

A vertical strip on the left side of the cover features a microscopic image of numerous cells, likely fibroblasts or epithelial cells, showing their characteristic rounded shapes and internal structures. The image is in a warm, orange-brown color palette.

# **IN VITRO-EVALUATION VON REKOMBINANTEN E. COLI SHIGATOXOIDEN ALS IMPFSTOFF- KANDIDATEN FÜR RINDER**

---

**KATHARINA KERNER**

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



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2012

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

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. C. Menge

***IN VITRO*-EVALUATION VON  
REKOMBINANTEN *E. COLI* SHIGATOXOIDEN  
ALS IMPFSTOFFKANDIDATEN FÜR RINDER**

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

eingereicht von

**Katharina Kerner**

Tierärztin aus Siegen

Gießen 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C. Menge  
Prof. Dr. Dr. habil. K.Doll

Tag der Disputation: 05.07.2012

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**K. Kerner<sup>\*</sup>, P.S. Bridger, G. Köpf, J. Fröhlich, H. Willems, G. Baljer, C. Menge (2009)**

*In vitro*-evaluation of recombinant *E. coli* Shigatoxoids as candidates for cattle vaccination. Posterpräsentation, 3. European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), 10.-13.09.2009, Berlin

**K. Kerner, P.S. Bridger, D. Loos, G. Köpf, J. Fröhlich, H. Willems, G. Baljer, C. Menge<sup>\*</sup> (2010)**

*In vitro*-Evaluation von rekombinanten *E. coli* Shigatoxoiden als Impfstoffkandidaten für Rinder. Posterpräsentation, III. EHEC-Workshop, 16.-18.06.2010, Wildbad Kreuth

**K. Kerner<sup>\*</sup>, P.S. Bridger, D. Loos, G. Köpf, J. Fröhlich, H. Willems, G. Baljer, C. Menge (2010)**

*In vitro*-Evaluation von rekombinanten *E. coli* Shigatoxoiden als Impfstoffkandidaten. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, 22.-24.06.2010, Jena

**K. Kerner, P.S. Bridger, G. Köpf, J. Fröhlich, D. Loos, H. Willems, G. Baljer, C. Menge<sup>\*</sup> (2011)**

*In vitro*-evaluation of recombinant *E. coli* Shiga toxoids as candidates for vaccination. Posterpräsentation, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 25.-28.09.11, Essen

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“, Teilprojekt A11 „Die Shigatoxin-Bildung und ihre Bedeutung für die *Escherichia coli*-Infektion des Rindes“.

---

# I Inhalt

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>I</b>   | <b>Inhalt .....</b>  | <b>I</b>  |
| <b>II</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>III</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>IV</b>  | <b>Literaturübersicht.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1</b>   | <b>Shigatoxin.....</b>   | <b>6</b>  |
| 1.1        | Verbreitung und Pathogenität Shigatoxin-bildender <i>Escherichia coli</i> .....            | 6         |
| 1.2        | Struktur des Toxins .....  | 8         |
| 1.3        | Stx-Rezeptoren.....  | 9         |
| 1.4        | Mechanismen der Stx-Wirkung auf Zellen und zelluläre Reaktionen .....                      | 9         |
| 1.5        | Wirkung mutagenisierter Shigatoxine.....   | 12        |
| 1.6        | Bedeutung des Stx für die Pathogenese EHEC-bedingter Erkrankungen .....                    | 13        |
| 1.7        | Stx-Wirkung auf Zellen des Immunsystems .....  | 14        |
| 1.8        | Verlauf einer Infektion mit STEC beim Rind .....   | 16        |
| <b>2</b>   | <b>Optionen zur Behandlung und Prävention EHEC-bedingter Erkrankungen .....</b>            | <b>16</b> |
| 2.1        | Behandlung EHEC-infizierter Menschen.....  | 16        |
| 2.2        | Subunit-Vakzine und Toxoid-Vakzine .....   | 18        |
| 2.3        | Kandidatenantigene für eine Impfung zur Verringerung der STEC-Ausscheidung beim Rind ..... | 19        |
| <b>3</b>   | <b>Ziel dieser Arbeit .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>V</b>   | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>24</b> |
| 1.1        | Amplifikation der <i>stx1</i> - und <i>stx2</i> -Gensequenzen .....                        | 24        |
| 1.2        | Klonierung der amplifizierten Toxingene .....  | 27        |
| 1.3        | Sequenzierung.....   | 29        |
| 1.4        | Mutagenisierung der klonierten Toxingene .....   | 29        |
| 1.5        | Agarosegelelektrophorese .....   | 31        |
| 1.6        | Expression der mutierten Toxingene .....   | 31        |
| 1.7        | Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel.....  | 32        |
| <b>2</b>   | <b>Verozell-Zytotoxizitätstest .....</b>   | <b>33</b> |
| 2.1        | Zelllinie .....  | 33        |
| 2.2        | Durchführung.....  | 33        |
| 2.3        | Auswertung .....   | 34        |

