerungen in der Mikrozirkulation kommt es zur hämolytischen Anämie. Die weitverbreitete Thrombosierung der kleinen Gefäße ist verantwortlich für die häufig auftretende Thrombozytopenie (177).
Die Bedeutung des Stx als essentieller Virulenzfaktor für die Pathogenese menschlicher Erkrankungen ist folglich nicht nur auf dessen zytotoxische Wirkung zurückzuführen, sondern auch auf die pro-inflammatorischen Effekte, die aus der Stx-vermittelten Zytokin-Induktion resultieren.

3.3. Rind

Während die Bindung von Stx an Endothelzellen der Mikrovaskulatur im Gastrointestinaltrakt und in den Nieren des Menschen eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt, exprimieren Kapillaren im Darm und in den Nieren des Rindes kein Gb_3 (88, 203). Ebenso steht die Abwesenheit des Stx-Rezeptors auf intestinalen Epithelzellen des Menschen *in vivo* in deutlichem Kontrast zu der Situation beim Rind. Hoey et al. (88, 89) berichten von der Gb_3-Expression durch Epithelzellen in Krypten nahe der Submukosa sowohl bei Primärkulturen als auch in Gefrierschnitten aus Dünn- und Dickdarmgewebe von Rindern. Epithelzellen von höher differenziertem Phänotyp dagegen scheinen keine Rezeptoren zu tragen. Immunhistologische Untersuchungen intestinaler Mukosa *in situ* der Gruppe Schüller et al. bestätigen diese Ergebnisse und zeigen zusätzlich auf, dass Stx2 im Gegensatz zu Stx1 nicht an bovines intestinales Epithel bindet (229). Trotz Rezeptorexpression scheint das Stx jedoch keinen zytotoxischen Effekt auf bovine intestinale Epithelzellen auszuüben (89). Das Toxin wird nicht wie bei empfindlichen Zellen in das ER transportiert, sondern in Lysosomen verbracht, was mit der Verhinderung der zytotoxischen Wirkung einhergeht (132).

Weiterhin kommen bei bovinen intestinalen Epithelzellen verschiedene Isoformen von Gb_3-Molekülen vor, die nicht mit „lipid rafts“ assoziiert, sondern zufällig in der Membran verteilt sind. Diese Kombination aus Gb_3-Isoform, Membranverteilung und intrazellulärer Stx-Transportroute stimmt mit den Beobachtungen bei anderen Rezeptor-positiven Zellen, die der Zytotoxizität widerstehen, überein (89).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der biologischen Bedeutung des Shigatoxinrezeptors auf Darmepithelzellen des Rindes und welche Rolle diesem Molekül bei der weiten Verbreitung der STEC in ihrem Reservoirwirt zukommt. Möglicherweise ist die unterschiedliche Gb_3-Verteilung in den Geweben des Menschen und des Rindes von erheblicher Bedeutung für die so unterschiedlichen Konsequenzen der STEC-Infektion bei den beiden Spezies. Eine weitere Tatsache, die Untersuchungen zur Bedeutung des Stx-Rezeptors rechtfertigt, ist die fehlende Toxizität des Stx für bovine intestinale Epithelzellen, denn trotz nicht vorhandener Zytotoxizität kann Stx bei Zellen die Chemokinfreisetzung induzieren und dadurch Einfluss auf die Homöostase des Darmimmunsystems nehmen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewinnung und Kultivierung von Zellen

1.1. Primäre bovine Kolonepithelzellen

1.1.1. Gewinnung von Kolonkrypten

Die Kolonkryptenpräparation wurde in Anlehnung an die von Föllmann und Birkner etablierte Methode durchgeführt (56). Das Darmmaterial zur Gewinnung der primären bovinen Kolonzellen stammte ausschließlich von Schlachtrindern des Gießener Schlachthofes. Dort wurden während des Schlachtprozesses jeweils etwa 30 cm lange Abschnitte des proximalen *Colon ascendens* von gesunden, 18 bis 24 Monate alten Rindern verschiedener Rassen und beiderlei Geschlechts kurz nach deren Tötung entnommen. Nach dem sofortigen manuellen Ausstreifen des Darminhaltes von kranial nach kaudal erfolgte noch vor Ort ein mehrmaliges (3- bis 4-mal) Waschen mit steriler, 4°C kalter NaCl-Lösung (0,9 %), um das Darmstück grob zu reinigen. Dann wurde das sichtbare Fettgewebe mit einer Schere abgesetzt, der Darm längs eröffnet und Farbe sowie Zustand der Mukosa kontrolliert. Nach weiteren (2- bis 3-mal) Waschungen mit steriler, 4°C kalter Kochsalzlösung (0,9 %) wurde der auf der Schleimhautoberfläche befindliche Mukus vorsichtig mit Hilfe eines Glasobjektträgers abgeschabt und das Darmstück anschließend solange gespült, bis die insgesamt 6 Liter der sterilen NaCl-Waschlösung aufgebraucht worden waren. Der Transport vom Schlachthof in das Labor erfolgte auf Eis in sterilem Transportmedium (PBS mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Gentamycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 4 mM L-Glutamin und 0,2 % Glukose). Der Zeitraum zwischen Gewebeentnahme und Vorbehandlung am Schlachthof und der Weiterverarbeitung im Labor betrug maximal 60 Minuten.

Unter der Sterilbank wurde das Darmstück mit der Schleimhaut nach oben auf ein von steriler Alufolie bedecktes, festes Eisbett in einer Styroporunterlage gebettet. Mit der Hilfe von zwei Glasobjektträgern wurde dann die Mukosa abgeschabt, in zwei mit eiskaltem HBSS gefüllte Petrischalen überführt und schließlich mit einer Rasierklinge in sehr feine Gewebsstückchen zerschnitten. Die derart breiartig zerkleinerte Mukosa

konnte dann in acht 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) verteilt werden, die mit eiskaltem HBSS bis zur 50 ml-Marke aufgefüllt wurden. Anschließend erfolgte die erste Waschung in der Zentrifuge (130 x g, 5 min, 4°C, gut vorgekühlt; Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech). Der Mukosa-Brei teilte sich dabei in Überstand, Mukus und Gewebepellet auf. Überstand und Mukusschicht wurden vorsichtig mit einer weiten Pasteurpipette, die mit einem Schlauch an eine elektrische Pumpe (easy-load Masterflex®, Fa. Milipore) angeschlossen war, abgesaugt. Danach wurden die Röhrchen wieder auf 50 ml mit eiskaltem HBSS aufgefüllt und die Waschschritte in der Zentrifuge so lange wiederholt, bis die Mukusschicht weitestgehend vom Gewebepellet entfernt worden war. Normalerweise war das nach etwa drei bis vier Waschschritten der Fall, wie die „hirnwindungsartig“ gestaltete Oberfläche der Gewebepellets anzeigte. Dann konnten die Pellets für den enzymatischen Aufschluß gepoolt werden. 30 ml Pellet wurden zu 120 ml Verdau-Lösung (60 ml DMEM, 60 ml HBSS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 2,5 µg/ml Gentamycin, 150 U/ml Collagenase 1 CLS, 37°C vorgewärmt, Enzym zuletzt zugeben) in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben und bei 100 U/min, 37°C und 8 % CO_2 im Brutschrank auf dem Magnetrührer für 45 Minuten inkubiert (1. Verdau). Danach musste die Zellsuspension zweimal mit einer 30 ml Spritze durch 0,6 x 25 mm Kanülen gepresst werden, um durch mechanische Kräfte die Zerkleinerung der Zellklumpen zu unterstützen. Anschließend fand ein weiterer Inkubationsschritt für 10 Minuten auf dem Magnetrührer im Brutschrank statt (2.Verdau), dessen Bedingungen identisch mit denen des 1. Verdaus waren. Danach wurde die Verdaulösung auf 12 Röhrchen aufgeteilt, diese auf 50 ml mit eiskaltem HBSS aufgefüllt und bei 202 x g, 4°C, für 7 Minuten abzentrifugiert. Die trübe Enzymlösung über dem Zellpellet (bestehend aus Epithelzellkrypten und Einzellzellen der *Lamina propria mucosae*) konnte anschließend mit der Pasteurpipette abgesaugt werden. Um die Epithelzellkrypten von den Einzellzellen zu trennen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden die Röhrchen mit den Pellets unter vorsichtigem Schwenken mit Sorbitol-Lösung (2 %ig in HBSS, eiskalt) auf 50 ml aufgefüllt und dann in der gut vorgekühlten Zentrifuge bei 50 x g für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Zur mikroskopischen Kontrolle des Zellbildes im Überstand wurde ein Tropfen des Überstandes auf einen Objektträger gegeben und die Menge an darin befindlichen Einzelzellen (sog. angereicherte Kolonmesenchymzellen, Kapitel

1.2) visuell abgeschätzt. Die aus den schwereren Epithelzellkrypten gebildeten Pellets wurden mit einer 10 ml Glaspipette sorgfältig aufgesaugt und solange innerhalb der Pipette gehalten, bis der verbleibende Überstand aus dem Röhrchen entfernt worden war. Danach wurde das Pellet in das Röhrchen zurückgegeben und das Volumen mit eiskalter Sorbitol-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Es schlossen sich jeweils bis zu vier weitere Sorbitol-Dichtegradientenzentrifugationen an, wobei jedes Mal das Pellet mit der Pipette aufgesaugt, in das entleerte Röhrchen zurückgegeben, das Volumen mit der Sorbitol-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und das Zellbild im Überstand kontrolliert wurde. Normalerweise nahmen die Einzelzellen mit den Gradienten ab, das Auftreten von Epithelzellkrypten im Überstand wurde als Zeichen zur Beendigung der Prozedur gewertet. Schließlich wurden die Kryptenpellets gepoolt und zu gleichen Teilen mit DMEM-Medium versetzt. Vor der endgültigen Aussaat sollte zuerst die Anzahl der Epithelzellkrypten in der Lösung bestimmt werden. Zum Auszählen der gewonnenen Krypten wurden 20 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen bedeckt. Bei meanderförmiger Durchmusterung erfolgte die Zählung aller Krypten unter dem Mikroskop. Das Ergebnis wurde auf ein Volumen von 1 ml bezogen.

1.1.2. Kultivierung der Zellen auf Plastikoberflächen

In 25 cm^2 große Zellkulturflaschen (Fa. Corning Costar) wurden stets zwischen 7500 und 10000 Krypten ausgesät, was einer Dichte von 300 bis 400 Krypten pro cm^2 entsprach. Um das Auswachsen der Kryptenzellen zu fördern, waren die Kulturgefäße am Vortag mit Kollagen beschichtet (2,8 µl/cm^2, CollagenR, Fa. Serva, eingesetzt 1:10 verdünnt) und mit Filterdeckeln versehen worden. Vor dem Einfüllen der Krypten erfolgte stets eine angemessen lange Äquilibrierung und Temperierung der bereits mit Kulturmedium befüllten Fläschchen im Brutschrank (37°C, 8 % CO_2). Unter denselben Bedingungen erfolgten sowohl die Anzucht als auch die weitere Kultivierung der primären bovinen Kolonzellen. Als Kulturmedium diente supplementiertes Dulbecco`s Modified Eagels-Medium (DMEM) (Tab. 4).

Tab. 4: Supplemente des Zellkulturmediums für primäre bovine Kolonzellen am Tag der Anzucht

Substanz	Konzentration	Bezugsquelle
L-Glutamin	4 mM	PAA-Laboratories
Penicillin	100 U/ml	PAA-Laboratories
Streptomycin	100 µg/ml	PAA-Laboratories
Gentamycin	2,5 µg/ml	Biochrom AG
Amphotericin B	2,5 µg/ml	PAA-Laboratories
bovines Transferrin	5 µg/ml	GIBCO™, Invitrogen Corporation
bovines Insulin	10 µg/ml	Biochrom AG
nichtessentielle Aminosäuren	0,15 mM	Biochrom AG
D-(+)-Glukose	2,7 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hydrocortison	1 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EGF (epidermal growth factor)	30 ng/ml	A F Schützdeller GmbH

Dieses Kulturmedium wurde für die ersten 24 Stunden der Anzucht mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Am 1. Kultivierungstag erfolgte ein Mediumwechsel, um die zahlreichen Zelltrümmer sowie die nicht angewachsenen Krypten aus dem Überstand zu entfernen. Das nun für die weitere Kultivierung verwendete Medium enthielt nur noch 2 % FCS und wurde mit 0,5 % Rinderhypophysenextrakt (Fa. c.c. pro GmbH) angereichert. Ein weiterer Mediumwechsel erfolgte am 4. Kultivierungstag, danach abhängig von den jeweiligen Versuchen, mindestens aber zweimal in der Woche.

Die bei den Versuchen zur Optimierung der Kulturbedingungen verwendete L-Valin-freie DMEM-Spezialrezeptur (Fa. PAN Biotech GmbH) enthielt im gebrauchsfertigen

Zustand keinen Hypophysenextrakt und wurde mit dialysiertem FCS (10 bzw. 2 %ig) versetzt, unterschied sich in der übrigen Zusammensetzung aber nicht von dem herkömmlichen Epithelzellmedium.
Von der Zellsuspension vor dem Aussäen der Krypten bzw. ab dem 1. Kultivierungstag von jeder einzelnen Flasche wurden Sterilkontrollen angelegt, um die vor jedem Mediumwechsel erfolgende lichtmikroskopische Kontrolle der Kulturen auf mögliche Kontaminationen mit Pilzen, Hefen oder Bakterien zu ergänzen.

1.1.3. Kultivierung der Zellen auf Filtern

Um ihr Polarisationsverhalten zu untersuchen, wurden primäre bovine Kolonzellen oder CaCo-2-Zellen auf Filter-Einsätzen (Corning Costar, Ø 12 mm, Porengröße 0,4 µm) kultiviert und der TEER (TransEpithelial Electrical Resistance) in regelmäßigen Abständen mit einem EVOM-Gerät (Epithelial VoltOhmMeter, World Precision Instruments (WPI), USA) gemessen. Pro Filter wurden 1 x 10^5 Zellen ausgesät und anschließend bei den für die jeweilige Zellsorte erforderlichen Bedingungen inkubiert. Ein Mediumwechsel fand spätestens alle drei Tage statt.

1.2. Angereicherte bovine Kolonmesenchymzellen

Die Gewinnung der angereicherten bovinen Kolonmesenchymzellen erfolgte während der Kolonkryptenpräparation aus den zellreichen Überständen, die sich bei der Sorbitol-Dichtegradientenzentrifugation über dem Krypten-Pellet sammelten. Diese Überstände wurden bei 202 x g und 4°C für 7 Minuten abzentrifugiert, die resultierenden Pellets gepoolt und daraus schließlich 3 x 10^5 Zellen /cm^2 in eine 80 cm^2 große Plastik-Zellkulturflasche (Fa. Nunc) ausgesät. Als Zellkulturmedium diente RPMI 1640 Medium mit stabilisiertem Glutamin, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank unter Wasserdampfsättigung bei 37°C und 5 % CO_2.

1.3. Immortalisierte Kolonmesenchymzellen

Bei den als „Kolonzell-Klone“ bezeichneten Zellen handelte es sich um primäre bovine Kolonzellen, die durch Lipofektion mit dem Plasmid pSV3neo, welches für das „SV40 large T antigen“ kodiert, zu immortalisierten adhärenten Zelllinien differenziert worden waren. Die Transformation wurde freundlicherweise von Dr. M. König (Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) vorgenommen. Die zur Transfektion ausgewählten Zellen waren zu 80 bis 90 % konfluent und wurden in kleinen Plastik-Zellkulturschalen (Fa. Falcon, Ø 3,5 cm) bei 37°C, 5 % CO_2 und Wasserdampfsättigung im Brutschrank kultiviert. Je Ansatz wurden 3 bis 4 µg Plasmid pSV3neo und 15-20 µl „Superfect Transfection Reagent“ (Fa. QIAGEN) in 100 µl DMEM-Medium gemischt und für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen einmal mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie mit 1 ml Zellkulturmedium überschichtet, in welches anschließend das Plasmid/Superfect-Gemisch zugegeben werden konnte. Es schloss sich eine 2- bis 3-stündige Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank an. Danach wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Nach 1-2 Tagen konnte die Selektion beginnen, und dem Zellkulturmedium (5 ml) wurden 40 µl Geneticin-Lösung (50 mg/ml, Fa. Sigma-Aldrich) zugegeben. Ein Mediumwechsel mit Geneticin-haltigem Medium fand alle 2-3 Tage statt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden die Kolonzell-Klone in großen Plastik-Zellkulturschalen (Fa. Falcon, 100 x 20 mm) bei 37°C, 5 % CO_2 und Wasserdampfsättigung im Brutschrank kultiviert und mit Zellkulturmedium 1 (RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS) versorgt.

1.4. BUVEC

BUVEC (Bovine Umbilical Vein Endothelial Cells) sind adhärent wachsende primäre Endothelzellen, die aus Nabelvenen von Kälbern stammen. Ihre Isolierung wurde freundlicherweise von Dr. A. Taubert und Dr. C. Hermosilla (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt (83). Die Kultivierung der BUVEC erfolgte in 25 cm^2 Plastik-Zellkulturflaschen (Fa. Nunc) im Brutschrank bei 37°C und

5 % CO_2. Als Zellkulturmedium diente komplettes Endothelzell-Wachstumsmedium (ECGM, Fa. Promocell).

1.5. Etablierte Zelllinien

1.5.1. Kultivierung nicht-adhärenter Zelllinien

BL-3-Zellen (bovine leukämische Lymphoblasten, ECACC 86062401) wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und Wasserdampfsättigung in Plastik-Zellkulturflaschen (Fa. Nunc, Arbeitsvolumen 10 ml) kultiviert. Als Nährmedium diente „BL-3-Medium“ (62 % RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin und 27 % Leibovitz´s L-15, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % hitze-inaktiviertem FCS und 3 µM Mercaptoethanol). Im Abstand von 2-3 Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet und das fehlende Volumen mit Nährmedium aufgefüllt.

1.5.2. Kultivierung adhärenter Zelllinien

CaCo-2-Zellen (humane Kolonkarzinomzellen) wurden dankend von Dr. P. Velge (Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA), Tours, Frankreich) erhalten. Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zelllinie erfolgte in Plastik-Zellkulturflaschen (Fa. Nunc, Arbeitsvolumen 10 ml) bei 37°C, 5 % CO_2 und Wasserdampfsättigung im Brutschrank. Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1 (RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS).

Für die Zellernte wurde zunächst das Medium komplett aus dem Zellkulturgefäß abgesaugt, und verbleibende Mediumreste wurden durch Spülen mit 10 ml HEPES-Puffer entfernt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung (Mischung aus Trypsinlösung (0,25 %) und EDTA-Puffer (0,2 % in HEPES-Puffer)) erfolgte eine 5 bis 10 minütige Inkubation im Brutschrank. Danach wurde die Suspension aus abgelösten Zellen und Trypsin-Gebrauchslösung in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml, Fa. Greiner) überführt, die Flasche bzw. Schale mit 10 ml Zellkulturmedium 1 ausgespült und diese Waschfraktion ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 202 x g und 20°C für 7 Minuten (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus

Sepatech). Das daraus resultierende Pellet wurde in Zellkulturmedium 1 resuspendiert und ein Aliquot nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Durch Zugabe von Medium konnte die für den jeweiligen Versuch erforderliche Zelldichte eingestellt werden. Um die Zelllinie für weitere Experimente zu erhalten, wurde ein Teil der gewonnenen Zellsuspension in das Zellkulturgefäß zurückgegeben und das Volumen mit Zellkulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Ein Mediumwechsel fand spätestens alle drei Tage statt.

2. Zellkulturtest zum Nachweis der Wirkung von Shigatoxin auf die Stoffwechselaktivität von Zellen (Zytotoxizitätstest)

Die Wirkung von Shigatoxin auf die Stoffwechselaktivität von Zellen wurde in einem modifizierten Zytotoxizitätstest nach Gentry und Dalrymple (68) untersucht.
Dazu wurden jeweils drei Komponenten mit einem Volumen von je 50 µl in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Fa. Nunc) pipettiert.

1. Komponente:
Für die Testansätze bestand die erste Komponente aus der in NaCl-Lösung (0,89 %) verdünnten Probe (Shigatoxin, 2000 CD_{50}/ml). Die Testreihen wurden logarithmisch verdünnt (log_{10}-Verdünnung). Als Positivkontrolle (100 % Zytotoxizität) diente SDS (1 %ig in NaCl-Lösung), für die Negativkontrolle (0 % Zytotoxizität) wurde NaCl-Lösung verwendet. Jede Verdünnungsstufe und jede Kontrolle wurde im Dreifachansatz angelegt.

2. Komponente:
Die zweite Komponente enthielt das von den im Test verwendeten Zellen benötigte Zellkulturmedium. In dieses wurden je nach Testansatz keine Zusätze oder aber Antikörper (anti-StxB1 13C4 (247), 1,5 µg/ml) und/oder LPS (25 µg/ml) eingemischt.

3. Komponente:
Die dritte Komponente bestand aus den im Zellkulturmedium gelösten Zellen. Diese Zellsuspension war so eingestellt, dass in jede Vertiefung 2 x 10^4 Zellen pipettiert werden konnten.

Als Verdunstungsschutz wurden in die Vertiefungen der Randreihen jeweils 100 µl NaCl pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 (bzw. 8 % CO_2 für primäre bovine Kolonzellen) und Wasserdampfsättigung über 3 Tage. Danach konnten die Tests durch mikroskopische Kontrolle und MTT-Test ausgewertet werden.
Zunächst wurde die Wirkung des Toxins auf die Zellen im Vergleich mit den Kontrollen im Lichtmikroskop beurteilt. Zytostatische sowie zytotoxische Effekte wurden nach Schweregrad gestaffelt protokolliert. Anschließend erfolgte die Durchführung des sog. MTT-Tests, der in der Modifikation von Tada et al. (249) eingesetzt wurde. Der hierbei bestimmte Parameter wird als „Stoffwechselaktivität“ bezeichnet. Der Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH), ein Tetrazoliumsalz, kann nur von vitalen Zellen verstoffwechselt werden. Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien setzen das gelbe MTT zu einem lilafarbenen Formazan um. Auf diese Weise können zytostatische und zytotoxische Effekte in den Zellkulturtests kolorimetrisch quantifiziert werden. Nach der dreitägigen Inkubation und der mikroskopischen Auswertung der Zellkulturtests wurden je 25 µl der MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) je Vertiefung zugegeben und die Platten anschließend für 4 Stunden bei 37 °C unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils 100 µl SDS-Lösung (10 %ig in 0,01 N HCl) pipettiert und die Zellen damit zerstört. Zugleich wurde das in wässriger Lösung unlösliche Formazan in Lösung gebracht. Am folgenden Tag erfolgte die Messung der Extinktionsdifferenzen OD_{abs} (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Vertiefungen mit einem ELISA-Plattenlesegerät (Multiskan Ascent, Fa. Labsystems). Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen wurde in Bezug zur Positiv- (OD_{pos}) und Negativkontrolle (OD_{neg}) in der Mikrotiterplatte angegeben. Dabei diente die folgende Formel zur Ermittlung der relativen optischen Dichte OD_{rel}:

$$OD_{rel} = (OD_{abs} – OD_{pos}) / (OD_{neg} - OD_{pos}) \times 100$$

3. Untersuchungen zum Nachweis der Transkription boviner Zytokingene

3.1. Inkubation der Zellen

Vier Tage alte Primärkulturen boviner Kolonzellen oder BUVEC bzw. immortalisierte bovine Kolonmesenchymzellen 48 Stunden nach dem letzten Splitten wurden für 4 (BUVEC) oder für 4 und für 24 Stunden mit Shigatoxin 1 (200 CD_{50}/ml), mit Shigatoxin 1 und neutralisierendem Antikörper (anti-StxB1 13C4 1,5 µg/ml) oder nur mit dem jeweiligen Zellkulturmedium im Brutschrank bei Wasserdampfsättigung, 37°C und 8 % CO_2 (für primäre Kolonzellen) bzw. 5 % CO_2 (für immortalisierte Kolonmesenchymzellen und BUVEC) inkubiert. Die Zugabe von Toxin bzw. Toxin und Antikörper, die vor Verwendung mindestens eine Stunde präinkubiert worden waren, fand im Zuge des Mediumwechsels statt. Primärzellen wurden in 25 cm^2 großen Zellkultur-Flaschen (Fa. Corning Costar, Arbeitsvolumen 5 ml) und immortalisierte Zellen in Zellkultur-Schalen (Fa. Falcon, Arbeitsvolumen 10 ml) kultiviert. Für jeden Versuchsansatz genügte jeweils eines der jeweiligen Zellkulturgefäße.

3.2. Ernte der Zellen

Nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit fand die Zellernte statt. Die Überstände wurden mit Glaspipetten abgesaugt und für nachfolgende Migrationsstudien (Kapitel 9) bei -20°C asserviert. Nach dem Spülen mit HEPES-Puffer wurden jeweils 5 bzw. 10 ml Trypsin zu den Zellen gegeben und diese für 10 Minuten im Brutschrank bis zur Ablösung des Monolayers inkubiert. Anschließend wurden die Trypsin-Zell-Lösungen in 50 ml Röhrchen (Fa. Greiner) gefüllt und das gleiche Volumen an FCS-haltigem Medium nach Ausspülen der Kulturgefäße hinzugefügt. Dann erfolgte eine 7-minütige Zentrifugation bei 202 x g und 20°C (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech). Nach dem Dekantieren des Überstandes konnten die entstehenden Zellpellets in jeweils 10 ml eiskaltem PBS-EDTA resuspendiert und eine Probe für die Zellzählung entnommen werden. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 300 x g und 4°C für 5 Minuten. Wieder wurde der Überstand dekantiert, die gebildeten Zellpellets in eiskaltem PBS

gelöst (1 ml pro 1 x 10^6 Zellen) und die Zellsuspension schließlich zu jeweils 1 ml mit gestopften Spitzen in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) verteilt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 6200 x g und RT für 5 Minuten an (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Rotor 2073). Danach musste der Überstand komplett entfernt (Ausschütten mit Schwung, restliches PBS mit Pipettenspitze abziehen) und das Zellpellet sehr gut gelöst werden. Schließlich wurden je Reaktionsgefäß 600 µl RLT-Puffer mit 2,5 % ß-Mercaptoethanol (Fa. Amersham Biosciences) zugegeben und die Zellsuspension bei -80°C eingefroren.

3.3. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolation aus den geernteten Zellen erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma QIAGEN gemäß dem Protokoll „Animal Cells I“ aus dem RNeasy® Mini Handbuch.

Zum Auftauen wurden die in RLT-Puffer (mit 2,5 % ß-Mercaptoethanol) eingefrorenen Zellen für 15-20 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben und dann mindestens 10-mal durch eine 20-Gauge Nadel (0,9 mm Durchmesser) gepresst, um eine vollständige Homogenisierung zu erreichen. Dann wurden in jedes Reaktionsgefäß 600 µl Ethanol (70 %ig) hinzugefügt, mit der Pipette gemischt und schließlich 600 µl der Probe auf eine RNeasy® Mini Säule gefüllt, die sich in einem 2 ml Sammelröhrchen befand. Säule und Röhrchen wurden für 15 Sekunden bei RT und 16000 x g zentrifugiert (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Rotor 2073). Der dabei im Sammelröhrchen aufgefangene Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden auch die restlichen 600 µl Zelllysat in 70 %igem Ethanol auf die Säule geladen, ebenso abzentrifugiert und der sich bildende Durchfluss verworfen. Dann folgte ein Waschschritt mit 350 µl RW1-Puffer. Wieder wurde der Durchfluss nach der Zentrifugation (15 Sekunden, RT, 16000 x g) verworfen. Für den nachfolgenden DNAse-Verdau wurden pro Säule 10 µl QIAGEN DNAse 1 Stock-Lösung (ca. 27 U) und 1 µl Amersham DNAse (ca. 10 U) mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und jeweils 81 µl dieser DNAse-Verdau-Lösung direkt auf die Silika-Gel-Membran der Säule pipettiert. Die Inkubation bei 20-30 °C dauerte 20 Minuten. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschritt mit 350 µl RW1-Puffer, in dessen Anschluss die Säule in ein

neues Sammelröhrchen gesetzt wurde. Dann wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und diese für 15 Sekunden, RT und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses schloss sich ein weiterer Waschschritt mit 500 µl RPE-Puffer an, bei dem die Zentrifugation aber 2 Minuten dauerte, um die RNeasy® Silika-Gel-Membran zu trocknen. Damit auch letzte Reste des RPE-Puffers entfernt werden konnten, wurde die Säule anschließend noch einmal in einem neuen Sammelröhrchen für 2 Minuten abzentrifugiert. Danach erfolgte die Elution in einem frischen, autoklavierten 1,5 ml Reaktionsgefäß. 43 µl RNAse-freies Wasser (DEPC-H_2O) wurden direkt auf die Silika-Gel-Membran der Säule pipettiert und diese dann 1 Minute lang bei 16000 x g zentrifugiert. Nach der Wiederholung dieses Elutionsschrittes waren 86 µl RNA-Lösung im Reaktionsgefäß gewonnen worden.

Als Erweiterung des RNeasy® Protokolls für die Isolation von RNA aus Tierzellen schloss sich ein weiterer DNAse-Verdau im Eluat an. Zu den 86 µl RNA-Lösung wurden 10 µl Ambion 10 x DNAse 1 Puffer, 2 µl RNAse-Inhibitor RNAsin (ca. 80 U) und 2 µl Amersham DNAse 1 (ca. 20 U) hinzugefügt und diese 100 µl für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zum Inaktivieren der DNAse dienten anschließend 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6). Dann wurde die Lösung gevortext, 200 µl Ethanol (99 %ig) hinzupipettiert, nochmals gevortext und für mindestens 30 Minuten bei -70°C eingefroren. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 12000 x g, 4°C für 30 Minuten (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R) wurde der Überstand über den gebildeten Zellpellets vorsichtig auf ein Tuch abgegeben. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 200 µl 70 %igem Ethanol (16000 x g, 5 Minuten, RT, Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Rotor 2073), und der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Nachdem der Restalkohol mit Hilfe einer Plastik-Pipettenspitze sorgfältig aus dem Reaktionsgefäß entfernt worden war, konnten die Pellets bei RT und geöffneten Gefäßen unter einem Zellstofftuch mindestens 30 Minuten lang trocknen. Schließlich wurden 50 µl DEPC-H_2O und 1 µl RNAsin (ca. 40 U) zu dem RNA-Pellet gegeben, die Lösung dreimal gevortext und danach jedes Mal kurz abzentrifugiert.

3.3.1. Quantitative RNA-Bestimmung im Photometer

Die Menge der isolierten RNA wurde im Photometer (DU® 640 Spectrophotometer, Fa. Beckman) bestimmt. Aus 5 µl Probe und 95 µl TE ließ sich eine 1:20-Verdünnung herstellen, die in einer UltraVette® (Fa. Brandt) bei verschiedenen Wellenlängen (λ = 260 nm, λ = 280 nm, λ = 320 nm) gegen TE (100 µl) als Leerwert gemessen wurde.
Die Berechnung des RNA-Gehaltes geschah nach folgender Formel:

$(A_{260} - A_{320})$ x 40 (RNA-Faktor) x 20 (Verdünnungsfaktor) = ng RNA/µl RNA-Lösung

3.3.2. Qualitative Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese

Um die frisch isolierte RNA auf mögliche DNA-Kontaminationen oder Fragmentierungen hin zu untersuchen, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung vorgenommen. Für das Gel wurden 400-500 ng RNA benötigt. Die entsprechende Menge RNA-Lösung wurde mit 2 µl Ladepuffer vermischt und das fehlende Volumen auf 17 µl mit DEPC-H_2O aufgefüllt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,001 % Ethidiumbromid (Agarose und Ethidiumbromid gelöst in 1x TAE-Puffer) elektrophoretisch über 30 Minuten bei 80 Volt. Als DNA-Größenmarker wurde Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII Marker3 (Fa. Fermentas) seitlich der Nukleinsäuren mitgeführt. 1x TAE-Puffer diente als Laufpuffer in der Gelelektrophoresekammer (Fa. Keutz, Modell Mini).

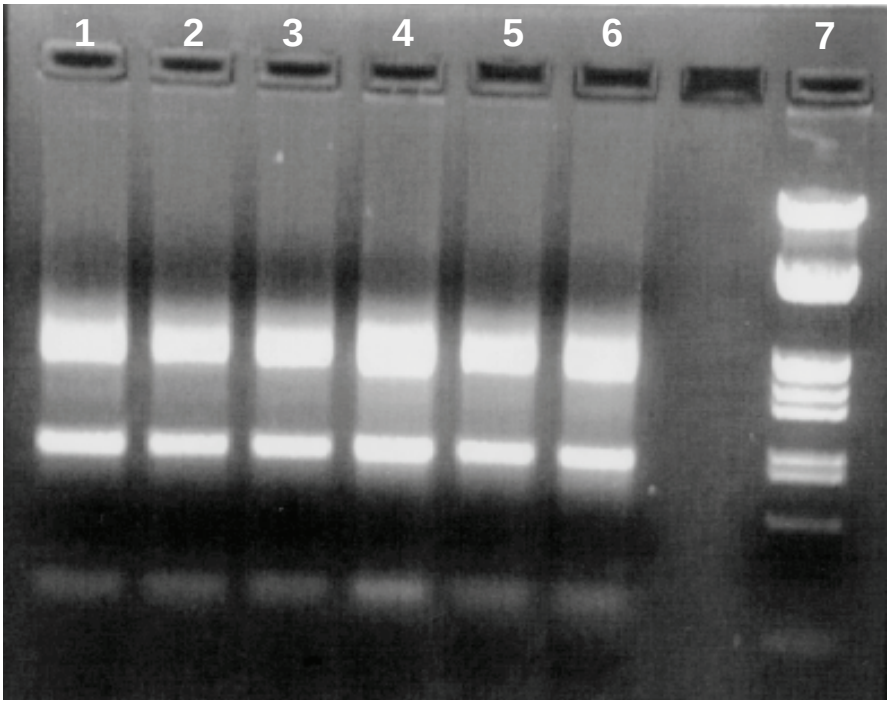


Abb. 1: Überprüfung der RNA-Qualität durch Gelelektrophorese

Auf dem exemplarisch dargestellten Agarosegel repräsentieren die Spuren 1 bis 6 die RNA-Proben, Spur 7 zeigt den Marker λHind Eco III. Es sind keine DNA-Kontaminationen zu sehen. Die Bandendicke ist bei allen sechs dargestellten RNA-Proben nahezu gleich, was für einen relativ gleichmäßigen RNA-Gehalt in den Proben spricht. In der deutlich sichtbaren oberen Bande stellt sich die 28S rRNA dar, in der etwa halb so dicken mittleren Bande erscheint die 18S rRNA. Eine hauchdünne, kaum sichtbare untere Bande schließlich zeigt die 5,8S rRNA und alle kleineren Fragmente. Die im Bild sichtbare RNA besteht also hauptsächlich aus ribosomaler RNA (rRNA). Die mRNA macht nur etwa 1-2 % der Gesamt-RNA aus und lässt sich wegen ihrer variablen Größe keiner bestimmten Bande zuordnen.

3.4. Reverse Transkription

Wenn die Menge der RNA ausreichend war und bei der gelelektrophoretischen Kontrolle keine DNA-Kontaminationen festgestellt werden konnten, wurden 1000 ng RNA in komplementäre DNA (complementary-DNA (cDNA)) umgeschrieben.

Um kontrollieren zu können, ob die genomische DNA des Ausgangsmaterials vollständig verdaut worden war, wurde von jeder Probe zusätzlich zu dem Ansatz für die Umsschreibereaktion (plusRT-Ansatz) noch jeweils ein Ansatz angefertigt, der alle Substanzen außer den Primern und der Reversen Transkriptase (RT) enthielt. Diese minusRT-Ansätze wurden nach demselben Protokoll behandelt wie die umzuschreibenden Proben, mit dem Ergebnis, dass am Ende der Umschreibereaktion

aber keine cDNA gebildet werden konnte. Die in diesen Proben eventuell in einer GAPDH-Test-PCR entdeckten Banden müssen dann eindeutig von der noch im Probenmaterial vorhandenen, nicht vollständig verdauten genomischen DNA stammen (Kapitel 3.5).

Die entsprechende Menge RNA-Lösung wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß mit Wasser für die Molekularbiologie (DEPC-H_2O, Fa Roth) auf 23 µl aufgefüllt und für den plusRT-Ansatz mit 2 µl Oligo-$d(T)_{16}$-Primern (= 0,5 µg, Applied Biosystems) ergänzt. Für den minusRT-Ansatz wurden statt der Primer 2 µl H_2O hinzugefügt. Die Proben wurden kurz gevortext und abzentrifugiert und dann im Cycler (PERKIN ELMER Gene Amp 9600 PCR System) für 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Danach erfolgte die Lagerung auf Eis. Zu den 25 µl Ansätzen wurden dann jeweils die in Tabelle 5 aufgeführten Substanzen hinzugefügt.

Tab. 5: pro Ansatz verwendete Substanzen für die reverse Transkription

Substanz	verwendetes Volumen	Bezugsquelle
DEPC-H_2O	1 µl	Carl Roth GmbH
M-MLV RT 5x Reaktions-Puffer	8 µl	Promega Corporation
dNTP-Mix	4 µl (0,5 mM)	PAN Biotech
Ribonuclease-Inhibitor RNAsin	1 µl (40 U)	Fermentas
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl (200 U)	Promega Corporation

Statt der Reversen Transkriptase erhielt der minusRT-Ansatz 1 µl H_2O.

Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben im Cycler (PERKIN ELMER Gene Amp 9600 PCR System) 60 Minuten auf 40°C und 2 Minuten auf 94°C erhitzt. Anschließend wurde die gewonnene cDNA sogleich in die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen eingesetzt oder aber bei -20°C eingefroren.

3.5. PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen

In einer Test-PCR sollten eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Dazu bot sich die Untersuchung der nicht umgeschriebenen minusRT-Ansätze auf das „Housekeeping"-Gen an, welches für die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kodiert, bei allen Vertebratenzellen exprimiert wird und somit in einer Test-PCR detektiert werden sollte. Die Primer stammten von der MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) (Tab. 6).

Tab. 6: Basenfolge der Primer für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen

Primer	Basenfolge 5´bis 3´Ende
bo-GAPDH-Taq2-forward	-GCG ATA CTC ACT-CTT-CTA-CCT-TCG A-
bo-GAPDH-Taq2-reverse	-TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC-

Der pro Ansatz verwendete PCR-Mix zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen setzte sich wie in Tabelle 7 dargestellt zusammen.

Tab. 7: pro Ansatz verwendete Substanzen für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen

Substanz	verwendetes Volumen	Bezugsquelle
Aqua bidest.	12,1 µl	-
10 x Ampli Taq Puffer	2,0 µl	Applied Biosystems
25 mM $MgCl_2$ lösl.	1,2 µl (f.c. 1,5 mM)	Applied Biosystems
dNTP Mix	1,0 µl (f.c. 0,2 mM)	PAN Biotech
GAPDH-Forward Primer	1,0 µl(f.c. 0,25 µM)	MWG-Biotech AG
GAPDH-Reverse Primer	1,0 µl(f.c. 0,25 µM)	MWG-Biotech AG
Ampli Taq Polymerase	0,2 µl (1 U)	Applied Biosystems

Zu jedem der Ansätze wurden dann 1,5 µl (37,5 ng cDNA) Probe bzw. 1,5 µl H_2O für die Negativkontrolle pipettiert. Als PCR-Positivkontrolle fand eine PBMC- oder Kolonepithelzell-cDNA Verwendung. Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben (20 µl Gesamtvolumen) im Cycler (PERKIN ELMER Gene Amp 9600 PCR System) 40 x hintereinander zunächst für 15 sek auf 94°C, für 30 sek auf 60°C und dann für 30 sek auf 72°C erhitzt. Das Ergebnis der PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen wurde mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Dazu wurden die gesamten PCR-Ansätze (je 20 µl) mit jeweils 2,5 µl Ladepuffer vermischt und auf ein 3 %iges Agarosegel (mit 0,003 % Ethidiumbromid, gelöst in 1x TAE-Puffer) aufgetragen. Als Marker dienten 20 µl Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fa. Fermentas). Unter Verwendung des Laufpuffers TAE erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 120 Volt über 45 Minuten. Wenn bei keiner der Proben außer der Positivkontrolle eine Bande zu sehen war, galt die Qualität als ausreichend für die Durchführung der „Real time“ TaqMan® PCR.

3.6. „Real time“ TaqMan® PCR

Die Methode der „Real time“ TaqMan® PCR basiert auf der Spaltung einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde durch die 5`-3`-Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase während der PCR und der Messung der Fluoreszenzintensität durch ein automatisiertes Spektrophotometer, welches in das Sequenzdetektionssystem (ABI PRISM™ 5700, Applied Biosystems) integriert ist.

Die quantitative Untersuchung der verschiedenen Proben und Kontrollen auf die mRNA-Transkription der bovinen Zytokin- und Chemokingene *il-8, gro-α, mcp-1, rantes, ip-10, tgf-β, il-10* und *il-12* erfolgte im Vergleich mit dem konstitutiv exprimierten „Housekeeping“-Gen *gapdh*. Speziell für *rantes* wurde ein eigenes System mit anderen Primern und anderer Sonde (genannt GAP-RANTES) verwendet (253).

Tabelle 8 : Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Primerpaare

Primer	Basenfolge 5`bis 3`Ende	Referenz
GAPDH Forw	GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A	(253)
GAPDH Rev	TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC	
GAP-RANTES Forw	GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA	(253)
GAP-RANTES Rev	CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	
IL8 Forw	CAC TGT GAA AAA TTC AGA AAT CAT TGT TA	(131)
IL8 Rev	CTT CAC CAA ATA CCT GCA CAA CCT TC	
GROalpha Forw	CGC CTG TGG TCA ACG AAC T	(253)
GROalpha-Rev	CAC CTT CAC GCT CTG GAT GTT	
MCP-1 Forw	CGC TCA GCC AGA TGC AAT TA	(253)
MCP-1 Rev	GCC TCT GCA TGG AGA TCT TCT T	
RANTES Forw	CCC TGC TGC TTT GCC TAT ATC T	(253)
RANTES Rev	GCA CTT GCT GCT GGT GTA GAA A	
IP10 Forw	AAG TCA TTC CTG CAA GTC AAT CCT	(253)
IP10 Rev	TTG ATG GTC TTA GAT TCT GGA TTC AG	
TGF Forw	GGC CCT GCC CTT ACA TCT G	(253)
TGF Rev	CGG GTT GTG CTG GTT GTA CA	
IL10 Forw	CCA AGC CTT GTC GGA AAT GA	Taubert, unver-
IL10 Rev	GTT CAC GTG CTC CTT GAT GTC A	öffentlicht
IL12-p40 Forw	GCA GCT TCT TCA TCA GGG ACA T	Taubert, unver-
IL12-p40 Rev	CCT CCA CCT GCC GAG AAT T-	öffentlicht

Für jedes Gen wurde im Doppelansatz ein eigener PCR-Mix mit den entsprechenden Primer-Paaren (MWG Biotech AG) und der passenden Sonde (Eurogentec, Liege, Belgien) angefertigt (Tab. 8, 9 und 10).

Tab. 9: Zusammensetzung des PCR-Mix für die TaqMan® PCR pro Ansatz (25 µl)

Substanz	verwendete Menge	Bezugsquelle
2x TaqMan® MasterMix	12,5 µl	EUROGENTEC
Forward Primer	1,5 µl (f.c. 300 nM)	MWG-Biotech AG
Reverse Primer	1,5 µl (f.c. 300 nM)	MWG-Biotech AG
Sonde	1 µl (f.c. 200 nM)	EUROGENTEC
Aqua bidest.	7 µl	-

Pro Ansatz wurden dann jeweils 1,5 µl Probe (37,5 ng cDNA) bzw. 1,5 µl H_2O für die Negativkontrolle hinzugefügt. Nachdem die Ansätze in die Vertiefungen einer „Optical 96-well Reaction Plate“ (Fa. MicroAmp) pipettiert und die Platte mit einer durchsichtigen Folie verschlossen worden war, wurden die Proben im TaqMan® Cycler einmal für 2 Minuten auf 50°C, einmal für 10 Minuten auf 95°C und 40 x für 15 Sekunden auf 95°C und für 60 Sekunden auf 60°C erhitzt.

Tab. 10 : Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Sonden

Referenzen vgl. Tabelle 8.

Sonde	Basenfolge 5`bis 3`Ende
GAPDH	CTG GCA TTG CCC TCA ACG ACC ACT T
GAP-RANTES	ATA CCC TCA AGA TTG TCA GCA ATG CCT CCT
IL-8	AAT GGA AAC GAG GTC TGC TTA AAC CCC AAG
GRO-α	CCA GTG CCT GCA GAC CTT GCA GG
MCP-1	CCC AAG TCG CCT GCT GCT ATA CAT TCA A
RANTES	CCC GCA CCC ACG TCC AGG AGT
IP-10	CCA CGT GTC GAG ATT ATT GCC ACA ATG A
TGF-β	CCT GGA TAC ACA GTA CAG CAA GGT CCT GG
IL-10	AGC CTG TGG CAT CAC CTC TTC CAG GTA A
IL-12	CAC CCA AGA ACC TGC AAC TGA GAC CAT TAA

Jede Sonde ist am 5`Ende mit dem „Reporter“-Farbstoff FAM (6-Carboxyfluoreszein) und am 3`Ende mit dem „Quencher“-Farbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) markiert. Während der PCR lagert sich die Sonde an ihre Zielsequenz zwischen dem „forward“- und dem „reverse“-Primer an und wird schließlich in der Extensionsphase durch die 5`Nukleaseaktivität der DNA Polymerase gespalten. Dadurch kommt es zur Freisetzung des „Reporter“-Farbstoffes, der jetzt seine charakteristische Fluoreszenz entfalten kann, die vorher vom „Quencher“-Farbstoff unterdrückt worden ist. Das Sequenzdetektionssystem misst nun den Anstieg in der Fluoreszenzintensität des „Reporter“-Farbstoffes, trägt für jedes untersuchte Gen das im Verlauf der PCR wachsende Fluoreszenzsignal graphisch gegenüber der PCR-Zyklenzahl auf und vergleicht es mit dem Reaktionsverlauf des jeweiligen „Housekeeping“-Gens. In den exponentiellen Teil der Kurve wird der Schwellenwert (Threshold) gelegt. Der Schnittpunkt der Fluoreszenzkurve mit dem Schwellenwert wird als Ct-Wert (Cycle threshold) bezeichnet und gibt die Zyklenzahl an, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal statistisch signifikant über den Hintergrundsignalen

liegt. Zur weiteren Auswertung wurde die vergleichende Ct-Methode (ΔΔ Ct-Verfahren) nach Herstellerangaben des ABI PRISM^{TM} 5700-Sequenzdetektionssystems (Applied Biosystems) angewendet:

1. Ermittlung der Mittelwerte der Ct-Werte aus den Doppelansätzen für jedes Gen
2. Normalisierung auf das „Housekeeping“-Gen:
   $MW\text{-}Ct_{Zielgen} - MW\text{-}Ct_{\text{“Housekeeping”-Gen}} = \Delta\ Ct$
3. Bestimmen des Ansatzes “nur Medium” als Referenzsystem (Kalibrator)
4. Normalisierung auf den Kalibrator:
   $\Delta\ Ct_{Probe} - \Delta\ Ct_{Kalibrator} = \Delta\Delta\ Ct$
   (dadurch wird der Kalibrator = Null)
5. Berechnung der relativen Mengen durch Einsetzen der ΔΔ Ct-Werte in die Formel: $2^{(-\Delta\Delta\ Ct)}$
   (dadurch erreicht der Kalibrator den Wert 1 bzw. 100 %)

4. Durchflusszytometrie

4.1. Zur Detektion verwendete Antikörper

Antikörper, die für die durchflusszytometrische Analyse und/oder die Fluoreszenzmikroskopie verwendet wurden, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tab. 11: verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

erkanntes Antigen	(Spezies)Isotyp	Herkunft/Bezug	Gebr.Lösung
boCD11a	(Maus)IgG2a	Dirk Werling, London	1:10 in PBS
boCD11b	(Maus)IgG1	IL-A 15 ZK-Überstand	50 µl pur
boCD11c	(Maus)IgG1	IL-A 16 ZK-Überstand	50 µl pur
boCD14	(Maus)IgG1	Dirk Werling, London	1:10 in PBS
boCD21	(Maus)IgG2a	IL-A 65 ZK-Überstand	50 µl pur
boCD25	(Maus)IgG1	IL-A 111 ZK-Überstand	50 µl pur
boCD71	(Maus)IgM	IL-A 77 ZK-Überstand	50 µl pur
CD77	(Ratte)IgM	Beckman-Coulter	1:10 in PBS
boCD80	(Maus)IgG1	Dirk Werling, London	25 µl pur
boCD86	(Maus)IgG1	Dirk Werling, London	25 µl pur
CD172a	(Maus)IgG1	IL-A 24 ZK-Überstand	50 µl pur
boMHC I	(Maus)IgG2a	IL-A 88 ZK-Überstand	100 µl pur
MHC II DR	(Maus)IgG1	J-11 ZK-Überstand	50 µl pur
MHC II DQ	(Maus)IgG2a	Dirk Werling, London	25 µl pur
ACT2	(Maus)IgG1	VMRD, Inc.	1:400 in PBS
Vimentin	(Maus)IgG1	DAKO A/S	1:13 in PBS

Fortsetzung Tab. 11

erkanntes Antigen	(Spezies)Isotyp	Herkunft/Bezug	Gebr.Lösung
Zytokeratin/FITC	(Maus)IgG1	Sigma-Aldrich	1:100 in PBS
ZO-1	(Ratte)IgG	Chemicon	1:50 in PBS
Maus-IgG(γ)/FITC	Ziege(IgG)	Medac	1:200 in PBS
Maus-IgG/PE	Ziege(IgG)	Sigma-Aldrich	1:50 in PBS
Ratte-IgM(μ)/PE	Ziege(IgM)	Beckman-Coulter	1:200 in PBS
Ratte-IgM(μ)/FITC	Ziege(IgM)	Dianova	1:100 in PBS
Ratte-IgG(γ)/TRITC	Ziege(IgG)	Biozol, Southern Biotech	1:200 in PBS
M30 Cyto death/FITC	Maus(IgG2b)	Roche	1:250 in PBS

4.2. Probenvorbereitung zur Untersuchung der Zytoskelettausstattung

Die Untersuchung der Zytoskelettausstattung fand über den Nachweis charakteristischer intermediärer Proteinfilamente der Zellen statt. Als Marker für Zellen epithelialer Herkunft wurde Zytokeratin verwendet und direkt mit einem FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat)-gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Zellen mesenchymaler Herkunft konnten mit einem gegen Vimentin gerichteten Antikörper detektiert werden, der wiederum mit einem PE (R-Phycoerythrin)-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurde. Da Zytokeratin und Vimentin intrazellulär gelegen sind, mussten die Zellen vor der Färbung fixiert und permeabilisiert werden.

1. Einsetzen von 2 x 10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Nunc)
2. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min, 4°C vorgekühlt) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt)
3. FIXATION: Resuspension der Zellpellets in je 100 µl 2 % Paraformaldehyd

(PFA) (50 µl PBS + 50 µl Fixierungsreagenz mit 4 % PFA in PBS)

4. Inkubation für 30 min bei RT in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
5. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
7. PERMEABILISIERUNG: Resuspension der Zellpellets in je 100 µl Digitoninlösung (0,005 % in PBS)
8. Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
9. zweimalige Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt
10. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in je 50 µl Gebrauchslösung des FITC-konjugierten anti-Zytokeratin Antikörpers bzw. des PE-gekoppelten anti-Vimentin Antikörpers (anti-Vimentin Antikörper und PE-markierter anti-Maus-IgG Antikörper sind vorher mind. 30 min. zusammen in der Gebrauchslösung inkubiert worden)
11. Inkubation für 20 min in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
12. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
13. Aufnahme der Zellpellets in je 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200 bis 500 µl PBS (angepaßt an die jeweilige Zellzahl)

Alle Präparationsschritte außer der Fixation und der Permeabilisierung wurden auf Eis durchgeführt.

4.3. Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz auf nativen Zellen

Zum Nachweis bestimmter Oberflächenantigene auf nativen Zellen und zur Markierung abgestorbener Zellen durch den Totfarbstoff 7-AAD wurde folgendes Präparationsschema verwendet:

1. Einsetzen von 2 x 10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Nunc)

2. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min, 4°C vorgekühlt) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt)
3. 1. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in je 50 µl antikörperhaltigen Zellkulturüberstandes (mAk gegen bestimmte Oberflächenantigene) bzw. in je 25 µl Gebrauchslösung des CD77-Antikörpers
4. Inkubation für 20 min in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
5. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
6. 2. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in je 50 µl Gebrauchslösung des PE-markierten anti-Maus-IgG Antikörpers mit 7AAD (f.c. 1µg/ml) bzw. des PE-markierten anti-Ratte-IgM Antikörpers mit 7-AAD
7. Inkubation für 20 min in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
8. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
9. Aufnahme der Zellpellets in je 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200 bis 500 µl PBS (angepaßt an die jeweilige Zellzahl)

Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

4.4. Probenvorbereitung für den intrazellulären CD77-Nachweis

Die Probenvorbereitung für den CD77-Nachweis bei fixierten und permeabilisierten Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einsetzen von 2 x 10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Nunc)
2. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min, 4°C vorgekühlt) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt)
3. FIXATION: Resuspension der Zellpellets in je 100 µl 2 % Paraformaldehyd (PFA) (50 µl PBS + 50 µl Fixierungsreagenz mit 4 % PFA in PBS)
4. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt

5. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
6. PERMEABILISIERUNG: Resuspension der Zellpellets in je 100 µl Digitoninlösung (0,005 % in PBS)
7. Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
8. zweimalige Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt
9. 1. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in je 25 µl Gebrauchlösung des anti-CD77 Antikörpers
10. Inkubation für 20 min in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
11. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
12. 2. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in je 50 µl Gebrauchslösung des PE-markierten anti-Ratte-IgM Antikörpers oder des FITC-markierten Ziege anti-Ratte-IgM Antikörpers
13. Inkubation für 20 min in Dunkelheit, anschließend Zentrifugationsschritt
14. Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt
15. Aufnahme der Zellpellets in je 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200 bis 500 µl PBS (angepaßt an die jeweilige Zellzahl)

Alle Präparationsschritte außer der Fixation und der Permeabilisierung wurden auf Eis durchgeführt.

4.5. Probenvorbereitung für den Apoptose-Nachweis

Für den Apoptose-Nachweis wurde der epithelzellspezifische FITC-konjugierte Antikörper M30 CytoDEATH^{TM} (Fa. Roche) eingesetzt. Dieser monoklonale Antikörper erkennt die in apoptotischen Epithelzellen von Caspasen (Cysteinyl-aspartatic acid proteases) neu gebildeten Epitope von Zytokeratinen.
Der Färbung ging eine Fixierung mit Methanol voraus:

1. Einsetzen von 2 x 10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Nunc)
2. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min, 4°C vorgekühlt) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt)
3. FIXATION: Resuspension der Zellpellets in je 100 µl -20°C kaltem Methanol
4. Inkubation für 8 min auf Eis, anschließend Zentrifugationsschritt
5. zweimalige Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt
6. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in je 100 µl Gebrauchlösung des FITC-konjugierten M30 CytoDEATH^{TM}-Antikörpers
7. Inkubation für 30 min auf Eis, anschließend Zentrifugationsschritt
8. zweimalige Resuspension der Zellpellets in je 100 µl PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt
9. Aufnahme der Zellpellets in je 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200 bis 500 µl PBS (angepaßt an die jeweilige Zellzahl)

4.6. Probenanalyse

Zur Probenanalyse wurde ein BD FACSCalibur^{TM}-Gerät (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) eingesetzt. Dieses Durchflusszytometer (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter) ist mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser und mit einem 635 nm „Red Diode“ Laser ausgestattet. Die anhand von Vorversuchen eingestellten Geräteparameter wurden in Form von Standardprotokollen gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Nach der Probenanalyse mit dem gerätespezifischen Programm „Cell Quest Pro“ (Fa. Becton-Dickinson) erfolgte die Aufarbeitung und Auswertung der Daten mit Hilfe des Programmes FCS Express (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada). Die Differenzierung der unterschiedlichen analysierten Zellsorten gelang über die Parameter Größe (Vorwärtsstreulicht oder „forward scatter“ (FSC)), Granularität (Seitwärtsstreulicht oder „sideward scatter“ (SSC)) und/oder Fluoreszenzeigenschaften (spezielle Kanäle). Zellpopulationen mit gleichen Eigenschaften konnten innerhalb elektronischer Auswertefenster („Gates“) zusammengefasst und genauer analysiert werden. Von jedem Probenansatz wurde

stichprobenartig nur eine bestimmte Anzahl von Ereignissen (hier 5000) gezählt, analysiert und als Zahl der „Gesamtzellen“ einer Probe definiert.

