

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

---

**Untersuchungen zur Wirkung von Shigatoxin 1 von *Escherichia coli*  
auf Zellen der unspezifischen Immunabwehr  
bei Rind, Schaf und Ziege**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Eingereicht von  
**Tobias Eisenberg**

Gießen 2003

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Untersuchungen zur Wirkung von Shigatoxin 1 von *Escherichia coli*  
auf Zellen der unspezifischen Immunabwehr  
bei Rind, Schaf und Ziege**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Tobias Eisenberg**  
Tierarzt aus Kassel

Gießen 2003

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

2. Berichterstatter:

PD Dr. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

5. Juni 2003

Meinen Eltern  
Christa und Fried Eisenberg

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. GRANULOZYTEN</b>	<b>3</b>
2.1.1. BIOLOGIE UND FUNKTIONEN	3
2.1.2. GRANULOZYTEN ALS KOMPONENTE DER ENTERALEN SCHLEIMHAUTABWEHR GEGEN BAKTERIELLE ERREGER	7
2.1.2.1. <i>Brachyspira</i> .....	9
2.1.2.2. <i>Mycobacterium</i> .....	9
2.1.2.3. <i>Helicobacter</i> .....	9
2.1.2.4. <i>Salmonella</i> .....	10
2.1.2.5. <i>Shigella</i> .....	12
2.1.2.6. <i>Yersinia</i> .....	13
2.1.2.7. <i>Escherichia</i> .....	15
<b>2.2. SHIGATOXIN-BILDENDE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (STEC)</b>	<b>16</b>
2.2.1. ÜBERSICHT ÜBER DIE VIRULENZFAKTOREN DER STEC	17
2.2.1.1. Shigatoxin .....	17
2.2.1.1.1. Shigatoxin-Rezeptoren.....	20
2.2.1.1.1.1. Glykosphingolipid-Rezeptoren.....	20
2.2.1.1.1.2. Alternativer Shigatoxin-Rezeptor.....	22
2.2.1.1.1.3. Proteinrezeptor für Stx .....	23
2.2.1.1.2. Wirkung der Shigatoxin-B-Untereinheit auf Zellen .....	23
2.2.1.2. Andere Virulenzfaktoren.....	24
2.2.1.2.1. LEE (Locus of enterocyte effacement)-Pathogenitätsinsel.....	24
2.2.1.2.2. Hitzestabiles Enterotoxin EAST1 .....	24
2.2.1.2.3. Eisentransportsystem .....	25
2.2.1.2.4. Plasmid-codiertes Hämolyisin .....	25
2.2.1.2.5. Exopolysaccharidkapsel.....	25
2.2.2. STEC-INFESTIONEN DES MENSCHEN	26
2.2.2.1. STEC-Infektionen mit lokalem Krankheitsbild (Hämorrhagische Kolitis).....	26
2.2.2.2. STEC-Infektionen mit systemischem Krankheitsbild (Hämolytisch-Urämisches-Syndrom und Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura) .....	30
2.2.3. STEC-INFESTIONEN DES WIEDERKÄUERS	32
<b>3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>36</b>
3.1.1. GEWINNUNG VON SHIGATOXIN 1 (STX1)	36
3.1.2. GEWINNUNG DER B-UNTEREINHEIT VON STX1 (RSTXB1)	36
3.1.3. PROTEINAUFREINIGUNG	37
3.1.3.1. Aufreinigung von Stx1 .....	37
3.1.3.1.1. Farbstoff-Affinitätschromatographie .....	37
3.1.3.1.2. Immuno-Affinitätschromatographie .....	37
3.1.3.1.3. Reduktion des Endotoxingehalts.....	37
3.1.3.2. Aufreinigung von rStxB1 .....	38
3.1.3.2.1. Anionenaustauschchromatographie .....	38
3.1.3.2.2. Methoden zur Charakterisierung der aufgereinigten Proteine.....	38
3.1.3.2.3. Proteinbestimmung .....	38
3.1.3.2.4. SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38

3.1.3.2.5.	Immunoblot.....	38
3.1.3.3.	Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	39
3.1.3.3.1.	Säulenchromatographie.....	39
3.1.3.3.2.	Qualitativer und quantitativer Nachweis von murinem Immunglobulin G.....	39
3.1.4.	SPENDERTIERE.....	39
3.1.4.1.	Blutgewinnung.....	39
3.1.4.1.1.	Rinder.....	39
3.1.4.1.2.	Schafe.....	40
3.1.4.2.	Gewinnung von Milch.....	40
3.1.4.2.1.	Rinder.....	40
3.1.4.2.2.	Schafe.....	40
3.1.5.	ZELLKULTURMETHODEN.....	41
3.1.5.1.	Kultivierung von Zelllinien.....	41
3.1.5.1.1.	Verwendete Zelllinien.....	41
3.1.5.1.1.1.	Zelllinien zur Verwendung in Zellkulturtests.....	41
3.1.5.1.1.2.	Hybridomzelllinie zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen Stx1.....	41
3.1.5.1.1.3.	Hybridomzelllinien zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene boviner Leukozyten.....	41
3.1.5.1.2.	Kultivierung adhärenter Zelllinien.....	42
3.1.5.1.3.	Kultivierung von Hybridomzellen und Massenproduktion monoklonaler Antikörper.....	42
3.1.5.2.	Präparation und Kultivierung boviner und oviner Granulozyten des peripheren Blutes.....	43
3.1.5.2.1.	Stimulation der Granulozyten.....	44
3.1.5.3.	Präparation und Kultivierung boviner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes.....	44
3.1.5.4.	Präparation und Kultivierung boviner und oviner Leukozyten aus der Milch.....	45
3.1.5.5.	Zellkulturtest zum Nachweis der Wirkung von Stx auf Zellen und zum Nachweis von Antikörpern gegen Stx1 aus Schafplasma.....	46
3.1.5.6.	Auswertung der Zellkulturtests.....	47
3.1.5.7.	Berechnung der verozytotoxischen Dosis.....	48
3.1.5.8.	Zellkulturtest zur Toxin-Abgabe von Granulozyten auf Verozellen.....	48
3.1.6.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	49
3.1.6.1.	Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz.....	49
3.1.6.2.	Probenvorbereitung für die Dreifarbenfluoreszenz.....	50
3.1.6.3.	Probenvorbereitung für Bindungsstudien.....	51
3.1.6.4.	Probenvorbereitung für Kompetitionsstudien.....	52
3.1.6.5.	Probenvorbereitung für die Messung granulozytärer Zellfunktionen.....	53
3.1.6.5.1.	Phagozytose.....	53
3.1.6.5.2.	Aktivierbarkeit (oxidative burst).....	54
3.1.6.5.2.1.	Untersuchungen zur Wirkung einer Endotoxinkontamination der verwendeten Stx1- und rStxB1-Chargen auf Granulozyten.....	57
3.1.6.5.3.	Migration.....	57
3.1.6.5.3.1.	Migrationsfähigkeit im Agarosegel.....	57
3.1.6.5.3.2.	Migrationsaktivität im Filter-Transwellsystem.....	58
3.1.6.5.4.	Vitalität.....	60
3.1.6.6.	Probenanalyse.....	64
3.1.7.	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	66
<b>3.2.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>68</b>
3.2.1.	CHARAKTERISIERUNG DER AUS PERIPHEREM BLUT GEWONNENEN GRANULOZYTEN.....	68
3.2.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON SHIGATOXIN-REZEPTOREN AUF GRANULOZYTEN.....	72
3.2.2.1.	Bovine Granulozyten.....	73
3.2.2.2.	Ovine und caprine Granulozyten.....	76
3.2.2.3.	Transmigrierte Granulozyten.....	78
3.2.3.	WIRKUNG VON SHIGATOXIN 1 AUF GRANULOZYTEN.....	80
3.2.3.1.	Bovine Granulozyten.....	80
3.2.3.1.1.	Morphologie und Vitalität.....	80

3.2.3.1.2.	Phagozytoseaktivität .....	83
3.2.3.1.3.	Aktivierbarkeit („oxidative-burst“).....	83
3.2.3.2	Ovine Granulozyten .....	86
3.2.3.2.1.	Morphologie und Vitalität.....	86
3.2.3.2.2.	Phagozytoseaktivität .....	89
3.2.3.2.3.	Aktivierbarkeit („oxidative-burst“).....	90
3.2.3.2.4.	Migrationsfähigkeit im Agarosegel .....	93
3.2.3.2.5.	Einfluss einer LPS – Kontamination auf die Funktion oviner Granulozyten .....	95
3.2.3.3	Migrierte Granulozyten .....	96
3.2.4.	INDIREKTE WIRKUNG VON STX1 AUF DIE MIGRATIONSAKTIVITÄT BOVINER GRANULOZYTEN IM TRANSWELL-FILTERSYSTEM .....	98
3.2.5.	UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSFER VON AUF GRANULOZYTEN GEBUNDENEM SHIGATOXIN 1 AUF ZELLKULTUREN .....	101
3.2.6.	UNTERSUCHUNGEN ZUM ANTIKÖRPERSTATUS DER VERWENDETEN SCHAFE .....	103
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>105</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>122</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>124</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>154</b>
<b>8.1.</b>	<b>CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....</b>	<b>154</b>
<b>8.2.</b>	<b>PUFFER, KULTURMEDIEN UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>156</b>
<b>8.3.</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>159</b>
<b>8.4.</b>	<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN .....</b>	<b>160</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

øFI	mittlere <u>F</u> luoreszenzintensität
A. bidest.	<u>A</u> qua <u>b</u> idestillata
Abb.	<u>A</u> bbildung
A/E	<u>A</u> ttaching and <u>E</u> ffacing
AEEC	<u>A</u> / <u>E</u> -befähigte <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
ARF6	<u>A</u> DP- <u>r</u> ibosylation <u>f</u> actor <u>6</u>
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
BL-3-Zellen	<u>b</u> ovine <u>L</u> ymphomzellen, Linie 3
bo, Bo	<u>b</u> ovin
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
BPI	<u>b</u> actericidal <u>p</u> ermeability- <u>i</u> ncreasing protein
C	Komplementkomponente, Grad <u>C</u> elsius
cagA	Zytotoxin-assoziiertes Protein ( <i>Helicobacter pylori</i> )
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation, Differenzierungscluster
CD <sub>50</sub>	zytotoxische Dosis 50 %
CD77	<u>c</u> luster <u>d</u> esignation no. 77 (Gb <sub>3</sub> )
ClO <sup>-</sup>	ROS, Hypochlorit
CNF1	<u>c</u> ytotoxic <u>n</u> ecrotic <u>f</u> actor <u>1</u> , Zytotoxischer Nekrosefaktor 1
CXCR	Rezeptor für Chemokine der C-X-C-Gruppe
(D+) HUS	<u>H</u> US mit assoziierter <u>D</u> iarrhoe
DNA, DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
eae	<u>E</u> . <u>c</u> oli <u>a</u> ttaching and <u>e</u> ffacing
EAST1	Hitzestabiles <i>E. coli</i> Enterotoxin (von EHEC)
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EHEC	<u>E</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
ELISA	<u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
ENA	Chemokin der C-X-C-Gruppe
EP	<u>E</u> pithelzellen
EPEC	<u>E</u> nteropathogene <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli

ER	<u>e</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
esp	<u>E. coli</u> <u>s</u> ecreting <u>p</u> roteins
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.): und andere
ETEC	<u>E</u> nterotoxische <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
Fa.	Firma
FACS	<u>f</u> luorescence- <u>a</u> ctivated- <u>c</u> ell- <u>s</u> orting
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum, fötales Kälberserum
Fc	Oberflächenstruktur auf Granulozyten
FITC	<u>F</u> luoresze <u>i</u> n- <u>I</u> sothio <u>z</u> yanat
Fl.	<u>F</u> luoreszenz
fMLP	<u>N</u> - <u>f</u> ormyl- <u>M</u> ethionyl- <u>L</u> eucyl- <u>P</u> henylalanin
FPLC <sup>®</sup>	<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
g	<u>G</u> ramm, Erdbeschleunigung
Gb <sub>2</sub>	Galabiosylzeramid
Gb <sub>3</sub>	Globotriaosylzeramid (CD77)
Gb <sub>4</sub>	Globotetraosylzeramid
Gb <sub>5</sub>	Galaktosylglobotetraosylzeramid
G-CSF	<u>g</u> ranulocyte <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
GM-CSF	<u>g</u> ranulocyte <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
GRO	Chemokin der C-X-C-Gruppe
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
h	Stunde(n)
HC	<u>H</u> ämorrhagische <u>C</u> olitis
HeLa-Zellen	humane Zervixkarzinom-Zellen
HEPES	<u>N</u> -(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)piperazin- <u>N'</u> -(2- <u>e</u> thansulfonsäure)
hly	<u>H</u> ämolysin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ROS, Wasserstoffperoxid
hu	<u>h</u> uman
HUS	<u>H</u> ämolytisch <u>u</u> rämisches <u>S</u> yndrom
ICAM-1	<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IE	<u>i</u> nternationale <u>E</u> inheit
IEL	<u>i</u> nter <u>a</u> epitheliale <u>L</u> ymphozyten
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
Ig	<u>I</u> mmunglobulin

IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IL-8R	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>8</u> - <u>R</u> ezeptor
IL-1Ra	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>1</u> - <u>R</u> ezeptor- <u>A</u> ntagonist
kB	<u>K</u> ilob <u>a</u> sen
kDa	<u>K</u> ilod <u>a</u> lton
l	<u>L</u> iter
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
LBP	<u>L</u> PS- <u>b</u> indendes- <u>P</u> rotein
LEE	<u>L</u> ocus of <u>e</u> nterocyte <u>e</u> ffacement
LFA-1	<u>l</u> eucocyte <u>f</u> unction <u>a</u> ssoziated molecule <u>1</u> (CD11a/CD18)
log	<u>L</u> ogarithmus
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
MACS	<u>m</u> agnet- <u>a</u> ctivated- <u>c</u> ell- <u>s</u> orting
mAk	<u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntikörper
MDa	<u>M</u> egad <u>a</u> lton
MDBK-Zellen	<u>M</u> adin- <u>D</u> arby- <u>b</u> ovine- <u>k</u> idney-Zellen
MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex, Haupthistokompatibilitätskomplex
Mø.Diff.Ag	<u>M</u> akrophagend <u>i</u> fferenzierungs <u>a</u> ntigen
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPO	<u>M</u> yeloperoxidase
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA, Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethyl- <u>t</u> hiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	arithmetischer <u>M</u> ittel <u>w</u> ert
n	Anzahl unabhängiger Versuche, auch Tierzahl
NADP(H)	<u>N</u> ikotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid- <u>P</u> hosphat
n. b.	<u>n</u> icht <u>b</u> estimmt
NE	<u>N</u> eutralisierende <u>E</u> inheit
NF-κB	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor κB
nm	<u>N</u> anometer
NO	Stickoxid
non-EP	<u>n</u> on- <u>E</u> pithelzellen

n. s.	<u>n</u> icht <u>s</u> ignifikant
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ROS, Superoxidanion
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ROS
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	ROS
·OH	ROS, Hydroxylradikal
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
p	<u>P</u> rotein, statistische Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit
PAF	<u>P</u> lättchen <u>a</u> ktivierung <u>f</u> aktor
PBMC	<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells
PBS	phosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	R- <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PEEC	<u>p</u> athogen- <u>e</u> licited- <u>e</u> pithelial- <u>c</u> hemoattractant
PHA-P	<u>P</u> hyto <u>h</u> ä <u>m</u> agglutinin <u>P</u>
PI	<u>P</u> ropidiumjodid
PKC	<u>P</u> rotei <u>k</u> inase <u>C</u>
PK(15)-Zellen	porcine- <u>k</u> idney-Zellen, Linie 15
PMA	<u>P</u> horbol-12- <u>m</u> yristat-13- <u>a</u> zetat
rhuIL-2	<u>r</u> ekombinantes <u>h</u> umanes <u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>2</u>
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies, reaktive Sauerstoffmetabolite
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rStxB1	rekombinante B-Untereinheit von Shigatoxin 1
RTX	<u>r</u> epeats-in- <u>t</u> ox <u>i</u> ns
S	Einheit <u>S</u> vedberg, Größenmaß für Proteine
SD	<u>s</u> tandard <u>d</u> ifference, Standardabweichung
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	<u>S</u> odium- <u>D</u> odezylsulfat- <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
Sip	<u>S</u> almonella induced protein
SOD	<u>S</u> uperoxi <u>d</u> dismutase
Sop	<u>S</u> almonella <u>o</u> uter protein, äußeres Membranprotein von <i>Salmonella</i>
SPI1	<u>S</u> almonella <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland <u>1</u>
STa	Hitzestabiles <i>E. coli</i> Enterotoxin a
STEC	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin bildende <i>Escherichia coli</i>
STEC1	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin 1 bildende <i>Escherichia coli</i>

STEC2	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin 2 bildende <i>E</i> <u>s</u> cherichia <u>c</u> oli
Stx	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin(e)
StxB1	B-Untereinheit des Stx1
Tab.	<u>T</u> abelle
TGF	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
Tir	<u>t</u> ranslocated <u>i</u> ntimin- <u>r</u> eceptor
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike- <u>r</u> eceptor
TNF	<u>T</u> umor- <u>N</u> ekrose- <u>F</u> aktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TTP	<u>T</u> hrombotisch <u>t</u> hrombozytopenische <u>P</u> urpura
U	<u>U</u> nit, Einheit
U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
VacA	Vakuolen-bildendes Toxin ( <i>Helicobacter pylori</i> )
VCAM-1	<u>v</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1, vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VTEC	<u>V</u> erotoxin-bildende <i>E. coli</i> (syn. STEC)
WC	<u>W</u> orkshop <u>c</u> luster
Yad	<u>Y</u> ersinia <u>A</u> dhäsin
Yop	<u>Y</u> ersinia <u>o</u> uter protein, äußeres Membranprotein von <i>Yersinia</i>
ZNS	<u>z</u> entrales <u>N</u> ervensystem

## 1. Einleitung

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) verursachen beim Menschen schwerwiegende lokale und systemische Erkrankungen wie das Hämolytisch Urämische Syndrom (HUS), die Hämorrhagische Colitis (HC) und die Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura (TTP) (286). Shigatoxine gelten hierbei als Hauptvirulenzfaktoren, die für die Schädigung der Endothelzellen als Schlüsselmechanismus der Pathogenese verantwortlich sind (3, 237). Die STEC-Infektion der Wiederkäuer verläuft dagegen meist klinisch inapparent. Lediglich bei Kälbern bis zur dritten Lebenswoche können Durchfallerkrankungen auftreten (99, 238). Große und kleine Wiederkäuer werden allerdings als das Hauptreservoir dieser Zoonoseerreger angesehen (95).

Bovine Zellen exprimieren den Stx-Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77 (194, 291). Zunehmende Bedeutung erlangen Untersuchungen an Immunzellen, seit bekannt ist, dass humane und bovine B-Lymphozyten Zielzellen für Stx darstellen. Da beim Rind auch T-Zellen Gb<sub>3</sub>/CD77-positiv sind (291), könnte eine Stx-induzierte Suppression spezifischer Immunzellen entscheidend zur Persistenz der STEC-Infektion beim Rind beitragen. Für die Kontrolle bakterieller Schleimhautinfektionen sind aber auch Zellen der unspezifischen Abwehr von großer Bedeutung (297). So wird die Infektionsstelle der STEC im Kolon von Kälbern von granulozytären Infiltraten dominiert. Bislang ist aber noch unbekannt, ob Shigatoxine durch eine Beeinträchtigung granulozytärer Zellfunktionen auch diesen Teil der Wirtsabwehr beim Rind supprimieren können.

Aufgrund des Fehlens Shigatoxin-spezifischer Symptome bei den Wiederkäuern wäre es allerdings auch denkbar, dass die Granulozyten dieser Tiere keine Zielzellen für Shigatoxine darstellen. In der Pathogenese humaner STEC-Infektionen spielen Granulozyten nämlich in zweifacher Hinsicht eine große Rolle. Einerseits aktivieren Shigatoxine diese Zellen, verstärken dadurch den Gewebeschaden und tragen so zur Pathogenese bei (154). Auf der anderen Seite transportieren die Granulozyten das Shigatoxin im Blut vom Darm zu anderen Organen und scheinen so für die Entwicklung z.B. der Nierenschäden verantwortlich zu sein (303).

Die Untersuchung zur Rolle unspezifischer Abwehrzellen bei der STEC-Infektion der Wiederkäuer dient daher nicht nur dem Verständnis der Infektion im

Reservoirwirt, sondern könnte auch helfen, den unterschiedlichen klinischen Verlauf der Infektion bei Wiederkäuer und Mensch zu erklären. Ziel dieser Arbeit war es daher der Frage nachzugehen, ob und in welchem Umfang die STEC die unspezifische Abwehr von Wiederkäuern zu beeinträchtigen vermögen. Dazu wurde untersucht, ob und in welchem Umfang Shigatoxin 1 auf Granulozyten verschiedener Wiederkäuerspezies wirken kann. Neben dem Versuch des Nachweises eines Rezeptors für Stx auf Granulozyten sollte auch der mögliche Einfluss von Shigatoxin 1 auf granulozytäre Zellfunktionen wie Vitalität, Phagozytoseaktivität, Aktivierbarkeit und Migrationsfähigkeit bestimmt werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Granulozyten

#### 2.1.1. Biologie und Funktionen

Leukozyten, die zytoplasmatisch anfärbbare Granula besitzen, werden als Granulozyten bezeichnet. Anhand selektiver Anfärbbarkeiten dieser Granula erfolgt eine Einteilung in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Da der Kern der etwa 9-12 µm großen Granulozyten nicht homogen mononukleär erscheint, spricht man auch von polymorph- oder segmentkernigen Leukozyten. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten entstammen dem Knochenmark, wo sie gemeinsam mit den Makrophagen aus myeloiden Vorläuferzellen hervorgehen. Dabei werden die Granulozyten im Knochenmark gespeichert; die Menge der im Blut zirkulierenden Zellen wird im physiologischen Zustand konstant gehalten. Zusammen mit den Makrophagen stellen die auch als Mikrophagen bezeichneten Zellen einen wesentlichen Teil des unspezifischen Immunsystems dar, dem Aufnahme und Abbau von Infektionserregern aber auch untergegangener körpereigener Zellen obliegt.

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Abwehrzellen bei einer akuten Infektion. Sie infiltrieren Infektionsgebiete, indem sie an das Endothel des Blutgefäßsystems adhären. Für diesen Vorgang müssen die Zellen bereits an der Endothelwand wandern, was als Margination bezeichnet wird. Die bei diesem Vorgang wirkenden Haftmechanismen werden von Selektinen vermittelt (134). Auf der Seite humaner Granulozyten ist dies das L-Selektin. Im Entzündungsgebiet werden die Phagozyten von endothelialen Adhäsionsmolekülen aktiviert, wobei die so genannten Integrine der Granulozyten die Hafteigenschaften vermitteln (134). Die auf Granulozyten vorhandenen Integrine gehören zur Unterfamilie der  $\beta$ 2-Integrine (z.B. CD11a/CD18 („leucocyte function associated molecule 1“, LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1/CR3), CD11c/CD18) (128, 134). Diese gehen mit den im Entzündungsgebiet vorhandenen endothelialen E- und P-Selektinen sowie mit den Abkömmlingen der Immunglobulin-Superfamilie wie interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) oder vaskulärem Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) vorübergehende Bindungen ein (128). Dadurch und durch die chemotaktische Wirkung pro-inflammatorischer

Zytokine verlangsamt sich der intravasale Wanderungsprozess („rolling“). Der Granulozyt haftet am Endothel („sticking“), um an dieser Stelle das Gefäß zu verlassen (134). Dies geschieht mittels einer amoeboiden Bewegung (Leukodiapedese), an die sich eine gerichtete Wanderung (Migration) zum Entzündungsort anschließt. Motor dieses Wanderungsprozesses stellen Chemokine dar, die von den umliegenden Zellen unter anderem nach Wechselwirkung mit Infektionserregern gebildet werden (Chemotaxis). Die wichtigsten dieser pro-inflammatorischen Zytokine sind die positiv chemotaktischen und Granulozyten-aktivierenden C-X-C-Chemokine wie Interleukin (IL)-8, GRO- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  und ENA-78. Pro-inflammatorisch wirken ferner IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), Plättchenaktivierungsfaktor (PAF), Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) (181). Gerade für die letzten beiden konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur als chemotaktisches Agens von Mukosazellen entzündlich veränderter Darmabschnitte sezerniert werden, sondern dass unter ihrer Einwirkung auch eine Verzögerung granulozytärer Apoptose zu beobachten ist (123). Am Entzündungsort erfolgt das Erkennen von Erregern durch opsonische Rezeptoren der Granulozyten, nachdem die Erreger durch humorale Komponenten opsonisiert worden sind (134). Als Opsonine fungieren Subklassen von IgG, die von so genannten Fc $\gamma$ -Rezeptoren erkannt werden, aber auch Komplementkomponenten wie C3b, die an Komplement-Rezeptoren binden. Zellen, die apoptotisch geworden sind, zeichnen sich durch auf die Außenseite der Zellmembran verlagertes Phosphatidyl-Serin aus (134). Auch dieses wird von Granulozyten erkannt und leitet die Phagozytose der untergegangenen Zelle ein.

Bei der Phagozytose werden Partikel nach direkter Anlagerung des Granulozyten durch eine Membranschlussung internalisiert. Eingeschlossen in der phagozytischen Vakuole (Phagosom) findet ein intrazellulärer Verdau durch das Verschmelzen mit den Effektormolekül-gefüllten Granula statt. Man unterscheidet primäre azurophile Granula, die wichtige antibakterielle Effektoren wie saure und neutrale Hydrolasen, Proteasen wie Elastase und Cathepsine, Phosphatasen, Esterasen, Nukleotidasen, Defensine und das BPI (bactericidal permeability-increasing protein) beinhalten. Die Myeloperoxidase und NADPH-Oxidase führen ferner zur Bildung hochreaktiver Hypochlorsäure und reaktiver Sauerstoffmetabolite wie O<sub>2</sub><sup>2-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH, <sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> (134, 181).

Die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite („oxidative-burst“ oder „respiratory-burst“) wird über eine Stimulation der Fc $\gamma$ -Rezeptoren induziert. Ein Elektronenübertragendes Enzymsystem, die membranständige NADPH-abhängige Oxidase, reduziert Sauerstoff zu Superoxidanion (O $_2^-$ ), welches in die phagozytische Vakuole abgegeben wird. Superoxidanion reagiert unter der Einwirkung von Superoxiddismutase oder bei saurem pH zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H $_2$ O $_2$ ). In Gegenwart von freiem Eisen kann auch OH $\cdot$  (Hydroxylradikal) entstehen. Unter der Einwirkung der in Granula gespeicherten Myeloperoxidase entsteht aus Chlorid und H $_2$ O $_2$  das hochreaktive Hypochlorit (ClO $\cdot$ ). Wegen der hohen Toxizität dieser Sauerstoffmetabolite überleben die Granulozyten die Aktivierung dieses mikrobiziden Weges nicht; es kommt zu deren Absterben und so zur Eiterbildung (134). Die Aggressivität dieser Effektorsubstanzen birgt ein zerstörerisches Potential, durch das nicht nur eine effiziente Abwehr von Erregern, sondern auch die Schädigung körpereigener Gewebe möglich wird. Beim Umschließen eines Partikels verschmelzen bereits die Granula mit der sich bildenden phagozytischen Vakuole, wodurch sich Granulainhalt auch nach außen entleert. Dieser Vorgang wird als Degranulation bezeichnet und trägt entscheidend zum Gewebeschaden am Infektionsort bei (134).

Darüber hinaus verfügen Granulozyten neben den primären auch über sekundäre oder spezifische Granula, die Lysozym, Laktoferrin und Properdin enthalten. Weiterhin existieren solche mit Gelatinase. Schließlich sind noch so genannte sekretorische Granula zu nennen, die vor allem präformierte Rezeptoren wie z.B. Integrine und Chemokinrezeptoren enthalten (181). Granulozyten sind auf diese Weise über oberflächliche Chemokinrezeptoren regulierbar. Die für die Migration wichtigsten Rezeptoren sind CXCR1 und CXCR2 (181). Granulozyten greifen daher nicht ausschließlich als phagozytierende Effektorzellen in den Infektionsverlauf ein, sondern wirken beispielsweise nach Stimulation durch LPS über die Bildung zahlreicher Entzündungsmediatoren auch immunmodulatorisch (128, 181). Aufgrund ihrer Vorreiterrolle bei der Infektabwehr vermögen Granulozyten nachfolgende Zellinfiltrate durch ein fein abgestimmtes Chemokinrepertoire zu modulieren. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF und Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) stimmen dabei die Wirtsreaktion genauso ab wie die anti-inflammatorischen Gegenspieler Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra). Auf diese Weise können die Phagozytose gesteigert,

Lymphozyten aktiviert oder Adhäsionsmoleküle und Vasodilatoren exprimiert werden (181). Die granulozytären Granula werden bereits im Knochenmark für den späteren Einsatz angelegt. Allerdings konnte auch die *de novo*-Synthese von Chemokinen durch periphere Granulozyten unter dem Einfluss von IL-1 und TNF belegt werden (181).

Zur Stimulation von Granulozyten *in vitro* bedient man sich oft eines Phorbolesters wie dem Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA), das über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Aktivierung der granulozytären NADPH-Oxidase führt (135). Zumindest bei humanen Zellen stimuliert das chemotaktische Peptid N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) als bakterielles Spaltprodukt und bindet mit hoher Affinität an spezifische N-Formyl-Rezeptoren auf der Oberfläche von Granulozyten. Es stimuliert die Chemotaxis, reguliert die Expression von Adhäsionsmolekülen herauf und verursacht eine Zunahme vaskulärer Permeabilität. Dies wird über eine Phosphorylierungsreaktion eines zelleigenen 64 kDa-Proteins erzielt, das anscheinend eine Drehscheibe im granulozytären Aktivierungsstoffwechsel darstellt und in die auch die Stimulationskaskade über PMA einmündet (280). Granulozyten werden aber auch durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) im pg-Bereich stimuliert (27). Nach der Injektion von LPS von *Y. enterocolitica* in Kaninchen sind die granulozytären Zellfunktionen Chemotaxis, Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite und Enzymsekretion beeinträchtigt (102). LPS von *E. coli* führt bei bovinen Granulozyten im Nanogrammbereich zur gesteigerten Expression der Gene des Typ 1 IL-1-Rezeptors und des IL-1 $\beta$  (17). Die Aktivierung von Granulozyten durch Endotoxin ist auf unterschiedliche Weise möglich. So erkennen granulozytäre Fc $\gamma$ -Rezeptoren opsonisiertes LPS. LPS-bindendes-Protein (LBP) im Plasma transferiert gebundenes LPS und katalysiert über granulozytäres CD14 die Anlagerung von LPS auf der Oberfläche von Granulozyten (128). Dies führt zur granulozytären Aktivierung. Aktuell wird eine Familie neuartiger Proteine als zelluläre Rezeptoren für das Erkennen bakterieller Zerfallsprodukte verantwortlich gemacht. Es handelt sich dabei um die so genannten Toll-like-Rezeptoren (TLR), die einen Liganden als „exogen“ erkennen und eine Signalkaskade der Wirtszelle initiieren (18, 155). Dem TLR4 wird in diesem Zusammenhang die Hauptrolle eines spezifischen Endotoxin-Sensors zugeschrieben, der als Aktivator des spezifischen Immunsystems fungiert (155). Für

einige TLR wurde eine strukturelle Verwandtschaft zum granulozytären CD14 sowie zum Typ 1 IL-1-Rezeptor nachgewiesen (62, 155).

### **2.1.2. Granulozyten als Komponente der enteralen Schleimhautabwehr gegen bakterielle Erreger**

Die Phagozytoseaktivität von Granulozyten ist nicht nur auf Gewebe beschränkt. Granulozyten durchwandern auch mukosale Epithelien, um luminal adhärierende Bakterien auf einer Schleimhaut zu phagozytieren (297). Das Durchwandern der Epithelschicht scheint ebenfalls durch Adhäsionsmoleküle vermittelt zu sein. Auf granulozytärer Seite konnte dafür das  $\beta$ 2-Integrin CD11b/CD18 verantwortlich gemacht werden (15, 43). Auf den Epithelzellen war dagegen das normalerweise auf Endothelzellen vorkommende ICAM-1 involviert (233). Letzteres war auf unstimulierten Epithelzellen nicht nachweisbar, wohl aber auf Epithelzellen aus Entzündungsgebieten und auf solchen nach IFN- $\gamma$ -Stimulation (233).

Granulozyten kommen als Gewebe-assoziierte Zellen im Bereich der Schleimhaut nicht infizierter Darmabschnitte auch physiologisch vor. Bedeutende enteropathogene Erreger der Gattungen *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia* und *Yersinia* induzieren eine neutrophile Transmigration durch polarisierte intestinale Epithelzellverbände (183, 189, 270, 285) und verursachen so eine massive neutrophile Reaktion im Bereich der Infektionsstelle. Den intestinalen Epithelzellen kommt eine Schlüsselrolle bei der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8, Monozyten-Chemotaktischen-Proteins 1, GM-CSF und TNF- $\alpha$  zu (68-70, 133, 269, 275). Dem IL-8 konnte sowohl in Tiermodellen als auch in *in-vitro*-Experimenten eine wichtige Funktion bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in das Entzündungsgebiet beigemessen werden (68-70, 109, 183, 185, 269). Für die Transkription des IL-8-Genes sind bestimmte Kernfaktoren (NF) Voraussetzung, die an genaue Konsensussequenzen in der Promotorregion binden (203). Während eine Reihe dieser Faktoren notwendig zu sein scheint, kommt dem Kernfaktor NF- $\kappa$ B herausragende Bedeutung zu (203). Die Promotorregion des IL-8-Genes enthält eine Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B und zwei putative Bindungsstellen für den Kernfaktor des IL-6-Genes (NF-IL-6). Die NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle bindet bevorzugt Rel p65-p65-Homodimere von NF- $\kappa$ B, aber auch einige p50-p65-Heterodimere nach Stimulation mit Invasin von *Yersinia* (274). Die genaue Induktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist bislang nicht bekannt. Eine derartige

Aktivierung verbunden mit einer gesteigerten IL-8-Freisetzung konnte aber nach Infektion kultivierter Epithelzellen mit *Y. enterocolitica* (274) sowie mit *Helicobacter pylori*, *S. enterica* Serovar Typhimurium oder enteropathogenen *E. coli* beobachtet werden (66, 72, 147, 204, 269, 279).

Granulozyten können durch endo- sowie exogene Einflüsse die Synthese von IL-8-Rezeptoren (IL-8R) modifizieren und auf diese Weise selbst eine immunmodulatorische Beeinflussung der Entzündungsreaktion ausüben (172). So bewirkt der Granulozyten-Koloniestimulationsfaktor (G-CSF) eine gesteigerte Bildung der IL-8R-mRNS sowie die Bindung von IL-8 durch Granulozyten, wohingegen die Vorbehandlung der Granulozyten mit LPS zu einer gehemmten Rezeptor-mRNS-Transkription und Bindung von IL-8 führt (172).

Mit der positiv chemotaktischen Migration neutrophiler Granulozyten in ein Entzündungsgebiet scheinen auch wesentliche Funktionalitätsparameter dieser Zellen beeinflusst zu werden. Hofman *et al.* (2000) (113) belegen, dass die Granulozyten durch ihre transepitheliale Migration einer humanen Epithelzelllinie eine markante Steigerung ihrer Phagozytoseaktivität erfahren. Die „oxidative-burst“-Aktivität war dagegen unbeeinflusst. Die Autoren konnten jedoch eine leichte Induktion von Apoptose nachweisen. Hong (115) sieht nach der Migration von Granulozyten durch eine Filtermembran nicht nur eine Steigerung der Phagozytose, sondern auch des „oxidative-burst“. Eine belgische Arbeitsgruppe konnte in Migrationsstudien an primären bovinen Euter-Epithelzellkulturen eine deutliche Reduktion der Phagozytose und des „oxidative-burst“ bei bovinen Granulozyten nach deren Migration beobachten (288). Zwahlen und Roth (336) demonstrieren ebenfalls an Filtermembranen eine altersabhängig unterschiedlich ausgeprägte Migration boviner Granulozyten. Auf verschiedene Stimuli reagierten die Zellen neonater Tiere „hyperirritabel“, d.h. mit einer gesteigerten Migration verglichen mit Granulozyten adulter Rinder.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob es sich bei dieser granulozytären Infiltration um eine frühe Abwehrreaktion des Wirtes mit dem Ziel der Protektion handelt, oder ob durch die eingewanderten Granulozyten eher eine Verstärkung des Gewebeschadens und damit der Pathogenese zu beobachten ist.

### **2.1.2.1. *Brachyspira***

Bei murinen Infektionen mit *Brachyspira hyodysenteriae* lässt sich eine starke neutrophile Infiltration entzündeter Darmabschnitte feststellen (263). Der entstandene Gewebeschaden sowie die Infiltration neutrophiler Granulozyten waren bei Mäusen, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD18 behandelt waren, weniger stark ausgeprägt. Auch die Depletion neutrophiler Granulozyten führte zu einer Abmilderung der Kolitis (263).

### **2.1.2.2. *Mycobacterium***

Von *Mycobacterium avium paratuberculosis* ist bekannt, dass es die Migrationsfähigkeit von Granulozyten experimentell infizierter Kühe beeinträchtigt. Eine Infektion mit *M. a. paratuberculosis* hemmte deutlich die Migration der mit Zymosan aktivierten Zellen verglichen mit Kontrolltieren (61).

### **2.1.2.3. *Helicobacter***

*H. pylori* verursacht bei Menschen Infektionen der Magenschleimhaut. Diese sind von einer Infiltration neutrophiler Granulozyten geprägt (16, 84). Bei *cagA* (Zytotoxin-assoziiertes Protein)-positiven *Helicobacter*-Stämmen fällt diese Infiltration besonders deutlich aus (16). Zytotoxin-positive *Helicobacter*-Stämme (Stämme, positiv für das Vakuolen-bildende Toxin (VacA) und *cagA*) verursachen auch bei Mäusen nach experimenteller Infektion neben gastrischen Erosionen und Vakuolenbildungen eine deutliche Granulozyteninfiltration (79). IL-8, das in der Mukosa von Patienten mit *H. pylori*-induzierter, chronischer Gastritis in hohen Konzentrationen nachzuweisen ist, konnte für die transepitheliale Migration von Granulozyten *in vitro* verantwortlich gemacht werden (84). Infektionen mit *cagA*-positiven Stämmen bewirken eine erhöhte Freisetzung von IL-8 aus gastrischen Epithelzellen (79). Eine verstärkte Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen als Voraussetzung für eine chemotaktisch motivierte Migration in entzündlich veränderte Gebiete beobachteten Yoshida *et al.* (1993) (331) nach Kontakt von Granulozyten mit *H. pylori*-Extrakten. Monoklonale Antikörper (mAk) gegen die Oberflächenantigene CD11a, CD11b, CD18 und ICAM-1 führten zu einer deutlichen Verringerung der beschriebenen Adhäsion an Endothelzellen, nicht aber mAk gegen E- und P-Selektin. Während Kozol *et al.* (157) eine erhöhte neutrophile chemotaktische Aktivität in Magensaftproben von *H. pylori*-Patienten fanden,

identifizierten Reymunde *et al.* (251) einen chemotaktischen Stoff aus Überständen von *H. pylori*-Kulturen, welcher vorläufig als hitzestabil und mit etwa 8,5 kDa Molekulargewicht charakterisiert wurde.

Die Granulozytenmigration trägt durch eine Verschlechterung der Barrierefunktion des Magenschleimhautepithels (84) mit zur Pathogenese der *H. pylori*-Infektion bei. Dies beobachten auch Basso *et al.* (16) durch das massive Freisetzen reaktiver Sauerstoffmetabolite und Proteasen aus infiltrierten Granulozyten. Derartige Veränderungen sind nach Basso *et al.* (16) direkt proportional zur gebildeten Menge granulozytärer Produkte, ohne den *Helicobacter* dabei nennenswerten Schaden zuzufügen. *In vitro*-Experimente zeigten, dass die Granulozyten von Personen, die an einer *H. pylori*-Infektion litten, zu einem deutlich höheren „oxidative-burst“ befähigt waren als Granulozyten nichtinfizierter Personen (16). Die Menge der von Granulozyten gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies war nach Zhang *et al.* (332) besonders hoch bei *Helicobacter*-Stämmen, die Zytotoxin-tragend waren. Ferner scheint auch eine reduzierte Bindungsfähigkeit der Bakterienzelle an Membranen polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten vorzuliegen, nachdem proteolytische Enzyme auf die Membran einwirken. Dies muss man aufgrund der schlechteren Möglichkeit der Opsonisierung als einen Vorteil für den Erreger werten (247). Eine Protektion durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten erscheint daher fraglich. Im Gegensatz zu den geschilderten Verhältnissen berichten Nanivadekar *et al.* (1990) (206) von 170 *H. pylori*-positiven Magenbiopsieproben indischer Patienten, in denen zwar eine Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen nachgewiesen werden konnte, Granulozyten jedoch vollständig fehlten. Dies war sogar bei Patienten mit vorangegangener, vierwöchiger Dyspepsie der Fall. Auch Kudo *et al.* (160) und Asaka *et al.* (11) berichten von Granulozyteninfiltrationen lediglich in rund ein (11) bis zwei (160) Dritteln der untersuchten *H. pylori*-Fälle. Asaka *et al.* (10) führen dagegen einen deutlichen Rückgang granulozytärer Infiltrate durch die erfolgreiche Bekämpfung der *Helicobacter*-Infektion an.

#### **2.1.2.4. *Salmonella***

Salmonellen verursachen Erkrankungen bei Mensch und Tier, die in ihrem klinischen Erscheinungsbild von Gastroenteritiden bis hin zu systemischen Infektionen variieren (164). Für die Invasion wie auch die entzündliche Reaktion von *S. enterica* Serovar Typhimurium bedarf es eines Typ III Sekretionsapparates, der dem von

*Shigella* spp. homolog ist (89). Dieser Sekretionsapparat wird von über 25 Virulenzgenen des bakteriellen Chromosoms codiert und als *Salmonella* „Pathogenicity Island 1“ (SPI1) bezeichnet (50). Galyov *et al.* (1997) (86) konnten für Flüssigkeitseinstrom und Entzündungsreaktion betroffener Ileumabschnitte des Kalbes das von *S. enterica* Serovar Dublin sezernierte Effektorprotein SopB verantwortlich machen. Auch SopE, das über das Typ III Sekretionssystem von *S. enterica* Serovar Typhimurium in das Zytosol der Epithelzellen gelangt, wirkt invasionsbegünstigend: SopE fungiert als Guanyl-Nukleotid-Austauscher für die Rho-GTPase Proteine Rac und CDC42, wodurch es zu Aktinpolymerisationen, Membrankräuselungen und so zur bakteriellen Invasion in die Epithelzellen kommt (40, 101). Eine von Lee *et al.* (2000) (164) durchgeführte Untersuchung konnte das Typ III Effektorprotein SipA bei *S. enterica* Serovar Typhimurium für die transepitheliale Granulozytenwanderung verantwortlich machen.

Von *S. enterica* Serovar Typhimurium ist bekannt, dass es nach Kontakt mit der apikalen Seite einer Epithelzellschicht die Bildung und Freisetzung zahlreicher Zytokine inklusive IL-8 induziert. Dadurch wandern neutrophile Granulozyten aus den Blutgefäßen durch das Epithel in das Darmlumen (188). McCormick *et al.* (188) präzisieren die Wege der Freisetzungen von Chemokinen dergestalt, dass sie an Epithelzellen nach Kontakt mit *S. enterica* Serovar Typhimurium eine basolaterale IL-8-Sekretion von einer apikalen PEEC- („pathogen-elicited-epithelial-chemoattractant“) Sekretion unterscheiden können. Während erstere vornehmlich eine Migration von Granulozyten in die *Lamina propria* bewirkt, induziert PEEC die granulozytäre Wanderung durch die Epithelschicht hindurch in das Darmlumen. Gleiche Ergebnisse publizieren Gewirtz *et al.* (89), wobei sie ausdrücklich darauf hinweisen, dass die Freisetzung von IL-8 und PEEC nicht auf einer Internalisierung der Bakterien beruht. Dagegen beobachteten McCormick *et al.* (186) beim Einsatz invasionsdefekter Mutanten von *S. enterica* Serovar Typhimurium auch keine Induktion einer Granulozyteneinwanderung und schlossen daraus, dass die Invasion Voraussetzung für eine derartige Signalinduktion sei.

Bei PEEC handelt es sich im Gegensatz zu vielen anderen Chemokinen um ein sehr kleines Molekül von nur 1-3 kDa Größe. Es ist stabil, hydrophil und es scheint keine Signaltransduktion via den N-Formyl-Peptid- oder IL-8-Rezeptor auszulösen. Wie die meisten auf Granulozyten chemoattraktiv wirkenden Substanzen bedient sich auch PEEC eines GTP-bindenden Proteins ( $G\alpha_i$ ), das eine intrazelluläre Erhöhung

der Kalziumionenkonzentration bewirkt (188). Steigert man die Konzentration von PEEC, so bewirkt dies bei Granulozyten eine rein chemotaktische Antwort, nicht aber eine Degranulation oder Steigerung des „oxidative burst“-Signals, wie dies bei den übrigen auf Granulozyten wirkenden Chemokinen zu beobachten ist (188). Nach McCormick *et al.* (188) existieren Wildstämme von *S. enterica* Serovar Typhi, die zwar IL-8, nicht aber PEEC induzieren. Hierdurch lässt sich die Beobachtung erklären, dass die Granulozyten während einer Infektion mit *S. enterica* Serovar Typhi nicht bis ins Darmlumen transmigrieren, sondern nur in die Darmschleimhaut hineinwandern (210).

Gewirtz *et al.* konnten später für die IL-8 Sekretion aus Epithelzellen das *S. enterica* Serovar Typhimurium-Protein Flagellin verantwortlich machen, nachdem die Bakterien mit der apikalen Epithelzellseite in Berührung gekommen waren (90). Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser apikale Kontakt eine epitheliale Signalkaskade in Gang setzt, die ihren Anfang mit der Translokation der GTPase ARF6 („ADP-ribosylation factor 6“) in die apikale Membran nimmt. Durch die Phospholipase D sowie die Proteinkinase C wird so die Abgabe von PEEC und die daraus resultierende Transmigration neutrophiler Granulozyten ermöglicht (49).

#### **2.1.2.5. *Shigella***

Vertreter der bakteriellen Gattung *Shigella* verursachen beim Menschen Enterokolitiden mit Kryptenabszessen und massiver Granulozyteninfiltration bis in die *Lamina propria* (76, 189). Perdomo *et al.* (241) beschrieben die durch *S. flexneri* induzierte transepitheliale Migration von Granulozyten durch ein Gewebekulturmodell nach Kontakt der Shigellen mit der apikalen Seite der Enterozyten. Im Gegensatz dazu sehen McCormick *et al.* (189) diese transepitheliale granulozytäre Migration erst nach Interaktion der invasiven *S. flexneri* mit der basolateralen Epithelzellseite. Neben diesem Kontakt sind die Expression von Genen des Invasionsplasmids sowie eine Beteiligung des Typ III Sekretionsapparates Voraussetzung für die Induktion der transepithelialen Migration von Granulozyten (189). Infolge der Migration von Granulozyten kommt es zu einer Auflockerung der Zell-Zell-Verbindungen („tight-junctions“). Die Shigellen nutzen und unterlaufen die granulozytäre Wirtsabwehrreaktion, indem die bakterielle Invasion über migrationsbedingt gelockerte „tight-junctions“ erleichtert wird (201).

Neben der Akquisition von Virulenzgenen im Hinblick auf eine evolutive Steigerung bakterieller Pathogenität kommt auch dem selektiven Verlust von „Antivirulenzgenen“ eine Bedeutung zu (182, 189). Ein solches Beispiel liegt auch bei *Shigella* vor: während das Gen für die Lysin-Dekarboxylase (*cadA*) in Shigellen naturgemäß fehlt, ist es in Salmonellen und enteropathogenen *E. coli* vorhanden. Lysin wird durch dieses Enzym zu Cadaverin abgebaut. Bei *Shigella* entsteht demnach kein Cadaverin. Durch exogen zugesetztes Cadaverin konnte die transepitheliale granulozytäre Migration *in vitro* verhindert werden, die sonst für die erfolgreiche Invasion der Epithelzellen durch Shigellen Voraussetzung ist (184).

#### **2.1.2.6. *Yersinia***

*Y. enterocolitica* ist als Erreger gastrointestinaler Syndrome mit akutem enterokolitischem Krankheitsbild sowie mesenterialer Lymphadenitis hinlänglich bekannt (29, 47). Im Gegensatz zu *Salmonella* und *Shigella* spp. stützt sich die Überlebensstrategie von *Yersinia* auf ein extrazelluläres Überleben und Vermehren innerhalb des Lymphgewebes des Dünndarmes (165, 284). Dazu findet eine Invasion der PEYER'schen Platten des Ileums statt (100). *Yersinia* spp. verfügen über eine Reihe chromosomal- und plasmid-codierter Virulenzgene (45, 57). Das 70 kB Virulenzplasmid, das das Adhäsins (YadA) und zahlreiche äußere Membranproteine (Yops) codiert, ist dabei besonders wichtig. Die Yops werden sezerniert und in die benachbarte Wirtszelle transloziert (45). Einige (YopH mit Protein-Tyrosin-Phosphataseaktivität und YopE, das Zytotoxin) spielen eine Rolle bei der Hemmung granulozytärer Zellfunktionen, namentlich Phagozytose und Bildung von Sauerstoffmetaboliten (25, 259, 260, 262). Den auf diese Weise Phagozytose-resistenten Yersinien erwächst durch die massive Infiltration von Granulozyten ein Vorteil bei ihrer Invasion im entzündlich vorgeschädigten Wirtsgewebe, was ihrer weiteren Ausbreitung Vorschub leistet (14, 187). Zwar existiert auch der Bericht, nach dem eine Phagozytose von *Y. enterocolitica* durch neutrophile Granulozyten stattfindet (26). Allerdings scheint dies öfter im Zusammenhang mit dem Verlust von Genen, also bei defekten Yersinien, aufzutreten. So war eine Mutante mit Deletion von *sodA* (Superoxid-Dismutase A) im Mausinfektionsmodell gegenüber dem Elternstamm attenuiert und wurde in *in-vitro*-Studien stärker durch neutrophile Granulozyten phagozytiert (257). Terti *et al.* konnten 1987 zeigen, dass *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* durch Virulenzplasmid-codierende

Strukturen einer Komplement-vermittelten Opsonisierung und so der Phagozytose entgehen (305).

Dem äußeren Membranprotein Invasin kommt eine wichtige Bedeutung in der Frühphase der intestinalen Infektion zu (240). Isberg und Leong (126) konnten eine Interaktion zwischen bakteriellem Invasin und  $\beta_1$ -Integrinen der Epithelzelle für die Invasion von *Yersinia* spp. verantwortlich machen. Darüber hinaus spielt das Invasin von *Y. enterocolitica* aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der IL-8 Produktion (276). Invasin-negative Mutanten von *Y. enterocolitica* vermochten keine IL-8-Produktion *in vitro* auszulösen, wohingegen Invasin-positive, rekombinante *E. coli* dazu in der Lage waren (276). Für zahlreiche enteropathogene Bakterien konnte nachgewiesen werden, dass der IL-8-Freisetzung aus infizierten Epithelzellen eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung vorausgeht (66, 72, 147, 204, 269, 274, 279). Während bei *Helicobacter pylori*, *S. enterica* Serovar Typhimurium oder enteropathogenen *E. coli* ein Typ-III-Sekretionssystem für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erforderlich ist, liegt bei *Yersinia* spp. ein differenter Mechanismus vor. Studien an Mutanten zeigten, dass *Y. enterocolitica*, denen das pYV-Virulenzplasmid-codierte Typ-III-Sekretionssystem fehlte, zur Induktion der epithelialen IL-8-Sekretion befähigt waren. Im Gegensatz dazu induzierten Wildtyp-Stämme von *Y. enterocolitica* überhaupt keine IL-8-Freisetzung aus Epithelzellen (275). *Yersinia*-Invasin induziert die Aktivierung des IL-8-Gen-Promotors über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (274). In der Folge wird IL-8 produziert. Allerdings wird die IL-8-Sekretion über eine spezifische Hemmung durch NF- $\kappa$ B verhindert. Eine derartige Suppression der IL-8-Sekretion könnte zudem auch auf dem Vorhandensein der äußeren Membranproteine YopP und YopJ beruhen (198, 262, 274).

Es stellt sich die Frage, ob bei einer Yersiniose die pro-inflammatorische Wirkung von Invasin durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder die anti-inflammatorische Wirkung von YopP/YopJ durch die Hemmung von NF- $\kappa$ B überwiegt. Beide Wege werden bei der intestinalen Yersiniose besprochen (41, 198, 240). Es wäre daher möglich, dass der über die Aktivierung und Hemmung von NF- $\kappa$ B auftretende „Netto-Effekt“ ausschlaggebend für die Pathogenese ist. Die dennoch stattfindende, abwehrbedingte Granulozyteninfiltration infolge IL-8 Sekretion könnte von *Yersinia* unterlaufen werden, indem die Erreger auf Plasmid-codierte Gene umschalten, die sie gegenüber der Phagozytose dieser Zellen resistent machen (274). Auf der anderen Seite beobachtet man nach Infektionen mit *Y. enterocolitica* in der Maus die Bildung

eines IL-1Ra, der nahezu vollständig von gewebsständigen neutrophilen Granulozyten synthetisiert wird (132). Durch diesen immunmodulatorischen Vorgang wird die pro-inflammatorische Wirkung des IL-1 abgemildert und eine Bekämpfung der lokalen Entzündung erzielt (132).