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>3</b>  | <b>ELISA</b> .....  | <b>38</b> |
| 3.1       | Durchführung des Stx-ELISA .....  | 38        |
| 3.2       | Durchführung des kompetitiven ELISA .....   | 38        |
| <b>4</b>  | <b>Berechnung der Stammlösung der Toxinpräparationen</b> .....                        | <b>39</b> |
| <b>5</b>  | <b>Mononukleäre Zellen aus dem peripherem Blut (PBMC)</b> .....                       | <b>40</b> |
| 5.1       | Isolation .....   | 40        |
| 5.2       | Inkubation mit den Toxinpräparationen .....   | 41        |
| 5.3       | Immundekoration .....   | 41        |
| 5.4       | Analysestrategie im Durchflusszytometer .....   | 43        |
| <b>6</b>  | <b>Ileale intraepitheliale Lymphozyten (iIEL)</b> .....                               | <b>45</b> |
| 6.1       | Isolation .....   | 45        |
| 6.2       | Immundekoration und Analyse im Durchflusszytometer .....                              | 46        |
| 6.3       | Inkubation mit den Toxinpräparationen .....   | 47        |
| 6.4       | Zellernte für RNA-Gewinnung .....   | 47        |
| 6.5       | RNA-Gewinnung .....   | 47        |
| <b>7</b>  | <b>Makrophagen</b> .....  | <b>56</b> |
| 7.1       | Isolation der peripheren mononukleären Zellfraktion .....                             | 56        |
| 7.2       | Generierung einer Makrophagenkultur .....   | 57        |
| 7.3       | Inkubation mit den Toxinpräparationen .....   | 58        |
| 7.4       | Immundekoration .....   | 58        |
| 7.5       | Analysestrategie im Durchflusszytometer .....   | 58        |
| 7.6       | RNA-Gewinnung .....   | 59        |
| <b>8</b>  | <b>Statistische Auswertung</b> .....  | <b>60</b> |
| <b>VI</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>1</b>  | <b>Herstellung der mutagenisierten <i>stx1</i>- und <i>stx2</i>-Gene</b> .....        | <b>61</b> |
| <b>2</b>  | <b>Herstellung von Toxinpräparationen als Stammlösungen</b> .....                     | <b>61</b> |
| 2.1       | Zytotoxizität der aus den <i>stx</i> -Transformanten gewonnenen Fraktionen .....      | 62        |
| 2.2       | Eigenschaften der Toxinpräparationen .....  | 64        |
| <b>3</b>  | <b>Wirkung des rStx<sub>WT</sub> und des rStx<sub>mut</sub> auf bovine PBMC</b> ..... | <b>65</b> |
| 3.1       | Vitalität .....   | 67        |
| 3.2       | Anteil und Vitalität von PBMC-Subpopulationen .....                                   | 68        |
| 3.3       | Stx-Rezeptor Gb <sub>3</sub> /CD77 .....  | 71        |
| <b>4</b>  | <b>Wirkung von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub> auf bovine iIEL</b> .....     | <b>75</b> |

---

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>5</b>    | <b>Wirkung von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub> auf bovine Makrophagen.....</b> | <b>76</b>  |
| 5.1         | Vitalität .....   | 76         |
| 5.2         | Oberflächenmarker .....   | 77         |
| 5.3         | Transkriptionsrate von verschiedenen Zytokinen/Chemokinen .....                         | 80         |
| <b>6</b>    | <b>Überprüfung der Antigenität von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub> .....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>VII</b>  | <b>Diskussion .....</b>   | <b>83</b>  |
| 1.1         | Herstellung der Toxine und Toxoide .....  | 83         |
| 1.2         | Wirkung der Toxine und Toxoide auf PBMC.....  | 85         |
| 1.3         | Wirkung der Toxine und Toxoide auf intraepitheliale Lymphozyten des Ileums .....        | 89         |
| 1.4         | Wirkung der Toxine und Toxoide auf Makrophagen.....                                     | 90         |
| 1.5         | Antigenität und Immunogenität der Toxine und Toxoide.....                               | 92         |
| 1.6         | Möglicher Einsatz der Shigatoxoide für Impfungen in Rinderbeständen .....               | 93         |
| 1.7         | Schlussfolgerung.....   | 97         |
| <b>VIII</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>98</b>  |
| <b>IX</b>   | <b>Summary.....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>X</b>    | <b>Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>XI</b>   | <b>Anhang .....</b>   | <b>112</b> |
| 1           | Übersicht über Blutspendertiere .....   | 112        |
| 2           | Übersicht über verwendete Seren .....   | 112        |
| 3           | Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....            | 113        |
| 4           | Verwendete Puffer und Medien .....  | 119        |
| 4.1         | Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturtechniken .....                               | 119        |
| 4.2         | Puffer für den ELISA .....  | 122        |
| 4.3         | Puffer und Lösungen für PCRs .....  | 123        |
| <b>XII</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>   | <b>124</b> |
| 1           | Abbildungen.....  | 124        |
| 2           | Tabellen .....  | 125        |
| <b>XIII</b> | <b>Danksagung.....</b>  | <b>127</b> |