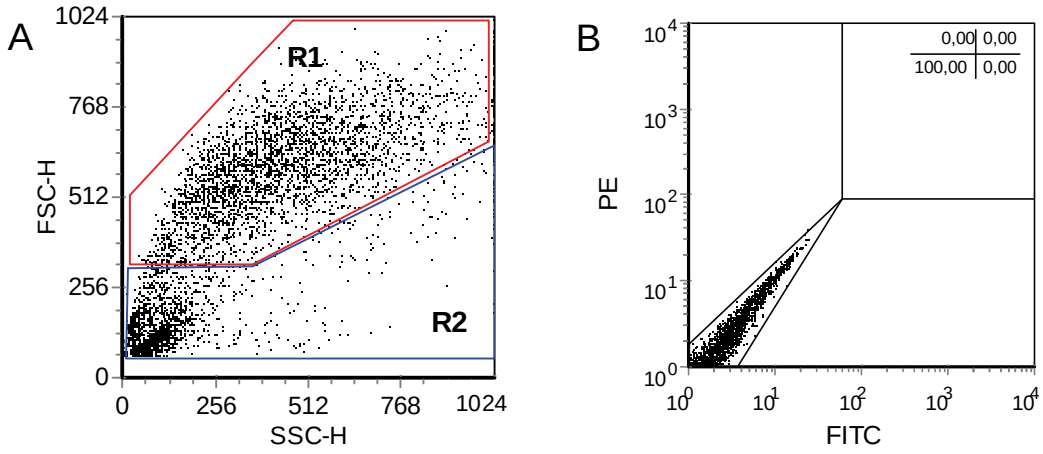


Abb. 2: Probenanalyse im Durchflusszytometer

Repräsentative Histogramme der Analyse primärer boviner Kolonzellen: A: Differenzierung der Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC); R1 umfasst die morphologisch intakten Zellen, R2 die subvitalen und toten Zellen. B: Differenzierung der Zellen nach Fluoreszenzeigenschaften (FITC oder PE), beispielhaft dargestellt ist eine Negativkontrolle, in der alle Zellen ungefärbt sind. Deutlich wird die starke Autofluoreszenz.

Bei der Differenzierung der Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) konnten zwei verschiedene Populationen definiert werden: Große und weniger granulierte Zellen wurden als „morphologisch intakte“ Zellen im Auswertefenster R1 zusammengefasst, während kleine und stärker granulierte Zellen bzw. Zelltrümmer als „subvitale“ (tote) Zellen im Auswertefenster R2 versammelt wurden (Abb. 2A). Bei der Analyse von nativen (nicht fixierten) Zellen konnte durch die Zugabe eines Totfarbstoffes (7-AAD), der nur bei toten Zellen den Zellkern anfärbt, eine zusätzliche Unterscheidung getroffen werden. Die nach Totfarbstoff-Selektion in R1 versammelten Zellen waren im Unterschied zu fixierten Zellen nicht nur morphologisch intakt, sondern tatsächlich lebendig und wiesen eine intakte Zellmembran auf. Die weitere Analyse sowohl der nativen als auch der fixierten Zellen bezog sich selektiv auf die in R1 erfassten Zellen, bei denen das Vorhandensein bestimmter Antigene mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde. Zu diesem Zweck wurden die Auswertefenster anhand der Negativkontrolle (Probe ohne jegliche Antikörper) und der Sekundärantikörper-Kontrolle (Probe nur mit Sekundärantikörpern) so eingerichtet, dass mindestens 98 %

dieser ungefärbten Zellen im linken unteren Quadranten erschienen (Abb. 2B). Bei Proben, die mit Primärantikörper inkubiert worden waren, lagen die „Antigen-positiven“ Zellen entsprechend den Fluoreszenzintensitäten der jeweils eingesetzten Farbstoff-markierten Sekundärantikörper entweder im rechten unteren oder im linken oberen Quadranten. „Doppelt positive“ Zellen erschienen im rechten oberen Quadranten.

5. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Charakterisierung der Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes (Leitz DMRB, Laborlux12, Wetzlar) wurden die gleichen Antikörperkombinationen verwendet wie bei der durchflusszytometrischen Analyse (Tab. 11). Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer möglichst bei Lichtausschluß durchgeführt. Die Volumina der Wasch-, Fixierungs- und Permeabilisierungslösungen richteten sich nach dem jeweiligen Arbeitsvolumen des Zellkulturgefäßes. Während des gesamten Vorgangs wurden die Zellen stets feucht gehalten.

5.1. Präparatevorbereitung zur Untersuchung der Zytoskelettausstattung

Die Präparatevorbereitung zur Untersuchung der Zytoskelettausstattung erfolgte nach folgendem Schema:

1. Entfernen des Mediums aus dem Zellkulturgefäß durch vorsichtiges Abkippen
2. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
3. FIXATION der Zellen in 2 % PFA (gleiche Teile PBS und Fixierungsreagenz mit 4 % PFA in PBS zugeben) für 30 min
4. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
5. PERMEABILISIERUNG der Zellen mit Digitonin (0,005 % in PBS) für 10 min
6. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
7. Ausstanzen der Präparate aus den Böden der Kulturgefäße mit Hilfe einer erhitzten Kupferstanze und sofortiges Überführen in die PBS-gefüllten Vertiefungen einer 12-Loch-Platte (Färbeplatte)

8. Begradigen der Präparatekanten mit Hilfe eines Skalpells bis zur Planheit
9. 1. FÄRBESCHRITT: Entfernen des PBS durch Absaugen, anschließend Inkubation der Zellen mit je 50 µl Gebrauchslösung des PE-gekoppelten anti-Vimentin Antikörpers (anti-Vimentin Antikörper und PE-markierter anti-Maus-IgG Antikörper sind vorher mind. 30 min. zusammen in der Gebrauchslösung inkubiert worden) für 1 Stunde in Dunkelheit
10. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
11. BLOCKEN: Entfernen des PBS durch Absaugen, anschließend Inkubation der Zellen mit je 200 µl des mAk 1E8 (Zellkulturüberstand; Maus IgG1-Ak gegen Phospholipase C von *Clostridium perfringens*) für 1 Stunde in Dunkelheit
12. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
13. 2. FÄRBESCHRITT: Entfernen des PBS durch Absaugen, anschließend Inkubation der Zellen mit je 50 µl Gebrauchslösung des FITC-markierten anti-Zytokeratin Antikörpers für 1 Stunde in Dunkelheit
14. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
15. Auflegen des Präparates auf einen Objektträger,dann Eindecken mit 60 µl Mowiol-Mounting-Medium, dann blasenfreies Auflegen eines Deckgläschens und Befestigen des Präparates auf dem Objektträger mit Mowiol-Mounting-Medium
16. Trocknen über Nacht bei 4°C in Dunkelheit

5.2. Präparatevorbereitung für den Nachweis von CD77 bzw. Aktin

Die Präparatevorbereitung zum Nachweis von CD77 bzw. Aktin und evtl. eines zusätzlichen Zytoskelettbestandteils geschah nach folgendem Schema:

Die Schritte 1. bis 8. wurden entsprechend Kapitel 5.1 durchgeführt.

9. 1. FÄRBESCHRITT: Entfernen des PBS durch Absaugen, anschließend Inkubation der Zellen mit je 25 µl Gebrauchslösung des anti-CD77-Antikörpers bzw. 50 µl des TRITC-markierten anti-Phalloidin-Antikörpers (100 µg/ml) und evtl. mit 50 µl Antikörpergebrauchslösung gegen Zytokeratin oder Vimentin
10. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS

11. 2. FÄRBESCHRITT: Entfernen des PBS durch Absaugen, anschließend Inkubation der Zellen mit je 50 µl Gebrauchslösung des PE-markierten anti-Ratte-IgM Antikörpers für 1 Stunde in Dunkelheit

Die weitere Behandlung der Präparate geschah entsprechend Kapitel 5.1 Schritt 14-16.

5.3. Präparatevorbereitung für den ZO-1-Nachweis

Die „tight junctions“ (syn. Zonulae occludentes) genannten Zell-zu-Zell-Verbindungen gelten als Charakteristikum für das dreidimensionale Wachstum eines Zellrasens. Um die Polarisierung der auf Filtern kultivierten Zellkulturen zu verifizieren, wurde ein spezifisch gegen das „tight junction“-Protein ZO-1 gerichteter Primärantikörper mit einem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht.
Die Vorbereitung der Präparate verlief nach folgendem Schema:

1. bewachsenen Filter in die Vertiefung einer leeren 12-Loch-Platte einsetzen
2. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
3. FIXATION der Zellen in 2 % PFA (gleiche Teile PBS und Fixierungsreagenz mit 4 % PFA in PBS sowohl in das obere als auch in das untere Filter-Kompartiment zugeben) für 30 min.
4. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
5. Umsetzen des Filters in die mit PBS (ca. 2 ml) benetzte Vertiefung einer 6-Loch-Platte
6. 1. FÄRBESCHRITT: Inkubation der Zellen mit je 50 µl Gebrauchslösung des anti-ZO-1-Antikörpers für 1 Stunde in Dunkelheit
7. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
8. 2. FÄRBESCHRITT: Inkubation der Zellen mit je 50 µl Gebrauchslösung des TRITC-markierten Ziege-anti-Ratte-IgG Antikörpers (γ-Ketten spezifisch) für 1 Stunde in Dunkelheit
9. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
10. Ausschneiden des Filters aus der Halterung mit Hilfe eines Skalpells, dann Eindecken mit 60 µl Mowiol-Mounting-Medium und blasenfreies Auflegen eines Deckgläschens, Trocknen über Nacht bei 4°C in Dunkelheit

5.4. Herstellung von Mowiol-Mounting-Medium

Das Mowiol-Mounting-Medium verhindert das Ausbleichen von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie. Für seine Herstellung wurden 2,4 g Mowiol (Polyvinylalkohol, Fa. Clariant) mit 6 g Glycerinlösung (87 %)und 6 ml Aqua dest. vermischt und für 2 Stunden bei RT auf dem Rührer gelöst. Nach Zugabe von 12 ml Tris-Lösung (pH 8,5 mit HCl) erfolgte das Lösen für 10 Minuten bei 50 bis 60°C im Wasserbad. Anschließend wurden ungelöste Reste bei 3291 x g für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand geerntet und dessen Volumen mit Hilfe einer Pipette ermittelt. Je ml Lösung konnten dann 1,5 mg pPD (p-Phenylendiamin = 1,4-Diaminobenzol, Fa. Sigma-Aldrich) hinzugegeben werden. Zum Schutz vor Licht wurde das Aufbewahrungsgefäß in Alufolie gehüllt. Um Sauerstoff aus der Lösung auszuschließen, erfolgte am Ende das Entgasen im Exsikkator. Danach wurde das Mowiol-Mounting-Medium bei -20°C gelagert.

6. Rasterelektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Filter für die Rasterelektronenmikroskopie verlief nach folgendem Schema:

1. Filter in die Vertiefung einer leeren 12-Loch-Platte einsetzen
2. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
3. FIXATION der Zellen mit „Yellow Fix“-Gebrauchslösung
   (1 Teil Glutaraldehydlösung (25 %) und 11,5 Teile Yellow Fix) für mindestens1 Stunde
4. zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS
5. Ausschneiden der Filter aus ihren Halterungen und Überführen in die Einsätze des „Critical Point“-Trockners (CPD)
6. stufenweise ENTWÄSSERUNG der Probe in einer Alkoholreihe :
   jeweils 10 min. in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 100 %igem Ehanol
7. Einlegen der Probe für jeweils 10 min. in eine Mischung aus Ethanol und Essigsäure-Isoamylester im Verhältnis 3:1, 1:1 und 1:3
8. 10 min. Einlegen in reinem Essigsäure-Isoamylester

9. Überführen in den CPD (Balzers Bal-Tec CPD 303)
10. 3 min. Goldbedampfung (Balzers SCD 020)

Die Aufnahmen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop „Phillips XL 20“ angefertigt.

7. Test zur Aufnahmefähigkeit von LDL

Der Test basiert auf der der von Voyta et al. (265) beschriebenen Methode der Identifizierung von „Low density lipoprotein“ (LDL) aufnehmenden Endothelzellen zur Differenzierung von anderen Zelltypen. Die Zellen wurden auf Glasdeckgläschen in 6-Loch-Platten kultiviert und waren zum Zeitpunkt der Untersuchung zu 80 bis 90 % konfluent und von vitaler Morphologie. Nach dem Entfernen des alten Mediums wurden die Plattenvertiefungen mit jeweils 1 ml LDL (Dil-Ac-LDL, Harbor Bio-Products, Norwood, USA, Cat. No 4003)-haltigen Mediums (10 µg LDL/ml) befüllt, die Negativkontrollen erhielten LDL-freies Medium. Dann schloss sich eine Inkubation für 4 Stunden bei 5 % CO_2 und 37°C an. Danach wurde das Medium abgenommen und durch frisches LDL-freies Medium (2 bis 3 ml) ersetzt. Nach der folgenden 10-minütigen Inkubation im Brutschrank erfolgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2 %igem Paraformaldehyd fixert und anschließend erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Eindecken wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen Eindeckmedium (Vectashield Hardset mit DAPI, Vector Lab., Burlingame, USA, Cat. No H-1500) gelegt. Nach dem Aushärten im Kühlschrank über Nacht erfolgte die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus Bx50).

8. Charakterisierung von Zellen bezüglich ihrer Enzymausstattung

Zur Charakterisierung von Zellen bezüglich ihrer Enzymausstattung wurde die Expression ausgesuchter Leitenzyme untersucht, die eine Aussage über Qualität und Differenzierung der Zellen über den Kultivierungszeitraum (max. 10 Tage) erlauben. Als Markerenzyme wurden gamma-Glutamyltranspeptidase (γ-GT), alkalische Phosphatase (AP), Saccharase und Laktase ausgesucht. Während die γ-GT den Grad der Entdifferenzierung von Zellen markiert (Tumormarker), nimmt die enzymatische Aktivität von Saccharase und Laktase mit dem Differenzierungsgrad zu, und die AP gilt als Markerenzym für luminale Zellmembranen.

8.1. Induktionsphase

Bei primären Kolonzellen ging dem eigentlichen Enzymtest eine vom jeweiligen Ansatz abhängige unterschiedlich lange Induktionsphase mit unterschiedlichen Stimulanzien voraus (Tab. 12). Für alle Ansätze erfolgte am 4. Kultivierungstag nach der Isolierung aus dem Rinderdarm die erneute Aussaat von jeweils 2×10^4 Zellen in die Vertiefungen einer kollagenisierten 96-Loch-Platte. Die spätere Zugabe von Stimulanzien geschah jeweils im Zuge eines Mediumwechsels.
Zur Bestimmung der Enzymexpression der Kolonzell-Klone 3 Tage nach ihrer Aussaat fand keine zusätzliche Stimulierung statt.

Tab. 12: Übersicht über die Induktionsbedingungen vor Durchführung der Enzymtests

Induktions-stimulanz	Induktions-beginn	Induktions-dauer	Durchführung des Enzymtests
ohne (nur Medium)	4. Kultivierungstag	72 h	7. Kultivierungstag
LPS (25 µg/ml)	4. Kultivierungstag	72 h	7. Kultivierungstag
Butyrat (2 mM)	5. Kultivierungstag	48 h	7. Kultivierungstag
Butyrat (4 mM)	5. Kultivierungstag	48 h	7. Kultivierungstag
Butyrat (2 mM)	6. Kultivierungstag	24 h	7. Kultivierungstag
Butyrat (4 mM)	6. Kultivierungstag	24 h	7. Kultivierungstag
ohne (nur Medium)	7. Kultivierungstag	72 h	10. Kultivierungstag
LPS (25 µg/ml)	7. Kultivierungstag	72 h	10. Kultivierungstag
Butyrat (2 mM)	7. Kultivierungstag	72 h	10. Kultivierungstag
Butyrat (4 mM)	7. Kultivierungstag	72 h	10. Kultivierungstag

8.2. Quantifizierung der Enzymaktivitäten

Nach Zugabe der Enzym-spezifischen Substratlösungen erfolgte die Messung der Enzymtests in einem Platten-Photometer (Multiskan Ascent, Fa. Labsystems).

8.2.1. Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ-GT)

1. vorsichtige Abnahme des Mediums, dann Waschen des Monolayers mit 100 µl/Vertiefung PBS
2. Zugabe von 20 µl/Vertiefung Triton-Lösung (0,1 % in 0,89 % NaCl) und von 180 µl/Vertiefung Substrat-Lösung (4,2 mM L-γ-Glutamyl-p-nitroanillin,

53 mM Glycylglycerin, 11 mM $MgCl_2$, gelöst in Ammediolpuffer (2-Amino-2-methyl-propan-1,3-diol) 50 mM, pH 9,3)

3. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten
4. Photometrische Messung bei OD 405 nm

8.2.2. Alkalische Phosphatase (AP)

1. vorsichtige Abnahme des Mediums, dann Waschen des Monolayers mit 100 µl/Vertiefung PBS
2. Zugabe von 20 µl/Vertiefung Triton-Lösung (0,1 % in 0,89 % NaCl) und von 180 µl/Vertiefung Substrat-Lösung, pH 10,5 (100 mM Glycin, 1 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 5 mM p-Nitrophenylphosphat)
3. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten
4. Photometrische Messung bei OD 405 nm

8.2.3. Saccharase und Laktase

1. vorsichtige Abnahme des Mediums, dann Waschen des Monolayers mit 100 µl/Vertiefung PBS
2. Zugabe von je 50 µl Zucker (Saccharose bzw. Laktose, beide 620 mM in 0,1 M KPO_4) oder KPO_4-Puffer (0,1 M, pH 6,0) pro Vertiefung
3. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten (Saccharase) bzw. für 3 Stunden (Laktase)
4. Zugabe von 50 µl/Vertiefung Substrat-Lösung (0,01 % O-Diamisidin, 0,001 % HRP, 20 U/50 µl GOD, gelöst in 0,5 M Na-PO_4-Puffer, pH 6,0)
5. Inkubation bei 37°C für 10 Minuten
6. Zugabe von 100 µl/Vertiefung H_2SO_4 (50 %ig)
7. Photometrische Messung bei OD 540 nm

9. Migrationsstudien mit bovinen Granulozyten

Verschiedene konditionierte Überstände primärer boviner Kolonzellen bzw. immortalisierter boviner Kolonzellen aus den vorangegangenen Inkubationen für die RNA-Isolation (Kapitel 3.2) wurden auf ihre chemotaktische Wirkung auf bovine Granulozyten hin untersucht.

9.1. DiO-Färbung von BL-3-Zellen

BL-3-Zellen wurden mit 3,3-Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO) gefärbt und fixiert, um sie als Standard-Zählteilchen in den Migrationsstudien einzusetzen. Pro ml Zellsuspension mit 1 x 10^6 Zellen/ml wurden 1,25 µl DiO (2,5 mg/ml) hinzugefügt und in einem 50 ml Röhrchen (Fa. Greiner) gut vermischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 100 U/min unter Lichtausschluß erfolgte eine Zentrifugation bei 202 x g und 20°C für 7 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen und danach wie oben beschrieben abzentrifugiert. Das entstehende Zellpellet konnte schließlich in PBS resuspendiert und die Lösung auf eine Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml eingestellt werden. Nach Zugabe des gleichen Volumens an PFA (4 % in PBS) fand eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur statt. Danach wurden die Zellen erneut wie beschrieben zentrifugiert und mit 10 ml PBS gewaschen. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in PBS mit 10 % FCS aufgenommen und in Aliquots zu 1 x 10^6 Zellen/ml bei -20°C eingefroren.
Vor der Verwendung wurden sie aufgetaut und das FCS durch Zentrifugieren und Waschen mit PBS entfernt.

9.2. Isolation der Granulozyten aus Rinderblut

Spendertiere für das Blut, aus dem die Granulozyten gewonnen wurden, waren stets adulte, weibliche Rinder der Rasse „Deutsch Schwarzbunt“ vom Oberen Hardthof.
Pro Gradient wurden 20 ml frisches Zitrat-Blut (4 ml Zitrat und 16 ml Vollblut) mit 17 ml 1x PBS-EDTA (RT) mit Hilfe einer Plastikpipette in einem Zentrifugen-Röhrchen (Fa. Greiner, 50 ml) gemischt und anschließend vorsichtig auf 12 ml Ficoll-Paque® Plus (Amersham Biosciences, RT) aufgeschichtet. Es folgte eine 45-minütige Zentrifugation bei 800 x g und 20°C mit ungebremstem Auslaufen. Der resultierende Gradient, bestehend aus Plasmaphase, Interphase (PBMC), Ficollphase und unterster Erythrozyten-Granulozytenphase, wurde bis auf die Grenzschicht zwischen Ficoll- und Erythrozyten-Granulozytenphase abgetragen. Dann konnten mit einer Plastikpipette je 2 ml des Erythrozyten-Granulozyten-Sedimentes aufgenommen und in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt werden. Nach Hinzufügen von 2 ml 1x PBS-EDTA-Puffer erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Hierzu wurden pro Röhrchen 27 ml A. dest. hinzugegeben, und nach 50 Sekunden wurde die Reaktion mit 3 ml 10x PBS-EDTA abgestoppt. Dann wurden die Zentrifugen-Röhrchen mit RPMI 1640 Medium (PAN™ BIOTECH GmbH) auf 50 ml aufgefüllt und für 7 Minuten bei 202 x g und 20°C abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes konnte das Zellpellet in 10 ml 1x PBS-EDTA resuspendiert und erneut für 7 Minuten bei 202 x g und 20°C abzentrifugiert werden. Wieder wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 2 ml PBMC-Medium (RPMI 1640 mit stab. Gln, 10 % FCS, 3 µM Mercaptoethanol) resuspendiert.
Die Reinheit der so gewonnenen Granulozytensuspension wurde anschließend im Durchflusszytometer nach Auszählung von 5000 Ereignissen pro Probe überprüft (pro FACS-Röhrchen 500 µl PBS und 50 µl Granulozytensuspension). Präparationen mit einer Reinheit von über 85 % Granulozyten konnten dann gepoolt und für den Migrationsversuch eingesetzt werden.

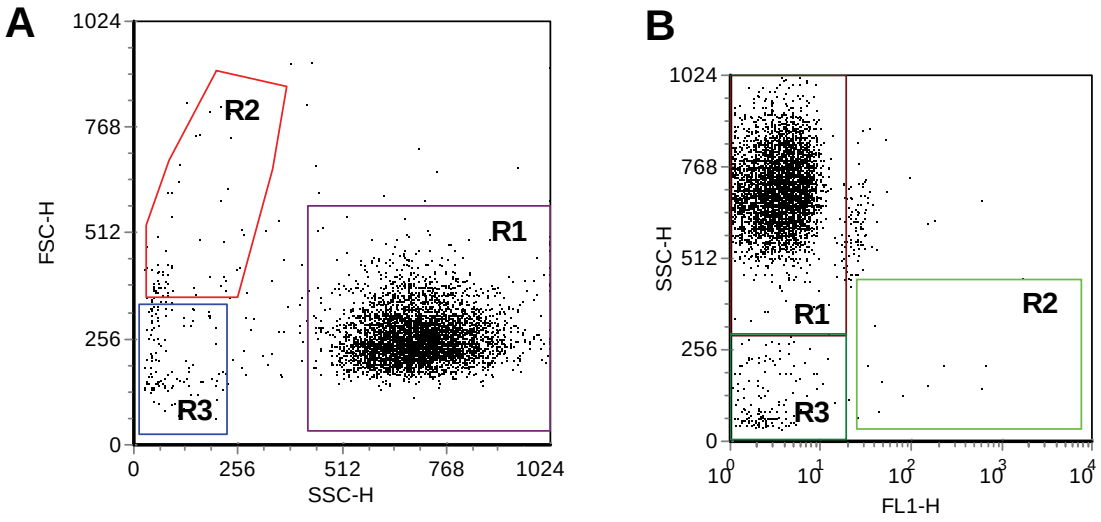


Abb. 3: Überprüfung der Reinheit der Granulozytensuspension

Durchflusszytometrische Analyse der Morphologie frisch präparierter Leukozyten anhand ihrer Größen- und Granularitätseigenschaften. Repräsentative Histogramme einer zu über 85 % reinen Granulozytenpräparation: R1 entspricht jeweils den Granulozyten, R3 den Lymphozyten.

9.3. Migrationsversuch

Je 1,5 ml der abzentrifugierten Überstände wurden in flachbödige 12-Loch-Zellkultur-Platten (Fa. Corning Costar) gegeben (unteres Kompartiment), darüber wurde ein Filter (Transwell-Clear, Fa. Corning Costar) mit 3,0 µm Porengröße gesetzt und auf diesen schließlich 0,5 ml Granulozytensuspension mit 5×10^5 Granulozyten gefüllt (oberes Kompartiment). Als Kontrolle diente frisches Epithelzellmedium (Tab. 4) mit 2 % FCS und 0,5 % Hypophysenextrakt bzw. Zellkulturmedium 1. Die Granulozyten wurden anschließend für 1 Stunde und 45 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und danach für 15 Minuten in den 4°C Kühlschrank verbracht, um die Migration zu verlangsamen und dann nach 2 Stunden mit der Ernte der tatsächlich gewanderten und der nicht gewanderten Zellen beginnen zu können. Dazu wurden die Platten auf Eis platziert und die Flüssigkeitsvolumina in unterem und oberem Kompartiment getrennt gewonnen. Um alle migrierten Granulozyten zu erfassen, wurden die Filter zunächst in leere Vertiefungen der 12-Loch-Platte umgesetzt. Während die Flüssigkeit nun durch den Filter ablaufen konnte und alle Granulozyten mit sich nahm, die auf ihrer Wanderung noch innerhalb der Filtermembran steckten, wurde die Zellsuspension aus dem unteren

Kompartiment aus der Platte entfernt und in eisgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Filter erneut in leere Platten-Vertiefungen umgesetzt und mit 500 µl 1x PBS-1x EDTA befüllt. Dann wurden die nun leeren Vertiefungen der ehemaligen unteren Kompartimente mit 166 µl 1x PBS-10x EDTA gespült, um alle migrierten Zellen zu erhalten und die so gewonnene Lösung mit dem Durchfluss vereinigt, der beim ersten Umsetzen der Filter durchgelaufen war. Da all diese Granulozyten als gewandert galten, wurden sie den FACS-Röhrchen hinzugegeben, die bereits die geerntete Zellsuspension aus dem unteren Kompartiment enthielt. Von dieser Granulozytensuspension wurden nach Resuspendieren 500 µl in eisgekühlte FACS-Röhrchen gefüllt, die schon 50 µl 1x PBS-10x EDTA enthielten. Für die Ernte des oberen Kompartimentes wurde der Filter mehrmals mit den 500 µl 1x PBS-1x EDTA überspült, schließlich mit einer Pipettenspitze durchstoßen und das gesamte Flüssigkeitsvolumen in eisgekühlte FACS-Röhrchen überführt, die schon 50 µl 1x PBS-10x EDTA enthielten. In jedes der FACS-Röhrchen wurden schließlich 1,5 x 10^4 fixierte und DiO-gefärbte BL-3-Zellen hinzugefügt.

9.4. Probenanalyse

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde das in Kapitel 4.6 beschriebene Durchflusszytometer eingesetzt. Zur Analyse des Migrationsverhaltens dienten die DiO-gefärbten BL-3-Zellen als standardisierte Zählteilchen. Indem das Zytometer selektiv 1000 dieser Zählteilchen zählte (R2 in Abb. 4), konnte eine quantitative Analyse der Granulozyten im oberen bzw. unteren Kompartiment erfolgen, die zur gleichen Zeit ermittelt wurden. So war es möglich, die Zahl der migrierten Zellen (im unteren Kompartiment (R1 in Abb. 4A und B)) und die Zahl der nicht migrierten Zellen (im oberen Kompartiment (R1 in Abb. 4C und D))bei jedem Ansatz zu bestimmen.

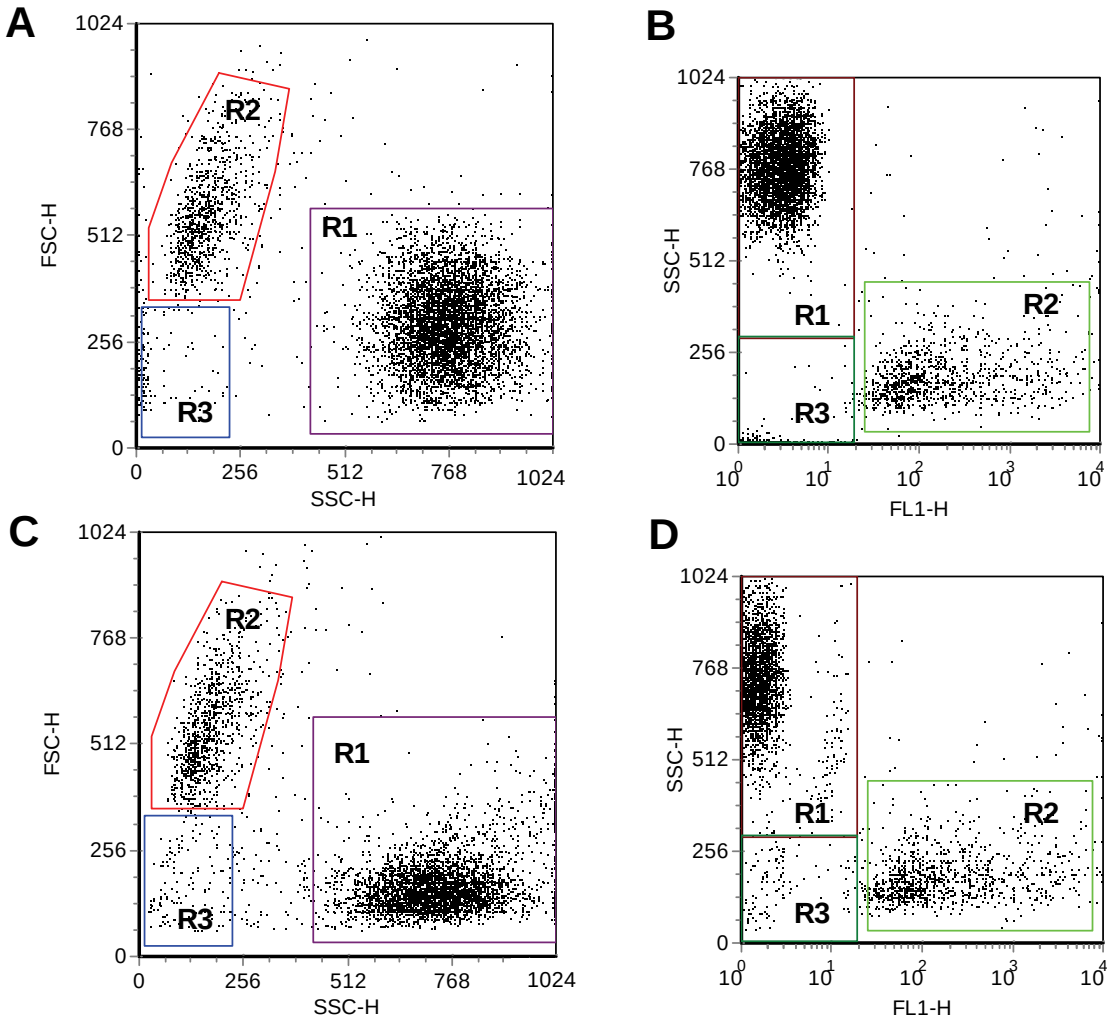


Abb. 4: Migrationsverhalten der Granulozyten

Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse des unteren (A+B) und des oberen (C+D) Kompartimentes: R1 entspricht jeweils den Granulozyten und R3 den Lymphozyten, R2 erfasst die DiO-gefärbten BL-3-Zellen.

10. Statistische Auswertung

Statistische Berechnungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm SigmaStat (Version 2.03 und 3.11, SPSS Inc., USA) durchgeführt. Zur statistischen Datenanalyse wurden der t-Test nach Student, der t-Test für gepaarte Stichproben, der Mann-Whitney Rank Sum Test sowie die ein- oder die zweifaktorielle Varianzanalyse verwendet. Die statistische Signifikanzgrenze für die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) ist bei $\leq 0{,}05$ definiert. Bei der Angabe der Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

n. s. = nicht signifikant ($p > 0{,}05$)

* = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$)

** = signifikant ($p \leq 0{,}01$)

*** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

Befinden sich die Sterne in einer Abbildung über einer Klammer, so bezieht sich der statistische Vergleich auf die durch die Klammer zusammengefassten Balken. Sterne über einem Balken ohne Klammer bezeichnen den Vergleich mit der Mediumkontrolle.

IV. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen an Primärkulturen boviner Kolonepithelzellen

1.1. Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild

Schon in den ersten 24 Stunden nach der Aussaat hatte sich der Großteil der Kolonkrypten am kollagenisierten Boden der Zellkulturgefäße angeheftet, und im Lichtmikroskop konnten kleine Zellplaques beobachtet werden, die als feine Ausläufer aus den geballten Kryptenstrukturen auswuchsen (Abb. 5 und 6). Die Vermehrung durch Zellproliferation führte in den folgenden Tagen zur stetigen Vergrößerung und Annäherung der Zellplaques, bis etwa am 4. Tag nach Aussaat der Krypten ein geschlossener einschichtiger Zellrasen entstanden war. Fand keine weitere Passagierung statt, verharrten die Zellen zunächst in dieser Plateau-Phase. Ohne Subkultivierung überlebten die Primärkulturen bis zu 5 Wochen, allerdings nahm währenddessen die Dichte des Monolayers stetig ab.

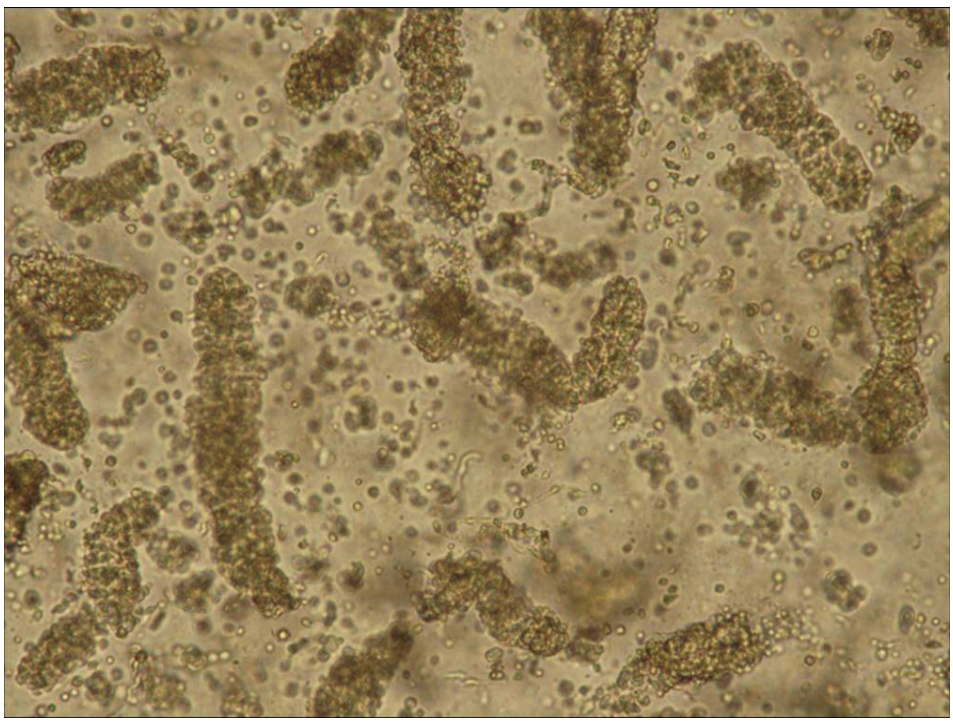


Abb. 5: lichtmikroskopische Betrachtung frisch präparierter Kolonkrypten

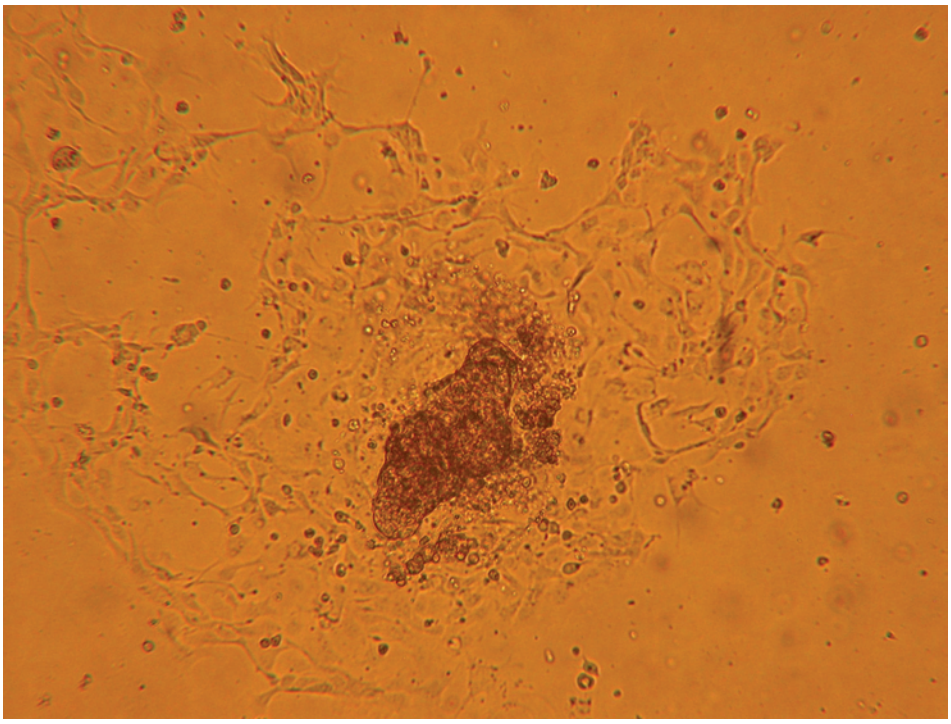


Abb. 6: Primärkultur boviner Kolonzellen

Die lichtmikroskopische Aufnahme einer 5 Tage alten Primärkultur zeigt Reste einer angehefteten Krypte und von dort auswachsende Zellen.

1.2. Zytoskelettausstattung

Um die Qualität der präparierten Epithelzellkulturen zu überprüfen, wurden sie stets am 4. Kultivierungstag einer durchflusszytometrischen Charakterisierung hinsichtlich ihrer Zytoskelettausstattung unterzogen (Abb. 7). Dabei zeigte sich, dass der Anteil Zytokeratin-positiver Zellen in den 17 untersuchten Primärkulturen zwischen 80 und 95 % (MW = 86 $\pm$ 4,2 %) der morphologisch intakten Zellen lag, während der Anteil der Vimentin-positiven Zellen nicht epithelialer Herkunft zwischen einem und 13 % (MW = 5,3 $\pm$ 3,8 %) schwankte.

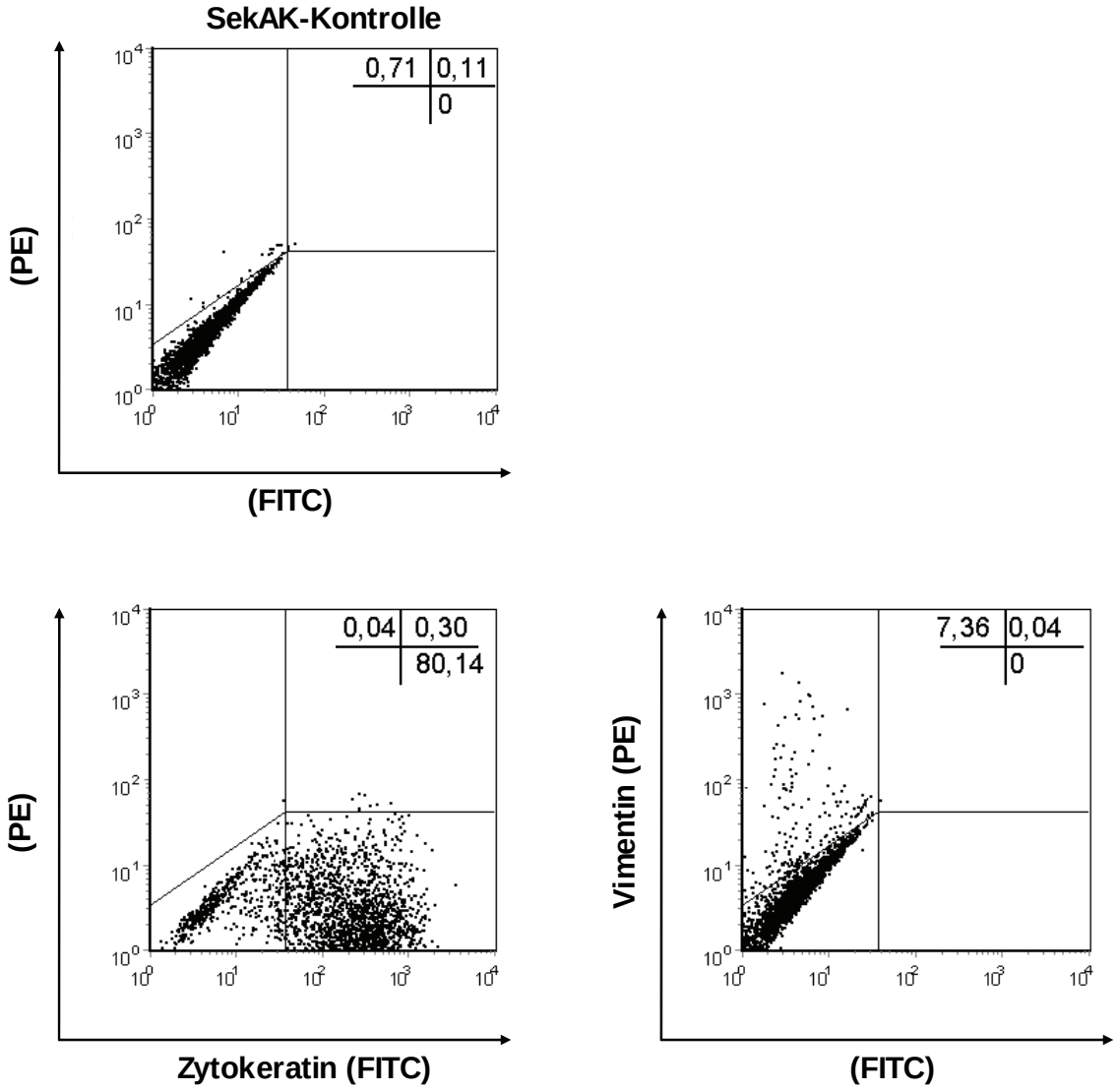


Abb. 7: Zytoskelettausstattung primärer boviner Kolonzellen

Durchflusszytometrische Analyse einer 4 Tage alten Primärkultur boviner Kolonzellen. Die Zahlen oben rechts geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen an. n = 17 Primärkulturen. Zellen fixiert und permeabilisiert, jeweils Doppelbestimmungen. Sekundär-Antikörper (SekAk)-Kontrolle = Zellen nur mit Sekundär-Antikörper inkubiert. Beispiel für eine Präparation mit niedrigem Epithelzell-Gehalt.

Parallel zur durchflusszytometrischen Analyse wurden ausgewählte Kulturen auch immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht, um zusätzlich Informationen über die Morphologie der betreffenden Zellen zu erhalten. Zytokeratin-positive Zellen dominierten das Bild im Fluoreszenzmikroskop. Ein dichter Zellrasen dieser Epithelzellen breitete sich über weite Flächen der Präparate aus, während die

Minderheit Vimentin-positiver Zellen als Einzelzellen verstreut oder angehäuft in kleinen Nestern dazwischen vorkam.

Zytokeratin-positive Epithelzellen präsentierten sich typischerweise als große, breitflächige Zellen mit relativ kurzen Ausläufern. Ihre Zellleiber wurden von einem großen oder mehreren kleinen Zellkernen dominiert. Während die Epithelzellen in jungen Kulturen (bis zum 4. Kultivierungstag) noch relativ unregelmäßig wuchsen und teilweise schmal und langgezogen wirkten, stellten sich die Zellleiber nach längerer Kulturdauer insgesamt großflächiger dar (Abb. 8). Vimentin-positive Zellen hingegen waren deutlich kleiner und zierlicher und erinnerten mit ihren langgestreckten Zellausläufern morphologisch an Fibroblasten (Abb. 9). Ihr Anteil nahm mit steigender Kulturdauer zu. Im Gegensatz zu Epithelzellen gelang bei Vimentin-positiven Zellen der Nachweis von fibroblastentypischen Aktin-Fasern (Abb. 10). Auch Zellen, die gleichzeitig sowohl positiv für Zytokeratin als auch positiv für Vimentin waren, konnten in seltenen Fällen nach längerer Kulturdauer entdeckt werden (Abb. 11). Morphologisch erinnerten diese Zellen an Epithelzellen. In sehr alten Kulturen fanden sich sogar rein Vimentin-positive Zellen mit Epithelzellmorphologie (Abb. 12).

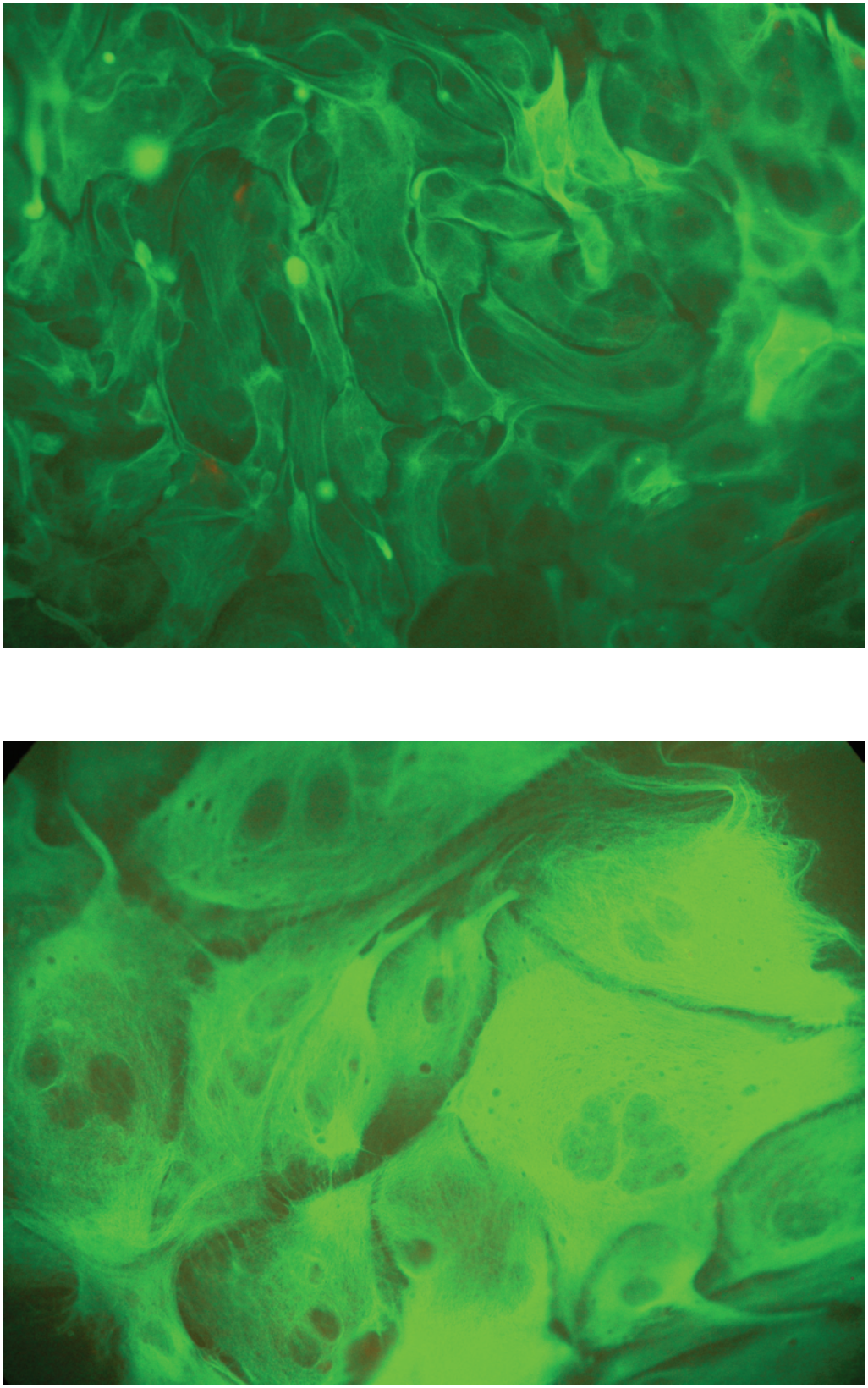


Abb. 8: Zytokeratin-positive primäre bovine Kolonzellen

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer 4 Tage (oben) und einer 18 Tage (unten) alten Primärkultur. Vergrößerung 400-fach. Nachweis von Zytokeratin (grün), trotz Inkubation mit anti-Vimentin kein Vimentin (rot) detektierbar.

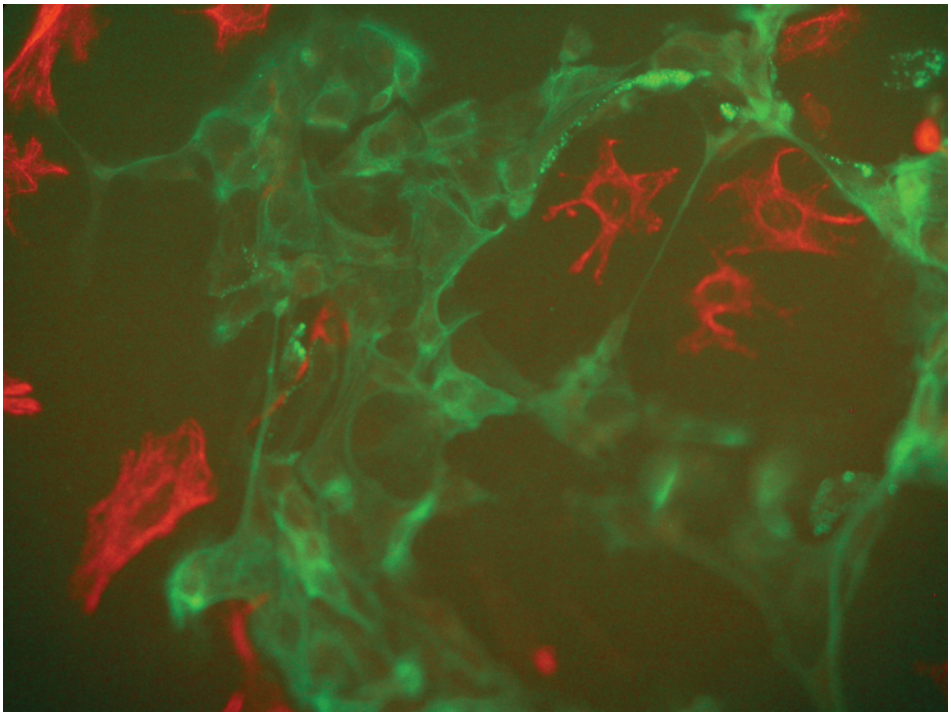


Abb. 9: Zytokeratin- und Vimentin-positive primäre bovine Kolonzellen

Fluoreszenzmikroskopie (4. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), Vimentin (rot).

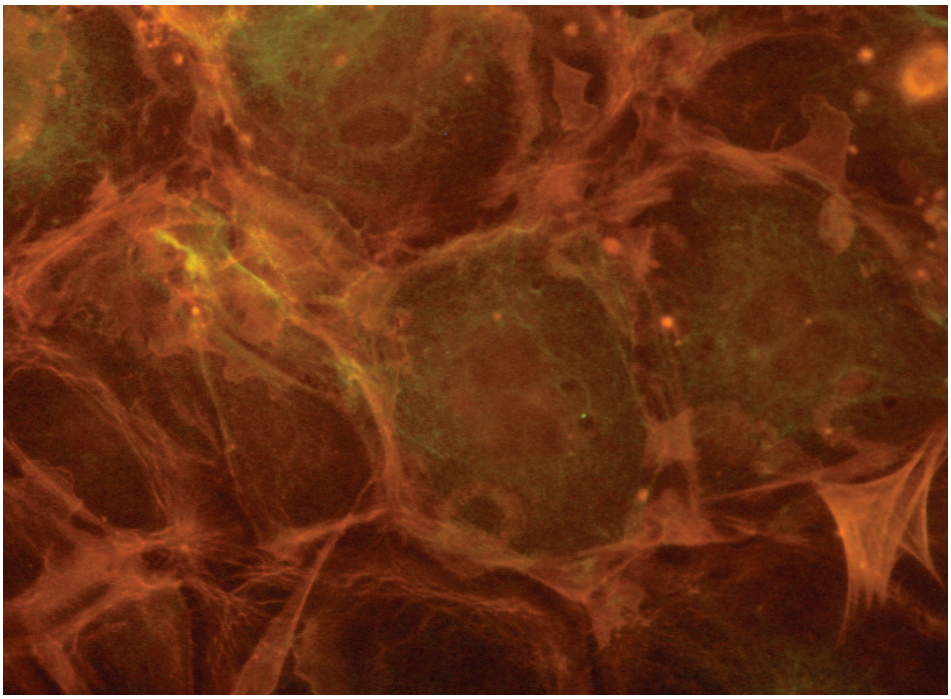


Abb. 10: Aktinfasern bei primären bovinen Kolonzellen

Fluoreszenzmikroskopie (4. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), Aktin (rot).

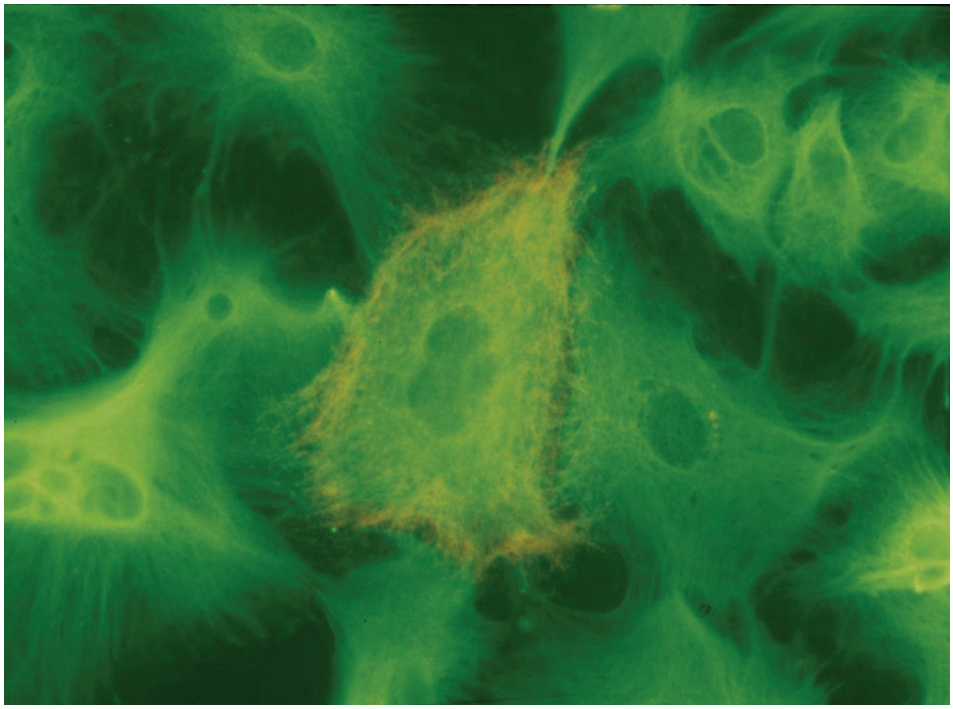


Abb. 11: gleichzeitig Zytokeratin- und Vimentin-positive primäre bovine Kolonzelle

Fluoreszenzmikroskopie (10. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), Vimentin (rot-orange).