#### **2.1.2.7. *Escherichia***

Neben intestinalen, kommensalisch lebenden *E. coli*, die keine Wirtsabwehrreaktion im Sinne einer Infiltration von Granulozyten hervorrufen, kommen zahlreiche pathogene *E. coli* vor, die ein Repertoire zahlreicher Virulenzfaktoren besitzen. Eine Aufstellung solcher „*E. coli*-Pathovaren“ findet sich bei Sonnenberg und Whittam (2001) (59). Infektionen mit Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC), die nachfolgend genauer besprochen werden (Kap. 2.2), aber auch Infektionen mit enteropathogenen *E. coli* (EPEC) sowie enterotoxischen *E. coli* (ETEC) bewirken eine Infiltration neutrophiler Granulozyten in der Darmschleimhaut und *Lamina propria* (20). Granulozyten wandern dabei auch in Richtung Darmlumen, was zu Granulozyten enthaltenden Stuhlproben bei EPEC- und ETEC-Patienten führt (214). Savkovic *et al.* (270) beschreiben eine transepitheliale Migration von Granulozyten nach Infektion von T84-Zellen mit adhären EPEC, die nicht durch N-formyl-Peptide oder andere lösliche bakterielle Faktoren ausgelöst wurde. Wie Studien mit neutralisierenden Anti-Chemokin-Antikörpern ergaben, war für die chemotaktische Aktivität das in den Überständen vorhandene IL-8 verantwortlich. Bei EPEC wurde ebenfalls eine Beteiligung des *espB* Gens an der Transmigration von Granulozyten sowie der IL-8-Freisetzung beschrieben (269, 270). Auch unter *in vivo*-Verhältnissen im Schwein sehen Bhogal *et al.* (1987) (20) eine Akkumulation von Granulozyten in mit EPEC infizierten isolierten Darmabschnitten („intestinal-loops“). Als Hinweis auf einen protektiven Effekt erwiesen sich diese Granulozyten elektronenmikroskopisch als aktiv phagozytierend. Durch den Zerfall der Granulozyten konnten hohe Spiegel antibakterieller Produkte wie Laktoferrin, Lysozym und kationischer Proteine nachgewiesen werden, die zu einem extrazellulären Abtöten der Bakterien führten.

Hinweise auf eine Beeinträchtigung granulozytärer Abwehrmechanismen durch ETEC finden sich bei Hofman *et al.* (1998) (112). Der Zytotoxische Nekrosefaktor 1 (CNF1) ist ein 110 kDa Protein pathogener *E. coli*, das durch Reorganisationen von Aktin-Zytoskelettkomponenten zur Ausbildung von sogenannten Stressfasern führt.

Der Grund dafür liegt in einer permanenten Aktivierung der kleinen GTPase Rho, ein Protein, das die Permeabilität von Zell-Zell-Interaktionen („tight-junctions“) reguliert (215). Während der transepitheliale Widerstand bei Inkubation von CNF1 mit T84-Zellen unbeeinflusst blieb, zerstörte das bakterielle Protein jedoch den Mikrovillisaum der Zellen und unterband die transepitheliale Migration von Granulozyten. Da die Migration die Phagozytoseaktivität steigert, könnte eine Hemmung der Migration der bakteriellen Vermehrung Vorschub leisten. (113).

## **2.2. Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)**

Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) verfügen über ein *stx1*- oder *stx2*-Gen oder über beide und sind in der Lage, Shigatoxin zu bilden (324). Das Shigatoxin (Stx) wird wegen seiner zytotoxischen Wirkung auf Verorzellen auch als Verotoxin und diese *E. coli*-Stämme auch als Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet (59). Eine Untergruppe der STEC bilden die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC).

Die STEC besiedeln den Dickdarm, insbesondere das Kolon (93, 229) und sind nicht invasiv. Bei der Ausprägung systemischer STEC-bedingter Erkrankungen des Menschen spielt die Shigatoxämie eine Rolle.

Auf molekularer Ebene konnte mehrfach gezeigt werden, dass Wechselwirkungen der STEC und ihrer Shigatoxine mit unterschiedlichen, im Entzündungsgebiet lokalisierten Wirtszellpopulationen stattfinden. Die Chemokine der sogenannten C-X-C-Familie stellen eine Gruppe pro-inflammatorischer Substanzen dar, von denen IL-8 die bekannteste ist. IL-8 wird nach Stimulation durch STEC oder Stx von intestinalen Epithelzellen (154) (122, 308), Monozyten (248, 313) und Makrophagen (306) sowie von Granulozyten (103) gebildet. Die C-X-C-Chemokine, zu denen auch GRO- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  und das ENA-78 gehören, besitzen eine Wirkung im Sinne positiver Chemotaxis (122) und erhöhter Granulozytenaktivierung (308). Thorpe *et al.* (308) konnten 2001 den Nachweis erbringen, dass unter dem Einfluss von Stx1 die Transkription diverser C-X-C-Chemokin-mRNS in intestinalen Epithelzellen induziert und teilweise sogar superinduziert wird. Ferner konnten die mRNS für IL-8 und GRO- $\alpha$  durch Stx1 stabilisiert und die Menge des jeweiligen Proteins dosisabhängig gesteigert werden. Diese Ergebnisse sind aus dem Grunde besonders bedeutsam, weil man bislang angenommen hatte, dass Stx nur über die Hemmung der Proteinsynthese Apoptose induzieren kann (75). Vielmehr scheint aber auch ein als „ribotoxische Stressantwort“ bezeichneter Mechanismus aufzutreten, bei dem ein

Proteinsynthese-Inhibitor wie Stx zu einem sequenzspezifischen Schaden an der 28 S rRNS führt. Daraufhin werden durch Mitogene oder durch Stress Proteinkinasen wie p38 aktiviert und die Expression der „Sofortantwort“- oder Aktivatorgene *c-fos* und *c-jun* induziert. Als Folge kann eine generalisierte Proteinantwort beobachtet werden, bei der auch IL-8-Protein gebildet wird (307).

Unabhängig vom Stx als Pathogenitätsfaktor verfügen die meisten STEC-Stämme noch über weitere Pathogenitätsfaktoren (28, 138, 163, 236, 237), die in Kapitel 2.2.1.2. näher beschrieben werden. Durch die Genomsequenzierung der STEC-Klone EDL933 und Stamm Sakai wurden etliche potentielle Virulenzgene, die für Fimbrien, Adhäsine, Toxine, Sekretionssysteme und Eisen-Aufnahmesysteme codieren, nachgewiesen (242). Viele Virulenzgene sind auch auf dem 60 MDa großen Pathogenitätsplasmid (229) lokalisiert.

Der Mensch infiziert sich mit STEC über die Aufnahme fäkal verunreinigter, vom Rind stammender Nahrungsmittel (8), aber auch über kontaminiertes Trinkwasser, Apfelsaft und verschiedene Gemüsesorten (5, 218). Nach enteraler Besiedlung werden von den Keimen große Mengen an Shigatoxin produziert und freigesetzt (254). Für eine Infektion ist nur eine sehr geringe Erregermenge erforderlich (59). Während O157:H7 das häufigste STEC-Serovar in den USA, Canada, Großbritannien und Japan darstellt, kommen im kontinentalen Europa, in Australien und Lateinamerika vornehmlich non-O157:H7-Serovare vor (5).

## **2.2.1. Übersicht über die Virulenzfaktoren der STEC**

### **2.2.1.1. Shigatoxin**

Der Name Shigatoxin leitet sich von Kioshi Shiga ab, der 1898 nach einem Ausbruch einer bakteriellen Dysenterie *Shigella dysenteriae* Serotyp 1 („Shiga's bacillus“) als ursächliches Agens identifizieren konnte (282). In den letzten Jahrzehnten wurden wesentliche Eigenschaften des Shigatoxins erforscht. Besondere Erwähnung verdient dessen partielle Aufreinigung durch van Heyningen und Gladstone (1953) (312). Dubos und Geiger (1946) (63) sowie Chart *et al.* (1989) (39) stellten eine Hemmung der Toxinexpression in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration fest. Zytotoxische Wirkungen von Stx wurden zuerst für mikrovaskuläre Endothelien des Gehirns (33, 116) und bestimmte Epithelzellkulturen (316) beschrieben. Der Beweis, dass auch bestimmte Stämme von *Escherichia coli* in der Lage sind, Shigatoxin zu produzieren, gelang erstmals O'Brien *et al.* (1977) (224). Gleichzeitig fand eine andere

Arbeitsgruppe, dass das heute auch als Verotoxin bezeichnete Zytotoxin bestimmter Diarrhoe-verursachender *E. coli* eine Toxizität auf Verozellen ausübt (156). 1983 wurde von O'Brien *et al.* (225) nach einem epidemieartigen Ausbruch von hämorrhagischer Kolitis ein Shiga-like-Toxin-Gen im verursachenden Stamm des Serotyps O157:H7 nachgewiesen. Es handelte sich dabei um dasselbe Toxin wie das bei Johnson *et al.* (1983) (130) beschriebene Verotoxin. Einige Jahre später gelang der genetische Nachweis, dass sich das Shigatoxin 1 (von *E. coli* O157:H7) in keiner oder lediglich einer Aminosäure vom Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* unterscheidet (293, 299). Karmali *et al.* (1983) (145) wiesen erstmalig einen Zusammenhang zwischen Shigatoxin und dem Hämolytisch-Urämischen-Syndrom des Menschen nach. Eine Reihe von Autoren beschrieben in der Mitte der 1980er Jahre, dass Stx1 und 2 durch toxintragende, lambdaoide Phagen in *E. coli* codiert werden (216, 222, 277, 287, 295). Einige dieser Phagen wurden inzwischen kloniert und sequenziert (36, 118, 142, 212). Dabei konnten funktionelle Promotoren unmittelbar am 5'-Ende der Toxin-codierenden Sequenzen beschrieben werden (54, 296). Während eine niedrige Eisenkonzentration im Außenmedium der Keime den Stx1-Promotor induziert (38, 221), konnte für die Induktion des Stx2-Promotors kein Umweltparameter verantwortlich gemacht werden (202).

Habib und Jackson (1993) (96) konnten eine getrennt regulierte Translation von StxB und StxA nachweisen, was die A1:B5-Stöchiometrie bestätigt. Diese setzt je eine unabhängige Ribosomenbindungsstelle für das Gen von StxA und StxB im Operon des Toxingens voraus. Die Bindungsstelle vor dem Gen für StxB wird jedoch infolge seiner Haarnadelstruktur auf der transkribierten mRNA bei der Translation begünstigt, weshalb deren Translationseffizienz steigt. Zusätzlich wurde vor dem StxB-Gen noch ein unabhängiger Promotor nachgewiesen (54, 117, 322), durch den auch ein solitäres Transkript dieses Gens entstehen kann (96).

Ein Zusammenhang zwischen bakterieller Toxinfreisetzung und Phageninduktion wird mittlerweile nicht mehr bezweifelt. Durch die Replikation des Phagen wird die Anzahl an Toxin-Gen-Kopien gesteigert, es kommt zur Transkription dieser Toxingene während eines lytischen Phagenzyklus und damit zur gesteigerten Toxin-Freisetzung nach bakterieller Zell-Lyse (209, 245, 321). Wagner *et al.* (320) konnten zudem zeigen, dass von einer Deletionsmutante eines EHEC-Isolates, bei der der späte Phagenpromotor  $P_R'$  defekt ist, tatsächlich nur sehr wenig Toxin produziert wird. Die Phageninduktion und eine damit verbundene gesteigerte Toxinbildung

kann *in vitro* durch die DNS-beschädigenden Antibiotika Mitomycin C (202) und Fluoroquinolon (180, 333) erzielt werden.

Das Shigatoxin gehört wie auch das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* und das hitzelabile Enterotoxin von *E. coli* in die Gruppe der heteromeren Protein-Toxine. Diese bestehen aus einer 32 kDa großen A-Untereinheit (StxA) und einem Pentamer aus fünf 7,7 kDa großen B-Untereinheiten (StxB). Die A-Untereinheit besteht wiederum aus zwei Komponenten: dem A1-Fragment als enzymatisch aktivem Anteil und dem A2-Fragment, das das A1-Fragment mit den B-Untereinheiten verbindet. Letztere sind für die Bindung des Holotoxins an den Shigatoxin-Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77 verantwortlich. StxA besitzt RNS *N*-Glykosidaseaktivität für die eukaryontische 28 S rRNS (75). Diese führt zu einer Inaktivierung der 60 S Untereinheit des Ribosoms, wodurch die Proteinsynthese gehemmt wird (249).

Der Shigatoxin-Familie gehören unterschiedliche Toxingruppen an, deren einheitliche Nomenklatur von Calderwood et al, (1996) (37) stammt. Dieses System der Namensgebung findet auch in dieser Arbeit Beachtung. Alle Shigatoxine vereinen in sich die folgenden Eigenschaften (219):

- identische Operonstruktur
- Aufbau aus Polypeptid-Untereinheiten
- dieselbe spezifische enzymatische Aktivität
- Bindung an spezifische Glykolipid-Rezeptoren auf den Zielzellen.

Zur ersten Gruppe werden das Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* und das Shigatoxin 1 von *Escherichia coli* gerechnet, die nur in einer Base differieren (141). Stx1 wurde über einen längeren Zeitraum für monotypisch gehalten, neuere Untersuchungen zeigten aber auch in dieser Gruppe Unterschiede auf (12).

Für Stx2-Varianten wurde partielle Kreuzneutralisation, die aber nicht gegenüber Stx1 besteht, aufgezeigt (87). O'Loughlin und Robins-Browne (229) (2001) beschreiben Stx2 und seine Varianten Stx2c, Stx2d und Stx2e als Vertreter der zweiten Gruppe. Kürzlich wurde auch ein weiteres Shigatoxin, das bei STEC-Stämmen von Tauben gefunden wurde, zunächst als Stx2f (199, 273), mittlerweile aber als Stx3 (Wieler, persönliche Mitteilung) beschrieben. Vergleiche in der Aminosäure- und Nukleotidsequenz ergaben innerhalb der zweiten Gruppe 90% Homologien, wohingegen Gruppe 1 und 2 nur zu 55% homolog waren (223). Folgende Charakteristika unterscheiden die Toxingruppen auf Gen- und Proteinebene (219):

- keine Kreuzhybridisierung mit Polynukleotid-Gensonden unter stringenten Bedingungen
- keine Kreuzneutralisation durch homologe Antiseren
- Unterschiede in der Affinität der Rezeptorbindung
- Unterschiede in der  $CD_{50}$  für verschiedene Zell-Linien
- Unterschiede in der biologischen Aktivität gegenüber verschiedenen Labortieren

Betrachtet man die biologische Wirksamkeit der Shigatoxine, so fällt dessen selektive Zytotoxizität gegenüber bestimmten Zelllinien bzw. die vollständige Resistenz anderer Zell-Linien auf (71, 166, 230). Weiterhin lassen sich Toxizitätsunterschiede zwischen Stx1 und Stx2 feststellen (87, 105, 143, 217, 266). Angaben über die Toxizität *in vivo* finden sich bei Karmali (1989) (143).

### **2.2.1.1.1. Shigatoxin-Rezeptoren**

#### **2.2.1.1.1.1. Glykosphingolipid-Rezeptoren**

Der funktionelle Rezeptor für Shigatoxin entstammt der Globo-Reihe der Gruppe der Glykosphingolipide (97). Der Lipidanteil dieser Art von Molekülen wird von einem Zeramid gebildet, das durch die Veresterung der 2-wertigen Aminoalkohole Sphingosin oder Dihydrosphingosin mit einer variablen, langkettigen Fettsäure entsteht (97, 239). Der Kohlenhydratanteil findet über eine  $\beta$ 1-glykosidische Verbindung mit der endständigen Hydroxylgruppe des Sphingosins Anschluss an den Lipidanteil. Während der Lipidanteil des Glykosphingolipids innerhalb der Membran verankert ist, liegt der hydrophile Kohlenhydratanteil dazu fast rechtwinklig abgeknickt auf der Außenseite der Zellmembran (97). Dieser extrazelluläre Anteil wird durch Enzyme des Golgi-Apparates gebildet (227). Einfachstes Glykosphingolipid ist dabei das durch Anlagerung von Glukose und Galaktose entstehende Laktosylzeramid, das das Vorläufermolekül der Stx-Rezeptoren darstellt. Globotriaosylzeramid ( $Gb_3$ ) entsteht aus Laktosylzeramid durch Anlagerung eines weiteren Galaktoserestes.  $Gb_3$  wird auf verschiedenen Zellen des menschlichen und tierischen Körpers gefunden und fungiert bei Rind und Mensch als funktionaler Stx-Rezeptor (166, 194, 291). Globotetraosylzeramid ( $Gb_4$ ) stellt ein Molekül dar, bei dem einem  $Gb_3$ -Molekül ein endständiger N-Azetylgalaktoserest angefügt ist. Schließlich ist noch ein Galaktosylglobotetraosylzeramid bekannt, das starke Homologie mit dem Forssman-Blutgruppenantigen aufweist.

Stx bindet mit der höchsten Affinität und spezifisch an die terminale Galabiose des Gb<sub>3</sub>. Dabei stellt nur das Stx2e einen gewissen Sonderfall dar, denn es bindet bevorzugt an Gb<sub>4</sub>, aber auch an Gb<sub>5</sub> und das Forssman-Antigen; alle diese Moleküle besitzen eine terminale  $\beta$ 1-3 Galaktosestruktur. Bei den beiden letzteren liegen jedoch keine Informationen zur Funktionalität des Rezeptors vor.

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass auch eine spezifische Bindung von Stx an isolierte Galabiose (266) sowie an Galabiose in isolierten Oligosaccharidketten (34, 166, 318) in einigen Fällen möglich ist, jedoch steigt die Affinität für die Bindung, wenn das Oligosaccharid an ein Lipid oder Protein gekoppelt vorliegt (166). Eine Bindung von Stx1 an Gb<sub>4</sub> war unter besonderen Versuchsbedingungen möglich (104). In zwei Tumorzelllinien (Daudi- und HeLa-Zellen) konnte auch Gb<sub>2</sub> (Galabiosylzeramid) als funktioneller Rezeptor für Stx identifiziert werden (42, 266).

Vorkommen und Bedeutung von Stx-Glykosphingolipid-Rezeptoren sind bereits bei zahlreichen Zellarten untersucht worden. HeLa-, Vero-, Daudi-, MDBK- und PK(15)-Zellen erwiesen sich als spontan Rezeptor-tragend und sensitiv für einen Stx-spezifischen zytotoxischen Effekt (42, 55, 87, 143, 196, 217). Es ist aber auch möglich, nach Fusion einer resistenten Zelllinie mit Gb<sub>3</sub>-tragenden Liposomen eine Toxinempfindlichkeit zu induzieren. Grundsätzlich scheinen empfindliche Zellen mehr oberflächliche Gb<sub>3</sub>- und/oder Gb<sub>4</sub>-Rezeptoren zu besitzen als resistente Linien (166, 196, 230, 267).

Im Menschen sind Gb<sub>3</sub>- und/oder Gb<sub>4</sub>-Rezeptoren auf Endothelzellen nachgewiesen worden (127, 152, 173, 226, 310, 314). Die Rezeptordichte ist abhängig vom Durchmesser des Gefäßes sowie der Organlokalisierung. Es bestehen auch Unterschiede in der Bindungsfähigkeit bzw. Empfänglichkeit der Endothelzellen gegenüber Stx1 und Stx2 (174, 227, 228). Manche Endothelzellen exprimieren Gb<sub>3</sub> auch erst nach Vorstimulation mit LPS, IL-1 oder TNF- $\alpha$  auf ihren Zelloberflächen, wie dies bei mikrovaskulären Endothelien des Glomerulums der Fall ist (311, 315). Ein Nachweis von Gb<sub>3</sub> gelang ferner auf humanen B-Zellen (178), was zur synonym mit Gb<sub>3</sub> gebrauchten Bezeichnung CD77 (cluster of differentiation 77) geführt hat. Humane und murine Makrophagen wie glomeruläre Mesangiumzellen tragen den Rezeptor und binden Stx1 in unterschiedlichem Maße (30, 169, 255, 283, 306, 313, 314). Aktivierte humane Monozyten sind in diesem Zusammenhang als Transportmittel für Stx in der Zirkulation angesehen worden (313). Makrophagen

und Monozyten können durch die Bindung der Shigatoxine zur Synthese und Freisetzung von Zytokinen stimuliert werden, deren Wirkungen den Verlauf einer STEC-assoziierten Erkrankung erheblich beeinflussen können (146, 264, 306, 313). Die Gb<sub>3</sub>-vermittelte Bindung von Stx an andere Blutbestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten oder Lipoproteine ist immer wieder im Rahmen der Toxindistribution, aber auch der Entgiftung nach einer STEC-Infektion des Menschen diskutiert worden. Bitzan *et al.* (21) postulieren, dass Gb<sub>3</sub>/CD77 als Pk-Antigen und Gb<sub>4</sub> als P-Antigen auf humanen Erythrozyten vorkommen und auch eine Bindung der Shigatoxine an das P1-Blutgruppenantigen, ein Glykosphingolipid der Lakto-Reihe, beobachtet werden kann. Dagegen war ein Bindungsnachweis auf Erythrozyten, aber auch auf Monozyten, Thrombozyten und Lipoproteinen nach te Loo *et al.* (2000) nicht möglich (303). Auf Thrombozyten ist aber Gb<sub>3</sub>/CD77 sowie eine weitere Glykosphingolipid-Struktur als Stx-Rezeptor beschrieben worden (44) und Lingwood (167, 168) fand (1996) eine Bindung von Gb<sub>3</sub> an Lipoproteine, die ihrerseits wiederum Shigatoxine binden konnten.

Im Zusammenhang mit der Erforschung des Hämolytisch Urämisches Syndroms (s. Kap. 2.2.2.2.) wurde ein Stx-Rezeptor auch auf Epithelzellen der Tubuli und Sammelröhrchen der menschlichen Niere gefunden (119, 169). Die Expression des Rezeptors in Nierenepithelien ist altersabhängig: obwohl HUS häufiger bei Kleinkindern und älteren Menschen auftritt, besitzen die Nierenepithelien Erwachsener eine höhere Rezeptordichte (261).

Erwähnenswert sind auch die Gb<sub>3</sub>/CD77- und Gb<sub>4</sub>-Nachweise auf Makrophagen und Milchlipidmembranen der Muttermilch (91, 211) sowie das Vorkommen eines Stx-bindenden P1-Glykoproteins in der Hydatidenflüssigkeit der Finne des Hundebandwurmes *Echinococcus granulosus* (60).

#### **2.2.1.1.1.2. Alternativer Shigatoxin-Rezeptor**

Von te Loo *et al.* wurde 2000 ein alternativer Shigatoxin-Rezeptor auf humanen Granulozyten beschrieben (303). Studien dieser Arbeitsgruppe belegen nicht nur eine Bindung von Stx an diesen Rezeptor, sondern auch die erneute Abgabe von Stx von Stx-beladenen Granulozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro*. Messungen ergaben, dass dieser non-Gb<sub>3</sub>/CD77-Shigatoxin-Rezeptor Stx1 spezifisch und absättigbar auf der Zelloberfläche zu binden vermochte. Die Bindung geschah allerdings mit hundertfach niedrigerer Affinität als beim bekannten Rezeptor

Gb<sub>3</sub>/CD77. Wurden Stx1-beladene Granulozyten nach 2,5 stündiger Inkubation einer Trypsinbehandlung unterzogen, so führte dies zu einer 95 %igen Stx1-Freisetzung. Dies deutet darauf hin, dass keine Internalisierung des Shigatoxin-Rezeptor-Komplexes stattfindet, wie dies für Gb<sub>3</sub>/CD77 bekannt ist. Te Loo *et al.* vermuteten weiterhin, dass es sich bei diesem alternativen Rezeptor wegen der Trypsinsensitivität um kein Glykolipid handele, wenn auch in einer aus Granulozyten extrahierten Glykolipidpräparation zwei Stx1-bindende Glykolipidbanden unterhalb des Gb<sub>4</sub> identifiziert werden konnten.

#### **2.2.1.1.1.3. Proteinrezeptor für Stx**

Laut Devenish *et al.* existiert auch ein oberflächlicher Proteinrezeptor für Stx auf Gb<sub>3</sub>-defizienten Verozellen (58). Stx1 sowie dessen B-Untereinheit und Stx2 banden an diese Zellen, zeigten dabei jedoch unterschiedliche Bindungskinetiken. Anhand dieser unterschiedlichen Kinetiken schlossen die Autoren auf eine Bindungsstelle für Stx2 und mindestens zwei Bindungsstellen für Stx1.

#### **2.2.1.1.2. Wirkung der Shigatoxin-B-Untereinheit auf Zellen**

Mangeny *et al.* (177) wiesen eine Induktion von Apoptose bei einer Lymphomzelllinie (Burkitts Lymphoma) nicht nur durch Stx-Holotoxin nach. Derselbe Effekt war auch durch die rekombinante B-Untereinheit von Stx auslösbar und beruhte auf einem zusätzlichen Mechanismus unabhängig von der Hemmung der Proteinbiosynthese. Mangeny *et al.* (177) konnten damit erstmals einen Nachweis einer ausschließlich Glykolipidrezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion erbringen. Hinweise für schädigende Wirkungen der solitären StxB finden sich auch in späteren Arbeiten, wobei auch hier ein Effekt im Sinne einer Induktion von Apoptose vorzuherrschen scheint (7, 131, 205, 229). Nakagawa *et al.* (205) spezifizieren die Apoptoseinduktion näher, indem sie eine ausschließlich durch intrazelluläre StxB1 stattfindende Aktivierung der Kaspasen 1 und 3 im Zytoplasma von HeLa-Zellen zeigen. Für ihre Versuche hatten sie allerdings die Zellen zuvor für die Bildung der StxB1 transfiziert, während in den übrigen Arbeiten eine Bindung der StxB an den Rezeptor Gb<sub>3</sub> für die Auslösung eines Effekts genügte.

### 2.2.1.2. Andere Virulenzfaktoren

#### 2.2.1.2.1. LEE (Locus of enterocyte effacement)-Pathogenitätsinsel

Die LEE-Region enthält Gene (*esp*, *eae*, *tir*, *esc* und *sep*), durch deren Produkte das Anheften (attaching) an und das Verstreichen der Mikrovilli (effacing) von Epithelzellen geschieht. *Eae* (für *E. coli* attaching and effacing) codiert das äußere Membranprotein Intimin. Es wird neben den STEC auch von EPEC-Stämmen sowie *Hafnia alvei* und *Citrobacter rodentium* gebildet und dient als intestinaler Adhärenzfaktor (218). Die histologische Manifestation wird als A/E-(„attaching and effacing-“) Läsion bezeichnet. Das *tir* („translocated intimin-receptor“-) Gen codiert ein Protein, das nach der Adhäsion der Bakterienzelle in den Enterozyten transloziert wird (56, 150). Im Enterozyten bewirkt der Intimin-vermittelte Kontakt mit der Bakterienzelle über mehrere Phosphorylierungsreaktionen zellulärer Proteine (Proteinkinase C, Myosin-Light-Chain-Kinase) eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung, die wiederum eine Depolymerisation von Aktin initiiert (Neuorganisation des Zytoskeletts) sowie eine Auflockerung der Zell-Zell-Verbindungen („tight-junctions“) nach sich zieht. Das freigesetzte Aktin akkumuliert in Form eines plattformähnlichen, so genannten „pedestal“ unter dem adhärensten Bakterium, über das nun Signaltransduktionen zwischen Bakterien- und Wirtszelle ablaufen können. Hinsichtlich einer Wirkung auf benachbarte Zellpopulationen scheint das Gen-Repertoire der STEC nicht ohne Bedeutung zu sein. So induzierten solche STEC, denen die Gene *eae* und *espB* fehlten, signifikant höhere chemotaktische Effekte auf Granulozyten und eine erhöhte Freisetzung von IL-8 aus Epithelzellen im Vergleich zu Stämmen mit intaktem LEE (122). Besagte *eae*- und *espB*-negative STEC-Stämme, denen nachweislich die „LEE pathogenicity island“ fehlte, scheinen daher über andere, bislang unbekannte Faktoren zu verfügen, die die Granulozyten-Transmigration sowie die Induktion der IL-8-Freisetzung steuern (122).

#### 2.2.1.2.2. Hitzestabiles Enterotoxin EAST1

Ein Teil der STEC besitzt ein dem STa enterotoxischer *E. coli* ähnliches hitzestabiles Enterotoxin. Dieses Toxin wurde auch bei einer Vielzahl anderer *E. coli*-Pathovaren sowie bei nicht pathogenen *E. coli* gefunden (268) und wirkt über einen Guanylat-Cyclase Rezeptor. Über die Wirkung von EAST1 kann gegenwärtig nur spekuliert

werden, eine Beteiligung bei der Pathogenese einer unblutigen Diarrhoe erscheint aber möglich (137).

#### **2.2.1.2.3. Eisentransportsystem**

O157:H7-Keime verfügen über ein Eisentransportsystem, durch das sie in der Lage sind, Häm oder Hämoglobin als Eisenquelle zu nutzen (309). Der biologische Sinn des ebenfalls für *E. coli* nachgewiesenen Hämolytins könnte in der Verfügbarmachung von Eisen und weiteren erythrozytären Komponenten für die Bakterien unter ungünstigen Wachstumsbedingungen bestehen (208, 237).

#### **2.2.1.2.4. Plasmid-codiertes Hämolytin**

Als bakterielles Exotoxin tragen manche *E. coli*-Stämme das *hlyA* Gen auf einem 93 kBP Plasmid (235). Das so genannte EHEC-Hämolytin zerstört Erythrozyten. Es besitzt ähnliche Porenbildungseigenschaften wie das chromosomal-codierte *E. coli*  $\alpha$ -Hämolytin und fungiert als transienter selektiver Kationenkanal bei neutralem pH mit einer mittleren Porengröße von 2,6 nm (272).

Beim *E. coli*  $\alpha$ -Hämolytin handelt es sich um ein 110 kDa großes, Cystein-freies Protein mit mehreren Membranbindungsstellen. Es stellt den Prototyp der RTX („repeats-in-toxin“-)Familie dar (19). Es verstärkt die Adhäsionsfähigkeit humaner Granulozyten an humane Nabelvenenendothelien zeit- und dosisabhängig. Bei letzteren führt es zu einer erhöhten Expression von P-Selektin und PAF (158). Die granulozytäre Adhäsion ist durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen P-Selektin oder nach Vorbehandlung der Granulozyten mit Antikörpern gegen CD11b/CD18 hemmbar (158). Im Gegensatz zu Endotoxin hat *hlyA* auf die Expression von E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 keinen Einfluss (158).

#### **2.2.1.2.5. Exopolysaccharidkapsel**

Für O157:H7 konnte durch Junkins und Doyle (1992) (136) die umweltabhängige Ausbildung einer Kolansäure-ähnlichen Exopolysaccharidkapsel nachgewiesen werden, die möglicherweise eine Rolle bei der Adhärenz der Keime spielen könnte.

### **2.2.2. STEC-Infektionen des Menschen**

Noch 1987 ging man davon aus, dass sich der Mensch ausschließlich über Rohmilch und Fleisch von persistent infizierten Rindern (179, 323) und in selteneren Fällen auch von Menschen infizieren könne (300). Bereits zehn Jahre später wurden neben dem Rind auch andere Wiederkäuerspezies, aber auch Lebensmittel nicht tierischen Ursprungs (Früchte, Gemüse, Trinkwasser) für die Infektion des Menschen verantwortlich gemacht. Auch eine Infektion von Menschen und Rindern durch Wildwiederkäuer wurde in Betracht gezogen (148). Heute ist der Wiederkäuer als Hauptinfektionsquelle des Menschen anerkannt. Infektionen durch den Verzehr von Lebensmitteln nicht tierischen Ursprungs scheinen durch Kontaminationen mit STEC-belasteten Exkrementen von Wiederkäuern bedingt zu sein. Beim Menschen sind STEC-assoziierte Erkrankungen bekannt, die sich in Form von lokalen oder systemischen Krankheitsbildern manifestieren (143).

#### **2.2.2.1. STEC-Infektionen mit lokalem Krankheitsbild (Hämorrhagische Kolitis)**

Die meisten STEC-Infektionen verlaufen als Enteritis. Meist weisen erwachsene Patienten eine Kolitis auf. Dieses Krankheitsbild wurde erstmals 1982 nach dem Verzehr von Hackfleisch einer Restaurantkette beobachtet (4). Bei diesem Ausbruch traten bei Patienten schwere Bauchkrämpfe und schwere, blutige Diarrhoen fast ohne Fieber auf. Der STEC-Stamm O157:H7 konnte von vielen Erkrankten, nicht aber von Gesunden (218) isoliert werden.

Pathologisch-histologisch sind die betroffenen Darmabschnitte stark ödematös, erosiv und hämorrhagisch verändert (253). Es zeigt sich ein Verlust der Zottenspitzen im Bereich von Zaekum und Kolon mit Degeneration und Verdickung des Mikrovillisaumes. Hierbei kommt es stellenweise zu Ulzerationen (163). Darmassoziierte Gefäße prominieren durch eine Schwellung der Gefäßendothelien und eine Aufweitung des Subendothelialraumes. Durch diese Verengung des Gefäßdurchmessers entstehen thrombotische Mikroangiopathien und Nekrosen. Hämorrhagien und/oder Ödembildungen prägen dann das Krankheitsbild (35, 252). In der sich anschließenden Phase können Reparaturprozesse durch unreife Epithelzellen, aber auch submukosale Blutungen und Fibrinexsudationen beobachtet werden, weshalb dieses Krankheitsbild als STEC-assoziierte hämorrhagische Kolitis

bezeichnet wird. Über mildere Verlaufsformen von O157:H7-Infektionen mit einer unblutigen Diarrhoe berichten Griffin und Karmali (95, 143).

Für die Pathogenese der Diarrhoe kommen ätiologisch verschiedene Mechanismen in Frage. Die Intimin-abhängige Phosphorylierung der Proteinkinase C (s. Kap. 2.2.1.2.1.) bewirkt über eine intrazelluläre Kalzium-Freisetzung als unmittelbare Folge auch eine Sekretion von Chlorid-Ionen über einen CFTR-Ionenkanal, denen Wassermoleküle folgen und so eine Vorbedingung für das Krankheitsbild der Diarrhoe darstellen (137). Dieselbe Signalkaskade verursacht in ihrer Konsequenz eine Auflockerung der Zell-Zell-Verbindungen („tight-junctions“), durch die sich ein vermehrter Efflux von Interstitialflüssigkeit in das Darmlumen erklären lässt (137). Interessant ist ferner die Hypothese, dass die infolge NF $\kappa$ B-Freisetzung und IL-8-Gen-Transkription vermehrt in das Darmlumen einwandernden Granulozyten durch die Abgabe von 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) zur Diarrhoe führen können (175). Dieses 5'-AMP wird im Darmlumen zu Adenosin, einem potenten Mediator intestinaler Chlorid- und Wassersekretion, abgebaut. Auch der nicht obligate Pathogenitätsfaktor EAST1 Enterotoxin (s. Kap. 2.2.1.2.2.) ist als Folge seines stimulierenden Einflusses auf die Guanylat-Cyclase als Auslöser unblutiger Diarrhoen identifiziert worden (137). Schließlich kommt dem Verlust der absorptiven Oberfläche des Darmes nach Ausbildung der A/E-Läsion im Sinne eines Malabsorptionssyndromes Bedeutung zu, was sich ebenfalls in einer Diarrhoe manifestieren kann (137).

Als Folge der Granulozyten-Transmigration muss der Verlust der Integrität der Barrierefunktion des Darmes durch Erweiterung der parazellulären Räume („tight-junctions“) gewertet werden. Dies führt zu einer erhöhten Resorption von Darminhaltsstoffen in die systemische Zirkulation (207, 234). Kucharzik *et al.* beschreiben eine verminderte Bildung des wichtigsten „tight-junction“-Transmembranproteins Occludin auf Protein- und Nukleinsäureebene in entzündeten Darmabschnitten, in denen Granulozyten aktiv transmigrierten (159). Das von den STEC im Darmlumen gebildete Shigatoxin gelangt auf diese Weise, möglicherweise auch durch aktiven Transport, in das subepitheliale Gewebe der Darmwand (2). Hier wird es als biologisch aktives Toxin in das Blut- und Lymphgefäßsystem aufgenommen und systemisch verteilt (1, 121). Es konnte sogar belegt werden, dass es *in vitro* zu einer gesteigerten Toxinaufnahme kommt, nachdem eine Epithelschicht von Granulozyten durchwandert wurde. Dazu haben Hurley *et al.* (2001) (122) an

einem konfluenten Monolayer humaner T84-Enterozyten den Effekt der parazellulären Permeabilitätssteigerung nach Transmigration von Granulozyten auf die Resorption von Stx näher untersucht. Dieser Effekt besteht in einer gesteigerten Translokation von Stx1 und Stx2 von apikal nach basolateral, die der Anzahl der in der entgegengesetzten Richtung transmigrierten Granulozyten direkt proportional ist (122).

Die infolge der STEC-Infektion veränderten Darmabschnitte zeigen auch histologisch eine Infiltration neutrophiler Granulozyten (32, 98, 149, 252) und Monozyten sowie Kryptenabszesse (149). Bei 70 Prozent der mit Serovar O157:H7 infizierten Personen konnten Leukozyten im Darmlumen festgestellt werden (149). Beim Kaninchen, einem wichtigen Tiermodell der STEC-Infektion, wird ebenfalls eine Kolitis beobachtet. Hier werden nach nur zwei Tagen *post infectionem* massive Infiltrationen neutrophiler Granulozyten in *Lamina propria* und Epithel gefunden (232). Die vorherige intravenöse Gabe des gegen das Granulozyten-Adhäsionsmolekül CD18 gerichteten Antikörpers vermochte bei mit O157:H7 infizierten Kaninchen die klinische und histologische Ausprägung einer Kolitis sowie die granulozytäre Infiltration betroffener Darmabschnitte zu verhindern (73).

Einem erhöhten Verbrauch von Granulozyten im entzündlich veränderten Gebiet wird scheinbar in der Weise Rechnung getragen, dass zumindest Stx2 eine medulläre granulopoetische Stammzellendifferenzierung hin zu vermehrt reifen Granulozyten unterhält, die sich in Form einer peripheren Granulozytose manifestiert (6). Fernández *et al.* (2000) (78) konnten durch Stx2-Injektionen in Mäuse eine Neutrophilie induzieren. Diese unterschied sich von einer LPS-bedingten Neutrophilie durch eine längere Anstiegsphase bis zum granulozytären Maximalwert. Eine Entspeicherung des Knochenmarks konnte dabei zu keiner Zeit beobachtet werden, was ebenfalls den Schluss einer vermehrten Produktion nach sich zieht. Ferner zeigten die Granulozyten in den Untersuchungen von Fernández *et al.* (2000) eine erhöhte Expressionsrate des knochenmarkspopulationsspezifischen Aktivierungsmarkers CD11b/CD18. Dieses Oberflächenmolekül ist nach Arnaout (9) an Prozessen wie Adhäsion an Endothel, Phagozytose und Superoxidproduktion beteiligt, die mit einer gesteigerten granulozytären Aktivierung einhergehen. So waren bei diesen Neutrophilen auch eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit an Lungenendothelien und ein erhöhtes zytotoxisches Potential nachweisbar.

Nur wenige Autoren berichten über Wirkungen des Shigatoxins auf Zellfunktionen und Vitalität von Granulozyten. Eine Reihe klinischer und experimenteller Studien untersuchen den Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktion und Steigerung der Stx-Toxizität während der STEC-Infektion (78, 308). Die Proteinsynthesehemmende Wirkung des Stx alleine vermag nach Fernández (78) keinen tiefgreifenden Gewebeschaden zu verursachen. Dieser ist vielmehr durch die Granulozyten bedingt, die synergistisch in das Geschehen involviert sind. King *et al.* (1999) (154) fanden heraus, dass Shigatoxin 1 humane Granulozyten dosisabhängig zu verstärkter Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite stimuliert. Gleichzeitig wurde aber eine Abschwächung der Phagozytoseaktivität sowie der Aktivierbarkeit durch den Phorbolester PMA bei diesen Zellen festgestellt. Eine Stx1-abhängige Wirkung auf Apoptose und Nekrose konnte dabei nicht beobachtet werden. King *et al.* (154) sehen in den spezifischen Wirkungen des Toxins auf bestimmte Funktionen der Granulozyten Hinweise auf die Entstehung des pathologischen Erscheinungsbildes während der Frühphase einer STEC-Infektion sowie die daraus resultierenden systemischen Komplikationen. So bewirkt und unterhält die Anhäufung reaktiver Sauerstoffmetabolite im Bereich der Darmwand nicht nur einen verstärkten Gewebeschaden, der der Resorption des Toxins Vorschub leistet, sondern es kommt auch in deren Folge zur Sezernierung von interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (278), von Willebrandt Faktor (317), Stickoxid (NO), PAF sowie IL-1 und IL-8 aus humanen Endothelzellen (67, 334). Die Hemmung der Phagozytoseaktivität bewirkt letztlich eine Hemmung der Wirtsantwort auf die bakterielle Infektion hin (154).

Im Gegensatz dazu beschreibt die japanische Arbeitsgruppe um Liu *et al.* (171) eine zeit- und dosisabhängige Verzögerung der Apoptose humaner Neutrophiler nach Kontakt mit Stx2 *in vitro*. Liu *et al.* (171) spekulieren, dass eine Beteiligung des Proteinkinase C (PKC)-Weges für die Apoptose-verzögernde Wirkung des Stx2 verantwortlich ist, weil dieser Effekt durch einen PKC-Inhibitor aufgehoben werden konnte. Sie interpretieren ihre Ergebnisse dergestalt, dass aus einem längeren Überleben der Granulozyten ein stärkerer Gewebeschaden resultiert, der der ungehinderten Vermehrung der STEC Vorschub leistet.

Wagner *et al.* beschreiben eine Beeinflussung der STEC durch die granulozytäre Wirtsantwort (319). Es besteht demnach ein Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten Stx der STEC und der Anwesenheit von Granulozyten. *In vitro* konnte

nicht nur durch Wasserstoffperoxid, sondern auch durch die Granulozyten selbst die Stx2-Freisetzung aus einem klinischen EHEC-Isolat gesteigert werden. Man vermutet als Erklärung, dass eine DNS-schädigende Substanz wie Wasserstoffperoxid analog der Wirkung von Mitomycin C und Fluoroquinolon (s. Kap. 2.2.1.1.) zu einer Induktion des Prophagenoms führt. Dabei ließ sich nicht nur eine gesteigerte Toxinproduktion, sondern auch ein zehnfacher Anstieg des Phagentiters nachweisen. Diese Beobachtung fand ihre Bestätigung durch eine Reihe von Vergleichen mit einer EHEC-Mutante, die durch Deletion der späten Region des Phagenpromotors auch nach Anwendung von Mitomycin C weniger Toxin produziert (320). Die Mutante bildete nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid, aber auch nach Kokultur mit Granulozyten sowie mit Inhibitoren neutrophiler NADPH-Oxidase-Enzymsysteme deutlich weniger Toxin als der Wildtypstamm.

#### **2.2.2.2. STEC-Infektionen mit systemischem Krankheitsbild (Hämolytisch-Urämisches-Syndrom und Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura)**

Bei 5 bis 10 Prozent der Patienten, vor allem bei Kindern oder älteren Menschen, entwickeln sich in der Folge einer STEC-Infektion systemische Komplikationen (122). Ausgangssituation ist die lokale STEC-Infektion des Darmes, die in ihrer klinischen Manifestation bis zu den schon gezeigten Symptomen einer HC reichen kann (s. Kap. 2.2.2.1.). Erst die systemische Verbreitung von Stx im Organismus ist für die nachfolgend beschriebenen Krankheitsbilder verantwortlich.

Vornehmlich beim Kleinkind ist das Hämolytisch-Urämische-Syndrom (HUS) gefürchtet, das mit akutem Nierenversagen, Thrombozytopenie und mikroangiopathischer hämolytischer Anämie assoziiert ist. In besonders schweren Fällen verläuft die Erkrankung auch mit Zellschädigungen in anderen Organen wie Pankreas und Gehirn (303). Die Nieren von HUS-Patienten zeigen Schwellungs- und Ablösungserscheinungen von Endothelzellen der Glomerula sowie Fibrinablagerungen in Glomerula und Arteriolen (139, 250). In der Mehrzahl der Fälle tritt HUS gekoppelt mit blutiger Diarrhoe auf (258), was auch als (D+) HUS bezeichnet wird. Im westlichen Europa werden 85 % aller (D+) HUS-Erkrankungen durch Stx2-bildene *E. coli* verursacht (108, 140, 144).

Bei der Thrombotisch-Thrombozytopenischen Purpura (TPP) handelt es sich um das dritte STEC-assoziierte Krankheitsbild des Menschen. TPP wird häufiger bei

erwachsenen Patienten beobachtet. Im Gegensatz zum HUS stehen die neurologischen Komplikationen im Vordergrund, es kann aber auch zu Diarrhoe, Hämolyse, Thrombozytopenie, Nierenversagen und Fieberschüben kommen. Scheinbar unterscheidet sich die Pathogenese von HUS und TTP in grundsätzlichen Punkten. Während man bei HUS von einer primären Störung vaskulärer Endothelien ausgeht, scheint bei der TTP hauptsächlich eine Störung auf Basis der Plättchenaggregation stattzufinden. Allerdings belegen neuere Untersuchungen auch eine Apoptoseinduktion mikrovaskulärer Endothelien nach Applikation von Plasma von TTP-Patienten (258).

Bei der Pathogenese systemischer STEC-assoziiierter Krankheitsbilder scheint dem Stx eine Schlüsselrolle zuzufallen (208, 237). Nach der intestinalen Produktion durch adhärente STEC wird das Stx durch die Barriere der Darmschleimhaut in den Körper aufgenommen. Der infolge der Wirtsabwehr durch Granulozyten entstandene Gewebeschaden am Darm wirkt hierbei resorptionsbegünstigend. Die systemische Verbreitung über das Blutgefäßsystem ist zwingende Voraussetzung für eine schädigende Wirkung des Stx auf sensible Endothelien des Organismus (3, 237).

Im Zusammenhang mit der Erforschung der Rolle von Granulozyten bei einer STEC-Infektion hat die Arbeit von te Loo *et al.* (2000) (303) besondere Aufmerksamkeit erregt, in der humane Granulozyten als fast ausschließliches intravasales Transportmittel für Stx1 angesehen werden. Bislang wurden hierfür Glykolipidstrukturen auf Erythrozyten (13, 21, 256, 302), Monozyten (313), Thrombozyten (44) oder Blutkomponenten wie Lipoproteinen (167) verantwortlich gemacht. Eine nennenswerte Bindung an sämtliche genannten Blutbestandteile inklusive Lymphozyten im Vollblut wurde jedoch von te Loo *et al.* (2000) (303) widerlegt. Der schon beschriebene alternative non-Gb<sub>3</sub>/CD77-Shigatoxin-Rezeptor auf humanen Granulozyten (s. Kap. 2.2.1.1.1.2.) ermöglichte durch seine niedrigere Affinität eine Übertragung von Stx von Granulozyten auf mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro* (303). Eine derartige Übertragung bewirkte bei 30 bis 40 Prozent der unstimulierten Endothelzellen eine Hemmung der Proteinsynthese und Zelltod. Dagegen beeinträchtigte die alleinige Inkubation mit Granulozyten oder mit Shigatoxin die Endothelzellen nicht. Vorstimulierte Endothelien zeigten eine Hemmung der Proteinsynthese sowie schwere zytotoxische Effekte nach Kontakt mit Stx1-beladenen Granulozyten und Stx1 (303). Derselben Arbeitsgruppe gelang erstmalig der Nachweis von Stx2 im Blut von Patienten, die an einer epidemischen

Form des HUS mit blutiger Diarrhoe litten (304). Das Toxin konnte ausschließlich an polymorphkernige Granulozyten gebunden nachgewiesen werden. Im Verlauf der Erkrankung war bei der überwiegenden Anzahl der Patienten eine Reduktion der Stx-Bindung an Granulozyten zu verzeichnen, wohingegen bei manchen Patienten nach fünf Tagen eine Bindung von Stx2 zusätzlich an Monozyten nachgewiesen werden konnte (304). Eine verstärkte Adhärenz von Granulozyten bei HUS-Patienten an die Endothelzellen der Blutgefäße beschreiben Forsyth *et al.* (83).

Im Hinblick auf die Funktion von Granulozyten bei der STEC-Infektion ist auch deren Beteiligung am Gewebeschaden vor allem in der Niere von Bedeutung. Eine Infiltration von Granulozyten findet sich in Autopsiematerial der Nieren von (D+) HUS-Patienten (124, 197). Fitzpatrick *et al.* (1992) (81, 82) konnten eine Aktivierung sowie die gesteigerte Sekretion von IL-8 und Elastase von Granulozyten von HUS-Patienten nachweisen. Während die Wirkung von IL-8 als proinflammatorischem Zytokin bereits ausführlich dargestellt worden ist (s. Kap. 2.2.), scheint die freigesetzte Elastase neben ebenfalls sezerniertem Superoxid (154) maßgeblich zum Endothelschaden beizutragen, wie er im Verlauf einer STEC-Infektion zu beobachten ist (81-83).

Einige Autoren (120, 200, 265) konstatieren, dass die Zahl neutrophiler Granulozyten des Blutes auch einen Vorhersagecharakter für den Ausgang einer HUS-Erkrankung hat. Auch Fernández *et al.* (78) beschreiben eine positive Korrelation zwischen neutrophilem Differentialblutbild und dem Ausmaß des Nierenschadens.

### **2.2.3. STEC-Infektionen des Wiederkäuers**

Der Wiederkäuer ist die Hauptquelle für STEC-Infektionen des Menschen (95) und spielt daher eine wichtige Rolle in Bezug auf die Epidemiologie der STEC. Der Wiederkäuer ist persistent infiziert, erkrankt aber bei einer STEC-Infektion in der Regel nicht (48). Lediglich bei Kälbern in den ersten Lebenswochen können dem Menschen und dem Kaninchen vergleichbare Enteritiden entstehen. Auch hier lassen sich eine Atrophie der Mikrovilli, Zerstörung von Epithelzellen und eine diffuse Infiltration neutrophiler Granulozyten in *Lamina propria* und Darmlumen nachweisen. Pseudomembranöse Beläge aus Blut, Fibrin, Zelldebris und Neutrophilen führen zu einer wässrigen, zuweilen auch blutigen Diarrhoe (99, 238). Allerdings reagieren die Kälber sehr unterschiedlich auf die STEC. Es lassen sich

eine starke Altersabhängigkeit, aber auch Abhängigkeiten vom jeweiligen STEC-Stamm beobachten. So zeigen Stämme des bei humanen Infektionen isolierten STEC-Serovars O157:H7 bei der Infektion konventioneller, aber auch fünf Tage alter gnotobiotischer Kälber einen asymptomatischen Verlauf (48, 329). Dagegen erkranken neugeborene, kolostrumfrei aufgezogene Kälber an einer Enterokolitis (51). Das bakterielle Intimin zur Kolonisierung wird für die krankmachende Eigenschaft verantwortlich gemacht (53). Demgegenüber sollen Stämme des STEC-Serovars O103:H2 bei Kälbern regelmäßig krankmachend sein (176, 325) und konnten auch von einer Ziege mit enteraler Krankheitssymptomatik isoliert werden (64).

Stevens *et al.* (2002) (292) führten Tests an isolierten mittleren Ileumabschnitten („ileal-loop-test“) vier Wochen alter konventioneller Kälber sowie an einem sieben Tage alten Gnotobioten durch. Während ein Stamm des Serovars O157:H7 keine enteropathogenen Eigenschaften im Sinne eines Flüssigkeitseinstromes und der Einwanderung neutrophiler Granulozyten hatte, rief die Inokulation mit einem Stamm des Serovars O103:H2 eine starke Wirtsabwehrreaktion hervor. Für die beobachtete Entzündungsreaktion war weder das Shigatoxin noch die Kolonisierung der Schleimhaut durch die Bakterien die Voraussetzung, wie dies durch O103:H2-Mutanten, die eine Deletion der Gene *stx1*, *eae* und *tir* aufwiesen, gezeigt werden konnte. Das *eae*-Gen scheint ohnehin keine zwingende Voraussetzung für einen enteropathogenen Verlauf der Infektion zu sein, weil schon STEC-Stämme im Zusammenhang mit einer Diarrhoe bei Kalb und Mensch isoliert wurden, die *eae*-Gen-negativ waren (65, 77, 325). Dean-Nystrom *et al.* (52) wiesen bereits nach, dass auch das Shigatoxin zumindest nicht als obligater Pathogenitätsfaktor einzustufen ist, weil sowohl Stx1-negative als auch Stx1-positive Stämme des *E. coli* O157:H7-Serovars bei neugeborenen Kälbern für die Ausbildung einer Diarrhoe verantwortlich gemacht werden konnten.