## II Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| °C               | Grad Celsius  |
| µg               | Mikrogramm  |
| µl               | Mikroliter  |
| µm               | Mikrometer  |
| µM               | mikromolar  |
| <i>A.dest.</i>   | <i>Aqua destillata</i>                              |
| A/E              | <i>attaching/effacing</i>                           |
| abs              | absolut   |
| ad               | bis zu (auffüllen auf)                              |
| ATCC             | <i>American Type Culture Collection</i>             |
| bp               | <i>baise pairs</i> , Basenpaare                     |
| CD               | <i>cluster of differentiation</i>                   |
| CD <sub>50</sub> | zytotoxische Dosis 50 %                             |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlendioxid  |
| DNA              | <i>desoxyribonucleic acid</i>                       |
| dNTP             | Desoxyribonukleosidtriphosphate                     |
| <i>E. coli</i>   | <i>Escherichia coli</i>                             |
| EDTA             | Ethylendiaminotetraessigsäure                       |
| Efa              | <i>EHEC factor for adherence</i>                    |
| <i>efa-1</i>     | Strukturgen für Efa-1                               |
| EHEC             | enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>        |
| ELISA            | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>            |
| EPEC             | enteropathogene <i>Escherichia coli</i>             |
| Esp              | <i>E. coli secreted protein</i>                     |
| f.c.             | <i>final concentration</i> , Endkonzentration       |
| FITC             | Fluoreszein-Isotiozyanat                            |
| FKS              | fötales Kälberserum                                 |
| g                | Erdbeschleunigung                                   |
| Gb <sub>3</sub>  | Globotriaosylceramid                                |
| Gb <sub>4</sub>  | Globotetraosylceramid                               |
| HC               | hämorrhagische Colitis                              |
| HEPES            | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) |
| HRP              | <i>Horseraddish Peroxidase</i>                      |
| HUS              | hämolytisch-urämisches Syndrom                      |
| ID <sub>50</sub> | inhibitorische Dosis 50 %                           |
| IE               | internationale Einheit                              |
| iIEL             | ileale intraepitheliale Lymphozyten                 |
| Ig               | Immunglobulin                                       |
| IHOD             | Inhibitorische optische Dichte                      |
| IL               | Interleukin   |
| kB               | Kilobasen   |
| KbE              | Kolonie-bildende Einheit                            |
| kDa              | Kilodalton  |
| LB-Medium        | Louria-Bertani-Medium                               |
| LEE              | <i>locus of enterocyte effacement</i>               |
| log              | Logarithmus   |
| LPS              | Lipopolysaccharid                                   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| M                    | Molarität   |
| mA                   | Milliampere   |
| mg                   | Milligramm  |
| MK                   | Mediumkontrolle   |
| ml                   | Milliliter  |
| mM                   | millimolar  |
| MM                   | Molekularmassenstandard                                     |
| mm                   | Millimeter  |
| MTT                  | 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NaCl                 | Natriumchlorid  |
| nm                   | Nanometer   |
| OD                   | optische Dichte   |
| OG                   | Obergrenze  |
| PBMC                 | <i>peripheral blood mononuclear cells</i>                   |
| PBS                  | <i>phosphate buffered saline</i>                            |
| PCR                  | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| pM                   | pikomolar   |
| pmol                 | Pikomol   |
| rel                  | relativ   |
| rStx1 <sub>WT</sub>  | rekombinant hergestelltes Shigatoxin 1 ohne Mutation        |
| rStx1 <sub>mut</sub> | rekombinant hergestelltes Shigatoxin 1 mit Mutation         |
| rStx2 <sub>WT</sub>  | rekombinant hergestelltes Shigatoxin 2 ohne Mutation        |
| rStx2 <sub>mut</sub> | rekombinant hergestelltes Shigatoxin 2 mit Mutation         |
| RT                   | Raumtemperatur  |
| SDS                  | Sodium-Dodecylsulfat  |
| STEC                 | Shigatoxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>            |
| Stx                  | Shigatoxin  |
| <i>stx</i>           | Strukturgen des Stx   |
| Stx1A                | A-Untereinheit von Stx1                                     |
| Stx1Ak               | Stx1-spezifische, neutralisierende Antikörper               |
| Stx1B                | B-Untereinheit von Stx1                                     |
| Stx2Ak               | Stx2-spezifische, neutralisierende Antikörper               |
| StxA                 | A-Untereinheit von Stx                                      |
| StxB                 | B-Untereinheit von Stx                                      |
| syn                  | synonym   |
| TAE                  | Tris-Acetat-EDTA  |
| TE                   | Tris EDTA   |
| TPP                  | Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura                    |
| Tris                 | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan                              |
| U                    | <i>unit</i> , Einheit                                       |
| U/min                | Umdrehungen je Minute                                       |
| UE                   | Untereinheit  |
| UG                   | Untergrenze   |
| UV                   | ultraviolett  |
| v:v                  | Volumeneinheit  |
| Vero-ZT              | Verozell-Zytotoxizitätstest                                 |
| VT                   | Verotoxin   |
| VTEC                 | Verotoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>                  |
| WP                   | Waschpuffer   |