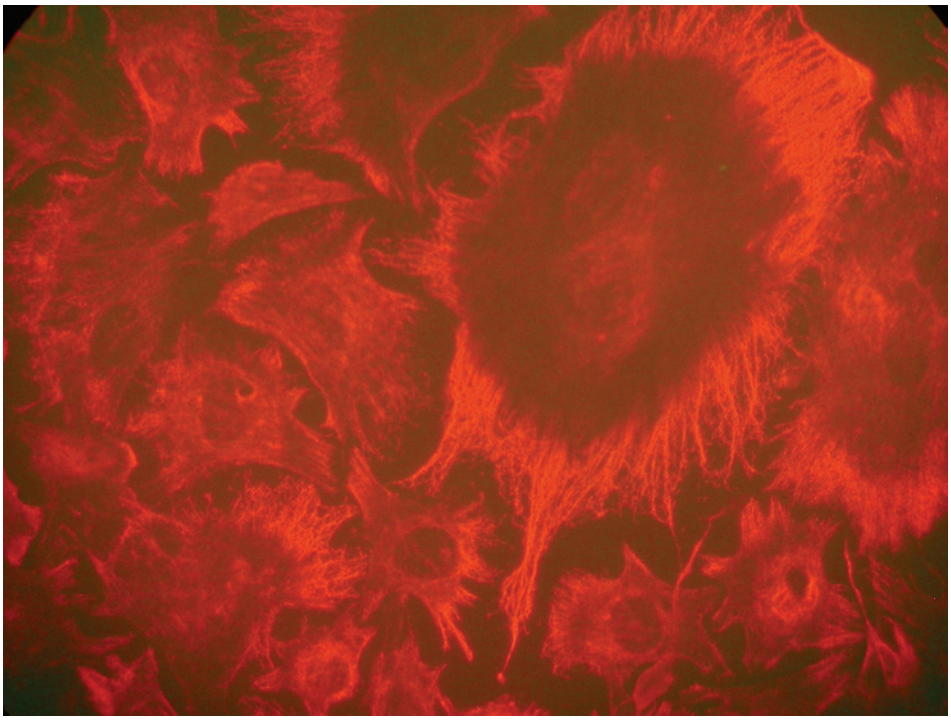


Abb. 12: Vimentin-positive primäre Kolonzellen mit Epithelzellmorphologie

Fluoreszenzmikroskopie (18. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), Vimentin (rot)

1.3. Versuche zur Optimierung der Kulturbedingungen

Um den von Hoey et al. (89) beschriebenen positiven Einfluss von L-Valin auf die Entwicklung der Vimentin-positiven Zellen in den Primärkulturen boviner Kolonzellen zu untersuchen, wurden zwei unabhängige Vergleichsstudien über einen Zeitraum von jeweils 18 Tagen durchgeführt. Dabei wurden primäre bovine Kolonzellen entweder mit dem herkömmlichen Epithelzellmedium (Kapitel 1.1.2) oder aber mit einer L-Valin-freien DMEM-Spezialrezeptur inkubiert. An bestimmten Tagen erfolgte die Charakterisierung der Zellen aus den beiden Vergleichsgruppen hinsichtlich ihrer Zytoskelettausstattung mittels Durchflusszytometrie bzw. Fluoreszenzmikroskopie.

Anders als erwartet erbrachte das L-Valin-freie Zellkulturmedium keine reineren Epithelzellulturen (Abb. 13). Der Anteil Vimentin-positiver Zellen lag bei den 4 Tage alten Kulturen fast 3 mal höher als bei der herkömmlichen Rezeptur mit L-Valin, und im weiteren Verlauf immer noch ungefähr doppelt so hoch. Stattdessen aber schien sich der L-Valin-Gehalt des Mediums positiv auf das Wachstum der Epithelzellen auszuwirken. An allen untersuchten Tagen war der Anteil Zytokeratin-positiver Zellen in den Kulturen mit L-Valin-haltigem Medium deutlich höher als in den L-Valin-freien Kulturen. Auch die morphologische Beurteilung der Zellkulturen mit dem Lichtmikroskop bestätigte die Überlegenheit des herkömmlichen Mediums: In Anwesenheit von L-Valin bildeten sich größere Zellplaques aus den Krypten, die schließlich schneller zu einem dichten Zellrasen proliferierten.

Da das L-Valin-freie Medium die Reinheit der Epithelzellkulturen gegenüber dem herkömmlichen Medium nicht verbessern konnte, wurde diese Kultivierungsmethode verworfen und in allen folgenden Präparationen wieder das herkömmliche Epithelzellmedium verwendet.

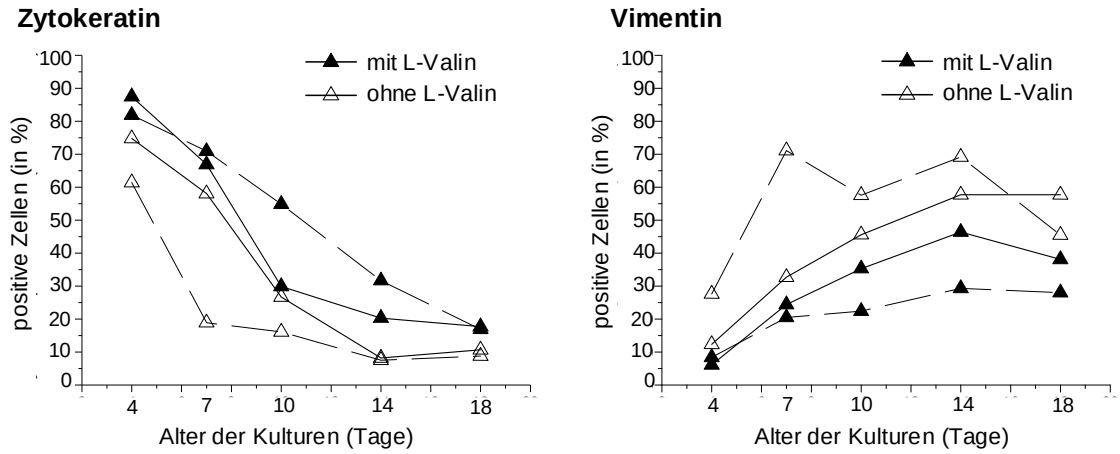


Abb. 13: Entwicklung der Zytokeratin- und Vimentin-positiven Zellen in Primärkulturen boviner Kolonzellen in An- und Abwesenheit von L-Valin

Durchflusszytometrische Analyse. Zellen fixiert und permeabilisiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen. n = 2. Durchgehende und unterbrochene Linien bezeichnen jeweils verschiedene Präparationen.

1.4. Funktionelle Charakterisierung

1.4.1. Polarisationsvermögen

Um ihr Polarisationsvermögen zu untersuchen, wurden Primärkulturen boviner Kolonzellen auf Filter-Einsätzen kultiviert. Zunächst wurde die Entwicklung des Transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER = „Transepithelial Electrical Resistance“) verfolgt und mit der Situation bei CaCo-2-Zellen verglichen. Über einen Zeitraum von 20 Tagen ließ sich bei den CaCo-2-Zellen ein Anstieg des TEER feststellen, der mit der unter dem Lichtmikroskop verfolgten Entwicklung des Zellrasens von kleinen über konfluierende Plaques bis hin zum fast vollständig geschlossenen Zellrasen korrelierte (Abb. 14).

In den langsamer und weniger dicht wachsenden Kulturen primärer Kolonzellen stieg der TEER dagegen nicht auf vergleichbar hohe Werte an und bewegte sich stets auf einem Niveau unterhalb von 200 Ω/cm^2. Innerhalb der ersten 10 Tage lagen die TEER-Werte erfahrungsgemäß so niedrig, dass keine Messungen durchgeführt wurden, um die Entwicklung der Zellen nicht zu stören. Bemerkenswerterweise behielten die auf Filtern

wachsenden Zellkulturen im Unterschied zu den in Plastikflaschen kultivierten Zellen ihre Epithelzelleigenschaften bezüglich Zytoskelettausstattung und Morphologie über einen längeren Kultivierungszeitraum bei. Schon bei lichtmikroskopischer Betrachtung fiel auf, dass die Primärkulturen keinen vollständig geschlossenen Zellrasen auf den Filtern bildeten, sondern in kleineren und größeren Zellinseln wuchsen. Die durch die sichtbaren Filterporen gekennzeichneten zellfreien Areale waren im Rasterelektronenmikroskop deutlich zu sehen (Abb. 15). Dennoch konnte innerhalb der Zellinseln mittels Fluoreszenzmikroskopie bei ausgewählten Filtern das Auftreten von engen Verzahnungen zwischen den Epithelzellen sichtbar gemacht werden (Abb. 16). Dass die Zellen dabei auch „tight junctions“ ausbildeten, wurde durch die Markierung von ZO-1 bewiesen, die die Zellgrenzen innerhalb von bestimmten Arealen des Zellrasens netzartig in feinen Linien nachzeichnete (Abb. 17 und 18).

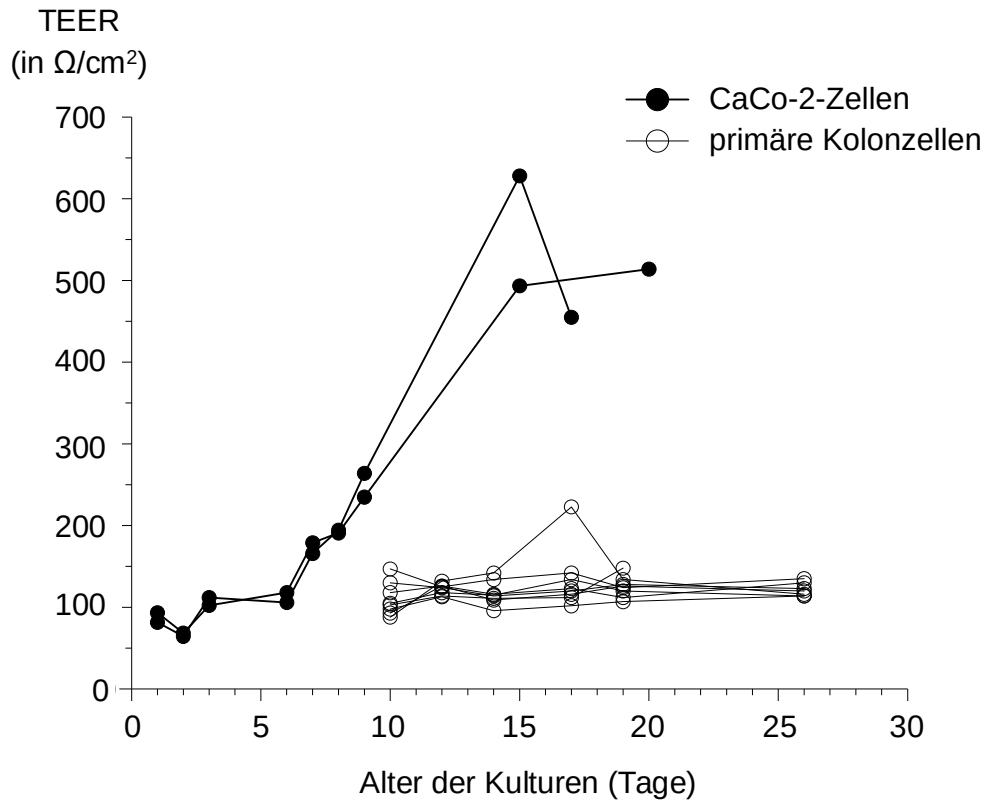


Abb. 14: Entwicklung des TEER bei CaCo-2- und primären Kolonzellen auf Filtern

Repräsentative Darstellung der Messwerte von Zellkulturen auf Filtern mit 0,4 µm Porengröße. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

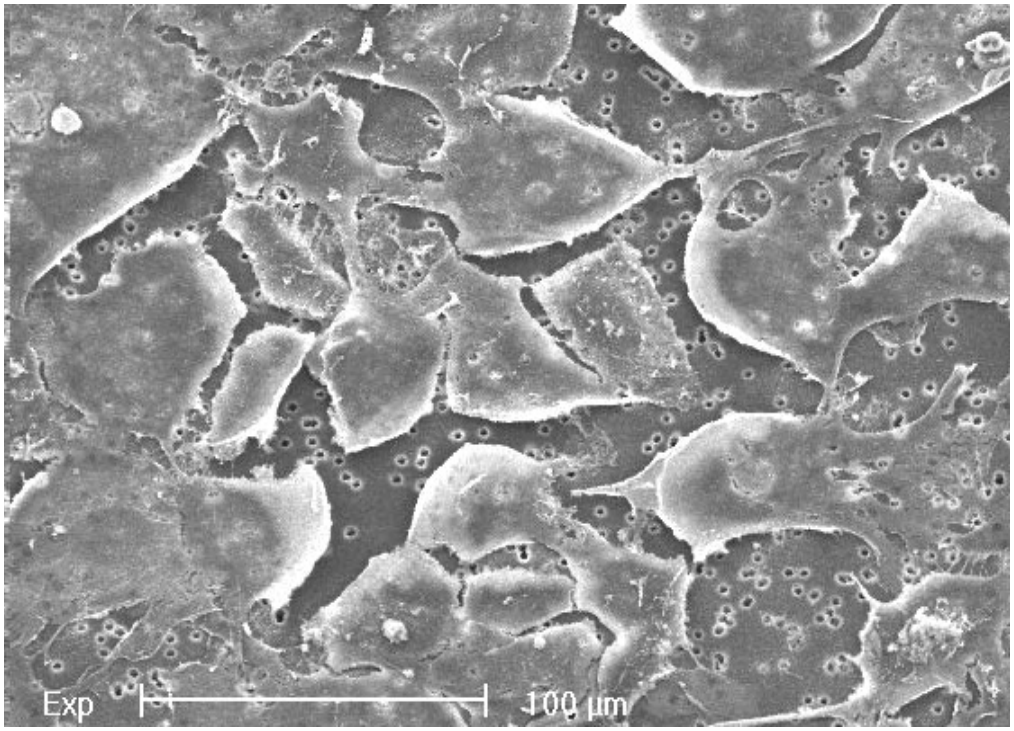


Abb. 15: Wachstumsverhalten primärer boviner Kolonzellen auf Filtern

Rasterelektronenmikroskopie. Deutlich sichtbar sind die Filterporen in den zellfreien Arealen.

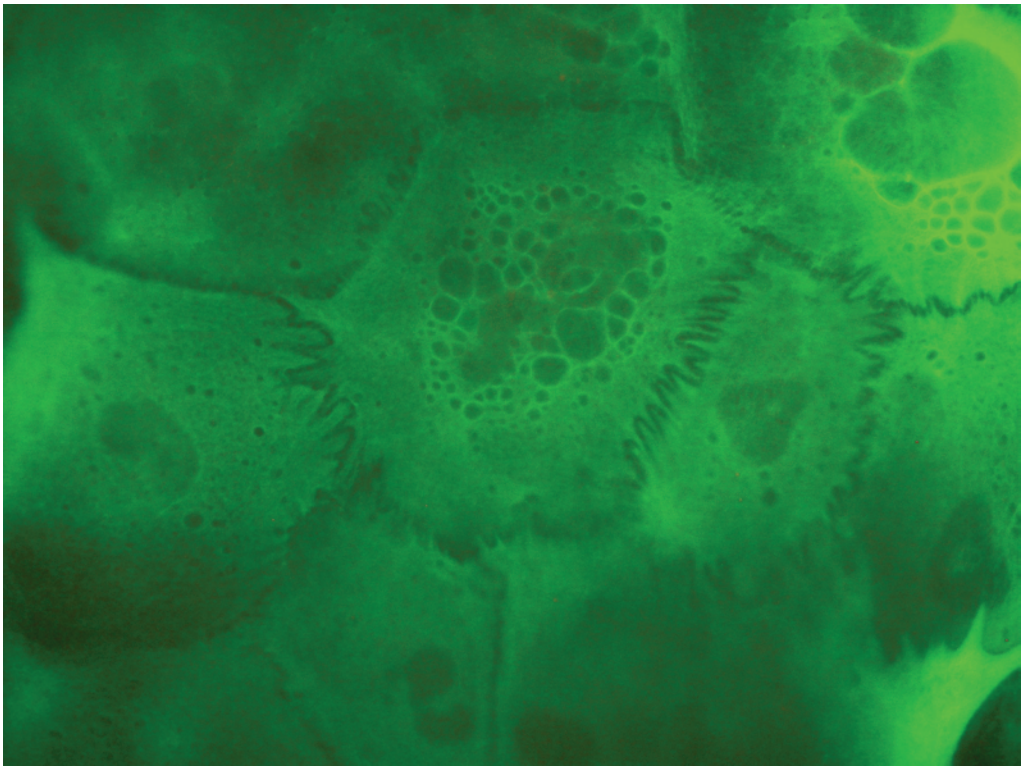


Abb. 16: Verzahnungen bei primären bovinen Kolonepithelzellen auf Filtern

Fluoreszenzmikroskopie (14. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Nachweis von Zytokeratin (grün), trotz Inkubation mit anti-Vimentin kein Vimentin (rot) detektierbar.

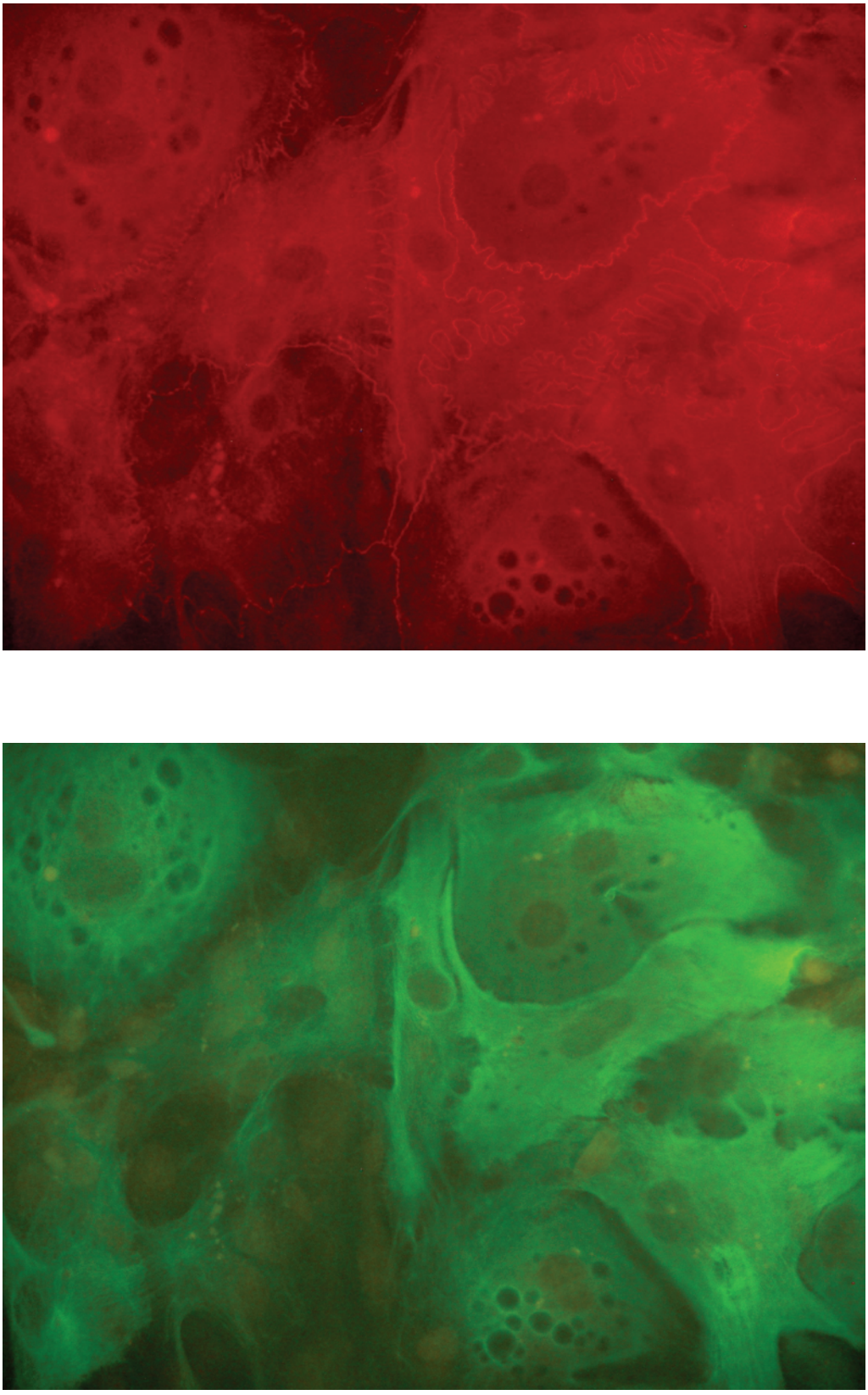


Abb. 17: „Tight junctions“ bei primären bovinen Kolonepithelzellen auf Filtern

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung desselben Filterbereiches (14. Kultivierungstag). Oben: ZO-1 (hellrot). Unten: Zytokeratin (grün). Vergrößerung 400-fach.

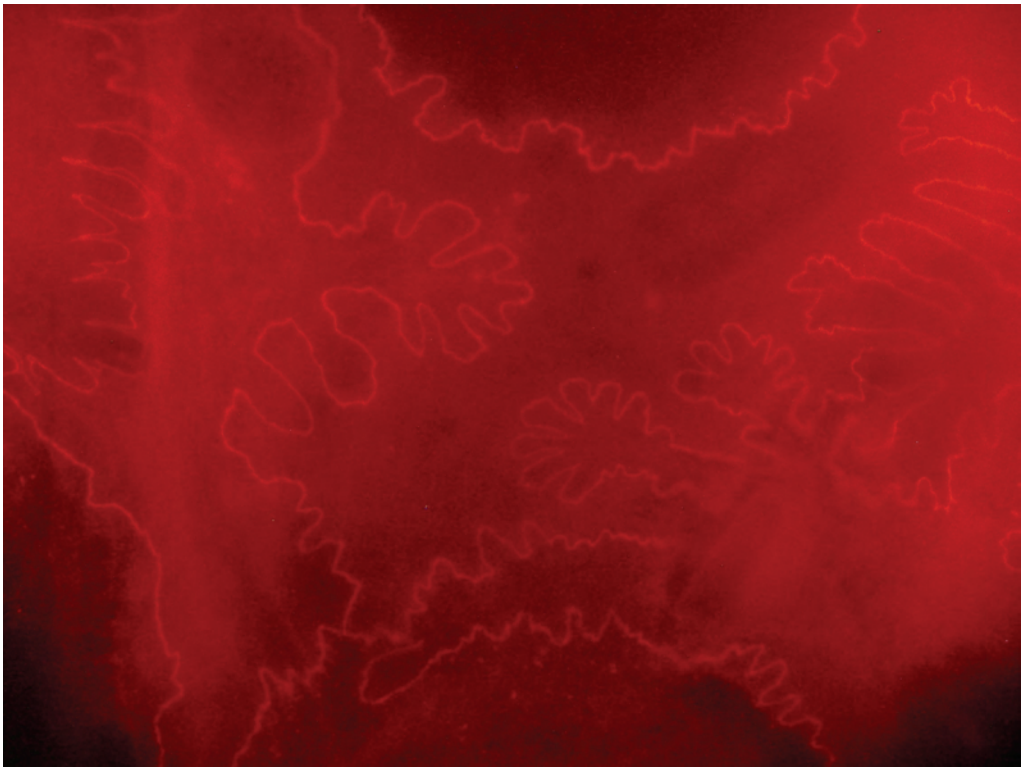


Abb. 18: „Tight junctions“ bei primären bovinen Kolonepithelzellen auf Filtern

Ausschnitt aus Abb. 17. Fluoreszenzmikroskopie (14. Kultivierungstag). ZO-1 (hellrot). Vergrößerung 1000-fach.

1.4.2. Expression von Leitenzymen

Während ihrer Entwicklung aus relativ undifferenzierten, proliferierenden Kryptenzellen wandern intestinale Epithelzellen entlang der Krypten-Villus-Achse lumenwärts und erwerben dabei die enzymatischen und morphologischen Eigenschaften reifer Villusepithelzellen. Die natürlicherweise im Darmlumen vorkommende kurzkettige Fettsäure Butyrat spielt dabei eine wichtige Rolle für die Induktion des Reifungsprozesses (102). Um den Differenzierungsgrad der herangewachsenen Primärkulturen zu charakterisieren, wurde die Expression ausgewählter Leitenzyme bestimmt und mit der Enzymexpression bei CaCo-2-Zellen verglichen.

Bei CaCo-2-Zellen führte die Induktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an Butyrat zur Steigerung der Expression der alkalische Phosphatase bis hin zum Vierfachen, während sich die Expression der gamma-Glutamyltranspeptidase nicht stimulieren ließ (Abb. 19). Bei primären bovinen Kolonzellen (Abb. 20) war die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der gamma-Glutamyltranspeptidase wesentlich geringer ausgeprägt als bei CaCo-2-Zellen und außerdem großen

Schwankungen unterworfen. Selbst die Stimulation mit LPS oder Butyrat löste keine signifikanten Änderungen der Expression aus. Ein weiterer Unterschied lag im Aktivitätsverhältnis der beiden Enzyme zueinander: Während bei CaCo-2-Zellen unter den angewandten Testbedingungen eine höhere optische Dichte für den Nachweis des Substratumsatzes der alkalischen Phosphatase ermittelt werden konnte als für den Nachweis der gamma-Glutamyltranspeptidase-Aktivität, fanden sich bei den primären bovinen Kolonzellen umgekehrte Verhältnisse. Eine äußerst geringe Saccharase- und Laktase-Expression konnte bei CaCo-2-Zellen nur nach Stimulation mit 1mM Butyrat gemessen werden, wobei die ermittelte optische Dichte für den Nachweis des Substratumsatzes der Saccharase etwa doppelt so hoch lag wie bei der Laktase (nicht dargestellt). Auch bei primären bovinen Kolonzellen war die Saccharase verhältnismäßig das stärker nachweisbare Enzym, allerdings lag ihre Expression etwa 5-mal und die der Laktase etwa 7,5-mal höher als bei den CaCo-2-Zellen. Untersuchungen mit älteren Kulturen primärer Kolonzellen bestätigten diese Befunde (Abb. 21).

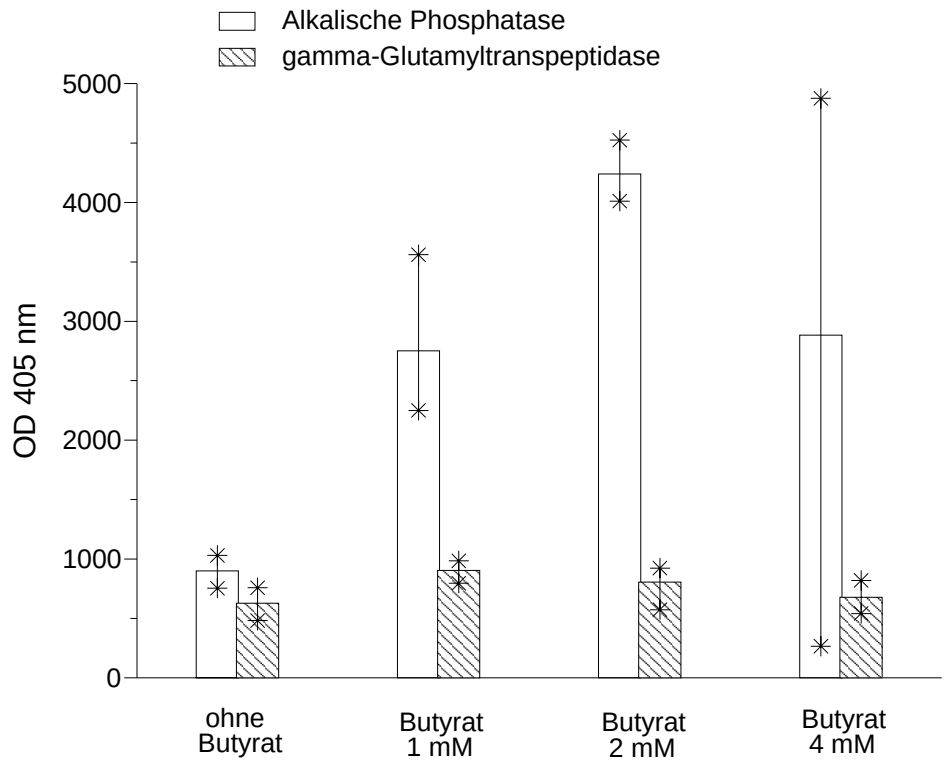


Abb. 19: AP- und γ-GT-Expression bei CaCo-2-Zellen

Mittelwerte sowie Minima und Maxima aus Dreifachbestimmungen. Stimulationsdauer 72 h (Tag 2 bis 5 nach Aussaat). Messung an Tag 5.

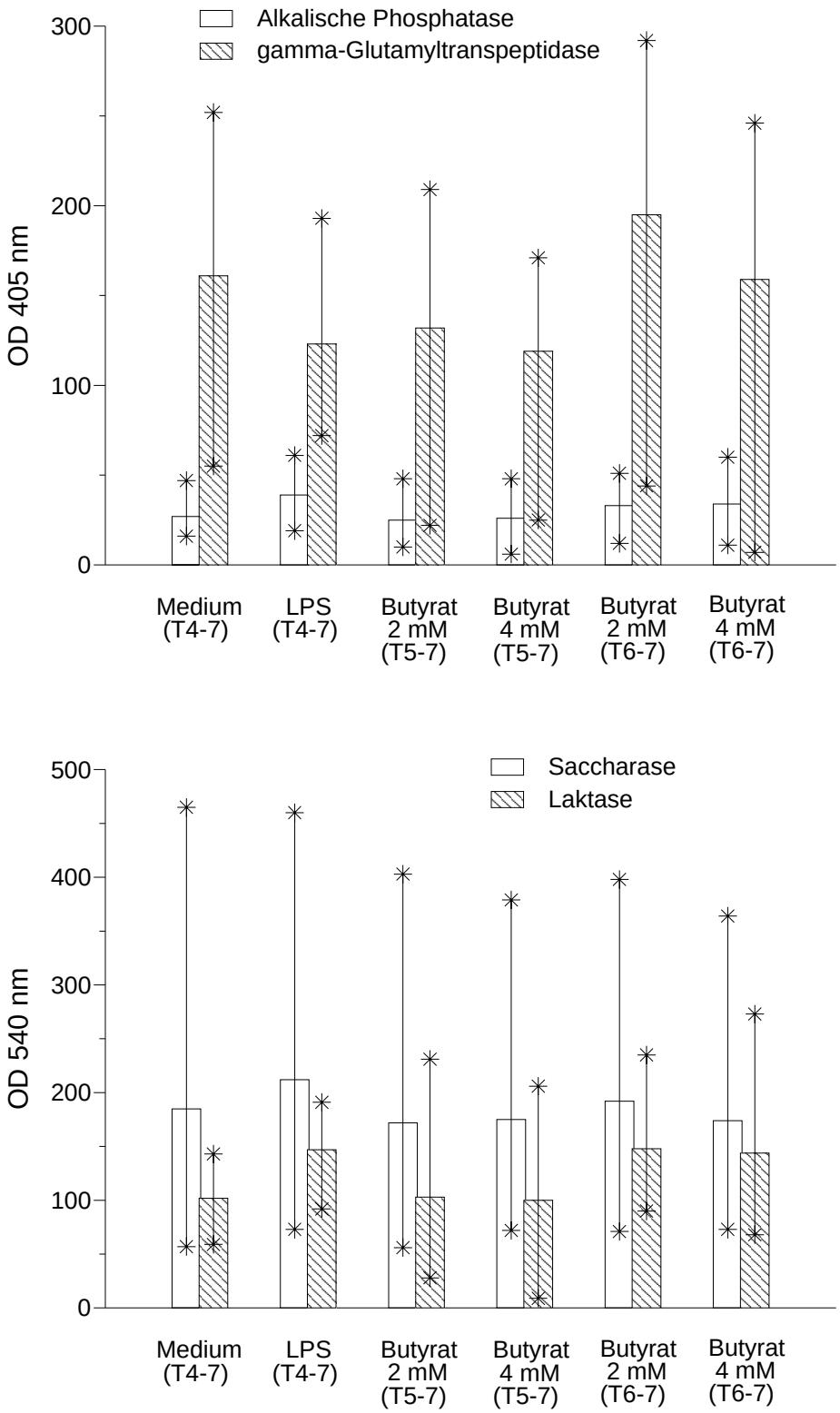


Abb. 20: Expression ausgewählter Leitenzyme bei primären bovinen Kolonzellen

Mittelwerte sowie Minima und Maxima von jeweils 6 Messungen aus 4 unabhängigen Präparationen. c(LPS): 25 µg/ml, Inkubationsdauer 72 h (T4-7 = Kultivierungstag 4-7), 48 h (T5-7) bzw. 24 h (T6-7) unter unterschiedlichen Bedingungen.

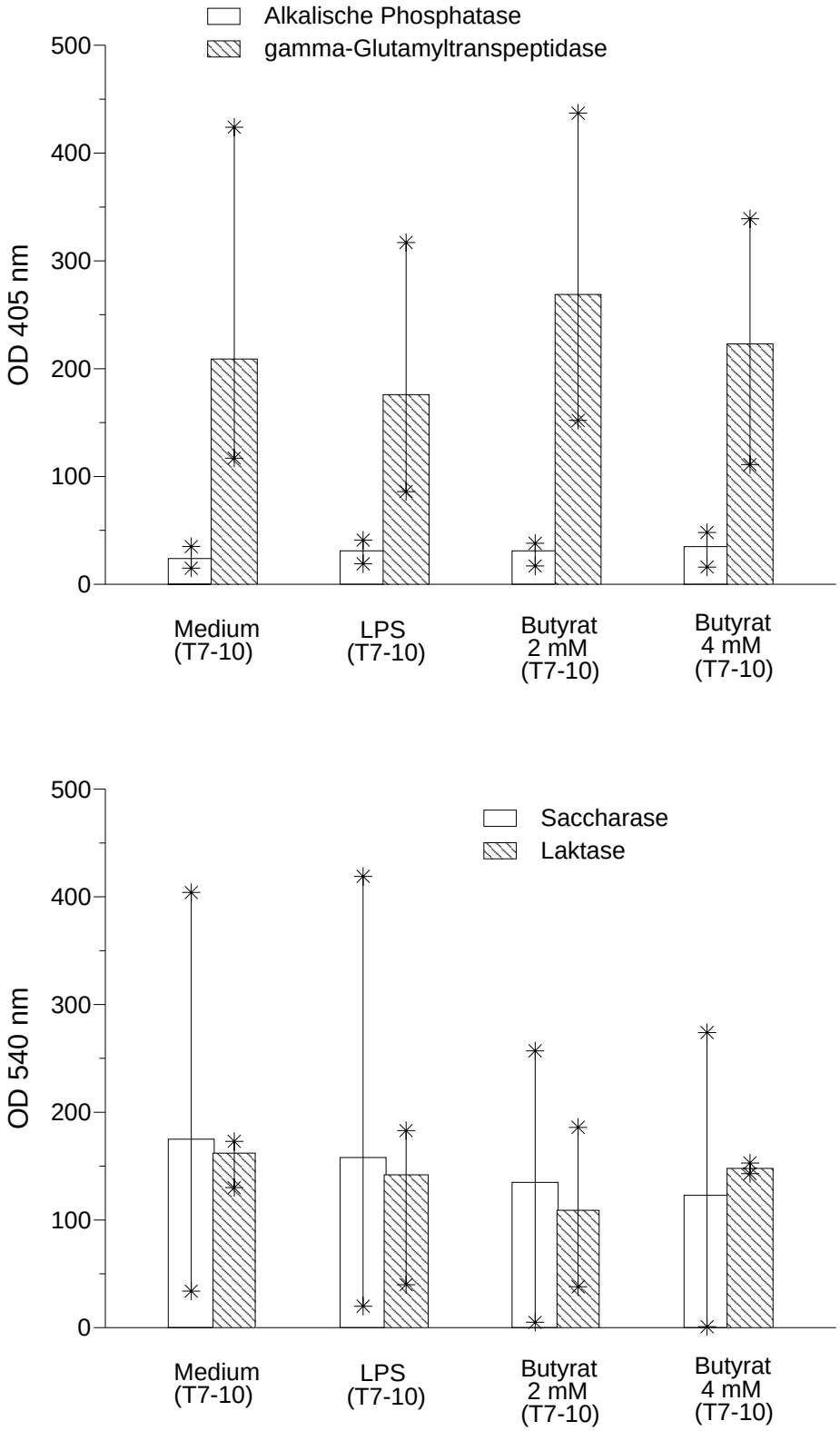


Abb. 21: Expression ausgewählter Leitenzyme bei primären bovinen Kolonzellen

Mittelwerte sowie Minima und Maxima von jeweils 6 Messungen aus 4 unabhängigen Präparationen. c(LPS): 25 µg/ml, Inkubationsdauersdauer 72 h (T7-10 = Kultivierungstag 7-10) unter unterschiedlichen Bedingungen.

1.4.3. Transkription von Zytokin-und Chemokingenen

Die Zytokin- und Chemokingentranskription boviner Kolonzellen lag bei fast allen untersuchten Genen unter einem Prozent der Menge an mRNA, die diese Zellen für das „House-keeping"-Gen *gapdh* enthielten. Einzig für *rantes* betrug der Anteil rund 30 % (Abb. 22). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen nach dem Mediumwechsel für 4 oder für 24 Stunden inkubiert worden waren. Für die nachfolgenden Inkubationsversuche mit Stx1 (Kapitel 3.2.3) war es wertvoll zu wissen, dass der Mediumwechsel die mRNA-Produktion der Zellen nicht beeinflusste.

ip-10-mRNA konnte bei keiner der sechs Präparationen nachgewiesen werden.

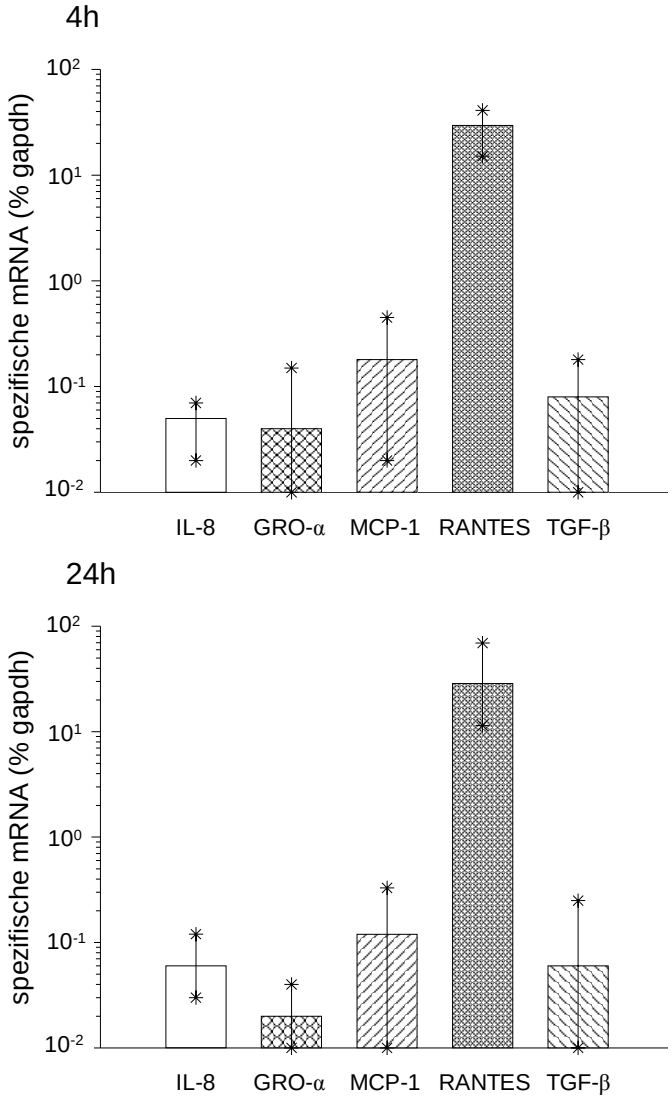


Abb. 22: Zytokin- und Chemokingentranskription boviner Kolonepithelzellen

Dargestellt sind Mittelwerte, Minima und Maxima von 6 unabhängigen 4 bzw. 5 Tage alten Zellpräparationen nach 4- bzw. 24-stündiger Inkubation bezogen auf *gapdh* in %.

1.4.4. Shigatoxin-Rezeptorexpression

Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass native, 4 Tage alte primäre bovine Kolonzellen CD77 im Durchschnitt zu rund 5,3 ± 0,56 % auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb. 23). Offensichtlich besaßen jedoch sehr viel mehr Zellen den Rezeptor, denn nach Permeabilisation der Zellen war er bei 16 ± 10,8 % nachweisbar. Der Anteil der Zellen, die rStxB1 banden, betrug nach Permeabilisation 22,5 ± 17,93 %. Mit Hilfe von Doppelfluoreszenz-Färbungen konnte eine eindeutige Zuordnung der Rezeptorexpression zu Zellen epithelialen Ursprungs getroffen werden, allerdings schienen die Zahlen aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Kolonzellen nicht aussagekräftig (Abb. 24). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Zellkulturen zeigten sich ca. 15 bis 20 % der Zellen als positiv für CD77, was schließlich die im Durchflusszytometer mit Einzelfluoreszenz gemessenen Prozentsätze untermauerte (Abb. 25).

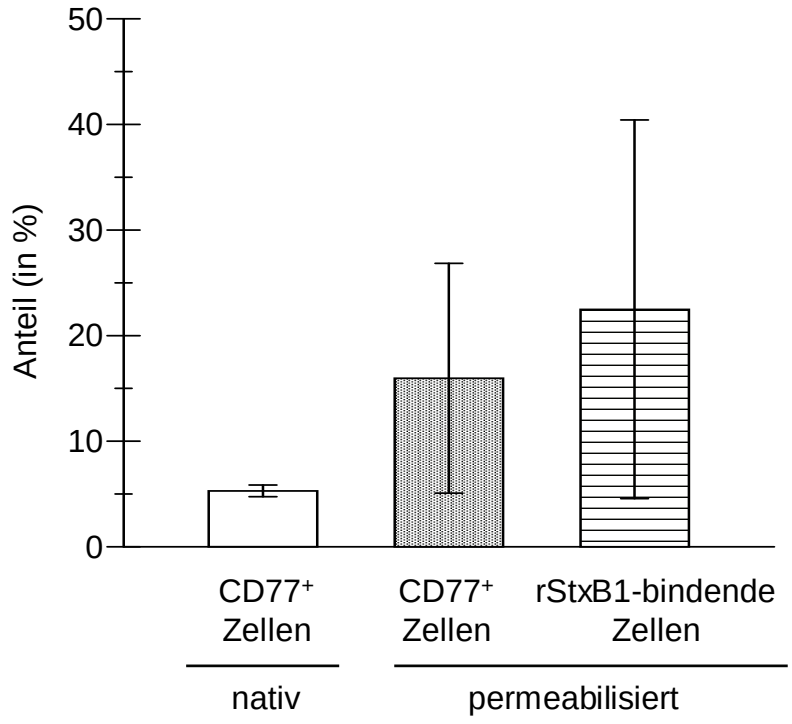


Abb. 23: CD77-Expression und rStxB1-Bindung bei primären bovinen Kolonzellen

Durchflusszytometrische Analyse 4 Tage alter Primärkulturen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 16 bzw. 24 Versuchen aus 4 bzw. 8 unabhängigen Präparationen. Zellen nativ bzw. permeabilisiert. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. c(rStxB1): 30 µg/ml.

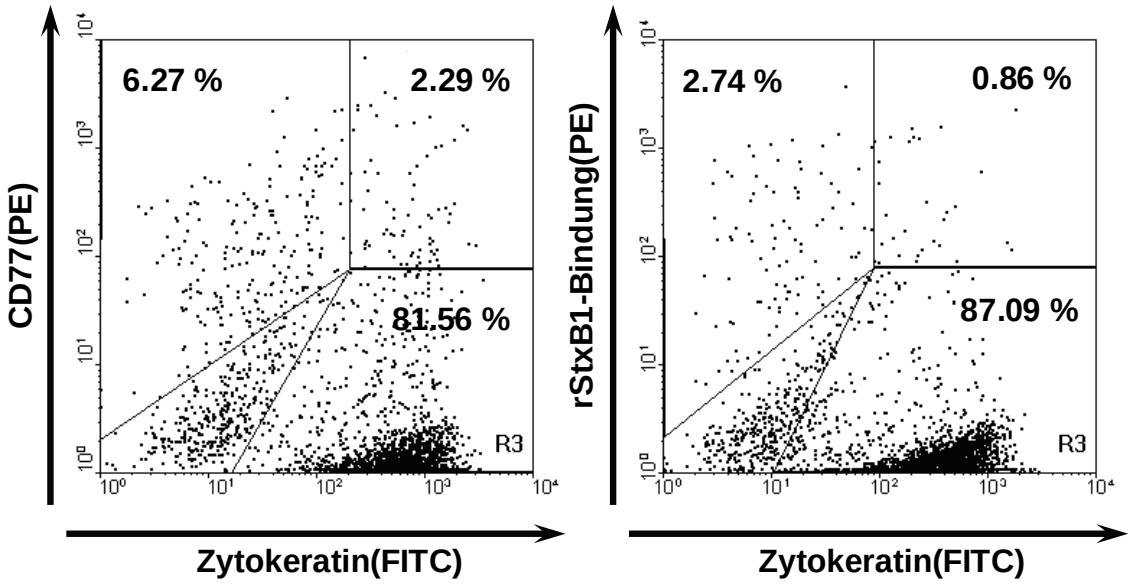


Abb. 24: CD77-Expression und rStxB1-Bindung bei primären bovinen Epithelzellen

Repräsentative Histogramme aus 12 Bestimmungen von 5 unabhängigen Präparationen 4 Tage alter Primärkulturen. Zellen permeabilisiert. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen.

Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Mikroskopie lieferten Hinweise darauf, dass sich die Shigatoxin-Rezeptorexpression nicht auf Zytokeratin-positive Epithelzellen allein beschränkte und sich die Rezeptorverteilung bei den verschiedenen Zellarten unterschied. Während bei Zellen mit Epithelzellmorphologie eine kernnahe, eher intrazelluläre Rezeptorverteilung vorherrschte (Abb. 25, 26, 27, 29, 30), exprimierten die Vimentin-positiven Zellen den Rezeptor in hoher Dichte hauptsächlich auf ihrer Oberfläche (Abb. 27, 28, 29, 30). Allerdings schienen die Vimentin-positiven Zellen keine homogene Gruppe darzustellen, da neben Rezeptor-tragenden Zellen auch solche ohne CD77-Signal vorkamen (Abb. 30 oben).

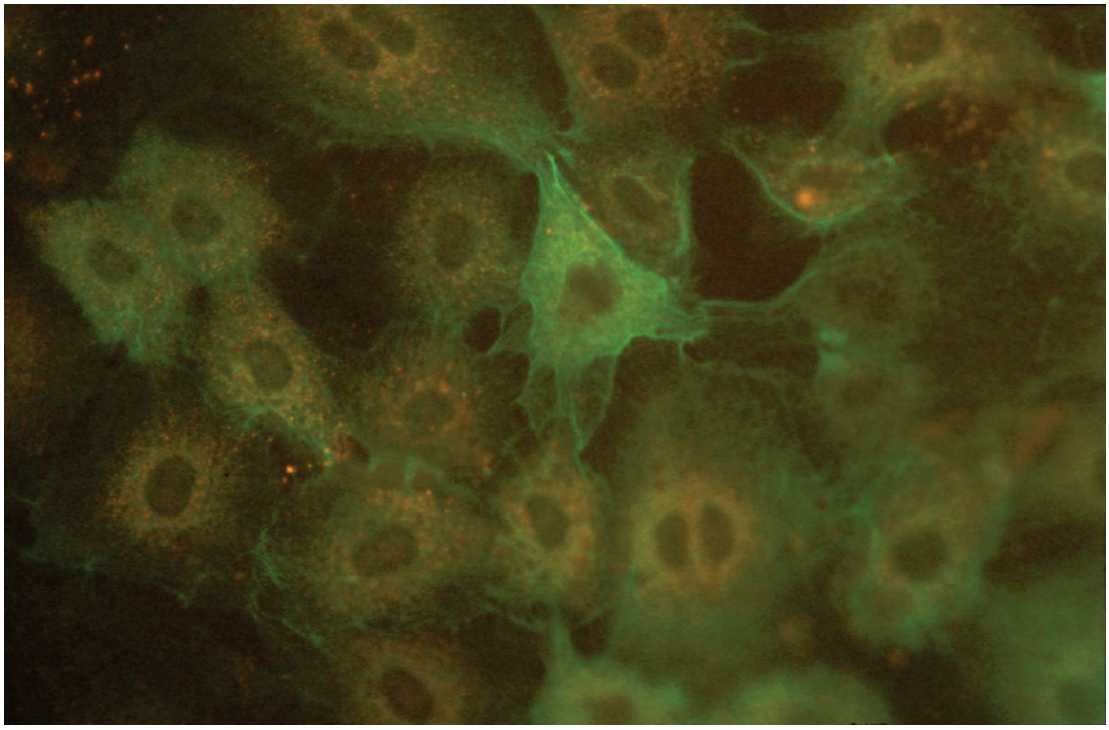


Abb. 25: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonepithelzellen

Fluoreszenzmikroskopie (4. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), CD77 (rot-orange).

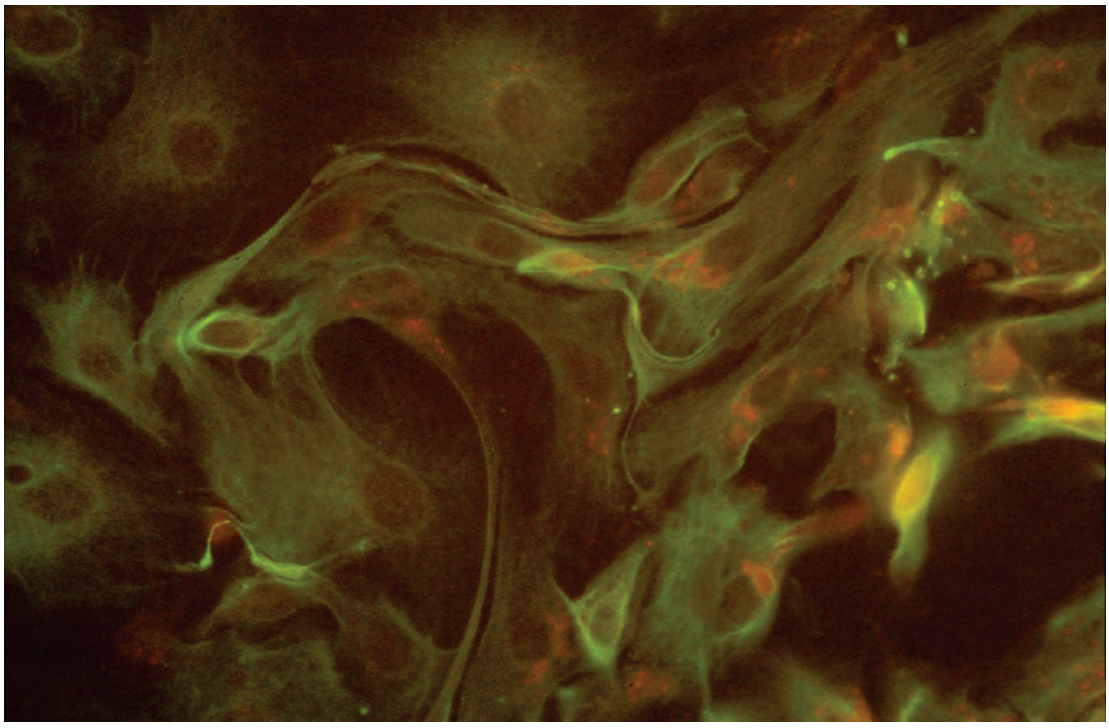


Abb. 26: rStxB1-Bindung bei primären bovinen Kolonepithelzellen

Fluoreszenzmikroskopie (4. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), rStxB1-Bindung (rot-orange).

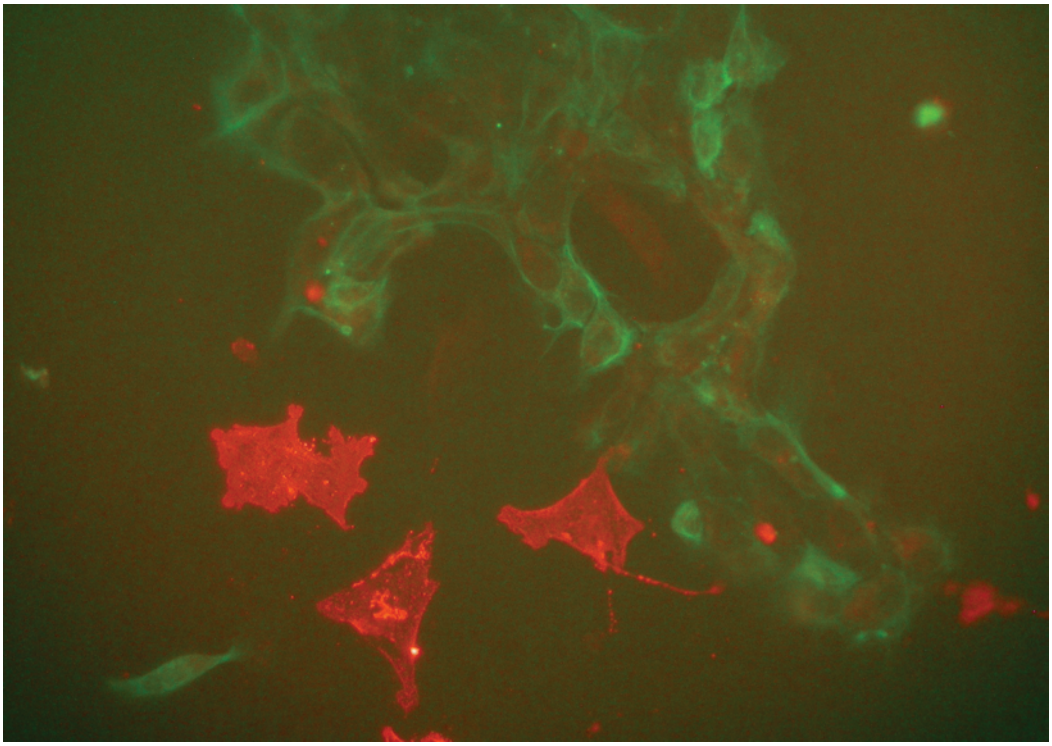


Abb. 27: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen

Fluoreszenzmikroskopie (4. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Zytokeratin (grün), CD77 (rot).