Bislang unzureichend geklärt ist die Frage, warum eine STEC-Infektion beim Wiederkäuer in der Regel symptomlos, aber persistent verläuft. Offenbar hat das Stx dabei eine wichtige Bedeutung, denn Cornick *et al.* konnten nachweisen, dass STEC länger bei Schafen persistieren als EPEC (46). Ob für die Persistenz der STEC-Infektion des Wiederkäuers eine Immuntoleranz des Wirtes verantwortlich ist oder ob Mechanismen einer von den Bakterien induzierten Immunsuppression dominieren, bedarf weiterer Forschung. Gegen eine Toleranz sprechen Befunde von

Menge (190, 195), der erstmalig eine immunmodulatorische Wirkung durch Shigatoxin beim Rind feststellen konnte. Bovine Lymphozyten-Subpopulationen exprimieren nach Stimulation Gb<sub>3</sub>/CD77 (192, 194). Obwohl Gb<sub>3</sub>/CD77 als humaner Stx-Rezeptor bekannt wurde, konnte kürzlich diese Struktur erstmals auch beim Rind als homologer, funktionaler Stx-Rezeptor identifiziert werden (194, 291). Im Gegensatz zum Menschen wird Gb<sub>3</sub>/CD77 beim Rind jedoch nicht nur auf B-, sondern auch auf T-Lymphozyten-Subpopulationen exprimiert (194). Dies trifft auch auf die mehrheitlich aus T-Lymphozyten bestehenden bovinen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) des Ileums zu, die als erste Immunzellen mit dem Stx in Kontakt kommen (24). Sowohl Stx1-Holotoxin als auch dessen rekombinante B-Untereinheit binden an Gb<sub>3</sub>/CD77 stimulierter boviner PBMC (291). Während der Phase der Lymphozytenaktivierung kommen verschiedene Rezeptor-Isoformen vor, die sich hinsichtlich ihrer Affinität für die Bindung der rStxB1 unterscheiden (291). Diesen Sachverhalt untermauert auch der Befund, dass die rStxB1 und der monoklonale CD77-Antikörper bei den verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlich stark binden (291). Die Toxinaufnahme durch mindestens eine dieser Isoformen ist zwar möglich, kann aber als gering angesehen werden (291). Die Sensitivität boviner Lymphozyten für Stx1 korreliert nicht mit dem oberflächlichen Gehalt von Gb<sub>3</sub>/CD77. Vielmehr lässt sich eine transiente Empfindlichkeit während der Frühphase der Aktivierung beobachten, in der Gb<sub>3</sub>/CD77 nur niedrig bis moderat exprimiert wird (193). Werden bovine Lymphozyten nämlich über einen längeren Zeitraum aktiviert, dann zeigen diese eine hohe Gb<sub>3</sub>/CD77-Expression. In diesem Zustand erweisen sich bovine Lymphozyten als refraktär gegenüber Stx1 (193).

Betrachtet man die mit dem Stx verbundene Wirkung auf Zellen des Immunsystems, so induziert Stx1 Apoptose in einer bovinen lymphoiden Zelllinie. Es hemmt ferner die Aktivierung und Proliferation boviner Lymphozyten-Subpopulationen hin zu Lymphoblasten *in vitro* (195). Dies war besonders bei BoCD8<sup>+</sup> T-Zellen und BoCD21<sup>+</sup> B-Zellen des Blutes sowie bei sämtlichen IEL-Subpopulationen ausgeprägt (23, 195, 290). Während sich auch BoCD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation als Rezeptor-tragend erweisen, scheinen diese aber hinsichtlich einer Wirkung durch Stx1 nur marginal beeinträchtigt zu werden (195). Stx1 führt weiterhin nach mehrtägiger Inkubation zu einer starken Reduktion vitaler Gb<sub>3</sub>/CD77<sup>+</sup>-Zellen der Blasten- und non-Blasten-Population (193). Dieser Leukotoxin-ähnliche Effekt ist unabhängig von der Lymphozyten-Subpopulation. Stx1 wirkt spezifisch auf bovine

Lymphozyten (193), d.h. die Wirkung ist nicht auf Effekte von Zytokinen (IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$ ) zurückzuführen (193). Allerdings hat Stx1 einen Einfluss auf Zytokin-mRNS-Profile von IEL, indem es die Transkription von IL-4-mRNS steigert und zu einer Hemmung von IL-8-mRNS führt (23). Verschiedene bovine Lymphozyten-Subpopulationen müssen daher als Zielzellen für Stx angesehen werden, was die Bedeutung des Stx im Hinblick auf eine Immunsuppression des Wiederkäuers unterstreicht. Die transiente Stx-Empfindlichkeit boviner Lymphozyten-Subpopulationen während ihrer Aktivierung scheint darauf hinzudeuten, dass *in vivo* durch die STEC vornehmlich die gerade beginnende, lokale Immunantwort gehemmt wird (193). Gegen eine generelle Immunsuppression spricht auch, dass Rinder Antikörper gegen Stx bilden (244). Diese führen offensichtlich nicht zu einer Elimination der STEC (129) und schützen auch nicht vor einer Reinfektion (111, 129).

Bovine Epithelzellen exprimieren einen Stx-Rezeptor (110), wie dies auch von einigen humanen Darmzelllinien bekannt ist (114), scheinen aber nicht empfänglich für einen zytotoxischen Effekt zu sein (Menge, unveröffentlichte Daten). Obwohl Bitzan *et al.* zeigen konnten, dass Stx bei bovinen Aortenendothelzellen die Transkription von prepro-Endothelin-1-mRNS steigert, sind histologische Schädigungen beim Rind unbekannt (22). Pruimboom-Brees *et al.* erklären dies mit dem Fehlen von Stx-Rezeptoren auf den Endothelzellen der kleinen Gefäße (246). Da derzeit die Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese humaner STEC-Infektionen diskutiert wird, sind Unterschiede zwischen Mensch und Wiederkäuer besonders bemerkenswert. Das Fehlen von Stx-Rezeptoren auf humanen T-Lymphozyten stellt gegenwärtig den prägnantesten Unterschied in der Stx-Rezeptorverteilung bei Wiederkäuer und Mensch auf der Ebene des Immunsystems dar (291). Allerdings fehlen bisher Untersuchungen bei Wiederkäuern zu einer Beteiligung des unspezifischen Immunsystems. Granulozyten als Vertreter der unspezifischen Abwehr sind beim Menschen als Zielzellen (154, 171) bzw. als intravasales Transportmittel für Stx (303) identifiziert worden.

### **3. Eigene Untersuchungen**

#### **3.1. Material und Methoden**

##### **3.1.1. Gewinnung von Shigatoxin 1 (Stx1)**

Das Ausgangsmaterial an Stx1-Holotoxin, das für diese Arbeit verwendet wurde, ist nach den Angaben von Stamm (2000) (290) hergestellt. Dazu wurde das bovine STEC-Feldisolat 2403 (STEC1, Serotyp rau:H-), wie bereits beschrieben (190), angezüchtet. Um eine große Menge dieser Bakterien für die Stx1-Produktion zu erhalten, fand die Massenvermehrung einer zuvor subkultivierten Kolonie des Keimes in einem Fermenterbehälter (Biostat<sup>®</sup>, Fa. Braun) statt. Die auf diese Weise gewonnene Bakteriensuspension wurde mit Trasyol<sup>®</sup> (Fa. Bayer) versetzt, mit Ultraschall behandelt und schließlich der Überstand ultrazentrifugiert. Bis zur weiteren Aufreinigung wurde das Roh toxin in gleichem Volumen Laufpuffer 1 bei 4 °C gelagert.

##### **3.1.2. Gewinnung der B-Untereinheit von Stx1 (rStxB1)**

Die Herstellung der rStxB1 war bereits bei Beginn der Versuche abgeschlossen und verlief wie bei Stamm (2000) (290) beschrieben. Für die Gewinnung und Reinigung der rekombinanten B-Untereinheit des Stx1 wurde der mit dem Plasmid pSU108 transformierte *E. coli* - K12-Stamm DH5 $\alpha$ [pSU108] verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Kirsten Niebuhr, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig). Der Keim wurde zur Produktion einer größeren Menge rStxB1 nach der Methode von Niebuhr (213) (1991) angezüchtet. Dazu wurde die Bakteriensuspension bis zum Erreichen der bei 560 nm gemessenen optischen Dichte (OD<sub>560</sub>) von 0,8 inkubiert. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42 °C erfolgte die Induktion des unter Kontrolle eines temperatursensitiven Repressors stehenden Gens für die B-Untereinheit (271). Die periplasmatische Fraktion konnte durch hypotone Behandlung und Zentrifugationen von der zytoplasmatischen Fraktion getrennt werden; ihre Reinheiten wurden schließlich in der SDS-PAGE (Kap. 3.1.3.3.2.) sowie mit dem Immunoblot (Kap. 3.1.3.3.3.) untersucht.

### **3.1.3. Proteinaufreinigung**

#### **3.1.3.1. Aufreinigung von Stx1**

##### **3.1.3.1.1. Farbstoff-Affinitätschromatographie**

Für die Aufreinigung des Rohtoxins wurde die Methode, wie von Menge (1996) beschrieben, verwendet (190). Stx bindet den Farbstoff Cibacron blue 3G-A (220) und konnte daher an zwei in Reihe geschalteten, vorgefertigten Säulen (HiTrap blue™, Fa. Pharmacia), die mit Cibacron blue 3G-A gebunden an Agarosekügelchen bestückt waren, in einer FPLC®-Anlage (Fa. Pharmacia) aufgereinigt werden.

##### **3.1.3.1.2. Immuno-Affinitätschromatographie**

In einem zweiten Schritt der Toxinaufbereitung wurde eine Chromatographiesäule (10 mm Ø und 60 mm Länge, HR 10/10, Fa. Pharmacia) mit einem Protein-A/G-Agarose-Material (Fa. Schleicher und Schuell) gefüllt, an die der von der Hybridomzelllinie 13C4 produzierte monoklonale Antikörper (mAk) nicht-kovalent gekoppelt war (190). An einer FPLC®-Anlage (Fa. Pharmacia) wurde das Toxin schließlich eluiert und in einem Dialyseschlauch über Nacht gegen NaCl-Lösung dialysiert.

##### **3.1.3.1.3. Reduktion des Endotoxingehalts**

Zur Verringerung des Endotoxingehalts wurden die Eluate aus der Immuno-Affinitätschromatographie gepoolt und mit Glycerol versetzt (Endkonzentration 5 %). Anschließend erfolgte eine Passage über eine Detoxigel®-Säule (Fa. Pierce). Nach Sterilfiltration über einen Millex®-GV-Filter (0,2 µm Porenweite, Fa. Millipore) wurde das gereinigte Stx1 aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Aliquots jeder Charge wurden auf ihren verbliebenen Endotoxingehalt im *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Test (QLC-100; Fa. BioWhittaker) untersucht. Die LPS-Konzentration betrug in der verwendeten Stx1-Charge 1,49 ng/ml. Die Endotoxinkontamination der Charge der B-Untereinheit (Kap. 3.1.3.2.) lag bei 1,78 ng/ml.

### **3.1.3.2. Aufreinigung von rStxB1**

#### **3.1.3.2.1. Anionenaustauschchromatographie**

Die Aufreinigung der periplasmatischen Fraktion erfolgte nach der von Niebuhr (1991) beschriebenen Methode (213) mit einigen Modifikationen in einer FPLC<sup>®</sup>-Anlage (Fa. Pharmacia). Die Fraktionen mit hohem Gehalt an rStxB1 (bestimmt in der SDS-PAGE und im Immunoblot) wurden gepoolt. Die Reduktion des Endotoxingehaltes erfolgte wie in Kapitel 3.1.3.1.3. beschrieben. Die gereinigte rStxB1 wurde nach Sterilfiltration aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### **3.1.3.2.2. Methoden zur Charakterisierung der aufgereinigten Proteine**

Außer den in diesem Kapitel beschriebenen Methoden zur Charakterisierung der aufgereinigten Toxine wurde für Stx1 auch die verozytotoxische Dosis (CD<sub>50</sub>/ml) im Zytotoxizitätstest mit Verozellen ermittelt (siehe Kapitel 3.1.5.5., 3.1.5.6. und 3.1.5.7.). Ebenso erfolgte eine Überprüfung der Neutralisierbarkeit des gereinigten Toxins mit dem von der Hybridomzelllinie 13C4 produzierten mAk.

#### **3.1.3.2.3. Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Proben wurde der BCA-Protein-Assay<sup>®</sup> (Fa. Pierce) bzw. der Micro-BCA-Protein-Assay<sup>®</sup> (Fa. Pierce) nach Herstellerangaben eingesetzt.

#### **3.1.3.2.4. SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wurde nach der von Laemmli (1970) (162) beschriebenen Methode angewendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte unter reduzierenden Bedingungen mit 16,3 %igen Gelen wie bei Stamm beschrieben (290).

#### **3.1.3.2.5. Immunoblot**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot (31) im Semi-Dry-Verfahren (161) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach dem Blotten wurde der Erfolg des Elektrotransfers durch Färben des Gels mit Coomassie-Brillant-Blau überprüft.

Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Renaturieren der Proteine mit dem von der Hybridomzelllinie 13C4 produzierten monoklonalen Antikörper (Zellkulturüberstand 1:10 in PBS mit 0,05 % Tween) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit Anti-Maus-Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (1:1000 in PBS mit 0,05 % Tween) und nachfolgender Zugabe der Substratlösung (2 ml Chloronaphthol-Stammlösung, 8 ml PBS, 7 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **3.1.3.3. Aufreinigung monoklonaler Antikörper**

#### **3.1.3.3.1. Säulenchromatographie**

Die Aufreinigung der mAk der Hybridomzelllinie 13C4 erfolgte an einer mit Protein-A/G-Agarose-Material (Fa. Schleicher und Schuell) gepackten Glassäule in einer FPLC<sup>®</sup>-Anlage (Fa. Pharmacia). Anschließend wurde das Eluat über Nacht gegen Bicarbonat-Lösung dialysiert, sterilfiltriert und das antikörperhaltige Medium hinsichtlich seiner Neutralisationsfähigkeit gegen gereinigtes Stx1 im Neutralisationstest mit Verozellen (siehe Kapitel 3.1.5.5.) getestet. Die im ELISA (Kap. 3.1.3.3.2.) bestimmte Immunglobulin-Konzentration dieses Mediums betrug 45 µg/ml.

#### **3.1.3.3.2. Qualitativer und quantitativer Nachweis von murinem Immunglobulin G**

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Maus-Immunglobulinen der Klasse IgG in Proben aus der Säulenchromatographie wurde ein indirekter „Capture-Enzym-Linked Immunosorbent Assay“ (Capture-ELISA), wie bei Stamm (2000) (290) beschrieben, verwendet. Die Nachweisgrenze des Testsystems betrug ca. 0,1 ng/ml.

### **3.1.4. Spendertiere**

#### **3.1.4.1. Blutgewinnung**

##### **3.1.4.1.1. Rinder**

Zur Blutgewinnung stand eine Herde von Rindern der Rasse Holstein-Friesian zur Verfügung, die auf dem landwirtschaftlichen Versuchsgut „Oberer Hardthof“ der Justus-Liebig-Universität Gießen in einem Laufstall mit Vollspaltenboden und

separatem Liegebereich gehalten wird. Die Fütterung bestand aus Heu, Gras, Silagen (Gras-, Mais-, Zuckerrübenblatt-Silage) sowie einer der Milchleistung entsprechenden, transponderrationierten Kraftfuttergabe.

Zur Blutentnahme gelangten nur gesunde zwei bis elf Jahre alte Tiere morgens nach dem Melken bzw. drei bis sechs Wochen alte Kälber. Es wurde die *Vena jugularis externa* punktiert und das Blut in sterile 60 ml Spritzen mit 2500 internationalen Einheiten (I.E.) Heparin (Fa. Sigma) als Antikoagulanzen entnommen.

#### **3.1.4.1.2. Schafe**

Für die Blutentnahme bei Schafen wurde die institutseigene Schafherde verwendet. Zur morgendlichen Blutentnahme gelangten nur gesunde adulte Tiere. Es wurde die *Vena jugularis externa* nach Freischeren und Desinfizieren der Region punktiert und das Blut über einen Kunststoffschlauch in den Spritzenkörper (Stempel entfernt) einer 60 ml Spritze geleitet, die 2500 I.E. Heparin (Fa. Sigma) als Antikoagulanzen enthielt.

#### **3.1.4.2. Gewinnung von Milch**

##### **3.1.4.2.1. Rinder**

Die Kuhmilchproben entstammten ebenfalls der Herde des landwirtschaftlichen Versuchsguts „Oberer Hardthof“ der Justus-Liebig-Universität Gießen. Zur Untersuchung kamen nur Proben der Rasse „Holstein-Frisian“. Die Milchproben wurden nach dem separaten Ermelken in sterile Plastik-Zentrifugenröhrchen (50 ml; Fa. Greiner) umgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

##### **3.1.4.2.2. Schafe**

Für die Versuche mit Schafmilch wurde ein Milchschaftbetrieb in der näheren Umgebung kontaktiert (M. Blötz, Wallendorf 28, 35753 Greifenstein-Beilstein), bei dem Ostfriesische Milchschafe gehalten werden. Die Gewinnung der Milchprobe entsprach der Methode bei Rindern.

### 3.1.5. Zellkulturmethoden

#### 3.1.5.1. Kultivierung von Zelllinien

##### 3.1.5.1.1. Verwendete Zelllinien

###### 3.1.5.1.1.1. Zelllinien zur Verwendung in Zellkulturtests

Für die Analyse der Zytotoxizität des Shigatoxins wurden Verozellen verwendet (siehe Kapitel 3.1.5.5., 3.1.5.6. und 3.1.5.7.). Diese adhärenzte Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, # CRL 1587) bezogen. Sie stammt ursprünglich von Nierenkarzinomzellen der grünen Meerkatze.

###### 3.1.5.1.1.2. Hybridomzelllinie zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen Stx1

Die Hybridomzelllinie 13C4 (ATCC, # CRL 1794) ist das Fusionsprodukt von SP2/0-Ag14-Myelomzellen und Splenozyten weiblicher BALB/c Mäuse, die mit gereinigtem Stx1 des *E. coli*-Stammes H30 immunisiert worden waren. Die produzierten mAk sind vom Isotyp IgG1/kappa und neutralisieren Stx1 durch Bindung an die B-Untereinheiten des Toxins (294).

###### 3.1.5.1.1.3. Hybridomzelllinien zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene boviner Leukozyten

Murine Hybridomzelllinien, die mAk gegen bovine Leukozytenoberflächenantigene produzieren, wurden freundlicherweise von J. Naessens PhD., International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenia, zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien und die produzierten mAk gibt Tabelle 1.

**Tab. 1: Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene boviner Leukozyten**

Zelllinie	Isotyp des mAk	erkanntes Antigen*	zelluläre Verteilung des Antigens
IL-A 24	IgG1	Mø.Diff.Ag	Monozyten, Granulozyten
	IgG	CD11b	Granulozyten
IL-A 88	IgG	BoMHC-I	Granulo-, Mono-, Lymphozyten
J11	IgG1	BoMHC-II	B-Zellen und Monozyten

BoCD: Bovine Cluster of Differentiation

Mø.Diff.Ag: Makrophagendifferenzierungsantigen

### **3.1.5.1.2. Kultivierung adhärenter Zelllinien**

Die Zelllinien wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (200 ml; Fa. Nunc) unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung) kultiviert. Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1 (RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS). Zum Ernten der Zellen wurden Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit HEPES-Puffer entfernt. Nach Zugabe von 10 ml einer Trypsin-Gebrauchslösung, bestehend aus Trypsin-Lösung (0,25 %) und EDTA-Puffer (0,2 % in HEPES-Puffer), erfolgte eine Inkubation für 10 - 15 Minuten im Brutschrank. Die dadurch abgelösten Zellen wurden in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen (50 ml; Fa. Greiner) pipettiert; die Flasche wurde mit 10 ml Zellkulturmedium 1 ausgespült und diese ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (202 x g, 7 min, 20 °C), das Pellet in Zellkulturmedium 1 resuspendiert und ein Aliquot nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zelldichte wurde durch Zugabe von Medium eingestellt. Ein Zehntel der entnommenen Zellsuspension wurde in die Zellkulturflaschen zurückpipettiert, auf 10 ml mit Zellkulturmedium 1 aufgefüllt und für den Erhalt der Zelllinie weiter im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel der Zellen fand nach mikroskopischer Kontrolle, spätestens aber nach 4 Tagen statt.

### **3.1.5.1.3. Kultivierung von Hybridomzellen und Massenproduktion monoklonaler Antikörper**

Die für diese Arbeit verwendeten antikörperhaltigen Zellkulturüberstände waren bereits vor Beginn gewonnen worden. Die hierfür erforderliche Methodik entspricht der bei Menge (1996) (190) dargelegten.

Die Kultivierung von Hybridomzellen erfolgte in Plastik-Petrischalen (Durchmesser 10 cm; Fa. Greiner) unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen. Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1. Eine Massenproduktion von mAk fand in Roux-Flaschen statt. Die antikörperhaltigen Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **3.1.5.2. Präparation und Kultivierung boviner und oviner Granulozyten des peripheren Blutes**

Die Präparation fand unmittelbar im Anschluss an die Blutgewinnung statt. Dazu wurde das Blut bei Raumtemperatur bis zur Verarbeitung aufbewahrt. Zur Auftrennung der Granulozyten wurde das Dichtegradientenmedium Ficoll Hypaque<sup>®</sup> (Fa. Pharmacia) verwendet. Die Präparation erfolgte bei Raumtemperatur (20 °C) in Röhrchen (50 ml; Fa. Greiner) unter sterilen Bedingungen. Sämtliche Pipettierschritte mit Blut wurden mit Plastikpipetten (10 ml; Fa. Flow Laboratories) durchgeführt. Es wurden jeweils 20 ml heparinisiertes Vollblut mit 17 ml PBS-EDTA gemischt. Diese Verdünnung wurde daraufhin vorsichtig auf 12 ml Ficoll Hypaque<sup>®</sup> aufgeschichtet, so dass eine klare Trennung der beiden Flüssigkeiten erhalten blieb. Die auf diese Weise aufgeschichteten Röhrchen wurden in einer Zentrifuge (Omnifuge 2.0 RS; Fa. Heraeus) 45 Minuten bei 800 x g (1970 U/min) zentrifugiert; dabei war die Beschleunigung maximal (Stufe 9), der Auslauf des Rotors erfolgte ohne Abbremsung (Stufe 0). Bei dem so entstandenen Gradienten wurden vorsichtig die verdünnte Plasmaschicht, die Schicht der mononukleären Zellen und die Ficollschicht abpipettiert. Die Plasmaphase der Zentrifugation mit Ficoll wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert (Kap. 3.2.6.), die mononukleäre Zellen enthaltende Interphase und die Ficollphase wurden bei Bedarf aufbewahrt (Kap. 3.1.5.3.). Von der untersten Schicht wurden Fraktionen aus je 2 ml der Erythrozyten-Granulozyten-Suspension und je 2 ml PBS-EDTA gebildet. Zur Lyse der Erythrozyten jedes Ansatzes wurden zunächst 27 ml Aqua bidestillata hinzugegeben, 50 Sekunden später erfolgte ein Zusatz von 3 ml 10fach konzentrierter PBS-EDTA zur Wiederherstellung der Isotonie. Jeder Ansatz wurde nach gründlicher Durchmischung bis auf 50 ml mit RPMI 1640-Medium (Fa. Life Technologies GmbH) aufgefüllt und erneut zentrifugiert (Zentrifugationsschritt 1; 7 min, 202 x g, 990 U/min, Beschleunigung Stufe 9, Abbremsung Stufe 9, 20 °C). Nach Verwerfen der Überstände jedes Ansatzes und Zugabe von je 10 ml PBS-EDTA erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt 1. Eine Resuspension der Zellen in 2 ml Blastenmedium schloss sich an das Dekantieren der Überstände an. Nachfolgend ruhten die Zellen für eine halbe Stunde; während dessen fand eine Überprüfung der Reinheit der unterschiedlichen Ansätze der Granulozytenpräparation im Zytometer statt. Ansätze, die eine Reinheit von mindestens 80 % aufwiesen, konnten daraufhin gepoolt und ihre Gesamtzellzahl

durch mikroskopische Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. Bei dieser Zellzählung fand Trypanblau-Lösung (180 µl Trypanblau-Lösung, 20 µl Zellsuspension) Anwendung, um tote Granulozyten identifizieren zu können.

Eine Inkulturnahme der Granulozyten über Nacht fand in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit U-förmigem Boden; Fa. Greiner) unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen statt. Es wurden pro Vertiefung  $2 \times 10^5$  Zellen in Blastenmedium ausplattiert.

### 3.1.5.2.1. Stimulation der Granulozyten

Eine Stimulation der Zellen erfolgte unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen für 18 Stunden. Als Stimulans diente Lipopolysaccharid (LPS, von *E. coli* O55, Konzentrationen: 1, 10 und 100 ng/ml; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Eine Übersicht über die in dieser Arbeit regelmäßig verwendeten Ansätze mit Stimulanzen und Testsubstanzen gibt Tabelle 2.

**Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit regelmäßig verwendeten Ansätze mit Stimulanzen und Testsubstanzen**

<b>Ansatz mit</b>	<b>Konzentration</b>
Medium	unverdünnt
LPS	1 ng/ml
Stx1-Holotoxin	200 CD50/ml
rStxB1	10µg/ml
Stx1-Holotoxin und mAk 13C4 (anti-StxB1)	200 CD50/ml (Stx1), 1,5 µg/ml (13C4)
rStxB1 und mAk 13C4 (anti-StxB1)	10µg/ml (rStxB1), 1,5 µg/ml (13C4)

### 3.1.5.3. Präparation und Kultivierung boviner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Die Präparation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) geschah zunächst wie in Kapitel 3.1.5.2. beschrieben. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Plasmafraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert (Kap. 3.2.6.). Die PBMC-enhaltende Interphase und die Ficollphase wurden abpipettiert, in neuen Plastik-Zentrifugenröhrchen (50 ml; Fa. Greiner) mit dem 3-fachen Volumen an PBS-EDTA gut gemischt und erneut zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS; Fa. Heraeus, 8 Minuten bei  $249 \times g$ ). Nach dem Dekantieren der Überstände wurden alle Zellen

eines Tieres gemeinsam mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Reagenz versetzt und 5 Minuten inkubiert. Nach erneutem Zentrifugationsschritt 1 folgten je ein Waschschrift mit PBS-EDTA und mit PBS. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml Zellkulturmedium 3 aufgenommen. Es folgte die Auszählung eines Aliquots der Zellsuspension nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer. Weiterverwendet wurden nur Präparationen mit mehr als 95 % lebenden (ungefärbten) Zellen. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1,8 \times 10^7$  Zellen in 10 ml Blastenmedium in Plastik-Zellkulturflaschen (200 ml; Fa. Nunc), wie für die adhärennten Zellen beschrieben (Kap. 3.1.5.1.2.), kultiviert. Als Zusatz zum Medium wurde einmalig bei Beginn der Kultur das Stimulanz Concavalin A (Con-A) in einer Konzentration von 5 µg/ml sowie regelmäßig beim Mediumwechsel rekombinantes humanes Interleukin 2 (rhuIL-2) in einer Konzentration von 200 U/ml zugesetzt. Spätestens alle zwei Tage erfolgte eine Teilung der Zellen, verbunden mit einem Mediumwechsel und erneutem IL-2-Zusatz. Das mit den Zellen inkubierte Medium wurde für die Versuche zur Migration (Kap. 3.2.4.) gepoolt, zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt.

#### **3.1.5.4. Präparation und Kultivierung boviner und oviner Leukozyten aus der Milch**

Die Präparation der Milchleukozyten fand unmittelbar im Anschluss an die Gewinnung der Milch mit einer modifizierten Methode nach Taylor *et al.* (1994) (301) statt. Dazu wurde die Milch während des Transports zum Labor bei Raumtemperatur aufbewahrt. Pro Tier wurden zwei Plastik-Zentrifugenröhrchen (50 ml; Fa. Greiner) mit Zentrifugationsschritt 1 (Omnifuge 2.0 RS, Fa. Heraeus) zentrifugiert. Der über dem Überstand befindliche Rahm wurde zusammen mit dem Überstand vorsichtig abpipettiert und das Zellpellett in ein neues Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurden die Zellen eines Tieres gepoolt. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 50 ml PBS, zwischen denen ein neues Plastik-Zentrifugenröhrchen Verwendung fand (Zentrifugationsschritt 1). Anschließend wurde das Zellpellett in 2 ml Blastenmedium resuspendiert. Die Reinheit der Leukozyten wurde im Zytometer ermittelt. Nur die Ansätze, bei denen eine eindeutige Zuordnung der Zellen hinsichtlich Größe und Granularität möglich war, wurden weiter untersucht. Die Bestimmung der Zellzahl, Inkubation und Stimulation der Zellen geschah, wie bei der Präparation von Granulozyten aus dem peripheren Blut beschrieben (s. Kap. 3.1.5.2.).

### **3.1.5.5. Zellkulturtest zum Nachweis der Wirkung von Stx auf Zellen und zum Nachweis von Antikörpern gegen Stx1 aus Schafplasma**

Zur Überprüfung der für die Versuche mit Granulozyten verwendeten Aliquots des Stx1 wurde die Zytotoxizität des Stx1 herangezogen. Diese wurde in einem Testsystem modifiziert nach Gentry und Dalrymple (1980) (88) untersucht. Dazu wurden als Zielzellen Verozellen verwendet. In die Vertiefungen einer Plastik-Zellkulturplatte (96-Loch mit flachem Boden; Fa. Greiner) wurden jeweils drei Komponenten mit einem Volumen von je 50 µl pipettiert.

#### 1. Komponente:

Sie enthielt die zu testende Probe in NaCl-Lösung (0,89 %) verdünnt. Es wurden logarithmische Verdünnungsreihen angelegt. Für die Positivkontrolle wurde SDS (1 % in NaCl-Lösung) verwendet, für die Negativkontrolle NaCl-Lösung. Jede Verdünnungsstufe wurde im Dreifachansatz untersucht; die entsprechenden Kontrollen waren den Testansätzen benachbart auf derselben Platte untergebracht.

#### 2. Komponente:

Sie enthielt Zellkulturmedium 1. Für Neutralisationstests wurde antikörperhaltiges Medium verwendet, welches in Kulturmedium verdünnt wurde. Zum Nachweis von Antikörpern gegen Stx1 aus dem Plasma wurde die Plasmaphase aus der Zentrifugation mit Ficoll (Kapitel 3.1.5.2.) verwendet. Das Plasma wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min bei 56 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend 1:10 in Kulturmedium verdünnt. Diese vorverdünnten Plasmaproben wurden in konstanter Konzentration im Test eingesetzt.

#### 3. Komponente:

Sie enthielt die Verozellsuspension in Zellkulturmedium 1, eingestellt auf eine Zellzahl von  $8 \times 10^5$  Zellen pro ml.

In die äußeren Vertiefungen der Platten wurden jeweils 100 µl NaCl als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen. Alle 24 Stunden wurden die Platten mikroskopisch

kontrolliert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer von 4 Tagen erfolgte die Auswertung des Tests.

### 3.1.5.6. Auswertung der Zellkulturtests

Zytostatische und zytotoxische Effekte im Zellkulturtest wurden durch einen kolorimetrischen Test unter Verwendung eines Farbstoffes quantifiziert, der nur von lebenden Zellen reduziert wird. Dieser Farbstoff, ein Tetrazoliumsalz, 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH), wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem lilafarbenen Formazan umgesetzt (94). Der im MTT-Test bestimmte Parameter wird als "Stoffwechselaktivität" bezeichnet. Der Test wurde in der Modifikation von Tada *et al.* (298) (1986) durchgeführt.

Am Ende der Inkubationsdauer des Verozelltests wurden je Ansatz der Mikrotiterplatte 25 µl der MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) pipettiert und die Platte unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert (4 h, 37 °C). Zum Abstoppen der Reaktion durch Zerstörung der Zellen und zum Lösen des in wässriger Lösung unlöslichen Formazans erhielt jede Vertiefung 100 µl SDS-Lösung mit anschließender Fortsetzung der Inkubation über Nacht. Die Messung der Extinktionsdifferenzen  $OD_{abs}$  (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Vertiefungen erfolgte mit einem ELISA-Platten-Lesegerät (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 der Ermittlung der relativen optischen Dichte  $OD_{rel}$ :

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

### **3.1.5.7. Berechnung der verozytotoxischen Dosis**

Wie bei Gentry und Dalrymple (88) (1980) beschrieben, wurde die „verozytotoxische Dosis 50 % pro Milliliter“ (CD<sub>50</sub>/ml) geometrisch ermittelt. Dazu wurde mit jeweils logarithmischer Skaleneinteilung die im Verozelltest bestimmte Stoffwechselaktivität der Zellen gegen die Verdünnungsstufen des titrierten Stx1 gezeichnet. Diese Berechnung wurde nach dem Auftauen von Stx1-Aliquots regelmäßig zur Kontrolle wiederholt. Bei der Dokumentation der Ergebnisse werden im Folgenden die eingesetzten Stx1-Konzentrationen als CD<sub>50</sub>/ml für Verozellen angegeben.

Zur Quantifizierung der Neutralisationskraft von Plasmaproben wurde eine „neutralisierende Einheit pro Milliliter“ (NE/ml) definiert. 1 NE entspricht der Reduktion der CD<sub>50</sub>/ml einer Toxinpräparation durch die Plasmaprobe (getestet in einer Verdünnung von 1:10) um eine 10er-Potenz. Eine Probe wurde dann als positiv bewertet, wenn ihre Neutralisationskraft 1 NE/ml oder mehr betrug (243).

### **3.1.5.8. Zellkulturtest zur Toxin-Abgabe von Granulozyten auf Verozellen**

Die Abgabe von an Granulozyten gebundenem Stx1 an Verozellen wurde anhand des in Kapitel 3.1.5.5. dargestellten Zellkulturtests untersucht. Dazu wurden am Versuchsvortag zwei Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit flachem Boden; Fa. Greiner) - mit  $4 \times 10^4$  Verozellen pro 100 µl Zellkulturmedium 1 in jede Vertiefung ausgesät - vorbereitet. Am Versuchstag fand nach der Präparation der Granulozyten zunächst die Beladung der Granulozyten mit Stx1 statt. Dazu wurden diese in Stx1-Holotoxin sowie ein Aliquot des Stx1-Holotoxins für eine Stunde unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Rückgewinnung der Stx1-beladenen Granulozyten getrennt vom Stx1-haltigen Mediumüberstand. Das Zellkulturmedium 1 wurde von den Verozellen in den Vertiefungen der vorbereiteten Plastik-Zellkulturplatten entfernt. Eine Platte erhielt im Austausch je Vertiefung 50 µl Zellkulturmedium 1 mit Toxin-beladenen Granulozyten, die in einer Granulozytensuspension titriert waren (jeweils  $2 \times 10^5$  Granulozyten pro Vertiefung). Die zweite Zellkulturplatte wurde zur einen Hälfte mit den titrierten Überständen aus der Toxinbeladung der Granulozyten, zur anderen Hälfte mit vorinkubiertem, titriertem Stx1-Holotoxin befüllt. Bei der Hälfte der Ansätze der ersten Zellkulturplatte wurden die Granulozyten nach 1 Stunde

Inkubation im Brutschrank durch drei Waschschrte mit Zellkulturmedium 1 wieder entfernt. Der Toxineinfluss auf die Verozellen wurde nach 4 Tagen Inkubation unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen gemäß der in Kapitel 3.1.5.6. beschriebenen Methode kolorimetrisch ausgewertet.

### **3.1.6. Durchflusszytometrie**

#### **3.1.6.1. Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz**

Die Probenvorbereitung zur Detektion eines Oberflächenantigens auf Granulozyten und zur Anfärbung des Kerns toter Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einsetzen der Zellen in eine Plastik-Zellkulturplatte (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner)
2. Zentrifugation der Platte (150 x g, 7 min, 4 °C; Centrifuge 5403, Fa. Eppendorf) und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt 2)
3. Resuspension der Zellpellets in je 50 µl (100 µl bei IL-A88) antikörperhaltigen Zellkulturüberstandes (mAk gegen Oberflächenantigene boviner und oviner Leukozyten, siehe Tabelle 1) oder in je 25 µl Gebrauchslösung des CD77-Antikörpers oder Ratte-IgM-Immunglobulins (Tab. 3)
4. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
5. Resuspension der Zellpellets in je 150 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
6. Resuspension der Zellpellets in je 50 µl Gebrauchslösung des entsprechenden anti-Ig-Antikörpers (siehe Tabelle 3) mit 2 µg/ml Propidiumjodid (PI)
7. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
8. Resuspension der Zellpellets in je 150 µl PBS mit anschließendem Zentrifugationsschritt 2
9. Aufnahme der Zellpellets in 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200 µl PBS

Alle Inkubationsschritte wurden auf Eis in Dunkelheit durchgeführt.

**Tab. 3: Gebrauchslösungen der Reagenzien für die Durchflusszytometrie**

Reagenz	Gebrauchslösung
Stx1	50.000 CD <sub>50</sub> /ml in NaCl-Lsg.
rStxB1	30 µg/ml in NaCl-Lsg.
StxB1-Antikörper 13C4	45 µg/ml in Kulturmedium
CD77-Antikörper Klon 38.13	1:10 in PBS
Ratte-Immunglobulin M	1:50 in PBS
FITC-markierter anti-Maus-Ig-Antikörper	1:100 in PBS
FITC-markierter anti-Ratte-IgM-Antikörper	1:200 in PBS
PE-markierter anti-Ratte-IgM-Antikörper	1:200 in PBS

### 3.1.6.2. Probenvorbereitung für die Dreifarbenfluoreszenz

Die Probenvorbereitung zur Detektion zweier Oberflächenantigene auf Granulozyten und zur Anfärbung des Kerns toter Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einsetzen der Zellen in eine Plastik-Zellkulturplatte (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner)
2. Zentrifugation der Platte und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt 2)
3. Resuspension der Zellpellets in je 50 µl (100 µl bei IL-A88) antikörperhaltigen Zellkulturüberstandes (mAk gegen Oberflächenantigene boviner und oviner Leukozyten, Tab. 1)
4. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
5. Resuspension der Zellpellets in je 150 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
6. Resuspension der Zellpellets in je 50 µl (100 µl bei IL-A88) antikörperhaltigen Zellkulturüberstandes (mAk gegen Oberflächenantigene boviner und oviner Leukozyten, siehe Tabelle 1) oder in je 25 µl Gebrauchslösung des CD77-Antikörpers (Tab. 3)
7. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
8. Resuspension der Zellpellets in je 150 µl PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2

9. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  Gebrauchslösung des entsprechenden anti-Ratte- bzw. anti-Maus-Ig-Antikörpers (Tab. 3) mit 2  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid (PI)
10. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
11. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu\text{l}$  PBS mit anschließendem Zentrifugationsschritt 2
12. Aufnahme der Zellpellets in 50  $\mu\text{l}$  PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200  $\mu\text{l}$  PBS

Alle Inkubationsschritte wurden auf Eis in Dunkelheit durchgeführt.

### **3.1.6.3. Probenvorbereitung für Bindungsstudien**

Die Probenvorbereitung zum Nachweis der Bindung von Stx1 oder rStxB1 an Granulozyten und zur Anfärbung des Kerns toter Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einsetzen der Zellen in eine Plastik-Zellkulturplatte (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner)
2. Zentrifugation der Platte und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt 2)
3. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  einer Stx-Präparation (Tab. 3)
4. Inkubation (30 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
5. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu\text{l}$  PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
6. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  antikörperhaltigen Mediums (mAk 13C4, Tab. 3)
7. Inkubation (30 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
8. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu\text{l}$  PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
9. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  Gebrauchslösung des anti-Maus-Ig-Antikörpers (Tab. 3) mit 2  $\mu\text{g/ml}$  PI
10. Inkubation (30 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
11. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu\text{l}$  PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt 2

12. Aufnahme der Zellpellets in 50  $\mu$ l PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200  $\mu$ l PBS

Alle Inkubationsschritte wurden auf Eis in Dunkelheit durchgeführt.

#### **3.1.6.4. Probenvorbereitung für Wettbewerbsstudien**

Die Probenvorbereitung zum Nachweis der Konkurrenz von rStxB1 und CD77-Antikörper um die Bindungsstelle auf Granulozyten und zur Anfärbung des Zellkerns wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Einsetzen der Zellen in eine Plastik-Zellkulturplatte (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner)
2. Zentrifugation der Platte und Ausschlagen des Überstandes (Zentrifugationsschritt 2)
3. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe von rStxB1 in NaCl-Lösung oder in je 25  $\mu$ l Gebrauchslösung des CD77-Antikörpers (Tab. 3)
4. Inkubation (30 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
5. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu$ l PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
6. Resuspension der Zellpellets in je 25  $\mu$ l Gebrauchslösung des CD77-Antikörpers oder in je 50  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe von rStxB1 in NaCl-Lösung (Tab. 3)
7. Inkubation (30 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
8. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu$ l PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
9. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu$ l antikörperhaltigen Mediums (mAk 13C4, Tab. 3)
10. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2
11. Resuspension der Zellpellets in je 150  $\mu$ l PBS, anschließend Zentrifugationsschritt 2
12. Resuspension der Zellpellets in je 50  $\mu$ l Gebrauchslösung der entsprechenden anti-Ratte- und anti-Maus-Ig-Antikörper (Tab. 3) mit 2  $\mu$ g/ml Propidiumjodid (PI)
13. Inkubation (20 min), anschließend Zentrifugationsschritt 2

14. Resuspension der Zellpellets in je 150 µl PBS mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt 2
15. Aufnahme der Zellpellets in 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 200 µl PBS

Alle Inkubationsschritte wurden auf Eis in Dunkelheit durchgeführt.

### **3.1.6.5. Probenvorbereitung für die Messung granulozytärer Zellfunktionen**

#### **3.1.6.5.1. Phagozytose**

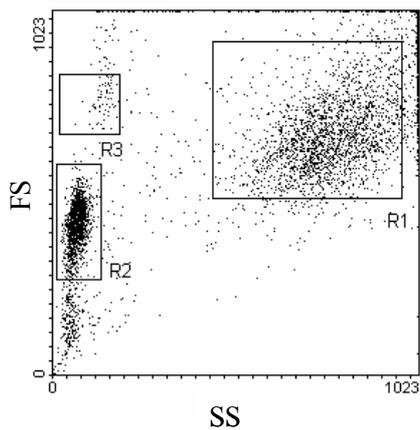
Die Messung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten erfolgte mittels eines Phagozytose-Testkits (Phagotest<sup>®</sup>; Fa. Orpegen-Pharma) nach modifizierten Angaben des Herstellers, die den Einsatz des Tests in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner) zuließen (191). Die Granulozyten inkubierten, wie in Kap. 3.1.5.2.1 beschrieben; die dabei verwendeten Ansätze mit Stimulanzen und Testsubstanzen finden sich in Tabelle 2. Nach der Inkubation der Granulozyten in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit U-förmigem Boden; Fa. Greiner) wurden die  $2 \times 10^5$  Zellen je Vertiefung in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner) überführt. In einer Zentrifuge (Centrifuge 5403, Fa. Eppendorf) wurden die Platten bei Zentrifugationsschritt 2 abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen danach in 150 µl eiskaltem autologen Plasma (aus dem Überstand der Dichtegradientenzentrifugation bei der Granulozytenpräparation, 1:1 mit PBS-EDTA verdünnt) resuspendiert. Als Stimulans für die Phagozytose diente eine Suspension opsonisierter, FITC-markierter *E. coli*, von der 10 µl in jede Probe pipettiert wurden. Nach gründlicher Durchmischung erfolgte eine 10 minütige Inkubation in einem auf 38 °C erwärmten Wasserbad. Die Platten wurden anschließend zentrifugiert, und nach Verwerfen des Überstandes wurden 50 µl „Quenching Solution“ (zum Ausschluss anheftender, nicht phagozytierter Bakterien von der Analyse) und 100 µl „Washing Solution“ pro Vertiefung pipettiert, die Platten daraufhin zentrifugiert (Zentrifugationsschritt 2). Nach einem weiteren Wasch- (150 µl „Washing Solution“) und Zentrifugationsschritt 2 erfolgte die Zugabe von je 150 µl „Lysing Solution“ (zur Fixation der Zellen) pro Probe bei Raumtemperatur. Nach Durchmischung der Proben und 20 minütiger Inkubation fand ein weiterer Zentrifugationsschritt 2 statt,

an den sich ein Waschschrift (mit 150 µl eiskaltem PBS-EDTA pro Vertiefung, 5 Minuten Inkubation) anschloss. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt 2 wurden die Zellen in 50 µl „DNA-staining Solution“ für 15 Minuten inkubiert. Die Analyse erfolgte mit einem Durchflusszytometer (EPICS™ ELITE; Fa. Beckman-Coulter). Dazu wurde der mittels „DNA-staining Solution“ sichtbar gemachte DNS-Gehalt als Auswertungsgrundlage herangezogen. DNS-Gehalte von Leukozyten liegen deutlich abgesetzt vom niedrigeren DNS-Gehalt zusammenhaftender Bakterien (Abb. 1 B). Anhand der Menge der Phagozytose-bedingt aufgenommenen fluoreszierenden Bakterien konnte die Phagozytoseaktivität der Granulozyten im FITC-Kanal des Zytometers bestimmt werden (Abb. 1 C).

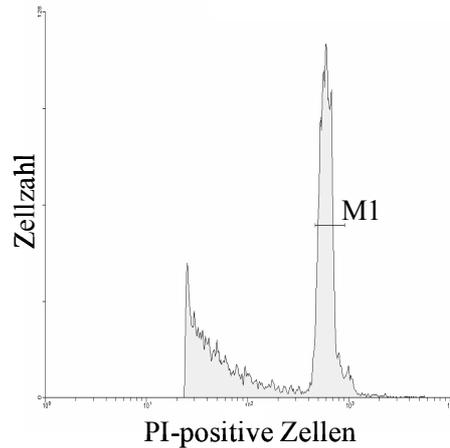
#### **3.1.6.5.2. Aktivierbarkeit (oxidative burst)**

Die Messung der Aktivierbarkeit der Granulozyten erfolgte mittels eines Burst-Testkits (Bursttest®; Fa. Orpegen-Pharma) nach modifizierten Angaben des Herstellers, die den Einsatz des Tests in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner) zuließen (191). Die Granulozyten inkubierten, wie in Kap. 3.1.5.2.1 beschrieben; die dabei verwendeten Ansätze mit Stimulanzien und Testsubstanzen finden sich in Tabelle 2. Nach der Inkubation der Granulozyten in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit U-förmigem Boden; Fa. Greiner) wurden die  $2 \times 10^5$  Zellen je Vertiefung in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner) überführt. Eine Aktivierung der Zellen erfolgte durch Zugabe einer opsonierten, unmarkierten *E. coli* Suspension (10 µl pro Probe) bzw. Phorbol-Myristat-Azetat (PMA; 10 µl pro Probe, 0,51 µM) als niedriger bzw. hoher Stimulus. Nach gründlicher Durchmischung fand eine 10 minütige Inkubation in einem auf 38 °C erwärmten Wasserbad statt. Die Platten wurden auf Eis verlagert und mit 10 µl des fluorogenen Farbstoffes Dihydrorhodamin (DHR) versetzt. Nach gründlicher Durchmischung schloss sich eine erneute Inkubation im Wasserbad für 20 Minuten an. In einer Zentrifuge (Centrifuge 5403, Fa. Eppendorf) wurden die Platten bei Zentrifugationsschritt 2 abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen danach in eiskalter „Washing Solution“ (150 µl pro Probe) resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt 2 erfolgte die Zugabe von je 150 µl „Lysing Solution“ pro Probe bei Raumtemperatur. Nach Durchmischung der Proben und 20 minütiger Inkubation fand ein weiterer Zentrifugationsschritt 2 statt, an den sich ein Waschschrift (mit 150 µl eiskaltem PBS-EDTA pro Vertiefung, 5 Minuten Inkubation) anschloss. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt 2 wurden die Zellen

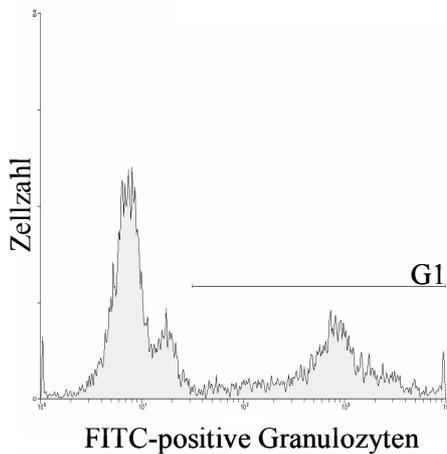
in 50 µl „DNA-staining Solution“ für 15 Minuten inkubiert. Die Analyse erfolgte analog zu 3.1.6.5.1. mit einem Durchflusszytometer (EPICS™ ELITE; Fa. Beckman-Coulter). Anhand der Menge des umgesetzten fluoreszierenden Rhodamins aus DHR konnte die Aktivierbarkeit der Granulozyten im FITC-Kanal des Zytometers bestimmt werden (Abb. 1 D, E).



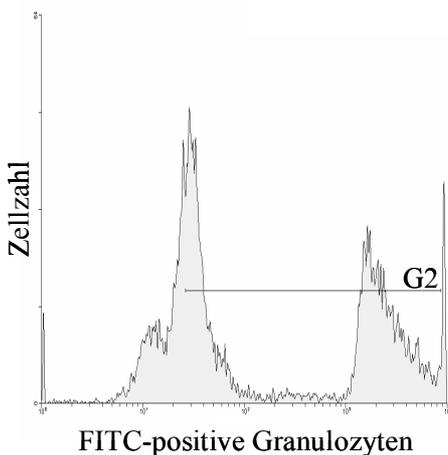
1. A. Abgrenzung der Granulozyten (R1) hinsichtlich ihrer Größe und Granularität



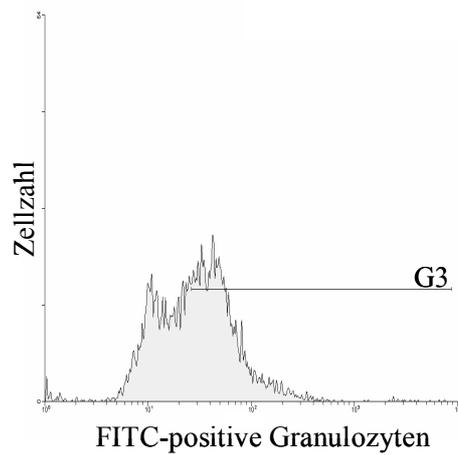
1. B. Abgrenzung der gemessenen Zellen (M1) von Bakterien-Konglomeraten hinsichtlich ihres höheren Propidium-Jodid-Gehalts



1. C. Repräsentative Messung der granulozytären Phagozytoseaktivität (G1)



1. D. Repräsentative Messung der granulozytären Aktivierbarkeit nach Stimulation durch Bakterien (G2)



1. E. Repräsentative Messung der granulozytären Aktivierbarkeit nach Stimulation durch PMA (G3)

**Abb. 1: Bestimmung der Phagozytoseaktivität und Aktivierbarkeit boviner Granulozyten mittels Durchflusszytometrie.** Repräsentative Histogramme einer Granulozytenpräparation eines Rindes.

#### **3.1.6.5.2.1. Untersuchungen zur Wirkung einer Endotoxinkontamination der verwendeten Stx1- und rStxB1-Chargen auf Granulozyten**

Um den Einfluss der im *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Test nachgewiesenen Endotoxinkontamination zu untersuchen (Kap. 3.2.3.2.5.), wurde das im Stimulationsansatz befindliche Protein verdaut. Je ein Ansatz mit Toxinkomponente bzw. Toxinkomponente und anti-StxB1 wurde vor dem eigentlichen Versuch mit Proteinase K vorbehandelt. Um sämtliches Protein vollständig zu verdauen, wurden 10 µl Proteinase K (Fa. Roth; 15 mg/ml) je Reaktionsansatz zugegeben und diese dann für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 15 minütiges Kochen denaturiert. Die so behandelten Ansätze wurden mit Vergleichsansätzen mit nativem Protein zur exemplarischen Messung der Aktivierbarkeit von Schafgranulozyten nach 18 Stunden Inkubation eingesetzt.

#### **3.1.6.5.3. Migration**

##### **3.1.6.5.3.1. Migrationsfähigkeit im Agarosegel**

Zur Messung der Migrationsfähigkeit von Granulozyten wurden Versuche in einem 0,8 %igen Agarosegel (Agarose D1 Low EEO; Fa. Pronadisa) in Plastik-Petrischalen (Durchmesser 10 cm; Fa. Greiner) durchgeführt, wie dies bei Olson (1990) beschrieben ist (231). Die Petrischalen wurden jeweils am Versuchstag mit 50 ml Gel gefüllt. Dazu wurden zunächst 0,8 g Agarose in 10 ml RPMI 1640-Medium (Fa. Life Technologies GmbH) in einen Glas-Erlenmeyerkolben mit Rührmagnet gegeben und mehrmals in einer Mikrowelle (Mikro-Chef FM 2915 Q, Fa. Moulinex) bis zum Sieden erhitzt. Zugegeben wurden 40 ml Blastenmedium, das zuvor im Wasserbad auf 48 °C erwärmt worden war. Nach gründlicher Durchmischung auf einem Rühr Tisch wurde das Gemisch in eine Petrischale eingefüllt und bis zum Erstarren des Gels auf einer ebenen Unterlage aufbewahrt.