Tab. 1: Aminosäurekodierung

| Aminosäure     | 3-<br>Buchstaben-<br>Code | 1-<br>Buchstaben-<br>Code | Aminosäure   | 3-<br>Buchstaben-<br>Code | 1-<br>Buchstaben-<br>Code |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Alanin         | Ala                       | A                         | Leucin       | Leu                       | L                         |
| Arginin        | Arg                       | R                         | Lysin        | Lys                       | K                         |
| Asparagin      | Asn                       | N                         | Methionin    | Met                       | M                         |
| Asparaginsäure | Asp                       | D                         | Phenylalanin | Phe                       | F                         |
| Cystein        | Cys                       | C                         | Prolin       | Pro                       | P                         |
| Glutamin       | Gln                       | Q                         | Serin        | Ser                       | S                         |
| Glutaminsäure  | Glu                       | E                         | Threonin     | Thr                       | T                         |
| Glycin         | Gly                       | G                         | Tryptophan   | Trp                       | W                         |
| Histidin       | His                       | H                         | Tyrosin      | Tyr                       | Y                         |
| Isoleucin      | Ile                       | I                         | Valin        | Val                       | V                         |

### III Einleitung

Shigatoxin-(Stx-)bildende *Escherichia coli* (STEC) sind Zoonoseerreger mit weltweiter Bedeutung. STEC verfügen über eine Reihe von Virulenzfaktoren (Proteine des Typ III-Sekretionssystems, Oberflächenproteine und Stx) (1, 21, 28, 102, 117, 118, 134). Bei einer Infektion des Menschen mit humanpathogenen STEC, EHEC genannt, kommt es zu einer durch die ribotoxische Wirkung des Stx bedingten hämorrhagischen Colitis (HC), die sich zu einem lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) entwickeln kann, z. T. mit dialysepflichtigem Nierenversagen (72, 128).

Rinder gelten als natürliches Reservoir und Hauptinfektionsquelle für den Menschen (21, 117). Obwohl STEC-Infektionen beim Rind nicht zu einer Erkrankung führen, spielt Stx eine wichtige Rolle bei der Infektion (44, 108, 148). Stx bindet vor allem an intraepitheliale Lymphozyten in der Darmschleimhaut und supprimiert die Effektormechanismen der Zellen. *In vivo* verzögert Stx bei Kälbern die Entwicklung einer STEC-spezifischen zellulären Immunität. Stx supprimiert nicht eine bereits bestehende Immunität, sondern unterdrückt nur eine sich gerade entwickelnde Immunantwort. Stx wirkt damit vor allem bei der Erstinfektion immunologisch naiver Kälber und bereitet als putativer Kolonisationsfaktor die Grundlage für die Entstehung persistenter STEC-Infektionen bei älteren Rindern.

Um das Infektionsgeschehen innerhalb von Rinderherden einzudämmen und so den Infektionsdruck auf den Menschen zu vermindern, werden unterschiedliche Strategien verfolgt. Verbesserte Hygienemaßnahmen oder die Verwendung von Futterzusätzen wie Probiotika waren jedoch bisher nicht von Erfolg gekrönt (53, 54, 84). Als Impfstoffkandidaten wurden verschiedene Virulenzfaktoren untersucht (34, 79, 80, 101, 131, 168). Die verwendeten Proteine führten zwar zu einer Ak-Produktion im Impfling, die Dauer und Menge der STEC-Ausscheidung wurde jedoch nicht reduziert.

Aufgrund der weiten Verbreitung haben Kälber bereits früh nach der Geburt Kontakt zu STEC. Die erstmalige natürliche Infektion fällt in einen Zeitraum, in dem ein Großteil der Tiere über keine oder nur geringe Mengen Stx-spezifischer Antikörper verfügt (44, 108, 148). Eine Immunisierungsstrategie auf der Basis der Stx unter Einbeziehung hochträchtiger Kühe könnte bei neugeborenen Kälbern diese immunologische Lücke schließen und bovine Immunzellen zum Zeitpunkt der Erstinfektion vor den modulatorischen Wirkungen der Stx schützen. Diese Strategie wäre besonders effektiv, da, unabhängig vom Vorhandensein anderer Virulenzmerkmale, alle potenziell für den Menschen gefährlichen STEC-Isolate

erfasst würden. Für die Entwicklung einer auf Stx basierenden Vakzine ist es notwendig, die Ribotoxizität zu verhindern (62, 63, 180). Ziel dieser Arbeit war daher, gentechnisch verändertes Stx herzustellen und zu überprüfen, ob die immunmodulatorischen Wirkungen von wildtypischem Stx auf periphere Blutlymphozyten, ileale intraepitheliale Lymphozyten und Makrophagen des Rindes bei den so generierten Shigatoxoiden verloren gegangen ist.