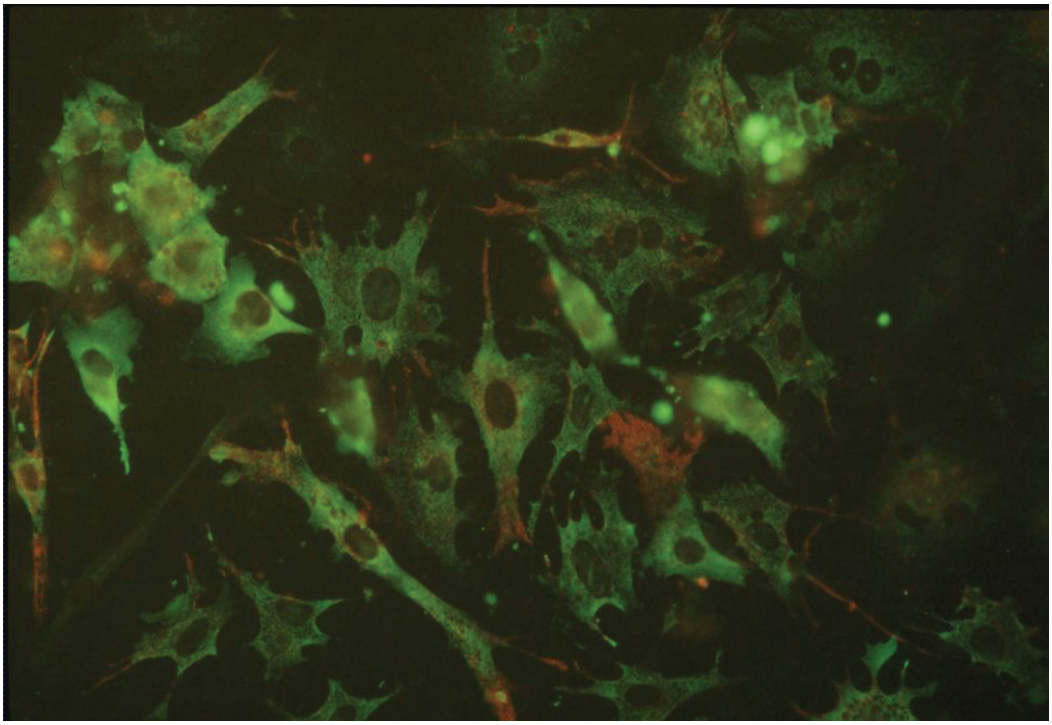


Abb. 28: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen

Fluoreszenzmikroskopie (8. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Vimentin (rot), CD77 (grün).

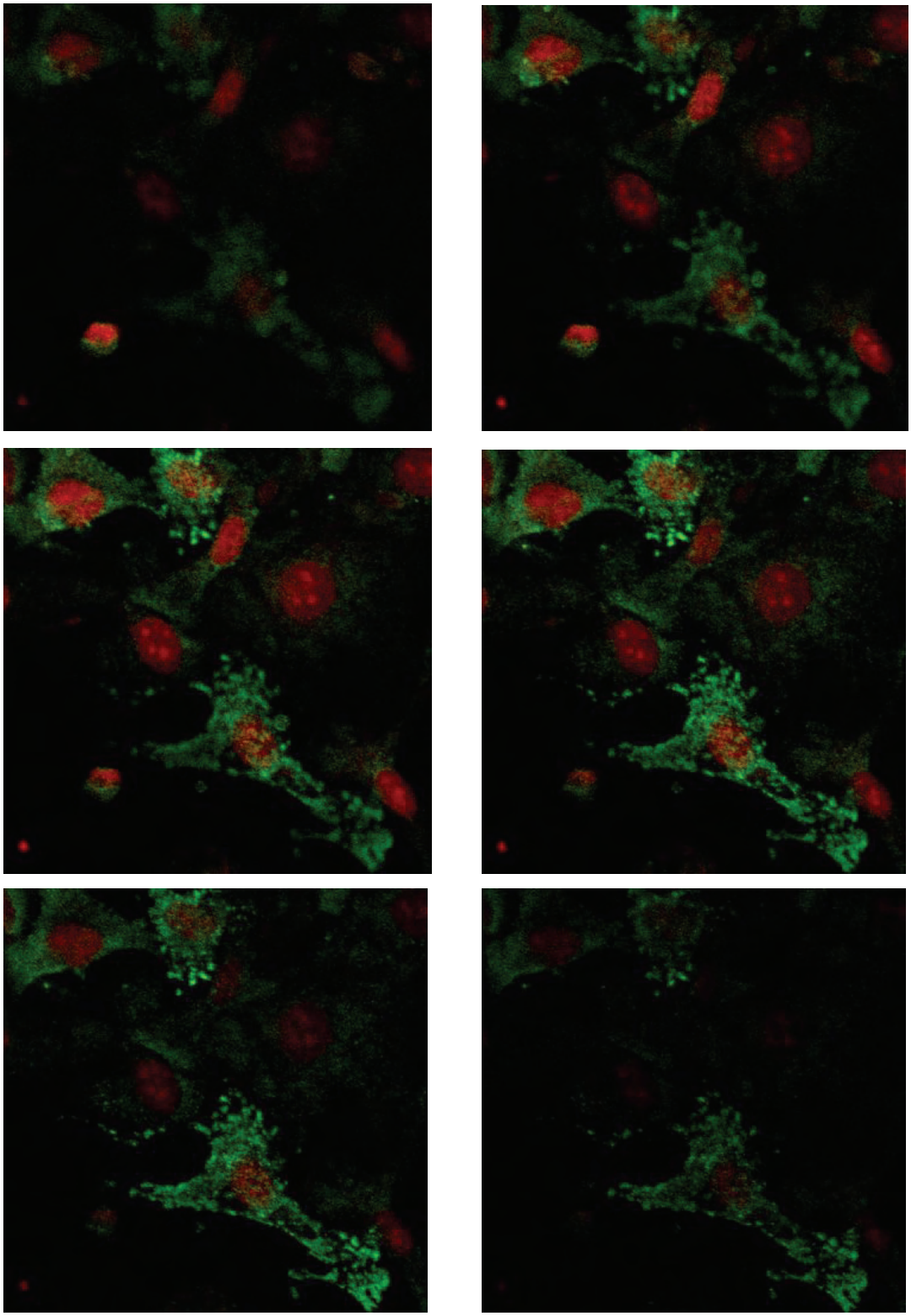


Abb. 29: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen

Konfokalmikroskopie (4. Kultivierungstag). Vergrößerung 630-fach. Die einzelnen Bilder repräsentieren unterschiedliche Ebenen von distal (links oben) nach apikal (rechts unten). Schnittabstand 1 µm. Kerne (rot), CD77 (grün). CD77 verteilt sich oberhalb der Kernebene (morphologisch mesenchymale Zellen) oder in Kernebene (Zellen mit Epithelzellmorphologie).

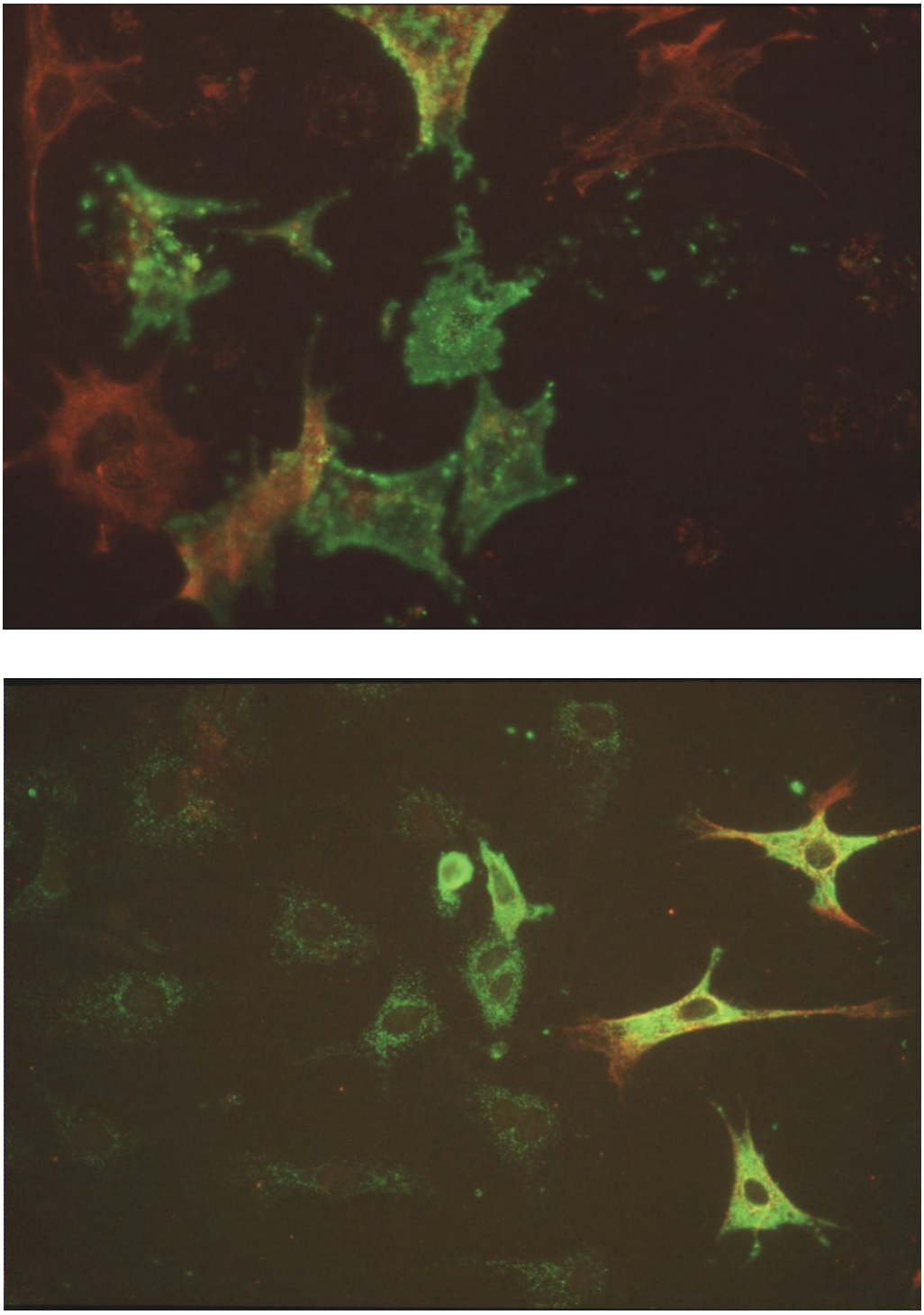


Abb. 30: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen

Fluoreszenzmikroskopie (5. Kultivierungstag). Vergrößerung 400-fach. Vimentin (rot), CD77 (grün). Das obere Bild betont die Heterogenität der Gruppe der Vimentin-positiven Zellen. Es zeigt eine unterschiedlich starke CD77-Expression bei Vimentin-positiven Zellen, die von CD77-negativen Zellen bis hin zu Zellen reicht, deren Oberfläche völlig mit Rezeptoren bedeckt ist. Im unteren Bild sind neben CD77-exprimierenden Vimentin-positiven Zellen auch Vimentin-negative Zellen mit Epithelzellmorphologie zu sehen, die CD77 kernnah exprimieren.

Die Effekte von LPS und Butyrat auf die Shigatoxin-Rezeptorexpression der primären Kolonzellen erwiesen sich als abhängig vom Alter der Kultur. Während bei 7 Tage alten Primärkulturen nach vorangehender 48- bzw. 24-stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Butyrat eine leicht reduzierte Rezeptorexpression nachgewiesen werden konnte (Abb. 31), reagierten 10 Tage alte primäre Kolonzellen nach vorangehener 72-stündiger Inkubation mit 2 bzw. 4 mM Butyrat mit einer leichten Steigerung der CD77-Expression (Abb. 32). LPS schien keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression zu haben.

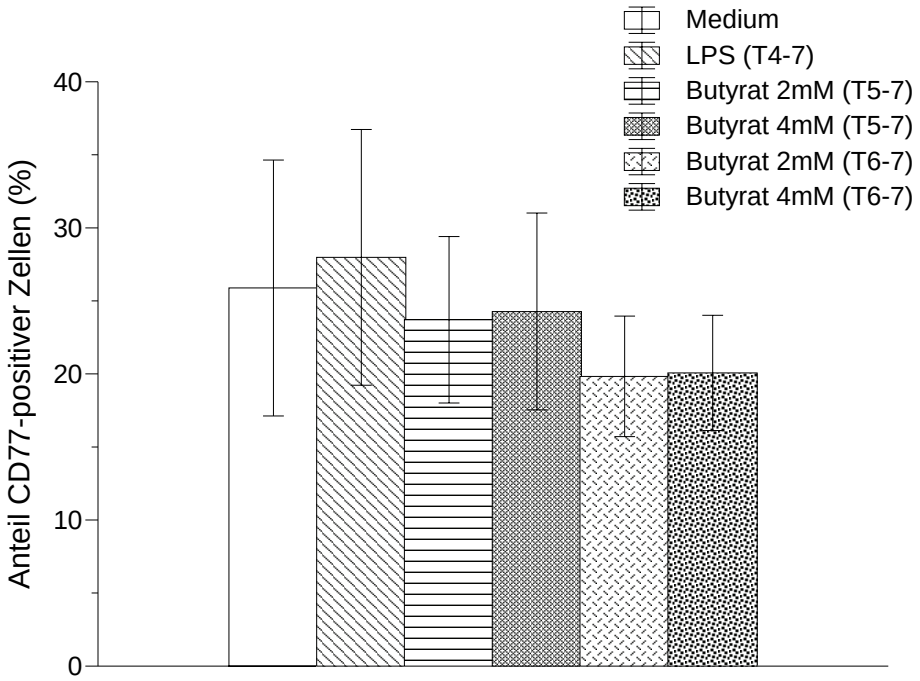


Abb. 31: Einfluss von LPS und Butyrat auf die CD77-Expression primärer Kolonzellen

Durchflusszytometrische Analyse. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Präparationen, jeweils Doppelbestimmungen. c(LPS): 25 µg/ml. Zellen nativ. Stimulationsdauer 72 h (T4-7 = Kultivierungstag 4-7), 48 h (T5-7) bzw. 24 h (T6-7). Die statistische Auswertung mit dem t-Test nach Student ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inkubationsbedingungen.

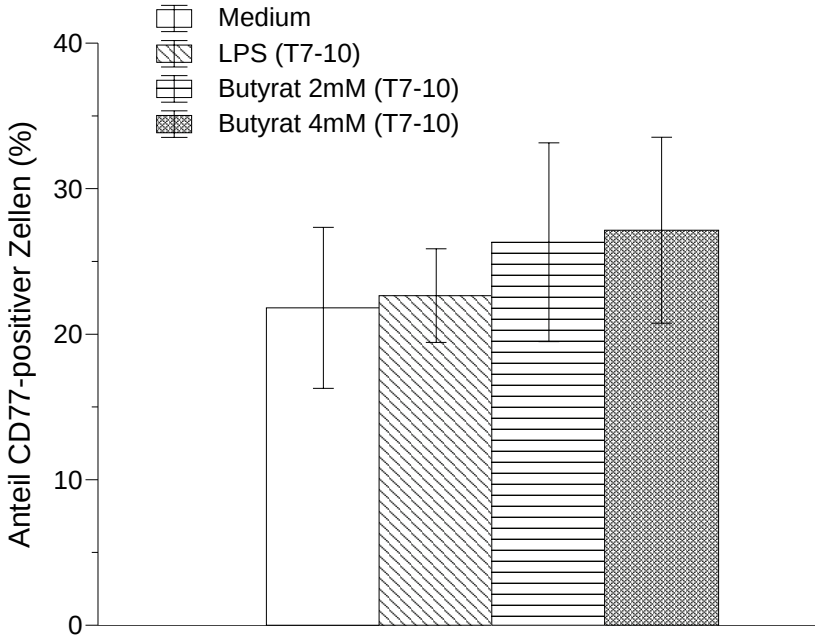


Abb. 32: Einfluss von LPS und Butyrat auf die CD77-Expression primärer Kolonzellen

Durchflusszytometrische Analyse. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Präparationen, jeweils Doppelbestimmungen. c(LPS): 25 µg/ml. Zellen nativ. Stimulationsdauer 72 h (T7-10 = Kultivierungstag 7-10). Die statistische Auswertung mit dem t-Test nach Student ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inkubations-bedingungen.

1.5. Untersuchungen zur Wirkung von Shigatoxin auf funktionelle Parameter

1.5.1. Stoffwechselaktivität

Durch ihre CD77-Expression wiesen sich primäre bovine Kolonzellen als potenzielle Zielzellen für das Shigatoxin aus. Um die Empfänglichkeit der Zellen gegenüber Stx1 zu testen, wurde die Wirkung des Toxins auf die Stoffwechselaktivität primärer boviner Kolonzellen im Zytotoxizitätstest (MTT-Test) untersucht.

Vier Tage nach ihrer Isolierung aus dem Rinderdarm wurden die Zellen geerntet und anschließend entweder mit Stx1 alleine oder aber mit Stx1, welches zuvor eine Stunde lang mit dem monoklonalen anti-StxB1-Antikörper 13C4 präinkubiert worden war, erneut ausplattiert.

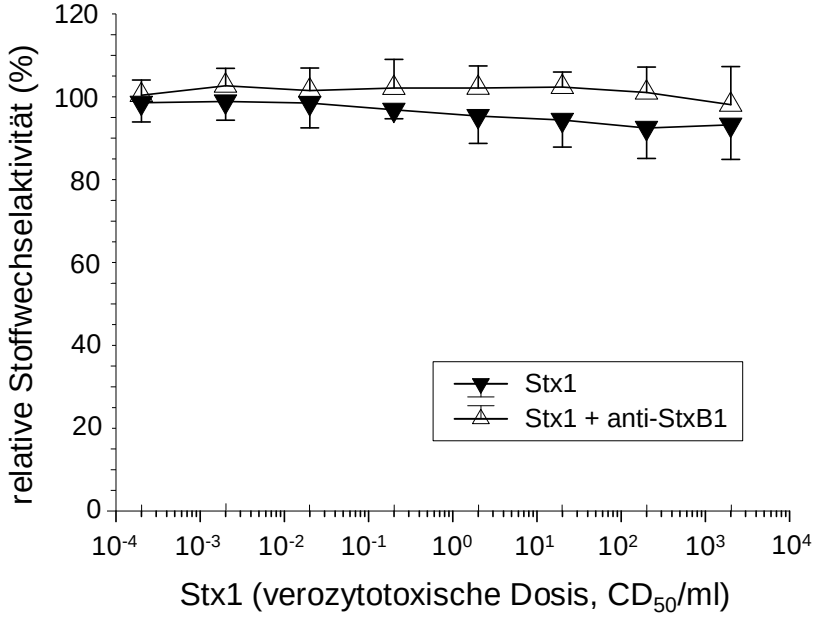


Abb. 33: Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität boviner Kolonzellen

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Dreifachansätze von 7 unabhängigen Versuchen mit 7 Tage alten Zellpräparationen; c(Stx1): 2000 CD_{50}/ml log 10 titriert, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml konstant, Inkubationsdauer 72 h. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab: p(Konzentration) > 0,05 (n.s.); p($\pm$ Stx1 bzw. $\pm$ Stx1+anti-StxB1) $\leq$ 0,05 (*); p(Interaktion) > 0,05 (n.s.).

Nach 72-stündiger Inkubation war die Stoffwechselaktivität der bovinen Kolonzellen durch Stx1 nur geringgradig reduziert worden, ein Effekt, der sich durch anti-StxB1 neutralisieren ließ (Abb. 33).

1.5.2. Shigatoxin-Rezeptorexpression

Da nicht auszuschließen war, dass der geringgradige Effekt des Stx1 auf der Tatsache beruhte, dass nur ein kleiner Anteil der primären bovinen Kolonzellen überhaupt CD77 exprimierte, konzentrierten sich die folgenden Versuche speziell auf Rezeptor-exprimierende Zellen. Zunächst wurden 4 Tage alte Primärkulturen boviner Kolonzellen für 144 Stunden unter verschiedenen Bedingungen inkubiert, um mittels Durchflusszytometrie den Einfluss von Stx1 auf die oberflächlich lokalisierte Shigatoxin-Rezeptorexpression bei nativen Zellen zu untersuchen. Dabei war sowohl ohne als auch mit LPS-Stimulation ein deutlicher Rückgang an Rezeptor-positiven Zellen unter der Wirkung von Stx1 festzustellen (Abb. 34).

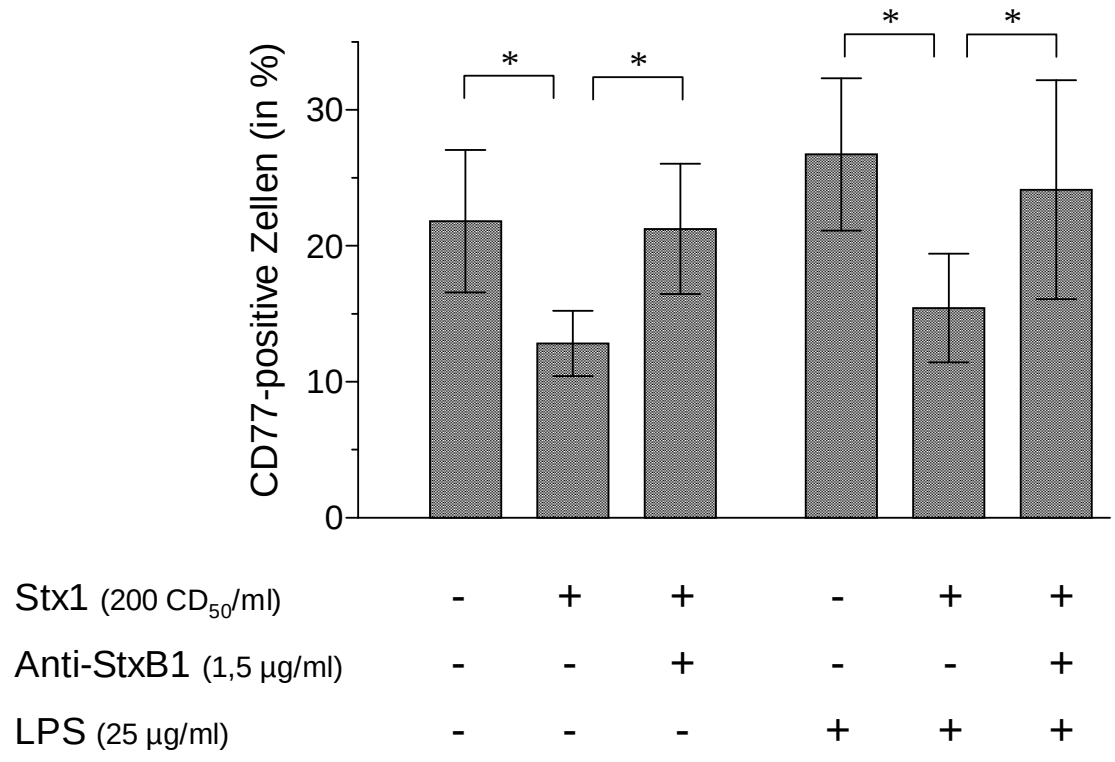


Abb. 34: Einfluss von Stx1 und LPS auf die oberflächlich lokalisierte Shigatoxin-Rezeptorexpression in Primärkulturen boviner Kolonzellen

Durchflusszytometrische Analyse 10 Tage alter Primärkulturen nach verschiedenen Inkubationsbedingungen und 144 h Inkubationsdauer. Mittelwerte und Standardabweichungen von 6-8 Messungen aus 3-4 unabhängigen Zellpräparationen. Zellen nativ. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab: p(Zugabe von LPS) > 0,05 (n.s.); p(± Stx1 bzw. ± Stx1 + antiStxB1) ≤ 0,05 (*); p(Interaktion) > 0,05 (n.s.).

Um die Identität dieser Stx-empfindlichen Zellen zu klären, wurde zunächst der Einfluss des Toxins speziell auf Rezeptor-positive Zellen nicht-epithelialer Herkunft untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich unter der Wirkung des Shigatoxins tatsächlich der Anteil an CD77-positiven und gleichzeitig Zytokeratin-negativen Zellen in den Kulturen von ca. 8 % auf ca. 6 % verringerte (Abb. 36), während der Anteil an Zytokeratin-positiven Zellen bzw Zytokeratin- und gleichzeitig CD77-positiven Zellen unverändert blieb (Abb. 35).

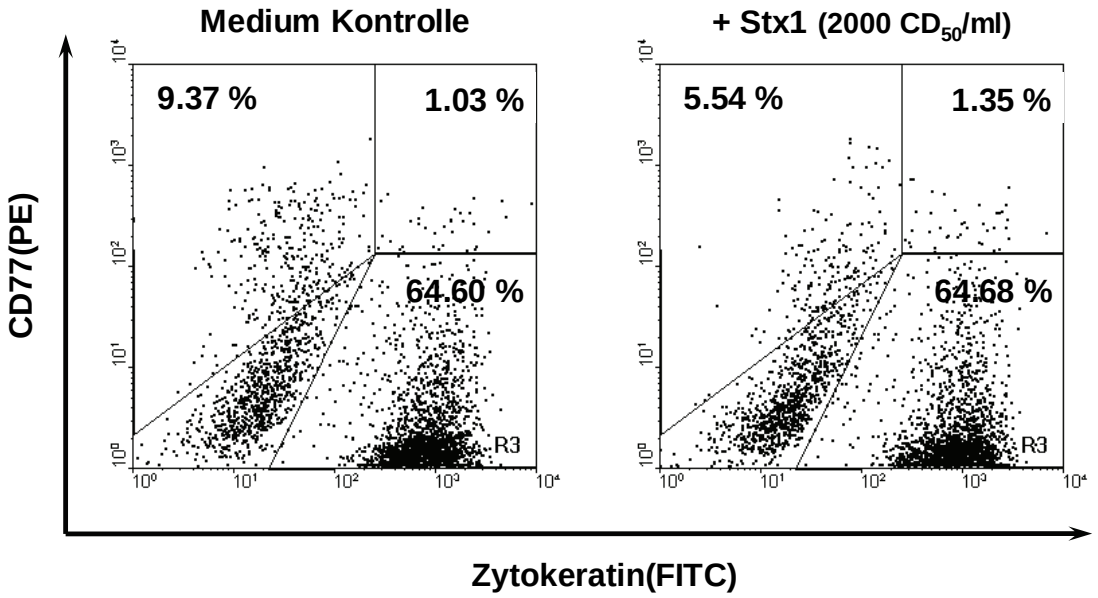


Abb. 35: Eliminierung von CD77-positiven/Zytokeratin-negativen primären bovinen Kolonzellen durch Stx1

Repräsentative Histogramme aus 4 Bestimmungen einer 7 Tage alten Zellpräparation nach 72 h Inkubationszeit. Zellen permeabilisiert. Alle Angaben beziehen sich auf morphologisch intakte Zellen.

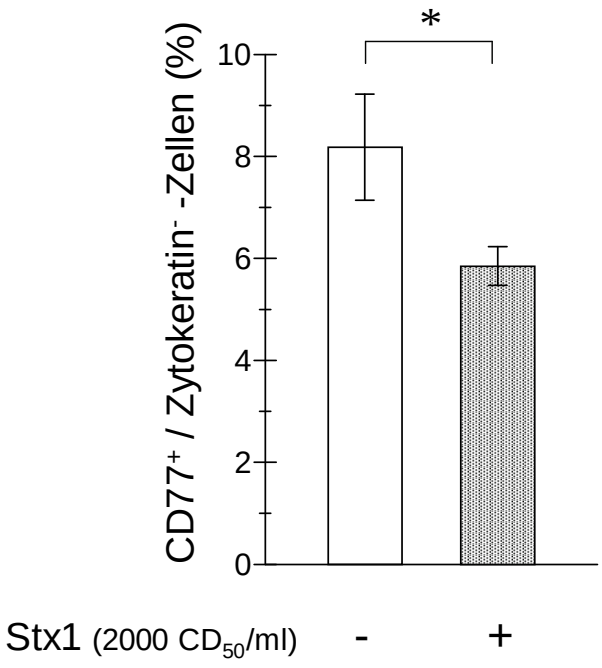


Abb. 36: Eliminierung von CD77-positiven/Zytokeratin-negativen primären bovinen Kolonzellen durch Stx1

Durchflusszytometrische Analyse. MW und SD aus 4 Bestimmungen einer 7 Tage alten Zellpräparation nach 72 h Inkubationszeit. Zellen permeabilisiert, Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Der t-Test für gepaarte Stichproben ergab: $p \leq 0{,}05$ (*).

Dieses Phänomen konnte auch auf fluoreszenzmikroskopischen Präparaten nachvollzogen werden, die zeigten, dass unter Stx1-Einfluss die Anzahl der Rezeptor-positiven Zellen deutlich zurückging (Abb. 37). Morphologisch handelte es sich bei diesen Zellen nicht um Epithelzellen, sondern um Zellen mesenchymaler Herkunft.

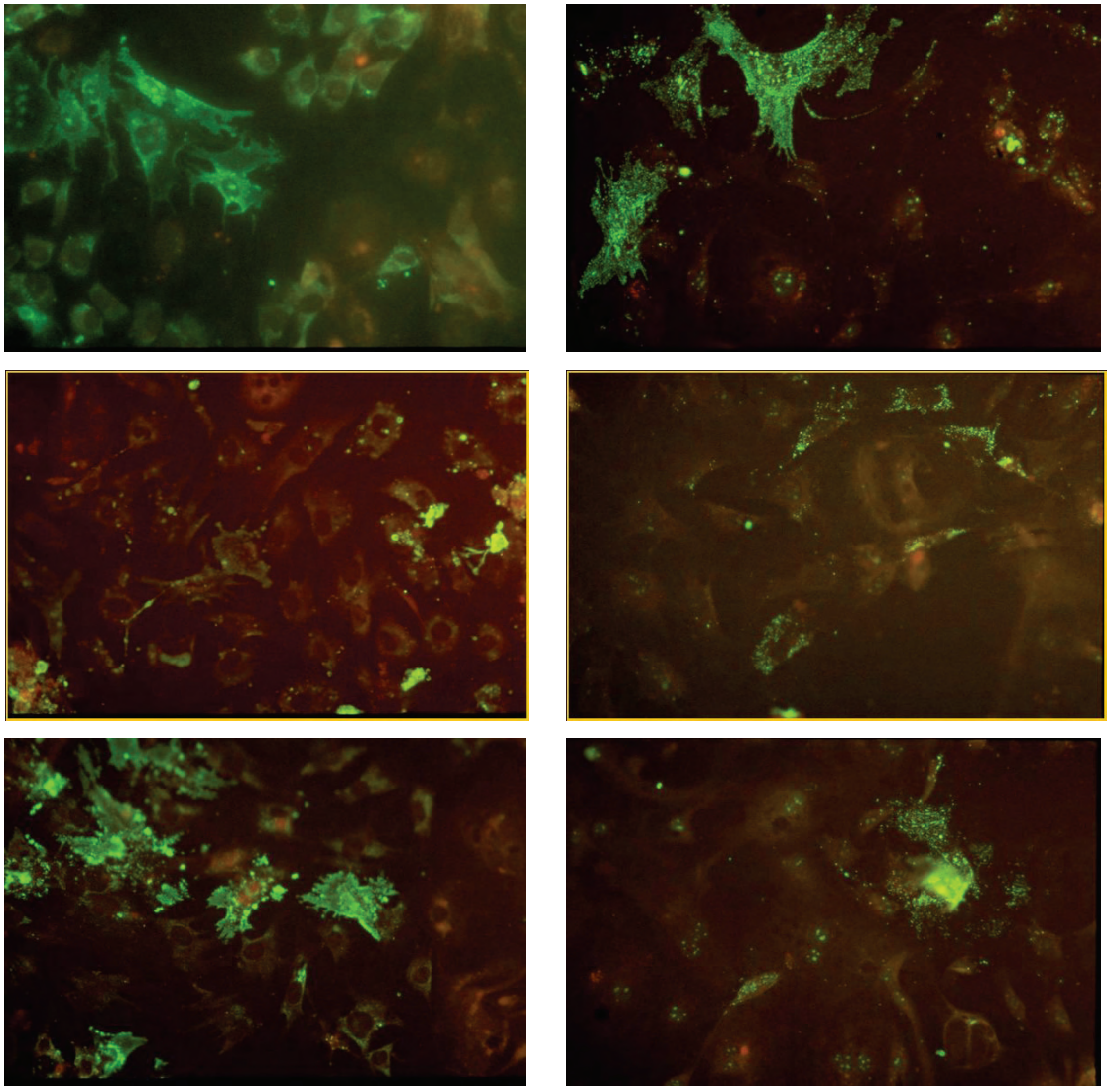


Abb. 37: Eliminierung Rezeptor-positiver primärer boviner Kolonzellen durch Stx1

Fluoreszenzmikroskopie (7. Kultivierungstag). Linke Spalte: CD77 (grün); rechte Spalte: rStxB1-Bindung (grün). Die Primärkulturen waren zu diesem Zeitpunkt für 72 h unter verschiedenen Bedingungen inkubiert worden: Mediumkontrolle (oberes Bildpaar), mit Stx1 (200 CD_{50}/ml) (mittleres Bildpaar) bzw. mit Stx1 (200 CD_{50}/ml) und anti-StxB1 (1,5 µg/ml) (unteres Bildpaar).

1.5.3. Apoptoserate der Epithelzellen

Nachdem gezeigt worden war, dass Rezeptor-positive Zellen nicht-epithelialer Herkunft durch den Einfluss des Stx aus den Zellkulturen eliminiert wurden, sollte nun speziell die Stx-Wirkung auf Epithelzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden primäre bovine Kolonzellen vier Tage nach ihrer Isolierung geerntet, erneut ausplattiert und unter verschiedenen Bedingungen 72 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte für jeden Ansatz die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen anhand des epithelzell-spezifischen Apoptose-Markers M30. Unabhängig von einer Stimulation mit LPS ließ sich im Vergleich zu den Ansätzen ohne Stx1 bzw. mit neutralisierendem Antikörper keine verstärkte Apoptoserate durch Stx1 nachweisen (Abb. 38). Das Toxin übte folglich keinen zytotoxischen Effekt auf Epithelzellen aus.

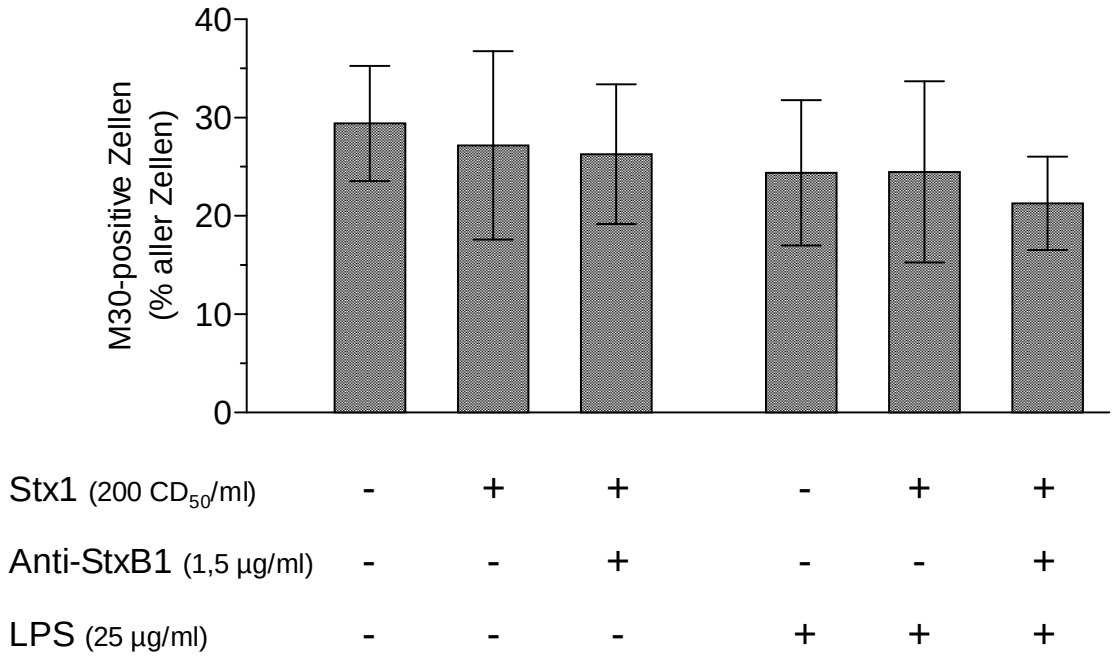


Abb. 38: Einfluss von Stx1 auf die Apoptoserate boviner Kolonepithelzellen

Durchflusszytometrische Analyse 7 Tage alter Primärkulturen nach verschiedenen Inkubationsbedingungen und 72 h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 Messungen aus 3 unabhängigen Zellpräparationen.

1.5.4. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen

Um den Einfluss von Stx1 auf die Zytokin- und Chemokingentranskription von primären bovinen Kolonzellen zu untersuchen, wurden die Zellen entweder nur mit Medium, mit Stx1 oder mit Stx1 und anti-StxB1 inkubiert. Nach 4-stündiger Inkubationszeit ließ sich unter dem Einfluss von Shigatoxin im Mittel ein leichter Anstieg an spezifischer mRNA für das Chemokin MCP-1 feststellen (Abb. 39). Die auffallend starken Schwankungen der einzelnen Bestimmungen beruhten darauf, dass von den insgesamt sechs unabhängigen Zellpräparationen nur bei vier Zellpräparationen ein starker Anstieg der spezifischen mRNA für MCP-1 um das 3- bis 6–fache der Mediumkontrolle zu beobachten war. Die beiden anderen Präparationen zeigten abweichende Reaktionen (Abb. 40).

Der Stx1-vermittelte Anstieg an spezifischer mRNA für MCP-1 war auch nach 24 Stunden noch zu verzeichnen, allerdings ließ sich dieser Effekt nicht neutralisieren. Bei den anderen untersuchten Zytokin- und Chemokingenen hingegen konnte zu keinem Zeitpunkt ein biologisch relevanter Effekt des Stx1 nachgewiesen werden, da alle Werte unter dem 2-fachen der Mediumkontrolle lagen (Abb 39).

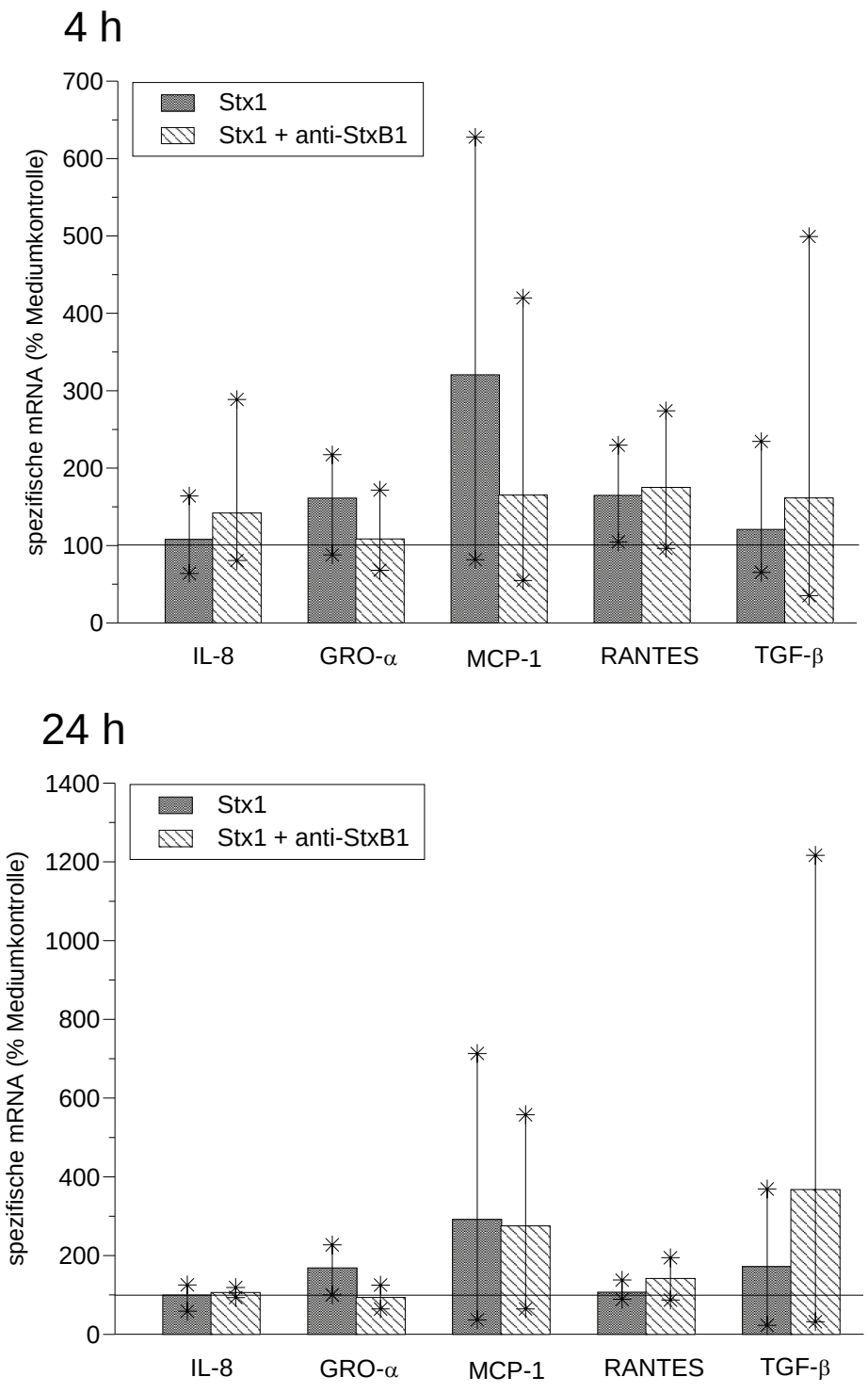


Abb. 39: Effekt von Stx1 auf die Zytokin- und Chemokingentranskription boviner Kolonzellen

Dargestellt sind die Mittelwerte sowie Minima und Maxima von sechs unabhängigen 4 bzw. 5 Tage alten Zellpräparationen nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation; c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml. Die Linie markiert 100 % Mediumkontrolle. Ein statistisch signifikanter Effekt des Stx1 konnte mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test nicht festgestellt werden.

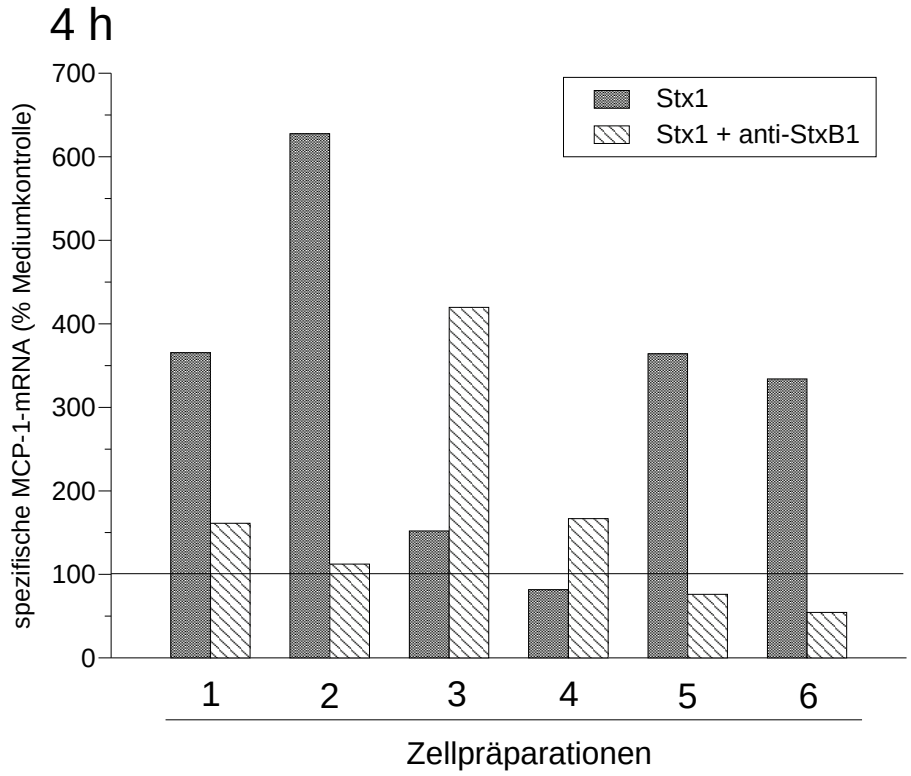


Abb. 40: Effekt von Stx1 auf die Expression spezifischer MCP-1-mRNA bei bovinen Kolonzellen

Dargestellt sind alle sechs 4 Tage alten Zellpräparationen nach 4 Stunden Inkubation.
c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml.

1.5.5. Freisetzung chemoattraktiver Substanzen

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der Chemokingenexpression unter dem Einfluss von Stx1 bei bovinen Kolonzellen tatsächlich mit der vermehrten Produktion von chemotaktischen Substanzen korreliert, wurde der Einfluss konditionierter Kolonzellkulturüberstände auf das Migrationsverhalten boviner Granulozyten untersucht. Im Mittel wanderten mehr Granulozyten in Richtung der konditionierten Überstände als in Richtung der Negativkontrolle (unkonditioniertes Medium). Die Zellpräparationen 3 und 4 (Abb. 40) bildeten dabei keine Ausnahmen. In den Versuchen mit 24 Stunden lang konditionierten Überständen war die Migrationsaktivität etwa dreimal so hoch wie in den Versuchen mit 4 Stunden Inkubation. Das Toxin selbst schien jedoch die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen nicht zu beeinflussen, da weder nach 4 noch nach 24 Stunden ein Effekt der Stx-konditionierten Überstände auf das Migrationsverhalten der Granulozyten festgestellt werden konnte (Abb. 41).

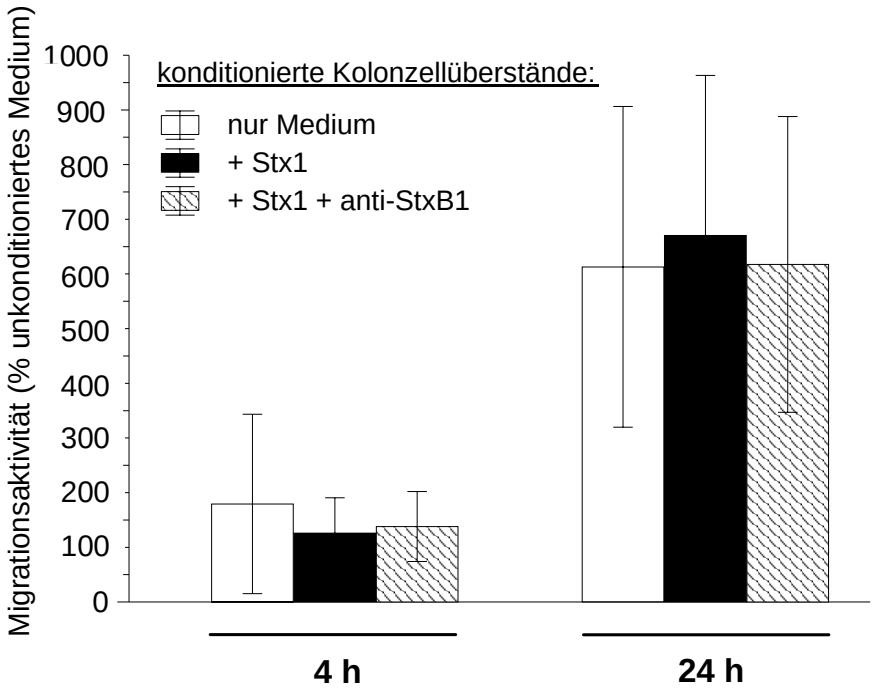


Abb. 41: Einfluss von Stx1 auf die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen bei primären bovinen Kolonzellen

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 bis 6 unabhängigen Granulozyten-Migrationsstudien mit für 4 bzw. 24 h konditionierten Kolonzellüberständen; c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml.

2. Untersuchungen an Primärkulturen angereicherter boviner Kolonmesenchymzellen in An- und Abwesenheit von Stx1

Eine Möglichkeit, die in den Primärkulturen boviner Kolonzellen neben den Epithelzellen vorkommenden Zellen mesenchymaler Herkunft in Reinkultur zur weiteren Charakterisierung gewinnen zu können, bestand in ihrer direkten Anreicherung während der Kolonkryptenpräparation und anschließenden Kultivierung.

2.1. Zytoskelettausstattung und Stoffwechselaktivität

Die Charakterisierung der primären angereicherten Kolonmesenchymzellen anhand der Zytoskelettausstattung zeigte, dass diese Zellen zu rund 65 % Vimentin exprimierten und negativ für Zytokeratin waren. Unter dem Einfluss von Stx1 war ein leichter Rückgang in der Anzahl Vimentin-positiver Zellen von ca. 65 auf etwa 52 % in den Kulturen zu verzeichnen (Abb. 42).

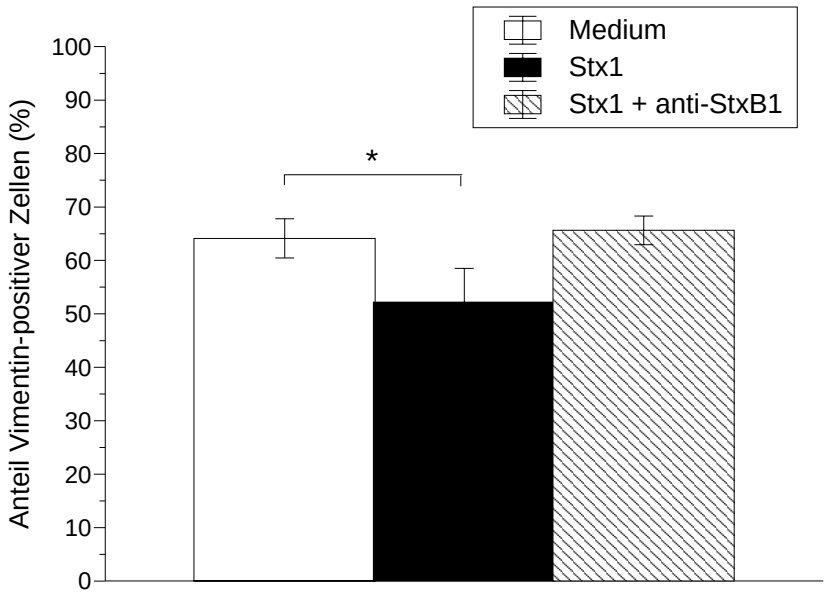


Abb. 42: Einfluss von Stx1 auf den Vimentin-positiven Anteil der primären Kolonmesenchymzellen

Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen, jeweils Doppelbestimmungen; Zellen permeabilisiert. c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml, Inkubationsdauer 72 h (Kultivierungstag 14 bis 17). Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Der t-Test nach Student ergab: $p \leq 0,05$ (*).

Nach 14tägiger Kultivierung wurden die primären angereicherten Kolonmesenchymzellen erneut in kollagenisierte 96-Loch-Mikrotiter-Platten ausgesät und 72 Stunden lang unter dem Einfluss von Stx1 bzw. von Stx1 und neutralisierendem Antikörper inkubiert. Die Beurteilung der Stoffwechselaktivität mit Hilfe des MTT-Tests ergab, dass Stx1 keinen Einfluss auf die Zellvitalität der primären Kolonmesenchymzellen ausübte (Abb. 43).

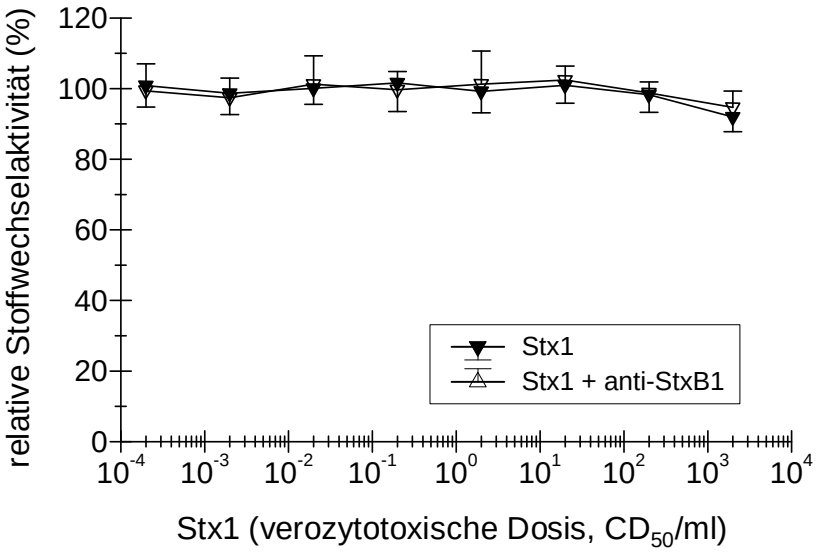


Abb. 43: Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität primärer Kolonmesenchymzellen

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Dreifachansätze von 4 unabhängigen Versuchen mit 17 Tage alten Präparationen; c(Stx1): 2000 CD_{50}/ml log 10 titriert, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml konstant, Inkubationsdauer72 h. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kurven für p(Konzentration), p(± Stx1 bzw. ± Stx1+anti-StxB1) und p(Interaktion).

2.2. Expression des Shigatoxin-Rezeptors und anderer Oberflächenmarker

In nativem Zustand trugen ca. 32 ± 5,32 % der Zellen CD77 auf ihrer Oberfläche. Wie schon bei den Primärkulturen boviner Kolonzellen beobachtet, schien der intrazellulär exprimierte Anteil des Rezeptors sehr hoch zu sein, denn nach Permeabilisation der Zellen erhöhte sich der CD77-Nachweis auf ca. 70 ± 12,32 %. Anders als bei den Primärkulturen boviner Kolonzellen konnte mit dem Nachweis der Bindung der rekombinanten B-Untereinheit des Shigatoxins (rStxB1) kein höherer Prozentsatz an positiven Zellen ermittelt werden. rStxB1 band bei nativen Zellen an ca. 25 ± 12,32 % und bei permeabilisierten Zellen an ca. 29 ± 23,8 % (Abb. 44).

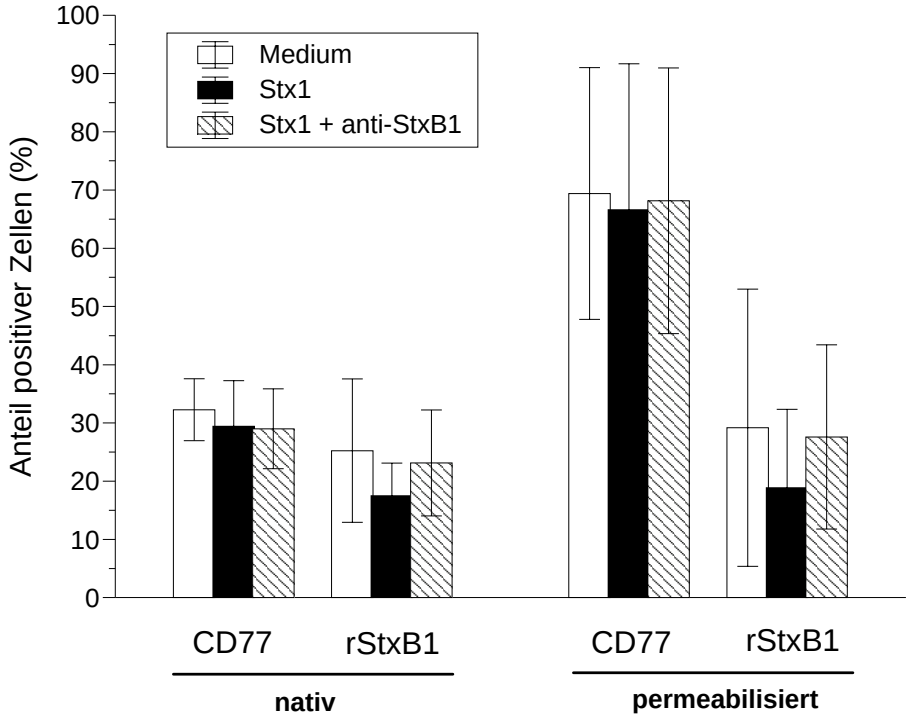


Abb. 44: Shigatoxin-Rezeptorexpression bei primären Kolonmesenchymzellen

Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen aus 4 unabhängigen Versuchen; c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml, Inkubationsdauer 72 h (Kultivierungstag 14 bis 17). Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Die statistische Auswertung mit dem t-Test nach Student ergab keine signifikanten Effekte des Stx1.

Nach zusätzlicher Stimulation mit 25 µg/ml LPS über den gesamten Inkubationszeitraum steigerte sich der Nachweis der CD77-Expression auf der Oberfläche nativer Zellen in allen Ansätzen leicht (Abb. 45).