Nach dem Erkalten wurden mittels einer eigens angefertigten Plexiglasschablone fünf Löcher in das Gel gestanzt und die darin befindlichen Gelpflöckchen mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Die Anordnung der Löcher war kreuzförmig, mit einem zentralen Loch für die Zellsuspension. Der Lochdurchmesser sowie der Abstand zwischen den einzelnen Löchern betragen jeweils 4 mm. In die auf diese Weise vorbereiteten Petrischalen wurden in das zentrale Loch jeweils eine Granulozyten-Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen in 50 µl Flüssigkeitsvolumen) mit je einem Ansatz der regelmäßig verwendeten Stimulanzen und Testsubstanzen (Tab. 2)

gefüllt. Die umliegenden Löcher enthielten jeweils Doppelansätze der zellfreien Überstände einer Kultur boviner PBMC (Kap. 3.1.5.3.) bzw. als Negativkontrolle Zellkulturmedium. Eine Auswertung erfolgte nach 4, 18 und 24 Stunden mittels eines Invers-Mikroskopes (Fa. Leitz) mit einem Zählkular und 10 x Objektiv. Dabei wurden in jeder Wanderungsrichtung die Abstände der zehn am weitesten gewanderten Granulozyten gemittelt. Eine Berechnung des Migrationskoeffizienten erfolgte nach der Formel:

$$M_{\text{Granulozyten}} = \frac{\text{durchschnittliche Migrationsstrecke der Granulozyten zum Überstand}}{\text{durchschnittliche Migrationsstrecke der Granulozyten zum Medium}}$$

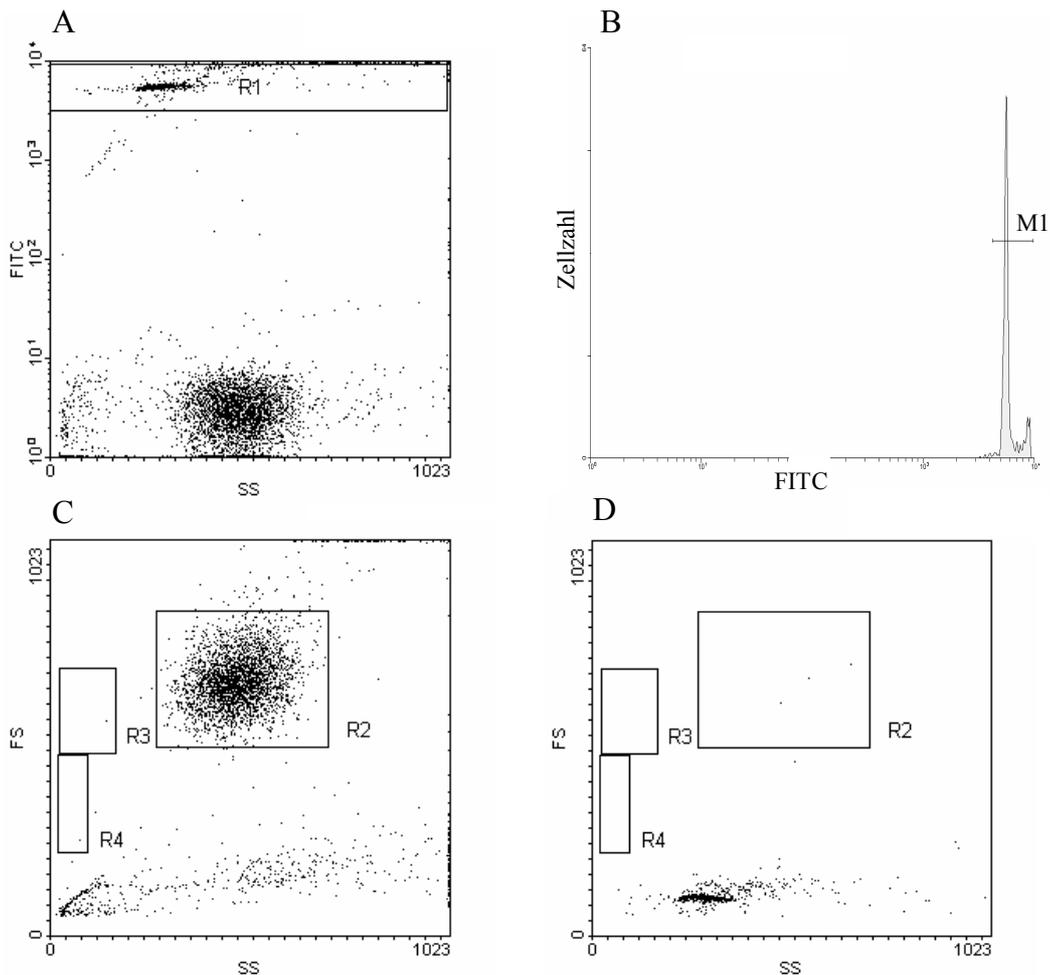
#### **3.1.6.5.3.2. Migrationsaktivität im Filter-Transwellsystem**

Die Migrationsaktivität der Granulozyten des Rindes wurde in einem Filter-Transwellsystem (Fa. Corning) analog Galligan und Coomber (85) in Abhängigkeit von Stx1 bzw. weiterer Stimulanzen untersucht. Unter sterilen Bedingungen wurde der Filter-Transwelleinsatz (3 µm Porenweite; Fa. Corning) in eine Vertiefung einer Plastik-Zellkulturplatte (12-Loch mit flachem Boden; Fa. Corning) eingesetzt, nachdem in diese 1500 µl eines zellfreien Überstandes einer bovinen Zellkultur (Tab. 4) pipettiert worden waren. Um einen Austausch der Flüssigkeiten über die Filtermembran hinweg zu verhindern, wurde unverzüglich die Zellsuspension mit  $5 \times 10^5$  Granulozyten in 500 µl Blastenmedium in das obere Kompartiment pipettiert. Nachdem auf diese Weise alle Filtereinsätze befüllt waren, inkubierten die Platten für zwei Stunden unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen. Anschließend wurde das gesamte Flüssigkeitsvolumen des oberen sowie unteren Kompartiments einer jeden Filtermembran getrennt gewonnen. Dazu wurde der Filtereinsatz zunächst in eine leer gelassene Vertiefung der Platte überführt, durchstoßen und die auf diese Weise aus dem oberen Kompartiment vollständig abfließende Flüssigkeitsmenge nach erneutem Überspülen des Filters gewonnen. Jede Fraktion eines jeden unteren und oberen Kompartiments jedes Filtereinsatzes wurde mit einer in Vorversuchen ermittelten Anzahl von Zählteilchen (Fluoresbrite Calibration Grade 3.0 Micron YG Microspheres, Fa. Polyscience) gemischt. Im Durchflusszytometer konnte durch die selektive Zählung von 1000 Polyscience-Beads eine quantitative Analyse der im oberen bzw. unteren Kompartiment vorhandenen Zellen erfolgen (Abb. 2). Anhand dessen war eine Aussage über die Menge nicht transmigrierter (Zellen im oberen

Kompartiment), transmigrierter (Zellen im unteren Kompartiment) sowie Zellen während der Transmigration (Zellen im Filtereinsatz; Differenz der Ausgangszellzahl minus Summe der Zellen beider Kompartimente) in Abhängigkeit vom jeweiligen Ansatz möglich.

**Tab. 4: Für Transmigrationsstudien verwendete Überstände boviner Zellkulturen**

Zelltyp	Bezeichnung
Intestinale Epithelzellen	EP
non Epithelzellen	non-EP
Intraepitheliale Lymphozyten des Ileums	IEL
Blasten aus PBMC	PBMC



**Abb. 2: Quantitatives Analyseverfahren zur Bestimmung der Migrationsaktivität von Granulozyten.** Repräsentative Histogramme eines Rindes; A. starke FITC-Fluoreszenzunterschiede der präparierten Zellen und der verwendeten Polyscience-Beads (R1), B. sehr einheitliches Fluoreszenzverhalten und hohe FITC-Fluoreszenzintensität (M1) der pro Analyse gezählten 1000 Polyscience-Beads, C. Scattergramm (FS vs. SS) mit hoch aufgereinigter Granulozytenpopulation (R2) unter Exklusion der Polyscience-Beads, D. Scattergramm unter Exklusion sämtlicher Zellen: keine Interferenz der Polyscience-Beads mit den Größen- und Granularitätseigenschaften boviner Leukozyten.

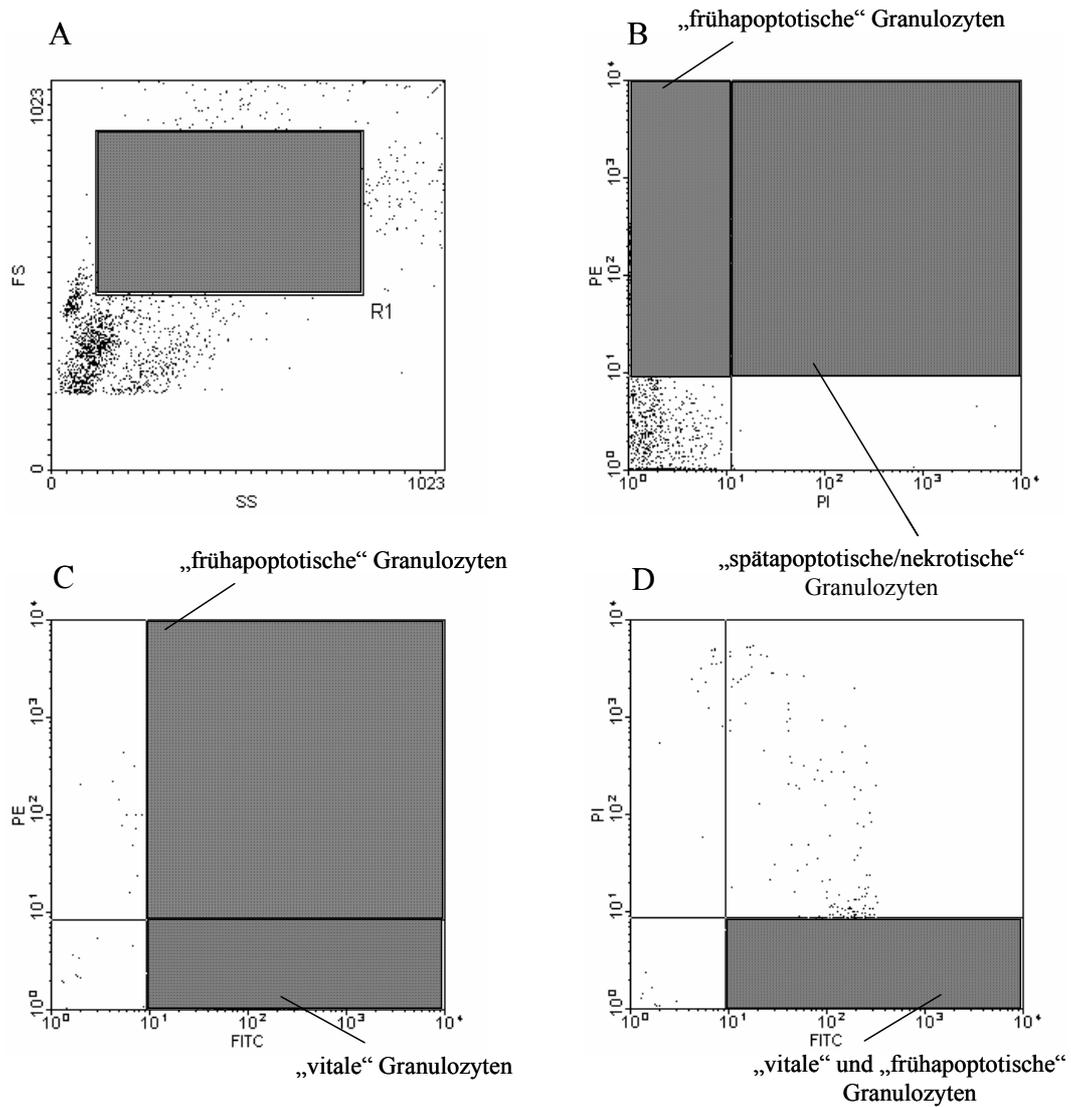
#### 3.1.6.5.4. Vitalität

Die Messung der Vitalität der Granulozyten erfolgte mittels eines Tests, mit dem eine Aussage hinsichtlich vitaler, apoptotischer sowie nekrotischer Zellen getroffen

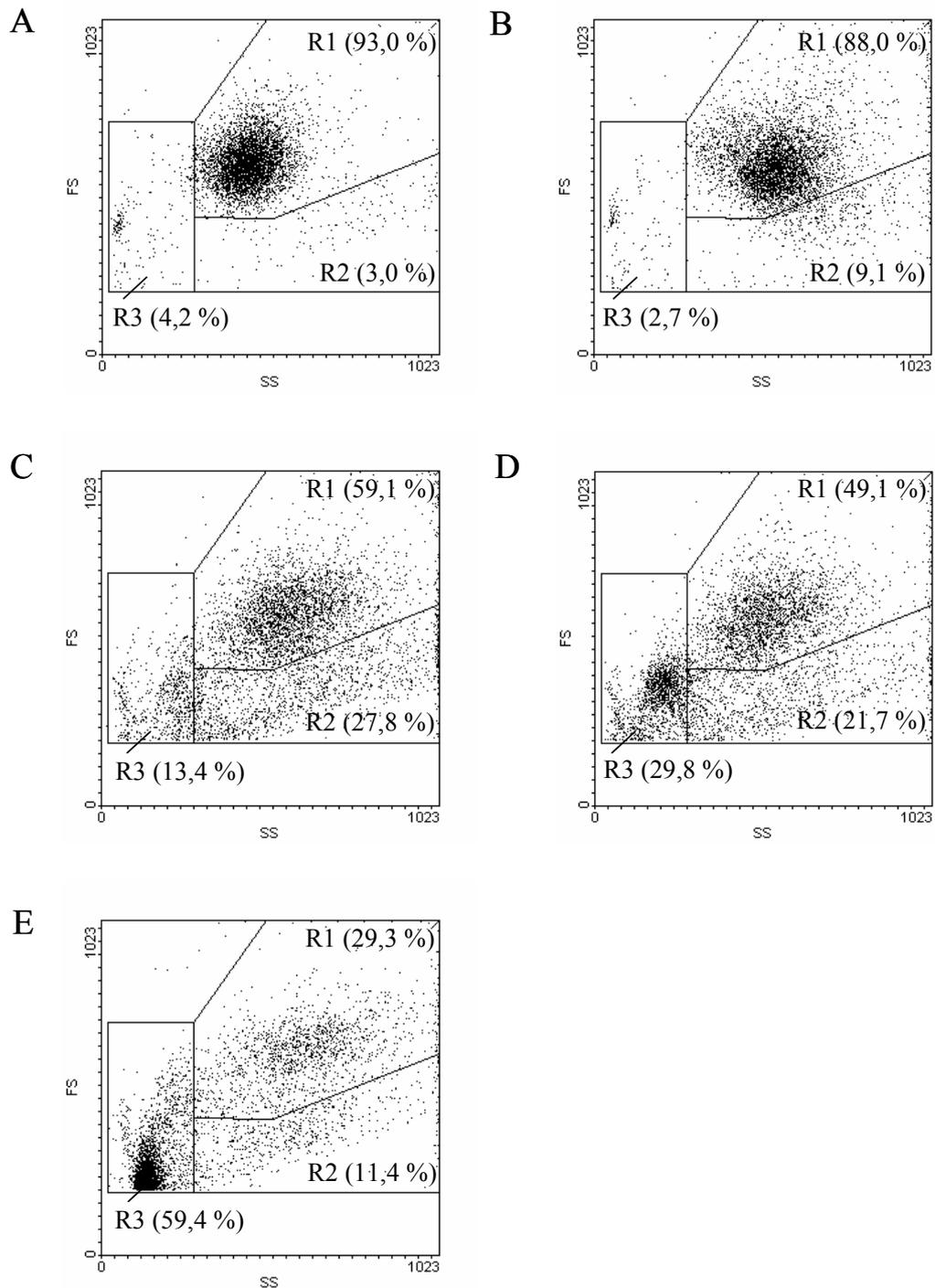
werden konnte. Die Granulozyten inkubierten, wie in Kap. 3.1.5.2.1. beschrieben; die dabei verwendeten Ansätze mit Stimulanzien und Testsubstanzen finden sich in Tabelle 2. Nach der Inkubation der Granulozyten in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit U-förmigem Boden; Fa. Greiner) wurden die  $2 \times 10^5$  Zellen je Vertiefung in Plastik-Zellkulturplatten (96-Loch mit V-förmigem Boden; Fa. Greiner) überführt. In einer Zentrifuge (Centrifuge 5403, Fa. Eppendorf) wurden die Platten bei Zentrifugationsschritt 2 abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen danach in Annexin-V-Bindungspuffer bei Raumtemperatur resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von drei Fluoreszenzfarbstoffen (5  $\mu\text{l}$  0,01  $\mu\text{M}$  Calcein AM, 5  $\mu\text{l}$  Annexin-V-PE (Phycoerythrin-konjugiert und 1:10 in PBS verdünnt) und 50  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumjodid (PI)) für 15 Minuten in Dunkelheit gefärbt. Anschließend folgten ein Zentrifugationsschritt 2 und die Resuspension der Zellen in 50  $\mu\text{l}$  eiskaltem Annexin-V-Bindungspuffer. Nach Überführung eines jeden Testansatzes in ein Analyseröhrchen mit 200  $\mu\text{l}$  eiskaltem Annexin-V-Bindungspuffer schloss sich die Analyse der Vitalität durch Messung der Zellen im Durchflusszytometer (EPICS™ ELITE; Fa. Beckman-Coulter) an, wie dies in Kapitel 3.1.6.6. beschrieben ist.

Eingesetzt werden Calcein-AM zur Färbung der vitalen Zellen, Annexin-V-PE zur Färbung apoptotischer Granulozyten durch Nachweis von Phosphatidylserin und Propidiumjodid als Farbstoff für nekrotische Zellen (Färbung der DNS nach Verlust der Membranintegrität). Durch charakteristische Fluoreszenzmerkmale lassen sich die Granulozyten einem Vitalitätszustand zuordnen: „Vitale“ Granulozyten waren ausschließlich mit Calcein anfärbbar (Abb. 3 C, dunkel unterlegte Fläche), „frühaoptotische“ Zellen färbten sich dagegen sowohl mit Calcein (Abb. 3 C) als auch mit Annexin-V (Abb. 3 B und C, hell unterlegte Flächen). „Spätaoptotisch/nekrotische“ Granulozyten wurden mit Annexin-V und Propidiumjod (PI) detektiert (Abb. 3 B, dunkel unterlegte Fläche).

Mit steigender Inkubationszeit der Granulozyten veränderte sich deren morphologisches Erscheinungsbild. Während in den ersten Stunden nach der Präparation eine homogene Zellpopulation vorherrschte, nahm daraufhin die Größe und Granularität der Zellen kontinuierlich ab. Die Granulozyten zeigten dabei zunächst eine verringerte Größe, was die Zuordnung zu einer „subvitalen“ Population ermöglichte (Abb. 4; R2). Im Endzustand war zudem die Granularität der Zellen stark reduziert. Die nach 48 Stunden mehrheitlich in diesem Zustand verharrenden Zellen wurden als „Debris“ bezeichnet (Abb. 4; R3).



**Abb. 3: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Vitalität von Granulozyten anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften.** Repräsentative Histogramme verschiedener Schafe; A. Scattergramm mit Granulozytenregion R1, B. Zellen aus Granulozytenregion R1, Annexin-V-PE vs. Propidiumjodid (PI), C. Zellen aus Granulozytenregion R1, Annexin-V-PE vs. Calcein (FITC); D. Zellen aus Granulozytenregion R1, PI vs. Calcein (FITC).



**Abb. 4: Vitalitätscharakterisierung boviner Granulozyten anhand ihrer Morphologie.** Scattergramme mit Regionen R1 (vitale Granulozyten); R2 (subvitale Granulozyten); R3 (Debris) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten (A nach 0,5 h; B nach 6 h; C nach 18 h; D nach 24 h und E nach 48 h).

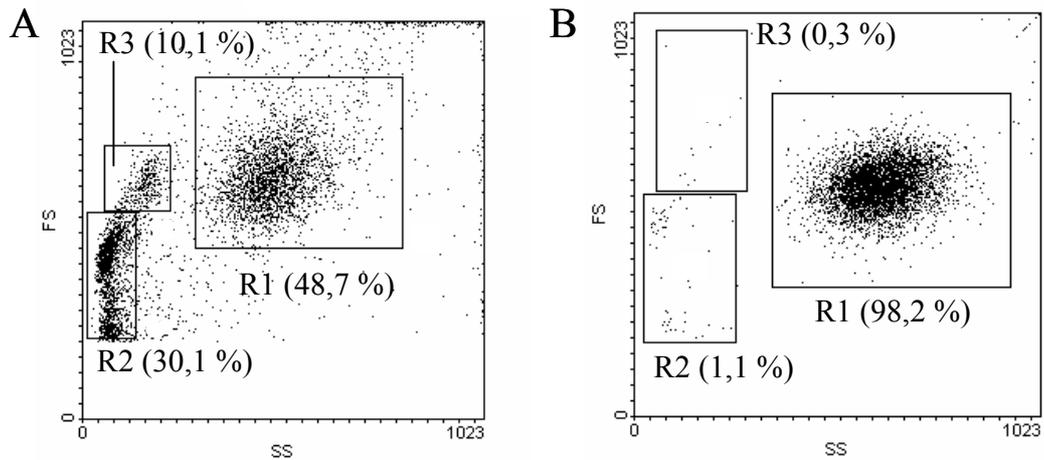
### 3.1.6.6. Probenanalyse

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde ein EPICS™ ELITE Analyser (Fa. Beckman-Coulter), ausgerüstet mit einem 488 nm Argonlaser und einer Standardfilterkombination (488 nm für Seitwärtsstreulicht, 525 nm für Fluoreszenz 1 (Fl. 1), 575 nm für Fl. 2 und 630 nm für Fl. 3), verwendet. Die Einstellung der Geräteparameter geschah anhand von Vorversuchen, wurde in Form eines Standardprotokolls gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Die Aufarbeitung und statistische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit einem gerätespezifischen Computerprogramm (Elite, Version 4.01).

Je Probenansatz fand eine Zählung und Analyse von 5000, in den Versuchen zur Migrationsfähigkeit im Transwellsystem von 10.000 Ereignissen statt. Diese stichprobenartige Anzahl wurde per Definition mit der Zahl der „Gesamtzellen“ einer Probe gleichgesetzt.

Vitale bovine und ovine Granulozyten zeigten sich anhand der Parameter Vorwärtsstreulicht („forward scatter“ (FS), korreliert mit der Größe der Zellen) und Seitwärtsstreulicht („sideward scatter“ (SS), korreliert mit der Granularität der Zellen) als eine homogene Zellpopulation mit hohem Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtsignal. Gegenüber Lympho- und Monozyten besaßen sie höhere Größen- und Granularitätseigenschaften. Um diese morphologisch differenzierte Population eigenständig analysieren zu können, wurde um die Granulozyten ein elektronisches Auswertefenster („Gate“) gezogen (Abb. 5).

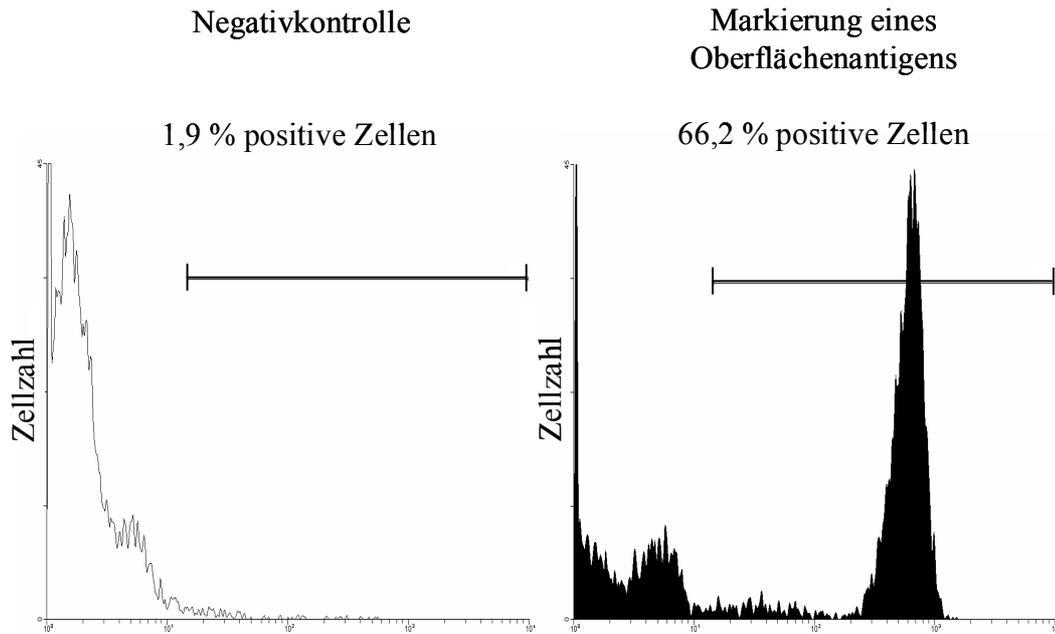
Nach der Aufreinigung der Granulozyten wurden nur solche Präparationen für weitere Versuche herangezogen, die eine Granulozyten-Reinheit von mindestens 80 Prozent aufwiesen. Abbildung 5 B zeigt exemplarisch eine reine Granulozytenfraktion. Die Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe und Granularität nicht wesentlich von Zellen aus dem Blut vor der Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 5 A).



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der Morphologie frisch präparierter Leukozyten anhand ihrer Größen- und Granularitätseigenschaften.** Repräsentative Histogramme von zwei Rindern nach Lyse der Erythrozyten unter hypotonen Bedingungen (A) und nach Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung von Granulozyten (B); R1 entspricht den Granulozyten, R2 den Lymphozyten und R3 den Monozyten der Proben.

Eine Unterscheidung lebender und toter Granulozyten wurde durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs PI erzielt. Dieser führt zur Anfärbung des Zellkerns toter Zellen durch dessen Anlagerung an die Nukleinsäure, wenn eine Desintegrität der Zell- sowie der Zellkernmembran vorliegt. Durch ein „Gate“ wurden definitionsgemäß solche Zellen als „tote Granulozyten“ bestimmt, deren Fluoreszenzintensität für diesen Farbstoff über der von 98 % der Zellen einer ungefärbten Kontrolle lag. „Tote“ Zellen wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Auf „lebenden“ Granulozyten wurde das Vorhandensein bestimmter Oberflächenantigene mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dazu wurde wiederum ein „Gate“ so definiert, dass weniger als 2 % der Zellen einer Negativkontrolle (Probe nur mit Sekundärantikörpern) eine Fluoreszenzintensität innerhalb des Fensters aufwiesen (Abb. 6; links). In Proben mit Primärantikörpern befanden sich dann die „Antigen-positiven Zellen“ im Fenster (Abb. 6; rechts).



**Abb. 6:** Darstellung der Anwendung elektronischer Auswertefenster („Gates“) zum Nachweis von Oberflächenantigenen auf bovinen Granulozyten. Durchflusszytometrische Analyse der indirekten Immunfluoreszenz.

Bei der Darstellung der Ergebnisse beziehen sich die angegebenen Werte auf den Anteil der „Antigen-positiven Zellen“ innerhalb des „Gates“ der lebenden Granulozyten. Für die Stärke der Toxinbindung auf Zellen, d. h. der durchschnittlichen Anzahl der von den Zellen gebundenen Toxinmoleküle, ist die mittlere Fluoreszenzintensität ( $\bar{\sigma}FI$ ) aller Toxin-bindenden Zellen einer Probe angegeben.

### 3.1.7. Statistische Auswertung

Für statistische Berechnungen in dieser Arbeit wurde das Programm BMDP (Fa. Statistical Software, Inc.) verwendet. Eine Überprüfung der Daten auf Signifikanz fand durch eine mehrfaktorielle Varianzanalyse statt.

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 ( $p \leq 0,001$ )

Sind mehrere p-Werte angegeben, so bezeichnet der erste die Signifikanz des Zusatzeinflusses (Zusatz von Stx1-Holotoxin oder rStxB1 ( $p_{\text{Zusatz}}$ )), der zweite die Signifikanz der Antikörperzugabe ( $p_{\text{Antikörper}}$ ) und der dritte die Signifikanz der Wechselwirkung zwischen Zusatz- und Antikörpereinfluss ( $p_{\text{WW}}$ ).

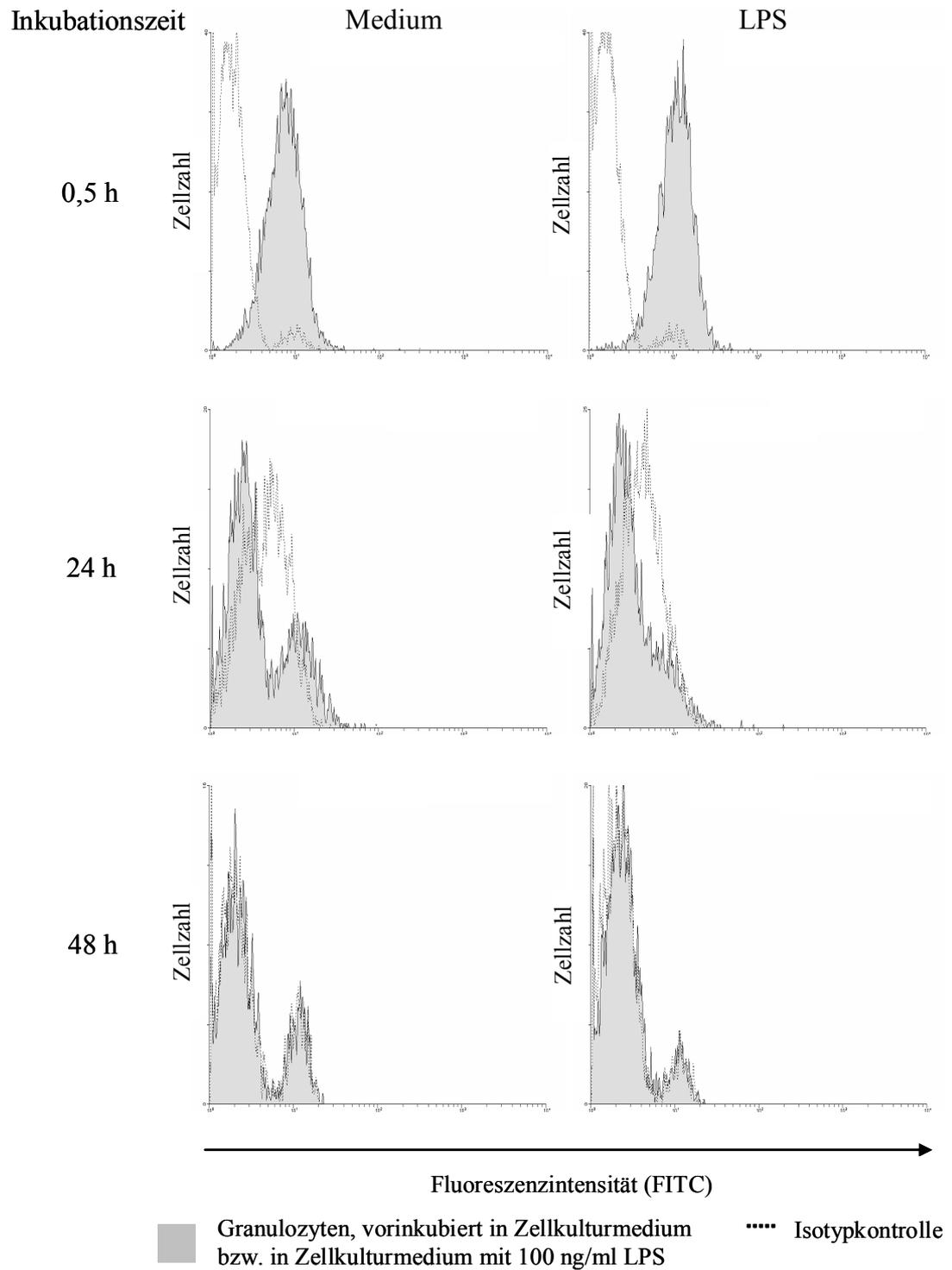
Sofern nicht anders vermerkt, sind in den Abbildungen und Tabellen nur signifikante Unterschiede angegeben. Abbildungen und Tabellen ohne statistische Auswertung der Daten sind entsprechend gekennzeichnet.

## **3.2. Ergebnisse**

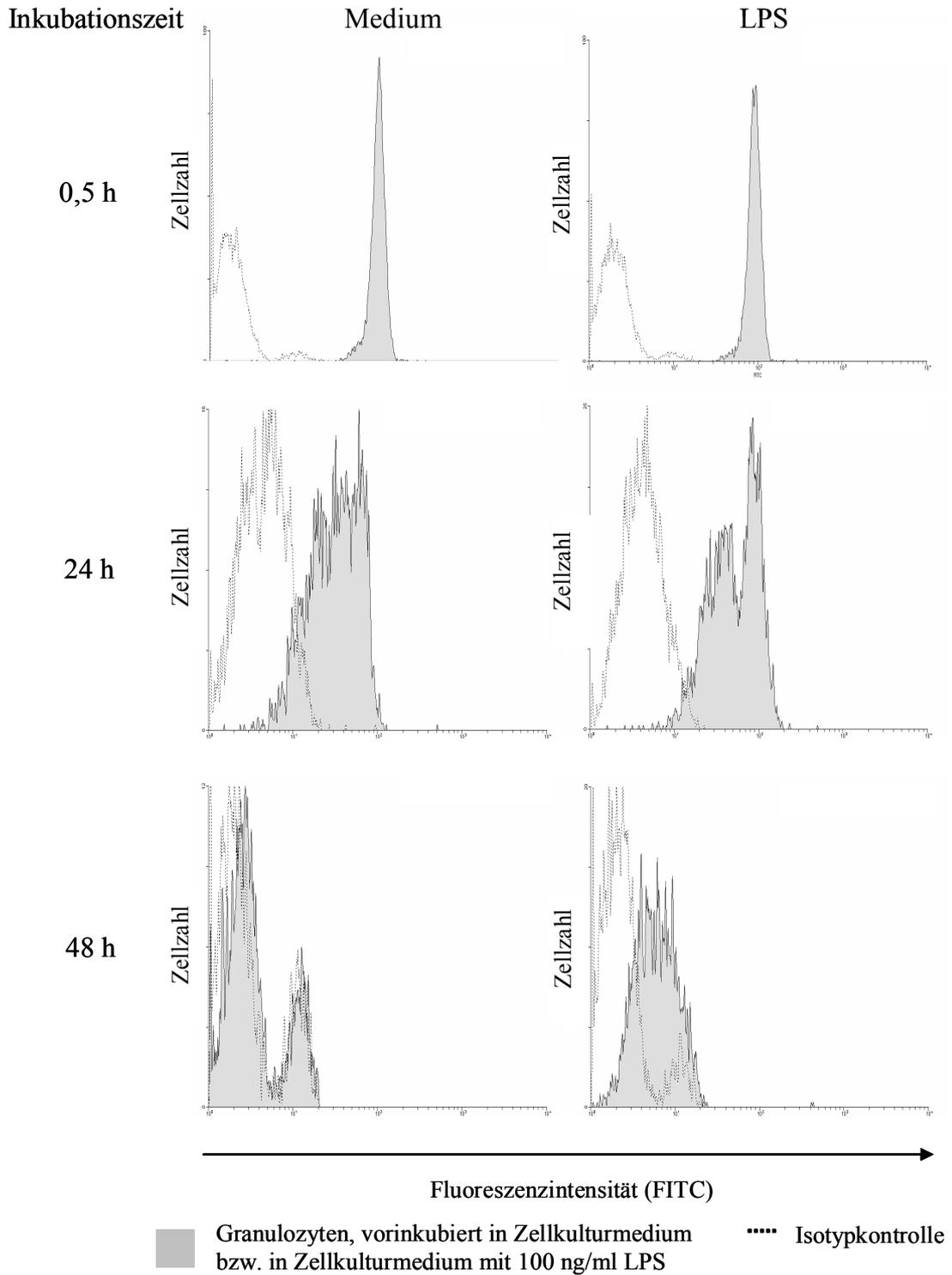
### **3.2.1. Charakterisierung der aus peripherem Blut gewonnenen Granulozyten**

Um die Reinheit der präparierten Granulozytenfraktion beurteilen zu können, wurden die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Parameter „Größe“ und „Granularität“ herangezogen. Granulozyten von Rind, Schaf und Ziege erschienen im Scattergramm als homogene Zellpopulation. In ihrer Größe und Granularität übertrafen sie die Lymphozyten- und Monozytenfraktion. Für die nachfolgenden Versuche mit Granulozyten fanden nur solche Präparationen Anwendung, die eine Reinheit von mindestens 80 Prozent Granulozyten pro Probe aufwiesen.

Zur besseren Charakterisierung der Granulozyten wurden die Zellen auch auf die Expression von Oberflächenantigenen untersucht. Alle bovinen Granulozyten exprimierten MHC-I. Bemerkenswerterweise lag die Fluoreszenzintensität beim Nachweis der MHC-I-Expression boviner Granulozyten über der von bovinen Lymphozyten. Die Granulozyten des Rindes besaßen demnach mehr MHC-I-Moleküle pro Einzelzelle verglichen mit den Lymphozyten dieser Spezies. Bovines MHC-II wird von Granulozyten spontan nicht exprimiert, wohl aber von Monozyten und Lymphozyten. CD11b ist auf myeloiden Zellen und natürlichen Killerzellen gemeinsam mit CD18 als sogenanntes Mac-1-Adhäsionsmolekül vorhanden (128). Auch frisch präparierte bovine Granulozyten banden den Antikörper gegen CD11b (Abb. 7). Bovine Granulozyten banden mit hoher Fluoreszenzintensität den Antikörper IL-A24 (Abb. 8), der ein bovines Makrophagendifferenzierungsantigen (Mø.Diff.Ag) erkennt (74). Die Granulozyten wurden nach Inkubation über 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS nochmals charakterisiert. Dabei hatte die Stimulation mit LPS nur einen geringgradigen Einfluss auf die Expression von CD11b und Mø.Diff.Ag (Abb. 7, 8). Nach 24-stündiger Inkubation war nur noch das Mø.Diff.Ag auf der Oberfläche der Granulozyten nachweisbar, allerdings sank die mittlere Fluoreszenzintensität (øFI) der Zellen für dessen Nachweis. Nach 48 Stunden Inkubation war kein Nachweis von CD11b und Mø.Diff.Ag auf bovinen Granulozyten mehr möglich.



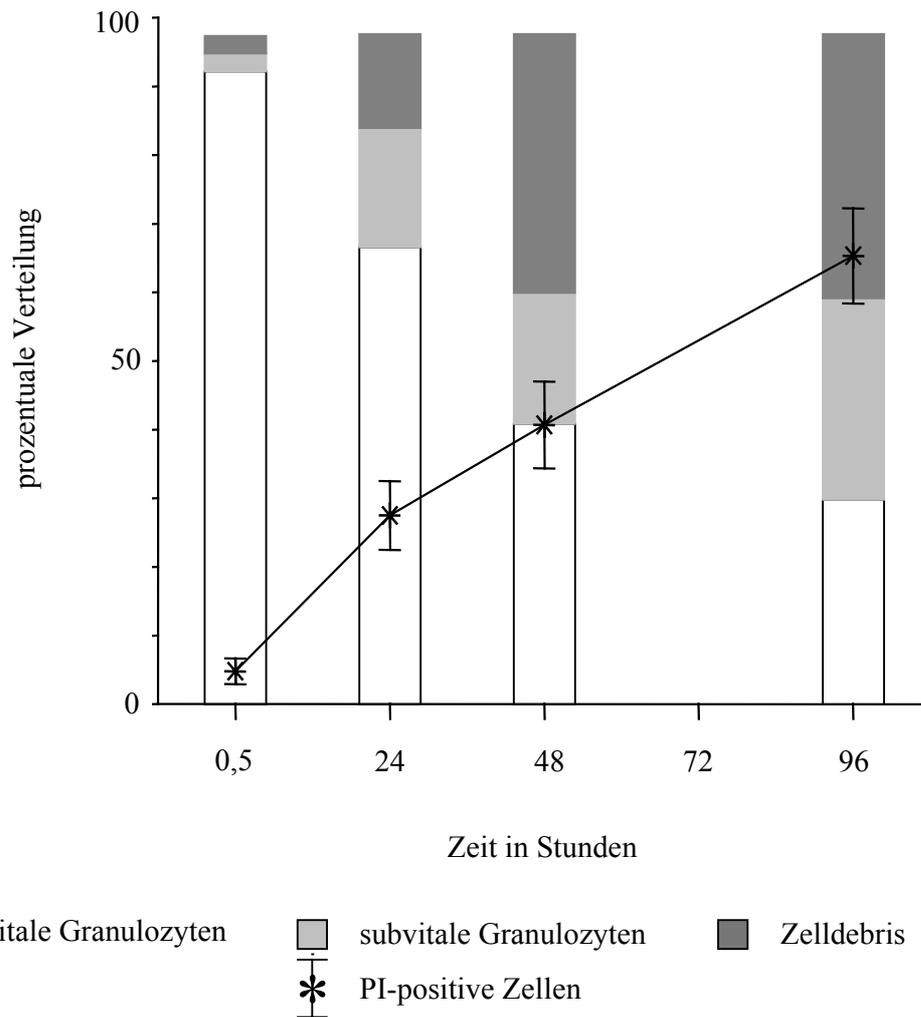
**Abb. 7: Nachweis von CD11b auf bovinen Granulozyten nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS.** Durchflusszytometrische Analyse mehrerer Tiere (n=7; Doppelansätze von 3 Kälbern und 4 Kühen); repräsentative Histogramme einer Kuh.



**Abb. 8:** Nachweis des Makrophagendifferenzierungsantigens (mAk IL-A24) auf bovinen Granulozyten nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS. Durchflusszytometrische Analyse mehrerer Tiere (n=7; Doppelansätze von 3 Kälbern und 4 Kühen); repräsentative Histogramme einer Kuh.

Untersuchungen an humanen Granulozyten bewegen sich für gewöhnlich im Bereich von wenigen Stunden. Diese kurzen Versuchszeiten sind durch einen Funktionsverlust und eine früh einsetzende Apoptose dieser vulnerablen Zellen bedingt (171). Untersuchungen an den Granulozyten der Wiederkäuer belegen jedoch durchaus noch nach etlichen Stunden überlebende Zellen, wie dies durch die fehlende Anfärbbarkeit mit PI und das zell-morphologische Erscheinungsbild zum Ausdruck kommt. Beide Parameter zeigen aber dann im Verlauf der Inkubation eine progrediente Zellschädigung an, bei der die Zellen zunehmend an Größe und Granularität verlieren. Nach 48 Stunden lässt sich ein deutlicher Übergang der Granulozytenpopulation in eine Zelldebris-Fraktion erkennen (Abb. 4, 9).

Die folgenden Ergebnisse wurden daher maßgeblich an zwei Zeitpunkten ermittelt. Der 30-Minuten-Wert zeigt Effekte an, die unmittelbar nach der Präparation schon messbar waren und stellt somit den frühesten möglichen Messzeitpunkt dar. Der 18-Stunden-Wert wurde gewählt, um Effekte, die auf einer längeren Einwirkung von Stimulanzen und Aktivatoren beruhen, sicher zeigen zu können. Dabei endet diese Zeitspanne, noch bevor sich Alterungserscheinungen an den Zellen deutlich zeigen.



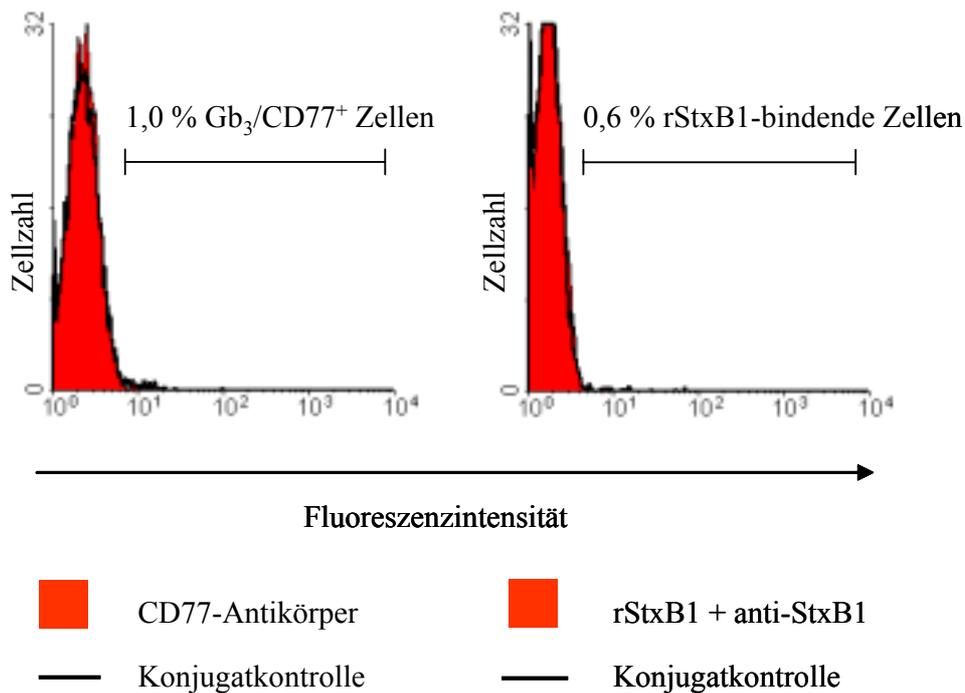
**Abb. 9: Morphologie und Membranintegrität boviner Granulozyten mit fortschreitender Inkubation in Medium.** Durchflusszytometrische Analyse von Zellgröße und -granularität sowie Anfärbbarkeit mit Propidiumjodid (PI); Doppelansätze von n=5 Tieren.

### 3.2.2. Untersuchungen zum Nachweis von Shigatoxin-Rezeptoren auf Granulozyten

Kürzlich wurde die Homologie zwischen Stx-Rezeptoren auf bovinen Lymphozyten und humanem Gb<sub>3</sub>/CD77 belegt (194, 291). Dazu wurde der monoklonale CD77-Antikörper zur Detektion des Rezeptors Gb<sub>3</sub>/CD77 sowie die rekombinante B-Untereinheit von Stx1 verwendet.

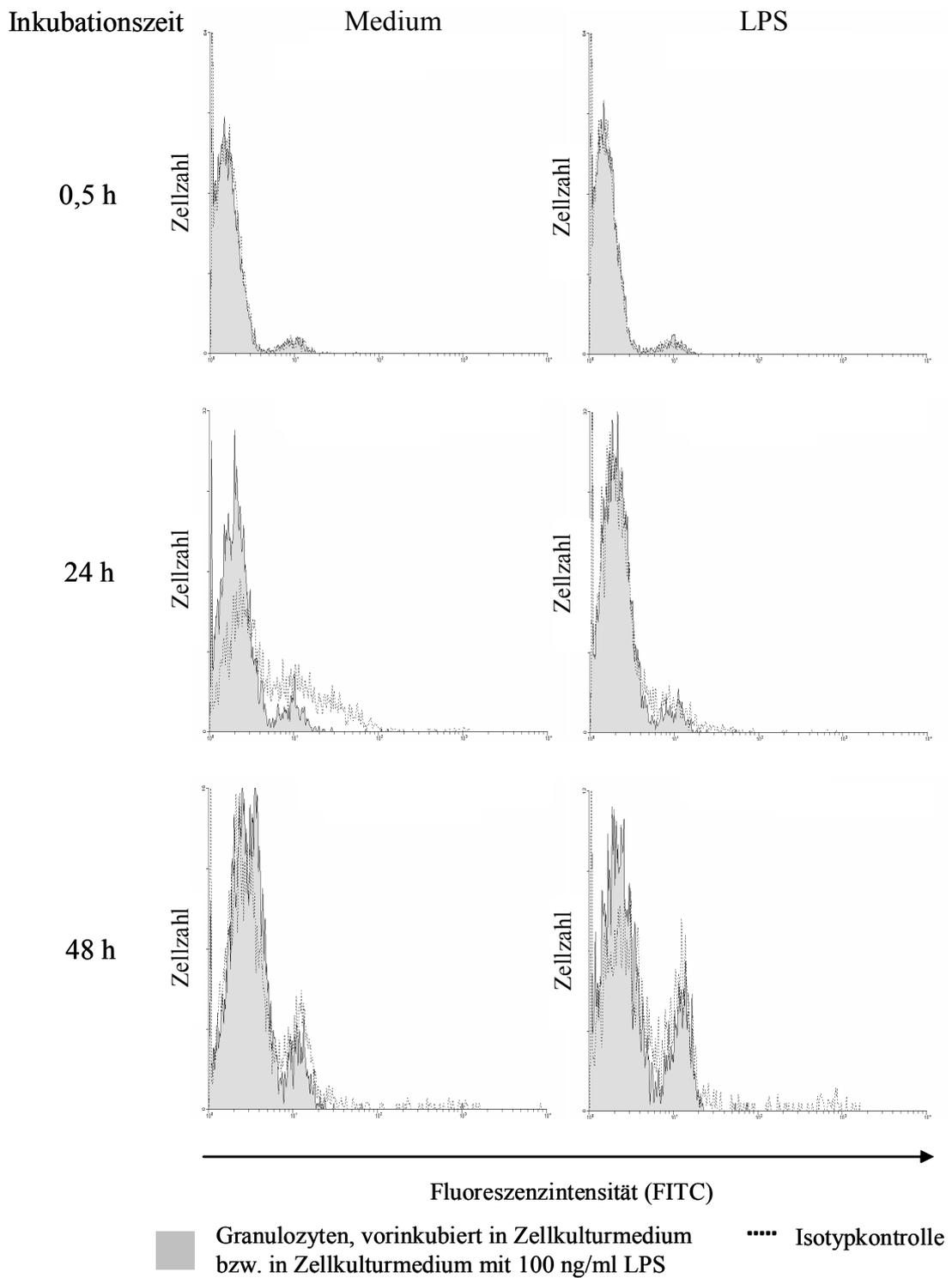
### 3.2.2.1 Bovine Granulozyten

Gb<sub>3</sub>/CD77 ließ sich auf Zelloberflächen unstimulierter boviner Granulozyten nicht nachweisen. Es fand weder eine Bindung des CD77-Antikörpers noch der rStxB1 statt (Abb. 10). Dabei war es unerheblich, ob die Granulozytenfraktion unmittelbar nach Lyse der Erythrozyten untersucht wurde, oder ob die Granulozyten durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt wurden.

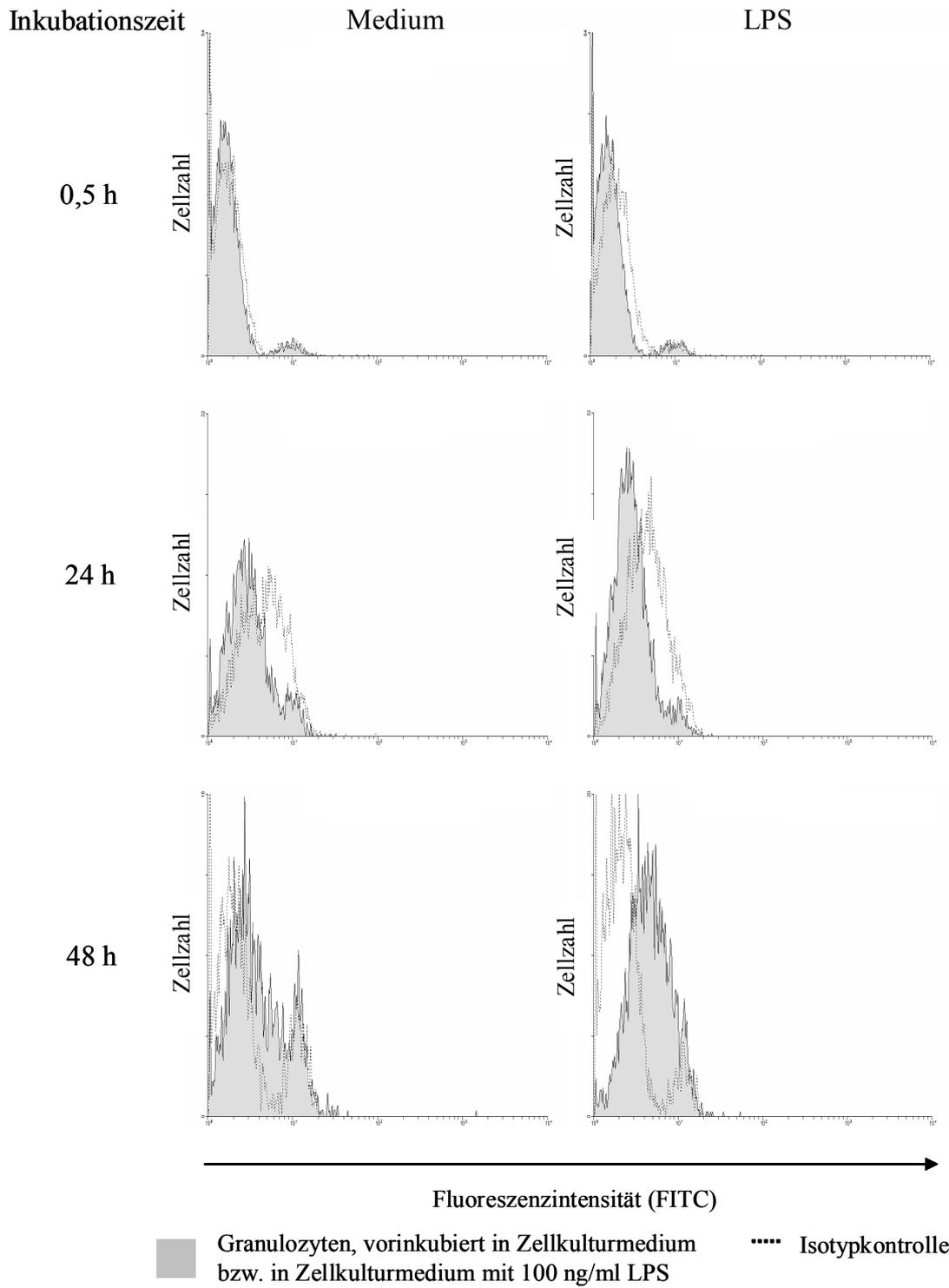


**Abb. 10:** Versuch zum Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf und Bindung von rStxB1 an bovinen Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation. Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=5 Tieren, repräsentative Histogramme einer Kuh.

Bovine Lymphozyten exprimieren oberflächliches Gb<sub>3</sub>/CD77 erst nach mehrtägiger Kultivierung und Stimulation (194). Aus diesem Grund wurde auch eine Kultivierung boviner Granulozyten von 3 zwei Wochen alten Kälbern sowie 4 Kühen mit Lipopolysaccharid (LPS) als Stimulans durchgeführt. An 6 Messzeitpunkten (0,5, 6, 18, 24, 48 und 72 Stunden) nach Präparation der Granulozyten war ein Nachweis der Expression von CD77 und der Bindung von rStxB1 bei bovinen Granulozyten auch in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von LPS (0, 1, 10, 100 ng/ml) nicht möglich (Abb. 11, 12).