## IV Literaturübersicht

### 1 Shigatoxin

#### 1.1 Verbreitung und Pathogenität Shigatoxin-bildender *Escherichia coli*

Shigatoxin-(Stx-)bildende *Escherichia coli* (STEC) kommen weltweit vor. Studien belegen, dass vor allem Rinder als natürliches Reservoir für STEC anzusehen sind (21, 117, 182). STEC-Stämme, die nachweislich pathogen für den Menschen sind, werden als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet (86).

Als Herdenprävalenzen für STEC wurden in unterschiedlichen Studien Werte im Bereich um 50 % ermittelt (51, 59). Studien zum Nachweis bei einzelnen Tieren zeigen, dass hier die Detektion von STEC zwischen 0 und 80 % schwankt (51, 59, 182). Hohe Ausscheidungsraten sind besonders bei Kälbern zu finden (11, 59). Geue *et al.* konnten zeigen, dass es große Unterschiede in der ermittelten Prävalenz sogar zwischen zwei identisch gehaltenen Gruppen von Rindern und zwischen den Tagen der Probensammlung gibt (51).

Die Schwankungen in der Detektionshäufigkeit sind sowohl methodisch bedingt als auch durch Schwankungen der Ausscheidungshäufigkeit und -menge der STEC begründet. Nach Pearce *et al.* hat die Art der Probennahme einen entscheidenden Einfluss auf die Detektionsrate. Die Autoren stellten fest, dass STEC nicht gleichmäßig im Kot verteilt ausgeschieden werden und somit eine Probennahme von unterschiedlichen Stellen des Kots die Chancen für einen STEC-Nachweis deutlich erhöht (130). Die Ausscheidung selbst wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Futtermodifikationen wie eine Zugabe von Probiotika oder apathogenen *E. coli*, verstärkte Hygienemaßnahmen betreffend Wasser und Futter, aber auch klimatische Veränderungen haben Einfluss auf die STEC-Ausscheidung. Während in den wärmeren Monaten vermehrt STEC nachgewiesen werden können, vermindert sich die Nachweisrate in den kalten Monaten (53, 54, 59, 84).

Die Unterschiede in der Einzeltierprävalenz werden durch diese Einflüsse jedoch nicht zufriedenstellend geklärt. In einer schottischen Studie wurden bei Schlachtrindern Kotproben gesammelt (n=598) und auf das Vorhandensein von *E. coli* O157 untersucht. Hierbei wurden 9 % der infizierten Tiere als sogenannte „high shedder“ identifiziert, d. h. sie schieden mehr als 10<sup>4</sup> KbE (Kolonie-bildende Einheiten) *E. coli* O157 pro Gramm Kot aus. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass diese „high shedder“ für 96 % der ausgeschiedenen *E. coli* am

Schlachthof verantwortlich sind und die Konzentration der ausgeschiedenen *E. coli* weitaus wichtiger als die Prävalenz sei (127). Andere Studien unterstützen diese Hypothese. Matthews *et al.* (100) werteten eine Studie von Synge *et al.* (152) erneut aus. Diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass 78 % der untersuchten Betriebe keine Anzeichen für eine STEC-Infektion zeigten, während ca. 2 % der Betriebe eine hohe STEC-Belastung zeigten. Matthews *et al.* vermuten, dass diese Unterschiede auf den unterschiedlichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen in den einzelnen Betrieben basieren. Allerdings gehen auch sie davon aus, dass einzelne Tiere den „high“ oder „super shedders“ zuzuordnen sind. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse anderer Studien an Schlachtrindern gestützt (37, 91, 123). In einer weiteren Studie stellten Matthews *et al.* fest, dass vermutlich 20 % der „super shedder“ für ca. 80 % der Übertragungen von STEC in einer Herde verantwortlich sind. Die Autoren stellten die These auf, dass durch die Identifikation und Elimination dieser Tiere die Herdenprävalenz stark gesenkt und damit auch das Infektionsrisiko für Menschen reduziert werden könnte (99).

Infektionsquellen für den Menschen sind neben dem direkten Kontakt zu Rindern in erster Linie der Verzehr von unzureichend erhitztem Rindfleisch. Besonders im Fokus sind hier unzureichend erhitzte Hamburger (7, 32, 65, 74, 167). Aber auch unzureichend gesäuberter Salat (2), nicht pasteurisierter Apfelsaft (23) oder unpasteurisierter Apfel-Cider ohne Konservierungsstoffe (9) sind bereits als Infektionsquelle in Erscheinung getreten.