Ein Einfluss des Stx1 auf die CD77-Expression ließ sich nicht feststellen, wohl aber auf die rStxB1-Bindung, die sich sowohl bei nativen als auch bei permeabilisierten Zellen nach Zugabe von Stx1 leicht verringerte (Abb. 44).

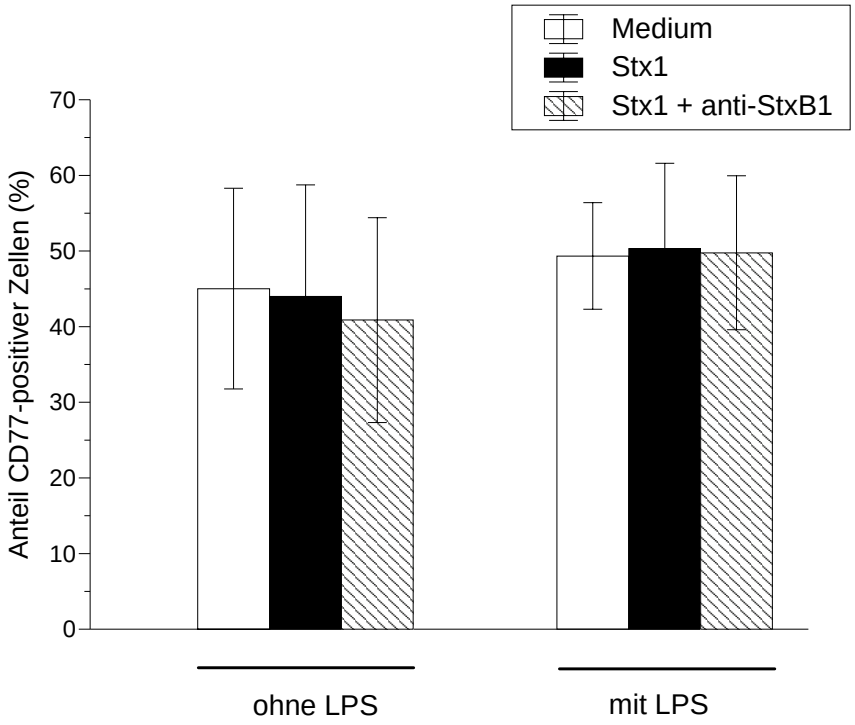


Abb. 45: CD77-Expression von primären Kolonmesenchymzellen in Gegenwart von LPS

Mittelwerte und Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen von 3 unabhängigen Versuchen; c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml, c(LPS): 25 µg/ml, Inkubationsdauer 72 h (Kultivierungstag 14 bis 17), Zellen nativ. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen.

Eine nähere Charakterisierung dieser Shigatoxin-Rezeptor-tragenden Zellen mesenchymaler Herkunft erfolgte durch die Untersuchung der Expression bestimmter Oberflächenmarker. Primäre angereicherte Kolonmesenchymzellen exprimierten zu rund 100 % MHC I und zu weniger als 10 % MHC II auf ihrer Zelloberfläche, was durch die Anwesenheit von Stx1 nicht beeinflusst wurde (nicht gezeigt). Das Vorkommen von CD11b und CD11c konnte nicht nachgewiesen werden. Bei einer von vier Präparationen war nahezu kein CD172a nachzuweisen, während in den anderen drei Präparationen rund 25 % bzw. fast 80 bis 90 % der Zellen CD172a exprimierten. Unter dem Einfluss von Stx1 kam es bei zwei der vier Präparationen zu einer leichten Erhöhung des CD172a-Nachweises (Abb. 46).

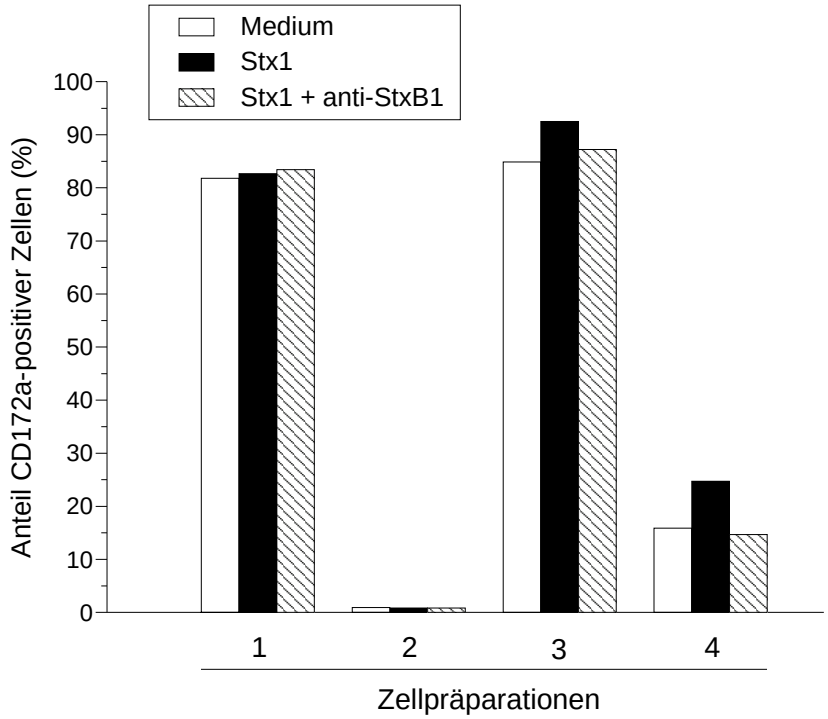


Abb. 46: CD172a-Oberflächenexpression bei primären Kolonmesenchymzellen

Mittelwerte aus den Doppelansätzen der einzelnen Versuche; c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml, Inkubationsdauer 72 h (Kultivierungstag 14 bis 17). Zellen nativ. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen.

3. Untersuchungen an Kulturen immortalisierter boviner Kolonmesenchymzellen

Um aussagekräftige Untersuchungen mit einem weniger heterogenen Zellpool durchführen zu können, wurden zur weiteren Charakterisierung Kulturen immortalisierter Kolonmesenchymzellen verwendet.

3.1. Charakterisierung verschiedener mesenchymaler Kolonzell-Klone

3.1.1. Zytoskelettausstattung

Durch Transfektion und Immortalisierung von Primärkulturen boviner Kolonzellen wurden insgesamt 10 Klone erhalten. Diese erwiesen sich nach der durchflusszytometrischen Untersuchung als negativ für Zytokeratin und präsentierten sich mit einem Vimentin-Anteil von 46 bis 85 % als Zellen mesenchymaler Herkunft (Tab. 13, Abb. 48).

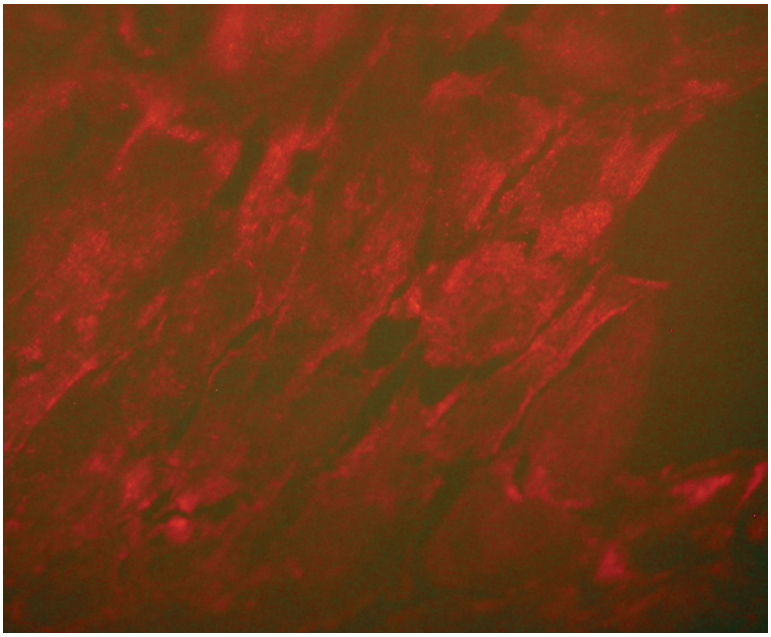


Abb. 47: Zytoskelettausstattung von Kolonzell-Klon 12

Fluoreszenzmikroskopie. Nachweis von Vimentin (rot), trotz Inkubation mit anti-Zytokeratin kein Zytokeratin (grün) detektierbar. Vergrößerung 400-fach.

Tab. 13: Vimentin-Ausstattung der mesenchymalen Kolonzell-Klone

Durchflusszytometrische Analyse. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen. Zellen permeabilisiert. Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen.

Klon	Vimentin-Anteil MW (± SD)
1	80,08 (± 2,05)
6a	50,70 (± 1,55)
7	74,65 (± 1,22)
8II	58,60 (± 3,92)
9a	46,09 (± 6,79)
10aI	70,77 (± 4,21)
10aII	70,87 (± 3,46)
11bI	84,53 (± 5,3)
11bII	82,45 (± 2,84)
12	83,61 (± 3,66)

Mit demselben Antikörper-Nachweissystem angefertigte Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie bestätigten das mit dem Durchflusszytometer erzielte Ergebnis einer ausschließlich Vimentin-positiven Kultur, in der keine Zytokeratin-positiven Zellen vorkamen. Die schmalen, länglichen Zellen wuchsen extrem dicht und erschienen alle sehr uniform in Größe und Morphologie (Abb. 47).

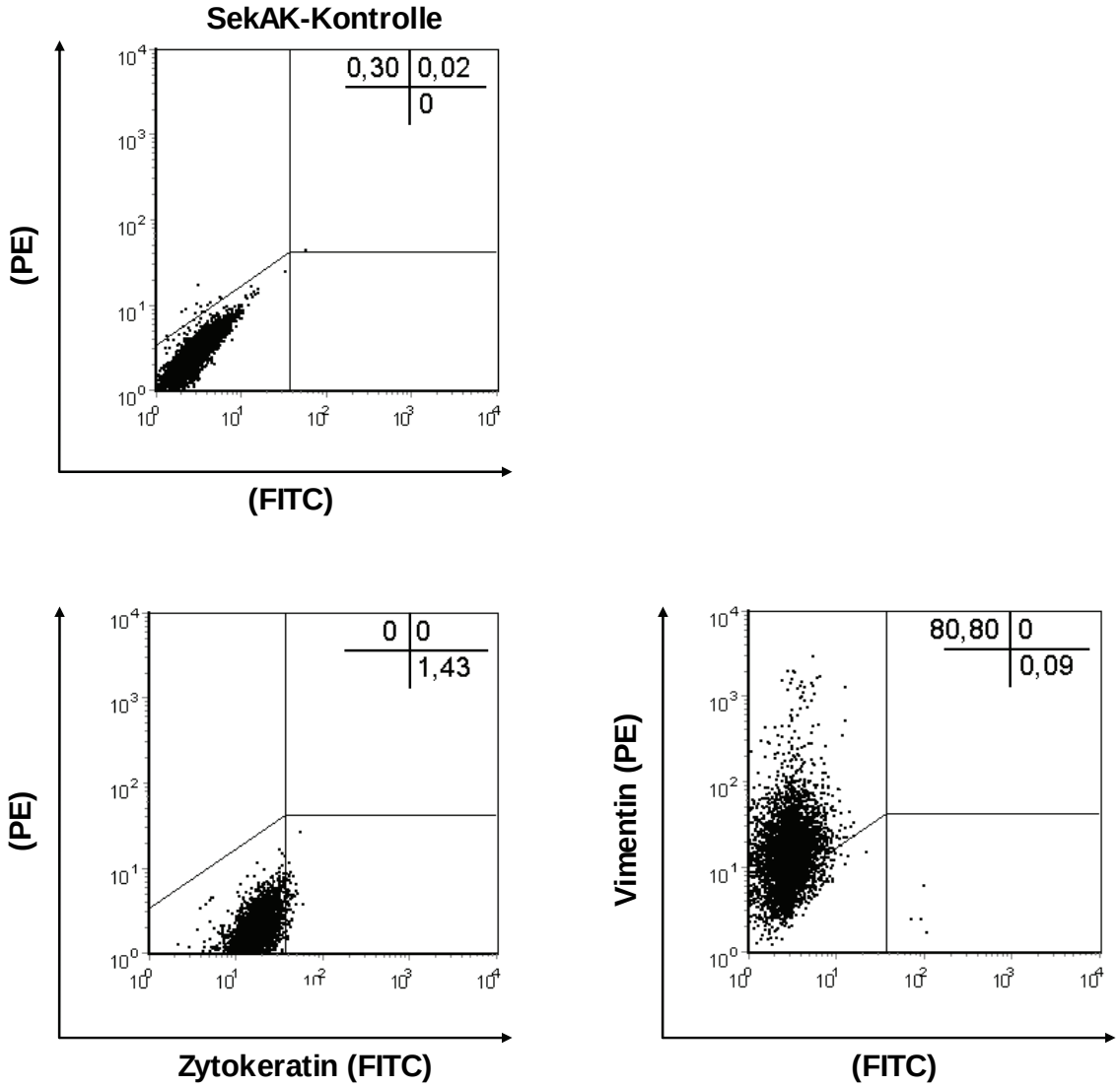


Abb. 48: Charakterisierung von Kolonzell-Klon 12 anhand der Zytoskelettausstattung

Durchflusszytometrische Analyse. Repräsentative Histogramme aus Dreifachbestimmungen. Zellen permeabilisiert. Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Sekundär-Antikörper (SekAk)-Kontrolle = Zellen nur mit Sekundär-Antikörper inkubiert.

3.1.2. Expression von Leitenzymen

Die Expression der ausgewählten Leitenzyme fiel bei den untersuchten Kolonzell-Klonen sehr uneinheitlich aus. Während alkalische Phosphatase und gamma-Glutamyltranspeptidase von allen Klonen exprimiert wurden, konnte bei Klon 6a weder Saccharase- noch Laktase-Aktivität festgestellt werden. Bei den Klonen 1 und 9a war keine Saccharase-Aktivität nachweisbar (Abb. 49). Im Vergleich mit den Primärkulturen boviner Kolonzellen (Kapitel 1.4.2) war bei den Klonen eine etwa 3-mal niedrigere Gesamtaktivität der gamma-Glutamyltranspeptidase festzustellen. Die Gesamtaktivitäten von alkalischer Phosphatase, Saccharase und Laktase hingegen wiesen keine deutlichen Unterschiede zu den bei den Primärkulturen boviner Kolonzellen gemessenen Enzymexpressionen auf.

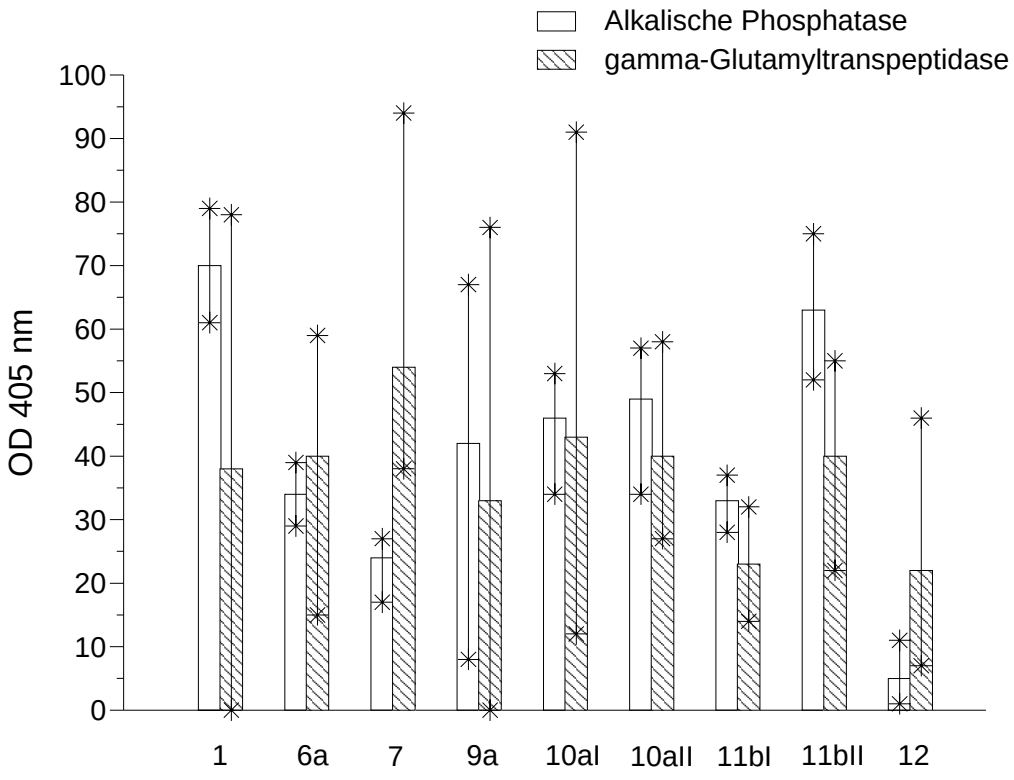
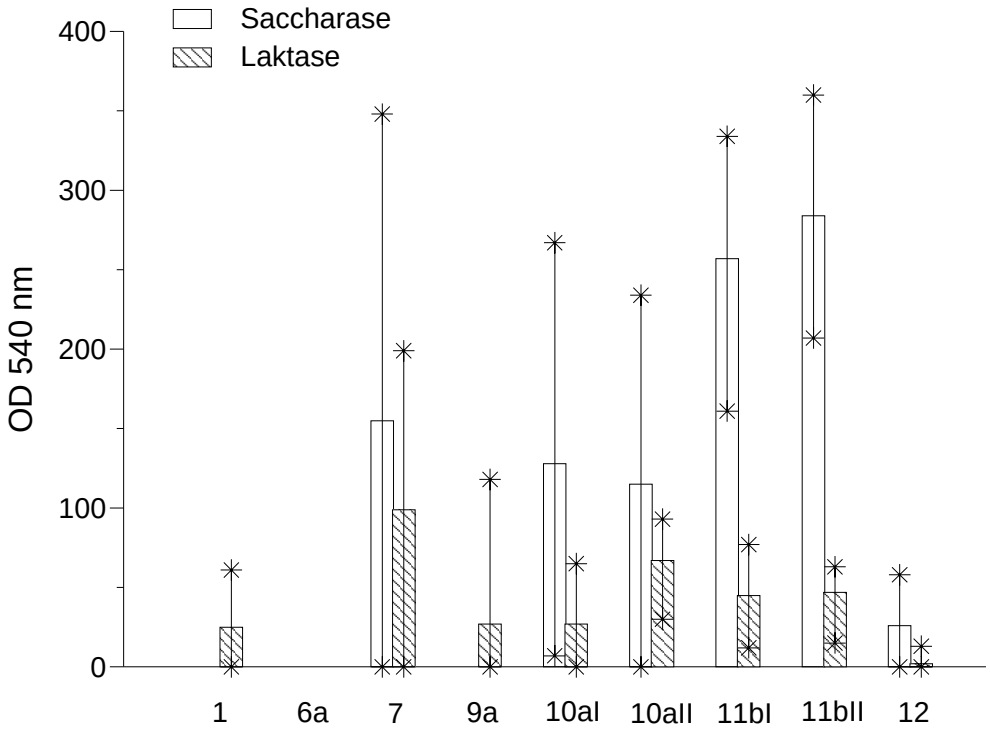


Abb. 49: Expression ausgewählter Leitenzyme bei mesenchymalen Kolonzell-Klonen

Mittelwerte sowie Minima und Maxima aus je 6 Bestimmungen eines bzw. dreier Versuche ohne zusätzliche Stimulation. Inkubationsdauer 72 h.



Fortsetzung Abb. 49

3.1.3. Fähigkeit zur Aufnahme von LDL

Die Fähigkeit zur Aufnahme von “Low density lipoproteins” (LDL) wurde am Beispiel von Kolonzell-Klon 12 vergleichend mit anderen Zelltypen untersucht. Als Positivkontrolle dienten primäre bovine Endothelzellen (BUVEC), von denen bekannt ist, dass sie LDL internalisieren (265), und als Negativkontrolle wurden primäre bovine Karunkelepithelzellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Philip Bridger, Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) verwendet, die kein LDL aufnehmen können.

Die Epithelzellen hatten erwartungsgemäß kein LDL aufgenommen. Bei den Endothelzellen hingegen waren im Fluoreszenzmikroskop deutliche Ansammlungen von rot (Cy-5) angefärbten LDL-Partikeln rund um die bläulich (DAPI) gefärbten Zellkerne zu sehen. Auch Kolonzell-Klon 12 konnte LDL internalisieren, jedoch unterschied sich das intrazelluläre Verteilungsmuster von dem bei den Endothelzellen beobachteten: Während die LDL-Partikel bei den Endothelzellen die Zellkerne kreisförmig umschlossen, konzentrierten sie sich bei den Zellen von Klon 12 bevorzugt an einem Pol und saßen kappenartig den Kernen auf (Abb. 50).

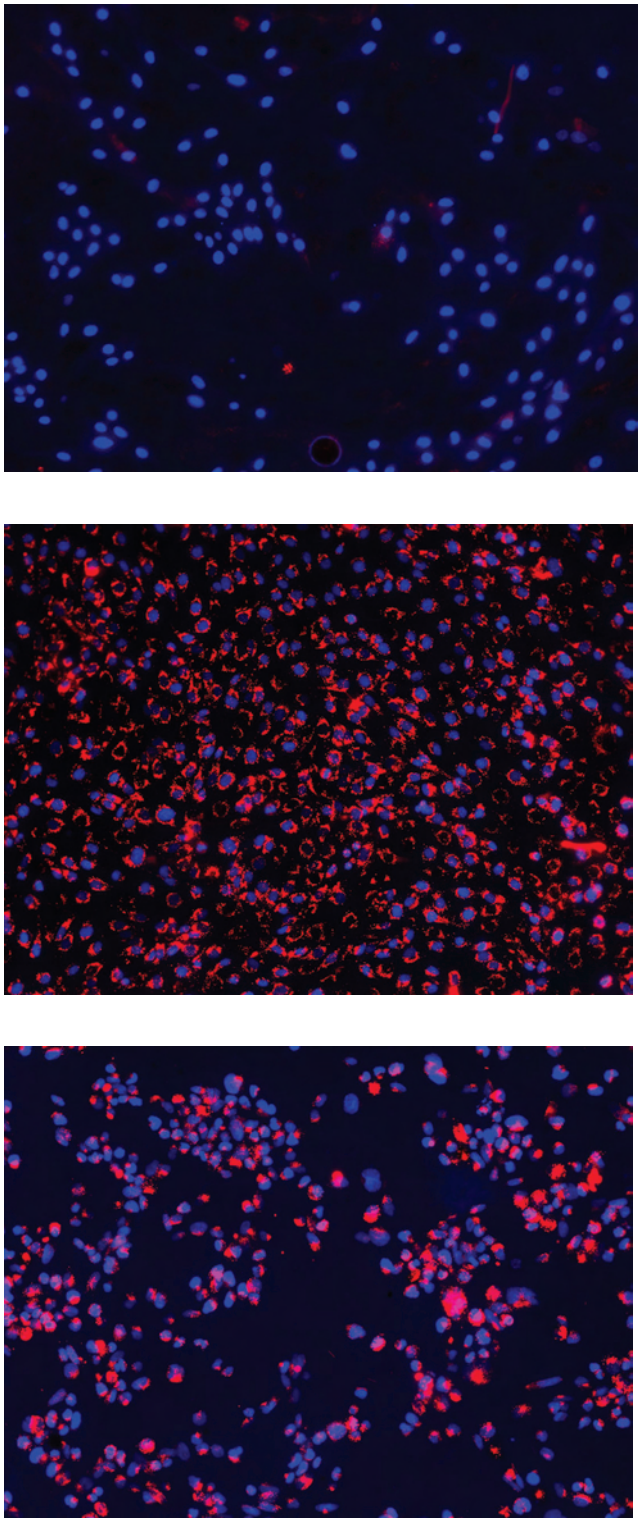


Abb. 50: LDL-Aufnahme bei verschiedenen Zellarten

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. LDL (rot), Kerne (blau). Vergrößerung 200-fach. Karunkelepithelzellen (oben), Endothelzellen (Mitte), Kolonzell-Klon 12 (unten).

3.1.4. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen

Das Vermögen zur Transkription bestimmter Zytokin- und Chemokingene wurde am Beispiel von Kolonzell-Klon 12 untersucht. Ohne LPS-Stimulation lag die Menge an mRNA für die Gene *il-8*, *gro-α* und *tgf-β* sowohl nach 4- als auch nach 24-stündiger Inkubation im Mittel unter 1 % der im selben PCR-Lauf quantifizierten Menge an mRNA für das „House keeping"-Gen *gapdh*. Für *il-10* und *il-12* gelang der Nachweis nur einmal bei drei Versuchen. Die ermittelten Werte lagen alle unter 0,0001 %. Die verhältnismäßig größte mRNA-Menge produzierte Kolonzell-Klon 12 für MCP-1 und RANTES. Bei allen Zytokin- bzw. Chemokingenen außer *rantes* und *il-12* fand eine Steigerung der gebildeten mRNA-Menge im Zeitraum nach 4 bis 24 Stunden Inkubation statt. IP-10-mRNA war in den durchgeführten Untersuchungen nicht nachweisbar.

Wurden die Zellen mit LPS stimuliert, so kam es im Vergleich zum unstimulierten Zustand allgemein zu einer Steigerung der Zytokin- bzw. Chemokingentranskription, wobei nach 24 Stunden wiederum mehr mRNA gemessen wurde als nach 4 Stunden. Lediglich die mRNA-Produktion für RANTES verringerte sich nach 4stündiger Inkubation im Vergleich zu den Ansätzen ohne LPS-Stimulation. IL-10- und IL-12-mRNA konnte in allen drei Versuchen mit LPS nachgewiesen werden, wobei der Klon auf die Stimulation mit einer sehr viel stärkeren Erhöhung der IL-12-mRNA reagierte. Für IP-10 konnte wieder keine spezifische mRNA nachgewiesen werden (Abb. 51).

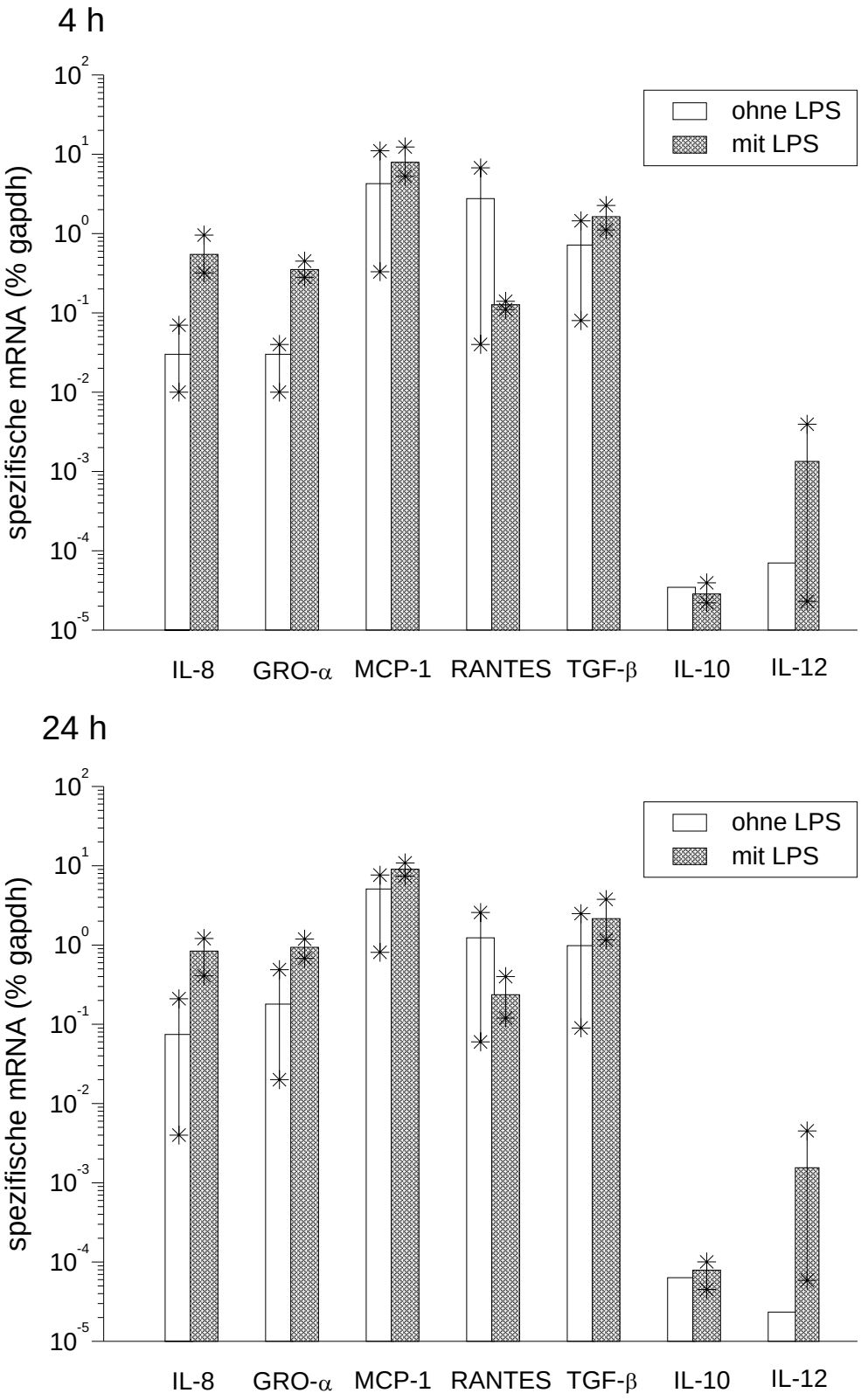


Abb. 51: Zytokin- und Chemokingentranskription durch Zellen des Kolonzell-Klons 12

Mittelwerte, Minima und Maxima aus je 3 unabhängigen Versuchen nach 4 bzw. 24 h Inkubation mit und ohne LPS-Stimulation (25 µg/ml) bezogen auf *gapdh* in %. Bei den Versuchen ohne LPS konnte nur einmal mRNA für IL-10 und IL-12 detektiert werden.

3.1.5. Expression von CD77 und anderer Oberflächenmarker

Bei der durchflusszytometrischen Analyse war CD77 auf der Oberfläche verschiedener Kolonzell-Klone unterschiedlich stark nachweisbar.

Von den insgesamt 10 untersuchten Kolonzell-Klonen wies Klon 12 sowohl in nativem als auch in fixiertem und permeabilisierten Zustand eine deutlich höhere CD77-Expression auf als alle anderen. Am deutlichsten war der Unterschied in der Oberflächenexpression des Rezeptors zu sehen, die sich ohne LPS-Stimulation zwischen 2,36 und maximal 16,19 % der vitalen Zellen bewegte, bei Klon 12 aber Werte von über 50 % erreichte. Nach Inkubation mit LPS konnte außer bei zwei Klonen im nativen und bei einem Klon im fixierten und permeabilisierten Zustand eine Reduzierung der Rezeptorexpression nachgewiesen werden (Tab. 14).

In den Abbildungen 52 und 53 sind repräsentative Histogramme des Kolonzell-Klons 11bII als Beispiel für die niedrigste Shigatoxin-Rezeptorexpression und von Kolonzell-Klon 12 als Beispiel für die höchste Shigatoxin-Rezeptorexpression vergleichend dargestellt.

Fluoreszenzmikroskopische Präparate zeigten, dass sich die Rezeptoren in hoher Dichte auf der Zelloberfläche von Klon 12 verteilten (Abb. 54).

Tab. 14: CD77-Expression der mesenchymalen Kolonzell-Klone

Durchflusszytometrische Analyse, Mittelwerte und Standardabweichungen der positiven Zellen in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen, jeweils Dreifachbestimmungen.
Inkubationszeit 72 h. c(LPS): 25 µg/ml.

	nativ		fixiert/permeabilisiert	
	CD77		CD77	
Klon	ohne LPS	mit LPS	ohne LPS	mit LPS
1	16,2 (±1,2)	12,2 (±0,6)	87,4 (±2,2)	65,8 (±2,7)
6a	2,7 (±0,2)	2,1 (±0,4)	82,9 (±1,3)	68,1 (±2,0)
7	2,4 (±0,6)	2,0 (±0,1)	84,2 (±1,0)	71,7 (±1,7)
8II	5,4 (±0,7)	6,6 (±0,6)	69,8 (±0,5)	56,9 (±3,7)
9a	5,6 (±0,6)	4,7 (±0,6)	80,3 (±3,1)	64,3 (±3,5)
10aI	9,8 (±1,0)	10,3 (±2,0)	77,9 (±3,9)	62,0 (±4,4)
10aII	4,0 (±0,6)	3,4 (±0,3)	41,9 (±6,0)	18,1 (±4,3)
11bI	8,2 (±1,3)	3,3 (±0,5)	94,0 (±0,9)	31,1 (±2,3)
11bII	8,3 (±1,3)	2,4 (±0,5)	15,7 (±4,1)	18,7 (±7,2)
12	**47,5 (±1,2)**	**40,1 (±2,0)**	**93,9 (±1,1)**	**82,2 (±8,5)**

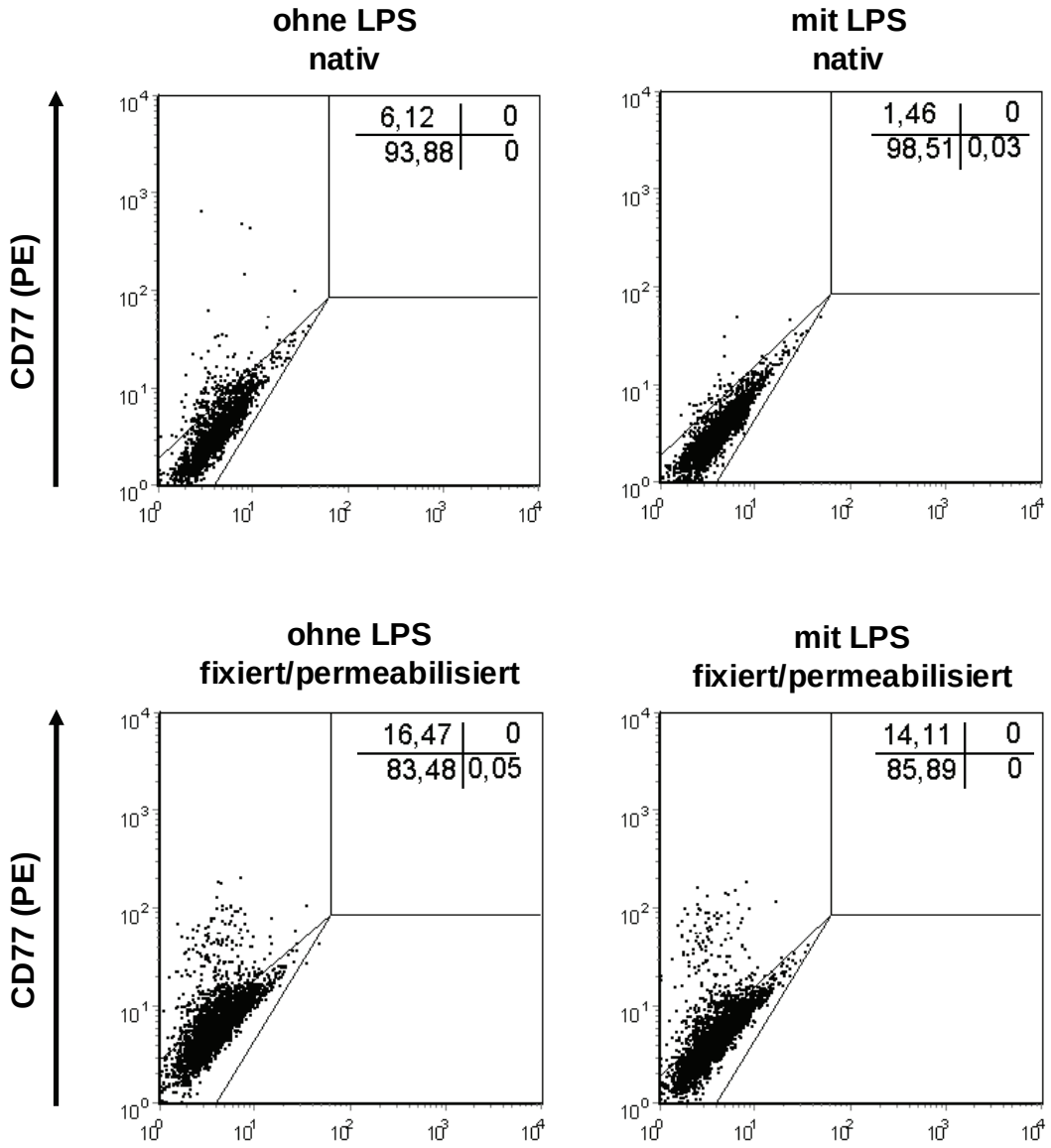


Abb. 52: CD77-Gehalt von Zellen des Kolonzell-Klons 11bII

Repräsentative Histogramme aus Dreifachbestimmungen. Zellen nativ bzw. fixiert und permeabilisiert. Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Inkubationszeit 72 h. c(LPS): 25 µg/ml.

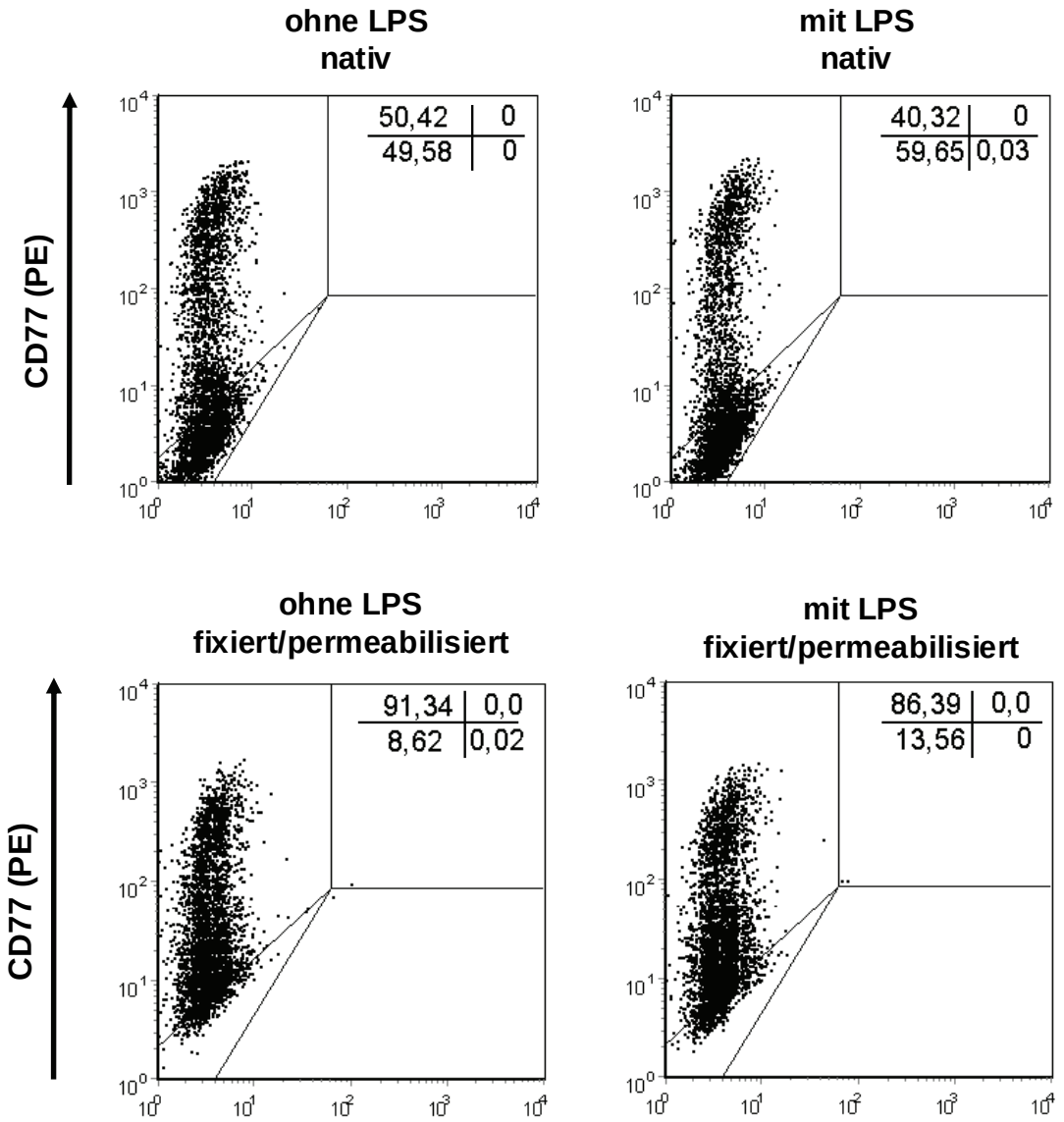


Abb. 53: CD77-Gehalt von Zellen des Kolonzell-Klons 12

Repräsentative Histogramme von Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Zellen nativ bzw. fixiert und permeabilisiert. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Inkubationszeit 72 h. c(LPS): 25 µg/ml.

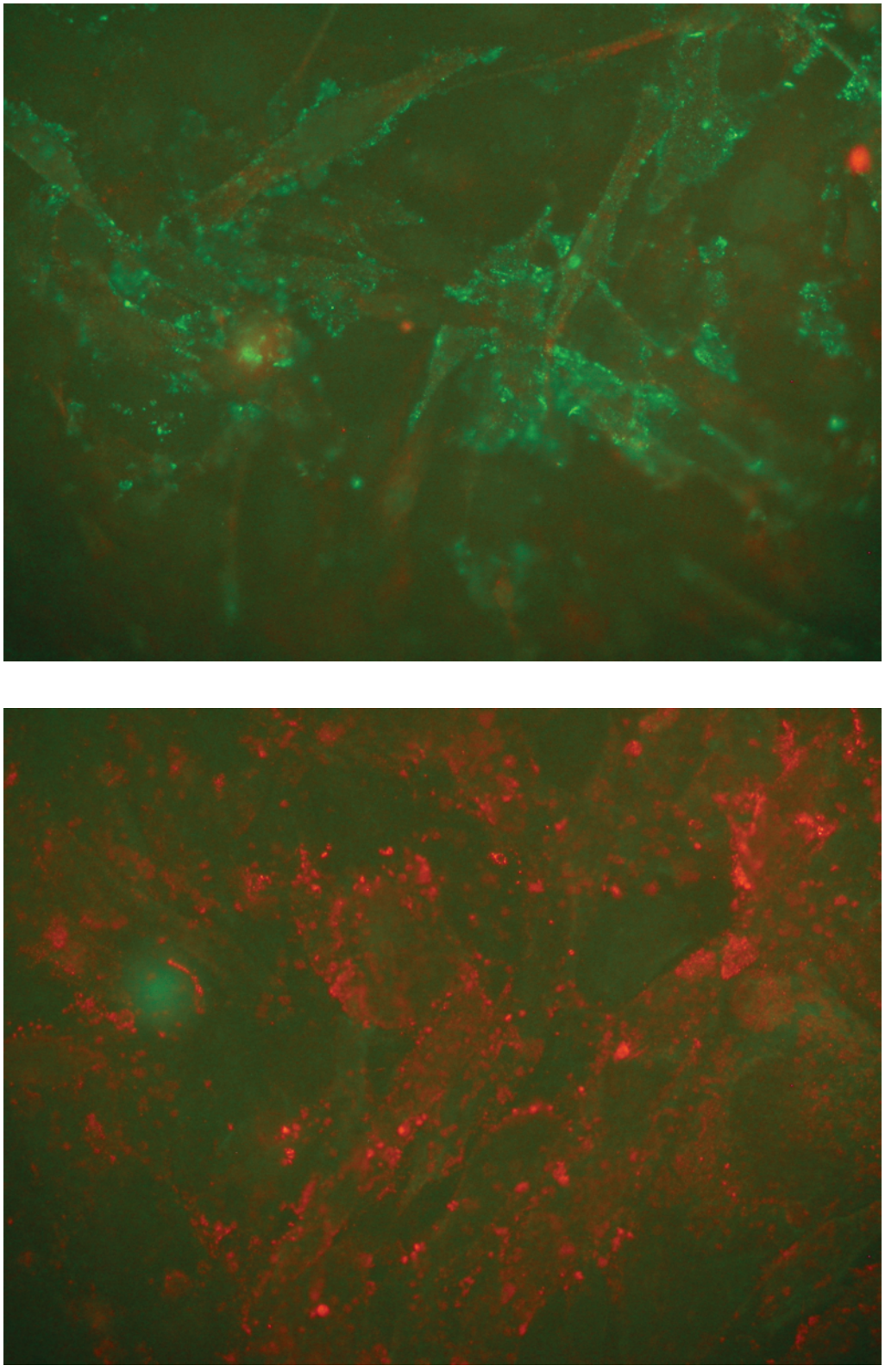


Abb. 54: CD77-Expression bei Kolonzell-Klon 12

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Vergrößerung 400-fach.

Oben: CD77 (grün), Vimentin (rot); unten: CD77 (rot), Vimentin (grün).

Da der Kolonzell-Klon 12 hinsichtlich seiner reichen Ausstattung mit CD77 den primären Kolonmesenchymzellen (Kapitel 2) am ähnlichsten war, wurde er für die anschließende Untersuchung der Expression anderer Oberflächenmarker ausgewählt. Die durchflusszytometrische Phänotypisierung enthüllte, dass die Zellen des Kolonzell-Klons 12 ebenfalls positiv für MHC I sowie für die Monozyten-/Makrophagenmarker CD14 und CD172a waren. Ein geringer Prozentsatz der Zellen exprimierte das auf Monozyten und DCs verbreitete CD80. Eindeutig negativ dagegen zeigte sich Klon 12 für CD86, welches ebenfalls auf Monozyten und dendritischen Zellen vorkommt sowie für den Leukozytenmarker CD11a. Ebenso nicht detektierbar waren CD11b und CD11c, die auf Granulozyten, Monozyten und DCs zu finden sind, sowie CD21, welches auch auf DCs vorkommt. Auch die für Antigen-präsentierende Zellen typischen Oberflächenmarker MHC II DQ und MHC II DR, sowie die Aktivierungsmarker ACT-2, CD25 (IL-2-Rezeptor) und CD71 (Transferrin-Rezeptor) wurden nicht von den Zellen exprimiert (Abb. 55).

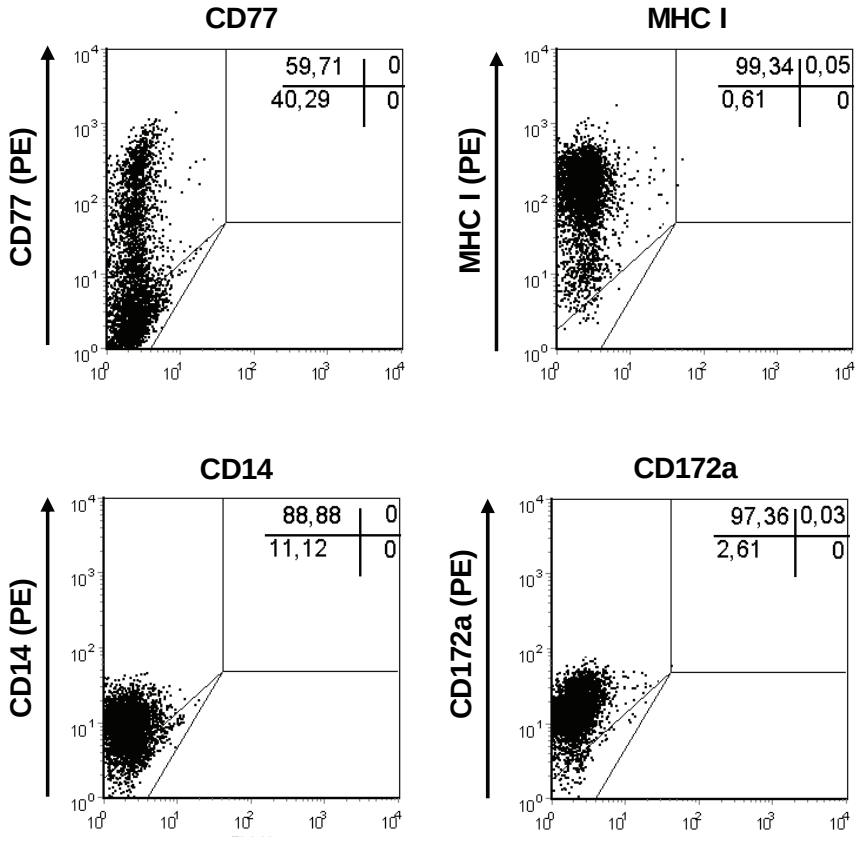
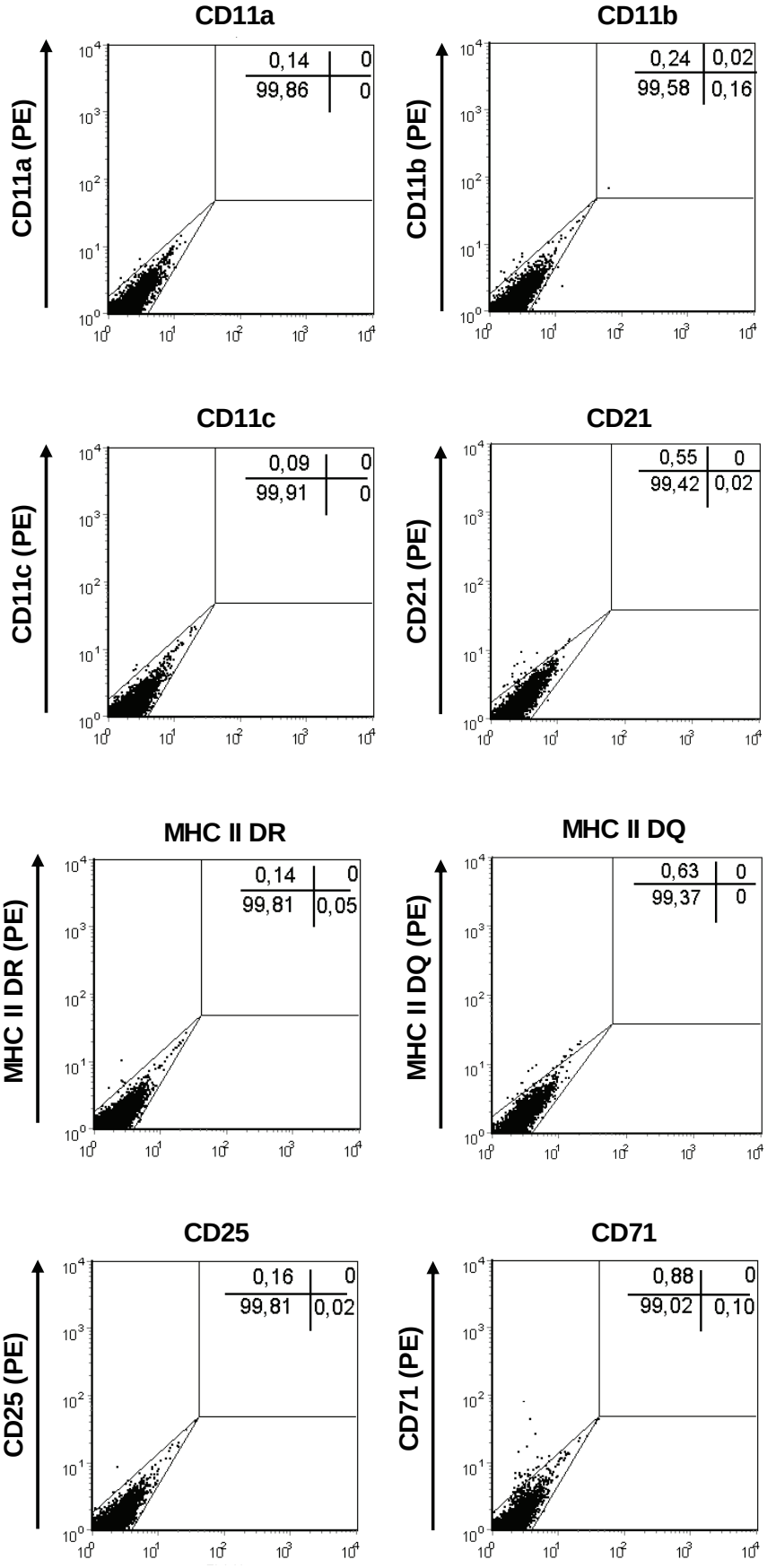
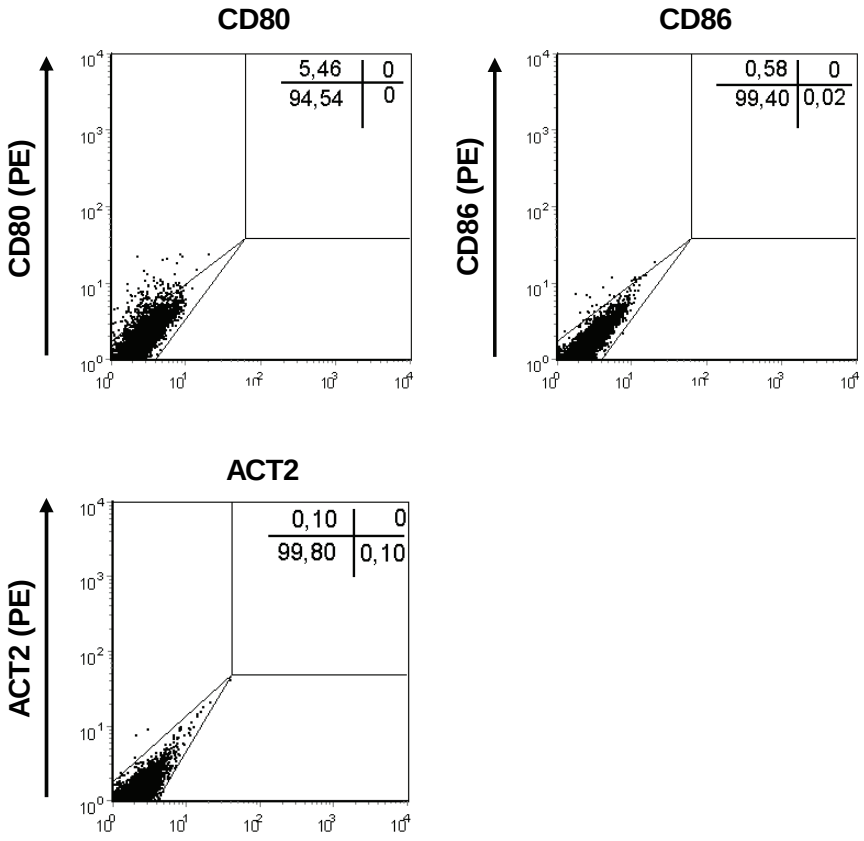


Abb. 55: Oberflächenexpression ausgewählter Marker durch Kolonzell-Klon 12

Repräsentative Histogramme der Doppelbestimmungen aus 1, 2 oder 3 unabhängigen Versuchen, Zellen nativ, Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen.



Fortsetzung Abb. 55



Fortsetzung Abb. 55

3.2. Wirkung von Shigatoxin 1 auf funktionelle Parameter des mesenchymalen Kolonzell-Klons 12

3.2.1. Stoffwechselaktivität

Die Inkubation mit LPS beeinflusste die Stoffwechselaktivität der Zellen des Kolonzell-Klons 12 nicht, wie der Vergleich der absoluten OD-Werte der Negativkontrollen mit und ohne LPS-Stimulation zeigte (nicht dargestellt).

Unabhängig von der Anwesenheit von LPS übte Stx jedoch eine reduzierende Wirkung auf die Stoffwechselaktivität der Zellen des Kolonzell-Klons 12 aus. Dieser Effekt ließ sich allerdings nicht durch den monoklonalen Antikörper 13C4 neutralisieren (Abb. 56).