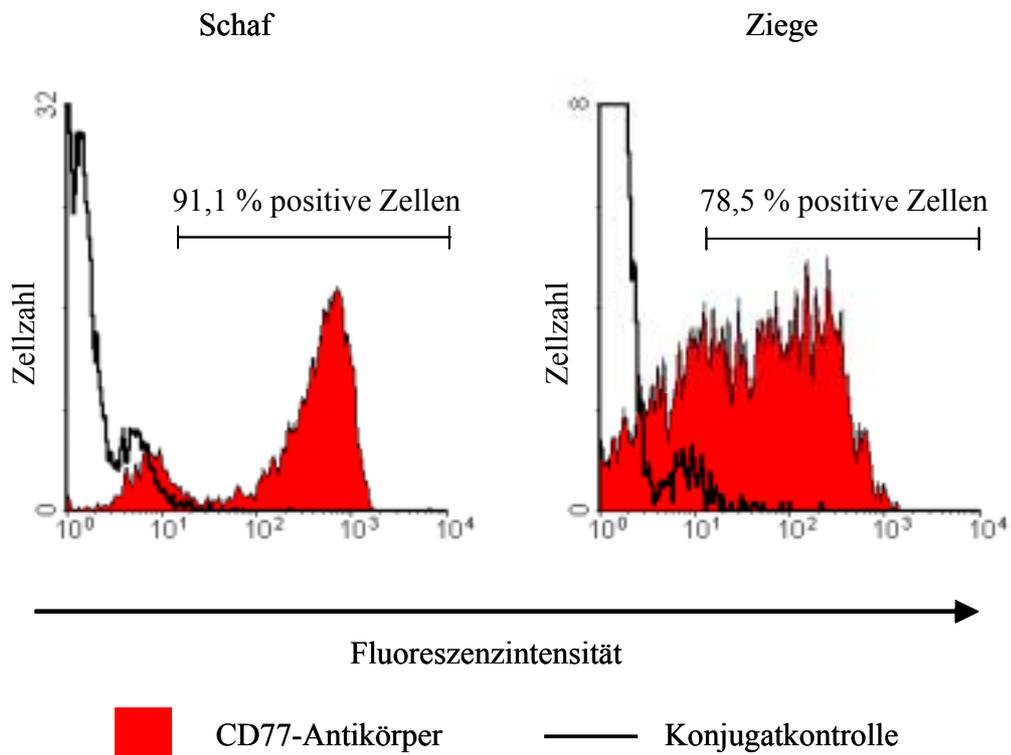
**Abb. 11: Versuch zum Nachweis des Shigatoxin-Rezeptors Gb<sub>3</sub>/CD77 auf bovinen Granulozyten nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS.** Durchflusszytometrische Analyse mehrerer Tiere (n=7; Doppelansätze von 3 Kälbern und 4 Kühen); repräsentative Histogramme einer Kuh.



**Abb. 12:** Versuch zum Nachweis der Bindungsfähigkeit von bovinen Granulozyten für die Shigatoxin-B-Untereinheit (rStxB1) nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS. Durchflusszytometrische Analyse mehrerer Tiere (n=7; Doppelansätze von 3 Kälbern und 4 Kühen); repräsentative Histogramme einer Kuh.

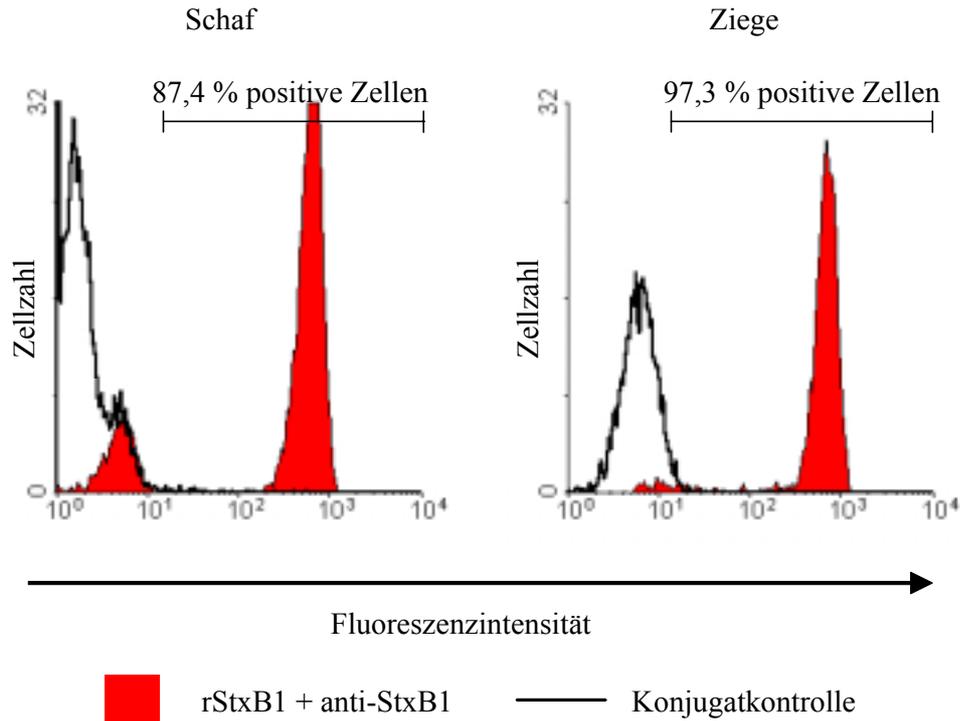
### 3.2.2.2. Ovine und caprine Granulozyten

Im Gegensatz zu bovinen Granulozyten gelang der Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 bei Granulozyten von Schaf und Ziege (Abb. 13). Die Granulozyten dieser kleinen Wiederkäuer exprimierten statistisch hoch signifikant Gb<sub>3</sub>/CD77 ( $p < 0,0001$  bei Vergleichen von bovinen und ovinen Granulozyten). Der Nachweis für Gb<sub>3</sub>/CD77 gelang spontan ohne vorherige Stimulation und mit sehr hoher mittlerer Fluoreszenzintensität.



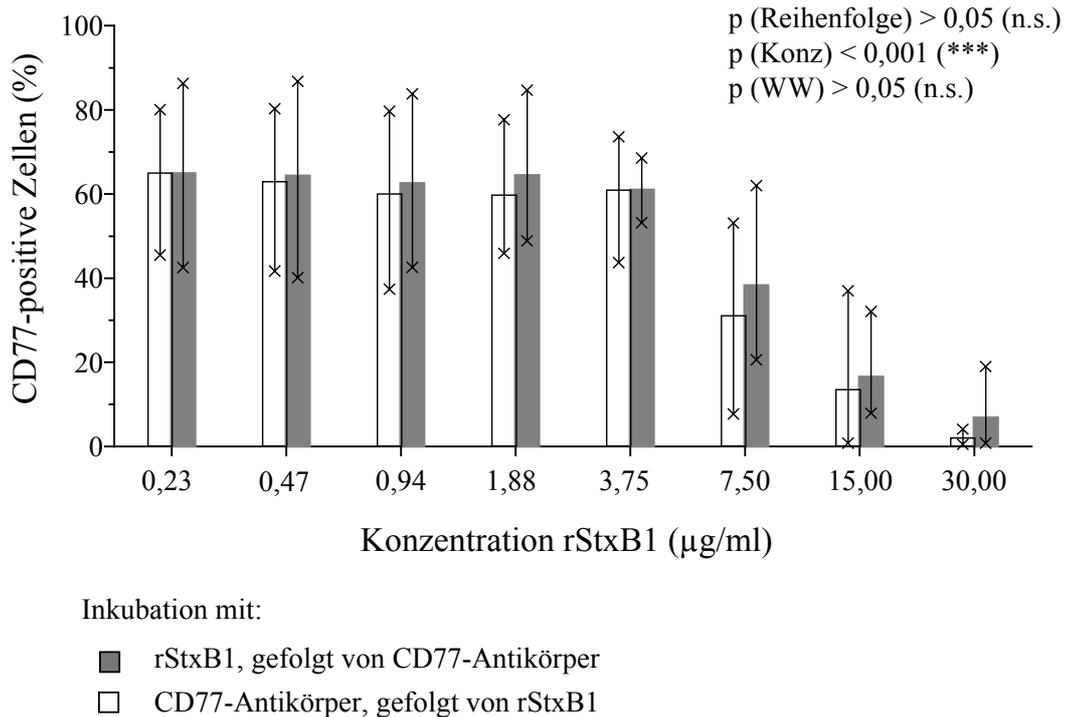
**Abb. 13:** Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf ovinen und caprinen Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation. Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von jeweils n=3 Tieren; repräsentative Histogramme eines Schafes und einer Ziege.

Bindungsstudien mit der rStxB1 ergaben eine starke Bindung an die Granulozyten der kleinen Wiederkäuer (Abb. 14). Auch bei diesen Experimenten banden nahezu alle Zellen ohne eine vorherige Stimulation die B-Untereinheit statistisch hoch signifikant ( $p < 0,0001$  bei Vergleichen von bovinen und ovinen Granulozyten). Die mittlere Fluoreszenzintensität des Nachweises der Bindung war sogar noch höher als beim Nachweis des Rezeptors Gb<sub>3</sub>/CD77.



**Abb. 14:** Nachweis der Bindung der rStxB1 an ovine und caprine Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation. Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von jeweils n=3 Tieren; repräsentative Histogramme eines Schafes und einer Ziege.

Nachdem der Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 und die Bindung der rStxB1 auf Granulozyten von Schaf und Ziege gelungen war, sollte als nächstes die Frage beantwortet werden, ob die rStxB1 auch an Gb<sub>3</sub>/CD77 bindet. An präparierten Granulozyten des Schafes wurden Kompetitionsstudien mit dem CD77-Antikörper und der rStxB1 durchgeführt. Die rStxB1 wurde zu diesem Zweck titriert, die Konzentration des CD77-Antikörpers blieb hingegen konstant. Abbildung 15 zeigt, dass die Bindung des CD77-Antikörpers hochsignifikant durch steigende Konzentrationen rStxB1 gehemmt werden konnte. Die Bindung des CD77-Antikörpers ist bei 30 µg/ml rStxB1 vollständig aufgehoben. Da beide Kurven kongruent verlaufen, bindet die rStxB1 unabhängig davon, ob sie als erster oder als zweiter Ligand in den Probenansatz zugegeben wird. Somit wurde bei zeitlich späterer Zugabe der rStxB1 der CD77-Antikörper offensichtlich wieder von seinem Rezeptor verdrängt.



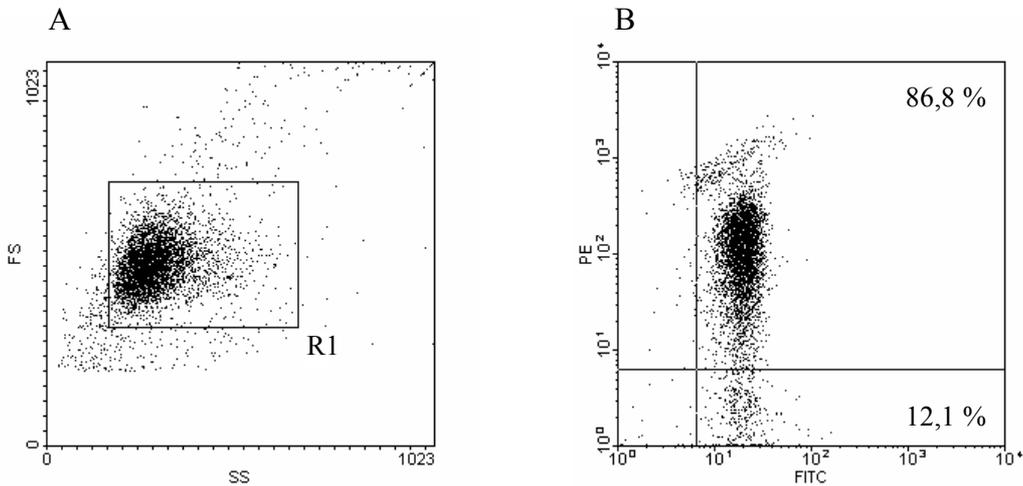
**Abb. 15:      **Kompetition der Bindung der rStxB1 und des CD77-Antikörpers an ovine Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation.****  
Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von  $n=3$  Tieren; Konzentration des CD77-Antikörpers ( $45 \mu\text{g/ml}$ ) konstant; angegeben sind Mittelwerte, Maxima und Minima.

An ovinen Granulozyten wurden neben Bindungsstudien zur Bindung der rStxB1 auch solche zum Bindungsnachweis von Stx1 durchgeführt. Diese Versuche fanden ausschließlich zum Zeitpunkt 0,5 Stunden nach der Präparation statt. Die Granulozyten der untersuchten Schafe zeigten ein sehr unterschiedliches Bindungsverhalten. Die Prozentsätze der Zellen, die Stx1 binden konnten, lagen zwischen  $2,75 \pm 0,78$  und  $15,7 \pm 3,82$  ( $n=3$ ).

### 3.2.2.3. Transmigrierte Granulozyten

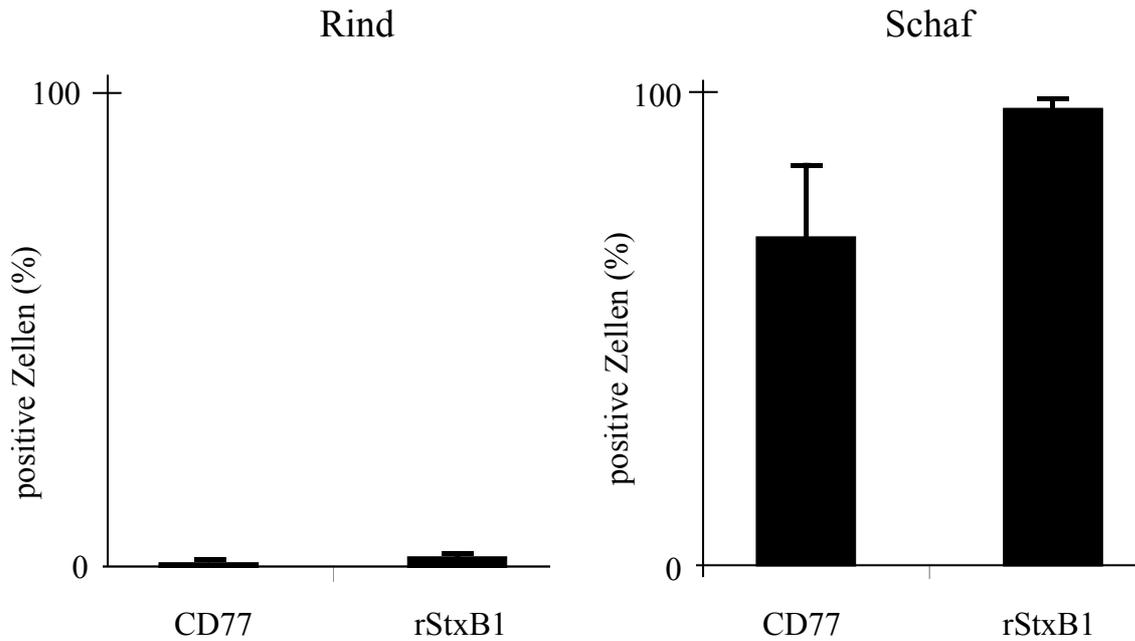
Aus dem Blut aufgereinigte Granulozyten repräsentieren Zellen in einem niedrigen Aktivierungszustand, wohingegen migrierte Granulozyten aktiviert sind. Dies wird durch eine veränderte Ausstattung an Oberflächenmolekülen und eine veränderte Funktionalität belegt (15, 43, 113). Als Modell für Granulozyten auf der enteralen Schleimhaut wurden aus frischer Milch aufgereinigte Granulozyten untersucht (Abb.

16). Milchleukozyten ähneln hinsichtlich ihrer Morphologie den Fettmizellen der Milch. Die Zahl der Mizellen ließ sich bei der Präparation der Granulozyten bereits stark reduzieren. Zur Abgrenzung von den Mizellen wurden spezifische Oberflächenantigene der Granulozyten (Mø.Diff.Ag.) bei der Immundekoration mit nachgewiesen (Abb. 16 B).



**Abb. 16: Charakterisierung oviner Granulozyten aus der Milch.** A. anhand ihrer Größen- (FS) und Granularitätseigenschaften (SS): R1 entspricht Granulozyten; B. Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 mittels Doppelfluoreszenz: Gb<sub>3</sub>/CD77 (PE) versus Mø.Diff.Ag (mAk IL-A24; FITC); durchflusszytometrische Analyse von n=3 Tieren; repräsentative Histogramme einer Schafmilchprobe. Die Gates wurden anhand von Negativkontrollen eingerichtet.

Es stellte sich die Frage, ob die migrationsbedingte Aktivierung der Granulozyten die Stx-Rezeptor-Expression beeinflusst. Dabei war vornehmlich von Interesse, ob migrierte bovine Granulozyten doch noch zur Gb<sub>3</sub>/CD77-Expression befähigt sind, bzw. ob migrierte ovine Granulozyten immer noch Gb<sub>3</sub>/CD77-positiv sind. Auf Granulozyten aus frischer Kuhmilch ließ sich keine Bindung des CD77-Antikörpers oder der rStxB1 nachweisen. Im Gegensatz dazu exprimierten die Granulozyten aus der Milch Ostfriesischer Milchschafe noch immer Gb<sub>3</sub>/CD77 auf ihrer Oberfläche und konnten rStxB1 binden (Abb. 17). Im Vergleich zu Granulozyten aus dem Blut des Schafes war jedoch der Anteil Gb<sub>3</sub>/CD77-positiver Zellen geringgradig erniedrigt.



**Abb. 17: Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 und Bindung der rStxB1 bei bovinen und ovinen Granulozyten aus frischer Kuh- bzw. Schafmilch.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=3 Tieren; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.2.3. Wirkung von Shigatoxin 1 auf Granulozyten

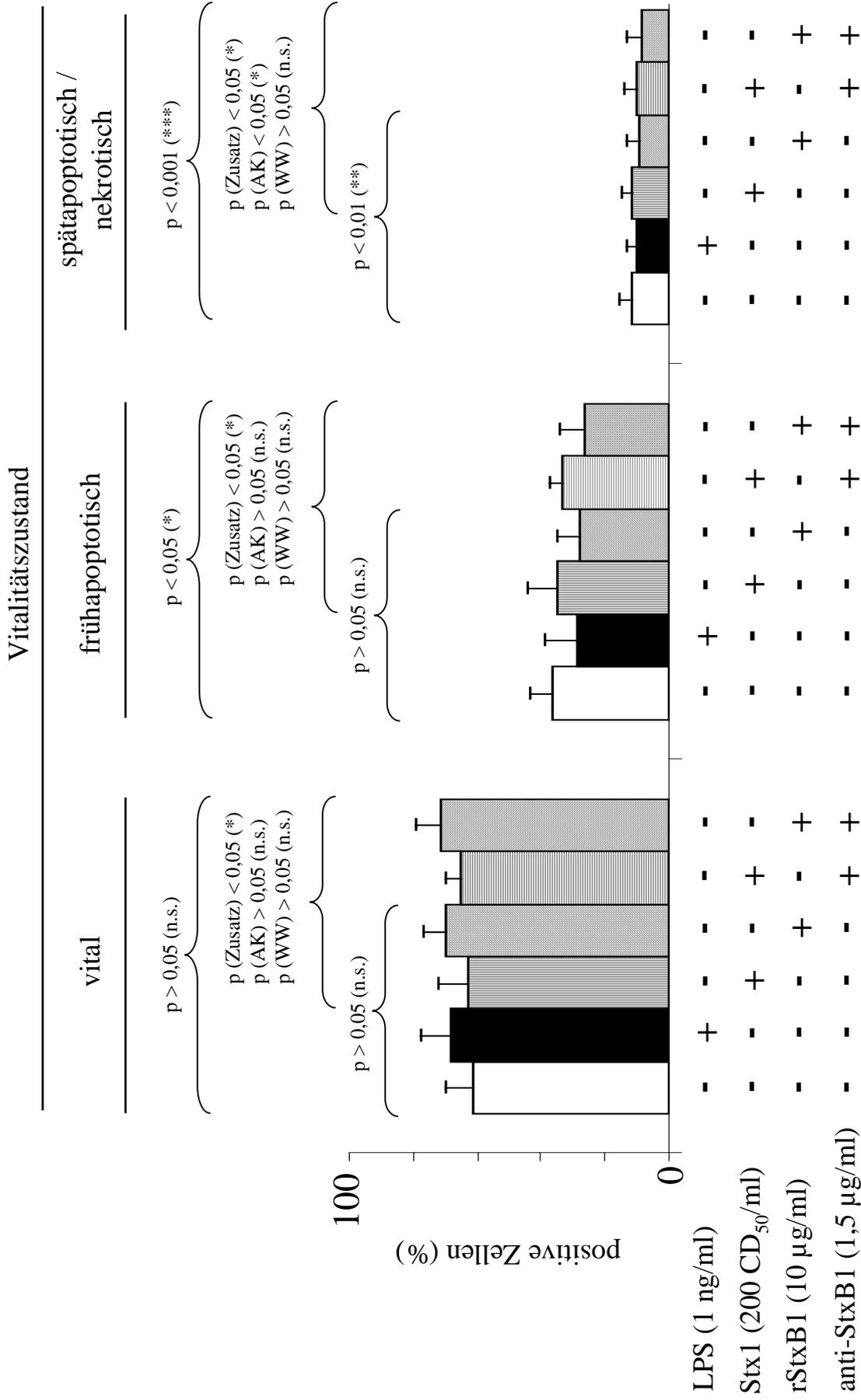
#### 3.2.3.1. Bovine Granulozyten

##### 3.2.3.1.1. Morphologie und Vitalität

Weil es sich bei Stx1 um ein Zytotoxin handelt, das seine Wirkung möglicherweise im Sinne einer Zellschädigung ausübt, wurde die Vitalität der Granulozyten untersucht. In Kapitel 3.1.6.5.4. sind die morphologischen und immunphänotypischen Kriterien, anhand derer eine Einteilung in „vitale“, „frühapoptotische“ und „spätapoptotisch/nekrotische“ Granulozyten vorgenommen wurde, erläutert.

Bovine Granulozyten erwiesen sich zu den Messzeitpunkten nach 0,5 und 18 Stunden Inkubation als überwiegend vital. Nach Inkubation mit Stx1 oder rStxB1 jeweils in Abwesenheit oder Anwesenheit von anti-StxB1 zeigten sich bei den vitalen Zellen nach 18 Stunden Inkubation kleinere Unterschiede, die teilweise sogar statistisch signifikant sind (Abb. 18). Allerdings waren diese Unterschiede gering und entsprachen eher Differenzen zwischen dem Ansatz mit Medium und jenem mit

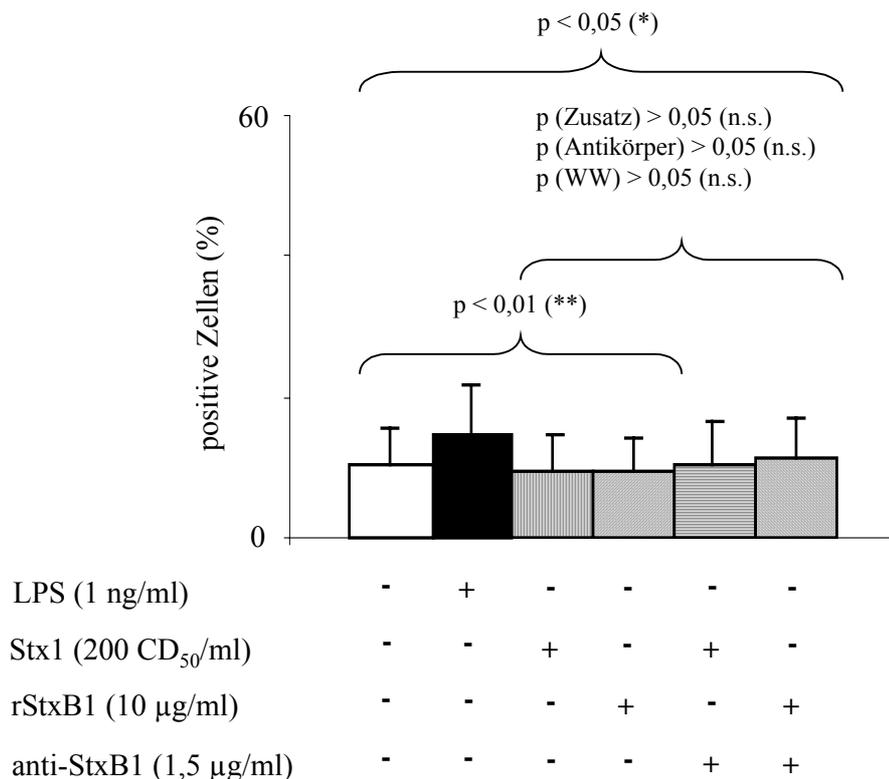
LPS als dass sie einen toxinspezifischen Einfluss erkennen ließen. Ebenso verhielt es sich mit den Granulozyten der frühapoptotischen sowie der spätapoptotisch/nekrotischen Population. Rindergranulozyten wiesen auch nach 0,5 Stunden unter Einwirkung von Stx1 oder rStxB1 keine Beeinträchtigungen ihrer Vitalität auf (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 18:** Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität boviner Granulozyten *in vitro*. Durchflusszytometrische Analyse; Doppellansätze von n=5 Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.2.3.1.2. Phagozytoseaktivität

Da Stx keinen zytotoxischen Einfluss auf die Vitalität boviner Granulozyten erkennen ließ, wurde die Phagozytoseaktivität als eine der Haupteigenschaften von Granulozyten untersucht. Unabhängig von der untersuchten Inkubationszeit waren Stx1 und rStxB1 nicht in der Lage, die Phagozytoseaktivität gegenüber Bakterien zu beeinflussen. Sowohl nach 0,5 h (Daten nicht gezeigt) als auch nach 18 Stunden ließ sich nur ein LPS-spezifischer Einfluss nachweisen.



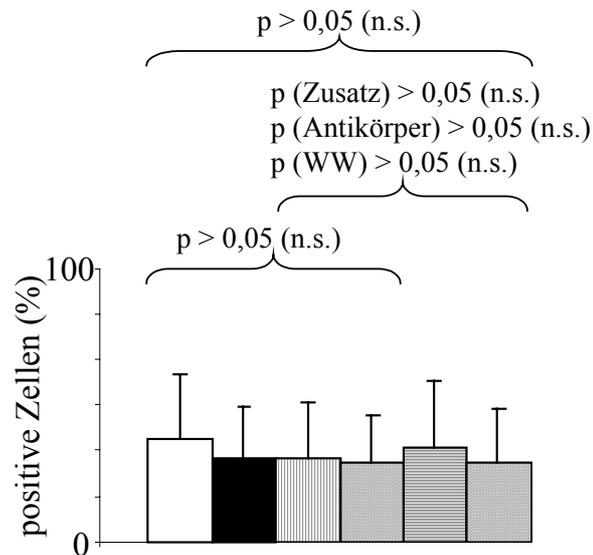
**Abb. 19: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Phagozytoseaktivität boviner Granulozyten *in vitro*.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=5 Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.2.3.1.3. Aktivierbarkeit („oxidative-burst“)

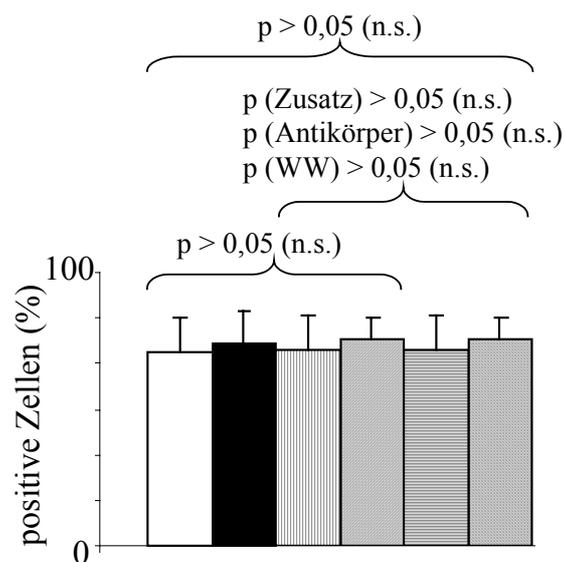
Als ein Maß für die Aktivierbarkeit von Granulozyten gilt die Messung der durch sie gebildeten reaktiven Sauerstoffmetabolite („reactive oxygen species“; ROS) Wasserstoffperoxid und Superoxidanion. Um einen möglichen Einfluss von Shigatoxin auf die Aktivierbarkeit messen zu können, wurden die präparierten Granulozyten für 0,5 bzw. 18 Stunden zusammen mit Stx1 oder rStxB1 inkubiert.

Durch nachfolgend zugesetzte Stimuli ließ sich die verbliebene Aktivierbarkeit der Zellen bestimmen. Die Zugabe opsonisierter *E. coli*-Bakterien einerseits und des Phorbolesters PMA andererseits repräsentierte eine niedrige bzw. hohe Stimulation. Abb. 20 stellt die Ergebnisse der Versuche zur Aktivierbarkeit nach 18 Stunden dar. Rindergranulozyten zeigten zu keinem Messzeitpunkt (Daten nach 0,5 Stunden Inkubation nicht gezeigt) nach Stimulation mit PMA eine toxinspezifische Beeinflussung ihrer Aktivierbarkeit. Eine zu beiden Messzeitpunkten nach bakterieller Stimulation gemessene leichte Reduktion der Aktivierbarkeit in den Ansätzen Stx1 und rStxB1 erwies sich als statistisch nicht signifikant. Diese war nur unvollständig durch anti-StxB1 neutralisierbar. Auch LPS bewirkte eine derartige Reduktion der Aktivierbarkeit.

## Bakterien-induziert



## PMA-induziert



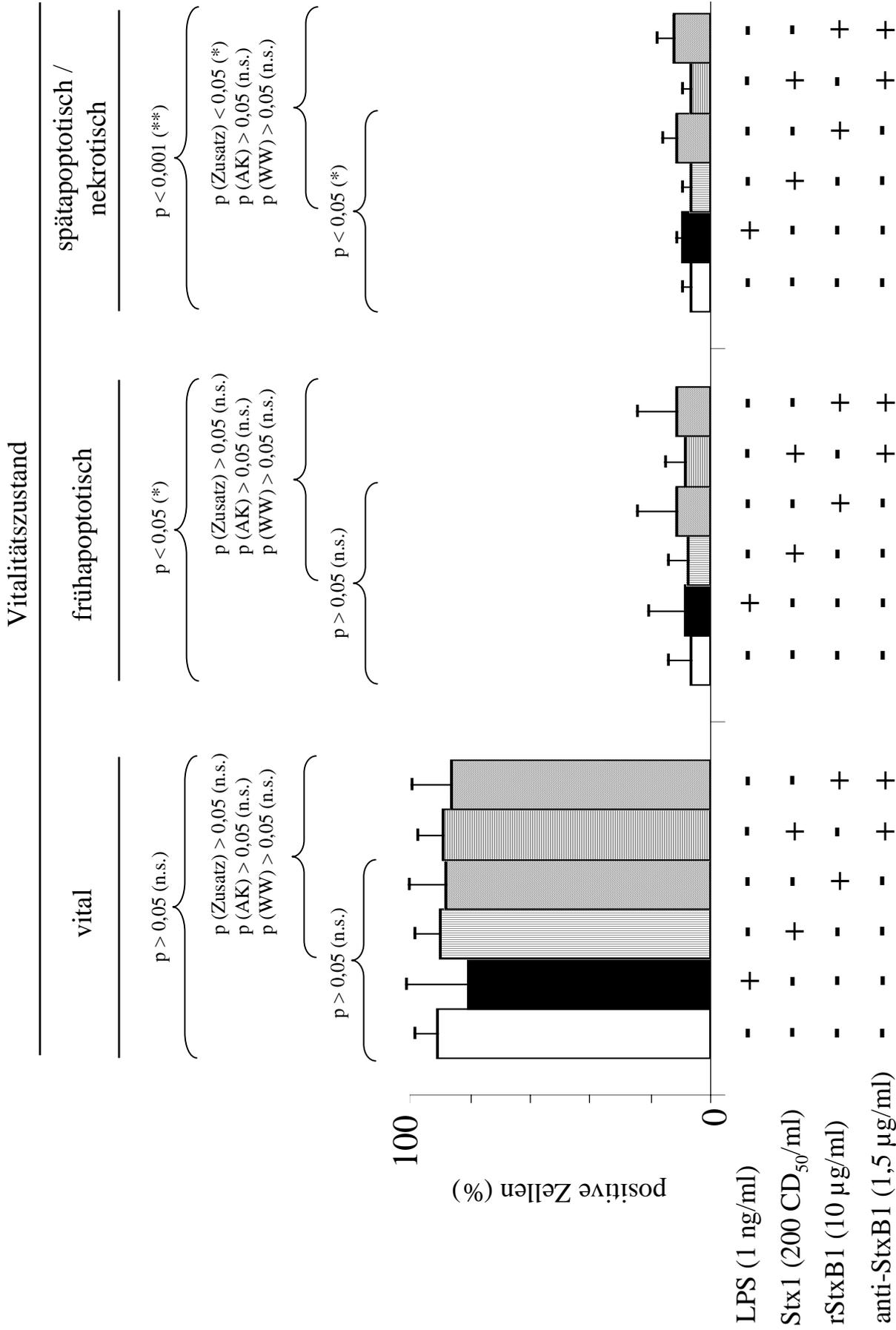
LPS (1 ng/ml)	-	+	-	-	-	-
Stx1 (200 CD <sub>50</sub> /ml)	-	-	+	-	+	-
rStxB1 (10 µg/ml)	-	-	-	+	-	+
anti-StxB1 (1,5 µg/ml)	-	-	-	-	+	+

**Abb. 20:** Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) boviner Granulozyten *in vitro*. Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=5 Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

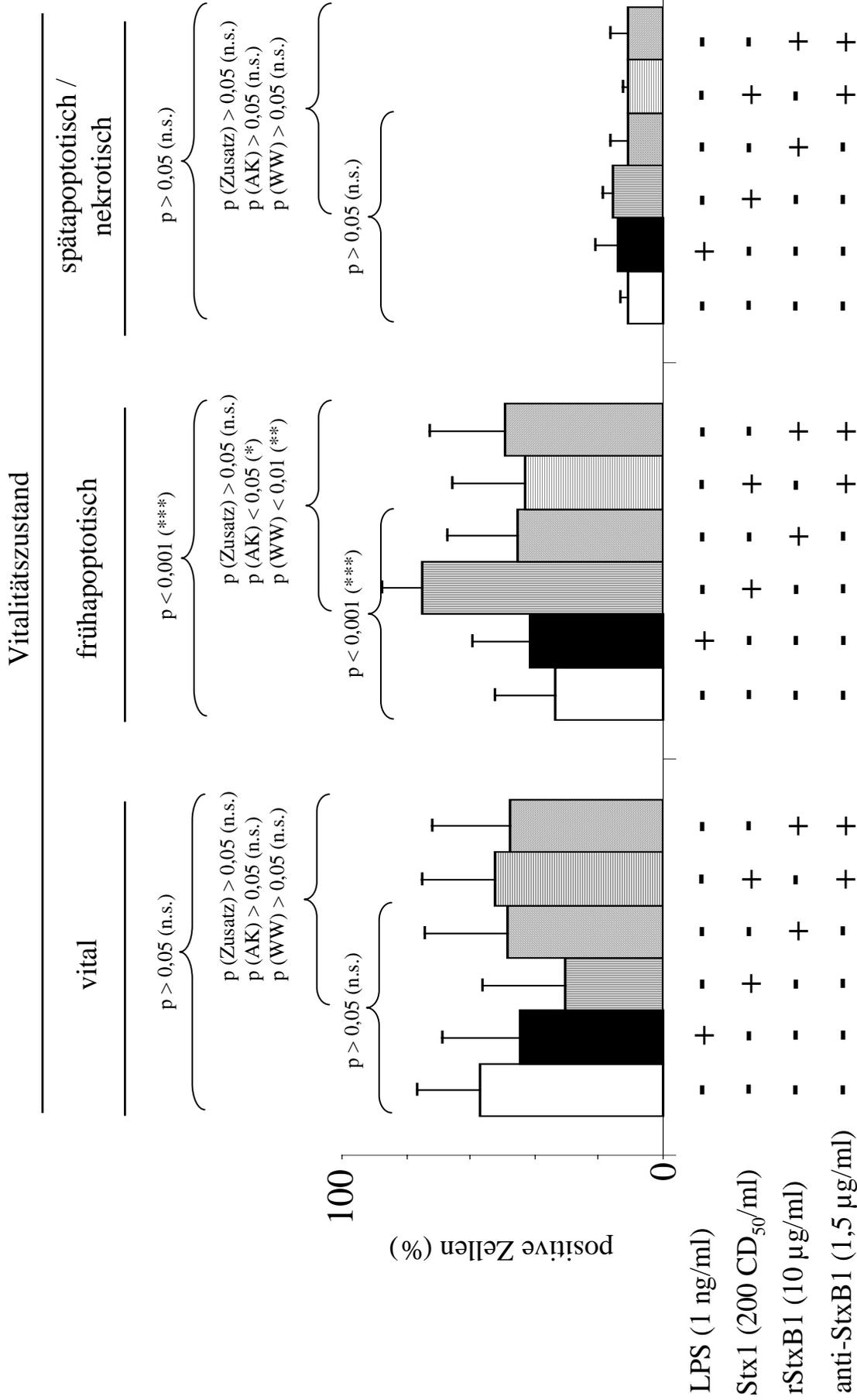
### **3.2.3.2 Ovine Granulozyten**

#### **3.2.3.2.1. Morphologie und Vitalität**

Im Gegensatz zu Rindergranulozyten wurde die Vitalität von Schafgranulozyten durch Stx stark beeinflusst. Nach 18 Stunden Inkubation kam es im Ansatz mit Stx1 zu einem deutlichen, LPS-unabhängigen Anstieg der frühapoptotischen Zellpopulation (Abb. 22). Diese statistisch hoch signifikante Zunahme war weniger stark auch noch bei der Population spätapoptotisch/nekrotischer Zellen zu erkennen. Daraus resultierend war der Anteil vitaler Granulozyten vermindert. Dieser Effekt war Stx1-spezifisch, denn er ließ sich durch den mAk anti-StxB1 neutralisieren. Ein solcher Effekt war bei 0,5 Stunden inkubierten Granulozyten noch nicht feststellbar, sondern trat erst nach einer Stx1-Vorinkubation über mehrere Stunden auf (Abb. 21). Die B-Untereinheit alleine beeinflusste die Vitalität nicht.



**Abb. 21: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität oviner Granulozyten *in vitro*.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=5 Tieren nach 0,5 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

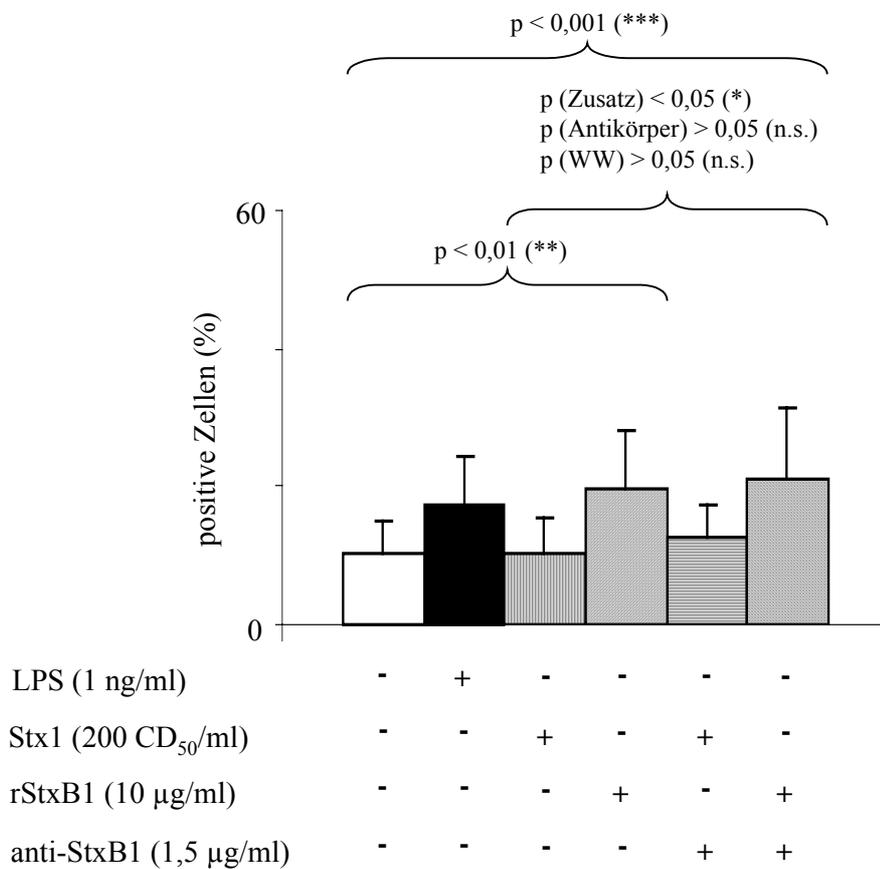


**Abb. 22:** Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität oviner Granulozyten *in vitro*. Durchflusszytometrische Analyse;

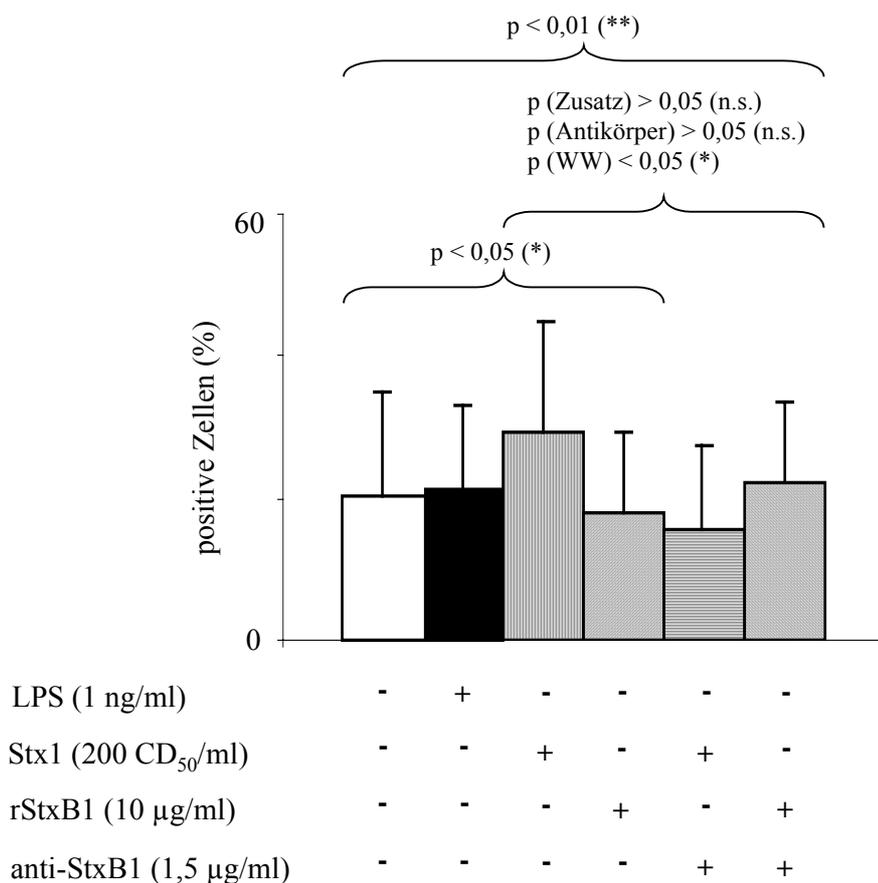
Doppelansätze von  $n=5$  Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.2.3.2.2. Phagozytoseaktivität

Achtzehn Stunden inkubierte Granulozyten zeigten nur im Ansatz mit Stx1-Holotoxin eine erhöhte Phagozytoseaktivität (Abb. 24). Dieser Effekt war erstmals nach mehrstündiger Inkubation der Granulozyten und nicht nach 0,5-stündiger Inkubation nach der Präparation zu beobachten. Auch in diesem Fall lag eine Stx1-Spezifität vor, denn der geschilderte Effekt war durch Zugabe des mAk anti-StxB1 neutralisierbar. Im Gegensatz dazu war bei 0,5 Stunden inkubierten Granulozyten die Phagozytoseaktivität nur in den Ansätzen mit rStxB1 und im Ansatz mit LPS erhöht (Abb. 23).



**Abb. 23: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Phagozytoseaktivität oviner Granulozyten *in vitro*.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von  $n=5$  Tieren nach 0,5 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.



**Abb. 24: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Phagozytoseaktivität oviner Granulozyten *in vitro*.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=5 Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

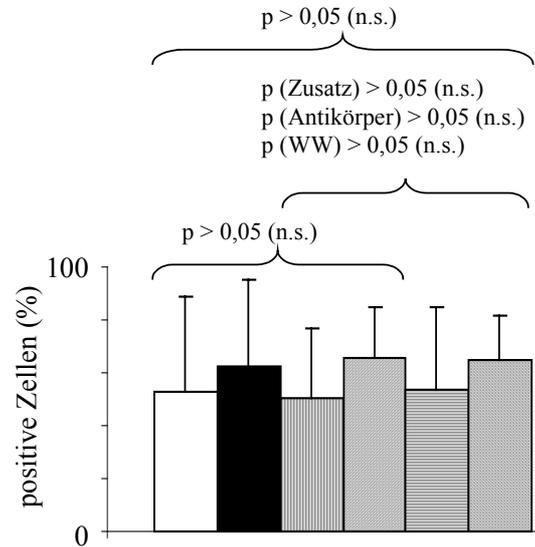
### 3.2.3.2.3. Aktivierbarkeit („oxidative-burst“)

Der Einfluss von Shigatoxin auf die Aktivierbarkeit von Schafgranulozyten war abhängig vom verwendeten Stimulans. Granulozyten, die man mit Stx1 oder rStxB1 vorstimulierte, wurden durch Bakterien stärker aktiviert als Granulozyten in Kontrollansätzen (Abb. 26). Auch LPS führte zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit der Zellen, verglichen mit der Mediumkontrolle. Nach 0,5 Stunden Inkubation trat ein solcher Effekt nur bei den Ansätzen mit rStxB1 und mit LPS auf, nicht aber beim Ansatz mit Stx1 (Abb. 25).

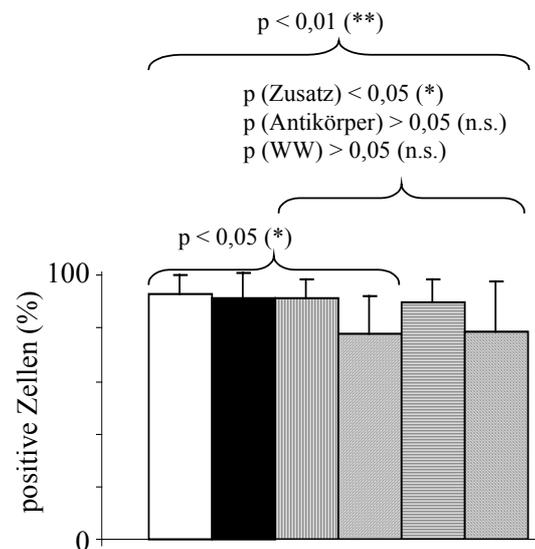
Stimulierte man die Zellen dagegen maximal mit PMA, so ergab sich ein gegenteiliger Effekt. Hier hemmten Shigatoxin und die B-Untereinheit die Aktivierbarkeit der Granulozyten. Diese Veränderungen waren bei den 18 Stunden inkubierten Granulozyten statistisch signifikant zu belegen (Abb. 26). Korrespondierende Ansätze zeigten nach 0,5 Stunden Inkubation lediglich eine

statistisch signifikante Hemmung der Aktivierbarkeit durch die rStxB1 (Abb. 25). Dieser Effekt war allerdings nicht durch anti-StxB1 neutralisierbar.

### Bakterien-induziert



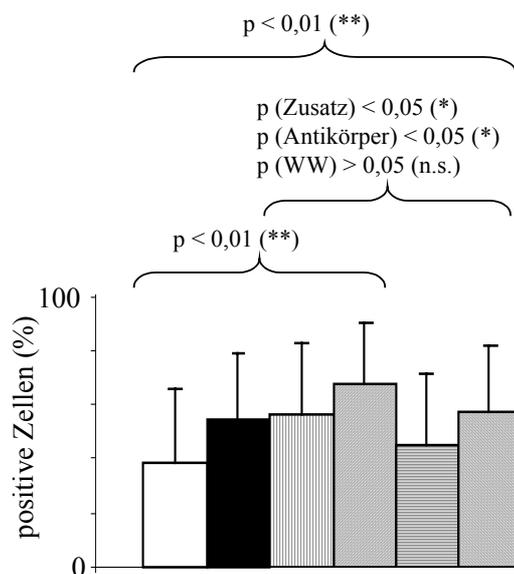
### PMA-induziert



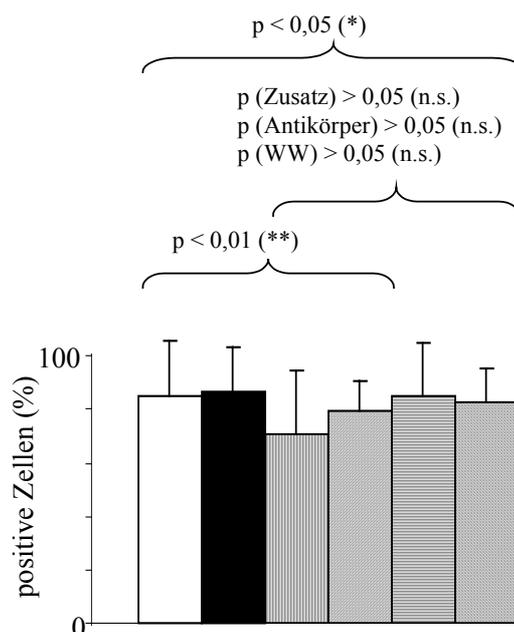
LPS (1 ng/ml)	-	+	-	-	-	-
Stx1 (200 CD <sub>50</sub> /ml)	-	-	+	-	+	-
rStxB1 (10 µg/ml)	-	-	-	+	-	+
anti-StxB1 (1,5 µg/ml)	-	-	-	-	+	+

**Abb. 25: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) oviner Granulozyten *in vitro*.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von jeweils n=5 Tieren nach 0,5 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

## Bakterien-induziert



## PMA-induziert

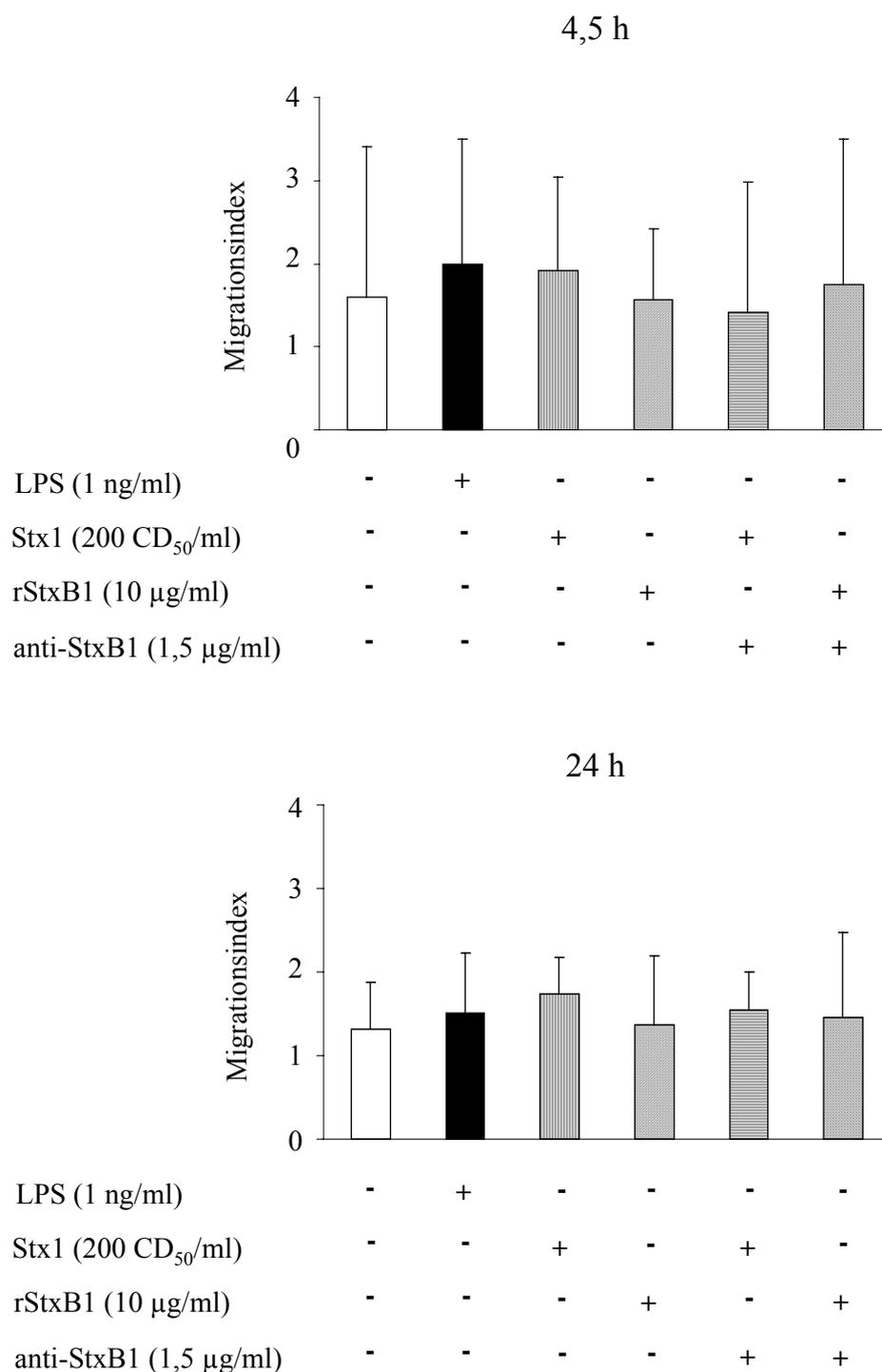


LPS (1 ng/ml)	-	+	-	-	-	-
Stx1 (200 CD <sub>50</sub> /ml)	-	-	+	-	+	-
rStxB1 (10 µg/ml)	-	-	-	+	-	+
anti-StxB1 (1,5 µg/ml)	-	-	-	-	+	+

**Abb. 26: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) oviner Granulozyten *in vitro*.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von jeweils n=5 Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

#### **3.2.3.2.4. Migrationsfähigkeit im Agarosegel**

Granulozyten migrieren aufgrund chemotaktisch wirkender, löslicher Substanzen zu einem Entzündungsort hin. Eine Wirkung von Stx1 und rStxB1 auf diese Fähigkeit der Zellen wurde anhand von Zytokin-haltigen Überständen boviner Lymphoblastenkulturen untersucht. Schafgranulozyten wanderten in einem Agarosegel in Richtung der Zytokin-haltigen Überstände. Trotz großer Standardabweichungen durch die Unterschiede zwischen den getesteten Granulozytenpräparationen war die Migrationsfähigkeit besonders hoch bei Granulozyten, die mit Stx1 kultiviert waren (Abb. 27). Obwohl dieser Effekt nach 4,5 Stunden auch bei Granulozyten im Ansatz mit LPS auftrat, zeigte nach 24 Stunden lediglich der Ansatz mit Stx1 eine erhöhte Migrationsfähigkeit.