Bereits am Schlachthof kann es zu einer Kontamination des Schlachtkörpers mit STEC kommen. Prävalenzstudien aus den USA ergaben, dass sowohl aus dem Kot als auch vom Fell der Tiere besonders häufig STEC zu isolieren sind (in 72 % bzw. 38 % der untersuchten Tiere). Eine Reduktion dieser Kontamination konnte im Verlauf des Schlachtprozesses gezeigt werden: Bei 87 % der 30 beprobten Gruppen von Rindern (bestehend aus 35-85 Tieren) konnte vor der Ausweidung mindestens eine Probe positiv auf STEC getestet werden, während die Prozentzahl nach der Ausweidung auf 57 % und nach der Nachbearbeitung auf 17 % sank. Die Nachbearbeitung der Schlachtkörper variierte zwischen den Schlachthöfen von Dampfpasteurisation, Waschen mit heißem Wasser oder Waschen mit organischer Säure. Hierbei wird deutlich, dass für eine Reduktion der STEC-Belastung die Nachbearbeitung eine große Rolle spielt, wenn auch die Erreger hierdurch nicht vollständig eliminiert werden können (6, 35). In einer weiteren Studie wurden Proben aus Kot und Abklatschproben der Beine von Schlachttieren untersucht. Bei Kot-negativen Tieren konnten STEC-positive Proben von den Beinen gewonnen werden, wenn diese Tiere nach einem Kot-positivem Tier geschlachtet wurden (14). Die Notwendigkeit einer Reduktion der STEC-

Belastung der lebenden Tiere wird hier deutlich. Eine Dekontamination des Fells der lebenden Tiere mittels Hochdruckreiniger wurde untersucht. Hierbei ergab sich, dass bereits das Waschen des Tieres für drei Minuten die Kontamination des Schlachtkörpers des behandelten Tieres deutlich reduziert (19).

Bei Menschen führt eine Infektion mit EHEC oft zu schweren Erkrankungen. Hier ist insbesondere die durch EHEC ausgelöste hämorrhagische Colitis (HC) zu nennen, in deren Folge sich bei Kindern und älteren Menschen ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) entwickeln kann. Eine HUS-Erkrankung kann zu einem dialysepflichtigen Nierenversagen führen, in 1 % der Erkrankungsfälle kommt es zum Tod des Betroffenen (71).

STEC besitzen mehrere Virulenzfaktoren, wobei besonders die Proteine des Typ III-Sekretionssystems wie EspA und Tir, das Oberflächenmolekül Intimin und Stx zu nennen sind (118). Stx wird als Hauptvirulenzfaktor angesehen (21). Von Stx existieren zwei Gruppen: Stx1 und Stx2, jede mit einer unterschiedlichen Anzahl an Untergruppen, die z. T. auch an unterschiedliche Rezeptoren bzw. unterschiedliche Konfigurationen eines Rezeptors binden (16).

## **1.2 Struktur des Toxins**

Stx gehören zu der großen Gruppe von AB<sub>5</sub>-Toxinen, zu denen auch Toxine von *Vibrio cholerae* und *Shigella dysenteriae* gehören (109). AB<sub>5</sub>-Toxine bestehen aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf rezeptorbindenden B-Untereinheiten (120). Nach einer proteolytischen Spaltung durch Furin wird die A-Untereinheit in ein größeres A<sub>1</sub>- und ein kleineres A<sub>2</sub>-Fragment zerlegt. Die Fragmente bleiben zunächst durch eine Disulfidbrücke verbunden (103). Im A<sub>1</sub>-Fragment befindet sich das aktive Zentrum. Höchstwahrscheinlich sind nur fünf Aminosäuren (AS) im katalytischen Zentrum für die toxische Aktivität verantwortlich. Diese AS bilden eine molekulare Tasche. Die obere Seitenwand dieser Tasche wird durch die AS Y77 und Y114 gebildet, während die untere Seitenwand von der AS W203 begrenzt wird. Auf dem Boden der Tasche befinden sich die AS E167 und R170 (31).

### 1.3 Stx-Rezeptoren

Shigatoxine besitzen mit Globotriaosylzeraamid (Gb<sub>3</sub>, Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer) einen spezifischen Rezeptor (87, 172). Stx1 und Stx2 binden bevorzugt an Gb<sub>3</sub> (syn. CD77), während Stx2e, der Auslöser der Ödemkrankheit des Schweines, bevorzugt an Globotetraosylzeraamid (Gb<sub>4</sub>, GalNac $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer) bindet (16). Gb<sub>3</sub>/CD77 wird je nach Spezies auf verschiedenen Zellen exprimiert. Beim Menschen findet sich der Rezeptor vor allem in Endothelzellen der Tubuli und Glomeruli der Niere, aber auch im Gehirn und im Gastrointestinaltrakt (72). Beim Rind ist der Stx-Rezeptor auf Nierenzellen (157) und im Gehirn nachweisbar (135) sowie im Ileum, Jejunum und Kolon (60).