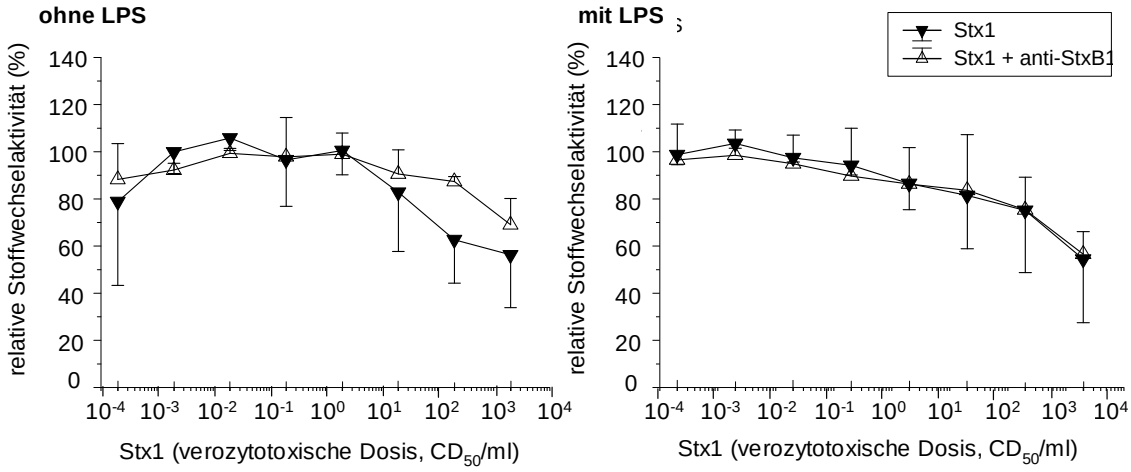


Abb. 56: Wirkung von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität von Zellen des Klons 12

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Dreifachansätze von 2 unabhängigen Versuchen in An- und Abwesenheit von LPS; c(Stx1): 2000 CD_{50}/ml log 10 titriert, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml konstant, c(LPS): 25 µg/ml, Inkubationsdauer 72 h. Mit der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte kein signifikanter Effekt des Stx1 festgstellt werden.

3.2.2. Expression von CD77

Unter der Wirkung von Stx1 verringerte sich die Anzahl der Zellen des Kolonzell-Klons 12, die CD77 auf ihrer Oberfläche exprimierten, um das 4- bis 5fache im Vergleich zu den Ansätzen ohne Stx1 bzw. mit Stx1 und anti-StxB1. Die Stimulation mit LPS beeinflusste diesen Effekt nicht. Wurden die Zellen nach Einwirkung des Stx permeabilisiert und zusätzlich zum oberflächlichen auch der intrazelluläre Gehalt an CD77 bestimmt, zeigte sich, dass die durch Stx1 vermittelte Reduzierung der Anzahl CD77-positiver Zellen insgesamt sehr viel schwächer ausfiel (Abb. 57).

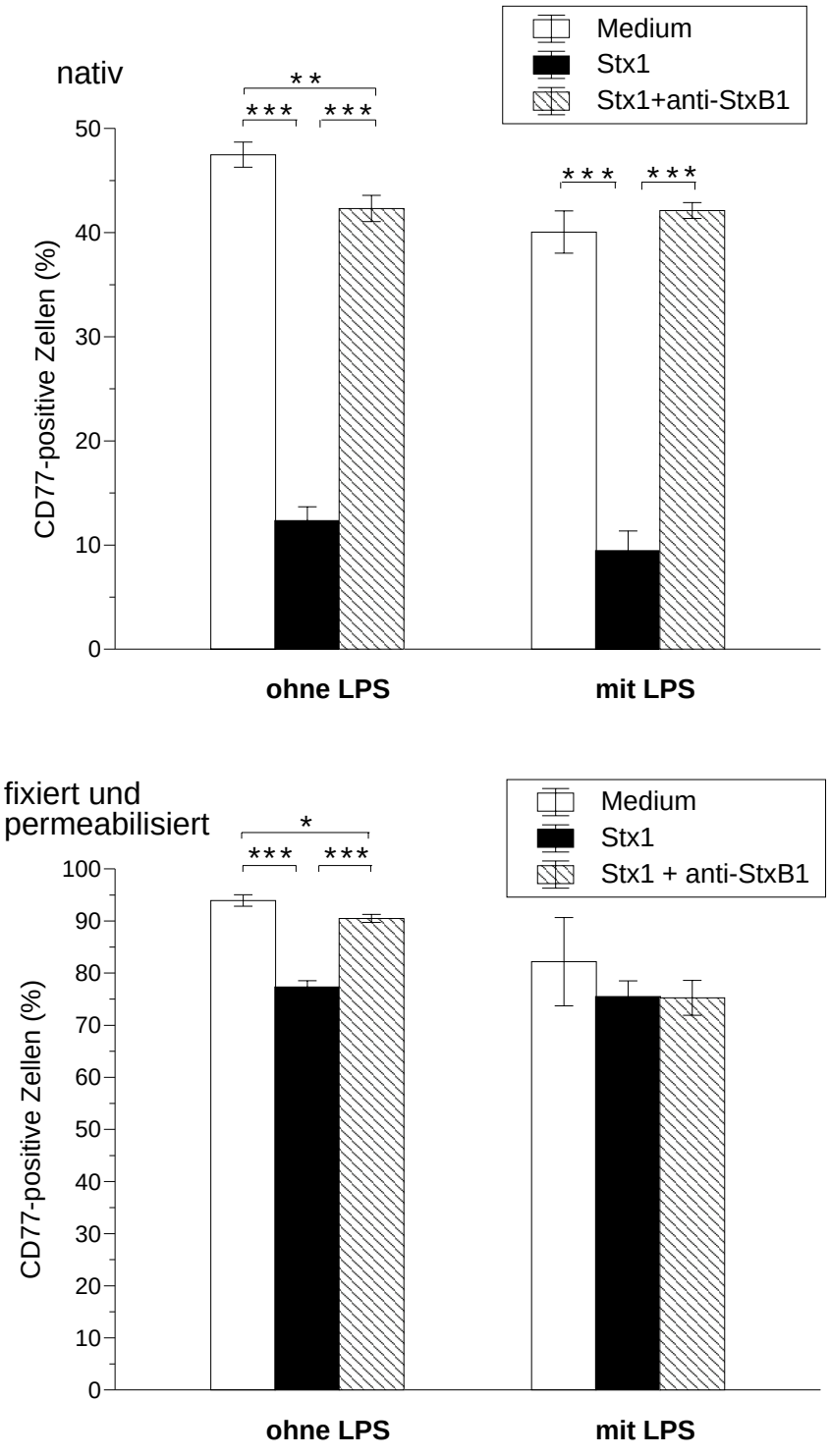


Abb. 57: Einfluss von Stx1 auf die CD77-Expression von Zellen des Kolonzell-Klons 12

Durchflusszytometrische Analyse. MW und SD aus Dreifachbestimmungen, Zellen nativ bzw. fixiert und permeabilisiert. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. c (Stx1): 200 CD_{50}/ml, c (anti-StxB1): 1,5 µg/ml, c (LPS): 25µg/ml. Inkubationszeit 72 h. Die statistische Auswertung mit dem t-Test nach Student ergab: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***).

3.2.3. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen

Um die Zellen des Kolonzell-Klons 12 im Vergleich mit primären bovinen Kolonzellen zu charakterisieren, wurde auch hier der Einfluss von Stx1 auf die Transkription von Zytokin- und Chemokingenen untersucht. Innerhalb der sechs durchgeführten Versuche kam es hinsichtlich der detektierten Menge an mRNA zu großen Schwankungen, die Tendenz für jedes Gen blieb grundsätzlich jedoch gleich. Es zeigte sich, dass sich die mRNA-Transkription für das Chemokin MCP-1 unter dem Einfluss von Stx1 nach 4 Stunden in ähnlicher Weise erhöhte, wie es bereits bei den Primärkulturen boviner Kolonzellen demonstriert worden war (Kapitel 2.4). Darüber hinaus aber führte Stx1 sowohl nach 4- als auch nach 24-stündiger Inkubation bei dem Kolonzell-Klon12 zu einem beträchtlichen Anstieg in der mRNA-Produktion für die Chemokine IL-8, GRO-α und RANTES. Keinen Einfluss dagegen hatte Stx1 auf die Transkription von *tgf-β*, *il-10* und *il-12*. Von den drei ohne LPS-Stimulation durchgeführten Versuchen gelang nur bei einem der Nachweis von IL-10- und IL-12-mRNA, während diese bei den beiden anderen Versuchen nicht detektiert werden konnten.

Wurden die Zellen mit LPS stimuliert, steigerte sich die in Gegenwart von Stx1 beobachtete Induktion der Chemokingentranskription um das 2- bis 6-fache. Bei *rantes* trat ein Steigerungseffekt nur bei den 24 Stunden-Werten auf. Im Gegensatz zum unstimulierten Zustand produzierten die Zellen in Anwesenheit von LPS unter dem Einfluss von Stx1 vermehrt IL10-mRNA (Abb. 58).

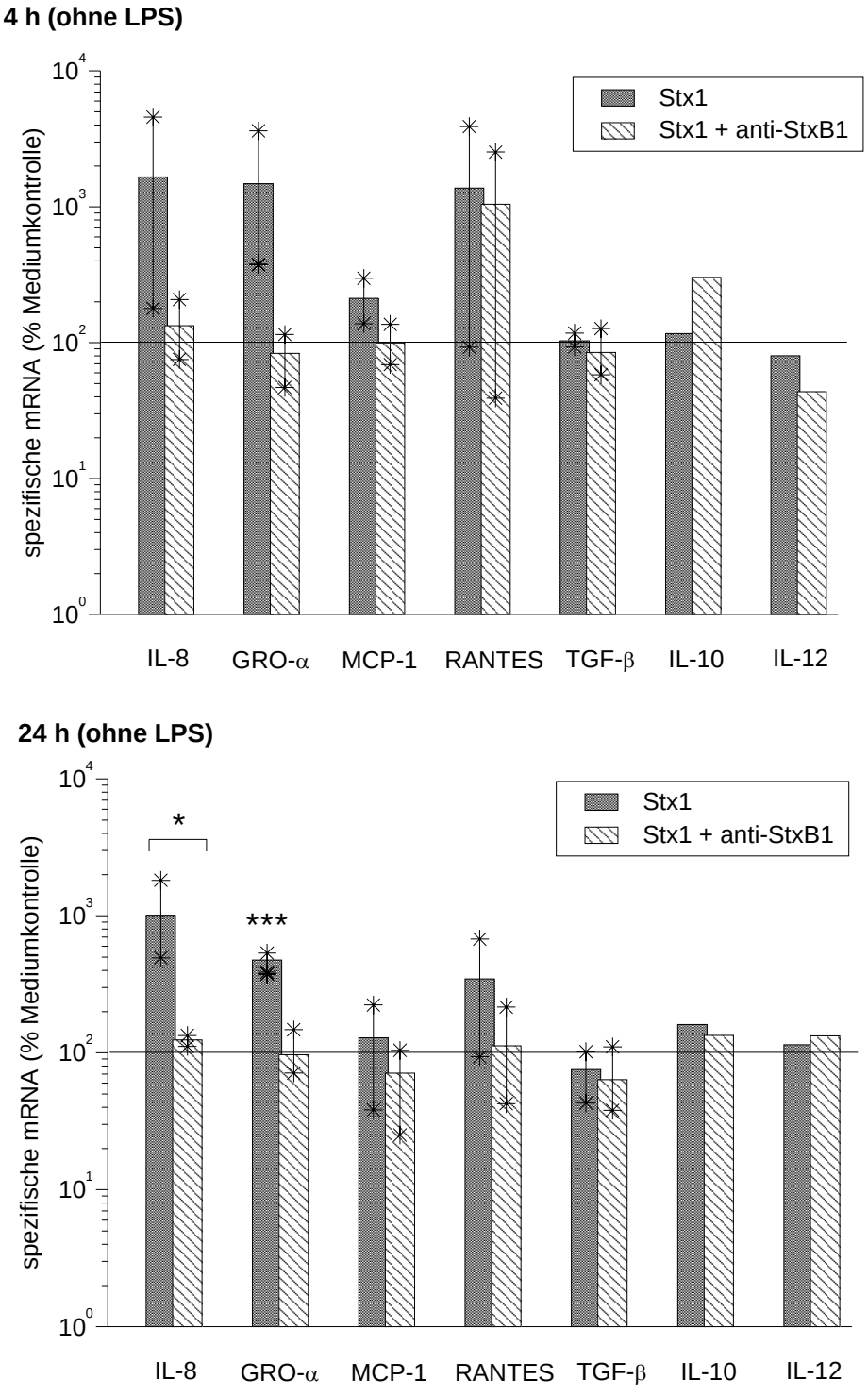
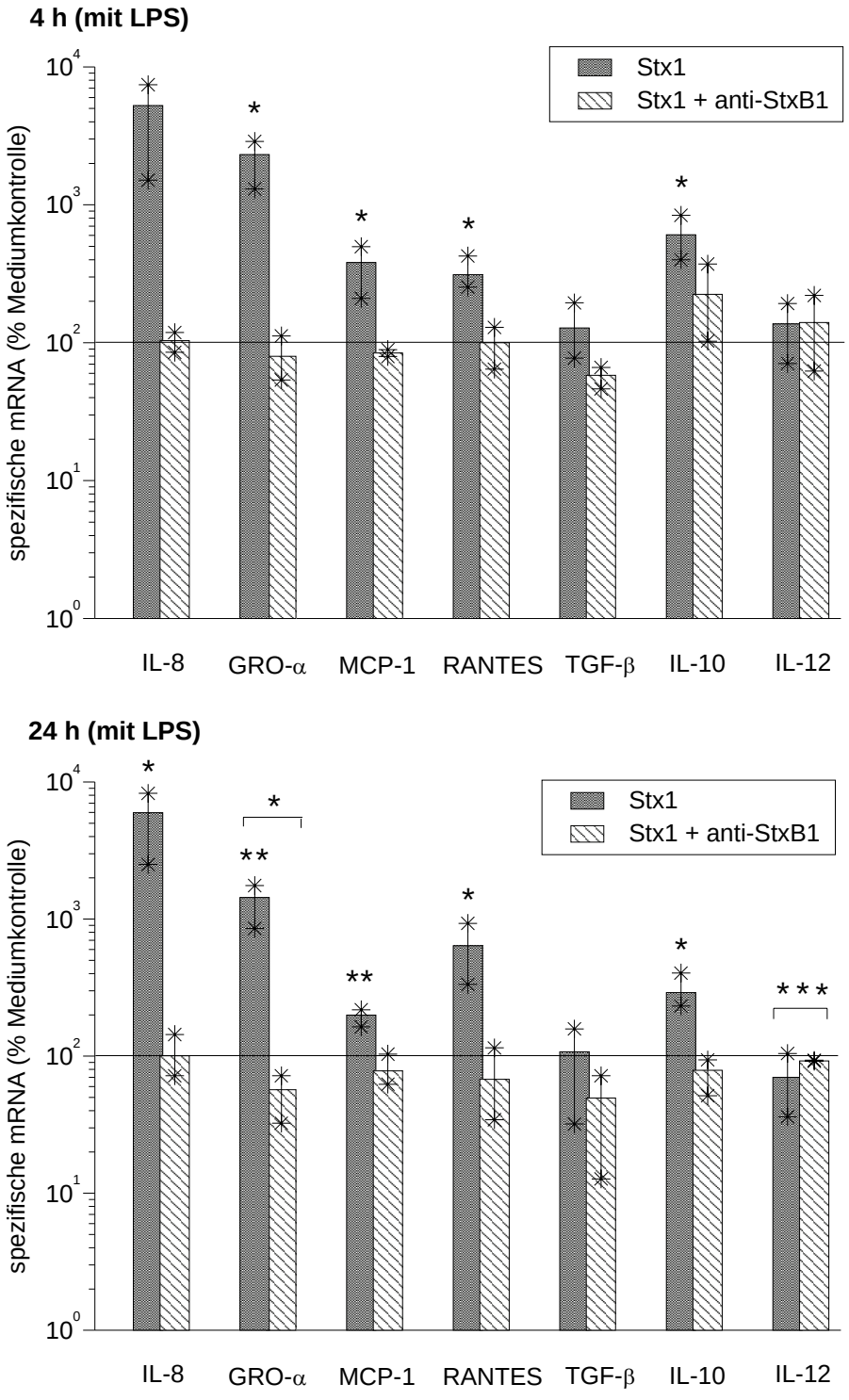


Abb. 58: Effekt von Stx1 auf die Zytokin- und Chemokingentranskription von Zellen des Kolonzell-Klons 12

Mittelwerte, Minima und Maxima von drei unabhängigen Versuchen nach 4 bzw. 24 Stunden Inkubation mit und ohne LPS-Stimulation (IL-10/IL-12: mRNA nur bei 1 von 3 Versuchen ohne LPS nachweisbar); c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml. Die Linie markiert 100 % Mediumkontrolle. Die statistische Auswertung mit dem t-Test nach Student ergab: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***).



Fortsetzung Abb. 58

3.2.4. Freisetzung chemoattraktiver Substanzen

Um zu überprüfen, ob die Induktion der Chemokingenexpression unter dem Einfluss von Stx1 (Kapitel 3.2.3) bei Kolonzell-Klon 12 mit der vermehrten Produktion von Chemokinen korrelierte, wurde der Einfluss konditionierter Zellkulturüberstände des Kolonzell-Klones 12 auf das Migrationsverhalten boviner Granulozyten untersucht.
Die im Mittel im Vergleich zur Negativkontrolle (unkonditioniertes Medium) erhöhte Migrationsaktiviät der Granulozyten in Gegenwart aller konditionierten Kolonzell-Klon-Überstände sprach dafür, dass die Zellen des Kolonzell-Klons 12 grundsätzlich dazu befähigt waren, chemotaktische Botenstoffe in das Zellkulturmedium zu entlassen (Abb. 59). Dabei war eine leichte Steigerung der Migrationsaktivität bei den für 24 Stunden konditionierten Überständen erkennbar. Allerdings konnte keine durch Stx1 bewirkte veränderte Freisetzung von chemotaktischen Botenstoffen für bovine Granulozyten festgestellt werden. Dies galt auch, wenn während der Konditionierung des Mediums LPS zugegeben worden war.

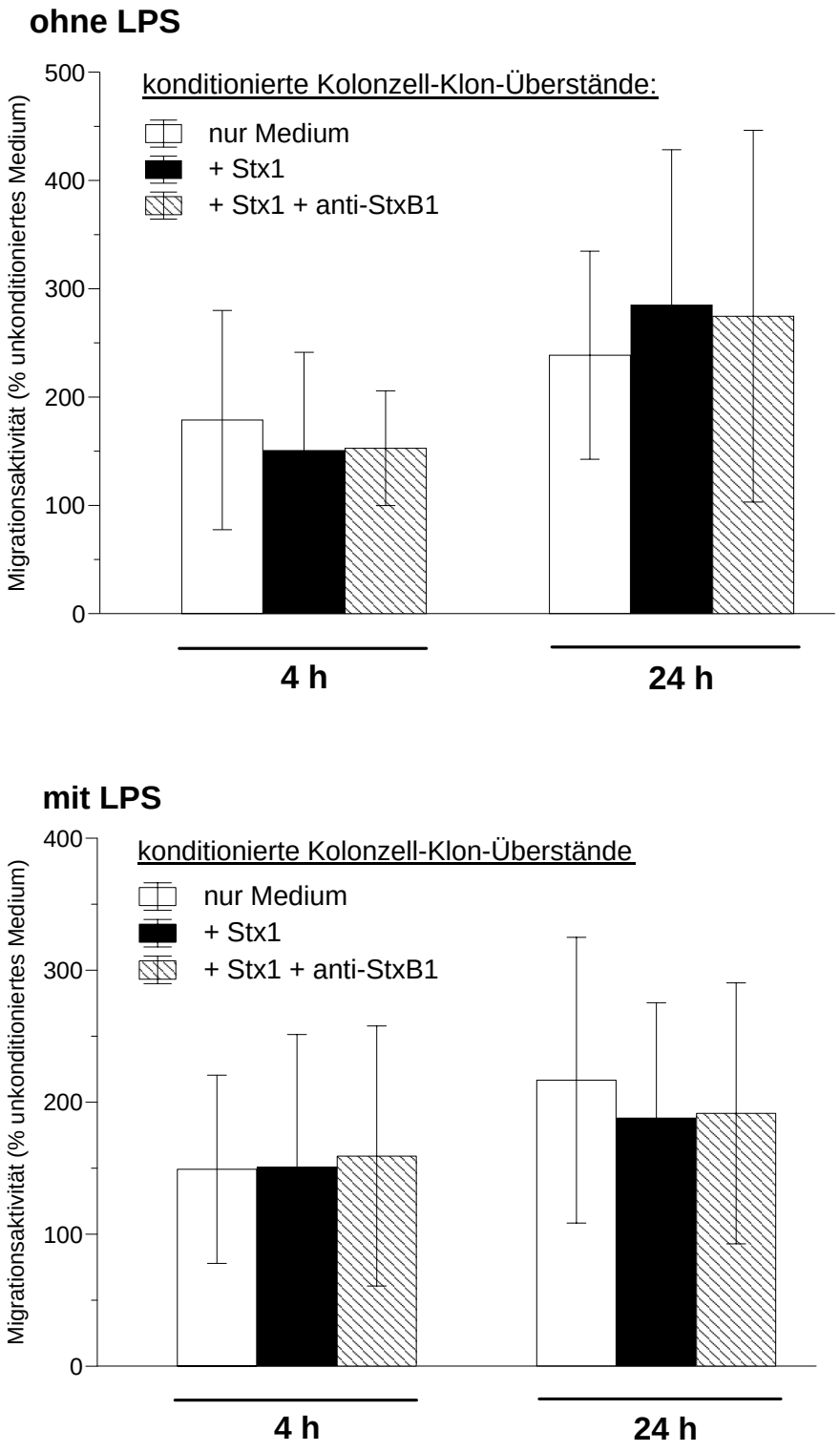


Abb. 59: Einfluss von Stx1 auf die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen bei Kolonzell-Klon 12

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Studien mit drei unabhängigen, für 4 bzw. 24 h konditionierten Zellkulturüberständen in An- (unten) und Abwesenheit (oben) von LPS (25µg/ml); c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml.

4. Vergleichende Untersuchungen an Endothelzellen

Vor dem Hintergrund, dass sich die Abstammung der mesenchymalen Kolonzellen mit CD77-Expression mit den hier angewandten Methoden nicht eindeutig bestimmen liess, wurden vergleichende Untersuchungen an primären Nabelschnur-Endothelzellen von Kälbern (BUVEC) durchgeführt, um die bei der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung der Kolonzell-Klone gewonnenen Erkenntnisse im Vergleich mit eindeutig identifizierten Zellarten interpretieren zu können.

4.1. Zytoskelettausstattung, Expression des Shigatoxin-Rezeptors und anderer Oberflächenmarker

Bei der Untersuchung der Zytoskelettausstattung zeigten sich die BUVEC erwartungsgemäß negativ für den Epithelzellmarker Zytokeratin. Alle Zellen exprimierten hingegen Vimentin (Abb. 60).

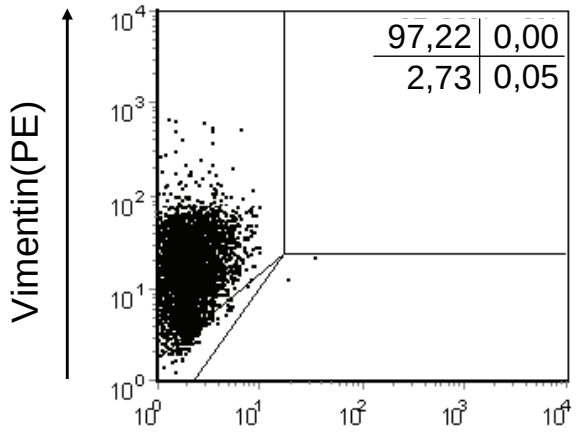


Abb. 60: Charakterisierung von BUVEC anhand der Zytoskelettausstattung

Repräsentatives Histogramm einer Doppelbestimmung. Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Zellen fixiert und permeabilisiert.

Die CD77-Expression konnte auf der Oberfläche von rund 8 % der unstimulierten nativen BUVEC nachgewiesen werden und steigerte sich auf rund 88 %, wenn die Zellen mit LPS stimuliert wurden. Dieser Steigerungseffekt durch LPS ließ sich auch

beim Nachweis der intrazellulären Rezeptorexpression beobachten. Nach Fixation und Permeabilisation waren rund 60 % der unstimulierten BUVEC positiv für CD77. Ging der Fixation und Permeabilisation die Stimulation mit LPS voraus, erhöhte sich der CD77-Nachweis auf nahezu 95 % (Abb. 61).

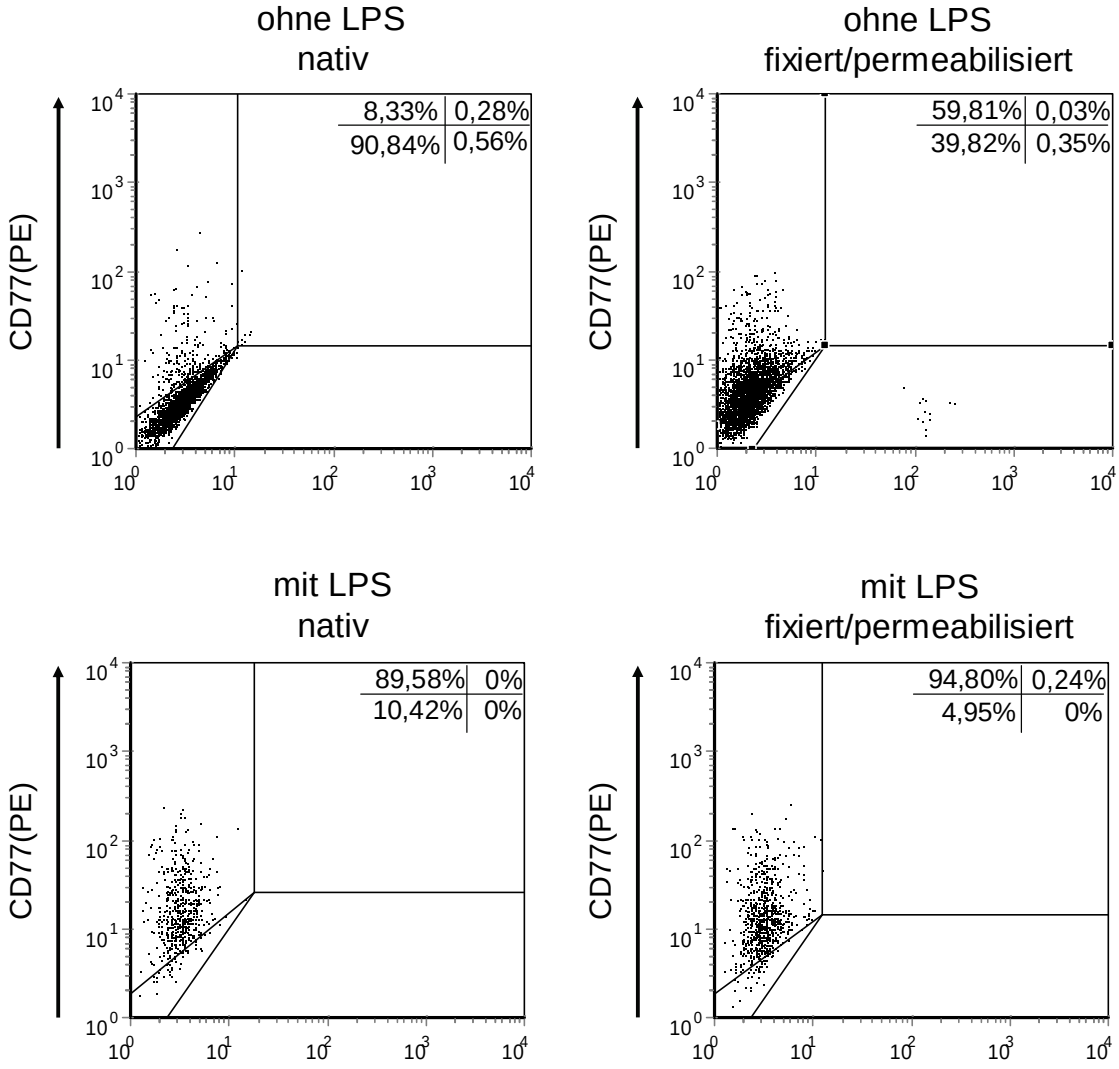


Abb. 61: CD77-Expression bei BUVEC

Repräsentative Histogramme aus Doppelbestimmungen. Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Zellen nativ bzw. fixiert und permeabilisiert in An- und Abwesenheit von LPS (100 ng/ml). Inkubationszeit 72 h nach Erreichen der Subkonfluenz. n=1

Die Untersuchung der BUVEC auf die Expression ausgewählter Oberflächenmarker ergab, dass diese Endothelzellen weder CD172a noch CD11b oder CD11c exprimierten (nicht gezeigt). Allerdings zeigten sie sich zu rund 58 % positiv für die Expression von MHC II DR (Abb. 62).

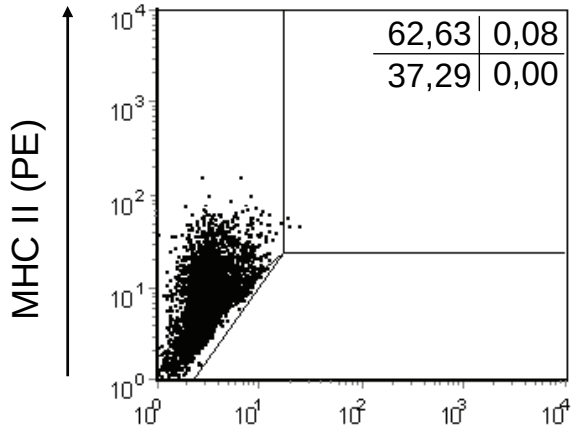


Abb. 62: MHC II-Oberflächenexpression bei BUVEC

Repräsentatives Histogramm einer Doppelbestimmung. Angaben in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen. Zellen nativ.

4.2. Transkription von Zytokin-, Chemokin- und Adhäsionsmolekülgenen

Ohne LPS-Stimulation betrug die mRNA-Transkription für TGF-β und P-Selektin im Mittel 4 % und für MCP-1 und ICAM-1 2 % bezogen auf *gapdh*. Alle anderen untersuchten Gene lagen unter 1 % der Menge an mRNA für *gapdh*. Für IP-10, IL-10 und IL-12 konnte keine mRNA-Transkription nachgewiesen werden.

Die Stimulation mit LPS führte außer bei *tgf-β* zu einer Steigerung der mRNA-Produktion bei allen Genen. In geringen Mengen konnte nun auch mRNA für IP-10 und IL-12 ermittelt werden. IL-10-mRNA war allerdings auch unter LPS-Stimulation nicht nachweisbar (Abb. 63).

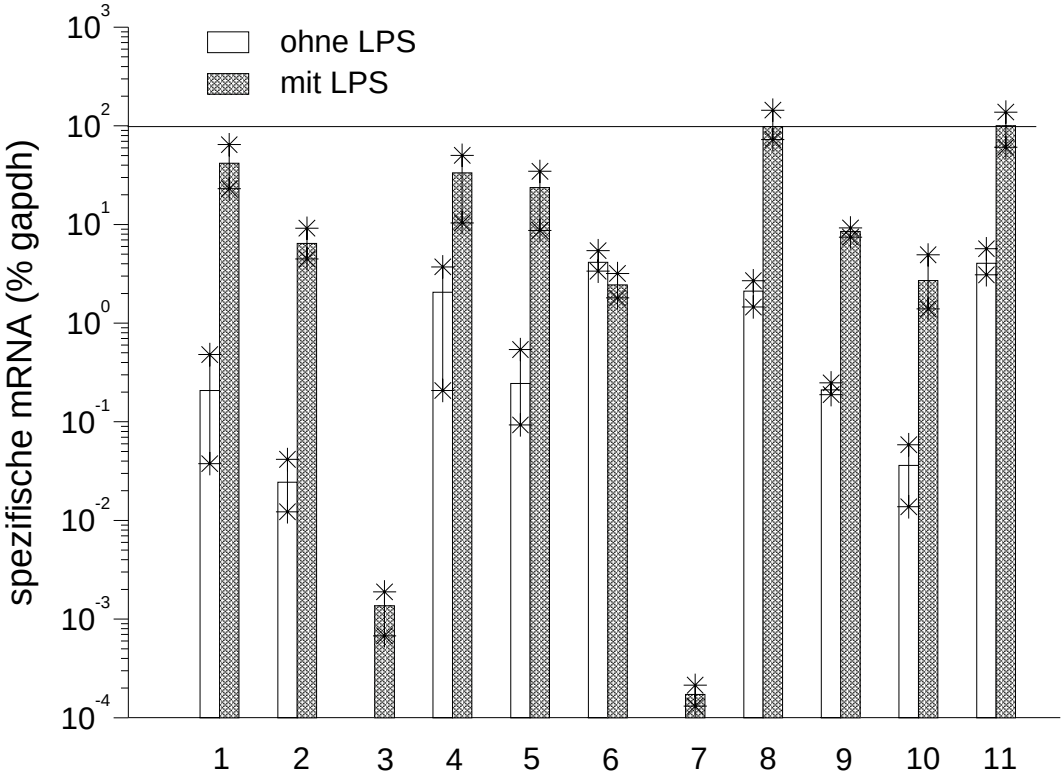


Abb. 63: Zytokingen- und Adhäsionsmolekülgen-Transkription durch BUVEC

Dargestellt sind Mittelwerte, Minima und Maxima von 3 unabhängigen Präparationen mit und ohne LPS (10 ng/ml) nach 4 h Inkubation bezogen auf *gapdh* in %. Die Linie markiert 100 % *gapdh.*

1 = IL-8

2 = GRO-α

3 = IP-10

4 = MCP-1

5 = RANTES

6 = TGF-β

7 = IL-12

8 = ICAM1

9 = VCAM1

10 = E-Selektin

11 = P-Selektin

4.3. Wirkung von Shigatoxin auf funktionelle Parameter

4.3.1. Einfluss von Shigatoxin auf die Stoffwechselaktivität

Der Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität der BUVEC wurde im MTT-Test in An- und Abwesenheit von verschiedenen LPS-Konzentrationen untersucht. Die Reagenzien wurden im Zuge des Mediumwechsels auf einen 2 Tage alten präformierten Monolayer gegeben und anschließend für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Durchführung des MTT-Tests.

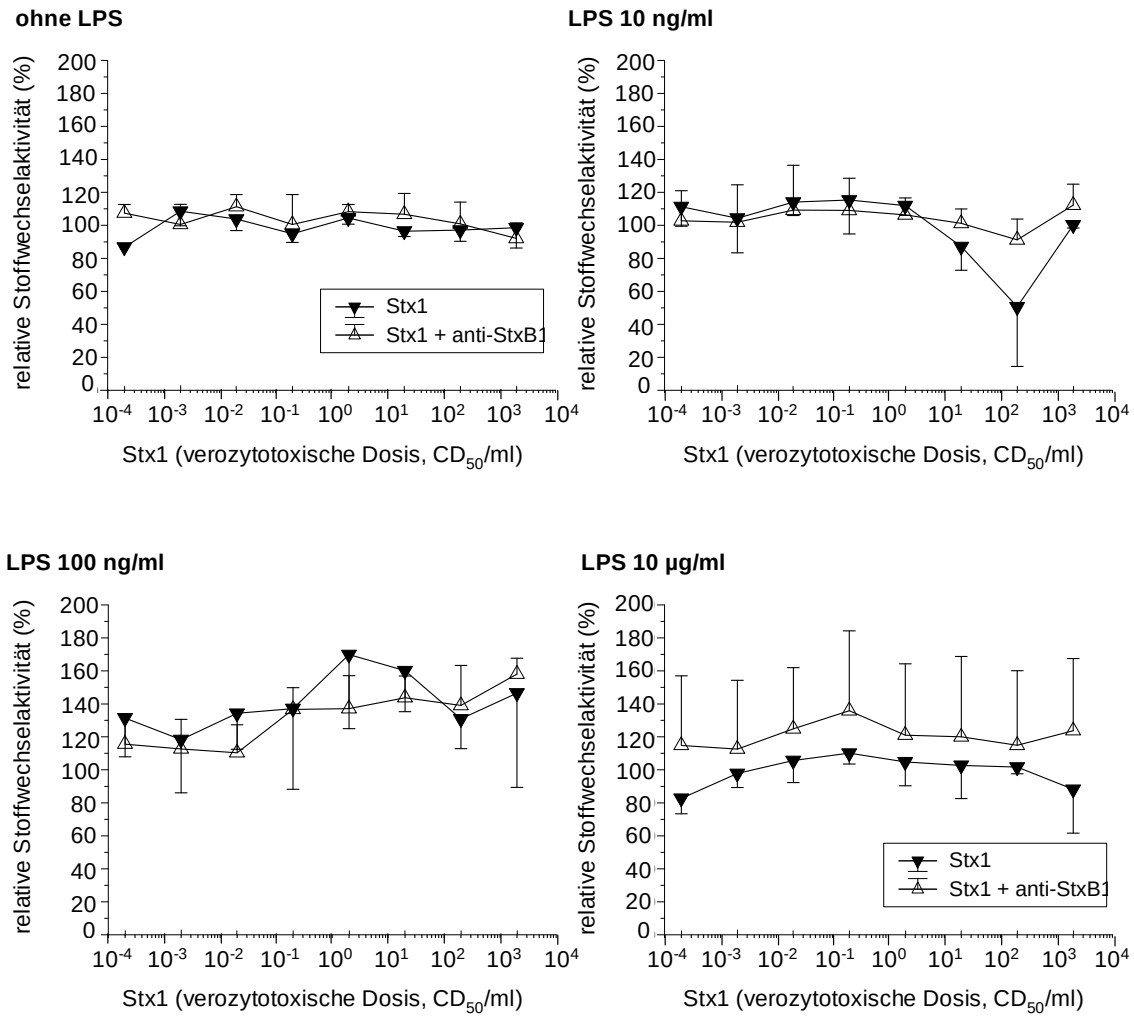


Abb. 64: Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität von BUVEC

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachansätzen je eines Versuches in An- und Abwesenheit von verschiedenen LPS-Konzentrationen; c(Stx1): 2000 CD_{50}/ml log 10 titriert, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml konstant. Inkubationsdauer 72 h. Die Zellen waren vorher 48 h ohne Stimulanzien präinkubiert worden.

Obwohl bovine Nabelschnur-Endothelzellen den Shigatoxinrezeptor tragen und dessen Expression durch LPS gesteigert wird, scheinen sie nicht empfänglich für die zytotoxische Wirkung des Shigatoxins zu sein. Im Zytotoxizitätstest ließ sich weder in Ab- noch in Anwesenheit verschiedener LPS-Konzentrationen ein Effekt des Stx1 auf die Stoffwechselaktivität der BUVEC nachweisen (Abb. 64). Vielmehr beeinflusste das LPS selbst die Zellvitalität, da es die Zellen bereits größtenteils abtötete, wenn es direkt bei der Aussaat zugegeben wurde (nicht abgebildet). Bei der Verwendung präformierer Monolayer überlebten die BUVEC länger, aber eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch die steigenden Konzentrationen an LPS fand trotzdem statt. Bei 10 µg/ml LPS waren im Lichtmikroskop nur schätzungsweise noch 10 % der Zellen als adhärent zu betrachten, und die optischen Dichten der Negativkontrollen betrugen im Mittel nur noch rund 67 % der im Versuchsansatz ohne LPS gemessenen optischen Dichten.

4.3.2. Expression von CD77

Der Einfluss von Shigatoxin auf die CD77-Expression der BUVEC wurde in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen an LPS untersucht. Drei Tage nach der Aussaat wurden konfluente Monolayer für weitere drei Tage unter verschiedenen Bedingungen im Brutschrank inkubiert und dann sowohl im nativen als auch im fixierten und permeabilisierten Zustand einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die CD77-Oberflächenexpression wurde durch LPS in einer dosisabhängigen Art und Weise beeinflusst. Der Anteil CD77-positiver Zellen war im nativen Zustand bei allen Ansätzen in Anwesenheit von 10 ng LPS/ml fast doppelt und in Anwesenheit von 100 ng LPS/ml fast viermal so hoch wie bei den Ansätzen ohne LPS-Stimulation. Stx1 beeinflusste die oberflächliche CD77-Expression nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von LPS. Bei Stimulation mit 10 ng/ml LPS war ein geringgradiger Anstieg, bei Stimulation mit 100 ng/ml LPS ein geringgradiger Rückgang in der Zahl CD77-positiver Zellen unter Stx1-Wirkung zu beobachten. Der Gesamtgehalt an CD77 wurde jedoch weder durch LPS noch durch Stx1 verändert. Nach Fixierung und Permeabilisierung waren die Zellen in allen Ansätzen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von LPS zu rund 90 % Rezeptor-positiv (Abb. 65).

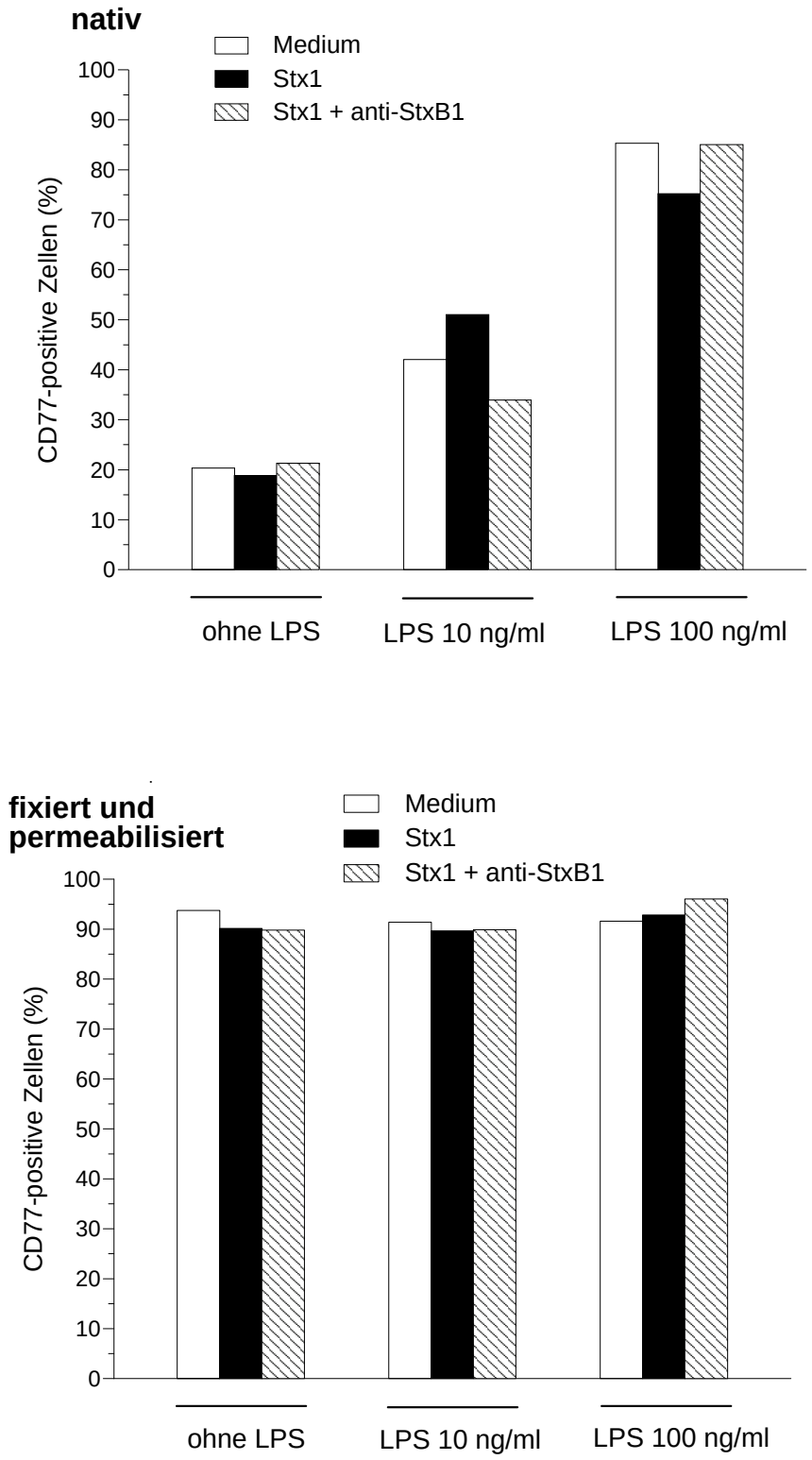


Abb. 65: Einfluss von Stx1 und LPS auf die CD77-Expression der BUVEC

Durchflusszytometrische Analyse. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Zellen nativ (oben) bzw. fixiert und permeabilisiert (unten), Angaben bezogen auf morphologisch intakte Zellen. c (Stx1): 200 CD_{50}/ml, c (anti-StxB1):1,5 µg/ml. Inkubationsdauer72 h. Die Zellen waren vorher 72 h präinkubiert worden.

4.3.3. Transkription von Zytokin- und Chemokingenen

Unter der Wirkung von Stx1 kam es bei 2 von 3 Präparationen im Vergleich zu den Ansätzen mit neutralisierendem Antikörper zu einer wenn auch nicht signifikanten Erhöhung der mRNA-Transkription um das 2,5- bzw. 15-fache für das Chemokin IL-8 und um das 1,5- bzw. 4,5-fache für das Chemokin GRO-α. Wurden die Zellen gleichzeitig mit LPS stimuliert, konnte dieser Stx-Effekt allerdings nicht mehr beobachtet werden. Auf die Transkription aller anderen untersuchten Zytokin- und Chemokingene übte das Stx1 keinen Einfluss aus (Abb. 66). Auch bei den zusätzlich untersuchten Adhäsionsmolekülgenen für ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und P-Selektin zeigte das Stx keine Wirkung (nicht abgebildet). Besonders erwähnenswert ist, dass BUVEC selbst nach Stimulation mit LPS unter Stx-Einfluss keinerlei mRNA für IL-10 transkribierten, während die *il-10*-Transkription bei den Zellen von Kolonzell-Klon 12 durch die gleichzeitige Anwesenheit von LPS und Stx gesteigert wurde (Kapitel 3.2.3).

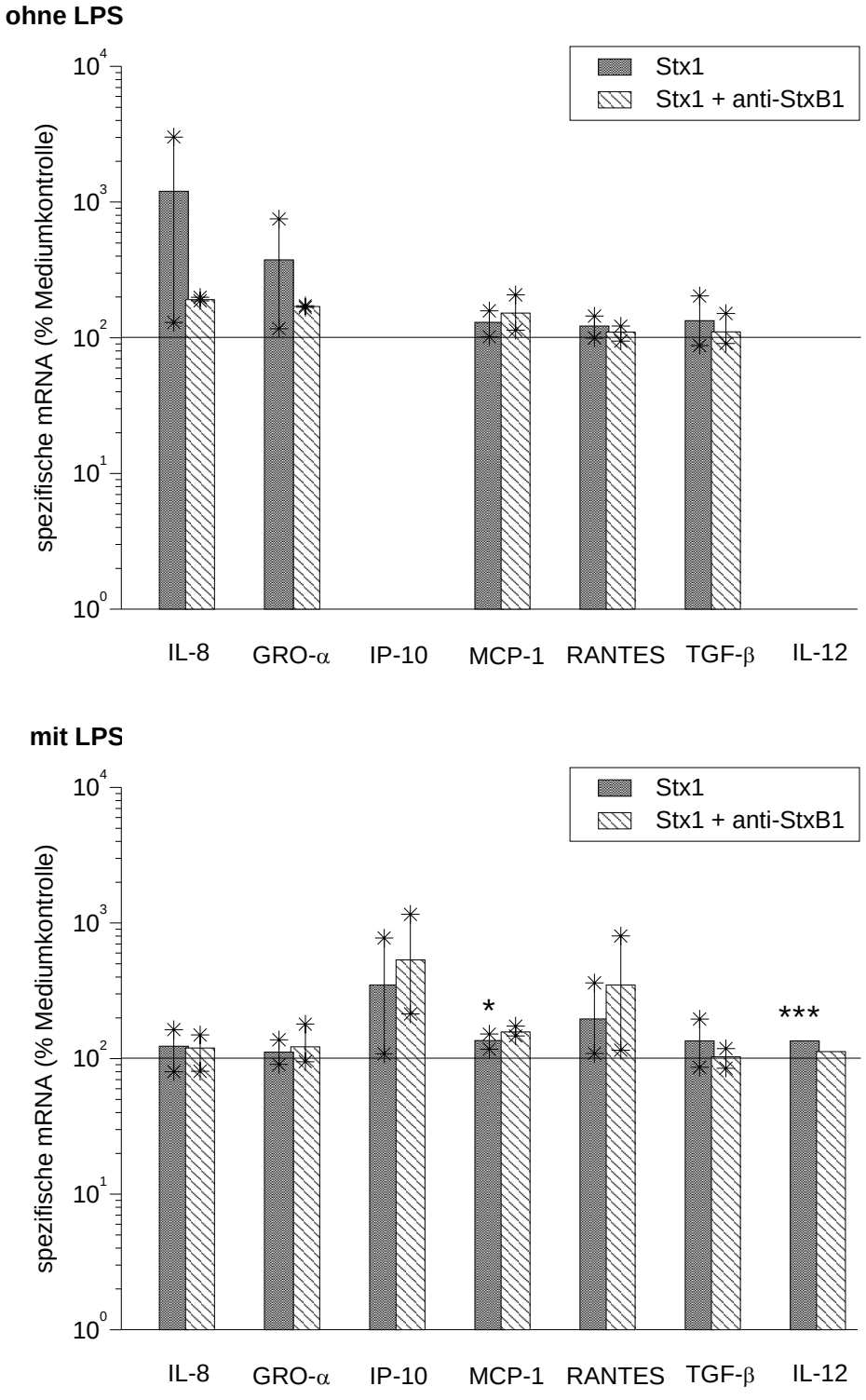


Abb. 66: Effekt von Stx1 auf die Zytokingentranskription von BUVEC

Mittelwerte, Minima und Maxima aus drei unabhängigen Präparationen nach 4 Stunden Inkubation in An- (unten) und Abwesenheit (oben) von LPS (10 ng/ml) (IL-12: mRNA nur bei 2 von 3 Präparationen nach LPS-Stimulation nachweisbar); c(Stx1): 200 CD_{50}/ml, c(anti-StxB1): 1,5 µg/ml. Die Linie markiert 100 % *gapdh*. Die statistische Auswertung mit dem t-Test nach Student ergab: $p \leq 0{,}05$ (*); $p \leq 0{,}001$ (***).

V. DISKUSSION

Da adulte STEC-infizierte Rinder normalerweise keine klinischen Anzeichen einer intestinalen Entzündung aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die Keime als Kommensalen im Darm des Rindes leben (235). Damit eine persistierende Kolonisation möglich wird, müssen die Bakterien Mechanismen entwickelt haben, die Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken, die Entzündung der Darmschleimhaut zu limitieren und gleichzeitig die intestinale Homöostase zu erhalten. Als Modulator der Immunzell-Aktivierung spielt das Shigatoxin dabei eine entscheidende Rolle, indem es die Sekretion immunregulierender Moleküle, insbesondere von Zytokinen und Chemokinen beeinflusst. Hierdurch kann die Zirkulation der Abwehrzellen lokal beeinflusst und der Charakter der Immunantwort verändern werden (87). Tatsächlich moduliert Stx1 die Immunabwehr des Rindes, da es an bovine Lymphozyten bindet und deren Aktivierung und Proliferation *in vitro* verhindert (157, 159). Darüberhinaus verändert Stx1 in der bovinen Darmschleimhaut die Zytokingenexpression bei intraepithelialen Lymphozyten (155, 158, 163, 242). Während der STEC-Infektion des Rindes trifft das im Darmlumen gebildete Stx jedoch zuerst auf Epithelzellen. Da Epithelzellen und ihre sezernierten Produkte essentiell für die intestinale Homöostase sind, könnte ein Effekt des Stx auf diese zentralen Komponenten des Darmschleimhautimmunsystems die Etablierung der Persistenz fördern. Deshalb wurde erstmals an einem *in vitro*-Modell primärer boviner Kolonzellen untersucht, ob und in welcher Weise Stx1 von *Escherichia coli* auf intestinale Epithelzellen des Rindes wirkt. Im Gegensatz zu humanen Epithelzellen, bei denen Stx die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine induziert und eine starke Entzündungsantwort der Darmschleimhaut hervorruft (258, 259, 277), bewirkte Stx1 bei primären bovinen Kolonepithelzellen keine vermehrte Freisetzung chemoattraktiver Lockstoffe für Granulozyten. Hierdurch konnte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen geleistet werden, mit denen es den STEC gelingt, den Darm des Rindes persistent aber symptomlos zu kolonisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig bovine Kolonepithelzellen für die Bearbeitung infektions-immunologischer Fragestellungen verwendet. Am Beginn der Untersuchungen stand zunächst die Etablierung des *in vitro*-Modells und die eingehende Charakterisierung der präparierten Primärkulturen. Der materielle und

zeitliche Aufwand ihrer Gewinnung war erheblich, und es dauerte stets mehrere Tage, bis ein steriler geschlossener Zellrasen zur Durchführung der Experimente zur Verfügung stand. Um die Qualität der Kolonzellkulturen im Hinblick auf das Vorkommen von Epithelzellen zu überprüfen, wurden sie jeweils am 4. Kultivierungstag einer durchflusszytometrischen Untersuchung zur Analyse ihrer Zytoskelettausstattung unterzogen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Kulturen weitgehende Konfluenz erreicht. Die Untersuchung ergab, dass in jungen, maximal 7 Tage alten Primärkulturen boviner Kolonzellen neben der vorherrschenden Population Zytokeratin-positiver Epithelzellen auch ein geringer Prozentsatz an Vimentin-positiven Zellen vorkam, deren Anteil mit steigendem Alter der Kulturen zunahm. Für die Herkunft der Vimentin-positiven Zellen gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Die Zellen könnten mesenchymalen Ursprungs sein und während der Kolonkryptenpräparation beim Abschaben der Mukosa aus der dicht darunter liegenden *Lamina propria* in die Gewebeproben gelangt sein. Mit zunehmendem Alter der Kulturen könnten diese Zellen dann die Epithelzellen überwuchert haben.

Eine andere Erklärung für die Umwandlung der ursprünglich hochreinen Epithelzellkulturen in solche mit vorherrschend mesenchymalem Charakter lieferte die Entdeckung von Zytokeratin-positiven Zellen mit Epithelzellmorphologie, deren Zellränder Vimentin-positive Zytoskelettbestandteile aufwiesen („doppelt-positive“ Zellen), sowie der Nachweis von Vimentin-positiven Zellen mit eindeutiger Epithelzellgestalt. Bei dem als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) bezeichneten Phänomen gehen Zellen nahtlos vom epithelialen in den mesenchymalen Phänotyp über (180). In Geweben vielzelliger Organismen geschieht dies als Antwort auf Verletzungen im Rahmen der Wundheilung, wenn während der Fibrogenese lokal Fibroblasten aus Epithelzellen entstehen (248). Häufig wird EMT aber auch in Zellkultursytemen beobachtet, wenn Epithelzellen aus ihrer funktionellen Einheit herausgelöst worden sind. Nach dem Kontaktverlust zur Basallamina und der Auflösung der engen Verzahnung mit benachbarten Zellen büßt das Epithel seine Polarität ein, konvertiert zu langgezogener, spindelförmiger Gestalt und nimmt mesenchymale Eigenschaften an (79). Das mag ein Grund sein, warum auf Filtern gewachsene polarisierte Zellverbände länger ihre Epithelzellcharakteristika behielten. Experimentell der EMT zugeführte Zellen zeigen eine Zunahme an Vimentin und glattem Muskel-Aktin (α- smooth-muscle actin, α-SMA), eine Reorganisation von F-Aktin (filamentöses

Aktin) zu Stressfasern und ein verändertes Kollagen-Synthese-Profil (180). In unseren Primärkulturen traten verschiedene Stadien der EMT auf, was durch die unterschiedlich starke Ausbildung von Vimentin-positiven Strukturen innerhalb einzelner Epithelzellen belegt wurde. Es fanden sich auch einzelne Zellen mit ausgeprägten Stressfasern. Da sich die Vimentin-positiven Zellen in jungen Kulturen morphologisch deutlich von den vermutlich durch EMT entstandenen Vimentin-positiven Zellen in älteren Kulturen unterschieden, ist davon auszugehen, dass sowohl „verschleppte“ mesenchymale Zellen aus der *Lamina propria* als auch die EMT für das Auftreten von Vimentin-positiven Zellen in Primärkulturen boviner Kolonepithelzellen verantwortlich sind.