**Abb. 27: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Migrationsfähigkeit von Schafgranulozyten in einem Agarosegel.** Migrationsindizes aus Doppelansätzen von n=3 Tieren nach 4,5 und 24 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen; die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet.

### 3.2.3.2.5. Einfluss einer LPS – Kontamination auf die Funktion oviner Granulozyten

Bei der Herstellung der Stx1- und rStxB1-Chargen war es unumgänglich, dass diese durch kleinere Mengen LPS verunreinigt wurden. Um die Stx-Spezifität der gemessenen Effekte in den Funktionalitätstests zu überprüfen, wurde eine Proteinase K-Behandlung von Stx1 und rStxB1 durchgeführt. Die Wirkung der so behandelten Ansätze wurde daraufhin exemplarisch bei Schafgranulozyten untersucht. Dazu diente der durch Bakterien induzierte „oxidative-burst“ nach 18 Stunden Inkubation (Tab. 5).

**Tab. 5:** Einfluss von LPS auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) oviner Granulozyten nach Stimulation durch Bakterien *in vitro*. Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von 3 Tieren nach 18 Stunden Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen; die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet.

Ansatz mit	Schaf „168“		Schaf „o. Nr.“		Schaf „60“	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Medium	43,8	0,4	83,7	2,6	94,6	5,8
LPS	65,5	8,7	88,8	6,4	95,7	2,5
Stx1 unverdaut	45,6	4,0	81,6	15,3	91,3	9,3
Stx1 verdaut	31,4	10,6	59,6	10,4	79,9	26,3
rStxB1 unverdaut	67,0	20,4	85,0	11,9	90,7	7,1
rStxB1 verdaut	28,5	1,5	87,7	10,8	80,7	10,5

MW: arithmetischer Mittelwert

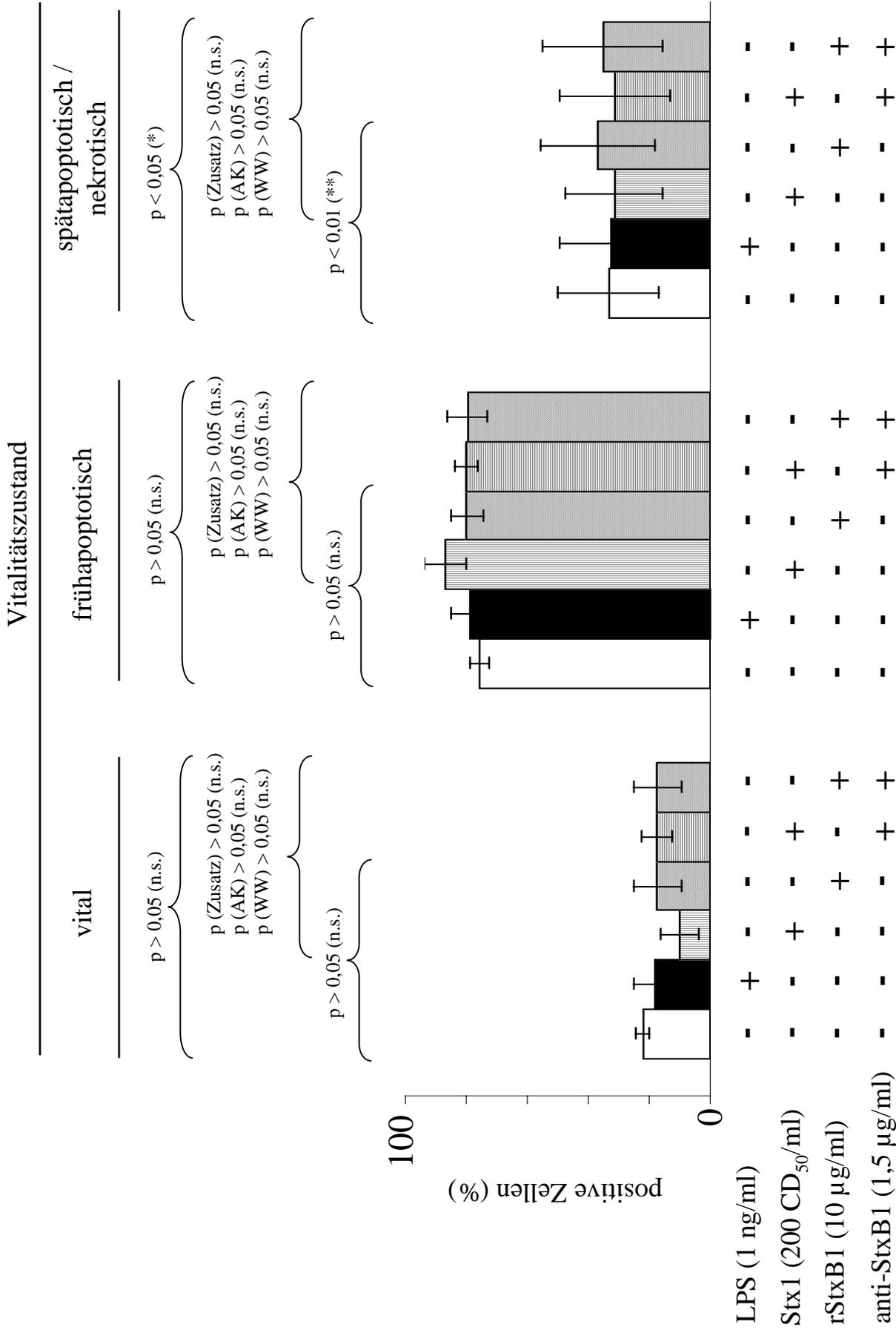
SD: Standardabweichung

Durch einen Verdau der Proteinkomponenten erwartet man einen Verlust der toxinspezifischen biologischen Aktivität im Reaktionsansatz. Allerdings ließ sich der in Kapitel 3.2.3.2.3. aufgezeigte Effekt von Stx1 und rStxB1 im Sinne einer Steigerung der Bakterien-stimulierten Aktivierbarkeit nach 18 Stunden Inkubation (Abb. 26) nur eingeschränkt wiederholen. So führte Stx1 im Ansatz entweder zu keiner oder nur zu einer sehr schwachen Erhöhung der Aktivierbarkeit, und auch die

rStxB1 bewirkte nur bei den Granulozyten eines Tieres eine deutlich gesteigerte Aktivierbarkeit. Zwar bewirkte die Proteinase K-Behandlung von Stx1 in jedem Fall auch eine reduzierte Aktivierbarkeit von Granulozyten verglichen mit dem Ansatz unverdauten Holotoxins. Jedoch zeigt sich ein solcher Effekt nur bei zwei von drei Tieren in Bezug auf die rStxB1.

### **3.2.3.3 Migrierte Granulozyten**

Um eine veränderte Funktionalität transmigrierter Granulozyten zu erfassen, wurde exemplarisch die Vitalität dieser Zellen aus der Milch des Schafes untersucht. Dabei bestätigten sich die Befunde, die an Granulozyten des Blutes beobachtet werden konnten. Stx1-Holotoxin führte zu einer Halbierung der verbliebenen vitalen Granulozyten mit einem entsprechenden Anstieg des Anteils frühapoptotischer Zellen (Abb. 28). Da sich der überwiegende Anteil der Milchgranulozyten in einem frühapoptotischen Zustand befand, war der Effekt statistisch nicht abzusichern. Dennoch scheint dies darauf hinzudeuten, dass auch transmigrierte und auf diese Weise aktivierte Schafgranulozyten empfindlich gegenüber dem Einfluss von Stx1 sind.



**Abb. 28: Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität oviner Granulozyten aus der Milch.** Durchflusszytometrische Analyse; Doppelansätze von n=3 Tieren nach 18 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### **3.2.4. Indirekte Wirkung von Stx1 auf die Migrationsaktivität boviner Granulozyten im Transwell-Filtersystem**

Eine direkte Wirkung von Stx1 auf isolierte bovine Granulozyten ist nicht feststellbar. Bekannt ist, dass Granulozyten *intra vitam* in Schleimhautverbänden als eine Zellpopulation inmitten eines Netzwerkes verschiedener anderer Zellarten vorkommen und mit diesen über Zytokine kommunizieren. Wie im Literaturteil dieser Arbeit ausgeführt, hängt insbesondere die Migration der Granulozyten auf die Schleimhautoberfläche von Faktoren der Epithelzellen (EP), intraepithelialen Lymphozyten (IEL) u.a. ab.

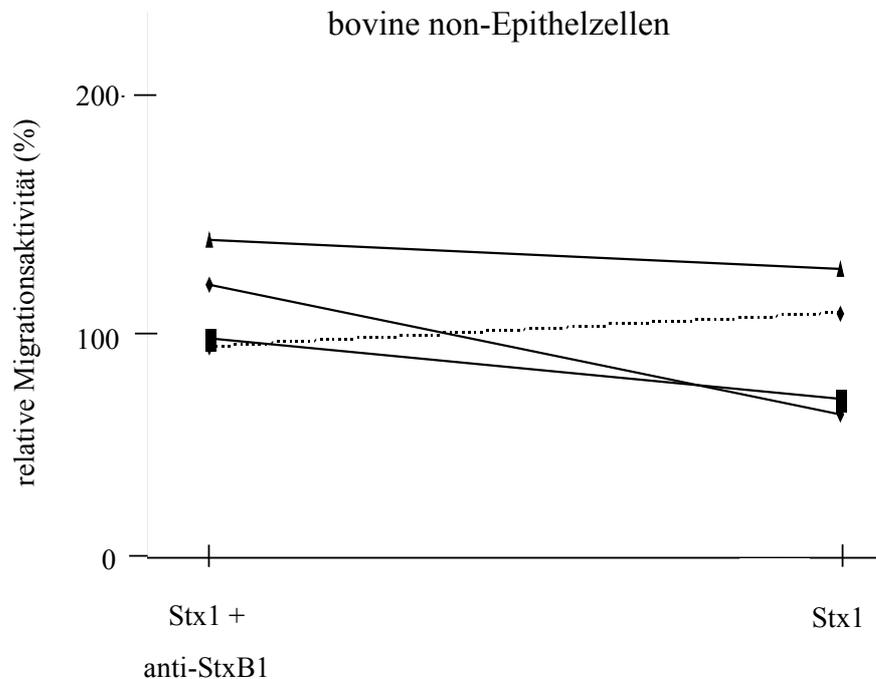
Um festzustellen, ob Stx1 einen indirekten Effekt auf Granulozyten des Rindes hat, wurde deshalb der Einfluss von Überständen unterschiedlicher toxinbehandelter boviner Zellkulturen auf die Migration von Granulozyten geprüft. Für den Nachweis wurde ein sensitiveres Untersuchungsverfahren als in Kapitel 3.2.3.2.4. genutzt, mit dem eine quantitative Aussage der pro Zeiteinheit transmigrierten Granulozyten möglich war. In einem Transwell-Filtereinsatz waren die Granulozyten im oberen Kompartiment durch eine Filtermembran getrennt vom unteren Kompartiment mit den zellfreien Zytokin-haltigen Überständen.

Bei der Etablierung primärer Kolonepithelzellkulturen des Rindes traten neben reinen Epithelzellen auch Zellen auf, deren Charakterisierung zurzeit noch nicht abgeschlossen ist. Zweifelsfrei handelt es sich dabei nicht um Epithelzellen, wie ihre Anfärbbarkeit mit Vimentin, nicht aber mit Zytokeratin beweist (Menge, unveröffentlichte Daten). Diese regelmäßig bei gesunden Rindern vorkommenden Zellen wurden bis zur endgültigen Klärung als bovine non-Epithelzellen bezeichnet. Auch Überstände dieser Kolonzellen wurden im Transwellssystem untersucht. Eine Toxinbehandlung dieser non-Epithelzellen bewirkt offenbar ein heterogenes Zytokinprofil im Überstand, durch das kein einheitlicher Effekt auf die Migrationsfähigkeit boviner Granulozyten ausgeübt wird (Abb. 29).

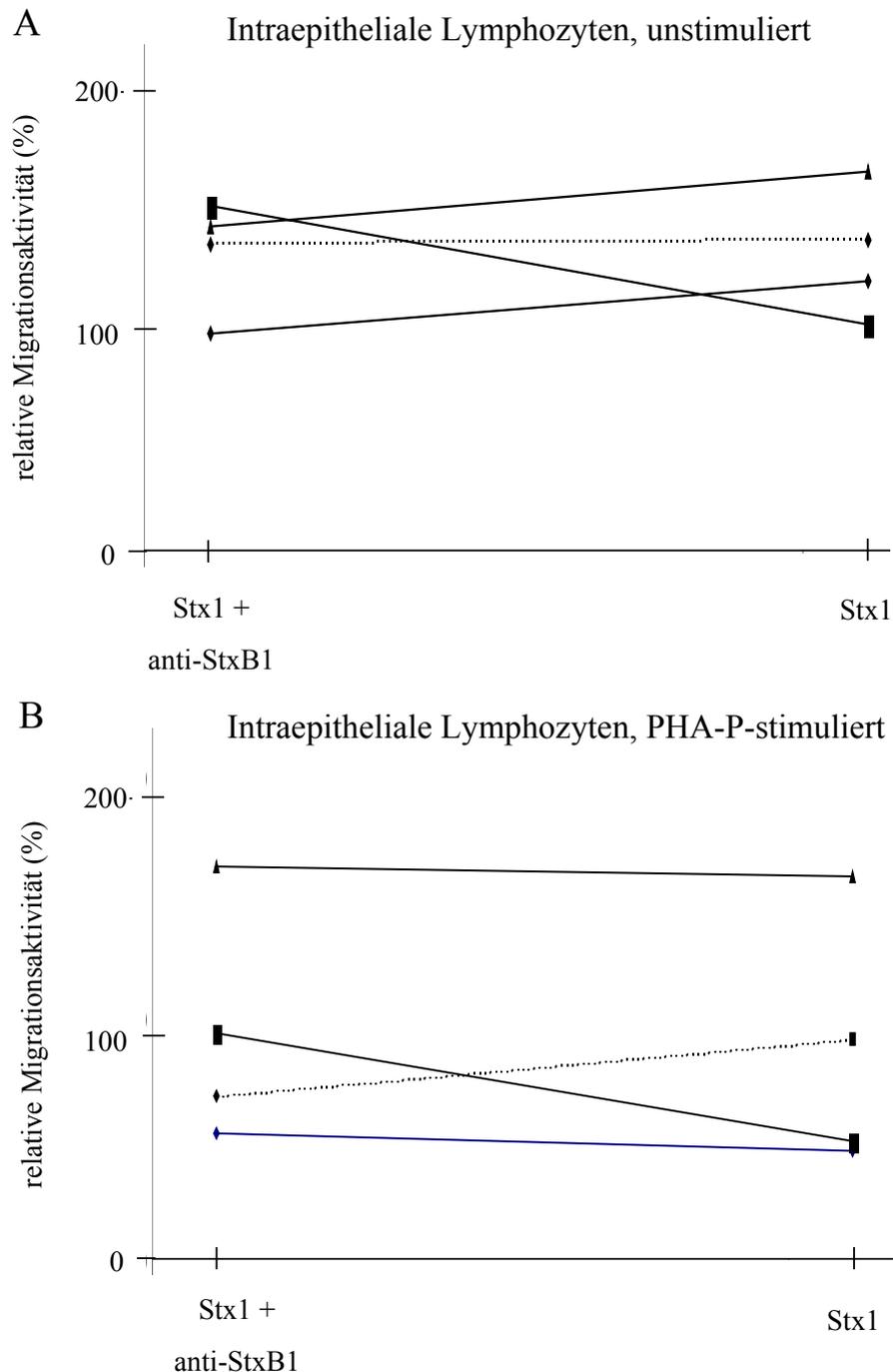
Überstände zweier toxinbehandelter IEL-Kulturen übten ebenfalls einen unterschiedlichen Effekt auf die Migrationsaktivität mehrerer boviner Granulozytenpräparationen aus (Abb. 30 A). Dies war auch dann noch der Fall, wenn die IEL für die Dauer der Toxineinwirkung mit Phytohämagglutinin P (PHA-P) zusätzlich stimuliert wurden (Abb. 30 B).

Im Gegensatz dazu ließ sich bei Überständen primärer boviner Kolonepithelzellen ein einheitlicher Effekt belegen. Diese Zellen gaben in Anwesenheit von Stx1

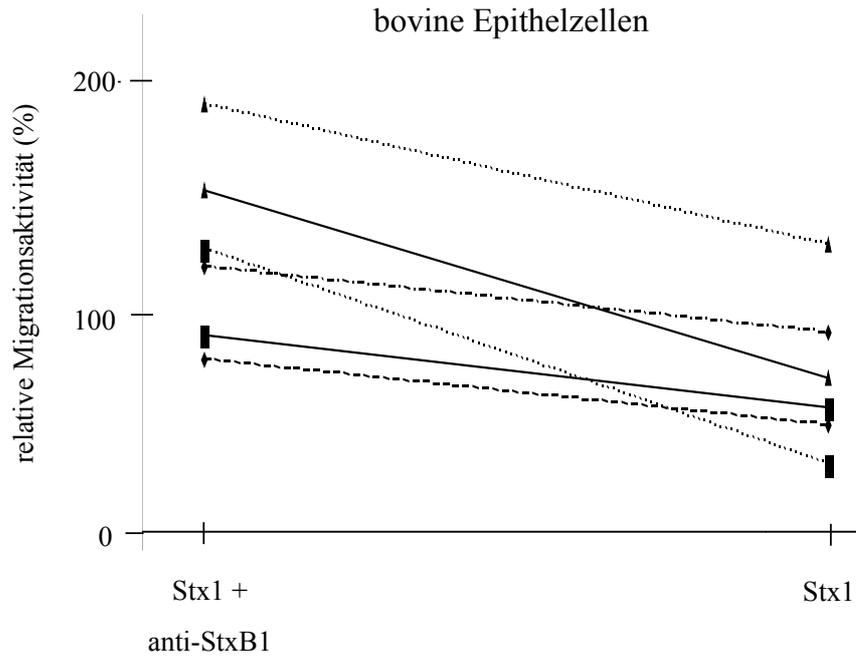
weniger chemotaktisch wirkende Faktoren in den Überstand ab als Zellen, die Stx1 und den neutralisierenden Antikörper anti-StxB1 erhalten hatten (Abb. 31). Dies belegt, dass auch die Granulozytenfunktionen bei der Spezies Rind indirekt durch Stx1 beeinträchtigt werden können.



**Abb. 29: Relative Migrationsaktivität boviner Granulozyten in Anwesenheit von Kulturüberständen boviner non-Epithelzellen aus dem Kolon.** Durchflusszytometrische Zellzählung von Granulozyten aus dem unteren Kompartiment eines Transwell-Filters nach 2 h Inkubation; insgesamt 4 Migrationsexperimente mit Granulozyten von n=3 Tieren (unterschiedliche Symbole bedeuten unterschiedliche Tiere, unterschiedliche Linien stellen unterschiedliche Zellkulturüberstände dar); die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet.



**Abb. 30: Relative Migrationsaktivität boviner Granulozyten in Anwesenheit von Kulturüberständen boviner IEL.** Durchflusszytometrische Zellzählung von Granulozyten aus dem unteren Kompartiment eines Transwell-Filters nach 2 h Inkubation; A. Versuche mit unstimulierten IEL, B. Versuche mit PHA-P-stimulierten IEL; jeweils insgesamt 4 Migrationsexperimente mit Granulozyten von n=3 Tieren (unterschiedliche Symbole bedeuten unterschiedliche Tiere, unterschiedliche Linien stellen unterschiedliche Zellkulturüberstände dar); die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet.



**Abb. 31: Relative Migrationsaktivität boviner Granulozyten in Anwesenheit von Kulturüberständen boviner Kolonepithelzellen.**

Durchflusszytometrische Zellzählung von Granulozyten aus dem unteren Kompartiment eines Transwell-Filters nach 2 h Inkubation; insgesamt 6 Migrationsexperimente mit Granulozyten von n=3 Tieren (unterschiedliche Symbole bedeuten unterschiedliche Tiere, unterschiedliche Linien stellen unterschiedliche Zellkulturüberstände dar); die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet.

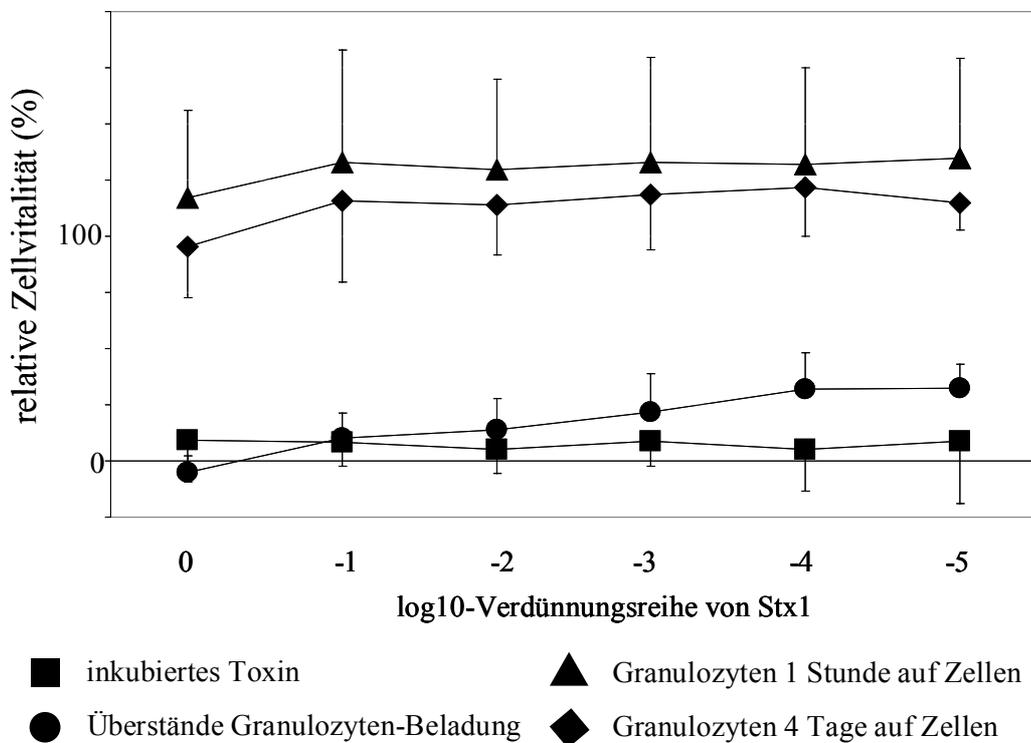
### 3.2.5. Untersuchungen zum Transfer von auf Granulozyten gebundenem Shigatoxin 1 auf Zellkulturen

Beim Menschen scheint Shigatoxin nicht nur intravasal von Granulozyten gebunden und transportiert, sondern in empfindlichen Geweben wie der Niere auch wieder abgegeben zu werden (303). Dieser für die Pathogenese der humanen STEC-Infektion wichtige Mechanismus führt im Umkehrschluss zu der Frage, ob das Fehlen toxämisch bedingter Erkrankungen beim Wiederkäuer auch mit dessen Granulozyten in Zusammenhang steht.

Um einen Toxintransfer beim Wiederkäuer zu simulieren, wurden Versuche mit Schaf- und Rindergranulozyten durchgeführt. Das Nachweissystem stellte die Überlebensrate von Verozellen dar, die als Nierenzellen bekannt für ihre hohe Toxinempfindlichkeit sind. Mit Stx1 vorinkubierte und auf diese Weise Stx-beladene Rinder- und Schafgranulozyten wurden dazu auf Verozellen überführt. Bei einem

Teil der Ansätze wurden die Granulozyten nach einer Stunde wieder entfernt, in anderen Ansätzen blieben sie bis zum Versuchsende (nach 4 Tagen) auf den Verozellen. Zu Kontrollzwecken wurde zusätzlich je ein Vergleichsansatz mit vorinkubiertem Shigatoxin mitgeführt. Außerdem wurde das zurückgewonnene, zellfreie, Stx1-haltige Medium aus der Toxinbeladung der Granulozyten rücktitriert, um die von den Zellen gebundene Toxinmenge quantifizieren zu können.

Wie aus der Abbildung 32 ersichtlich ist, kann beim Rind eine Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit von Verozellen durch die Granulozyten weder bei einer Stunde noch bei 4 Tage inkubierten Granulozyten beobachtet werden.

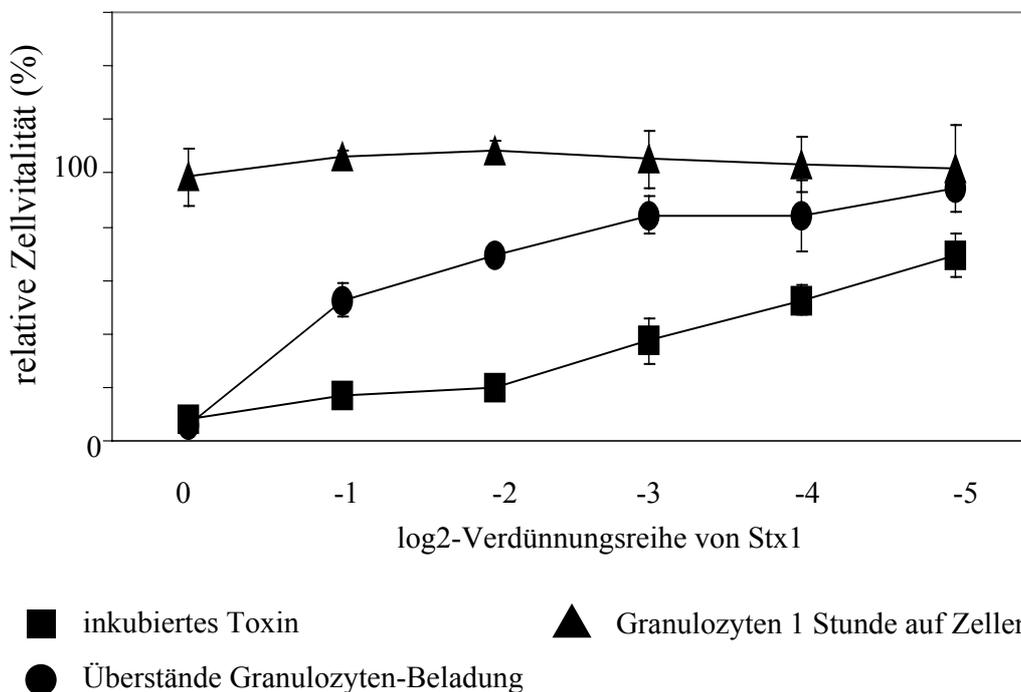


**Abb. 32: Versuch der Übertragung von Stx1 durch bovine Granulozyten auf empfängliche Verozellen *in vitro*.** Vierfachansätze von n=4 Tieren; angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Abbildung 33 zeigt den analogen Versuch mit Granulozyten eines Schafes. Eine Stunde auf Verozellen inkubierte, Stx-beladene Granulozyten verursachen keine Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit von Verozellen. Die Kurve der Überstände aus der Granulozyten-Beladung verläuft mehr oder weniger sigmoid, allerdings nicht deckungsgleich mit der Stx1-Kontrollkurve. Letztere schneidet die 50 Prozent-Marke drei log-Stufen vor der Kurve der Stx1-haltigen Überstände. Dies bedeutet, dass

weniger Toxin im Überstand der Granulozyten-Beladung verblieben ist, weil ein Teil des Shigatoxins von den Schafgranulozyten gebunden wurde.

Vier Tage auf Verozellen inkubierte, Stx-beladene Granulozyten beeinträchtigten die Zellvitalität von Verozellen (Kurve nicht gezeigt). Die Kurve für die Überlebensfähigkeit der Verozellen sank hierbei auf 50 Prozent ab, verlief allerdings eher geradlinig und nicht sigmoid. Dies impliziert, dass ein solcher in allen Titrationsstufen konstanter Effekt durch den Zerfall von Granulozyten und nicht durch das Stx1 zustande kommt.



**Abb. 33: Versuch der Übertragung von Stx1 durch ovine Granulozyten auf empfängliche Verozellen *in vitro*.** Darstellung eines repräsentativen Versuchs eines Schafes (n=6); angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Vierfachansätzen.

### 3.2.6. Untersuchungen zum Antikörperstatus der verwendeten Schafe

Im Gegensatz zum Menschen sind Antikörper gegen Shigatoxine beim Rind häufig nachgewiesen worden (290). Sie gelten als indirekter Nachweis für einen Antigenkontakt. In dieser Arbeit wurden auch die Plasmen der als Blutspender verwendeten 15 Schafe auf ihren Antikörperstatus im Zytotoxizitätstest analysiert. Bei sieben Tieren (46,7 %) gelang ein Nachweis von Stx1-neutralisierenden

Antikörpern mit  $> 1$  NE/ml (Kap. 3.1.5.7.). Weitere acht Tiere (53,3 %) wurden als negativ ( $< 1$  NE/ml) beurteilt. Eine Altersabhängigkeit in der Neutralisationskraft der Plasmaproben, wie sie von Stamm (290) beschrieben wurde, ließ sich bei diesen Schafen nicht nachweisen. So war das Durchschnittsalter der acht negativ getesteten Tiere mit 5,89 Jahren höher als das der Tiere mit Plasmen  $> 1$  NE/ml (3,88 Jahre). Das Durchschnittsalter aller Schafe lag bei 4,95 Jahre. Einen Überblick über die Neutralisationsfähigkeit der Plasmaproben gibt Tabelle 6.

**Tab. 6:**        **Stx1-neutralisierende Wirkung in Plasmaproben von Schafen.**  
Messung mittels MTT-Test nach viertägiger Inkubation von Dreifachansätzen; die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet.

Neutralisationsfähigkeit (NE/ml) <sup>1</sup>	Anzahl der Schafe	durchschnittliches Alter (Jahre)
$< 1$	8	$5,89 \pm 3,67$
$1 \leq x < 1,5$	2	$2,71 \pm 0,18$
$1,5 \leq x < 2$	2	$7,5 \pm 0,48$
$2 \leq x < 2,5$	3	$2,25 \pm 0,58$
$\geq 2,5$	0	-

<sup>1</sup> bestimmt für 1:10 verdünnte Plasmaproben

## 4. Diskussion

Granulozyten spielen in der Pathogenese der STEC-bedingten Erkrankungen des Menschen eine große Rolle. So werden Granulozyten durch die Shigatoxine (Stx) aktiviert und verstärken den Gewebeschaden bei der hämorrhagischen Kolitis (154). Außerdem transportieren Granulozyten die Shigatoxine im Blut vom Darm zu anderen Organen und führen so z.B. zu Nierenschäden beim hämolytisch-urämischem Syndrom (303). Bei Wiederkäuern, dem biologischen Reservoir der STEC, führt die Infektion dagegen nur in den seltensten Fällen zu Erkrankungen, sondern zeichnet sich besonders durch ihre Persistenz aus (46, 48, 93). Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß Stx1 in der Lage ist, die spezifische Immunabwehr im Kolonisationsbereich der STEC an der bovinen Darmschleimhaut zu modulieren und möglicherweise dadurch der Persistenz der Infektion Vorschub zu leisten (23, 193-195, 291). Da Granulozyten ein wichtiger Bestandteil der Schleimhautabwehr bei bakteriellen Infektionen sind (297), wurde zur Überprüfung dieser Hypothese in dieser Arbeit erstmals anhand von Granulozyten-Primärkulturen untersucht, ob und in welcher Art Stx1 auf Granulozyten von Wiederkäuern wirken kann. Dabei war es nahe liegend, mit Zellen zu arbeiten, die aus dem Darm präpariert wurden. Während jedoch die Präparation von intraepithelialen Lymphozyten aus dem Darm mit sich daran anschließender Stimulation routinemäßig gelingt (23), erfahren auf diese Weise präparierte Granulozyten eine das Ergebnis störende Aktivierung. Eine ebensolche Aktivierung ist auch bei der Aufreinigung aus dem Blut mittels MACS ("magnet-activated-cell-sorting") oder Durchflusszytometer ("fluorescence-activated-cell-sorting") zu erwarten. Die Aufreinigung der Granulozyten aus dem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation stellt jedoch einen Kompromiss dar, bei dem die schonende Gewinnung und die daraus resultierende geringst mögliche Aktivierung dieser empfindlichen Zellen am besten gewahrt sind. Um den *in-vivo*-Verhältnissen etwas näher zu kommen, wurden für Fragestellungen zur Aktivierung auch Granulozyten aus der Milch untersucht, die *intra vitam* eine gesicherte Transmigration durch eine Endothelzell-, Basalmembran- und Epithelzellschicht durchlaufen und so eine putative Aktivierung erfahren haben.

Die Untersuchungen an Granulozyten aus Blut und Milch von großen und kleinen Wiederkäuern zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Spezies auf. So wurde beim Schaf und auch bei der Ziege der Stx-Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77 auf Granulozyten nachgewiesen, was die Möglichkeit einer direkten Wirkung des Toxins auf diese Zellen impliziert. Sowohl Stx1 als auch die rekombinante B-Untereinheit (rStxB1) banden spezifisch auf der Oberfläche

oviner Granulozyten. Stx1 wirkte auf die gemessenen Funktionalitätsparameter der Zellen insbesondere in Form einer Beschleunigung der Apoptose. Darüber hinaus zeigte es sich, dass einmal an Schafgranulozyten gebundenes Stx1 nicht wieder von diesen abgegeben wird. Möglicherweise stellt dieser Mechanismus eine wichtige Kontrollfunktion dar, mit dem die Menge freien Shigatoxins im Darm des Schafes limitiert und damit Toxin-bedingte Schäden verhindert werden. Dagegen konnte beim Rind kein Gb<sub>3</sub>/CD77 oder eine andere rStxB1-bindende Struktur auf Granulozyten identifiziert werden. Entsprechend waren die Zellen des Rindes refraktär gegenüber einer direkten Wirkung von Stx1. Allerdings ergab sich ein indirekter Effekt des Stx1 in Transmigrationsstudien, nämlich es wurde die Chemokinfreisetzung aus bovinen Kolonepithelzellen reduziert. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Granulozyten könnte somit bei STEC-Infektionen der Wiederkäuer eine große Bedeutung für den Verlauf der Infektion haben. Die deutlichen Unterschiede offenbaren aber auch eine bislang unterschätzte Heterogenität der STEC/Wirts-Interaktionen bei verschiedenen Wiederkäuerspezies, die bislang gleichermaßen als STEC-Reservoir angesehen wurden.

Unter den Spezies, die natürlicherweise mit STEC infiziert werden, stellen Schaf und Ziege offensichtlich eine Besonderheit dar, da nur ovine und caprine Granulozyten hochaffine Stx-Rezeptoren besitzen. Bei nahezu allen Blutgranulozyten dieser Tiere war ohne vorherige Stimulation eine Bindung des CD77-Antikörpers mit sehr hoher relativer Fluoreszenzintensität nachweisbar. Dies bedeutet, dass die Anzahl der pro Einzelzelle exprimierten Gb<sub>3</sub>/CD77-Moleküle sehr hoch ist. Die biochemische Analyse des Antigens auf Schaf- und Ziegengranulozyten, das von dem gegen humanes CD77 gerichteten Antikörper erkannt wird, steht noch aus. Klon 38.13 reagiert aber spezifisch mit der terminalen Galabiose des Gb<sub>3</sub> auf humanen (326) und bovinen Zellen (190, 290). Es ist daher unwahrscheinlich, dass sich ovines und caprines CD77 von Gb<sub>3</sub> unterscheidet. Außerdem banden Schaf- und Ziegengranulozyten rStxB1 ebenfalls. Konkurrenzexperimente an Schafgranulozyten mit dem CD77-Antikörper und rStxB1 zeigten, dass mit steigender Konzentration der rStxB1 die Bindung des CD77-Antikörpers vollständig gehemmt wurde. Dies spricht dafür, dass Stx1 bei Schafgranulozyten an den klassischen Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77 bindet. Mit analogen Konkurrenzstudien mit bovinen Lymphozyten konnten in früheren Studien mindestens drei verschiedene Isoformen von Gb<sub>3</sub> detektiert werden (291). Gb<sub>3</sub>-Moleküle auf Schafgranulozyten erschienen dagegen als eine homogene Klasse von Rezeptoren mit hoher Affinität für rStxB1. Dafür spricht, dass die Reihenfolge, mit der die Liganden zu den

Granulozyten gegeben wurden, keinen Einfluss auf den CD77-Nachweis hatte. Der CD77-Antikörper wurde bei steigender Konzentration der rStxB1 offenbar wieder von seinem Rezeptor verdrängt. Bei humanen Granulozyten ist dagegen ein Stx-Rezeptor nachgewiesen worden, der sich von Gb<sub>3</sub>/CD77 unterscheidet und durch eine niedrigere Affinität auszeichnet (303). Aufgrund der Tatsache, dass rStxB1 in wesentlich höherer Konzentration zur Verfügung stand, wurde für Bindungsstudien dieser Arbeit vornehmlich rStxB1 und nicht das Stx1-Holotoxin verwendet. Vermutlich aufgrund der niedrigeren Konzentration lag bei durchflusszytometrischen Untersuchungen der Prozentsatz positiver Zellen für den Nachweis der Holotoxinbindung deutlich unter dem Prozentsatz des Nachweises der Bindung der B-Untereinheit. Dieser Versuch, wie auch die Reduktion von freiem Stx1 in Überständen oviner Granulozyten, belegt aber das grundsätzliche Vermögen oviner Granulozyten auch Stx1-Holotoxin zu binden.

Nicht nur die Rezeptorstruktur, sondern auch das durch den Rezeptor vermittelte Signal scheint sich bei den Granulozyten von Schaf und Mensch zu unterscheiden. King *et al.* konnten die Aktivierbarkeit PMA-stimulierter humaner Granulozyten nicht nur durch Zugabe von Stx1 hemmen, sondern auch durch enzymatisch inaktives StxB1 (154). Andererseits gelang Liu *et al.* der Nachweis, dass der Apoptose-hemmende Effekt von Stx2 auf humane Granulozyten durch die Anwendung eines Proteinkinase-Inhibitors aufgehoben werden kann (171). Beide Sachverhalte deuten auf einen oberflächlichen Stx-Rezeptor hin, durch dessen Bindung eine intrazelluläre Signalkaskade initiiert wird. In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele, dass nicht nur Stx1, sondern auch StxB1 über die reine Bindung an zelluläre Rezeptoren hinaus eine Wirkung entfalten kann (153, 154, 170, 177, 314). Ein apoptotischer Effekt wurde bereits häufiger nach Bindung eines Liganden an Gb<sub>3</sub>/CD77 beschrieben (7, 131, 177, 205, 229), scheint aber nicht in jedem Fall aufzutreten (125, 327). Während bei Mangeney *et al.* (1993) (177) eine Induktion von Apoptose beim Burkitts-Lymphom durch Stx-Holotoxin und rStxB1 auszulösen war, fanden andere Autoren Hinweise für apoptotische Wirkungen der solitären StxB (7, 131, 205, 229). Offenbar leitet die Internalisierung des StxB1-Rezeptor-Komplexes den Signaltransduktionsweg zur Auslösung von Apoptose bei Zellen des Menschen ein (328). Dies untermauerten auch Nakagawa *et al.* (205), indem sie in mit *stxb1* transfizierten HeLa-Zellen eine Aktivierung der Kaspasen 1 und 3 im Zytoplasma ausschließlich durch die intrazellulär vorliegende StxB1 nachwiesen. Offenbar existiert ein solcher Mechanismus bei Schafgranulozyten nicht, denn bei diesen wird nur durch Stx1, nicht aber durch rStxB1 Apoptose ausgelöst. Der Effekt von Stx1 auf ovine Granulozyten setzt

somit wahrscheinlich eine Gb<sub>3</sub>/CD77-vermittelte Endozytose des Holotoxins und eine enzymatische Inaktivierung der Ribosomen durch Stx1 voraus.

Im deutlichen Gegensatz zu den Granulozyten der kleinen Wiederkäuer können bovine Granulozyten kein Stx1 binden. Bekannt ist eine Induktion des Rezeptors auf bovinen Lymphozyten nach Kultivierung und mitogener Stimulation der Zellen (194, 291). Diese Stimulation zur Rezeptorexpression betrifft Lymphozyten in einem Übergangsstadium zur Apoptose. Zu diesem Zeitpunkt tritt auch eine Subpopulation dieser Zellen auf, die zwar negativ für den Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 sind, aber dennoch rStxB1 binden können (291). Allerdings exprimieren Granulozyten adulter Rinder sowie Kälber auch nach deren Inkulturnahme und Stimulation mit LPS-Konzentrationen von bis zu 100 ng/ml kein Gb<sub>3</sub>/CD77 und binden auch rStxB1 nicht. Auch die Migration boviner Granulozyten über die Blut-Milch-Schranke, welche bekanntermaßen granulozytäre Zellfunktionen beeinflussen kann (288), führt nicht zur Expression von Gb<sub>3</sub>/CD77. Die Expression funktionaler Stx1-Rezeptoren durch bovine Granulozyten kann deshalb auch im Bereich der intestinalen Mukosa mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden.

Bei der Pathogenese humaner STEC-bedingter intestinaler Erkrankungen wird den Granulozyten deshalb eine bedeutende Rolle zugeschrieben, weil Stx eine verstärkte Bildung von Sauerstoffmetaboliten (ROS) in diesen Zellen auslöst (154), gleichzeitig aber die Apoptose verzögert (171). Außerdem vermag Stx eine Reihe von Chemokinen in intestinalen Epithelzellen zu induzieren (308), die zu einer verstärkten Granulozyten-Transmigration und Stx-Translokation durch diese Zellschicht beitragen (122). Bei den untersuchten Granulozyten des Rindes beeinträchtigte Stx1 weder die Vitalität noch beeinflusste es weitere Zellfunktionen. Dies könnte die klinische Inapparenz der STEC-Infektion bei erwachsenen Rindern erklären. Allerdings ist die Darmschleimhaut ein hochkompliziertes Netzwerk verschiedener Zelltypen. Nur die ausgewogene Interaktion dieser Zellen untereinander über Zell-Zell-Interaktionen und lösliche Faktoren garantiert die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase (80). Es musste deshalb geklärt werden, ob Stx1 eventuell indirekt über die aus den umgebenden Zellen freigesetzten Chemokine die Granulozytenfunktionen beim Rind beeinflusst. Nahe liegend war hierbei eine Untersuchung von allogenen Zelltypen, die auch tatsächlich am Infektionsort mit Stx1 in Kontakt kommen könnten. Experimente zur Migrationsaktivität von Rindergranulozyten wurden daher mit Überständen Stx1-behandelter boviner Epithelzellen, boviner intraepithelialer Lymphozyten (IEL) sowie nicht-epithelialer Zellen intestinalen Ursprungs (bovine „non-Epithelzellen“) durchgeführt. Die

Untersuchungen mit bovinen IEL-Überständen zeigten unstimuliert, aber auch nach Stimulation mit dem Mitogen PHA-P keine einheitliche Wirkung von Stx1, obwohl Blessenohl (23, 24) zeigen konnte, dass Stx1 bei bovinen IEL-Kulturen eine verstärkte IL-4-Transkription bei gleichzeitig reduzierter IL-8-Transkription induziert. Diese Unterschiede erklären sich wahrscheinlich durch die Tatsache, dass der Nachweis von mRNA nicht mit der Menge eines tatsächlich vorhandenen Proteins korreliert sein muß. Auch erfasst dieser Migrationstest nicht die solitäre Wirkung von IL-8 auf die Migrationsaktivität, sondern die gesamte Wirkung einer Mischung verschiedenartiger Chemokine. Die Überstände boviner non-Epithelzellen, die vermutlich eine sehr heterogene Zusammensetzung unterschiedlicher Zelltypen aufweisen, konnten ebenfalls keinen einheitlichen Toxin-spezifischen Einfluss induzieren. Im Gegensatz dazu führten sämtliche Experimente mit bovinen Epithelzellen zu demselben Ergebnis: bovine Granulozyten zeigten eine reduzierte Migrationsaktivität, wenn sie mit Überständen inkubiert wurden, die von Stx1-behandelten Epithelzellen transferiert worden waren. Damit ist zum ersten Mal belegt, dass bovine Darmepithelzellen nicht nur den Stx-Rezeptor exprimieren (110), sondern dass sie auch auf Stx1 reagieren können. Im Gegensatz zum Menschen scheinen bovine Epithelzellen auf das Stx jedoch eher mit einer Reduktion als mit einer Induktion (308) der Chemokinfreisetzung zu reagieren. Gründe für diese Unterschiede könnten auf einen unterschiedlichen Signaltransduktionsweg des Gb<sub>3</sub>/CD77-Moleküls auf der Zelloberfläche der Epithelzellen zurückzuführen sein. Die dem zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Die von Thorpe *et al.* (308, 330) nachgewiesene verstärkte Sekretion von IL-8 sowie weiterer C-X-C-Chemokine bei humanen Epithelzellen bedurfte der N-Glykosidaseaktivität des Stx. Auf der anderen Seite erfolgte die Bindung uropathogener *E. coli* P-Fimbrien-vermittelt über Gb<sub>3</sub>, was in Epithelzellen über die intrazelluläre Formation von Zeramid-I-phosphat zur Aktivierung einer Serin-Threonin-Kinase führt (106, 107). Von den durch Stx1 veränderten Chemokinspiegeln am Ort der intestinalen STEC-Infektion könnte nicht nur die Transmigration an sich, sondern auch andere Zellfunktionen der Granulozyten betroffen sein. So verzögerte IL-8 z.B. die Apoptose humaner Granulozyten (151) und erhöhte die Freisetzung von alkalischer Phosphatase aus bovinen Neutrophilen (85). Allerdings berichteten Stevens *et al.* (292), dass weder Stx1 noch Intimin oder Tir die Einwanderung von Granulozyten im bovinen „ileal-loop“-Test beeinflussen. Dies deutet darauf hin, dass die STEC zumindest beim Kalb eine intestinale Entzündungsreaktion durch einen Stx1- oder A/E-Läsions-unabhängigen Mechanismus induzieren können. Eine Extrapolation der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit auf die Situation im „ileal-loop“-

Test ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da sich Granulozyten von Kälbern in den ersten Lebenstagen funktionell deutlich von den Granulozyten älterer Tiere unterscheiden, wie Menge *et al.* in Abhängigkeit von der Kolostrumaufnahme belegen konnte (191). Zumindest beim adulten Rind scheinen allerdings Mechanismen zu bestehen, die eine reduzierte Transmigration von Granulozyten durch die Darmschleimhaut hin zu den adhärenen STEC-Mikrokolonien nach sich ziehen. Da adhärenente *E. coli* luminal von transmigrierten Granulozyten phagozytiert werden (297), könnte eine auf diese Weise behinderte Wirtsabwehr die STEC-Mikrokolonien vor einem Angriff des unspezifischen Immunsystems schützen und so der Persistenz der bovinen STEC-Infektion Vorschub leisten.

Auch beim Schaf korreliert die Stx-Bildung mit der Fähigkeit der STEC, persistente Infektionen auszulösen (46). Der Nachweis funktioneller Stx1-Rezeptoren auf ovinen Granulozyten legt deshalb nahe, dass Stx1 beim Schaf sogar in der Lage ist, die lokale unspezifische Infektabwehr durch direkte Interaktion mit den Effektorzellen zu unterdrücken. Da sich auch das Schaf vom Menschen durch das Fehlen Stx-induzierter Krankheitserscheinungen unterscheidet, müßte sich allerdings die Qualität oder Quantität der hier durch Stx1 ausgelösten Effekte von denen beim Menschen unterscheiden. Aus der Literatur ist bekannt, dass humane Granulozyten in Anwesenheit von Stx1 in ihrer Phagozytoseaktivität sowie der Aktivierbarkeit durch PMA abgeschwächt sind (154). Zumindest in Bezug auf die Phagozytoseaktivität zeigten Schafgranulozyten einen gegenteiligen Effekt. Für die Messung der Phagozytoseaktivität wurden zwar opsonisierte Bakterien verwendet, es erwies sich jedoch als notwendig, die Granulozyten zuvor zusätzlich in verdünntem autologen Plasma zu resuspendieren. Auf diese Weise kombinieren sich aber wie auch bei Messungen im Vollblut eine intrinsische phagozytotische Kapazität des Granulozyten mit der opsonisierenden Aktivität des Plasmas (289). Die Höhe der daraus resultierenden Gesamtaktivität der Phagozytose kann dadurch von Messungen abweichen, die nur die granulozytäre intrinsische Komponente berücksichtigen. Hinsichtlich der Hemmung der granulozytären Aktivierbarkeit bei PMA als Stimulans bestätigten sich beim Schaf in den Ansätzen mit Stx1 und rStxB1 die Befunde von King *et al.* für humane Granulozyten (154). Wurden dagegen Bakterien als Stimulans eingesetzt, so steigerten diese in den Ansätzen mit Stx1 und rStxB1 die Aktivierbarkeit. Unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulans scheinen sich durch verschiedene Signaltransduktionswege innerhalb der Granulozyten zu ergeben. Während die Phagozytose die Voraussetzung für die Aktivierung durch Bakterien ist, führt PMA über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu

einer Aktivierung der granulozytären NADPH-Oxidase (135). Schließlich wird mit den für diese Arbeit verwendeten Verfahren zur Bestimmung der Aktivierbarkeit die intrazellulär gebildete Menge ROS gemessen, die vom Enzymsystem NADPH-Oxidase gebildet werden. Testsysteme, die kolorimetrisch zusätzlich auch extrazelluläre ROS erfassen, wie bei King *et al.* (154), verdeutlichen noch die Befunde. Ein direkter Vergleich mit Ergebnissen vom Menschen ist auch deshalb schwierig, weil bei der hier angewandten Methodik der Grad der Vitalität der Granulozyten, die für die Messung von Phagozytoseaktivität und Aktivierbarkeit erfasst wurden, schwierig zu beurteilen ist. Dies resultiert aus der Auswahl morphologisch einheitlicher Zellen (gemessen an der Höhe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtsignals bei der durchflußzytometrischen Analyse). Die Anzahl der Granulozyten, die zwar noch morphologisch zu den erfassten Zellen gehören, bei der Messung aber schon apoptotisch oder nekrotisch sind, bleibt unerkannt. Um so erstaunlicher ist es zu beobachten, dass trotz Stx1-abhängiger Steigerung des Prozentsatzes frühapoptotischer Zellen nach 18 Stunden Inkubation der Prozentsatz phagozytierender oder zum „oxidative burst“-befähigter Zellen durch Stx1 nur relativ schwach beeinflusst wird.