Gb<sub>3</sub>/CD77 wird von Blutzellen sowohl beim Mensch als auch beim Rind exprimiert. Jedoch finden sich erhebliche Unterschiede in der zellulären Verteilung. Während beim Mensch der Rezeptor auf B-Lymphozythen (24) und Granulozyten (155) vorkommt, nicht aber auf  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten (24), konnte Gb<sub>3</sub>/CD77 beim Rind auf B-Lymphozyten,  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nachgewiesen werden (106, 107, 148). Bovine Granulozyten exprimieren kein Gb<sub>3</sub>/CD77 (105). Auf Monozyten wurde Gb<sub>3</sub>/CD77 beim Mensch (20) gefunden.

### 1.4 Mechanismen der Stx-Wirkung auf Zellen und zelluläre Reaktionen

#### 1.4.1 Intrazytoplasmatische, enzymatische Wirkung von Stx

Durch die Bindung von Stx an Gb<sub>3</sub>/CD77 kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer Reaktion der Zelle (75). Nach clathrin-abhängiger Endozytose (163) oder clathrin-unabhängiger Aufnahme (36) wird Stx in der Zelle retrograd transportiert. In den Endosomen spaltet das Enzym Furin die A-Untereinheit in ein A<sub>1</sub>- und ein A<sub>2</sub>-Fragment. Von dort aus gelangt die A-Untereinheit retrograd durch den Golgiapparat (GA) zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird dort in das Zytosol ausgeschleust. Im Zytosol übt das A<sub>1</sub>-Fragment seine ribotoxische Wirkung aus (141).

Die enzymatische Wirkung des StxA<sub>1</sub>-Fragments beruht nach bisherigen Erkenntnissen auf folgenden molekularen Interaktionen: E167 bindet über ionische Wechselwirkungen an das Ribose-Phosphat-Rückgrat der 28S rRNA der Zielzelle und vermittelt so eine Verbindung zwischen Toxin und rRNA. Die aromatischen Ringe von Y77, Y114 und W203 stabilisieren diese Verbindung und richten den Adeninrest an Position 4324 der rRNA aus. Y77 als vermuteter Säurekatalysator fungiert als Donator eines Protons an ein Stickstoffatom am Adeninring und schwächt damit die Bindung zwischen dem C1 der Ribose und dem N9 des

Adenins. Das protonierte Adenin dissoziiert von der Ribose, wobei ein positiv geladenes Oxocarboniumion im Ribosering zurückbleibt, welches durch R170 stabilisiert wird. Abschließend greift ein Wassermolekül das Oxocarboniumion an, die Ribose wird hydrolysiert und der Säurekatalysator wird wiederhergestellt (31).

Im Zuge der Abspaltung des Adeninrestes kommt es zu einer Konformitätsänderung der 28S rRNA, die eine Affinitätsabnahme des Ribosoms zum eukaryotischen Elongationsfaktor 1 (eEF 1) und somit eine verminderte eEF 1-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen nach sich zieht (121). Als Folge sind die Ribosomen, die an mRNA gebunden sind, irreversibel und vollständig inaktiviert, da ribosomale 60S-Untereinheiten von Stx nur inaktiviert werden können, wenn sie Bestandteile von vollständigen Ribosomen sind (136). Durch die Inaktivierung der Ribosomen kommt es zum Stillstand der Proteinsynthese und die betroffene Zelle geht zugrunde.

Neben der ribotoxischen Wirkung mit Inhibition der Proteinbiosynthese lösen Shigatoxine eine sogenannte „ribotoxic stress response“ aus. Hierbei wird vermutlich durch die Schädigung der Ribosomen eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKs) ausgelöst. Dabei steht die Aktivierung der c-Jun N-terminal Kinase (JNK) im Vordergrund. Die Aktivierung von JNK wird mit der Apoptose der Zelle in Verbindung gebracht (129). Diese Aktivierung konnte auch bei anderen Ribotoxinen wie Rizin nachgewiesen werden und wurde auch bei einer geringfügig beeinflussten Proteinsynthese beobachtet (67). Die „ribotoxic stress response“ führt, ähnlich der ribotoxischen Wirkung (22), bei einigen Zelltypen zur Apoptose (z. B. intestinale Epithelzellen (146), THP-1-Zellen (human acute monocytic leukemia cell line) (82)). Allerdings scheint auch für Apoptose in THP-1 Zellen eine enzymatisch aktive A-Untereinheit nötig zu sein, denn weder aufgereinigte B-Untereinheiten noch ein enzymatisch nicht aktives Stx1-Toxoid konnten Apoptose auslösen (82). Als ein weiterer Mechanismus, der zur Apoptose in den Zellen führen kann, muss die Aktivierung des Caspase-3 Signalwegs benannt werden. Dieser Signalweg wurde bei humanen Nabelschnurendothelzellen nach Inkubation mit Stx1, vor allem aber nach Inkubation mit Stx2 aktiviert (18).