Um eine höhere Reinheit der Epithelzellkulturen zu erreichen, wurden verschiedene Versuche zur Optimierung der Kulturbedingungen unternommen. Eine Möglichkeit, das Wachstum der unerwünschten nicht-epithelialen Zellen zu hemmen, bestand in der Supplementierung des Zellkulturmediums mit unterschiedlichem Gehalt an FCS (56). Der in den ersten 24 Stunden der Anzucht noch enthaltene Anteil von 10 % FCS wurde an allen folgenden Tagen der Kultivierung auf 2 % reduziert. Dies behinderte die Entwicklung der Epithelzellen nicht, da das Zellkulturmedium auch EGF als zusätzlichen Wachstumsstimulator enthielt. Da die Anteile an Zytokeratin-positiven Zellen in den auf diese Weise gewonnenen Primärkulturen zwischen 80 und 95 % lagen, war diese Methode als erfolgreich zu bezeichnen.
Ein anderer Ansatz, reinere Epithelzellkulturen zu gewinnen, besteht darin, auf L-Valin als essentiellen Nährstoff für Fibroblasten im Zellkulturmedium zu verzichten (89). Im Gegensatz zu Hoey et al. gelang es uns aber nicht, unter Verwendung L-Valin-freier Zellkulturmedien das Wachstum der Vimentin-positiven Zellen zu unterdrücken. In Abwesenheit von L-Valin kam es innerhalb von 18 Tagen zu einer stärkeren Vermehrung der Vimentin-positiven Zellen als in L-Valin-haltigem Medium. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Vimentin-positiven Zellen um eine heterogene Population von Zellen handelt, zu der nicht nur Fibroblasten gehören, sondern auch andere Zellen mesenchymalen Ursprungs, die sich gerade dann stark vermehren können, wenn durch das begrenzte Angebot an Aminosäuren auch die Epithelzellen in ihrer Entwicklung gehemmt werden. Möglicherweise wurde durch das L-Valin-freie Milieu aber auch die EMT gefördert, da gerade in diesen Kulturen ein auffallend hoher Anteil an Vimentin-positiven Zellen mit Epithelzellmorphologie zu finden war. Aus diesem

Grunde entschieden wir uns, Studien zur Stx-Wirkung auf Epithelzellen nur mit Zellkulturen bis zu einem Alter von maximal 7 Tagen durchzuführen.

Von großer Bedeutung ist die Frage nach der Vergleichbarkeit dieses *in vitro*-Modells mit der Situation *in vivo*. Das hochprismatische, einschichtige Epithel der Darmschleimhaut wird morphologisch vor allem durch dreidimensionales Wachstum charakterisiert. Diese Polarität zeigt sich in der Ausbildung apikaler Mikrovilli sowie in der engen Verzahnung der einzelnen Zellen durch „tight junctions“, welche die apikale von der basolateralen Zellmembran separieren. Anfängliche Versuche, die Polarisation der auf Filtern gezogenen Zellverbände durch regelmäßige Messungen des TEER zu verfolgen, erwiesen sich als wenig aussagekräftig. Die Messwerte lagen trotz steigender Tendenz stets weit unter denen der Positivkontrolle (CaCo-2-Zellen) und selbst bei ein und demselben Filter waren sie oft starken Schwankungen unterworfen. Erst fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen belegten die Ausbildung von „tight junctions“ zwischen einzelnen Zellen des Monolayers. Offenbar beschränkte sich dieses Phänomen aber nur auf bestimmte Bereiche und umfasste nie den gesamten Zellrasen. Da die Zellen oftmals in einem subkonfluenten Zustand verblieben, kam es nicht zum vollständigen Bewuchs des Filters. Deshalb traten zwischen den eng verzahnten Zellplaques auch immer wieder nicht bewachsene oder nicht polarisierte Areale auf, deren Existenz die Schwierigkeiten bei der Messung des TEER erklären.
Ein weiteres Merkmal des Differenzierungsgrades einer Zelle ist ihre enzymatische Ausstattung und die relative Aktivität der Enzyme. Alkalische Phosphatase, Saccharase und Laktase gelten als charakteristische Enzyme terminal differenzierter Villusepithelzellen. Die Tatsache, dass diese Markerenzyme bei bis zu 10 Tage alten primären Kolonzellen zwar nachgewiesen werden konnten, ihre Expression aber im Vergleich zu der Expression der alkalischen Phosphatase bei CaCo-2-Zellen nur minimal war, lässt annehmen, dass die Zellen entweder noch nicht vollständig entwickelt oder aber bereits wieder in einen Zustand der Entdifferenzierung eingetreten waren. Da jedoch die Inkubation mit dem als Induktor der Zelldifferenzierung bekannten Butyrat auch nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Enzymexpression führte, muss von der bereits eingetretenen Entdifferenzierung der Primärkulturen nach einem gewissen Zeitraum ausgegangen werden. Die Entdifferenzierung wird auch durch das Auftreten der Zytokeratin/Vimentin doppelt-positiven Zellen im Rahmen der EMT

widergespiegelt. Zu bedenken bleibt ebenfalls, dass die Polarisation nur unvollständig war und typische Bürstensaum-Enzyme möglicherweise nur von vollständig differenzierten Epithelzellverbänden exprimiert werden können. Trotzdem erwies sich das etablierte *in vitro*-Modell als geeignet, um infektions-immunologische Fragestellungen zu bearbeiten.

Angesichts der Unterschiede in der Stx-Rezeptorverteilung in den Geweben und auf Zellen von Mensch und Rind ist anzunehmen, dass Stx unterschiedliche Funktionen als Virulenz- oder Kolonisationsfaktor in den verschiedenen Wirten erfüllt. Diese unterschiedlichen Rollen des Stx spiegeln sich letztendlich in den unterschiedlichen Konsequenzen der STEC-Infektion bei Mensch und Rind wieder. Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis von CD77 auf primären bovinen Kolonepithelzellen widerlegt die zuvor formulierte These, die Unempfänglichkeit des Rindes gegenüber der krankmachenden Wirkung des Stx beruhe auf der Abwesenheit des Toxinrezeptors auf den meisten bovinen Geweben (203). Tatsächlich haben schon Hoey et al. (88) in immunhistologischen Bindungsstudien bewiesen, dass Stx1 beim Rind sowohl an epitheliale Kryptenzellen in Dünn- und Dickdarm, an Tubulus- und Sammelgangszellen in der Niere sowie an lymphoide Zellen in der Submukosa bindet. Das Vorkommen von CD77 auf Darmepithelzellen des Rindes steht im Gegensatz zur Abwesenheit des Rezeptors auf humanen intestinalen Epithelzellen (20, 90, 160, 229). Dies lässt vermuten, dass das Stx eine wesentliche Rolle bei der intestinalen Kolonisation des Rindes spielt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Rezeptor wie von Hoey et al. (89) postuliert als „Toxinfänger“ fungiert, der durch lokale Bindung die Resorption des Stx verhindert und dadurch der Entstehung subepithelialer Gewebeschäden entgegenwirkt. Zum einen konnte CD77 im Mittel nur auf 16 % der primären Kolonepithelzellen nachgewiesen werden. Zum anderen wirkt Stx1 auf Immunzellen in der Mukosa der bovinen Darmschleimhaut (158) und muss deshalb auch in signifikantem Umfang die Darmschranke passieren können.

Die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der aus Kolonkrypten ausgewachsenen Epithelzellen den Rezeptor exprimierte, mag mit dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Zellen zusammenhängen. Zumindest ist von humanen intestinalen Epithelzelllinien bekannt, dass sie Gb_3/CD77 proliferations- und differenzierungsabhängig exprimieren (102). Hoey et al. (88) konnten die Stx1-Bindung

nur an Epithelzellen in den Krypten nachweisen, nicht aber an höher differenzierten apikalen Epithelzellen. Da die Krypten als Orte der lebensnotwendigen Regeneration gelten, könnte das Toxin durch seine Wirkung auf die dort gelegenen Stammzellen die Entwicklung des Epithels beeinflussen, das Zell-„turn-over“ sowie die Epithelzell-Abschilferung reduzieren und auf diese Weise die Kolonisationsdauer der Bakterien auf der Darmschleimhaut verlängern. Dieser Effekt des Stx1 scheint bei der STEC-Kolonisation der Darmschleimhaut von Schafen eine Rolle zu spielen (139). Zwar erbrachten Langzeitstudien mit bovinen Kolonzellen, in denen die Wirkung des Stx auf die Zytoskelettausstattung untersucht wurde, keine Hinweise auf eine durch Stx bewirkte Verschiebung des Verhältnisses epithelialer und mesenchymaler Zellen zueinander (nicht gezeigt). Aber aus eigenen Arbeiten ist bekannt, dass CD77 bei epithelialen und mesenchymalen primären Kolonzellen des Schafes in einem dem Rind vergleichbaren Expressionsmuster vorkommt (nicht gezeigt). Diese Beobachtung macht weitere Versuche zur Charakterisierung des Einflusses von Stx auf die Proliferationsaktivität der bovinen Kolonzellen notwendig.

Obwohl primäre bovine Kolonepithelzellen CD77 exprimieren, wirkte Stx weder negativ auf die Morphologie der Epithelzellen noch induzierte es vermehrt Apoptose. Die im Zytotoxizitätstest mit primären bovinen Kolonzellen auftretende Stx-bedingte geringgradige Beeinträchtigung der Zellvitalität beruhte wahrscheinlich auf der Anwesenheit der ebenfalls CD77-positiven mesenchymalen Zellen. Typischerweise korreliert die Stx-Rezeptorexpression einer Zelle mit ihrer Sensitivität gegenüber dem Toxin. Es ist jedoch bekannt, dass das Stx trotz seiner Eigenschaft als potentes Zytotoxin unterschiedliche Toxizität auf verschiedene Zelltypen ausübt. Die Ursache für die unterschiedliche Sensitivität rezeptorpositiver Zellen gegeüber Stx begründet sich in der speziellen Gb_3-Struktur (Isoform) sowie im Verteilungsmuster des Rezeptors in der Zellmembran. Gb_3 ist heterogen in seiner Lipidzusammensetzung, was Azyl-Kettenlänge, Sättigung und Hydroxilierung betrifft (10, 190). Typischerweise haben empfindlichere Zellen höhere Dichten an Gb_3 mit kürzeren Fettsäureketten, während das Gb_3-Molekül von relativ Stx-resistenten Zellen längere Fettsäureketten besitzt (11, 222). Weiterhin wird die Organisation von Gb_3 in Lipidmikrodomänen, sog. „lipid rafts“, mit Sensitivität gegenüber Stx in Verbindung gebracht (52, 114). Dagegen sind Zellen, bei denen der Rezeptor zufällig über die gesamte Zellmembran verteilt ist, relativ unempfindlich gegenüber der Toxizität des Stx. Die Rezeptorverteilung und -

struktur scheint mit dem intrazellulären Transport des Rezeptor-Toxin-Komplexes nach dessen Internalisierung zu bestimmten Zellorganellen zusammenzuhängen (220, 223). In sensitiven Zellen wird Stx auf retrogradem Wege zum ER, zur Kernhülle und zum Kern transportiert (11). Die von Hoey et al. (89) bei bovinen Kolonepithelzellen aufgezeigte Lokalisaton des Stx in Lysosomen entspricht dem Transportweg des Stx in nicht-sensitiven Zellen, der charakteristischerweise in der Neutralisation der Zytotoxizität mündet (132). Dieses Phänomen erklärt, warum es trotz CD77-Expression bei primären bovinen Kolonepithelzellen nicht zur vermehrten Apoptoseinduktion durch Stx kam. Jedoch schließt das Fehlen von Zytotoxizität andere Stx-Wirkungen nicht aus. Möglicherweise stehen im bovinen Wirt die modulierenden Eigenschaften des Toxins im Vordergrund und sind entscheidend für die Fortdauer der STEC-Infektion im Darm des Rindes.

Neben den Stx gilt das Adhäsin Intimin als wichtiger EHEC-Kolonisationsfaktor, der die enge Anheftung der Bakterien an die Enterozyten vermittelt und die Besiedelung des Darmtraktes adulter Rinder erleichtert (37). Als Rezeptor erkennt Intimin nicht nur das bakteriell kodierte Tir, sondern auch die eukaryontischen Proteine ß1-Integrin und Nukleolin (234). Nukleolin ist ein multifunktionelles Protein, das in großer Anzahl im Nukleus vorkommt, wo es an der Biosynthese der Ribosomen beteiligt ist. Es wird aber auch auf der Oberfläche vieler verschiedener Zelltypen exprimiert (72). Jüngste Studien (212) belegen nun, dass Stx2 von EHEC O157:H7 im Zusammenspiel mit Intimin im Maus-Modell als Kolonisationsfaktor wirkt. Durch Induktion der Zelloberflächenexpression von Nukleolin fördert das Toxin die Adhäsion der Bakterien an die Enterozyten und unterstützt somit die Kolonisation des Darmtraktes. Obwohl eine intestinale Gb_3/CD77-Expression bei Mäusen bislang nicht bekannt ist (217, 256), zeigten auch andere Untersuchungen, dass die Infektion mit EHEC O157:H7 bei Kälbern, Mäusen und Ferkeln die Nukleolin-Menge im Zytoplasma und in der apikalen Membran von Enterozyten mit adhärenten Bakterien erhöht (234). Das in der vorliegenden Arbeit etablierte *in-vitro*-Modell wäre geeignet, diese aktuellen Erkenntnisse zu überprüfen, da die Zellen zumindest teilweise polarisieren.

Humane Kolonepithelzellen reagieren auf Stimulation mit Stx innerhalb kurzer Zeit mit der Sekretion von C-X-C-Chemokinen wie IL-8 und GRO-α (259). Damit rekrutieren sie neutrophile Granulozyten in die Schleimhaut und leiten ein akutes Entzündungsgeschehen ein, aus dem sich später die für STEC-Infektionen des Menschen typischen intestinalen Läsionen entwickeln können (202). Primäre Kolonepithelzellen des Rindes hingegen verstärkten nach Kontakt mit Stx1 sowohl kurz- (4 h Inkubation) als auch längerfristig (24 h Inkubation) ausschliesslich die mRNA-Transkription für das C-C-Chemokin MCP-1. MCP-1 wirkt kaum chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, lockt aber eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen, T-Zellen und vor allem Monozyten an (60, 125, 191, 260). Eine Hochregulation der Transkription der entzündungsfördernden C-X-C-Chemokine in Anwesenheit von Stx konnte bei bovinen Epithelzellen nicht beobachtet werden. Das resultierende Chemokinprofil ist damit nicht als pro-inflammatorisch anzusehen. Epithelzellen können und müssen pro-inflammatorische Antworten vermeiden, wenn es sich bei den erkannten PAMPs um Keime der residenten Mikroflora oder deren Produkte handelt (140). Die Tatsache, dass in Migrationsstudien keine verstärkte Freisetzung von chemotaktischen Substanzen nachgewiesen werden konnte, stimmt mit der Beobachtung überein, dass Stx1 auch bei bovinen IEL *in vitro* keine verstärkte Produktion neutrophiler Chemokine bewirkt (163). Das Fehlen intestinaler Entzündungssymptome bei STEC-infizierten adulten Rindern könnte demnach nicht nur darauf beruhen, dass bovine Granulozyten mangels Stx-Rezeptor nicht durch Stx aktiviert werden können (156), sondern auch darauf, dass diese Zellen während der STEC-Kolonisierung der Schleimhaut gar nicht erst in die Mukosa angelockt werden. Die im Verlauf der humanen STEC-Infektion stattfindende Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Darmschleimhaut gilt dagegen als Schlüsselereignis in der Pathogenese, da sie nicht nur zu einer Verstärkung der Stx-Aufnahme führt (95), sondern die Neutrophilen auch als Toxin-„Transporter“ betrachtet werden, die das Stx systemisch verteilen (202). Beim Rind jedoch spricht vieles dafür, dass die gegen die pro-inflammatorische Stx-Wirkung refraktären Epithelzellen das Abwehrsystem der Schleimhaut nicht alarmieren, so dass die STEC schließlich als Bestandteil der kommensalen Mikroflora geduldet werden.

Zukünftige Untersuchungen sollen beantworten, ob das Fehlen intestinaler Entzündung auch dadurch erklärt werden kann, dass Stx1 die IL-8-Induktion durch H7 Flagellin

verhindert. In Untersuchungen von Berin et al. (16) wurde die Aktivierung pro-inflammatorischer Signale bei humanen Kolonepithelzelllinien hauptsächlich durch das H7 Flagellin von EHEC O157:H7 bewirkt. EHEC-Mutanten, denen sowohl das *eae*- als auch das *stx*-Gen fehlten, aktivierten ebenso NF-κB und führten in gleichem Maße zur Produktion von IL-8 wie der EHEC O157:H7 Wildtyp-Stamm. Ob Stx beim Rind möglicherweise diese Flagellin-Wirkung unterdrückt, muss in Studien untersucht werden, bei denen die Interaktion von bovinen Kolonepithelzellen mit vermehrungsfähigen STEC-Bakterien im Mittelpunkt steht.

Ein Teil der neben den Epithelzellen in den Primärkulturen boviner Kolonzellen vorkommenden Vimentin-positiven Zellen mit fibroblastenartiger Gestalt zeichnete sich durch eine starke CD77-Oberflächenexpression aus und reagierte besonders empfindlich gegenüber dem Toxin. Der unter Stx-Einfluss auftretende starke Rückgang an rezeptorpositiven Zellen in den Primärkulturen war vermutlich auf diese nicht-epithelialen Zellen zurückzuführen, da Epithelzellen sich als refraktär gegen die zytotoxische Wirkung des Toxins erwiesen hatten. Wie Stx diesen Effekt verursachte, ob es die rezeptortragenden Zellen tötete oder lediglich zum Abbau oder der Umverteilung von CD77 führte, blieb zunächst unklar.
Um Herkunft und Bedeutung dieser Vimentin-positiven Stx-Zielzellen zu erforschen, wurden sie nach der von Pauly et al. beschriebenen Methode transfiziert und immortalisiert (188). Die erhaltenen Zellklone dienten als Modell für phänotypische und funktionelle Untersuchungen und wurden mit bereits bekannten Zellarten verglichen. Der besonders hervorgehobene Klon 12 wies die größten Gemeinsamkeiten mit den in den Primärkulturen auftretenden mesenchymalen Zellen auf, da auch er in hohem Maße CD77 exprimierte und vergleichbare Reaktionen auf das Toxin zeigte. Auf die Zugabe von Stx1 in das Kulturmedium reagierte Klon 12 mit einer Umverteilung von oberflächlichem CD77 in intrazelluläre Kompartimente und legte somit die Vermutung nahe, dass auch das bei den Primärzellen nach Stx-Inkubation auftretende Phänomen der Abnahme rezeptorpositiver Zellen auf diesem Effekt beruhen könnte.

Letztendlich läßt sich die Frage nach der Identität der Vimentin-positiven Zellen in den Primärkulturen nicht eindeutig beantworten, da sie sich vermutlich aus Zellen unterschiedlicher Herkunft zusammensetzen, die stark in ihren Eigenschaften differieren. Für Klon 12, dessen Ursprung auf nur eine der verschiedenen mesenchymalen Zellsorten zurückgeht, kann eine Abstammung von (1) Fibroblasten, (2) Myofibroblasten, (3) dendritischen Zellen (DCs) oder (4) Monozyten/Makrophagen angenommen werden.

(1) Mit Ausnahme der aus EMT hervorgegangenen Zellen muß der Ursprung der Vimentin-positiven Zellen in den mesenchymalen Elementen der *Lamina propria* liegen. Diese Verbindungs- und Stützschicht besteht hauptsächlich aus Bindegewebszellen wie Fibroblasten und Fibrozyten. Deren typische spindelförmige Gestalt zeigten auch der Großteil der Vimentin-positiven Zellen in den Primärkulturen sowie Zellen des Klons 12. Nicht alle Gewebsfibroblasten haben ihren Ursprung jedoch im primären Mesenchym, sondern stammen teilweise auch von Fibrozyten des Blutes ab (186). Diese Fibrozyten können sich unter der Einwirkung von T-Zellen aus einer $CD14^+$ Population mononukleärer Blutzellen entwickeln (1). Im Gegensatz zu Klon 12 exprimierten die von Abe et al. untersuchten Zellen nach längerer Kulturdauer jedoch kein CD14 mehr. Interessanterweise zeigten sie aber ebenso wie Klon 12 eine deutliche CD172a-Expression, während ihre MHC II-Expression mit zunehmender Kulturdauer herunterreguliert wurde. Fibrozyten spielen eine wichtige Rolle während der Entzündungs- und der Reparationsphase der Wundheilung. Neben Kollagen I produzieren sie auch Chemokine wie MCP-1 oder Zytokine wie IL-10 (35).

(2) Die Entdeckung von sog. Streßfasern innerhalb der Vimentin-positiven Zellen lieferte einen weiteren Hinweis, der für die Abstammung von fibroblastenartigen Zellen spricht. Die Streßfaserbündel bestehen aus α-Aktin-Mikrofilamenten (α-smooth muscle actin, α-SMA), deren Expression typisch für Myofibroblasten ist. Diese spezialisierten Fibroblasten teilen sich phänotypische Eigenschaften sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen und sind direkt unterhalb des Epithels lokalisiert, wo sie eine Verbindung mit den glatten Muskelzellen der *Muscularis mucosae* eingehen (199). Schüller et al. gelang es sogar, die Bindung von Stx an perikryptische Fibroblasten (Synonym für Myofibroblasten) in dieser epithelnahen Lage in Gefrierschnitten menschlichen Gewebes nachzuweisen (229). Unter der Einwirkung von TGF-β können intestinale Fibroblasten zu kontraktilen Wundmyofibroblasten transdifferenziert werden

(263), die Kollagen und eine Vielzahl an Matrixproteinen sezernieren. Myofibroblasten sind jedoch nicht nur maßgeblich an der Wundheilung beteiligt, sondern agieren auch als parakrine Vermittler zwischen dem Epithel und den Elementen der *Lamina propria*, da sie in vielen Geweben und Organen ein beachtliches Repertoir an Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Neurotransmittern, Entzündungsmediatoren und Adhäsionsmolekülen sezernieren (200).

(3) Eine bedeutende Entdeckung während der phänotypischen Charakterisierung von Zellen des Klons 12 war, dass sie neben CD14 und MHC I auch das Leukozyten-Differenzierungsantigen CD172a exprimierten. Dieses auch als MyD-1 bekannte Molekül wurde kürzlich als Mitglied der SIRP-α-Familie („signal regulatory protein“) identifiziert (118). Es wird vor allem von bovinen Monozyten und Makrophagen, einer Population von ALVC („afferent lymph veiled cells“), von Granulozyten sowie von Zellen mit DC-Morphologie in Lymphgewebe, Haut und Darmepithel exprimiert (51, 77, 151). Der Name MyD-1 reflektiert die hauptsächliche Verteilung auf myeloiden und dendritischen Zellen. Die Proteine der SIRP-α-Familie regulieren Signale, die verschiedene physiologische und pathologische Prozesse steuern. Es wäre also denkbar, dass CD172a eine Rolle bei der Regulierung der Aktivierung von Monozyten und/oder dendritischen Zellen spielt (28). Beide Zelltypen stellen Differenzierungsformen monozytoider Zellen dar, gehören zum angeborenen Immunsystem und sind auf unterschiedliche Aufgaben spezialisiert:

DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der erworbenen Immunantwort, was in ihrer Fähigkeit begründet liegt, Fremdmaterial zu internalisieren, zu Lymphknoten zu wandern und Antigene naiven T-Zellen zu präsentieren und damit deren terminale Differenzierung zu Effektor- oder Regulator-Zellen zu konfigurieren (174). Durch Mikroorganismen aktivierte Epithelzellen rekrutieren DCs durch das Chemokin CCL20 (Synonym LARC) in die Schleimhaut (100, 207, 233). Dort induziert der Kontakt von DCs und Epithelzellen die Expression von „tight junction“-Proteinen, was es den DCs erlaubt, die Verbindungskomplexe zu öffnen, ohne die Monolayer-Integrität zu stören, Dendriten in das Darmlumen vorzustrecken und direkt luminale Mikroorganismen zu sammeln (208). Solchermaßen intraepithelial gelegene DCs könnten während der Kolonkryptenpräparation leicht zusammen mit den Epithelzellen isoliert und kultiviert worden sein. Werling et al. beobachteten, dass die Stimulation mit TLR-Rezeptor-Agonisten (z.B. LPS) zu unterschiedlichen Reaktionsmustern bei bovinen Makrophagen

und DCs führt: Während DCs nach Stimulation mit LPS vorwiegend IL-12 produzieren, ist die vermehrte Sekretion von IL-10 typisch für Monozyten/Makrophagen (268). Da die Zellen des Klons 12 auf LPS-Stimulation mit einer vermehrten *il-12*-Transkription reagierten, liegt eine Verwandtschaft mit DCs nahe. Allerdings exprimierte Klon 12 kein CD11c, den Hauptmarker für DCs (174), dafür aber CD14, welches auf der Oberfläche boviner Makrophagen vorkommt und die Bindung von LPS vermittelt (107). (4) Vermutlich handelt es sich bei den Zellen des Klons 12 um Mitglieder einer makrophagenartigen Zelllinie, die durch LPS eine Sensibilisierung gegenüber Stx1 erfuhren, welches eine Steigerung der *il-10*-Transkription auslöste. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen stammen von Knochenmarksstammzellen ab und entstehen in einer höchst regulierten Kaskade von Differenzierungsschritten (261). Wahrscheinlich führt der Kontakt von pro-inflammatorischen Monozyten mit den Produkten von Stromazellen (z.B. TGF-β) zur Differenzierung in nicht-inflammatorische Makrophagen. Obwohl diese Gewebsmakrophagen den Blutmonozyten in der Eigenschaft Mikroorganismen zu phagozytieren und zu töten sehr ähneln, unterscheiden sie sich doch durch ihre Unfähigkeit zur Zytokinproduktion, zum „respiratory burst“, zur Antigen-Präsentation und zur Chemotaxis (237). Residente Makrophagen sind generell herunterreguliert, was die pro-inflammatorische Zytokinproduktion betrifft und tragen nicht zur Steuerung der mukosalen Entzündung bei. Von diesen „normalen“ nicht-inflammatorischen Gewebsmakrophagen, die kein CD14 exprimieren (236, 238), unterscheiden sich wesentlich die im Entzündungsfall direkt aus dem Pool $CD14^{+}$ im Blut zirkulierender Monozyten entstehenden Makrophagen. Bei Blut-Monozyten, die in gesunde intestinale Mukosa rekrutiert werden, wird der pro-inflammatorische Phänotyp charakteristischerweise unterdrückt. Dagegen erfahren Blut-Monozyten, die zu Entzündungsherden gelockt werden, nicht eine solch stringente Verwandlung und behalten ihr immunregulatorisches Potential bei (237). LPS und Immunkomplexen ausgesetzte Makrophagen werden durch einen $IL\text{-}10^{high}$ und $IL\text{-}12^{low}$ Phänotyp charakterisiert und fördern Immunantworten vom Typ II. Das von diesen „Typ II aktivierten Makrophagen“ (162) sezernierte IL-10 ist mehr als ein bloßer Deaktivator von Makrophagen und DCs, denn durch die Dämpfung der NF-κB-Aktivitäten wird die Induktion von inflammatorischen Zytokinen unterdrückt und der Entwicklung einer Typ I Immunität entgegengewirkt. Ebenso könnte die Rekrutierung von naiven T-Zellen in eine von IL-10 dominierte Umwelt, in der die DC-Reifung verhindert wird, in

Toleranz und Immunsuppression münden (144). Die Stx-vermittelte Modulation des Zytokin-/Chemokinprofils bei Klon 12 in Richtung einer vermehrten IL-10-Transkription deutet wahrscheinlich auf die Abstammung dieser immortalisierten mesenchymalen Zellen von „Typ II aktivierten Makrophagen“ hin. Durch seine Wirkung auf bovine Darmschleimhaut-Makrophagen schafft Stx1 somit ein Milieu, das durch Kontrolle und Supprimierung von Immunität und Entzündung geprägt ist und das folglich die Etablierung einer persistierenden Kolonisation der STEC im Darm des Rindes fördert.

Auch ohne die exakte Kenntnis des Zelltyps, von dem sich die mesenchymalen Zellen ableiten, besitzt die Entdeckung ihrer Empfindlichkeit gegenüber der modulierenden Wirkung des Stx1 eine große Bedeutung für das Verständnis der Mechanismen der persistenten STEC-Infektion des Rindes. Um sich innerhalb der Gewebe zu bewegen, erhalten Leukozyten Führungshinweise (z. B. durch Chemokine, Selektine, Integrine), welches Gewebe sie bevölkern und welches sie meiden sollen. Solche richtungsweisenden Signale werden beispielsweise zum Zeitpunkt der Extravasation durch einen „endothelial address code“ auf der luminalen Oberfläche des Gefäßendotheliums vermittelt. Ähnlich wie Fibroblasten zur Formulierung eines zusätzlichen „stromal address code“ befähigt sind, der das Migrationsverhalten der Leukozyten innerhalb der Gewebe dirigiert (186), steuern auch Monozyten und Makrophagen durch die Sekretion von Zytokinen/Chemokinen maßgeblich die Zirkulation der Abwehrzellen und können dadurch die Schleimhautimmunität beeinflussen.
Die Chemokine MCP-1 und RANTES, deren mRNA-Transkription bei Klon 12 durch Stx1 induziert wird, könnten verstärkt Monozyten anlocken, die in die Darmschleimhaut einwandern, wo auch sie zu „Typ II aktivierten Makrophagen“ differenzieren und ihrerseits wieder Zytokine produzieren, die zur Erhaltung des immunsupprimierenden Milieus beitragen. Unterstützt wird diese Makrophagen-Rekrutierung durch die Epithelzellen, welche durch Stx1 ebenfalls zu einer vermehrten MCP-1-Transkription veranlasst werden. Trotz der erhöhten mRNA-Transkription für monophile Chemokine war in Migrationsstudien keine verstärkte chemotaktische Aktivität für bovine mononukleäre Zellen in Überständen Stx1-behandelter Klon 12-Kulturen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dies könnte sich dadurch begründen, dass

CD77-positive bovine PBMC selbst Zielzellen für Stx1 darstellen (157) und durch das in den Überständen verbliebene Toxin gehemmt worden sind. In der durchgeführten Form ist der Migrationstest deshalb nur bedingt ausssagekräftig. Die Beobachtung, dass Stx die Zusammensetzung der IEL-Subpopulationen *in vivo* verändert (158), deutet aber daraufhin, dass Stx *in vivo* die Rezirkulation der Mukosalymphozyten beeinflussen könnte. Durch seine Wirkung auf das Zytokin-/Chemokinprofil der Darmschleimhaut-Makrophagen könnte Stx den fein abgestimmten und komplex regulierten „stromal address code“ aus dem Gleichgewicht bringen und das Migrationsverhalten der Monozyten und Lymphozyten innerhalb der Mukosa stören, so dass lokale immunologische Lücken entstehen, die das Verweilen der Bakterien auf der Darmschleimhaut begünstigen.

Im Gegensatz zu mononukleären Zellen weisen bovine Granulozyten keine Stx-Bindungsstellen auf und sind resistent gegenüber der Toxin-Wirkung (156). Der Migrationstest mit Überständen Stx-behandelter Zellen und bovinen Granulozyten ist deshalb uneingeschränkt interpretierbar. Obwohl unter Stx-Einfluss eine Erhöhung der mRNA-Transkription für die potenten Neutrophilenlockstoffe IL-8 und GRO-α festgestellt worden war, war ein vermehrtes Vorkommen chemotaktischer Substanzen für bovine Granulozyten in den Überständen Stx1-behandelter Klon 12-Kulturen nicht nachweisbar. Anscheinend wurde die produzierte mRNA also nicht in funktionelle Proteine umgesetzt. Die Menge an synthetisierten Chemokinen könnte auch so gering gewesen sein, dass ein Effekt, der möglicherweise *in vivo* aufgetreten wäre, im Testsystem nicht nachweisbar war. Zu bedenken bleibt auch, dass mRNA-Expression nicht zwangsläufig auch die Expression der entsprechenden Proteine nach sich ziehen muß. Dies gilt vor allem dann, wenn ein Toxin anwesend ist, das die Potenz besitzt, Ribosomen zu schädigen und somit die Proteinbiosynthese zu inhibieren. In unseren Versuchen wurde Stx1 in hohen Konzentrationen eingesetzt. Ob bei niedrigerer Dosierung des Toxins im Rahmen einer „ribotoxic stress response“ möglicherweise doch mRNA zu Proteinen umgesetzt werden würde, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Andererseits werden die Chemokine IL-8 und GRO-α nicht exklusiv, sondern im Zusammenspiel mit einem breiten Spektrum an chemotaktischen Substanzen sezerniert, die verschiedene Zelltypen ansprechen, sich gegenseitig in ihrer Wirkung ergänzen oder auch behindern. Bislang sprechen die gewonnenen Ergebnisse

jedoch dafür, dem Stx im bovinen Wirt keine Bedeutung als entzündungsförderndes Agens zuzuschreiben.

Bei den Zellen des Klons 12 handelt es sich sehr wahrscheinlich nicht um Endothelzellen, da vergleichende Versuche mit BUVEC phänotypische und funktionelle Unterschiede aufzeigten. Zwar ist das Vermögen der LDL-Internalisierung allein betrachtet noch kein zuverlässiges Unterscheidungskriterium, da dazu nicht nur Endothelzellen, sondern auch Monozyten/Makrophagen in der Lage sind (135, 283). Das beobachtete intrazelluläre Verteilungsmuster der LDL-Partikel unterschied sich jedoch bei BUVEC und Klon 12 so gravierend, dass von verschiedenen Zellarten ausgegangen werden kann. Der Nachweis der Befähigung zur LDL-Aufnahme diente somit nicht nur der Abgrenzung der Kolonklon-Zellen von Endothelzellen, sondern lieferte gleichzeitig auch einen weiteren Hinweis auf die Abstammung des Klons 12 von Makrophagen.

Desweiteren unterschieden sich BUVEC von Klon 12-Zellen hinsichtlich der durch Stx1 induzierbaren Reaktionen. Entgegen früheren Veröffentlichungen, die das Fehlen von Stx-Rezeptoren auf Gefäßendothelzellen des Rindes postuliert hatten (203), konnte bei BUVEC eine schwache CD77-Oberflächenexpression nachgewiesen werden, die unter LPS-Einwirkung dosisabhängig gesteigert werden konnte. Die Induktion der CD77-Expression durch LPS ist auch von HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells) bekannt, die dadurch gegenüber Stx sensibilisiert werden (179, 262). BUVEC hingegen blieben trotz LPS-gesteigerter Rezeptorexpression unempfindlich gegenüber Stx1. Vergleichbares wurde auch schon früher von bovinen Aorta-Endothelzellen berichtet (179). Allerdings bleibt zu bedenken, dass Endothelzellen unterschiedlicher Lokalisation sich in ihren Eigenschaften unterscheiden können (179). Sowohl BUVEC als auch bovine Aorten-Endothelzellen entstammen den großen Blutgefäßen und nicht der intestinalen Mikrovaskulatur, deren Endothelzellen Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein müssen.

Zwar bewirkte das Stx bei BUVEC ähnlich wie bei Klon 12 eine gesteigerte *il-8*-und *gro-α*-mRNA-Transkription, aber bei allen anderen untersuchten Chemokin- und Zytokingenen konnten keine Parallelen zum Zytokin-/Chemokin-Profil von Klon 12 gezogen werden. Ein wesentlicher Unterschied bestand darin, dass Stx in Gegenwart

von LPS bei Klon 12 die Induktion von *il-10*-mRNA bewirkte, während *il-10*-Transkripte bei BUVEC überhaupt nicht nachweisbar waren.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit unterstützen die Vermutung, dass STEC im Darm des Rindes zu einer Kommensalen-artigen Lebensweise in der Lage sind (235). Vor allem die Toleranz der Epithelzellen, auf Stx1 nicht mit einem pro-inflammatorischen Expressionsprofil von Chemokinen zu reagieren, könnte die Stx1-bedingte Hemmung anderer Effektormechanismen der Wirtsabwehr ergänzen und zur Etablierung einer persistierenden Kolonisation des Rindes beitragen. Dringender Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der Bedeutung der Darmschleimhaut-Makrophagen, die als neue Art von Stx1-Zielzellen im Darm des Rindes identifiziert werden konnten. Die veränderte Chemokingentranskription, mit der Darmschleimhaut-Makrophagen auf Stx1 reagierten, könnte in einer Störung des „stromal address code“ (186) münden und durch die unkoordinierte Zirkulation der Abwehrzellen immunologische Lücken erzeugen, die eine adäquate Immunantwort des Wirtes gegen die STEC verzögern. Histologische Untersuchungen enthüllten, dass diese Stx-Zielzellen in der *Lamina propria* dicht unterhalb der Krypten in großer Anzahl vorkommen (E.A. Dean-Nystrom, National Animal Disease Center, ARS, USDA, U.S.A.; persönliche Mitteilung). Die Tatsache, dass Stx1 *in vivo* auf IEL wirkt, beweist, dass das Toxin tatsächlich bis in die *Lamina propria* gelangt (158). Die Verzögerung der Entwicklung einer systemischen, zellulären Immunität durch Stx2-bildende EHEC O157:H7 spricht ebenfalls dafür, dass beim Rind grössere Mengen an Stx aus dem Darm resorbiert werden (158). Vorkommen und funktionelle Bedeutung der Darmschleimhaut-Makrophagen lassen vermuten, dass diese Zellen als Multiplikatoren der Stx-Wirkung fungieren könnten. Eine detailierte Untersuchung der Rolle dieser Induktor- und Effektorzellen im Verlauf der bovinen STEC-Infektionen ist deshalb dringend geboten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Shigatoxin- (Stx-)induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Chemokine durch Epithelzellen ist ein zentrales Ereignis in der Pathogenese intestinaler Entzündungen, die beim Menschen durch Stx-bildende *E. coli* (STEC) hervorgerufen werden können. Das Vorkommen von Stx-Rezeptoren auf Zellen in Kolonkrypten des Rindes warf die Frage nach der Bedeutung dieser Zellen in der Pathogenese der STEC-Infektion des Rindes auf. In einem erstmals für infektions-immunologische Fragestellungen verwendeten *in vitro*-Modell boviner Kolonzellen wurde deshalb die Wirkung von Stx1 auf verschiedene Zellfunktionen mittels Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und reverser „Real time“ PCR untersucht.

In den aus der Darmschleimhaut von Schlachtrindern gewonnenen Kulturen primärer Kolonzellen lag der Anteil an Epithelzellen zwischen 80 und 95 %. Die Epithelzellen bildeten partiell „tight junctions“ aus. Eine im Vergleich zu CaCo-2-Zellen jedoch nur geringe Expression von Leitenzymen ließ auf eine bereits nach wenigen Tagen eintretende Entdifferenzierung der Zellen schließen. Trotzdem behielten sie die Fähigkeit zur Transkription und Sekretion ausgewählter Chemokine bei, wie durch reverse „Real time“ PCR und Granulozyten-Migrationsstudien nachgewiesen werden konnte.

Durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass 15 bis 20 % der kultivierten Epithelzellen über den Stx-Rezeptor CD77 verfügten. Die Expression von CD77 war bei Epithelzellen nicht nur an der Oberfläche, sondern vor allem intrazellulär in Kernnähe nachweisbar. Stx1 veränderte weder die zelluläre Verteilung des CD77 noch die epitheliale Apoptoserate. Die Untersuchung primärer Epithelzellkulturen mit reverser „Real time“ PCR ergab, dass unter der Wirkung von Stx1 eine geringgradige Zunahme von *mcp-1*-Transkripten auftrat. Keinen Einfluss dagegen übte Stx1 auf den Gehalt an mRNA für TGF-β sowie für Gro-α, RANTES und IL-8 aus. Migrationsstudien mit bovinen Granulozyten bestätigten, dass Stx1 auch die Sekretion granulozytotroper Chemokine aus Epithelzellen nicht veränderte.

Neben den Epithelzellen kamen in geringer Anzahl auch mesenchymale Zellen in den Primärkulturen vor. Ein Teil dieser Zellen wies eine starke, oberflächlich lokalisierte Stx-Rezeptor-Expression auf und reagierte auf Stx1 mit einer Rezeptor-Umverteilung von der Zelloberfäche in intrazelluläre Kompartimente. Darüberhinaus hatte die Inkubation mit Stx1 zwar nur einen geringradigen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität

mesenchymaler Kolonzellkulturen, führte aber zur Eliminierung der CD77-exprimierenden Zellpopulation.

Zur besseren funktionellen Charakterisierung der Stx-sensiblen Mesenchymalzellen wurden sie mit dem Plasmid pSVneo3 transfiziert und immortalisiert. Es entstanden mehrere Zellklone, von denen einer aufgrund seiner starken CD77-Expression zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurde. Die Zellen dieses Kolonzell-Klons exprimierten neben MHC I auch den Monozyten/Makrophagen-Marker CD14 sowie das auf myeloiden und dendritischen Zellen vorkommende CD172a. Unter Einwirkung von Stx1 kam es zu einer Umverteilung des Rezeptors von der Zelloberfläche in intrazelluläre Kompartimente. Auf LPS-Stimulation reagierten die Zellen mit einer erhöhten *il-12*-Transkription. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von LPS und Stx1 synthetisierten sie jedoch vermehrt *il-10*-mRNA. Außerdem induzierte Stx1 die Transkription der Chemokingene *il-8*, *gro-α*, *mcp-1* und *rantes*, die sich bei gleichzeitiger Einwirkung von LPS bis zum 70-fachen steigern ließ.

Die Ergebnisse zeigen, dass Stx1 für bovine Kolonepithelzellen nicht zytotoxisch ist. Bovine intestinale Epithelzellen sind auch im Hinblick auf die Sekretion ausgewählter Chemokine gegenüber Stx1 resistent. Im Bereich der Kolonkrypten des Rindes konnten jedoch erstmals mesenchymale Zellen als Zielzellen für Stx1 identifiziert werden. Durch ihre Fähigkeit, verschiedene Botenstoffe des Immunsystems zu exprimieren, könnten diese Zellen bei der STEC-Infektion des Rindes eine große Bedeutung besitzen.

VII. SUMMARY

Shiga toxin (Stx) induced secretion of pro-inflammatory chemokines by epithelial cells represents a central event in the pathogenesis of intestinal inflammation that can be provoked in humans by Stx-producing *E. coli* (STEC). The presence of Stx-receptors on bovine colonic crypt cells raised the question as to the role of epithelial cells during STEC-infections in cattle. Therefore, the effect of Stx1 on several cell functions was examined by flow cytometry, fluorescence microscopy and reverse Real-time PCR. Experiments were performed using an *in vitro*-model of bovine colonic cells firstly introduced for immunobiological studies.

In primary cultures of colonic cells isolated from gut specimens of slaughtered cattle, 80-95 % of the cells were of epithelial origin. The epithelial cells partially formed tight junctions. However, minimal expression of distinct marker enzymes as compared to CaCo-2 cells suggested, that the primary cell cultures started to dedifferentiate after a few days in culture. Nevertheless, the cells retained their abilities to transcribe and secrete certain chemokines proven by reverse Real-time PCR and granulocyte migration assays. Flow cytometry and fluorescence microscopy analyses revealed that 15-20 % of the epithelial cells possessed the Stx-receptor CD77. CD77 could be detected on the surface of epithelial cells, but was mainly located in the cytoplasma surrounding the nuclei. Stx1 neither had influence on the CD77 expression patterns nor the onset of apoptosis in epithelial cells. Examination of the primary cells` cytokine/chemokine profile by reverse Real-time PCR revealed a slight increase of *mcp-1*-transcripts in the presence of Stx1. Stx1 had no influence on the content of mRNA specific for TGF-β, Gro-α, RANTES and IL-8. Migration studies with bovine granulocytes confirmed that stimulation with Stx1 did not alter the release of granulocytotropic chemokines from epithelial cells.

Beside epithelial cells, primary colonic crypt cell cultures regularly contained low numbers of mesenchymal cells. These were characterized by a strong surface expression of CD77. In the presence of Stx1, the cells redistributed CD77 from the cell surface into intracellular compartments. Furthermore, incubation with Stx1 had a minor influence on the metabolic activity of mesenchymal cells but eliminated CD77-expressing cells from the cultures.

In order to better characterize these Stx-sensible, mesenchymal cells on a functional level, the cells were immortalized by transfection with the plasmid pSVneo3. From the resulting cell clones one was chosen for further characterization due to its strong expression of CD77. In addition to MHC I, the cloned cells expressed the monocyte/macrophage marker CD14 and the CD172a antigen, present on myeloid and dendritic cells. Stx1 affected the redistribution of CD77 from the cell surface into intracellular compartments. LPS-stimulation led to an increased *il-12*-transcription in these cells. However, when LPS and Stx1 were added to the cultures simultaneously, the cells produced elevated amounts of *il-10*-mRNA. Stx1 also induced the transcription of the chemokine genes *il-8*, *gro-α*, *mcp-1* and *rantes*, that were enhanced by up to 70-fold when LPS was also present.

The results demonstrate that Stx is not cytotoxic for bovine colonic epithelial cells. Furthermore, bovine intestinal epithelial cells are resistant to Stx1 with respect to the secretion of selected chemokines. This is the first study identifying mesenchymal cells as target cells for Stx1 in the bovine gut. Refering to their capability to express distinct mediators of the immune system, these cells may be of great relevance for the course of STEC-infections in cattle.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R. and Metz, C. N.** 2001. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. J Immunol **166** (12): 7556-7562.
2. **Abreu, M. T., Arnold, E. T., Thomas, L. S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B. and Arditi, M.** 2002. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. J Biol Chem **277** (23): 20431-20437.
3. **Abreu, M. T., Fukata, M. and Arditi, M.** 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. J Immunol **174** (8): 4453-4460.
4. **Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T. and Arditi, M.** 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. J Immunol **167** (3): 1609-1616.
5. **Acheson, D. W., Moore, R., De Breucker, S., Lincicome, L., Jacewicz, M., Skutelsky, E. and Keusch, G. T.** 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. Infect Immun **64** (8): 3294-3300.
6. **Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A. G., Trabulsi, L. R., Douce, G., Knutton, S. and Dougan, G.** 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. J Clin Microbiol **36** (3): 662-668.
7. **Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jornvall, H., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H.** 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood **96** (9): 3086-3093.
8. **Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol **2** (8): 675-680.
9. **Allan, C. H. and Trier, J. S.** 1991. Structure and permeability differ in subepithelial villus and Peyer's patch follicle capillaries. Gastroenterology **100** (5 Pt 1): 1172-1179.
10. **Arab, S. and Lingwood, C. A.** 1996. Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: comparison of a supported bilayer film and liposomes. Glycoconj J **13** (2): 159-166.
11. **Arab, S. and Lingwood, C. A.** 1998. Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. J Cell Physiol **177** (4): 646-660.
12. **Ayabe, T., Ashida, T., Kohgo, Y. and Kono, T.** 2004. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. Trends Microbiol **12** (8): 394-398.
13. **Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E. and Ouellette, A. J.** 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol **1** (2): 113-118.
14. **Babyatsky, M. W., deBeaumont, M., Thim, L. and Podolsky, D. K.** 1996. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. Gastroenterology **110** (2): 489-497.

15. **Baggiolini, M.** 1998. Chemokines and leukocyte traffic. Nature **392** (6676): 565-568.

16. **Berin, M. C., Darfeuille-Michaud, A., Egan, L. J., Miyamoto, Y. and Kagnoff, M. F.** 2002. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. Cell Microbiol **4** (10): 635-648.

17. **Bevins, C. L.** 2004. The Paneth cell and the innate immune response. Curr Opin Gastroenterol **20** (6): 572-580.

18. **Bevins, C. L., Martin-Porter, E. and Ganz, T.** 1999. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. Gut **45** (6): 911-915.

19. **Bitzan, M., Richardson, S., Huang, C., Boyd, B., Petric, M. and Karmali, M. A.** 1994. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. Infect Immun **62** (8): 3337-3347.

20. **Björk, S., Breimer, M. E., Hansson, G. C., Karlsson, K. A. and Leffler, H.** 1987. Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. J Biol Chem **262** (14): 6758-6765.

21. **Bland, P. W. and Whiting, C. V.** 1992. Induction of MHC class II gene products in rat intestinal epithelium during graft-versus-host disease and effects on the immune function of the epithelium. Immunology **75** (2): 366-371.

22. **Blumberg, R. S.** 1998. Current concepts in mucosal immunity. II. One size fits all: nonclassical MHC molecules fulfill multiple roles in epithelial cell function. Am J Physiol **274** (2 Pt 1): G227-231.

23. **Boyd, B., Tyrrell, G., Maloney, M., Gyles, C., Brunton, J. and Lingwood, C.** 1993. Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targetting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. J Exp Med **177** (6): 1745-1753.

24. **Brandtzaeg, P.** 1999. Regionalized immune function of tonsils and adenoids. Immunol Today **20** (8): 383-384.

25. **Brandtzaeg, P.** 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. Int J Med Microbiol **293** (1): 3-15.

26. **Brandtzaeg, P., Farstad, I. N., Johansen, F. E., Morton, H. C., Norderhaug, I. N. and Yamanaka, T.** 1999. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. Immunol Rev **171**: 45-87.

27. **Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and McMichael, A. J.** 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature **391** (6669): 795-799.

28. **Brooke, G. P., Parsons, K. R. and Howard, C. J.** 1998. Cloning of two members of the SIRP alpha family of protein tyrosine phosphatase binding proteins in cattle that are expressed on monocytes and a subpopulation of dendritic cells and which mediate binding to CD4 T cells. Eur J Immunol **28** (1): 1-11.

29. **Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J. and Volpe, F.** 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. Nat Cell Biol **2** (6): 346-351.

30. **Butcher, E. C. and Picker, L. J.** 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. Science **272** (5258): 60-66.

31. **Cepek, K. L., Parker, C. M., Madara, J. L. and Brenner, M. B.** 1993. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. J Immunol **150** (8 Pt 1): 3459-3470.

32. **Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W. L. and Boismenu, R.** 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A **99** (22): 14338-14343.

33. **Chen, Y. and Zychlinsky, A.** 1994. Apoptosis induced by bacterial pathogens. Microb Pathog **17** (4): 203-212.

34. **Cheroutre, H.** 2005. IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium. Immunol Rev **206** (1): 114-131.

35. **Chesney, J. and Bucala, R.** 1997. Peripheral blood fibrocytes: novel fibroblast-like cells that present antigen and mediate tissue repair. Biochem Soc Trans **25** (2): 520-524.

36. **Cornick, N. A., Booher, S. L., Casey, T. A. and Moon, H. W.** 2000. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. Appl Environ Microbiol **66** (11): 4926-4934.

37. **Cornick, N. A., Booher, S. L. and Moon, H. W.** 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. Infect Immun **70** (5): 2704-2707.

38. **Cray, W. C., Jr. and Moon, H. W.** 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol **61** (4): 1586-1590.

39. **Dallas, S. D. and Rolfe, R. D.** 1998. Binding of *Clostridium difficile* toxin A to human milk secretory component. J Med Microbiol **47** (10): 879-888.

40. **Dean-Nystrom, E. A., Bosworth, B. T., Cray, W. C., Jr. and Moon, H. W.** 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect Immun **65** (5): 1842-1848.

41. **DeGrandis, S., Law, H., Brunton, J., Gyles, C. and Lingwood, C. A.** 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. J Biol Chem **264** (21): 12520-12525.

42. **DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S. and Finlay, B. B.** 1999. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. Infect Immun **67** (5): 2389-2398.

43. **Di Nardo, A., Vitiello, A. and Gallo, R. L.** 2003. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. J Immunol **170** (5): 2274-2278.

44. **Diamond, G. and Bevins, C. L.** 1998. beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. Clin Immunol Immunopathol **88** (3): 221-225.

45. **Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L. and Bevins, C. L.** 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A **88** (9): 3952-3956.

46. **Dickinson, B. L., Badizadegan, K., Wu, Z., Ahouse, J. C., Zhu, X., Simister, N. E., Blumberg, R. S. and Lencer, W. I.** 1999. Bidirectional FcRn-dependent

IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. J Clin Invest **104** (7): 903-911.

47. Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L. and Podolsky, D. K. 1994. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. J Clin Invest **94** (1): 376-383.

48. Dwinell, M. B., Johanesen, P. A. and Smith, J. M. 2003. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. Surgery **133** (6): 601-607.

49. Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A. U., Kramer, S., Deibel, C., Guzman, C. A. and Chakraborty, T. 1998. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. Mol Microbiol **30** (1): 147-161.

50. Eisenhauer, P. B. and Lehrer, R. I. 1992. Mouse neutrophils lack defensins. Infect Immun **60** (8): 3446-3447.

51. Ellis, J. A., Davis, W. C., MacHugh, N. D., Emery, D. L., Kaushal, A. and Morrison, W. I. 1988. Differentiation antigens on bovine mononuclear phagocytes identified by monoclonal antibodies. Vet Immunol Immunopathol **19** (3-4): 325-340.

52. Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., Salamero, J. and Johannes, L. 2001. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. Mol Biol Cell **12** (8): 2453-2468.

53. Farstad, I. N., Halstensen, T. S., Fausa, O. and Brandtzaeg, P. 1994. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. Immunology **83** (3): 457-464.

54. Fernandez-Estivariz, C., Gu, L. H., Gu, L., Jonas, C. R., Wallace, T. M., Pascal, R. R., Devaney, K. L., Farrell, C. L., Jones, D. P., Podolsky, D. K. and Ziegler, T. R. 2003. Trefoil peptide expression and goblet cell number in rat intestine: effects of KGF and fasting-refeeding. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284** (2): R564-573.

55. Finzi, G., Cornaggia, M., Capella, C., Fiocca, R., Bosi, F., Solcia, E. and Samloff, I. M. 1993. Cathepsin E in follicle associated epithelium of intestine and tonsils: localization to M cells and possible role in antigen processing. Histochemistry **99** (3): 201-211.

56. Föllmann, W., Weber, S. and Birkner, S. 2000. Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. Toxicol In Vitro **14** (5): 435-445.

57. Forstner, J. F. 1978. Intestinal mucins in health and disease. Digestion **17** (3): 234-263.

58. Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B. and Knutton, S. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol Microbiol **30** (5): 911-921.

59. Fraser, M. E., Chernaia, M. M., Kozlov, Y. V. and James, M. N. 1994. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 A resolution. Nat Struct Biol **1** (1): 59-64.

60. Gangur, V., Birmingham, N. P. and Thanesvorakul, S. 2002. Chemokines in health and disease. Vet Immunol Immunopathol **86** (3-4): 127-136.

61. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol **3** (9): 710-720.

62. **Ganz, T.** 2000. Paneth cells--guardians of the gut cell hatchery. Nat Immunol **1** (2): 99-100.

63. **Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F. and Lehrer, R. I.** 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest **76** (4): 1427-1435.

64. **Garcia, A., Bosques, C. J., Wishnok, J. S., Feng, Y., Karalius, B. J., Butterton, J. R., Schauer, D. B., Rogers, A. B. and Fox, J. G.** 2006. Renal Injury Is a Consistent Finding in Dutch Belted Rabbits Experimentally Infected with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Infect Dis **193** (8): 1125-1134.

65. **Garcia, A. and Fox, J. G.** 2003. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis **9** (12): 1592-1597.

66. **Garred, O., van Deurs, B. and Sandvig, K.** 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. J Biol Chem **270** (18): 10817-10821.

67. **Gebert, A.** 1997. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. Histochem Cell Biol **108** (6): 455-470.