Während rStxB1 bei Schafgranulozyten nicht in der Lage war, Apoptose auszulösen, ließ sich ein Einfluss von rStxB1 auf die Aktivierbarkeit der Zellen beobachten. Dies könnte durch zwei voneinander unabhängige Signaltransduktionswege bedingt sein. Man muss aber auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass in den Granulozytenpräparationen vorhandene Gb<sub>3</sub>/CD77-positive Lymphozyten eine Wirkung entfaltet haben. Schaflymphozyten exprimieren bereits *ex vivo* Gb<sub>3</sub>/CD77 (Eisenberg, unveröffentlichte Daten). Ein Einfluss von Stx1 oder StxB1 auf ihre Funktionen ist bislang nicht untersucht. Bei bovinen Lymphozyten induziert aber auch rStxB1 einen Effekt (291). Lymphozyten von Rindern exprimieren *ex vivo* kaum nachweisbar Gb<sub>3</sub>/CD77, reagieren aber dennoch innerhalb der ersten vier Stunden der Inkubation auf Stx1 durch Veränderung der Zytokin-mRNA-Profile (23). Zytokine von Lymphozyten könnten einen Einfluss auf Zellfunktionen der Granulozyten ausüben (85), ohne dass dabei Gb<sub>3</sub>/CD77 auf Granulozyten involviert ist. Durch solche möglicherweise im Reaktionsansatz vorhandenen, löslichen endo- oder parakrinen Faktoren lassen sich auch die starken Schwankungen bei den Nachweisen der Phagozytoseaktivität, Aktivierbarkeit und Vitalität erklären, die zwischen unterschiedlichen Tieren einer Spezies und zwischen den einzelnen Ansätzen eines Tieres auftraten. Diese im Sinne einer schwierig zu quantifizierenden Störgröße wirkenden Effekte betreffen vornehmlich die Tierart Schaf. Beimengungen von Lymphozyten befanden sich regelmäßig in geringeren Mengen im Probenansatz, allerdings waren in den Präparationen der Schafgranulozyten grundsätzlich

mehr mononukleäre Zellen als bei Präparationen von Rindergranulozyten nachweisbar. Lösliche Faktoren könnten von den Granulozyten aber auch selbst gebildet worden sein. Humane Granulozyten können über die Bildung löslicher Substanzen wie beispielsweise IL-1Ra immunmodulatorisch wirken (132). Der Effekt des Stx1 bestünde in dieser frühen Phase noch nicht in der Induktion von Apoptose bei den Granulozyten, sondern er könnte zunächst mit einer Schädigung der Ribosomen bei Lymphozyten oder Granulozyten einhergehen. Diese Schädigung manifestiert sich in Form einer vermehrten oder verminderten Bildung von Chemokinen. Ein derartiger Effekt durch einen Proteinsynthese-Inhibitor, wie es z.B. Stx ist, wird auch als "ribotoxische Stressantwort" bezeichnet (307). Diese löslichen Faktoren könnten nicht nur die Schwankungen bei den Parametern Vitalität, Phagozytoseaktivität und Aktivierbarkeit erklären, sondern hätten auch große Bedeutung im Kontext der intestinalen Mukosa mit ihren vielfältigen zellulären Interaktionen.

Um zwischen einer Wirkung des rStxB1 und der des Stx1-Holotoxins unterscheiden zu können, wurde in den Funktionalitätstests je ein Ansatz Stx1-Holotoxin sowie rStxB1 mit und ohne den neutralisierenden Antikörper (anti-StxB1) vergleichend untersucht. Von dem in den Funktionalitätstests eingesetzten monoklonalen anti-StxB1-Antikörper ist bekannt, dass dessen neutralisierende Fähigkeit stark konzentrationsabhängig ist (290). Bei einer Vorinkubation mit rStxB1 trat bei bovinen Lymphozyten sogar eine Verstärkung der Bindung, nicht aber eine Verstärkung des toxischen Effekts auf (290). Auch in den Funktionalitätstests mit Granulozyten konnte der Antikörper die Toxinkomponente anscheinend nicht vollständig neutralisieren. Eine Internalisierung eines Toxin-Antikörper-Komplexes durch bovine Lymphozyten ist möglich (290), wohingegen über dessen intrazelluläre Wirkweise bei Granulozyten bislang nichts bekannt ist. Unter Umständen scheint der Antikörper zusammen mit rStxB1 die Wirkung der Toxinkomponente alleine übertreffen zu können, wie dies bei der Phagozytoseaktivität und der Migrationsfähigkeit von Schafgranulozyten zu beobachten ist. Auch *in vivo* wäre es denkbar, dass Immunkomplexe, bestehend aus der B-Untereinheit und den natürlicherweise vorkommenden Antikörpern gegen Stx1, über Fc-Rezeptoren der Granulozyten unabhängig von Gb<sub>3</sub>/CD77 gebunden werden und sich so die Wirkung der Toxinkomponente potenziert.

Schließlich ist von Beckman *et al.* bekannt, dass bovine Lympho- und Granulozyten auf *E. coli*-LPS im Nanogrammbereich mit einer differenzierten Chemokin- und Chemokinrezeptorregulation reagieren (17). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch geringste Mengen von Endotoxin auf Zellen im Reaktionsansatz gewirkt haben könnten. Um einen Einfluss von LPS auf die beobachteten Effekte ausschließen bzw. besser einordnen

zu können, wurde der Endotoxingehalt der aufgereinigten Stx1- und rStxB1-Präparationen im *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Test untersucht. Die verwendete Charge des Stx1-Holotoxins enthielt 1,49 ng/ml LPS, die Charge mit rStxB1 war mit 1,78 ng/ml LPS kontaminiert. Diese Endotoxin-Konzentrationen wurden im Probenansatz weiter verdünnt, so dass LPS-Endkonzentrationen von 18 pg/ml in Ansätzen mit Holotoxin und 130 pg/ml in Ansätzen mit rStxB1 vorlagen. Schon Endotoxinkonzentrationen von 100 pg/ml können zu einer Sensibilisierung und verstärkten Aktivität von neutrophilen Granulozyten führen (27). Daher wurde in den Funktionalitätstests ein Ansatz mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml mitgeführt, um LPS-spezifische Effekte von Toxin-spezifischen Effekten bei Granulozyten und präparationsbedingt verbleibenden Residual-PBMC unterscheiden zu können. Es handelte sich dabei um den unteren Wert aus Versuchen zur Induktion des Stx-Rezeptores Gb<sub>3</sub>/CD77 auf Granulozyten, bei denen sich auch LPS-Konzentrationen von 100 ng/ml als nicht stimulatorisch erwiesen. Ein Einfluss von LPS auf Granulozyten ließ sich in den Funktionalitätstests verschiedentlich beobachten. So führte LPS - nicht aber Stx1 - bei Rindergranulozyten zu einer Stabilisierung der Vitalpopulation und zu einer Erhöhung der Phagozytoseaktivität. Schafgranulozyten reagierten auf LPS und Stx1 in ähnlicher Weise. LPS induzierte Apoptose bei Blut- und Milchgranulozyten und führte zu einer Steigerung der Aktivierbarkeit bei Bakterien als Stimulans. Interferenzen in der unterschiedlichen Wirkung von LPS auf Granulozyten von Rind und Schaf lassen sich durch ein unterschiedliches Repertoire an Signalwegen erklären. Die Granulozyten könnten eine unterschiedliche Art oder Anzahl von Fc-Rezeptoren besitzen, die opsonisiertes LPS erkennen. Auch ein unterschiedlicher Gehalt des LPS-bindenden-Proteins (LBP) im verwendeten autologen Plasma, das über granulozytäres CD14 die Anlagerung von LPS auf der Oberfläche von Granulozyten katalysiert, kommt hierfür in Betracht (128). Schließlich sind noch die sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) zu nennen, die als transmembranäre Rezeptoren ebenfalls für die Erkennung bakterieller Zerfallsprodukte eine Rolle spielen (18). Hinsichtlich der starken Schwankungen innerhalb der unterschiedlichen Tiere einer Versuchsgruppe scheinen aber auch individuelle Empfänglichkeitsunterschiede aufzutreten. Schließlich wurde die Frage, ob die beobachtete Stx1-spezifische Wirkung möglicherweise nur auf der Wirkung einer LPS-Kontamination beruht, durch einen Proteinase K-Verdau überprüft. Dabei sollte die biologische Aktivität der Toxinkomponente eliminiert werden. Die exemplarisch untersuchte Aktivierbarkeit von Schafgranulozyten nach Stimulation durch Bakterien ergab sehr heterogene Effekte. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte von Stx1,

die sich nicht eindeutig durch anti-StxB1 neutralisieren ließen, durch Methoden-immanente Schwankungen bedingt waren.

Die Beschleunigung der Apoptose war der deutlichste Effekt, den Stx1 bei ovinen Granulozyten auslösen konnte. Im Hinblick auf die Situation an der intestinalen Mukosa ist besonders relevant, dass dieser Effekt sowohl vor (bei aus dem Blut präparierten Granulozyten) als auch nach (bei Granulozyten, die aus Milch aufgereinigt wurden) Transmigration der Zellen durch eine Schleimhaut zu beobachten war. Es ist nämlich bekannt, dass die Migration humaner Granulozyten zur Steigerung der Phagozytoseaktivität (113) und Aktivierbarkeit führt (115). Einen wenn auch gegenteiligen Effekt sahen Smits *et al.* (288) bei durch Euterepithelzellen migrierte Granulozyten des Rindes. Aufgrund der geringen Ausbeute an Milchgranulozyten wurde in den entsprechenden Versuchen in dieser Arbeit lediglich die Vitalität dieser Zellen nach Inkubation mit Stx1 bestimmt. In der Tat war der Apoptose-induzierende Effekt von Stx1 bei migrierten Granulozyten des Schafes deutlich schwächer als bei Blutzellen ausgeprägt. Es wird zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben müssen zu beurteilen, inwieweit die schwache Steigerung der Migrationsfähigkeit von Schafgranulozyten, die durch Stx1 selbst ausgelöst wurde, einen Einfluss auf das Ausmaß und die Kinetik der Apoptose-Induktion hat. Allerdings wird möglicherweise aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse der Umfang, mit dem Stx1 bei ovinen Granulozyten Apoptose auslöst, noch unterschätzt, da die angewandte Methode nur Granulozyten erfasst, die hinsichtlich ihrer Morphologie noch relativ unverändert sind. Bei der Quantifizierung der Populationen unterschiedlichen Vitalitätsgrades sind Granulozyten nicht erfasst, die morphologisch bereits so stark verändert sind, dass sie außerhalb des Zählfensters der Granulozyten-Hauptpopulation liegen. Um dieses Problem zu kompensieren, wurde mit dem extrazellulären Nachweis von Phosphatidyl-Serin ein Apoptosemarker gewählt, der bereits etwa nach 60 Minuten apoptotische Zellen anzeigt (281). Die Verwendung eines frühen Apoptosemarkers erklärt auch, warum ein Effekt des Stx1 nach 0,5 Stunden noch nicht nachweisbar ist. Diese Untersuchungsmethode erwies sich letztlich aber als gut geeignet, da sich die Zellen auch nach 18 Stunden Inkubation noch mehrheitlich im Zustand früher Apoptose befinden, ohne dabei hinsichtlich ihrer Morphologie starke Beeinträchtigungen zu erfahren. Dies lässt auch auf eine protrahierte Wirkung von Stx1 schliessen. Hingegen belegen Untersuchungen an Granulozyten des Menschen teilweise sogar gegenteilige Wirkungen der Shigatoxine. Während King *et al.* (154) keinen Effekt des Stx1 auf die Apoptose sehen, beschreiben Liu *et al.* (171) eine Stx2-abhängige Verzögerung der Apoptose bei humanen Granulozyten. Allerdings scheint ein Vergleich dieser Ergebnisse schwierig, denn Liu *et al.* färbten die

Zellen offenbar ausschließlich mit Propidiumjodid, einem Marker, der mehr über Nekrose als über Apoptose Aufschluss gibt. King *et al.* verwendeten mit Bis-Benzimid einen anderen Apoptoseindikator.

Auch wenn die Wirkung von Stx1 auf manche Funktionen oviner Granulozyten der Überprüfung bedarf, wurde hier erstmalig die Existenz eines funktionellen Stx1-Rezeptors auf Granulozyten des Schafes nachgewiesen. Das Fehlen klinischer Symptome nach ovinen STEC-Infektionen beruht daher mit Sicherheit nicht auf dem generellen Unvermögen oviner Zellen, den Stx-Rezeptor zu exprimieren. Dieses konnte auch für das Rind bereits ausgeschlossen werden (291). Aus der Induktion von Apoptose bei Schafgranulozyten muss geschlossen werden, dass das von den STEC sezernierte Stx1 Zellen des unspezifischen Immunsystems zu hemmen vermag. Durch eine Wirkung auf migrierte Granulozyten wird ferner deutlich, dass beim Schaf eine Toxinresorption gar nicht die Voraussetzung für eine Wirkung auf Granulozyten sein muss. Vielmehr deuten die Befunde darauf hin, dass Abwehrvorgänge und Interaktionen von Granulozyten mit Stx auch im Darmlumen des Schafes stattfinden können. Eine verstärkte Granulozytenneubildung, wie sie von einigen Autoren im Zusammenhang mit einer STEC2-Infektion beschrieben wird, deutet auf einen verstärkten Verbrauch dieser Zellen bei murinen STEC-Infektionen hin (6, 78). Die Apoptoseinduktion bei ovinen Granulozyten war allerdings erst nach einer mehrstündigen Inkubationszeit zu beobachten, bewirkte dann aber vor allem einen Anstieg von Zellen innerhalb der frühapoptotischen Population. Während dieser Zeitspanne war ein Effekt durch Stx1 auf die Phagozytoseaktivität und die Aktivierbarkeit nur gering ausgeprägt. Ein erst nach vielen Stunden eintretender apoptotischer Effekt durch Stx1 auf Granulozyten scheint von nur untergeordneter Bedeutung für den Verlauf der STEC-Infektion des Schafes zu sein. Der Vorgang der Phagozytose läuft innerhalb von einigen Minuten ab (191), und enteropathogene *E. coli* zeigen ihren antiphagozytotischen Phänotyp durch die Produkte EspA, EspB und EspD des *lee*-kodierte Typ-III-Sekretionssystems bereits 120 Minuten nach Infektion einer Makrophagen-ähnlichen Zelllinie (92). Da auch viele STEC-Stämme über einen *lee* verfügen, spielen durch Stx1 ausgelöste, eher protrahierte Effekte auf Funktionen unspezifischer Immunzellen für den Verlauf der Infektion wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

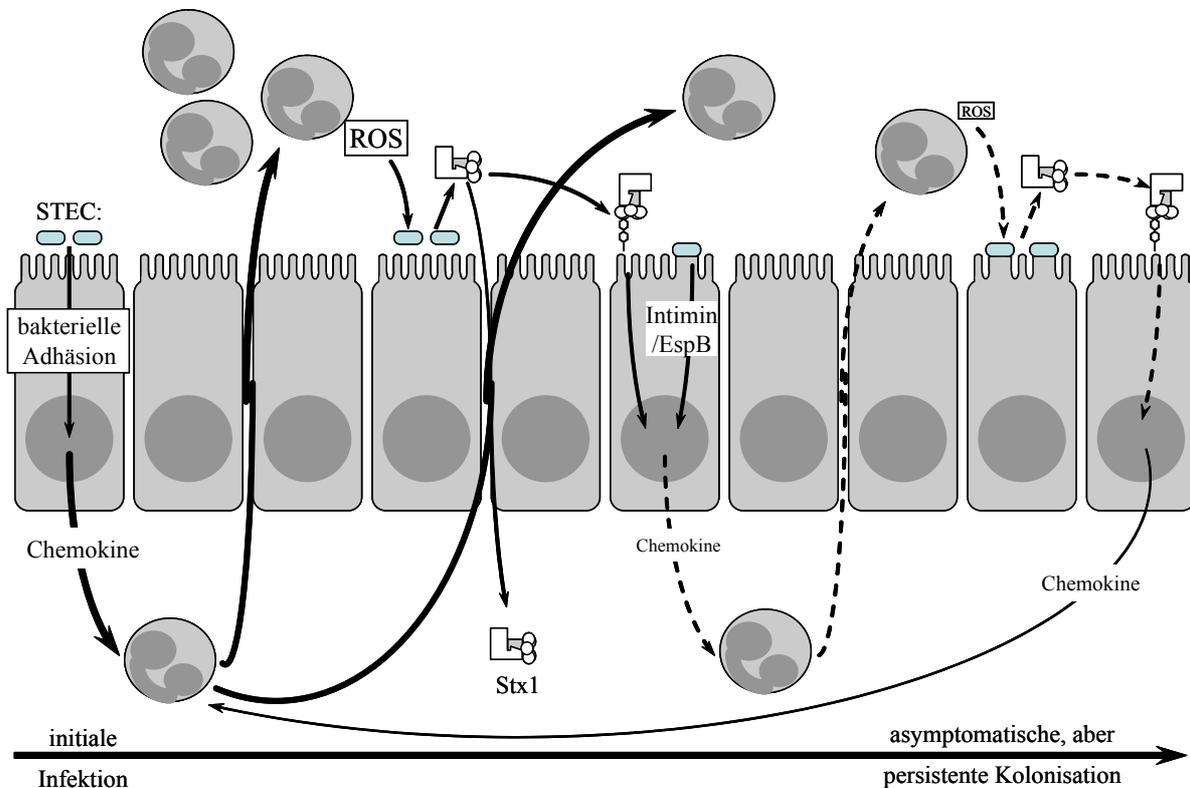
Viel entscheidender ist offensichtlich die Frage, ob Granulozyten *in vivo* eine Transportfunktion für Shigatoxine ausüben können. Beim Menschen wird Stx2 intravasal von granulozytären Rezeptoren, die eine niedrigere Affinität als Gb<sub>3</sub>/CD77 besitzen, gebunden

und transportiert (303). Bei der peripheren Übertragung des Holotoxins von Granulozyten auf empfängliche Zellen erwies sich das Toxin als intakt und biologisch aktiv (303). Diese Ergebnisse stellen derzeit einen zentralen Punkt im Modell der humanen STEC-Infektion dar, denn sie könnten erklären, wie nach intestinaler Infektion ein extraintestinaler Gewebeschaden entsteht. Unsere Ergebnisse werfen aber auch die Frage auf, ob Granulozyten des Wiederkäuers eine Aufnahme-, Transport- und Übertragungsfunktion für Stx besitzen. Shigatoxin bindet beim Rind an Darmepithelzellen, Zellen des submukosalen Lymphsystems sowie an bestimmte Zelltypen der Niere (110). In der bovinen Niere tritt ein Muster von verschiedenen Stx-Rezeptor-Isoformen auf (110). Auf vaskulären Endothelzellen existiert beim Rind kein Stx-Rezeptor (246), eine Bindung von Stx ist demnach im Gefäßsystem des Rindes nicht nachweisbar (110). Da Rinder auch keinen Stx-Rezeptor auf Granulozyten besitzen, entfällt zusätzlich die Grundlage für einen Toxintransport. Untersuchungen zum Vorhandensein und zur Gewebeverteilung von Stx-Rezeptoren bei Schaf und Ziege wurden bislang noch nicht durchgeführt. Die vorliegende Arbeit zeigt aber erstmals, dass Schaf und Ziege über Gb<sub>3</sub>/CD77 auf Granulozyten verfügen. Wenn diese Gb<sub>3</sub>/CD77-Moleküle Shigatoxine binden, dürfte aber kein Unterschied in der Affinität zu einem peripheren Gb<sub>3</sub>/CD77-Rezeptor auf Endothelzellen bestehen. Dadurch wird eine Stx-Übertragung unwahrscheinlich. Darüberhinaus könnte beim Schaf durch die Granulozyten freies Toxin sogar noch im Darmlumen gebunden werden, das dann nicht mehr abgegeben werden kann. Ovine Granulozyten sorgten auf diese Weise für eine Entgiftung. Die zur Absicherung dieser Hypothese als Toxin-Akzeptor verwendeten Verozellen entsprechen hinsichtlich ihrer Eigenschaft einem Toxin-sensitiven Gewebe. Als potentielle Toxin-Donatoren fungierten mit Stx1 vorinkubierte bovine und ovine Granulozyten. Rindergranulozyten übertrugen erwartungsgemäß auch nach viertägiger Inkubation mit Verozellen kein Toxin: eine Beeinflussung der Stoffwechselaktivität von Verozellen in den Kokulturen war zu keinem Zeitpunkt feststellbar. Schafgranulozyten banden Stx1, was zur Reduktion der Verotoxizität im umgebenden Medium führte. Eine Beladung von Schafgranulozyten mit Stx1 innerhalb von einer Stunde bei 37 °C erscheint auch unter *in-vivo*-Verhältnissen durchaus denkbar. Auch auf diese Weise beladene Zellen übertrugen kurzfristig kein Toxin auf Verozellen, was die aufgestellte Hypothese bestätigte. Erst nach vier Tagen ließ sich ein zytotoxischer Effekt auf Verozellen erkennen. Da dieser nicht titrierbar war, beruht er vermutlich auf einem toxin-unabhängigem Zerfall der Schafgranulozyten nach vier Tagen mit Freisetzung anderer zytotoxischer Faktoren.

Diese Stx-Bindung über granulozytäres Gb<sub>3</sub>/CD77 könnte durch die Immunkomplex-vermittelte Stx-Aufnahme über Fc-Rezeptoren noch gesteigert sein. Anti-Stx1 spezifische Antikörper wurden in den Plasmen der verwendeten Schafe nachgewiesen. Für eine Rinderpopulation, aus der auch die Blutproben für diese Arbeit stammten, wurden solche Untersuchungen bereits von Stamm durchgeführt (290). Es ließ sich eine Altersabhängigkeit belegen, bei der die Plasmen älterer Rinder über eine höhere Toxin-Neutralisationsfähigkeit verfügten. Bei Schafen war der Anteil der Tiere mit deutlicher Neutralisationsfähigkeit im Plasma mit 46,7 Prozent wesentlich geringer ausgeprägt als bei den untersuchten Rindern. Dies ist deshalb verwunderlich, weil beim Schaf STEC-Infektionen mit höherer Prävalenz auftreten (335). Der Nachweis Stx1-spezifischer Antikörper belegt aber, dass grundsätzlich auch beim Schaf zumindest soviel Toxin resorbiert werden kann, dass es zur Ausbildung einer spezifischen Immunität kommt. Obwohl bei dieser Untersuchung nur Antikörper gegen Stx1 nachgewiesen wurden, könnte die Diskrepanz zwischen der im Vergleich zum Rind höheren Prävalenz von STEC beim Schaf und der niedrigeren Seroprävalenz bedeuten, dass in manchen Individuen Shigatoxin bereits im Darmlumen durch ovine Granulozyten gebunden wird, bevor es Antikörper-produzierende B-Zellen aktivieren kann.

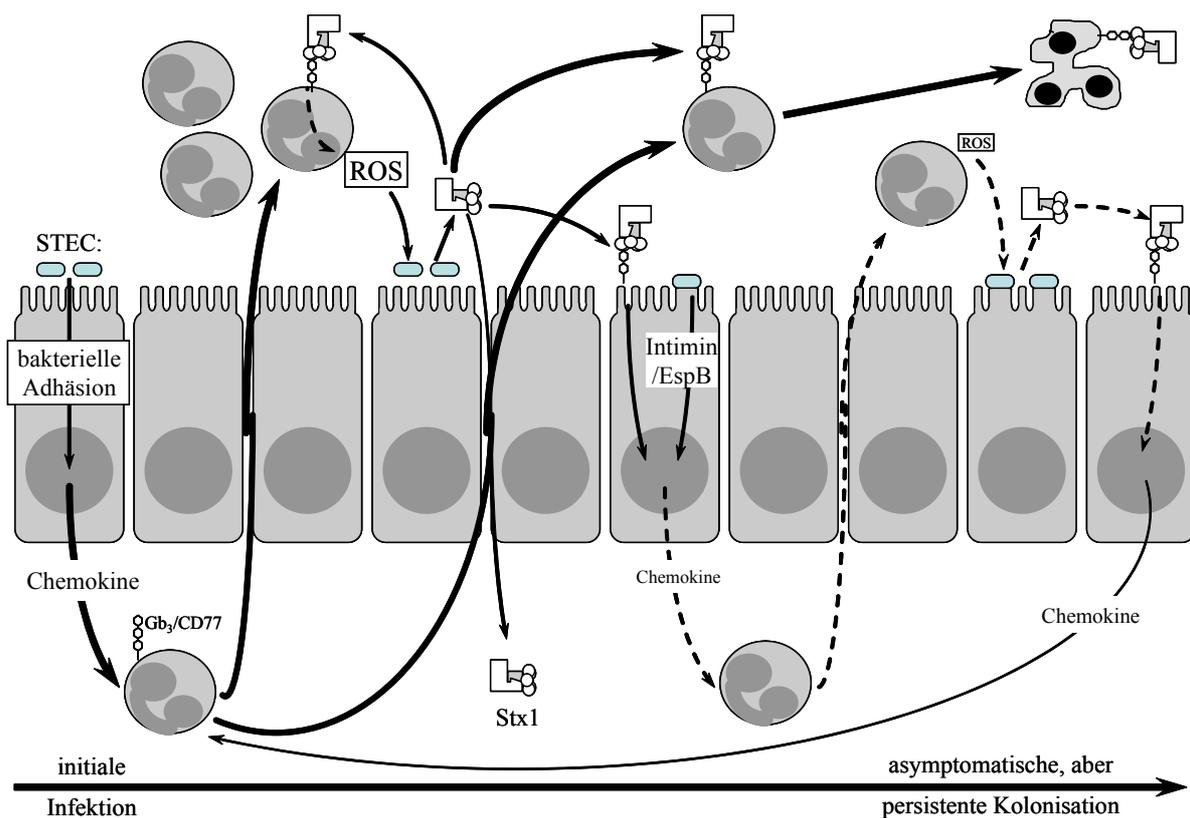
Auf der Basis der Wechselwirkungen von Stx mit humanen Granulozyten ergeben sich für die Wiederkäuer folgende modellhafte Vorstellungen vom Verlauf der STEC-Infektion (Abb. 34, 35). Bei Rindern werden zu Beginn der STEC-Infektion in Folge der bakteriellen Adhäsion an intestinale Epithelzellen Chemokine freigesetzt, und Granulozyten aus regionären Kapillaren wandern ein (106, 308) (Abb. 34). Die Granulozyten transmigrieren durch die Epithelschicht in Richtung Darmlumen, wo sie reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROS) sezernieren, um die STEC-Mikrokolonien abzutöten. Durch diesen Einfluss werden *stx*-Prophagen im bakteriellen Genom aktiviert und die Stx-Produktion gesteigert (319). Durch eine temporär geschädigte Darmschranke infolge der einwandernden Granulozyten ist die Stx-Resorption erhöht (122). Nach dieser Initialphase bindet luminal sezerniertes Stx an die Gb<sub>3</sub>/CD77-Rezeptoren der Epithelzellen und reguliert auf diese Weise die Chemokinproduktion im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus` herab. Möglicherweise wird diese Regulation noch durch Faktoren des LEE-Lokus` wie beispielsweise Intimin und EspB verstärkt, nachdem die STEC die Ausbildung von A/E-Läsionen eingeleitet haben (122). Dadurch sinken die Anzahl der neu einwandernden Granulozyten und deren Menge an gebildeten ROS, woraus eine Herabregulation der Stx-Produktion resultiert. Dies führt zu einem Gleichgewichtsverhältnis zwischen ROS-induziertem Stx und Stx-supprimierter Granulozytentransmigration und damit zur Etablierung einer persistenten Infektion. Vorausgesetzt, dass ovine Darmepithelzellen auf

Stx ähnlich reagieren wie diese Zellen des Rindes, könnte sich dieselbe Ereigniskette auch während einer STEC-Infektion im Darm des Schafes abspielen (Abb. 35). Im Unterschied zum Rind könnte jedoch hier die Bindung von Stx an Granulozyten die Menge der ROS erhöhen. Vor allem wird aber frei im Darmlumen vorliegendes Stx von Granulozyten gebunden, wodurch Granulozyten zunächst apoptotisch und schließlich mit dem Kot ausgeschieden werden. Im Hinblick auf die hohe Dichte von Gb<sub>3</sub>/CD77 bzw. StxB1-Bindungsstellen auf der Oberfläche der Granulozyten würde dieser Entgiftungsmechanismus über eine hohe Kapazität verfügen und die Menge der von Schafen intestinal resorbierten Shigatoxine stark limitieren. Im Vergleich zum Wiederkäuer verläuft die STEC-Infektion des Menschen deutlich unterschiedlich. Stx scheint hier die granulozytäre ROS-Bildung im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus` zu unterhalten, wodurch die Stx-Produktion der STEC beschleunigt wird. Ferner verstärkt Stx die Chemokin-Expression in intestinalen Epithelzellen (308). Durch diese Vorgänge ist der Schweregrad der Entzündungsreaktion während einer humanen STEC-Infektion positiv korreliert mit der Menge des resorbierten Stx. Damit resultieren die infolge Stx-Einwirkung entstandenen Gewebeschäden z.B. bei der hämorrhagischen Kolitis des Menschen im Endeffekt aus einem Fehlen von negativen Feedback-Mechanismen, wie wir sie bei Schaf und Rind finden.



**Abb. 34: Modell der intestinalen STEC-Infektion beim adulten Rind** (nach Menge, unveröffentlicht)

Für das Verständnis der Unterschiede im Verlauf der STEC-Infektion bei Mensch und Wiederkäuer scheint somit das Zusammenspiel vieler beteiligter Faktoren wichtiger zu sein als die An- oder Abwesenheit von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf einem einzelnen Typ von Zellen (246). Darüberhinaus macht der in dieser Arbeit aufgezeigte Unterschied zwischen großen und kleinen Wiederkäuern deutlich, dass für das Verstehen der Interaktionen der STEC mit ihrem Wirt jede Spezies differenziert gesehen werden muss. Trotz dieser Unterschiede läßt sich aber feststellen, dass zumindest bei Rindern die Persistenz der STEC-Infektion stärker durch eine Modulation des spezifischen Immunsystems (193-195, 291) als durch eine Beeinträchtigung der unspezifischen Abwehr durch Stx1 bedingt ist. Zusätzlich zum Fehlen von Stx-Rezeptoren auf bovinen mikrovaskulären Endothelzellen (110) erklären die Unterschiede in der Expression von Stx-Rezeptoren zwischen humanen Granulozyten und jenen von Rindern, Schafen und Ziegen, warum Wiederkäuer keine Stx-bedingten Symptome zeigen.



**Abb. 35: Modell der intestinalen STEC-Infektion beim Schaf** (nach Menge, unveröffentlicht)

## 5. Zusammenfassung

Da bislang nur Hinweise für eine Beeinträchtigung des spezifischen Immunsystems während der STEC-Infektion des Rindes vorlagen, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob auch die zum unspezifischen Immunsystem gehörenden Granulozyten verschiedener Wiederkäuerspezies Zielzellen für Shigatoxine (Stx) darstellen. Im Einzelnen wurde dazu mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob bovine, ovine und caprine Granulozyten über einen Stx-Rezeptor verfügen und die für die Rezeptorbindung verantwortliche, rekombinante B-Untereinheit (rStxB1) binden können. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob das aufgereinigte Stx1-Holotoxin und die rStxB1 bei bovinen und ovinen Granulozyten auf direktem oder indirektem Wege einen Einfluss auf die Parameter Vitalität, Phagozytoseaktivität, Aktivierbarkeit und Migrationsfähigkeit ausüben können.

Rezeptoren vom Gb<sub>3</sub>/CD77-Typ fanden sich *ex vivo* auf Granulozyten aus dem Blut von Schaf und Ziege. Bindungsstudien mit rStxB1 bestätigten das Vorhandensein eines Stx-Rezeptors auf den Granulozyten der kleinen Wiederkäuer. In Wettbewerbsstudien an Schafgranulozyten konnte die Bindung der rStxB1 an Gb<sub>3</sub>/CD77 mit hoher Affinität gezeigt werden. Schafgranulozyten banden auch das Stx1-Holotoxin. Stx1 führte *in vitro* bei Schafgranulozyten aus dem Blut zu einer starken Erhöhung des Anteils früh-apoptotischer Zellen. Derselbe Effekt zeigte sich auch bei Granulozyten aus Schafmilch als ein Modell für Zellen nach Transmigration einer Gewebeschicht. Granulozyten aus dem Blut von Schafen zeigten in Anwesenheit von Stx1 eine erhöhte Phagozytoseaktivität. Ferner beeinflussten Stx1 und rStxB1 die Aktivierbarkeit dieser Zellen.

Granulozyten aus dem Blut von Rindern exprimierten *ex vivo* kein Gb<sub>3</sub>/CD77 und banden auch die rStxB1 nicht. Beim Rind war auch nach Inkulturnahme und Stimulation der Granulozyten mit LPS sowie bei Milchgranulozyten keine Rezeptorexpression oder Bindung der rStxB1 nachweisbar. Auf die Vitalität von Rindergranulozyten hatten Stx1 und rStxB1 keinen Einfluss. Eine toxinspezifische Beeinträchtigung der Zellfunktionen (Phagozytose, Aktivierbarkeit) trat nicht auf. Allerdings zeigten Rindergranulozyten eine reduzierte Migrationsaktivität hin zu Überständen Stx1-behandelter boviner intestinaler Epithelzellen.

In Abhängigkeit von der Wirtsspezies stellen die Granulozyten von Schafen somit direkte und die Granulozyten von Rindern indirekte Zielzellen für Shigatoxin dar. Dies macht auch eine Beeinträchtigung des unspezifischen Immunsystems während der STEC-Infektion von Wiederkäuern wahrscheinlich. Im Hinblick auf die Persistenz der STEC-Infektion könnte sich bei Wiederkäuern ein Gleichgewicht zwischen bakteriell freigesetztem Stx und Stx-

supprimierter Granulozytenmigration einstellen und eine symptomlose Infektion etablieren. Beim Schaf wäre darüber hinaus denkbar, dass die Granulozyten die Menge an lumenalem Toxin vermindern, indem sie freies Stx mit hoher Affinität binden, apoptotisch werden und mit dem Kot ausgeschieden werden. Die Ergebnisse belegen somit erstmals eine wichtige Rolle des unspezifischen Immunsystems bei der STEC-Infektion der Wiederkäuer, zeigen aber auch starke speziesspezifische Unterschiede auf. Dabei finden sich Unterschiede nicht nur in Bezug auf das für einheitlich gehaltene Reservoir Wiederkäuer, sondern auch im Vergleich zu dem von STEC-bedingten Erkrankungen betroffenen Menschen.

## 6. Summary

Immunomodulation by Shiga toxins (Stxs) is considered to play an important role in the establishment of persistent bovine STEC infections, since it is known that Stx1 impairs cells belonging to the specific immune system in cattle. In order to supplement our understanding of this immunomodulation the present thesis addressed the question, whether granulocytes - as a part of the innate immune system - of different ruminant species represent target cells for the Stxs. Therefore bovine, ovine, and caprine granulocytes were analysed by flow cytometry for the presence of Stx-receptors and for the ability to bind recombinant StxB1-subunit (rStxB1). Subsequent investigations assessed the putative effect— either by direct or indirect means - of purified Stx1-holotoxin and rStxB1 on viability, phagocytic and oxidative burst-activity, and migratory capability of the cells.

Granulocytes obtained from the peripheral blood of sheep and goats expressed Stx-receptors of the Gb<sub>3</sub>/CD77-type *ex vivo*. Binding studies with rStxB1 confirmed the presence of functional Stx-receptors on small ruminants` granulocytes. Competition studies with ovine granulocytes demonstrated high affinity binding of rStxB1 by Gb<sub>3</sub>/CD77. Ovine granulocytes also bound Stx1-holotoxin. *In vitro* Stx1 increased the number of ovine blood granulocytes entering a state of early apoptosis. The same effect was caused by Stx1 in granulocytes obtained from sheep`s milk as a model for cells having transmigrated through a tissue-layer. Moreover, Stx1 increased the phagocytic activity of ovine granulocytes and Stx1 as well as rStxB1 altered the oxidative burst activity of these cells.

Blood granulocytes of cattle neither expressed Gb<sub>3</sub>/CD77 nor did they bound rStxB1 *ex vivo*. Furthermore, analysis of cells stimulated with LPS *in vitro* as well as analysis of granulocytes from bovine milk failed to detect Stx-receptor expression or the ability of the cells to bind rStxB1. There was no toxin-specific effect on cellular functions (phagocytosis, oxidative burst activity) in bovine granulocytes. Nevertheless, bovine granulocytes exhibited an impaired migratory activity towards supernatants of Stx1-treated bovine intestinal epithelial cells.

In conclusion, granulocytes from sheep represent direct target cells while bovine granulocytes represent indirect target cells for Stx1. Both aspects point to an impairment of the innate immune system during ruminant`s STEC-infection. With regard to the persistence of STEC-infection it is thus tempting to conclude that a steady state between Stx1 secreted by the STEC and a Stx-suppressed transmigration of granulocytes finally leads to the establishment of asymptomatic infections. Moreover, granulocytes in sheep probably reduce the amount of toxin in the intestinal lumen by binding free Stx with high affinity, undergoing apoptosis, and

being eliminated with the feces. For the first time the results thus stress the role of the innate immune system in ruminant's STEC-infection but also enlighten striking species-specific differences. These differences not only occur between ruminant species thus far equally regarded as STEC reservoirs but are also apparent in comparison to man who is threatened by STEC-associated illnesses.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Acheson, D. W., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky, and G. T. Keusch** 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture *Infect Immun.* **64**:3294-300.
2. **Acheson, D. W. K., M. Jacewicz, E. Skutelsky, R. Moore, and G. T. Keusch** 1994. Translocation of Shiga-like toxins across intact epithelial monolayers in tissue cultures. Abstr. 2nd Int. Symp. Workshop VTEC infections, Bergamo, Italy.
3. **Acheson, D. W. K., L. L. Lincicome, M. S. Jacewicz, and G. T. Keusch** 1998. Shiga toxin interaction with intestinal epithelial cells, p. 140-147. *In* J. B. Kaper, and A. D. O'Brien (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. **Anonymus** 1982. Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis--United States. 1982, p. 580-585., *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, vol. 31. Centers for Disease Control.
5. **Anonymus** 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice--British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996, p. 975., *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, vol. 45. Centers for Disease Control and Prevention.
6. **Aoki, Y., Y. Yosida, and T. Takeda** 1999. Shiga toxin 2 promotes the stem cell differentiation into granulocytes in the bone marrow causing marked granulocytosis in the peripheral blood *J Infect.* **39**:97.
7. **Arab, S., M. Murakami, P. Dirks, B. Boyd, S. L. Hubbard, C. A. Lingwood, and J. T. Rutka** 1998. Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells *J. Neuro-Oncol.* **40**:137-150.
8. **Armstrong, G. L., J. Hollingsworth, and J. G. Morris, Jr.** 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world *Epidemiol Rev.* **18**:29-51.
9. **Arnaout, M. A.** 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18 *Blood.* **75**:1037-50.
10. **Asaka, M., M. Kato, M. Kudo, T. Meguro, T. Kimura, T. Miyazaki, and K. Inoue** 1993. The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease *Gastroenterol Jpn.* **28**:163-7.

11. **Asaka, M., M. Kudo, M. Kato, T. Kimura, T. Meguro, S. Mitani, T. Miyazaki, and K. Inoue** 1994. The role of *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of gastritis J Gastroenterol. **29**:100-4.
12. **Asakura, H., S. Makino, H. Kobori, M. Watarai, T. Shirahata, T. Ikeda, and K. Takeshi** 2001. Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (stx) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals Epidemiol Infect. **127**:27-36.
13. **Ashida, A., K. Matsui, T. Chizaki, K. Yoshikawa, N. Kawamura, K. Suzuki, and H. Tamai** 1999. Erythrocyte P1 group antigen expression in VTEC-associated hemolytic uremic syndrome Clin Nephrol. **51**:73-6.
14. **Autenrieth, I. B., V. Kempf, T. Sprinz, S. Preger, and A. Schnell** 1996. Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines Infect Immun. **64**:1357-68.
15. **Balsam, L. B., T. W. Liang, and C. A. Parkos** 1998. Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain J Immunol. **160**:5058-65.
16. **Basso, D., A. Stefani, N. Gallo, L. Brigato, F. Navaglia, A. Toma, F. Zancanaro, F. Di Mario, G. De Franchis, and M. Plebani** 1999. Polymorphonuclear oxidative burst after *Helicobacter pylori* water extract stimulation is not influenced by the cytotoxic genotype but indicates infection and gastritis grade Clin Chem Lab Med. **37**:223-9.
17. **Beckman, M. J., J. Sotos, F. Leite, L. A. Schuler, and C. J. Czuprynski** 2000. Differential gene regulation of interleukin-1 ligands and receptors in bovine peripheral blood neutrophils and mononuclear cells in response to *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) Vet Immunol Immunopathol. **77**:221-32.
18. **Beutler, B.** 2001. Toll-like receptors Mod. Asp. Immunobiol. **52**:52.
19. **Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, M. Kehoe, and M. Palmer** 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins Arch Microbiol. **165**:73-9.
20. **Bhogal, B. S., L. K. Nagy, and P. D. Walker** 1987. Neutrophil mediated and IgA dependent antibacterial immunity against enteropathogenic *Escherichia coli* in the porcine intestinal mucosa Vet Immunol Immunopathol. **14**:23-44.
21. **Bitzan, M., S. Richardson, C. Huang, B. Boyd, M. Petric, and M. A. Karmali** 1994. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro Infect Immun. **62**:3337-47.

22. **Bitzan, M. M., Y. Wang, J. Lin, and P. A. Marsden** 1998. Verotoxin and ricin have novel effects on preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (ecNOS) expression and NO production in vascular endothelium *J Clin Invest.* **101**:372-82.
23. **Blessenohl, M.** 2003. Untersuchungen zur Wirkung von Shigatoxin 1 von *E. coli* auf ileale intraepitheliale Lymphozyten des Rindes. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen.
24. **Blessenohl, M., C. Menge, and G. Baljer** 2000. Bovine ileal intraepithelial lymphocytes represent target cells for Shiga toxin 1, p. abstr. 304; S. 131. In: Abstracts of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections 2000.
25. **Bliska, J. B., K. L. Guan, J. E. Dixon, and S. Falkow** 1991. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:1187-91.
26. **Boelaert, J. R., B. F. Cantinieaux, C. F. Hariga, and P. G. Fondu** 1990. Recombinant erythropoietin reverses polymorphonuclear granulocyte dysfunction in iron-overloaded dialysis patients *Nephrol Dial Transplant.* **5**:504-17.
27. **Böhmer, R. H., L. S. Trinkle, and J. L. Staneck** 1992. Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst *Cytometry.* **13**:525-31.
28. **Bonnet, R., B. Souweine, G. Gauthier, C. Rich, V. Livrelli, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier** 1998. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults *J Clin Microbiol.* **36**:1777-80.
29. **Bottone, E. J.** 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism *CRC Crit Rev Microbiol.* **5**:211-41.
30. **Boyd, B., and C. Lingwood** 1989. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue *Nephron.* **51**:207-10.
31. **Boyd, B., S. Richardson, and J. Gariepy** 1991. Serological responses to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter action of the toxin *Infect Immun.* **59**:750-7.
32. **Boyd, B., G. Tyrrell, M. Maloney, C. Gyles, J. Brunton, and C. Lingwood** 1993. Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs *J Exp Med.* **177**:1745-53.

33. **Bridgewater, F. A. J., R. S. Morgan, K. E. K. Rowson, and G. Payling-Wright** 1955. The neurotoxin of *Shigella shigae*. Morphological and functional lesions produced in the nervous system of rabbits. *Br. J. Exp. Pathol.* **36**:447-453.
34. **Brown, J. E., P. Echeverria, and A. A. Lindberg** 1991. Digalactosyl-containing glycolipids as cell surface receptors for shiga toxin of *Shigella dysenteriae* 1 and related cytotoxins of *Escherichia coli* *Rev Infect Dis.* **13**:298-303.
35. **Bürgi, E., T. Sydler, H. U. Bertschinger, and A. Popischil** 1992. Mitteilung über das Vorkommen der Ödemkrankheit bei Zuchtschweinen. *TU.* **47**:582-588.
36. **Calderwood, S. B., F. Auclair, A. Donohue-Rolfe, G. T. Keusch, and J. J. Mekalanos** 1987. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**:4364-8.
37. **Calderwood, S. B., A. D. W. K., G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth** 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* **62**:118-119.
38. **Calderwood, S. B., and J. J. Mekalanos** 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus *J Bacteriol.* **169**:4759-64.
39. **Chart, H., S. M. Scotland, and B. Rowe** 1989. Production of vero cytotoxin by *Escherichia coli* and Shiga toxin by *Shigella dysenteriae* 1 as related to the growth medium and availability of iron *Zentralbl Bakteriologie.* **272**:1-10.
40. **Chen, L. M., S. Hobbie, and J. E. Galan** 1996. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses *Science.* **274**:2115-8.
41. **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson** 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells *Infect Immun.* **66**:1237-43.
42. **Cohen, A., G. E. Hannigan, B. R. Williams, and C. A. Lingwood** 1987. Roles of globotriosyl- and galabiosylceramide in verotoxin binding and high affinity interferon receptor *J Biol Chem.* **262**:17088-91.
43. **Colgan, S. P., C. A. Parkos, C. Delp, M. A. Arnaout, and J. L. Madara** 1993. Neutrophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers is modulated by epithelial exposure to IFN-gamma in a highly polarized fashion *J Cell Biol.* **120**:785-98.
44. **Cooling, L. L., K. E. Walker, T. Gille, and T. A. Koerner** 1998. Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid *Infect Immun.* **66**:4355-66.

45. **Cornelis, G. R.** 1994. *Yersinia* pathogenicity factors Curr Top Microbiol Immunol. **192**:243-63.
46. **Cornick, N. A., S. L. Booher, T. A. Casey, and H. W. Moon** 2000. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes Appl Environ Microbiol. **66**:4926-34.
47. **Cover, T. L., and R. C. Aber** 1989. *Yersinia enterocolitica* N Engl J Med. **321**:16-24.
48. **Cray, W. C., Jr., and H. W. Moon** 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7 Appl Environ Microbiol. **61**:1586-90.
49. **Criss, A. K., M. Silva, J. E. Casanova, and B. A. McCormick** 2001. Regulation of *Salmonella*-induced neutrophil transmigration by epithelial ADP-ribosylation factor 6 J Biol Chem. **276**:48431-9.
50. **Darwin, K. H., and V. L. Miller** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa Clin Microbiol Rev. **12**:405-28.
51. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, W. C. Cray, Jr., and H. W. Moon** 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves Infect Immun. **65**:1842-8.
52. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, H. W. Moon, and A. D. O'Brien** 1998. Bovine infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*., p. 261-267. In J. Kaper, and A. D. O'Brien (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.
53. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, H. W. Moon, and A. D. O'Brien** 1998. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves Infect Immun. **66**:4560-3.
54. **DeGrandis, S., J. Ginsberg, M. Toone, S. Climie, J. Friesen, and J. Brunton** 1987. Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B J Bacteriol. **169**:4313-9.
55. **DeGrandis, S., H. Law, J. Brunton, C. Gyles, and C. A. Lingwood** 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin J Biol Chem. **264**:12520-5.
56. **Deibel, C., S. Kramer, T. Chakraborty, and F. Ebel** 1998. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein Mol Microbiol. **28**:463-74.

57. **Delor, I., A. Kaeckenbeeck, G. Wauters, and G. R. Cornelis** 1990. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae *Infect Immun.* **58**:2983-8.
58. **Devenish, J., C. Gyles, and J. LaMarre** 1998. Binding of *Escherichia coli* verotoxins to cell surface protein on wild-type and globotriaosylceramide-deficient Vero cells *Can J Microbiol.* **44**:28-34.
59. **Donnenberg, M. S., and T. S. Whittam** 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* *J Clin Invest.* **107**:539-48.
60. **Donohue-Rolfe, A., D. W. Acheson, A. V. Kane, and G. T. Keusch** 1989. Purification of Shiga toxin and Shiga-like toxins I and II by receptor analog affinity chromatography with immobilized P1 glycoprotein and production of cross-reactive monoclonal antibodies *Infect Immun.* **57**:3888-93.
61. **Dotta, U., R. Guglielmino, A. Cagnasso, A. D'Angelo, S. Prato, and M. Bosso** 1999. Effects of subclinical bovine paratuberculosis on in-vitro polymorphonuclear neutrophil migration *J Comp Pathol.* **121**:399-403.
62. **Dower, S. K., J. E. Sims, D. P. Cerretti, and T. A. Bird** 1992. The interleukin-1 system: receptors, ligands and signals *Chem Immunol.* **51**:33-64.
63. **Dubos, R. J., and J. W. Geiger** 1946. Preparation and properties of Shiga toxin and toxoid *J. Exp. Med.* **84**:143-156.
64. **Duhamel, G. E., R. A. Moxley, C. W. Maddox, and E. D. Erickson** 1992. Enteric infection of a goat with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O103:H2) *J Vet Diagn Invest.* **4**:197-200.
65. **Dytoc, M. T., A. Ismaili, D. J. Philpott, R. Soni, J. L. Brunton, and P. M. Sherman** 1994. Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21 *Infect Immun.* **62**:3494-505.
66. **Eaves-Pyles, T., C. Szabo, and A. L. Salzman** 1999. Bacterial invasion is not required for activation of NF-kappaB in enterocytes *Infect Immun.* **67**:800-4.
67. **Ebnet, K., E. P. Kaldjian, A. O. Anderson, and S. Shaw** 1996. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions *Annu Rev Immunol.* **14**:155-77.
68. **Eckmann, L., H. C. Jung, C. Schurer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff** 1993. Differential cytokine expression by human intestinal

- epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8 *Gastroenterology*. **105**:1689-97.
69. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer** 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry *Infect Immun*. **61**:4569-74.
70. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer** 1995. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system *Trends Microbiol*. **3**:118-20.
71. **Eiklid, K., and S. Olsnes** 1980. Interaction of *Shigella shigae* cytotoxin with receptors on sensitive and insensitive cells *J Recept Res*. **1**:199-213.
72. **Elewaut, D., J. A. DiDonato, J. M. Kim, F. Truong, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff** 1999. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria *J Immunol*. **163**:1457-66.
73. **Elliott, E., Z. Li, C. Bell, D. Stiel, A. Buret, J. Wallace, I. Brzuszcak, and E. O'Loughlin** 1994. Modulation of host response to *Escherichia coli* O157:H7 infection by anti-CD18 antibody in rabbits *Gastroenterology* **106**:1554-61.
74. **Ellis, J. A., W. C. Davis, N. D. MacHugh, D. L. Emery, A. Kaushal, and W. I. Morrison** 1988. Differentiation antigens on bovine mononuclear phagocytes identified by monoclonal antibodies *Vet Immunol Immunopathol*. **19**:325-40.
75. **Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara, and K. Igarashi** 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins *Eur J Biochem*. **171**:45-50.
76. **Falkow, S., and J. Mekalanos** 1990. Enteric bacilli, p. 574-576. *In* B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, and H. S. Ginsberg (eds), *Microbiology* 4th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa.
77. **Feng, P., S. D. Weagant, and S. R. Monday** 2001. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis *J Clin Microbiol*. **39**:24-8.
78. **Fernández, G. C., C. Rubel, G. Dran, S. Gomez, M. A. Isturiz, and M. S. Palermo** 2000. Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome *Clin Immunol*. **95**:227-34.
79. **Figura, N.** 1996. *Helicobacter pylori* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection *Aliment Pharmacol Ther*. **10**:79-96.
80. **Fiocchi, C.** 1997. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions *Am J Physiol*. **273**:G769-75.

81. **Fitzpatrick, M. M., V. Shah, G. Filler, M. J. Dillon, and T. M. Barratt** 1992. Neutrophil activation in the haemolytic uraemic syndrome: free and complexed elastase in plasma *Pediatr Nephrol.* **6**:50-3.
82. **Fitzpatrick, M. M., V. Shah, R. S. Trompeter, M. J. Dillon, and T. M. Barratt** 1992. Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood *Kidney Int.* **42**:951-6.
83. **Forsyth, K. D., A. C. Simpson, M. M. Fitzpatrick, T. M. Barratt, and R. J. Levinsky** 1989. Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome *Lancet.* **2**:411-4.
84. **Fujiwara, Y., T. Arakawa, T. Fukuda, E. Sasaki, K. Nakagawa, K. Fujiwara, K. Higuchi, K. Kobayashi, and A. Tarnawski** 1997. Interleukin-8 stimulates leukocyte migration across a monolayer of cultured rabbit gastric epithelial cells. Effect associated with the impairment of gastric epithelial barrier function *Dig Dis Sci.* **42**:1210-5.
85. **Galligan, C. L., and B. L. Coomber** 2000. Effects of human IL-8 isoforms on bovine neutrophil function in vitro *Vet Immunol Immunopathol.* **74**:71-85.
86. **Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges, and T. S. Wallis** 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa *Mol Microbiol.* **25**:903-12.
87. **Gannon, V. P., and C. L. Gyles** 1990. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease *Vet Microbiol.* **24**:89-100.
88. **Gentry, M. K., and J. M. Dalrymple** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin *J Clin Microbiol.* **12**:361-6.
89. **Gewirtz, A. T., A. M. Siber, J. L. Madara, and B. A. McCormick** 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization *Infect Immun.* **67**:608-17.
90. **Gewirtz, A. T., P. O. Simon, Jr., C. K. Schmitt, L. J. Taylor, C. H. Hagedorn, A. D. O'Brien, A. S. Neish, and J. L. Madara** 2001. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response *J Clin Invest.* **107**:99-109.

91. **Gomez, H. F., V. Diaz-Gonzalez, I. Herrera-Insua, P. Chaturvedi, D. S. Newburg, and C. T.G.** 1997. Human milk lipids bind SLT-1. Abstr. 3rd Int.Symp.Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections, Baltimore, USA.
92. **Goosney, D. L., J. Celli, B. Kenny, and B. B. Finlay** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis Infect Immun. **67**:490-5.
93. **Grauke, L. J., I. T. Kudva, J. W. Yoon, C. W. Hunt, C. J. Williams, and C. J. Hovde** 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants Appl Environ Microbiol. **68**:2269-77.
94. **Green, L. M., J. L. Reade, and C. F. Ware** 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines J Immunol Methods. **70**:257-68.
95. **Griffin, P. M.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In P. D. S. In M. J. Blaser, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (ed.), (ed.), Infections of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, Ltd., New York.
96. **Habib, N. F., and M. P. Jackson** 1993. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes J Bacteriol. **175**:597-603.
97. **Hakomori, S.** 1986. Glycosphingolipids Sci Am. **254**:44-53.
98. **Hall, G. A., N. Chanter, and A. P. Bland** 1988. Comparison in gnotobiotic pigs of lesions caused by verotoxigenic and non-verotoxigenic *Escherichia coli* Vet Pathol. **25**:205-10.
99. **Hall, G. A., D. J. Reynolds, N. Chanter, J. H. Morgan, K. R. Parsons, T. G. Debney, A. P. Bland, and J. C. Bridger** 1985. Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease Vet Pathol. **22**:156-63.
100. **Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzer, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken** 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis Infect Immun. **57**:673-8.
101. **Hardt, W. D., H. Urlaub, and J. E. Galan** 1998. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage Proc Natl Acad Sci U S A. **95**:2574-9.
102. **Hartiala, K. T., I. Granberg, A. Toivanen, and M. Viljanen** 1989. Inhibition of polymorphonuclear leucocyte functions in vivo by *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide Ann Rheum Dis. **48**:42-7.

103. **Hattar, K., L. Fink, K. Fietzner, B. Himmel, F. Grimminger, W. Seeger, and U. Sibelius** 2001. Cell density regulates neutrophil IL-8 synthesis: role of IL-1 receptor antagonist and soluble TNF receptors *J Immunol.* **166**:6287-93.
104. **Head, S., K. Ramotar, and C. Lingwood** 1990. Modification of the glycolipid-binding specificity of vero cytotoxin by polymyxin B and other cyclic amphipathic peptides *Infect Immun.* **58**:1532-7.
105. **Head, S. C., M. Petric, S. Richardson, M. Roscoe, and M. A. Karmali** 1988. Purification and characterization of Verocytotoxin 2. *FEMS Lett.* **51**:211-216.
106. **Hedlund, M., R. D. Duan, A. Nilsson, and C. Svanborg** 1998. Sphingomyelin, glycosphingolipids and ceramide signalling in cells exposed to P-fimbriated *Escherichia coli* *Mol Microbiol.* **29**:1297-306.
107. **Hedlund, M., M. Svensson, A. Nilsson, R. D. Duan, and C. Svanborg** 1996. Role of the ceramide-signaling pathway in cytokine responses to P-fimbriated *Escherichia coli* *J Exp Med.* **183**:1037-44.
108. **Heuvelink, A. E., N. C. van de Kar, J. F. Meis, L. A. Monnens, and W. J. Melchers** 1995. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe *Epidemiol Infect.* **115**:1-14.
109. **Hoch, R. C., I. U. Schraufstatter, and C. G. Cochrane** 1996. In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors *J Lab Clin Med.* **128**:134-45.
110. **Hoey, D. E., C. Currie, R. W. Else, A. Nutikka, C. A. Lingwood, D. L. Gally, and D. G. Smith** 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium *J Med Microbiol.* **51**:143-9.
111. **Hoffman, M., T. Casey, and B. T. Bosworth** 1997. Bovine immune response to *Escherichia coli* O157, p. V67/VIII; S. 117. In: Abstracts of the 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections 1997.
112. **Hofman, P., G. Flatau, E. Selva, M. Gauthier, G. Le Negrate, C. Fiorentini, B. Rossi, and P. Boquet** 1998. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 effaces microvilli and decreases transmigration of polymorphonuclear leukocytes in intestinal T84 epithelial cell monolayers *Infect Immun.* **66**:2494-500.
113. **Hofman, P., M. Piche, D. F. Far, G. Le Negrate, E. Selva, L. Landraud, A. Alliana-Schmid, P. Boquet, and B. Rossi** 2000. Increased *Escherichia coli*

- phagocytosis in neutrophils that have transmigrated across a cultured intestinal epithelium *Infect Immun.* **68**:449-55.
114. **Holgersson, J., P. A. Jovall, and M. E. Breimer** 1991. Glycosphingolipids of human large intestine: detailed structural characterization with special reference to blood group compounds and bacterial receptor structures *J Biochem (Tokyo)*. **110**:120-31.
  115. **Hong, Y. S.** 1992. Polymorphonuclear leukocyte functions enhanced by chemotaxis *J Korean Med Sci.* **7**:307-13.
  116. **Howard, J. G.** 1955. Observations on the intoxication produced in mice and rabbits by the neurotoxin of *Shigella shigae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **36**:439-446.
  117. **Huang, A., S. de Grandis, J. Friesen, M. Karmali, M. Petric, R. Congi, and J. L. Brunton** 1986. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19 *J Bacteriol.* **166**:375-9.
  118. **Huang, A., J. Friesen, and J. L. Brunton** 1987. Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli* *J Bacteriol.* **169**:4308-12.
  119. **Hughes, A. K., P. K. Stricklett, and D. E. Kohan** 1998. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubule cells *Kidney Int.* **54**:426-37.
  120. **Hughes, D. A., G. C. Smith, J. E. Davidson, A. V. Murphy, and T. J. Beattie** 1996. The neutrophil oxidative burst in diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome *Pediatr Nephrol.* **10**:445-7.
  121. **Hurley, B. P., M. Jacewicz, C. M. Thorpe, L. L. Lincicome, A. J. King, G. T. Keusch, and D. W. Acheson** 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells *Infect Immun.* **67**:6670-7.
  122. **Hurley, B. P., C. M. Thorpe, and D. W. Acheson** 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration *Infect Immun.* **69**:6148-55.
  123. **Ina, K., K. Kusugami, T. Hosokawa, A. Imada, T. Shimizu, T. Yamaguchi, M. Ohsuga, K. Kyokane, T. Sakai, Y. Nishio, Y. Yokoyama, and T. Ando** 1999. Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease *J Gastroenterol Hepatol.* **14**:46-53.
  124. **Inward, C. D., A. J. Howie, M. M. Fitzpatrick, F. Rafaat, D. V. Milford, and C. M. Taylor** 1997. Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *British Association for Paediatric Nephrology Pediatr Nephrol.* **11**:556-9.

125. **Inward, C. D., J. Williams, I. Chant, J. Crocker, D. V. Milford, P. E. Rose, and C. M. Taylor** 1995. Verocytotoxin-1 induces apoptosis in vero cells J Infect. **30**:213-8.
126. **Isberg, R. R., and J. M. Leong** 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells Cell. **60**:861-71.
127. **Jacewicz, M. S., D. W. Acheson, D. G. Binion, G. A. West, L. L. Lincicome, C. Fiocchi, and G. T. Keusch** 1999. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis Infect Immun. **67**:1439-44.
128. **Janeway, C. A., and P. Travers** 1997. Immunologie, 2. Auflage ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
129. **Johnson, R. P., W. C. Cray, Jr., and S. T. Johnson** 1996. Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7 Infect Immun. **64**:1879-83.
130. **Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Bezanson** 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada Lancet. **1**:76.
131. **Jones, N. L., A. Islur, R. Haq, M. Mascarenhas, M. A. Karmali, M. H. Perdue, B. W. Zanke, and P. M. Sherman** 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**:G811-9.
132. **Jordan, M., I. G. Otterness, R. Ng, A. Gessner, M. Rollinghoff, and H. U. Beuscher** 1995. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist J Immunol. **154**:4081-90.
133. **Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion J Clin Invest. **95**:55-65.
134. **Jungi, T. W.** 1999. Einführung in die Immunbiologie für Studierende der Veterinärmedizin (Block 1 des 6teiligen Immunologielehrgangs), S. 1-74, Institut für Veterinär-Virologie, Universität Bern.
135. **Jungi, T. W.** 1999. Immunologie-Ringvorlesung für Fortgeschrittene – Nonspezifische Zelluläre Effektor-Mechanismen, S. 1-7, Institut für Veterinär-Virologie, Universität Bern.
136. **Junkins, A. D., and M. P. Doyle** 1992. Demonstration of exopolysaccharide production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* Curr Microbiol. **25**:9-17.

137. **Kaper, J., S. Elliott, V. Sperandio, N. T. Perna, G. F. Mayhew, and F. R. Blattner** 1998. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement, p. 163-182. In J. Kaper, and A. D. O'Brien (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology.
138. **Kaper, J. B.** 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Curr Opin Microbiol. **1**:103-8.
139. **Kaplan, B. S., T. G. Cleary, and T. G. Obrig** 1990. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes Pediatr Nephrol. **4**:276-83.
140. **Kaplan, B. S., K. E. Meyers, and S. L. Schulman** 1998. The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome J Am Soc Nephrol. **9**:1126-33.
141. **Karch, H., F. Gunzer, A. Schwarzkopf, H. Schmidt, and M. Bitzan** 1993. Molekularbiologie und pathogenetische Bedeutung von Shiga- und Shiga-like Toxinen. Bioengineering. **3/93**:39-45.
142. **Karch, H., H. Schmidt, C. Janetzki-Mittmann, J. Scheef, and M. Kroger** 1999. Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages Mol Gen Genet. **262**:600-7.
143. **Karmali, M. A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Clin Microbiol Rev. **2**:15-38.
144. **Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior** 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* J Infect Dis. **151**:775-82.
145. **Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, and C. Lim** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools Lancet. **1**:619-20.
146. **Kaye, S. A., C. B. Louise, B. Boyd, C. A. Lingwood, and T. G. Obrig** 1993. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro Infect Immun. **61**:3886-91.
147. **Keates, S., Y. S. Hitti, M. Upton, and C. P. Kelly** 1997. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells Gastroenterology. **113**:1099-109.

148. **Keene, W. E., E. Sazie, J. Kok, D. H. Rice, D. D. Hancock, V. K. Balan, T. Zhao, and M. P. Doyle** 1997. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat Jama. **277**:1229-31.
149. **Kelly, J., A. Oryshak, M. Wenetsek, J. Grabiec, and S. Handy** 1990. The colonic pathology of *Escherichia coli* 0157:H7 infection Am J Surg Pathol. **14**:87-92.
150. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells Cell. **91**:511-20.
151. **Kettritz, R., M. L. Gaido, H. Haller, F. C. Luft, C. J. Jennette, and R. J. Falk** 1998. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils Kidney Int. **53**:84-91.
152. **Keusch, G. T., D. W. Acheson, L. Aaldering, J. Erban, and M. S. Jacewicz** 1996. Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells J Infect Dis. **173**:1164-70.
153. **Khine, A. A., M. Firtel, and C. A. Lingwood** 1998. CD77-dependent retrograde transport of CD19 to the nuclear membrane: functional relationship between CD77 and CD19 during germinal center B-cell apoptosis J Cell Physiol. **176**:281-92.
154. **King, A. J., S. Sundaram, M. Cendoroglo, D. W. Acheson, and G. T. Keusch** 1999. Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters J Infect Dis. **179**:503-7.
155. **Kirschning, C. J., and S. Bauer** 2001. Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses Int J Med Microbiol. **291**:251-60.
156. **Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli* Infect Immun. **18**:775-9.
157. **Kozol, R., A. Domanowski, R. Jaszewski, R. Czanko, B. McCurdy, M. Prasad, B. Fromm, and R. Calzada** 1991. Neutrophil chemotaxis in gastric mucosa. A signal-to-response comparison Dig Dis Sci. **36**:1277-80.
158. **Krull, M., C. Dold, S. Hippenstiel, S. Rosseau, J. Lohmeyer, and N. Suttorp** 1996. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus* alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells J Immunol. **157**:4133-40.
159. **Kucharzik, T., S. V. Walsh, J. Chen, C. A. Parkos, and A. Nusrat** 2001. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins Am J Pathol. **159**:2001-9.

160. **Kudo, M., M. Asaka, M. Kato, M. Katagiri, H. Kagaya, K. Nishikawa, T. Koshiyama, K. Hokari, T. Meguro, H. Takeda, and et al.** 1995. Role of *Helicobacter pylori* in chronic gastritis: a prospective study J Clin Gastroenterol. **21**:S174-8.
161. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose J Biochem Biophys Methods. **10**:203-9.
162. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature. **227**:680-5.
163. **Law, D.** 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* Clin Microbiol Rev. **7**:152-73.
164. **Lee, C. A., M. Silva, A. M. Siber, A. J. Kelly, E. Galyov, and B. A. McCormick** 2000. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration Proc Natl Acad Sci U S A. **97**:12283-8.
165. **Lian, C. J., W. S. Hwang, and C. H. Pai** 1987. Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica* Infect Immun. **55**:1176-83.
166. **Lindberg, A. A., J. E. Brown, N. Stromberg, M. Westling-Ryd, J. E. Schultz, and K. A. Karlsson** 1987. Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1 J Biol Chem. **262**:1779-85.
167. **Lingwood, C. A.** 1996. Aglycone modulation of glycolipid receptor function Glycoconj J. **13**:495-503.
168. **Lingwood, C. A.** 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis Trends Microbiol. **4**:147-53.
169. **Lingwood, C. A.** 1994. Verotoxin-binding in human renal sections Nephron. **66**:21-8.
170. **Lingwood, C. A., and S. K. Yiu** 1992. Glycolipid modification of alpha 2 interferon binding. Sequence similarity between the alpha 2 interferon receptor and verotoxin (Shiga-like toxin) B-subunit Biochem J. **283**:25-6.
171. **Liu, J., T. Akahoshi, T. Sasahana, H. Kitasato, R. Namai, T. Sasaki, M. Inoue, and H. Kondo** 1999. Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7 Infect Immun. **67**:6203-5.
172. **Lloyd, A. R., A. Biragyn, J. A. Johnston, D. D. Taub, L. Xu, D. Michiel, H. Sprenger, J. J. Oppenheim, and D. J. Kelvin** 1995. Granulocyte-colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptors on polymorphonuclear leukocytes J Biol Chem. **270**:28188-92.

173. **Louise, C. B., and T. G. Obrig** 1991. Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro *Infect Immun.* **59**:4173-9.
174. **Louise, C. B., and T. G. Obrig** 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells *J Infect Dis.* **172**:1397-401.
175. **Madara, J. L., T. W. Patapoff, B. Gillece-Castro, S. P. Colgan, C. A. Parkos, C. Delp, and R. J. Mrsny** 1993. 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers *J Clin Invest.* **91**:2320-5.
176. **Mainil, J.** 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals *Vet Res.* **30**:235-57.
177. **Mangeny, M., C. A. Lingwood, S. Taga, B. Caillou, T. Tursz, and J. Wiels** 1993. Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb<sub>3</sub>/CD77, a glycolipid antigen *Cancer Res.* **53**:5314-9.
178. **Mangeny, M., Y. Richard, D. Coulaud, T. Tursz, and J. Wiels** 1991. CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis *Eur J Immunol.* **21**:1131-40.
179. **Martin, M. L., L. D. Shipman, J. G. Wells, M. E. Potter, K. Hedberg, I. K. Wachsmuth, R. V. Tauxe, J. P. Davis, J. Arnoldi, and J. Tilleli** 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome *Lancet.* **2**:1043.
180. **Matsushiro, A., K. Sato, H. Miyamoto, T. Yamamura, and T. Honda** 1999. Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin *J Bacteriol.* **181**:2257-60.
181. **Matzer, S. P., T. Baumann, and H. U. Beuscher** 2002. Neutrophile Granulozyten - von der Effektorzelle zum Regulator der Immunantwort *Immunologie aktuell.* **2**:132-134.
182. **Maurelli, A. T., R. E. Fernandez, C. A. Bloch, C. K. Rode, and A. Fasano** 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:3943-8.
183. **McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller, and J. L. Madara** 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils *J Cell Biol.* **123**:895-907.

184. **McCormick, B. A., M. I. Fernandez, A. M. Siber, and A. T. Maurelli** 1999. Inhibition of *Shigella flexneri*-induced transepithelial migration of polymorphonuclear leucocytes by cadaverine Cell Microbiol. **1**:143-55.
185. **McCormick, B. A., P. M. Hofman, J. Kim, D. K. Carnes, S. I. Miller, and J. L. Madara** 1995. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils J Cell Biol. **131**:1599-608.
186. **McCormick, B. A., S. I. Miller, D. Carnes, and J. L. Madara** 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis Infect Immun. **63**:2302-9.
187. **McCormick, B. A., A. Nusrat, C. A. Parkos, L. D'Andrea, P. M. Hofman, D. Carnes, T. W. Liang, and J. L. Madara** 1997. Unmasking of intestinal epithelial lateral membrane beta1 integrin consequent to transepithelial neutrophil migration in vitro facilitates inv-mediated invasion by *Yersinia pseudotuberculosis* Infect Immun. **65**:1414-21.
188. **McCormick, B. A., C. A. Parkos, S. P. Colgan, D. K. Carnes, and J. L. Madara** 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium* J Immunol. **160**:455-66.
189. **McCormick, B. A., A. M. Siber, and A. T. Maurelli** 1998. Requirement of the *Shigella flexneri* virulence plasmid in the ability to induce trafficking of neutrophils across polarized monolayers of the intestinal epithelium Infect Immun. **66**:4237-43.
190. **Menge, C.** 1996. Untersuchungen zur Wirkung des Shiga-like-Toxins-I (SLT-I) von *Escherichia coli* auf Immunzellen des Rindes. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen.
191. **Menge, C., B. Neufeld, W. Hirt, N. Schmeer, R. Bauerfeind, G. Baljer, and L. H. Wieler** 1998. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf Vet Immunol Immunopathol. **62**:309-21.
193. **Menge, C., I. Stamm, M. Blessenohl, L. H. Wieler, and G. Baljer** 2003. Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb<sub>3</sub>/CD77<sup>+</sup> bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha Experimental Biology and Medicine **228**:377-86.
194. **Menge, C., I. Stamm, M. Wuhrer, R. Geyer, L. H. Wieler, and G. Baljer** 2001. Globotriaosylceramide (Gb(3)/CD77) is synthesized and surface expressed by bovine lymphocytes upon activation in vitro Vet Immunol Immunopathol. **83**:19-36.

195. **Menge, C., L. H. Wieler, T. Schlapp, and G. Baljer** 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro *Infect Immun.* **67**:2209-17.
196. **Middlebrook, J. L., and R. B. Dorland** 1984. Bacterial toxins: cellular mechanisms of action *Microbiol Rev.* **48**:199-221.
197. **Moghal, N. E., M. A. Ferreira, A. J. Howie, D. V. Milford, E. Raafat, and C. M. Taylor** 1998. The late histologic findings in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome *J Pediatr.* **133**:220-3.
198. **Monack, D. M., J. Mecsas, D. Bouley, and S. Falkow** 1998. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice *J Exp Med.* **188**:2127-37.
199. **Morabito, S., G. Dell'Omo, U. Agrimi, H. Schmidt, H. Karch, T. Cheasty, and A. Caprioli** 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons *Vet Microbiol.* **82**:275-83.
200. **Morris, K. P., M. G. Coulthard, and J. N. Matthews** 1991. Predicting outcome after childhood hemolytic uremic syndrome *Clin Nephrol.* **36**:263-4.
201. **Mounier, J., T. Vasselon, R. Hellio, M. Lesourd, and P. J. Sansonetti** 1992. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole *Infect Immun.* **60**:237-48.
202. **Muhldorfer, I., J. Hacker, G. T. Keusch, D. W. Acheson, H. Tschape, A. V. Kane, A. Ritter, T. Olschlager, and A. Donohue-Rolfe** 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli* *Infect Immun.* **64**:495-502.
203. **Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima** 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression *J Leukoc Biol.* **56**:554-8.
204. **Munzenmaier, A., C. Lange, E. Glocker, A. Covacci, A. Moran, S. Bereswill, P. A. Baeuerle, M. Kist, and H. L. Pahl** 1997. A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B *J Immunol.* **159**:6140-7.
205. **Nakagawa, I., M. Nakata, S. Kawabata, and S. Hamada** 1999. Regulated expression of the Shiga toxin B gene induces apoptosis in mammalian fibroblastic cells *Mol Microbiol.* **33**:1190-9.
206. **Nanivadekar, S. A., P. P. Bhat, P. D. Sawant, C. P. Shroff, and H. D. Patel** 1990. Unusual features of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*--associated gastritis in India. A study of 200 cases *J Assoc Physicians India.* **38**:695-8.

207. **Nash, S., J. Stafford, and J. L. Madara** 1987. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers J Clin Invest. **80**:1104-13.
208. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli* Clin Microbiol Rev. **11**:142-201.
209. **Neely, M. N., and D. I. Friedman** 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release Mol Microbiol. **28**:1255-67.
210. **Neter, E.** 1982. Enterobacteriaceae I, p. 301-303. In F. Milgrom, and T. D. Flanagan (eds), Medical microbiology. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
211. **Newburg, D. S., S. Ashkenazi, and T. G. Cleary** 1992. Human milk contains the Shiga toxin and Shiga-like toxin receptor glycolipid Gb<sub>3</sub> J Infect Dis. **166**:832-6.
212. **Newland, J. W., N. A. Strockbine, and R. J. Neill** 1987. Cloning of genes for production of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II Infect Immun. **55**:2675-80.
213. **Niebuhr, K.** 1991. Biochemische und immunologische Charakterisierung der rekombinanten B-Untereinheit des Shigatoxins. Dipl. Biol. Universität Braunschweig.
214. **Notario, R., E. Morales, E. Carmelengo, N. Borda, N. Binsztein, A. Depetris, T. Gambande, D. Grinberg, V. Herrera, I. Sas, and et al.** 1993. [Enteropathogenic microorganisms in children with acute diarrhea in 2 hospitals of Rosario, Argentina] Medicina (B Aires). **53**:289-99.
215. **Nusrat, A., M. Giry, J. R. Turner, S. P. Colgan, C. A. Parkos, D. Carnes, E. Lemichez, P. Boquet, and J. L. Madara** 1995. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia Proc Natl Acad Sci U S A. **92**:10629-33.
216. **O'Brien, A. D., M. E. Chen, R. K. Holmes, J. Kaper, and M. M. Levine** 1984. Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. Lancet. **1**:77-78.
217. **O'Brien, A. D., and R. K. Holmes** 1987. Shiga and Shiga-like toxins Microbiol Rev. **51**:206-20.
218. **O'Brien, A. D., and J. Kaper** 1998. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*: Yesterday, Today, and Tomorrow, p. 1-11. In J. Kaper, and A. D. O'Brien (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology.

219. **O'Brien, A. D., M. A. Karmali, and S. M. Scotland** 1994. A proposal for rationalizing the nomenclature of the *Escherichia coli* cytotoxins Abstr. O2.8:26 2<sup>nd</sup> Int.Symp.Workshop VTEC infections, Bergamo, Italy.
220. **O'Brien, A. D., and G. D. LaVeck** 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli* Infect Immun. **40**:675-83.
221. **O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson, and S. B. Formal** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli* J Infect Dis. **146**:763-9.
222. **O'Brien, A. D., L. R. Marques, C. F. Kerry, J. W. Newland, and R. K. Holmes** 1989. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933 Microb Pathog. **6**:381-90.
223. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis Curr Top Microbiol Immunol. **180**:65-94.
224. **O'Brien, A. D., M. R. Thompson, J. R. Cantey, and S. B. Formal** 1977. Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*, abstr. B-103, p. 32. In Abstracts of the 77th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1977.
225. **O'Brien, A. O., T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, and S. B. Formal** 1983. *Escherichia coli* 0157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin Lancet. **1**:702.
226. **Obrig, T. G., P. J. Del Vecchio, J. E. Brown, T. P. Moran, B. M. Rowland, T. K. Judge, and S. W. Rothman** 1988. Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells Infect Immun. **56**:2373-8.
227. **Obrig, T. G., C. B. Louise, C. A. Lingwood, B. Boyd, L. Barley-Maloney, and T. O. Daniel** 1993. Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses J Biol Chem. **268**:15484-8.
228. **Ohmi, K., N. Kiyokawa, T. Takeda, and J. Fujimoto** 1998. Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins Biochem Biophys Res Commun. **251**:137-41.
229. **O'Loughlin, E. V., and R. M. Robins-Browne** 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells Microbes Infect. **3**:493-507.

230. **Olsnes, S., R. Reisbig, and K. Eiklid** 1981. Subunit structure of Shigella cytotoxin J Biol Chem. **256**:8732-8.
231. **Olson, D. P.** 1990. In vitro migration responses of neutrophils from cows and calves Am J Vet Res. **51**:973-7.
232. **Pai, C. H., J. K. Kelly, and G. L. Meyers** 1986. Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli* Infect Immun. **51**:16-23.
233. **Parkos, C. A., S. P. Colgan, M. S. Diamond, A. Nusrat, T. W. Liang, T. A. Springer, and J. L. Madara** 1996. Expression and polarization of intercellular adhesion molecule-1 on human intestinal epithelia: consequences for CD11b/CD18-mediated interactions with neutrophils Mol Med. **2**:489-505.
234. **Parsons, P. E., K. Sugahara, G. R. Cott, R. J. Mason, and P. M. Henson** 1987. The effect of neutrophil migration and prolonged neutrophil contact on epithelial permeability Am J Pathol. **129**:302-12.
235. **Paton, A. W., and J. C. Paton** 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111, and rfbO157 J Clin Microbiol. **36**:598-602.
236. **Paton, A. W., and J. C. Paton** 1999. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR J Clin Microbiol. **37**:3362-5.
237. **Paton, J. C., and A. W. Paton** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections Clin Microbiol Rev. **11**:450-79.
238. **Pearson, G. R., K. J. Bazeley, J. R. Jones, R. F. Gunning, M. J. Green, A. Cookson, and M. J. Woodward** 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**:370-3.
239. **Pellizzari, A., H. Pang, and C. A. Lingwood** 1992. Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content Biochemistry. **31**:1363-70.
240. **Pepe, J. C., and V. L. Miller** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection Proc Natl Acad Sci U S A. **90**:6473-7.
241. **Perdomo, J. J., P. Gounon, and P. J. Sansonetti** 1994. Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri* J Clin Invest. **93**:633-43.
242. **Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S.**

- Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Nature. **409**:529-33.
243. **Pirro, F.** 1993. Untersuchungen zur laktogenen Immunität des Rindes gegen Shiga-like Toxine von *E. coli*. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen.
244. **Pirro, F., L. H. Wieler, K. Failing, R. Bauerfeind, and G. Baljer** 1995. Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle Vet Microbiol. **43**:131-41.
245. **Plunkett, G., 3rd, D. J. Rose, T. J. Durfee, and F. R. Blattner** 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product J Bacteriol. **181**:1767-78.
246. **Pruimboom-Brees, I. M., T. W. Morgan, M. R. Ackermann, E. D. Nystrom, J. E. Samuel, N. A. Cornick, and H. W. Moon** 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins Proc Natl Acad Sci U S A. **97**:10325-9.
247. **Pruul, H., C. S. Goodwin, P. J. McDonald, G. Lewis, and D. Pankhurst** 1990. Hydrophobic characterisation of *Helicobacter (Campylobacter) pylori* J Med Microbiol. **32**:93-100.
248. **Ramegowda, B., and V. L. Tesh** 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines Infect Immun. **64**:1173-80.
249. **Reisbig, R., S. Olsnes, and K. Eiklid** 1981. The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit J Biol Chem. **256**:8739-44.
250. **Remuzzi, G., and P. Ruggenti** 1995. The hemolytic uremic syndrome Kidney Int. **48**:2-19.
251. **Reymunde, A., J. Deren, I. Nachamkin, D. Oppenheim, and G. Weinbaum** 1993. Production of chemoattractant by *Helicobacter pylori* Dig Dis Sci. **38**:1697-701.
252. **Richardson, S. E., M. A. Karmali, L. E. Becker, and C. R. Smith** 1988. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections Hum Pathol. **19**:1102-8.
253. **Riley, L. W.** 1987. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis Annu Rev Microbiol. **41**:383-407.

254. **Ritchie, M., S. Partington, J. Jessop, and M. T. Kelly** 1992. Comparison of a direct fecal Shiga-like toxin assay and sorbitol-MacConkey agar culture for laboratory diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection J Clin Microbiol. **30**:461-4.
255. **Robinson, L. A., R. M. Hurley, C. Lingwood, and D. G. Matsell** 1995. *Escherichia coli* verotoxin binding to human paediatric glomerular mesangial cells Pediatr Nephrol. **9**:700-4.
256. **Robson, W. L., A. K. Leung, T. Bowen, R. Brant, and E. Ching** 1994. The P1 blood group and the severity of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome Clin Nephrol. **42**:288-90.
257. **Roggenkamp, A., T. Bittner, L. Leitritz, A. Sing, and J. Heesemann** 1997. Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 Infect Immun. **65**:4705-10.
258. **Rose, P., and I. Chant** 1998. Hematology of Hemolytic-Uremic-Syndrome, p. 293-302. In J. Kaper, and A. D. O'Brien (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology.
259. **Rosqvist, R., I. Bolin, and H. Wolf-Watz** 1988. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein Infect Immun. **56**:2139-43.
260. **Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz** 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence Mol Microbiol. **4**:657-67.
261. **Rowe, P. C., E. Orrbine, G. A. Wells, and P. N. McLaine** 1991. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. The Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Centre J Pediatr. **119**:218-24.
262. **Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann** 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils Infect Immun. **64**:724-33.
263. **Sacco, R. E., D. L. Hutto, W. R. Waters, L. Xiasong, M. E. Kehrli, Jr., F. A. Zuckermann, and M. J. Wannemuehler** 2000. Reduction in inflammation following blockade of CD18 or CD29 adhesive pathways during the acute phase of a spirochetal-induced colitis in mice Microb Pathog. **29**:289-99.
264. **Sakiri, R., B. Ramegowda, and V. L. Tesh** 1998. Shiga toxin type 1 activates tumor necrosis factor-alpha gene transcription and nuclear translocation of the transcriptional activators nuclear factor-kappaB and activator protein-1 Blood. **92**:558-66.

265. **Salzman, M. B., R. B. Ettenger, and J. D. Cherry** 1991. Leukocytosis in hemolytic-uremic syndrome *Pediatr Infect Dis J.* **10**:470-1.
266. **Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg, and H. C. Krivan** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants *Infect Immun.* **58**:611-8.
267. **Sandvig, K., K. Prydz, M. Ryd, and B. van Deurs** 1991. Endocytosis and intracellular transport of the glycolipid-binding ligand Shiga toxin in polarized MDCK cells *J Cell Biol.* **113**:553-62.
268. **Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine, and A. Fasano** 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli* *J Infect Dis.* **173**:1019-22.
269. **Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht** 1997. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* *Am J Physiol.* **273**:C1160-7.
270. **Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht** 1996. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils *Infect Immun.* **64**:4480-7.
271. **Schauder, B., H. Blocker, R. Frank, and J. E. McCarthy** 1987. Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* atpE translational initiation region *Gene.* **52**:279-83.
272. **Schmidt, H., E. Maier, H. Karch, and R. Benz** 1996. Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 *Eur J Biochem.* **241**:594-601.
273. **Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, and H. Karch** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons *Appl Environ Microbiol.* **66**:1205-8.
274. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers *Faseb J.* **14**:1471-84.
275. **Schulte, R., P. Wattiau, E. L. Hartland, R. M. Robins-Browne, and G. R. Cornelis** 1996. Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica* *Infect Immun.* **64**:2106-13.

276. **Schulte, R., R. Zumbihl, D. Kampik, A. Fauconnier, and I. B. Autenrieth** 1998. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells *Med Microbiol Immunol (Berl)*. **187**:53-60.
277. **Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw, and B. Rowe** 1983. Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage *Lancet*. **2**:216.
278. **Sellak, H., E. Franzini, J. Hakim, and C. Pasquier** 1994. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation *Blood*. **83**:2669-77.
279. **Sharma, S. A., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and L. D. Kerr** 1998. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells *J Immunol*. **160**:2401-7.
280. **Shibata, M., T. Ohoka, S. Mizuno, and K. Suzuki** 1993. Characterization of a 64-kd protein phosphorylated during chemotactic activation with IL-8 and fMLP of human polymorphonuclear leukocytes. I. Phosphorylation of a 64-kd protein and other proteins *J Leukoc Biol*. **54**:1-9.
281. **Shiffer, Z., N. Zurgil, Y. Shafran, and M. Deutsch** 2001. Analysis of laser scattering pattern as an early measure of apoptosis *Biochem Biophys Res Commun*. **289**:1320-7.
282. **Shiga, K.** 1898. Über den Dysenterie-bacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Zentralbl. Bakteriol. Orig*. **24**:913-918.
283. **Simon, M., T. G. Cleary, J. D. Hernandez, and H. E. Abboud** 1998. Shiga toxin 1 elicits diverse biologic responses in mesangial cells *Kidney Int*. **54**:1117-27.
284. **Simonet, M., S. Richard, and P. Berche** 1990. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid *Infect Immun*. **58**:841-5.
285. **Slutsker, L., A. A. Ries, K. D. Greene, J. G. Wells, L. Hutwagner, and P. M. Griffin** 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features *Ann Intern Med*. **126**:505-13.
286. **Smith, D. G., S. W. Naylor, and D. L. Gally** 2002. Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle *Int J Med Microbiol*. **292**:169-83.
287. **Smith, H. W., P. Green, and Z. Parsell** 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs *J Gen Microbiol*. **129**:3121-37.

288. **Smits, E., C. Burvenich, A. J. Guidry, R. Heyneman, and A. Massart-Leen** 1999. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils *Vet Immunol Immunopathol.* **68**:169-76.
289. **Smits, E., C. Burvenich, and R. Heyneman** 1997. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood *Vet Immunol Immunopathol.* **56**:259-69.
290. **Stamm, I.** 2000. Untersuchungen zum Mechanismus der Shigatoxin-Wirkung auf Immunzellen des Rindes. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen.
291. **Stamm, I., M. Wuhrer, R. Geyer, G. Baljer, and C. Menge** 2002. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1 *Microbial Pathogenesis.* **33**:193-206.
292. **Stevens, M. P., O. Marches, J. Campbell, V. Huter, G. Frankel, A. D. Phillips, E. Oswald, and T. S. Wallis** 2002. Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops *Infect Immun.* **70**:945-52.
293. **Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1 *J Bacteriol.* **170**:1116-22.
294. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** 1985. Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli* *Infect Immun.* **50**:695-700.
295. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities *Infect Immun.* **53**:135-40.
296. **Sung, L. M., M. P. Jackson, A. D. O'Brien, and R. K. Holmes** 1990. Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli* *J Bacteriol.* **172**:6386-95.
297. **Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund** 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence *Curr Opin Microbiol.* **2**:99-105.
298. **Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama, and K. Tsukamoto** 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2 *J Immunol Methods.* **93**:157-65.
299. **Takao, T., T. Tanabe, Y. M. Hong, Y. Shimonishi, H. Kurazono, T. Yutsudo, C. Sasakawa, M. Yoshikawa, and Y. Takeda** 1988. Identity of molecular structure of

- Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin  
Microb Pathog. **5**:57-69.
300. **Tauxe, V. R.** 1998. Public Health Perspective on Immunoprophylactic strategies for  
*Escherichia coli* O157:H7: Who or what would we immunize?, p. 445-452. In A. D.  
O'Brien, and J. Kaper (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-  
producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology.
301. **Taylor, B. C., J. D. Dellinger, J. S. Cullor, and J. L. Stott** 1994. Bovine milk  
lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+  
Cell Immunol. **156**:245-53.
302. **Taylor, C. M., D. V. Milford, P. E. Rose, T. C. Roy, and B. Rowe** 1990. The  
expression of blood group P1 in post-enteropathic haemolytic uraemic syndrome  
Pediatr Nephrol. **4**:59-61.
303. **te Loo, D. M., L. A. Monnens, T. J. van Der Velden, M. A. Vermeer, F. Preyers,  
P. N. Demacker, L. P. van Den Heuvel, and V. W. van Hinsbergh** 2000. Binding  
and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic  
syndrome Blood. **95**:3396-402.
304. **te Loo, D. M., V. W. van Hinsbergh, L. P. van den Heuvel, and L. A. Monnens**  
2001. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes  
of patients with hemolytic uremic syndrome J Am Soc Nephrol. **12**:800-6.
305. **Terti, R., E. Eerola, O. P. Lehtonen, T. H. Stahlberg, M. Viander, and A.  
Toivanen** 1987. Virulence-plasmid is associated with the inhibition of opsonization in  
*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* Clin Exp Immunol. **68**:266-  
74.
306. **Tesh, V. L., B. Ramegowda, and J. E. Samuel** 1994. Purified Shiga-like toxins  
induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages  
Infect Immun. **62**:5085-94.
307. **Thorpe, C. M., B. P. Hurley, L. L. Lincicome, M. S. Jacewicz, G. T. Keusch, and  
D. W. Acheson** 1999. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal  
epithelial cells Infect Immun. **67**:5985-93.
308. **Thorpe, C. M., W. E. Smith, B. P. Hurley, and D. W. Acheson** 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**:6140-7.
309. **Torres, A. G., and S. M. Payne** 1997. Haem iron-transport system in  
enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Mol Microbiol. **23**:825-33.

310. **van de Kar, N. C., T. Kooistra, M. Vermeer, W. Lesslauer, L. A. Monnens, and V. W. van Hinsbergh** 1995. Tumor necrosis factor alpha induces endothelial galactosyl transferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific tumor necrosis factor receptors and protein kinase C Blood. **85**:734-43.
311. **van de Kar, N. C., L. A. Monnens, M. A. Karmali, and V. W. van Hinsbergh** 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**:2755-64.
312. **van Heyningen, W. E., and G. P. Gladstone** 1953. The neurotoxin of *Shigella shigae*. 3. The effect of iron on production of the toxin. Br. J. Exp. Pathol. **34**:221-229.
313. **van Setten, P. A., L. A. Monnens, R. G. Verstraten, L. P. van den Heuvel, and V. W. van Hinsbergh** 1996. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release Blood. **88**:174-83.
314. **van Setten, P. A., V. W. van Hinsbergh, L. P. Van den Heuvel, T. J. van der Velden, N. C. van de Kar, R. J. Krebbers, M. A. Karmali, and L. A. Monnens** 1997. Verocytotoxin inhibits mitogenesis and protein synthesis in purified human glomerular mesangial cells without affecting cell viability: evidence for two distinct mechanisms J Am Soc Nephrol. **8**:1877-88.
315. **van Setten, P. A., V. W. van Hinsbergh, T. J. van der Velden, N. C. van de Kar, M. Vermeer, J. D. Mahan, K. J. Assmann, L. P. van den Heuvel, and L. A. Monnens** 1997. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells Kidney Int. **51**:1245-56.
316. **Vicari, G. A., A. L. Olitzki, and Z. Olitzki** 1960. The action of the thermolabile toxin of *Shigella dysenteriae* on cells cultivated in vitro. Br. J. Exp. Pathol. **41**:179-189.
317. **Vischer, U. M., L. Jornot, C. B. Wollheim, and J. M. Theler** 1995. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells Blood. **85**:3164-72.
318. **Waddell, T., S. Head, M. Petric, A. Cohen, and C. Lingwood** 1988. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2 Biochem Biophys Res Commun. **152**:674-9.
319. **Wagner, P. L., D. W. Acheson, and M. K. Waldor** 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infect Immun. **69**:1934-7.

320. **Wagner, P. L., M. N. Neely, X. Zhang, D. W. Acheson, M. K. Waldor, and D. I. Friedman** 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain J Bacteriol. **183**:2081-5.
321. **Waldor, M. K.** 1998. Bacteriophage biology and bacterial virulence Trends Microbiol. **6**:295-7.
322. **Weinstein, D. L., R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** 1988. Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli* Infect Immun. **56**:106-11.
323. **Wells, J. G., L. D. Shipman, K. D. Greene, E. G. Sowers, J. H. Green, D. N. Cameron, F. P. Downes, M. L. Martin, P. M. Griffin, S. M. Ostroff, and et al.** 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle J Clin Microbiol. **29**:985-9.
324. **Whittam, T. S.** 1998. Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, p. 195-212. In J. Kaper, and A. D. O'Brien (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology.
325. **Wieler, L. H., E. Vieler, C. Erpenstein, T. Schlapp, H. Steinruck, R. Bauerfeind, A. Byomi, and G. Baljer** 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes J Clin Microbiol. **34**:2980-4.
326. **Wiels, J., M. Fellous, and T. Tursz** 1981. Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen Proc Natl Acad Sci U S A. **78**:6485-8.
327. **Williams, J. M., N. Lea, J. M. Lord, L. M. Roberts, D. V. Milford, and C. M. Taylor** 1997. Comparison of ribosome-inactivating proteins in the induction of apoptosis Toxicol Lett. **91**:121-7.
328. **Williams, J. M., D. V. Milford, and C. M. Taylor** 1995. Intracellular signaling pathways involved in Verocytotoxin-induced apoptosis in Vero cells. Abstr. 7th Europ. Workshop Conference Bact. Prot. Toxins, Middelfart, Denmark.
329. **Woodward, M. J., D. Gavier-Widen, I. M. McLaren, C. Wray, M. Sozmen, and G. R. Pearson** 1999. Infection of gnotobiotic calves with *Escherichia coli* O157:H7 strain A84 Vet Rec. **144**:466-70.
330. **Yamasaki, C., Y. Natori, X. T. Zeng, M. Ohmura, S. Yamasaki, and Y. Takeda** 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**:231-4.

331. **Yoshida, N., D. N. Granger, D. J. Evans, Jr., D. G. Evans, D. Y. Graham, D. C. Anderson, R. E. Wolf, and P. R. Kviety** 1993. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation Gastroenterology. **105**:1431-40.
332. **Zhang, Q. B., I. M. Nakashabendi, M. S. Mokhashi, J. B. Dawodu, C. G. Gemmell, and R. I. Russell** 1996. Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis Gut. **38**:841-5.
333. **Zhang, X., A. D. McDaniel, L. E. Wolf, G. T. Keusch, M. K. Waldor, and D. W. Acheson** 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice J Infect Dis. **181**:664-70.
334. **Zimmerman, G. A., S. M. Prescott, and T. M. McIntyre** 1992. Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signaling molecules. Immunol. Today. **1**:93-100.
335. **Zschöck, M., H. P. Hamann, B. Kloppert, and W. Wolter** 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties Lett Appl Microbiol. **31**:203-8.
336. **Zwahlen, R. D., and D. R. Roth** 1990. Chemotactic competence of neutrophils from neonatal calves. Functional comparison with neutrophils from adult cattle Inflammation. **14**:109-23.

## 8. Anhang

### 8.1. Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	M-2128
Ampicillin	Fluka	10044
Annexin-V-Phycoerythrin-konjugiert	Caltag Laboratories GmbH	ANNV04
Anti-Maus-Ig-Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper	Amersham Pharmacia Biotech	NXA931
BCA-Protein-Assay <sup>®</sup>	Pierce	
Bursttest <sup>®</sup>	ORPEGEN-Pharma	
Calcein AM	Molecular Probes	
CD77-Antikörper (mAk, Klon 38.13)	Coulter-Immunotech	0175
	Diagnostics	
Cibacron blue 3G-A (HiTrap blue <sup>™</sup> )	Pharmacia	
Coomassie-Brillant-Blau G-250	Serva Electrophoresis GmbH	17524
Detoxigel <sup>®</sup> -Säule	Pierce	
EDTA	Serva Electrophoresis GmbH	11280
Ficoll Hypaque <sup>®</sup>	Amersham Pharmacia Biotech	
FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-Antikörper (Anti-IgG/IgA/IgM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F-1010
FITC-konjugierter Ziege anti-Ratte-IgM-F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente (μ-Ketten-spezifisch)	Dianova	112-096-075
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F-7524
Gassner-Nährboden	Oxoid GmbH	CM0431
Glyzerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G-7893
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	

HEPES	Biomol Feinchemikalien GmbH	5288
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen	25030-024
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
Mercaptoethanol	Fluka	63689
Micro-BCA-Protein-Assay <sup>®</sup>	Pierce	
Millex <sup>®</sup> -GV-Filter	Millipore	
Penizillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies GmbH	15140-114
Phagotest <sup>®</sup>	ORPEGEN-Pharma	
Protein-A/G-Agarose-Material	Schleicher und Schuell	
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P-4170
Quantitative Chromogenic LAL ( <i>Limulus</i> -Amoebocyten-Lysat-Test)	BioWhittaker	QLC-100
R-Phycoerythrin-konjugierter Ziege anti-Ratte-IgM-F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente (μ-Ketten-spezifisch)	Coulter-Immunotech Diagnostics	01625
RPMI 1640-Medium	Life Technologies GmbH	51800-035
RPMI 1640-Medium mit stabilisiertem Glutamin	Biochrom KG	FG 1215
Ratte-IgM kappa Myeloma	Serotec Ltd.	PRP08
SDS (Dodezylsulfat Natriumsalz)	Serva Electrophoresis GmbH	20763
Trasyol <sup>®</sup> (10000 KIE/ml)	Bayer AG	
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	Carl Roth GmbH	4855
Trypanblau	Hoechst AG	
Trypsinlösung 0,25 %	Life Technologies GmbH	25050-022
Tween 20		
Ultrosor <sup>®</sup> HY	Life Technologies GmbH	66029-018

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

## 8.2. Puffer, Kulturmedien und Lösungen

### Annexin-V-Bindungspuffer

Annexin-V-Bindungspuffer-Stammlösung	1,0 ml
A. bidest.	9,0 ml

### Annexin-V-Bindungspuffer-Stammlösung (10-fach)

HEPES/NaOH (pH 7,4)	2,383 g
NaCl	8,182 g
CaCl <sub>2</sub>	0,277 g
A. bidest.	100,0 ml

### Erythrozyten-Lyse-Reagenz

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

### MTT-Stammlösung (5 mg/ml)

MTT	0,50 g
PBS	100,0 ml

### NaCl-Lösung (0,89 %)

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

### PBS (pH 7,4)

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

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

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

**PBS-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)**

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

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

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

**SDS-Lösung**

Dodezylsulfat Natriumsalz	100,00 g
HCl 1N	10,0 ml
A. bidest.	ad 1000 ml

**Trypanblau-Lösung**

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung	1000 ml

**Blastenmedium**

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	890,0 ml
FCS	100,0 ml
Penizillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml
Merkaptoethanol (1mM)	3,0 ml

**Zellkulturmedium 1**

RPMI 1640	880,0 ml
FCS	100,0 ml
Penizillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml

Glutamin-Lösung (200 mM)	10,0 ml
--------------------------	---------

**Zellkulturmedium 3**

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	900,0 ml
---------------------------------------	----------

FCS	100,0 ml
-----	----------

Merkaptoethanol (1mM)	3,0 ml
-----------------------	--------

### 8.3. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Bestimmung der Phagozytoseaktivität und Aktivierbarkeit boviner Granulozyten mittels Durchflusszytometrie.....	56
Abb. 2:	Quantitatives Analyseverfahren zur Bestimmung der Migrationsaktivität von Granulozyten .....	60
Abb. 3:	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Vitalität von Granulozyten anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften.....	62
Abb. 4:	Vitalitätscharakterisierung boviner Granulozyten anhand ihrer Morphologie .....	63
Abb. 5:	Durchflusszytometrische Analyse der Morphologie frisch präparierter Leukozyten anhand ihrer Größen- und Granularitätseigenschaften .....	65
Abb. 6:	Darstellung der Anwendung elektronischer Auswertefenster („Gates“) zum Nachweis von Oberflächenantigenen auf bovinen Granulozyten .....	66
Abb. 7:	Nachweis von CD11b auf bovinen Granulozyten nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS .....	69
Abb. 8:	Nachweis des Makrophagendifferenzierungsantigens (mAk IL-A24) auf bovinen Granulozyten nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS .....	70
Abb. 9:	Morphologie und Membranintegrität boviner Granulozyten mit fortschreitender Inkubation in Medium.....	72
Abb. 10:	Versuch zum Nachweis von Gb <sub>3</sub> /CD77 auf und Bindung von rStxB1 an bovinen Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation .....	73
Abb. 11:	Versuch zum Nachweis des Shigatoxin-Rezeptors Gb <sub>3</sub> /CD77 auf bovinen Granulozyten nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS .....	74
Abb. 12:	Versuch zum Nachweis der Bindungsfähigkeit von bovinen Granulozyten für die Shigatoxin-B-Untereinheit (rStxB1) nach 0,5, 24 und 48 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS .....	75
Abb. 13:	Nachweis von Gb <sub>3</sub> /CD77 auf ovinen und caprinen Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation .....	76
Abb. 14:	Nachweis der Bindung der rStxB1 an ovine und caprine Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation.....	77
Abb. 15:	Kompetition der Bindung der rStxB1 und des CD77-Antikörper an ovine Granulozyten 0,5 Stunden nach der Präparation. ....	78
Abb. 16:	Charakterisierung oviner Granulozyten aus der Milch.....	79
Abb. 17:	Nachweis von Gb <sub>3</sub> /CD77 und Bindung der rStxB1 bei bovinen und ovinen Granulozyten aus frischer Kuh- bzw. Schafmilch.....	80
Abb. 18:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität boviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	82
Abb. 19:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Phagozytoseaktivität boviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	83
Abb. 20:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) boviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	85
Abb. 21:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität oviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	87
Abb. 22:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität oviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	88
Abb. 23:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Phagozytoseaktivität oviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	89
Abb. 24:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Phagozytoseaktivität oviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	90

Abb. 25:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) oviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	91
Abb. 26:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) oviner Granulozyten <i>in vitro</i> .....	92
Abb. 27:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Migrationsfähigkeit von Schafgranulozyten in einem Agarosegel.....	94
Abb. 28:	Einfluss von Stx1 und rStxB1 auf die Vitalität oviner Granulozyten aus der Milch.....	97
Abb. 29:	Relative Migrationsaktivität boviner Granulozyten in Anwesenheit von Kulturüberständen boviner non-Epithelzellen aus dem Kolon.....	99
Abb. 30:	Relative Migrationsaktivität boviner Granulozyten in Anwesenheit von Kulturüberständen boviner IEL.....	100
Abb. 31:	Relative Migrationsaktivität boviner Granulozyten in Anwesenheit von Kulturüberständen boviner Kolonepithelzellen.....	101
Abb. 32:	Versuch der Übertragung von Stx1 durch bovine Granulozyten auf empfängliche Verozellen <i>in vitro</i> .....	102
Abb. 33:	Versuch der Übertragung von Stx1 durch ovine Granulozyten auf empfängliche Verozellen <i>in vitro</i> .....	103
Abb. 34:	Modell der intestinalen STEC-Infektion beim adulten Rind.....	118
Abb. 35:	Modell der intestinalen STEC-Infektion beim Schaf.....	119

#### 8.4. Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene boviner Leukozyten.....	41
Tab. 2:	Übersicht über die in dieser Arbeit regelmäßig verwendeten Ansätze mit Stimulanzen und Testsubstanzen.....	44
Tab. 3:	Gebrauchslösungen der Reagenzien für die Durchflusszytometrie.....	50
Tab. 4:	Für Transmigrationsstudien verwendete Überstände boviner Zellkulturen.....	59
Tab. 5:	Einfluss von LPS auf die Aktivierbarkeit („oxidative-burst“) oviner Granulozyten nach Stimulation durch Bakterien <i>in vitro</i> .....	95
Tab. 6:	Stx1-neutralisierende Wirkung in Plasmaproben von Schafen.....	104

## **Danksagung**

Allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich sehr herzlich.

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. habil. G. Baljer, der nicht nur durch die Überlassung des Themas der Dissertation und die vom Institut gewährten Mittel und Möglichkeiten, sondern auch durch seine freundliche und konstruktive Art diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Seiner Hilfsbereitschaft verdanke ich auch vieles neben meiner Promotion.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Christian Menge, danke ich für die hervorragende Einführung und Einarbeitung in das Arbeitsgebiet und die erforderlichen Methoden sowie seine unermüdliche fachliche und seelische Unterstützung. Ich bin sehr dankbar, dass wir über den gesamten Zeitraum der letzten drei Jahre außerordentlich gut miteinander harmoniert haben. Neben ihm hat Frau Dr. Ivonne Stamm meinen besonderen Dank verdient, denn durch ihre wichtigen Vorarbeiten bei der Bereitstellung von Toxinen und Antikörpern und ihre stete Hilfestellung hat sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen. Ihre Offenheit und Freundschaft bedeuten mir viel.

Allen Mitarbeitern und Doktorand/innen im Haus, insbesondere den Angehörigen der Arbeitsgruppe Zellbiologie, sei herzlich für das allzeit freundschaftliche Klima und die gute Zusammenarbeit am Institut gedankt. Dies trug maßgeblich dazu bei, dass ich diese Arbeit gerne gemacht habe.

Den Tierpflegern des Oberen Hardthofes sowie den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik II und der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz sei für die Beschaffung des Probenmaterials für die Vorversuche und Versuche gedankt; Herrn Dr. A. Menzebach am Zentrum für Anaesthesiologie des Klinikums der JLU Gießen und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung humaner Granulozytenpräparationen. Weiterhin geht mein Dank an das Laborteam der Klinik für Innere Medizin des Klinikums der JLU Gießen für die Durchführung von Endotoxinbestimmungen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten möchte ich mich bei den Herren Dr. K. Failing und H. Heiter der Arbeitsgruppe Biomathematik des Institutes für Physiologie am Fachbereich Veterinärmedizin herzlich bedanken.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die mir für die gesamte Dauer der Promotion ein Stipendium und umfangreiche Sachmittel zur Verfügung gestellt hat. Weiterhin war dadurch für mich die Möglichkeit gegeben, im Graduiertenkolleg „Molekulare

Veterinärmedizin“ mitzuarbeiten und meine Erfahrungen auch mit Methoden und Kenntnissen zu erweitern, die mein Wissen an wichtigen Punkten ergänzt haben. In diesem Rahmen danke ich auch den übrigen Kollegiatinnen und Kollegiaten sowie Herrn Professor Dr. E. Petzinger für unser freundschaftliches Verhältnis.

Für wesentliche Hilfestellungen in drucktechnischen Fragen sowie für den Druck an sich bedanke ich mich sehr bei meinem Freund Oliver Büttner. Frau Dr. Cornelia Jäger hat mir den Weg in das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere geraten und gebahnt. Auch ihr hierfür eine herzliches Dankeschön.

Ich danke meinen Eltern für die mir gewährten Möglichkeiten, die mich erst an den Punkt brachten, diese Arbeit anzufertigen. Ihnen gebührt ferner mein Dank für ihre Lektoratstätigkeit. Abschließend und ganz besonders danke ich meiner Freundin Nicole für Ihre Nähe und die seelische Unterstützung und Geduld, ohne die ich auch die holprigen Abschnitte des Promovierens nicht so gut überstanden hätte.