68. **Gentry, M. K. and Dalrymple, J. M.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. J Clin Microbiol **12** (3): 361-366.

69. **Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. and Madara, J. L.** 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol **167** (4): 1882-1885.

70. **Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S. K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S. P., Crabb, J. W., Ganz, T. and Bevins, C. L.** 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. Nat Immunol **3** (6): 583-590.

71. **Giannasca, P. J., Giannasca, K. T., Falk, P., Gordon, J. I. and Neutra, M. R.** 1994. Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. Am J Physiol **267** (6 Pt 1): G1108-1121.

72. **Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. and Bouvet, P.** 1999. Structure and functions of nucleolin. J Cell Sci **112 (Pt 6)**: 761-772.

73. **Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. and Sansonetti, P. J.** 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem **278** (11): 8869-8872.

74. **Giugliano, L. G., Ribeiro, S. T., Vainstein, M. H. and Ulhoa, C. J.** 1995. Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol **42** (1): 3-9.

75. **Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H. and Spies, T.** 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. Proc Natl Acad Sci U S A **96** (12): 6879-6884.

76. **Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. and Spies, T.** 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. Science **279** (5357): 1737-1740.

77. **Hall, G. A., Sopp, P. and Howard, C. J.** 1993. An investigation of temporary workshop clusters reacting with cells of the mononuclear phagocytic system. Vet Immunol Immunopathol **39** (1-3): 225-236.

78. **Havran, W. L., Jameson, J. M. and Witherden, D. A.** 2005. Epithelial cells and their neighbors. III. Interactions between intraepithelial lymphocytes and

neighboring epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289** (4): G627-630.

79. **Hay, E. D. and Zuk, A.** 1995. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. Am J Kidney Dis **26** (4): 678-690.

80. **Hecht, G.** 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. Am J Physiol **277** (3 Pt 1): C351-358.

81. **Henderson, B., Poole, S. and Wilson, M.** 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. Microbiol Rev **60** (2): 316-341.

82. **Henderson, B., Wilson, M. and Wren, B.** 1997. Are bacterial exotoxins cytokine network regulators? Trends Microbiol **5** (11): 454-458.

83. **Hermosilla, C., Zahner, H. and Taubert, A.** 2006. *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. Int J Parasitol **36** (4): 423-431.

84. **Hershberg, R. M., Cho, D. H., Youakim, A., Bradley, M. B., Lee, J. S., Framson, P. E. and Nepom, G. T.** 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. J Clin Invest **102** (4): 792-803.

85. **Hershberg, R. M., Framson, P. E., Cho, D. H., Lee, L. Y., Kovats, S., Beitz, J., Blum, J. S. and Nepom, G. T.** 1997. Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. J Clin Invest **100** (1): 204-215.

86. **Hershberg, R. M. and Mayer, L. F.** 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. Immunol Today **21** (3): 123-128.

87. **Heyderman, R. S., Soriani, M. and Hirst, T. R.** 2001. Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? Trends Microbiol **9** (6): 262-266.

88. **Hoey, D. E., Currie, C., Else, R. W., Nutikka, A., Lingwood, C. A., Gally, D. L. and Smith, D. G.** 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. J Med Microbiol **51** (2): 143-149.

89. **Hoey, D. E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C. A., Gally, D. L. and Smith, D. G.** 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. Cell Microbiol **5** (2): 85-97.

90. **Holgersson, J., Jovall, P. A. and Breimer, M. E.** 1991. Glycosphingolipids of human large intestine: detailed structural characterization with special reference to blood group compounds and bacterial receptor structures. J Biochem (Tokyo) **110** (1): 120-131.

91. **Hornef, M. W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S. and Richter-Dahlfors, A.** 2002. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. J Exp Med **195** (5): 559-570.

92. **Hornef, M. W., Normark, B. H., Vandewalle, A. and Normark, S.** 2003. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. J Exp Med **198** (8): 1225-1235.

93. **Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D. and MacPherson, G. G.** 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells

transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp Med **191** (3): 435-444.

94. **Hurley, B. P., Jacewicz, M., Thorpe, C. M., Lincicome, L. L., King, A. J., Keusch, G. T. and Acheson, D. W.** 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. Infect Immun **67** (12): 6670-6677.

95. **Hurley, B. P., Thorpe, C. M. and Acheson, D. W.** 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. Infect Immun **69** (10): 6148-6155.

96. **Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., Dinh, T. H., Pearson, J. A., Chen, S. L. and Magun, B. E.** 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. Mol Cell Biol **17** (6): 3373-3381.

97. **Israel, E. J., Taylor, S., Wu, Z., Mizoguchi, E., Blumberg, R. S., Bhan, A. and Simister, N. E.** 1997. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. Immunology **92** (1): 69-74.

98. **Iwasaki, A. and Kelsall, B. L.** 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. J Exp Med **191** (8): 1381-1394.

99. **Iwasaki, A. and Kelsall, B. L.** 2001. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. J Immunol **166** (8): 4884-4890.

100. **Izadpanah, A., Dwinell, M. B., Eckmann, L., Varki, N. M. and Kagnoff, M. F.** 2001. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280** (4): G710-719.

101. **Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, A. and Keusch, G. T.** 1986. Pathogenesis of *shigella* diarrhea. XI. Isolation of a *shigella* toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. J Exp Med **163** (6): 1391-1404.

102. **Jacewicz, M. S., Acheson, D. W., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe, A., Balasubramanian, K. A. and Keusch, G. T.** 1995. Maturational regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. J Clin Invest **96** (3): 1328-1335.

103. **Jeffrey, G. P., Oates, P. S., Wang, T. C., Babyatsky, M. W. and Brand, S. J.** 1994. Spasmolytic polypeptide: a trefoil peptide secreted by rat gastric mucous cells. Gastroenterology **106** (2): 336-345.

104. **Johansen, F. E., Braathen, R. and Brandtzaeg, P.** 2001. The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. J Immunol **167** (9): 5185-5192.

105. **Johansen, F. E., Braathen, R. and Brandtzaeg, P.** 2000. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. Scand J Immunol **52** (3): 240-248.

106. **Jones, N. L., Islur, A., Haq, R., Mascarenhas, M., Karmali, M. A., Perdue, M. H., Zanke, B. W. and Sherman, P. M.** 2000. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278** (5): G811-819.

107. Jungi, T. W., Sager, H., Adler, H., Brcic, M. and Pfister, H. 1997. Serum factors, cell membrane CD14, and beta2 integrins are not required for activation of bovine macrophages by lipopolysaccharide. Infect Immun **65** (9): 3577-3584.

108. Kabelitz, D., Marischen, L., Oberg, H. H., Holtmeier, W. and Wesch, D. 2005. Epithelial defence by gamma delta T cells. Int Arch Allergy Immunol **137** (1): 73-81.

109. Kagnoff, M. F. and Eckmann, L. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. J Clin Invest **100** (1): 6-10.

110. Kaiserlian, D., Vidal, K. and Revillard, J. P. 1989. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells. Eur J Immunol **19** (8): 1513-1516.

111. Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol **2** (2): 123-140.

112. Karam, S. M. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Front Biosci **4**: D286-298.

113. Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev **2** (1): 15-38.

114. Katagiri, Y. U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., Kiyokawa, N. and Fujimoto, J. 1999. Activation of Src family kinase yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. J Biol Chem **274** (49): 35278-35282.

115. Kelsall, B. L. and Strober, W. 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. J Exp Med **183** (1): 237-247.

116. Kennedy, J., Kelner, G. S., Kleyensteuber, S., Schall, T. J., Weiss, M. C., Yssel, H., Schneider, P. V., Cocks, B. G., Bacon, K. B. and Zlotnik, A. 1995. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. J Immunol **155** (1): 203-209.

117. Kenny, B. and Finlay, B. B. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A **92** (17): 7991-7995.

118. Kharitonenkov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J. and Ullrich, A. 1997. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. Nature **386** (6621): 181-186.

119. Kim, J. M., Eckmann, L., Savidge, T. C., Lowe, D. C., Witthoft, T. and Kagnoff, M. F. 1998. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. J Clin Invest **102** (10): 1815-1823.

120. Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Lynch-Devaney, K. and Podolsky, D. K. 1995. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. Gastroenterology **109** (2): 516-523.

121. King, A. J., Sundaram, S., Cendoroglo, M., Acheson, D. W. and Keusch, G. T. 1999. Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters. J Infect Dis **179** (2): 503-507.

122. Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. Nature **416** (6877): 194-199.

123. Kraehenbuhl, J. P. and Neutra, M. R. 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 301-332.

124. Kristoffersen, E. K. 1996. Human placental Fc gamma-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG. APMIS Suppl **64**: 5-36.

125. Laing, K. J. and Secombes, C. J. 2004. Chemokines. Dev Comp Immunol **28** (5): 443-460.

126. Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S. Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nunez, G. and Keshav, S. 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. Gastroenterology **125** (1): 47-57.

127. Lamm, M. E. 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Annu Rev Microbiol **51**: 311-340.

128. Leach, J. L., Sedmak, D. D., Osborne, J. M., Rahill, B., Lairmore, M. D. and Anderson, C. L. 1996. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. J Immunol **157** (8): 3317-3322.

129. Lehrer, R. I. and Ganz, T. 2002. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. Curr Opin Hematol **9** (1): 18-22.

130. Lencer, W. I., Cheung, G., Strohmeier, G. R., Currie, M. G., Ouellette, A. J., Selsted, M. E. and Madara, J. L. 1997. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptdins 2 and 3. Proc Natl Acad Sci U S A **94** (16): 8585-8589.

131. Leutenegger, C. M., Alluwaimi, A. M., Smith, W. L., Perani, L. and Cullor, J. S. 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. Vet Immunol Immunopathol **77** (3-4): 275-287.

132. Lingwood, C. A. 1999. Glycolipid receptors for verotoxin and *Helicobacter pylori*: role in pathology. Biochim Biophys Acta **1455** (2-3): 375-386.

133. Lingwood, C. A. 1993. Verotoxins and their glycolipid receptors. Adv Lipid Res **25**: 189-211.

134. Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J. L., De Grandis, S. and Karmali, M. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. J Biol Chem **262** (18): 8834-8839.

135. Luan, Y. and Griffiths, H. R. 2006. Ceramides reduce CD36 cell surface expression and oxidised LDL uptake by monocytes and macrophages. Arch Biochem Biophys.

136. Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. and Flavell, R. A. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A **101** (15): 5598-5603.

137. Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L. and Hollingsworth, M. A. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am J Physiol **276** (4 Pt 1): G941-950.

138. Macpherson, A. J. and Harris, N. L. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol **4** (6): 478-485.

139. Magnuson, B. A., Davis, M., Hubele, S., Austin, P. R., Kudva, I. T., Williams, C. J., Hunt, C. W. and Hovde, C. J. 2000. Ruminant gastrointestinal cell proliferation and clearance of *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun **68** (7): 3808-3814.

140. **Mahida, Y. R.** 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol **18** (2): 241-253.
141. **Mainil, J. G. and Daube, G.** 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? J Appl Microbiol **98** (6): 1332-1344.
142. **Man, A. L., Prieto-Garcia, M. E. and Nicoletti, C.** 2004. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? Immunology **113** (1): 15-22.
143. **Mantis, N. J., Cheung, M. C., Chintalacharuvu, K. R., Rey, J., Corthesy, B. and Neutra, M. R.** 2002. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. J Immunol **169** (4): 1844-1851.
144. **Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M.** 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol **25** (12): 677-686.
145. **Marshall, L. J., Perks, B., Ferkol, T. and Shute, J. K.** 2001. IL-8 released constitutively by primary bronchial epithelial cells in culture forms an inactive complex with secretory component. J Immunol **167** (5): 2816-2823.
146. **Martin, E., Ganz, T. and Lehrer, R. I.** 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. J Leukoc Biol **58** (2): 128-136.
147. **Matise, I., Cornick, N. A., Samuel, J. E. and Moon, H. W.** 2003. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. Infect Immun **71** (9): 5194-5201.
148. **Maury, J., Nicoletti, C., Guzzo-Chambraud, L. and Maroux, S.** 1995. The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. Eur J Biochem **228** (2): 323-331.
149. **Mayer, L., Eisenhardt, D., Salomon, P., Bauer, W., Plous, R. and Piccinini, L.** 1991. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. Gastroenterology **100** (1): 3-12.
150. **McClugage, S. G., Low, F. N. and Zimny, M. L.** 1986. Porosity of the basement membrane overlying Peyer's patches in rats and monkeys. Gastroenterology **91** (5): 1128-1133.
151. **McKeever, D. J., MacHugh, N. D., Goddeeris, B. M., Awino, E. and Morrison, W. I.** 1991. Bovine afferent lymph veiled cells differ from blood monocytes in phenotype and accessory function. J Immunol **147** (11): 3703-3709.
152. **Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol **1** (2): 135-145.
153. **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature **388** (6640): 394-397.
154. **Melmed, G., Thomas, L. S., Lee, N., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Zhou, Y., Hu, B., Arditi, M. and Abreu, M. T.** 2003. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. J Immunol **170** (3): 1406-1415.
155. **Menge, C., Blessenohl, M., Eisenberg, T., Stamm, I. and Baljer, G.** 2004. Bovine ileal intraepithelial lymphocytes represent target cells for Shiga toxin 1 from *Escherichia coli*. Infect Immun **72** (4): 1896-1905.

156. **Menge, C., Eisenberg, T., Stamm, I. and Baljer, G.** 2006. Comparison of binding and effects of *Escherichia coli* Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes. Vet Immunol Immunopathol **113**: 392-403.

157. **Menge, C., Stamm, I., Blessenohl, M., Wieler, L. H. and Baljer, G.** 2003. Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb3/CD77+ bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha. Exp Biol Med (Maywood) **228** (4): 377-386.

158. **Menge, C., Stamm, I., Van Diemen, P. M., Sopp, P., Baljer, G., Wallis, T. S. and Stevens, M. P.** 2004. Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. J Med Microbiol **53** (Pt 6): 573-579.

159. **Menge, C., Wieler, L. H., Schlapp, T. and Baljer, G.** 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. Infect Immun **67** (5): 2209-2217.

160. **Miyamoto, Y., Iimura, M., Kaper, J. B., Torres, A. G. and Kagnoff, M. F.** 2006. Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. Cell Microbiol **8** (5): 869-879.

161. **Mobassaleh, M., Gross, S. K., McCluer, R. H., Donohue-Rolfe, A. and Keusch, G. T.** 1989. Quantitation of the rabbit intestinal glycolipid receptor for Shiga toxin. Further evidence for the developmental regulation of globotriaosylceramide in microvillus membranes. Gastroenterology **97** (2): 384-391.

162. **Mosser, D. M.** 2003. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol **73** (2): 209-212.

163. **Moussay, E., Stamm, I., Taubert, A., Baljer, G. and Menge, C.** 2006. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol **113**: 367-382.

164. **Moxley, R. A.** 2004. *Escherichia coli* 0157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. Anim Health Res Rev **5** (1): 15-33.

165. **Moyer, M. P., Dixon, P. S., Rothman, S. W. and Brown, J. E.** 1987. Cytotoxicity of Shiga toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. Infect Immun **55** (6): 1533-1535.

166. **Nataro, J. P. and Kaper, J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev **11** (1): 142-201.

167. **Naylor, S. W., Low, J. C., Besser, T. E., Mahajan, A., Gunn, G. J., Pearce, M. C., McKendrick, I. J., Smith, D. G. and Gally, D. L.** 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. Infect Immun **71** (3): 1505-1512.

168. **Neish, A. S.** 2004. Molecular aspects of intestinal epithelial cell-bacterial interactions that determine the development of intestinal inflammation. Inflamm Bowel Dis **10** (2): 159-168.

169. **Neutra, M. R.** 1998. Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. Am J Physiol **274** (5 Pt 1): G785-791.

170. **Neutra, M. R., Frey, A. and Kraehenbuhl, J. P.** 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. Cell **86** (3): 345-348.

171. **Neutra, M. R., Mantis, N. J. and Kraehenbuhl, J. P.** 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nat Immunol **2** (11): 1004-1009.

172. **Neutra, M. R., Phillips, T. L., Mayer, E. L. and Fishkind, D. J.** 1987. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. Cell Tissue Res **247** (3): 537-546.

173. **Nguyen, T. X., Cole, A. M. and Lehrer, R. I.** 2003. Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. Peptides **24** (11): 1647-1654.

174. **Niedergang, F., Didierlaurent, A., Kraehenbuhl, J. P. and Sirard, J. C.** 2004. Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens? Trends Microbiol **12** (2): 79-88.

175. **O'Brien, A. D. and Holmes, R. K.** 1987. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev **51** (2): 206-220.

176. **O'Brien, A. D., LaVeck, G. D., Thompson, M. R. and Formal, S. B.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis **146** (6): 763-769.

177. **O'Loughlin, E. V. and Robins-Browne, R. M.** 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. Microbes Infect **3** (6): 493-507.

178. **Ogra, P. L., Jiri Mestecky, Michael E. Lamm, Warren Strober, John Bienenstock, Jerry R. McGhee**. 1999. Mucosal Immunology. 2nd edition. Academic Press, San Diego

179. **Ohmi, K., Kiyokawa, N., Takeda, T. and Fujimoto, J.** 1998. Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. Biochem Biophys Res Commun **251** (1): 137-141.

180. **Okada, H., Danoff, T. M., Kalluri, R. and Neilson, E. G.** 1997. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. Am J Physiol **273** (4 Pt 2): F563-574.

181. **Ouellette, A. J. and Selsted, M. E.** 1996. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. Faseb J **10** (11): 1280-1289.

182. **Owen, R. L.** 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. Gastroenterology **72** (3): 440-451.

183. **Owen, R. L.** 1999. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. Semin Immunol **11** (3): 157-163.

184. **Paiba, G. A., Gibbens, J. C., Pascoe, S. J., Wilesmith, J. W., Kidd, S. A., Byrne, C., Ryan, J. B., Smith, R. P., McLaren, M., Futter, R. J., Kay, A. C., Jones, Y. E., Chappell, S. A., Willshaw, G. A. and Cheasty, T.** 2002. Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain. Vet Rec **150** (19): 593-598.

185. **Pappo, J. and Owen, R. L.** 1988. Absence of secretory component expression by epithelial cells overlying rabbit gut-associated lymphoid tissue. Gastroenterology **95** (5): 1173-1177.

186. **Parsonage, G., Filer, A. D., Haworth, O., Nash, G. B., Rainger, G. E., Salmon, M. and Buckley, C. D.** 2005. A stromal address code defined by fibroblasts. Trends Immunol **26** (3): 150-156.

187. **Paton, J. C. and Paton, A. W.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev **11** (3): 450-479.

188. **Pauly, T., Elbers, K., Konig, M., Lengsfeld, T., Saalmuller, A. and Thiel, H. J.** 1995. Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. J Gen Virol **76 (Pt 12)**: 3039-3049.

189. **Pearson, G. R., Bazeley, K. J., Jones, J. R., Gunning, R. F., Green, M. J., Cookson, A. and Woodward, M. J.** 1999. Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animals with dysentery. Vet Rec **145** (13): 370-373.

190. **Pellizzari, A., Pang, H. and Lingwood, C. A.** 1992. Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. Biochemistry **31** (5): 1363-1370.

191. **Penny, L. A., Armstrong, D. G., Baxter, G., Hogg, C., Kindahl, H., Bramley, T., Watson, E. D. and Webb, R.** 1998. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the bovine corpus luteum around the time of natural luteolysis. Biol Reprod **59** (6): 1464-1469.

192. **Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J. P., Edelman, L., Sansonetti, P. J. and Corthesy, B.** 2002. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. Immunity **17** (1): 107-115.

193. **Phalipon, A. and Sansonetti, P. J.** 1999. Microbial-host interactions at mucosal sites. Host response to pathogenic bacteria at mucosal sites. Curr Top Microbiol Immunol **236**: 163-189.

194. **Philpott, D. J., Ackerley, C. A., Kiliaan, A. J., Karmali, M. A., Perdue, M. H. and Sherman, P. M.** 1997. Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. Am J Physiol **273** (6 Pt 1): G1349-1358.

195. **Pitman, R. S. and Blumberg, R. S.** 2000. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. J Gastroenterol **35** (11): 805-814.

196. **Podolsky, D. K., Lynch-Devaney, K., Stow, J. L., Oates, P., Murgue, B., DeBeaumont, M., Sands, B. E. and Mahida, Y. R.** 1993. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. J Biol Chem **268** (9): 6694-6702.

197. **Porter, E. M., van Dam, E., Valore, E. V. and Ganz, T.** 1997. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. Infect Immun **65** (6): 2396-2401.

198. **Porter, P. and Linggood, M. A.** 1983. Novel mucosal anti-microbial functions interfering with the plasmid-mediated virulence determinants of adherence and drug resistance. Ann N Y Acad Sci **409**: 564-579.

199. **Powell, D. W., Adegboyega, P. A., Di Mari, J. F. and Mifflin, R. C.** 2005. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289** (1): G2-7.

200. **Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I. and West, A. B.** 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. Am J Physiol **277** (1 Pt 1): C1-9.

201. **Prigozy, T. I. and Kronenberg, M.** 1998. Presentation of bacterial lipid antigens by CD1 molecules. Trends Microbiol **6** (11): 454-459.

202. **Proulx, F., Seidman, E. G. and Karpman, D.** 2001. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. Pediatr Res **50** (2): 163-171.

203. Pruimboom-Brees, I. M., Morgan, T. W., Ackermann, M. R., Nystrom, E. D., Samuel, J. E., Cornick, N. A. and Moon, H. W. 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. Proc Natl Acad Sci U S A **97** (19): 10325-10329.

204. Quayle, A. J., Porter, E. M., Nussbaum, A. A., Wang, Y. M., Brabec, C., Yip, K. P. and Mok, S. C. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. Am J Pathol **152** (5): 1247-1258.

205. Ramegowda, B. and Tesh, V. L. 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. Infect Immun **64** (4): 1173-1180.

206. Raulet, D. H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat Rev Immunol **3** (10): 781-790.

207. Reibman, J., Hsu, Y., Chen, L. C., Bleck, B. and Gordon, T. 2003. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. Am J Respir Cell Mol Biol **28** (6): 648-654.

208. Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P. and Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol **2** (4): 361-367.

209. Rhee, S. H., Keates, A. C., Moyer, M. P. and Pothoulakis, C. 2004. MEK is a key modulator for TLR5-induced interleukin-8 and MIP3alpha gene expression in non-transformed human colonic epithelial cells. J Biol Chem **279** (24): 25179-25188.

210. Richardson, S. E., Rotman, T. A., Jay, V., Smith, C. R., Becker, L. E., Petric, M., Olivieri, N. F. and Karmali, M. A. 1992. Experimental verocytotoxemia in rabbits. Infect Immun **60** (10): 4154-4167.

211. Ritonja, A., Kopitar, M., Jerala, R. and Turk, V. 1989. Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes. FEBS Lett **255** (2): 211-214.

212. Robinson, C. M., Sinclair, J. F., Smith, M. J. and O'Brien, A. D. 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Proc Natl Acad Sci U S A **103** (25): 9667-9672.

213. Roe, A. J., Hoey, D. E. and Gally, D. L. 2003. Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. Biochem Soc Trans **31** (Pt 1): 98-103.

214. Rogers, T. J., Paton, A. W., McColl, S. R. and Paton, J. C. 2003. Enhanced CXC chemokine responses of human colonic epithelial cells to locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun **71** (10): 5623-5632.

215. Rose, F. R., Bailey, K., Keyte, J. W., Chan, W. C., Greenwood, D. and Mahida, Y. R. 1998. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. Infect Immun **66** (7): 3255-3263.

216. Rumio, C., Besusso, D., Palazzo, M., Selleri, S., Sfondrini, L., Dubini, F., Menard, S. and Balsari, A. 2004. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. Am J Pathol **165** (2): 373-381.

217. **Rutjes, N. W., Binnington, B. A., Smith, C. R., Maloney, M. D. and Lingwood, C. A.** 2002. Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model. Kidney Int **62** (3): 832-845.

218. **Samuel, J. E., Perera, L. P., Ward, S., O'Brien, A. D., Ginsburg, V. and Krivan, H. C.** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. Infect Immun **58** (3): 611-618.

219. **Sands, B. E. and Podolsky, D. K.** 1996. The trefoil peptide family. Annu Rev Physiol **58**: 253-273.

220. **Sandvig, K., Garred, O., Holm, P. K. and van Deurs, B.** 1993. Endocytosis and intracellular transport of protein toxins. Biochem Soc Trans **21 (Pt 3)** (3): 707-711.

221. **Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H. and van Deurs, B.** 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. Nature **358** (6386): 510-512.

222. **Sandvig, K., Ryd, M., Garred, O., Schweda, E., Holm, P. K. and van Deurs, B.** 1994. Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. J Cell Biol **126** (1): 53-64.

223. **Sandvig, K. and van Deurs, B.** 1994. Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. FEBS Lett **346** (1): 99-102.

224. **Sandvig, K. and van Deurs, B.** 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. Physiol Rev **76** (4): 949-966.

225. **Sansonetti, P. J.** 2004. War and peace at mucosal surfaces. Nat Rev Immunol **4** (12): 953-964.

226. **Savidge, T. C. and Smith, M. W.** 1995. Evidence that membranous (M) cell genesis is immuno-regulated. Adv Exp Med Biol **371A**: 239-241.

227. **Sawada, N., Murata, M., Kikuchi, K., Osanai, M., Tobioka, H., Kojima, T. and Chiba, H.** 2003. Tight junctions and human diseases. Med Electron Microsc **36** (3): 147-156.

228. **Saxena, S. K., O'Brien, A. D. and Ackerman, E. J.** 1989. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into Xenopus oocytes. J Biol Chem **264** (1): 596-601.

229. **Schüller, S., Frankel, G. and Phillips, A. D.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. Cell Microbiol **6** (3): 289-301.

230. **Selsted, M. E. and Ouellette, A. J.** 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Nat Immunol **6** (6): 551-557.

231. **Shao, L., Kamalu, O. and Mayer, L.** 2005. Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. Immunol Rev **206** (1): 160-176.

232. **Shao, L., Serrano, D. and Mayer, L.** 2001. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. Semin Immunol **13** (3): 163-176.

233. **Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J. P. and Sirard, J. C.** 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A **98** (24): 13722-13727.

234. **Sinclair, J. F., Dean-Nystrom, E. A. and O'Brien, A. D.** 2006. 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 **74** (2): 1255-1265.

235. Smith, D. G., Naylor, S. W. and Gally, D. L. 2002. Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle. Int J Med Microbiol **292** (3-4): 169-183.

236. Smith, P. D., Janoff, E. N., Mosteller-Barnum, M., Merger, M., Orenstein, J. M., Kearney, J. F. and Graham, M. F. 1997. Isolation and purification of CD14-negative mucosal macrophages from normal human small intestine. J Immunol Methods **202** (1): 1-11.

237. Smith, P. D., Ochsenbauer-Jambor, C. and Smythies, L. E. 2005. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. Immunol Rev **206** (1): 149-159.

238. Smith, P. D., Smythies, L. E., Mosteller-Barnum, M., Sibley, D. A., Russell, M. W., Merger, M., Sellers, M. T., Orenstein, J. M., Shimada, T., Graham, M. F. and Kubagawa, H. 2001. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. J Immunol **167** (5): 2651-2656.

239. Smollich, A., Michel, G. 1992. Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag Jena

240. Snoeck, V., Goddeeris, B. and Cox, E. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. Microbes Infect **7** (7-8): 997-1004.

241. Somnay-Wadgaonkar, K., Nusrat, A., Kim, H. S., Canchis, W. P., Balk, S. P., Colgan, S. P. and Blumberg, R. S. 1999. Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form. Int Immunol **11** (3): 383-392.

242. Stamm, I., Wuhrer, M., Geyer, R., Baljer, G. and Menge, C. 2002. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1. Microb Pathog **33** (6): 251-264.

243. Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E. and Nusslein-Volhard, C. 1991. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. Cell **65** (5): 725-735.

244. Stevens, M. P., van Diemen, P. M., Dziva, F., Jones, P. W. and Wallis, T. S. 2002. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. Microbiology **148** (Pt 12): 3767-3778.

245. Stevens, M. P., van Diemen, P. M., Frankel, G., Phillips, A. D. and Wallis, T. S. 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. Infect Immun **70** (9): 5158-5166.

246. Story, C. M., Mikulska, J. E. and Simister, N. E. 1994. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. J Exp Med **180** (6): 2377-2381.

247. Strockbine, N. A., Marques, L. R., Holmes, R. K. and O'Brien, A. D. 1985. Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*. Infect Immun **50** (3): 695-700.

248. Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E. and Neilson, E. G. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. J Cell Biol **130** (2): 393-405.

249. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K. 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods **93** (2): 157-165.

250. Takeda, K. 2005. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. J Endotoxin Res **11** (1): 51-55.

251. Tanaka, Y., Imai, T., Baba, M., Ishikawa, I., Uehira, M., Nomiyama, H. and Yoshie, O. 1999. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. Eur J Immunol **29** (2): 633-642.

252. Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J. and Selsted, M. E. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. Science **286** (5439): 498-502.

253. Taubert, A., Zahner, H. and Hermosilla, C. 2006. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. Vet Parasitol.

254. te Loo, D. M., Monnens, L. A., van Der Velden, T. J., Vermeer, M. A., Preyers, F., Demacker, P. N., van Den Heuvel, L. P. and van Hinsbergh, V. W. 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. Blood **95** (11): 3396-3402.

255. Territo, M. C., Ganz, T., Selsted, M. E. and Lehrer, R. 1989. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. J Clin Invest **84** (6): 2017-2020.

256. Tesh, V. L., Burris, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolkowski, E. A., O'Brien, A. D. and Samuel, J. E. 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. Infect Immun **61** (8): 3392-3402.

257. Thorpe, C. M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin Infect Dis **38** (9): 1298-1303.

258. Thorpe, C. M., Hurley, B. P., Lincicome, L. L., Jacewicz, M. S., Keusch, G. T. and Acheson, D. W. 1999. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. Infect Immun **67** (11): 5985-5993.

259. Thorpe, C. M., Smith, W. E., Hurley, B. P. and Acheson, D. W. 2001. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. Infect Immun **69** (10): 6140-6147.

260. Townson, D. H., O'Connor, C. L. and Pru, J. K. 2002. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. Biol Reprod **66** (2): 361-366.

261. Valledor, A. F., Borras, F. E., Cullell-Young, M. and Celada, A. 1998. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. J Leukoc Biol **63** (4): 405-417.

262. van de Kar, N. C., Monnens, L. A., Karmali, M. A. and van Hinsbergh, V. W. 1992. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. Blood **80** (11): 2755-2764.

263. **Vaughan, M. B., Howard, E. W. and Tomasek, J. J.** 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. Exp Cell Res **257** (1): 180-189.

264. **Vora, P., Youdim, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Wada, A., Hirayama, T., Arditi, M. and Abreu, M. T.** 2004. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. J Immunol **173** (9): 5398-5405.

265. **Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E. and Zetter, B. R.** 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. J Cell Biol **99** (6): 2034-2040.

266. **Wagner, P. L., Acheson, D. W. and Waldor, M. K.** 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun **69** (3): 1934-1937.

267. **Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R. and Li, X.** 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. Nat Immunol **4** (9): 920-927.

268. **Werling, D., Hope, J. C., Howard, C. J. and Jungi, T. W.** 2004. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. Immunology **111** (1): 41-52.

269. **Werling, D. and Jungi, T. W.** 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. Vet Immunol Immunopathol **91** (1): 1-12.

270. **Wieler, L. H., Vieler, E., Erpenstein, C., Schlapp, T., Steinruck, H., Bauerfeind, R., Byomi, A. and Baljer, G.** 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. J Clin Microbiol **34** (12): 2980-2984.

271. **Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M. and Parks, W. C.** 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Science **286** (5437): 113-117.

272. **Winter, K. R., Stoffregen, W. C. and Dean-Nystrom, E. A.** 2004. Shiga toxin binding to isolated porcine tissues and peripheral blood leukocytes. Infect Immun **72** (11): 6680-6684.

273. **Wray, C., McLaren, I. M., Randall, L. P. and Pearson, G. R.** 2000. Natural and experimental infection of normal cattle with *Escherichia coli* O157. Vet Rec **147** (3): 65-68.

274. **Wurbel, M. A., Philippe, J. M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M. G., Malissen, M., Jordan, B. R., Malissen, B., Carrier, A. and Naquet, P.** 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. Eur J Immunol **30** (1): 262-271.

275. **Yamamoto, M., Fujihashi, K., Kawabata, K., McGhee, J. R. and Kiyono, H.** 1998. A mucosal intranet: intestinal epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes. J Immunol **160** (5): 2188-2196.

276. **Yamanaka, T., Helgeland, L., Farstad, I. N., Fukushima, H., Midtvedt, T. and Brandtzaeg, P.** 2003. Microbial colonization drives lymphocyte

accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. J Immunol **170** (2): 816-822.

277. Yamasaki, C., Natori, Y., Zeng, X. T., Ohmura, M., Yamasaki, S., Takeda, Y. and Natori, Y. 1999. 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 **442** (2-3): 231-234.

278. Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. and Oppenheim, J. J. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science **286** (5439): 525-528.

279. Yang, S. K., Eckmann, L., Panja, A. and Kagnoff, M. F. 1997. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. Gastroenterology **113** (4): 1214-1223.

280. Zaiou, M., Nizet, V. and Gallo, R. L. 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. J Invest Dermatol **120** (5): 810-816.

281. Zanetti, M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leukoc Biol **75** (1): 39-48.

282. Zanetti, M., Gennaro, R. and Romeo, D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. FEBS Lett **374** (1): 1-5.

283. Zhao, B., Li, Y., Buono, C., Waldo, S. W., Jones, N. L., Mori, M. and Kruth, H. S. 2006. Constitutive receptor-independent LDL uptake and cholesterol accumulation by macrophages differentiated from human monocytes with M-CSF. J Biol Chem.

IX. ANHANG

1. Reagenzien und Materialien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
1,4-Diaminobenzol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P-6001
3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	M2128
3,3`-Dioctadecycloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO)	Molecular Probes	D-275
7-Amino-Actinomycin D (7AAD)	Sigma	A-9400
Agarose D-1 low EED	Pronadisa	8016
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH	P11-001
Amplitaq® DNA Polymerase (mit 10fach Puffer und $MgCl_2$-Lösung)	Applied Biosystems	N808-0161
Anti-ACT2, bovin	VMRD, Inc.	Klon CACT26A
Anti-Maus IgG-Antikörper, γ-Ketten-spezifisch, FITC-konjugiert	Medac	M30101
Anti-Maus IgG-Antikörper, PE-konjugiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P9287
Anti-Ratte IgM-Antikörper, μ-Ketten-spezifisch, PE-konjugiert	Beckman-Coulter	IM1625
β-Mercaptoethanol	Amersham Biosciences	17-1317-01
Collagen R-Lösung (2 mg/ml)	Serva	47254
Collagenase 1 (Typ CLS mit 242 U/mg)	Biochrom AG	C-I22
D-(+)-Glucose-Lösung (45 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G8769
D-(+)-Glucose (wasserfrei)	Merck	8337

Digitonin (wasserlöslich)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D1407
DMEM mit L-Valin	GIBCO™, Invitrogen Corporation	21885-025
DMEM mit D-Valin (L-Valin-frei)	PAN™ BIOTECH GmbH	P04-03157
dNTP-Mix	PAN™ BIOTECH GmbH	739026
DNase I und 10x Puffer	Amersham Biosciences	27-0514-02
D-Sorbitol	Sigma	S-3889
Epidermal growth factor (EGF)	A F Schützdeller GmbH	
Ethanol 99 %	Merck	1.00983.1011
Ethidiumbromid	Serva	21251
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest	S1810
Fötales Kälberserum (FCS), dialysiert	PAA Laboratories GmbH	A15-245
Ficoll-Paque® Plus	Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech	17-0840-03
Filter-Einsatz Transwell-Clear 3,0 µm Porengröße	Costar, Corning Incorporated	3462
Filter-Einsatz Transwell-Clear 0,4 µm Porengröße	Costar, Corning Incorporated	3460
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	Fermentas	SM0241
Gentamycin	Biochrom AG	A2710
Hydrocortison	Sigma	H-0888
Insulin, bovines	Biochrom AG	K 3510
Kanülen, Sterican® (0,6 x 25 mm)	Braun Melsungen AG	4657667
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker	Fermentas	SM0191
Leibowitz's L-15 Medium	Life Technologies GmbH	41300-021
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH	M11-004
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich	L-4130
Long EGF	A F Schützdeller GmbH	
M30 CytoDeath™ FITC	Roche	2 156 857
Microwell-Platten, 96-Loch, Flachboden	Nunc GmbH	167008

M-MLV RTase (H^-)	Promega	M 3683
M-MLV RTase Buffer Pack	Promega	M 5313
Monoklonaler anti-CD77-Antikörper, Klon 38-13	Immunotech, Beckman-Coulter	IM0175
Monoklonaler anti-Pan Zytokeratin-Antikörper, FITC-konjugiert, Klon C-11	Sigma	F-3418
Mowiol	Clariant	
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom AG	K 0293
Oligo $d(T)_{16}$ Primer	Applied Biosystems	N808-0128
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	104005
PCR-Gefäße	Nerbe	04.022.1100
PCR Primer	MWG Biotech AG	-
PCR TaqMan™ Sonden	Eurogentec	-
Penicillin / Streptomycin (100X)	PAA Laboratories GmbH	P11-010
qPCR ™ MasterMix	Eurogentec	RT-QP2X-03
Ratte IgG anti-ZO-1-Antikörper	CHEMICON® International	MAB1520
Ribonuclease Inhibitor (RNasin)	Fermentas	E00312
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	c.c. pro GmbH	G-11-T
RNase-free DNase Set mit DNase I und RDD-Puffer	QIAGEN	79254
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN	74106
RPMI 1640 Medium (mit 2mM stab. L-Glutamin und 2.0 g/l $NaHCO_3$)	PAN™ BIOTECH GmbH	P04-18500
Transferrin, bovines	GIBCO™, Invitrogen Corporation	11107-018
Trypsin (10x)	PAA Laboratories GmbH	L-11-001
UltraVette®	Brandt	759200
Vimentin-Antikörper, Klon Vim 3B4	DAKO A/S	M7020
Zellkultur-Flaschen	Nunc GmbH	17 8905

mit Filterkappe, 80 cm^2		
Zellkultur-Flaschen mit Filterkappe, 25 cm^2	Costar, Corning Incorporated	430639
Zellkultur-Schalen, 100 x 20 mm	Falcon, Becton Dickinson	35 3003
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner bio-one	227261
Ziege anti-Ratte IgG-Antikörper, γ-Ketten-spezifisch, TRITC-konjugiert	Southern Biotech, Biozol	3030-03
Ziege anti-Ratte IgM-Antikörper, μ-Ketten-spezifisch, FITC-konjugiert	Dianova, Jackson Immuno-Research	112-096-075
Wasser für die Molekularbiologie, DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH	T 143.2

Alle nicht aufgeführten Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, oder der Firma Serva, Heidelberg bezogen.

2. Puffer, Medien und Lösungen

Einfriermedium:

FCS (hitzeinaktiviert 30 min, 56°C)	50,0 ml
DMSO	10,0 ml

Epon:

Glycidether (Harz)	500 ml
DDSA (2-Dodecenylsucinic acid anhydride)	100 g
MNA (Methylnadic anhydride)	100 ml
DMP (2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol)	100 ml

Fixierungsreagenz:

PFA	4,0 g
PBS	ad 100 ml

HBSS-Puffer (ohne Ca^{2+}, ohne Mg^{2+}, pH 7,4):

KCl	0,4 g
KH_2PO_4	0,06 g
NaCl	8,0 g
$NaHCO_3$	0,35 g
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	0,06 g
D-Glucose (wasserfrei)	1,0 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

HEPES-Puffer (pH 7,4):

HEPES-10-fach-Konzentrat	100,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

HEPES-10-fach-Konzentrat (pH 7,4):

NaCl	80,00 g
KCl	3,00 g
HEPES	23,80 g
D-Glucose (wasserfrei)	20,00 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Ladepuffer:

Bromphenolblau-Na-Salz	0,025 g
Xylen-Zyanol FF	0,025 g
Glycerin	3,0 g
Aqua bidest.	ad 10 ml

MTT-Stammlösung (5 mg/ml):

MTT	0,50 g
PBS	100,0 ml

NaCl-Lösung (0,89 %ig):

NaCl	8,90 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

PBS-Puffer (pH 7,4):

PBS-10-fach-Konzentrat	100,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

PBS-10-fach-Konzentrat (pH 7,4):

Na_2HPO_4 x 2 H_2O	18,00 g
KH_2PO_4	2,50 g
KCl	2,50 g
NaCl	100,00 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

PBS-EDTA-10-fach-Konzentrat (pH 7,4):

Na_2HPO_4 x 2 H_2O	14,20 g
NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
KH_2PO_4	2,00 g
Na_2 –EDTA x 2 H_2O	20,00 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

PBS-EDTA-Puffer (pH 7,4):

PBS-EDTA-10-fach-Konzentrat	100,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Permeabilisierungsreagenz:

Digitonin	0,005 g
PBS	ad 100 ml

SDS-Lösung (10 %ig, 0,01 n HCl):

Na-Dodecylsulfat	50,0 g
Aqua bidest.	450,0 ml
HCl 1 n	5,0 ml

SDS-Lösung (1 %ig in NaCl):

Na-Dodecylsulfat	0,50 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	50,0 ml

Sorbitol-Lösung (2 %ig):

D-Sorbitol	10 g
HBSS	500 ml

TAE-Puffer 50-fach:

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

TAE-Puffer:

TAE-Lsg. 50-fach	200 ml
Aqua bidest.	ad 10 000 ml

TE-Puffer (pH 8,0):

EDTA 0,5 M, pH 8,0	20 µl
Tris/Cl, pH 8,0	1 ml
Aqua bidest	ad 100 ml

Trypanblau-Lösung:

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung (0.89 %)	1000 ml

Yellow Fix:

Paraformaldehyd	20 g
Pikrinsäure	0,1 g
Phosphatpuffer 0,2 M	500 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Yellow Fix-Gebrauchslösung:

Yellow Fix	92 ml
Glutaraldehydlösung 25 %ig	8 ml

Zellkulturmedium 1:

RPMI 1640 (mit stab. Gln)	890,0 ml
FCS	100,0 ml
Penizillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml

X. TABELLEN

Tab. 1: TLRs des Menschen und ihre Liganden 22
Tab. 2: Chemokine der Säugetiere und des Menschen 28
Tab. 3: Gb_3-Expression durch humane Kolonkarzinom-Zelllinien 37
Tab. 4: Supplemente des Zellkulturmediums für primäre bovine Kolonzellen am Tag der Anzucht 46
Tab. 5: pro Ansatz verwendete Substanzen für die reverse Transkription 57
Tab. 6: Basenfolge der Primer für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen 58
Tab. 7: pro Ansatz verwendete Substanzen für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen 58
Tabelle 8 : Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Primerpaare 60
Tab. 9: Zusammensetzung des PCR-Mix für die TaqMan® PCR pro Ansatz (25 µl) 61
Tab. 10 : Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Sonden 62
Tab. 11: verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie 64
Tab. 12: Übersicht über die Induktionsbedingungen vor Durchführung der Enzymtests 77
Tab. 13: Vimentin-Ausstattung der mesenchymalen Kolonzell-Klone 125
Tab. 14: CD77-Expression der mesenchymalen Kolonzell-Klone 133

XI. ABBILDUNGEN

Abb. 1: Überprüfung der RNA-Qualität durch Gelelektrophorese 56
Abb. 2: Probenanalyse im Durchflusszytometer 70
Abb. 3: Überprüfung der Reinheit der Granulozytensuspension 81
Abb. 4: Migrationsverhalten der Granulozyten 83
Abb. 5: lichtmikroskopische Betrachtung frisch präparierter Kolonkrypten 85
Abb. 6: Primärkultur boviner Kolonzellen 86
Abb. 7: Zytoskelettausstattung primärer boviner Kolonzellen 87
Abb. 8: Zytokeratin-positive primäre bovine Kolonzellen 89
Abb. 9: Zytokeratin- und Vimentin-positive primäre bovine Kolonzellen 90
Abb. 10: Aktinfasern bei primären bovinen Kolonzellen 90
Abb. 11: gleichzeitig Zytokeratin- und Vimentin-positive primäre bovine Kolonzelle 91
Abb. 12: Vimentin-positive primäre Kolonzellen mit Epithelzellmorphologie 91
Abb. 13: Entwicklung der Zytokeratin- und Vimentin-positiven Zellen in Primärkulturen boviner Kolonzellen in An- und Abwesenheit von L-Valin 93
Abb. 14: Entwicklung des TEER bei CaCo-2- und primären Kolonzellen auf Filtern 94
Abb. 15: Wachstumsverhalten primärer boviner Kolonzellen auf Filtern 95
Abb. 16: Verzahnungen bei primären bovinen Kolonepithelzellen auf Filtern 95
Abb. 17: „Tight junctions“ bei primären bovinen Kolonepithelzellen auf Filtern 96
Abb. 18: „Tight junctions“ bei primären bovinen Kolonepithelzellen auf Filtern 97
Abb. 19: AP- und γ-GT-Expression bei CaCo-2-Zellen 98
Abb. 20: Expression ausgewählter Leitenzyme bei primären bovinen Kolonzellen 99
Abb. 21: Expression ausgewählter Leitenzyme bei primären bovinen Kolonzellen 100
Abb. 22: Zytokin- und Chemokingentranskription boviner Kolonepithelzellen 101
Abb. 23: CD77-Expression und rStxB1-Bindung bei primären bovinen Kolonzellen 102
Abb. 24: CD77-Expression und rStxB1-Bindung bei primären bovinen Epithelzellen 103

Abb. 25: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonepithelzellen 104
Abb. 26: rStxB1-Bindung bei primären bovinen Kolonepithelzellen 104
Abb. 27: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen 105
Abb. 28: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen 105
Abb. 29: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen 106
Abb. 30: CD77-Expression bei primären bovinen Kolonzellen 107
Abb. 31: Einfluss von LPS und Butyrat auf die CD77-Expression primärer Kolonzellen 108
Abb. 32: Einfluss von LPS und Butyrat auf die CD77-Expression primärer Kolonzellen 109
Abb. 33: Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität boviner Kolonzellen 110
Abb. 34: Einfluss von Stx1 und LPS auf die oberflächlich lokalisierte Shigatoxin-Rezeptorexpression in Primärkulturen boviner Kolonzellen 111
Abb. 35: Eliminierung von CD77-positiven/Zytokeratin-negativen primären bovinen Kolonzellen durch Stx1 112
Abb. 36: Eliminierung von CD77-positiven/Zytokeratin-negativen primären bovinen Kolonzellen durch Stx1 112
Abb. 37: Eliminierung Rezeptor-positiver primärer boviner Kolonzellen durch Stx1 113
Abb. 38: Einfluss von Stx1 auf die Apoptoserate boviner Kolonepithelzellen 114
Abb. 39: Effekt von Stx1 auf die Zytokin- und Chemokingentranskription boviner Kolonzellen 116
Abb. 40: Effekt von Stx1 auf die Expression spezifischer MCP-1-mRNA bei bovinen Kolonzellen 117
Abb. 41: Einfluss von Stx1 auf die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen bei primären bovinen Kolonzellen 118
Abb. 42: Einfluss von Stx1 auf den Vimentin-positiven Anteil der primären Kolonmesenchymzellen 119
Abb. 43: Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität primärer Kolonmesenchymzellen 120
Abb. 44: Shigatoxin-Rezeptorexpression bei primären Kolonmesenchymzellen 121
Abb. 45: CD77-Expression von primären Kolonmesenchymzellen in Gegenwart von LPS 122
Abb. 46: CD172a-Oberflächenexpression bei primären Kolonmesenchymzellen 123
Abb. 47: Zytoskelettausstattung von Kolonzell-Klon 12 124

Abb. 48: Charakterisierung von Kolonzell-Klon 12 anhand der Zytoskelettausstattung 126
Abb. 49: Expression ausgewählter Leitenzyme bei mesenchymalen Kolonzell-Klonen 127
Abb. 50: LDL-Aufnahme bei verschiedenen Zellarten 129
Abb. 51: Zytokin- und Chemokingentranskription durch Zellen des Kolonzell-Klons 12 131
Abb. 52: CD77-Gehalt von Zellen des Kolonzell-Klons 11bII 134
Abb. 53: CD77-Gehalt von Zellen des Kolonzell-Klons 12 135
Abb. 54: CD77-Expression bei Kolonzell-Klon 12 136
Abb. 55: Oberflächenexpression ausgewählter Marker durch Kolonzell-Klon 12 137
Abb. 56: Wirkung von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität von Zellen des Klons 12 140
Abb. 57: Einfluss von Stx1 auf die CD77-Expression von Zellen des Kolonzell-Klons 12 141
Abb. 58: Effekt von Stx1 auf die Zytokin- und Chemokingentranskription von Zellen des Kolonzell-Klons 12 143
Abb. 59: Einfluss von Stx1 auf die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen bei Kolonzell-Klon 12 146
Abb. 60: Charakterisierung von BUVEC anhand der Zytoskelettausstattung 147
Abb. 61: CD77-Expression bei BUVEC 148
Abb. 62: MHC II-Oberflächenexpression bei BUVEC 149
Abb. 63: Zytokingen- und Adhäsionsmolekülgen-Transkription durch BUVEC 150
Abb. 64: Einfluss von Stx1 auf die Stoffwechselaktivität von BUVEC 151
Abb. 65: Einfluss von Stx1 und LPS auf die CD77-Expression der BUVEC 153
Abb. 66: Effekt von Stx1 auf die Zytokingentranskription von BUVEC 155

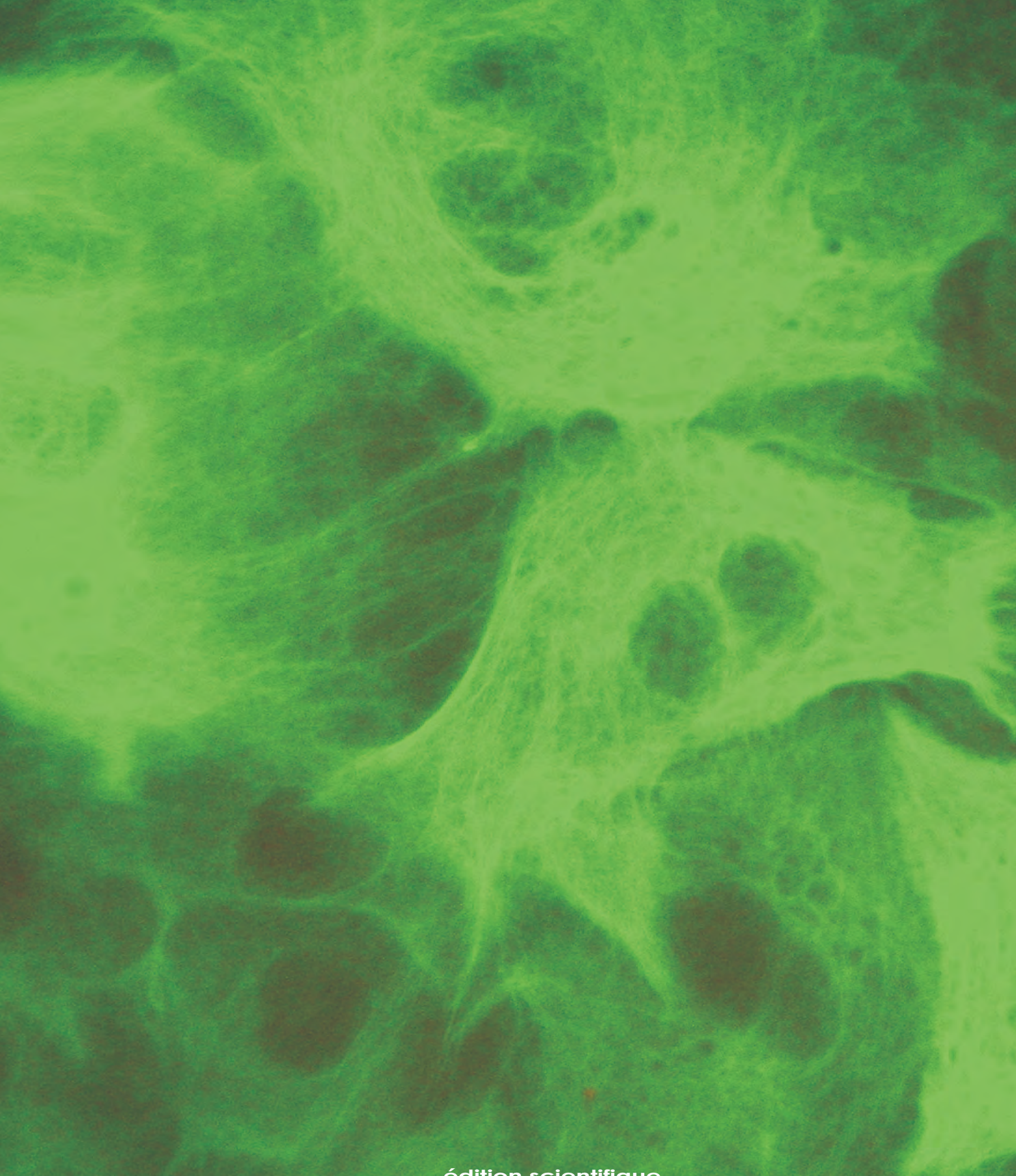
Danksagung

DANKE sage ich allen, durch deren Unterstützung diese Doktorarbeit möglich wurde!

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die zuverlässige Betreuung sowie für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und aller notwendigen Mittel zum Gelingen meiner Dissertation.
Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Christian Menge danke ich für seine fachliche Unterstützung und fortwährende Diskussionsbereitschaft, für sein stets offenes Ohr und seine Geduld bei der Durchsicht meiner Arbeit. Sein großes Wissen auf dem Gebiet der Infektionsimmunologie hat wesentlich dazu beigetragen, die vielen losen Enden zu einem roten Faden zu verknüpfen.
Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ivonne Stamm, die mich die Geheimnisse der Zellkultur gelehrt und in die notwendigen Methoden eingearbeitet hat. Ohne ihre engagierten Vorarbeiten wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.
Bei allen Angehörigen des Institutes bedanke ich mich herzlich für das stets angenehme Arbeitsklima und den respektvollen Umgang miteinander. Vor allem innerhalb des Doktorandenzimmers lernte ich eine außergewöhnlich freundschaftliche Atmosphäre kennen, die von Gemeinschaftsgefühl und Hilfsbereitschaft geprägt war.
Insbesondere Etienne Moussay danke ich für seinen konstruktiven Beistand während unserer gemeinsamen Forscherzeit. Auf seine Hilfe konnte ich stets zählen.
Julia Fröhlich sei Dank für ihre Freundschaft und ihre ansteckende Power.
Vielen Dank an Gabriele Köpf, die mir auf fachlicher und menschlicher Ebene immer hilfsbereit zur Seite stand.
Frau Dr. Heike Schoepe danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten, Philip Bridger für die Unterstützung bei der Durchführung des LDL-Versuches und Frau Dr. Anja Taubert für ihre Beratung und die Bereitstellung der BUVEC und des TaqMan.
Ebenso danke ich Frau Dr. Stefanie Barth für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Herrn Dr. Dirk Werling für seinen wertvollen Rat und für sein Interesse an meiner Forschungsarbeit.
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung meiner Arbeitsstelle im Sonderforschungsbereich 535.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinem Bruder Martin und meinem Onkel Hans, danke ich für ihre Verbundenheit und ihren Beistand in schweren wie in guten Zeiten.
Jürgen, meinem Retter aus allen Katastrophen beim Umgang mit dem Computer, sei gedankt für seine Geduld und seine Hilfe bei der Formatierung.
Zutiefst dankbar bin ich schließlich meinen Eltern, die jederzeit für mich da waren, mir jede erdenkliche Hilfe, Kraft und Halt gaben und uneingeschränkt meinen beruflichen Werdegang unterstützten. Danke, dass ihr an mich glaubt!

„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.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5150-5

9 783835 951501