#### **1.4.2 Alternative Wirkung**

Durch die Bindung von Stx an Gb<sub>3</sub>/CD77 erfolgt außerdem die Aktivierung von Syk (spleen tyrosine kinase), welche die Aufnahme von Stx in die Zelle erhöht (81). Gleichzeitig

kommt es durch eine rasche Erhöhung der intrazellulären Zeramide zu einer vermehrten Produktion von Gb<sub>3</sub>/CD77, was zu einer zusätzlichen Sensibilisierung der Zellen für Stx führt (122). Zusätzlich wird durch eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) der mitochondriale Apoptoseweg aktiviert (159) und ein vermehrter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom initiiert, was wiederum zur Aktivierung der p38 mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) führt (66). Diese Aktivierung von p38 MAP-Kinasen wird mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen in Verbindung gebracht (129).

### 1.4.3 Modulatorische Wirkung

In verschiedenen *in vitro*-Studien konnte bei humanen Zelllinien eine gesteigerte Produktion von Zytokin-mRNA nachgewiesen werden. Besonders deutlich war dies in einer Studie bei einer humanen Kolonepithelzelllinie (HCT-8) zu beobachten, hier zeigte sich in Anwesenheit von Stx1 eine signifikante Steigerung der IL-8 Produktion, ebenso für einige andere Zytokine wie GRO- $\alpha$  und GRO- $\beta$  (161, 162). Dies bestätigen Untersuchungen mit einer anderen Kolonepithelzelllinie (CaCo-2). Hier konnte ebenfalls nach Inkubation mit Stx1 und Stx2 eine erhöhte Produktion von mRNA für TNF- $\alpha$  und IL-8 nachgewiesen werden (179).

Der mögliche Zusammenhang zwischen einer aktivierten p38 MAP-Kinase und der Produktion von Zytokinen konnte bei intestinalen Epithelzellen gezeigt werden. Hier wurde nach Inkubation mit Stx1 eine vermehrte Ausschüttung von IL-8 nachgewiesen, die nach Hemmung des p38 MAP-Kinase-Signalweges deutlich reduziert werden konnte (162). THP-1-Zellen reagierten auf Stx1 mit einer erhöhten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , die ebenfalls nach der Blockade des p38 MAP-Kinase-Signalweges fast vollständig unterblieb (40).

Die genauen Mechanismen, die zu einer Chemokinantwort nach Aktivierung des p38 MAP-Kinase-Signalweges führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Für die Aktivierung der MAP-Kinasen und der damit verbundenen Ausschüttung der Zytokine scheint die enzymatische aktive A-Untereinheit unabdingbar zu sein, denn die Bindung von aufgereinigten B-Untereinheiten von Stx an Gb<sub>3</sub>/CD77 konnte in THP-1-Zellen keine Produktion von TNF- $\alpha$  auslösen (139). Für humane primäre Monozyten konnte gezeigt werden, dass Stx1 und Stx2 zu einer verzögerten, niedrigen JNK-Aktivierung in den Zellen führten, dafür jedoch zu einer deutlichen p38 MAP-Kinase-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (20). Ebenso wie bei Foster *et al.* (40) konnte eine vermehrte TNF- $\alpha$ -Produktion nachgewiesen werden, eine gesteigerte Apoptoserate war jedoch nicht zu

beobachten, was die Theorie der Zusammenhänge zwischen JNK und Apoptose sowie p38 MAPK und proinflammatorischen Zytokinen (s. u.) unterstützt.

Bei bovinen Zellen zeigt Stx eher eine modulatorische als eine zytoletale Wirkung (38, 108). Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von Rindern reagieren auf die Anwesenheit von Stx mit einer verminderten Aktivierung und Proliferation (108). Bei einem Infektionsversuch zeigten PBMC von Kälbern, die mit einem Stx2-negativen *E. coli* O157:H7-Stamm infiziert wurden, eine signifikant höhere STEC-Antigen-spezifische Proliferation als PBMCs von Kälbern, die mit einem Stx2-positivem *E. coli* des gleichen Serotyps inokuliert wurden (61).

Diese Verminderung der Aktivierung und der Proliferation konnte auch bei intra-epithelialen Lymphozyten aus dem bovinen Ileum (iIEL) nachgewiesen werden (104). Hier kommt es außerdem zu einem deutlichem Anstieg der Transkription von *il-4* (104, 112). Auch auf bovinen Makrophagen konnte Gb<sub>3</sub>/CD77 nachgewiesen werden (147). Mukosamakrophagen können Stx binden und reagieren mit einer modifizierten Zytokinausschüttung (147, 158), insbesondere einer Zunahme in der mRNA für IL-8 (147). Durch die Bindung von Stx an Kryptenzellen im bovinen Kolon soll es zu einer verminderten Entwicklung von Epithelzellen und damit zu einer verlängerten Kolonisation des Erregers im Darm kommen können (60). Nach einer anderen Untersuchung sind Kryptenzellen jedoch resistent gegen die zytotoxische und die immunmodulatorische Wirkung von Stx (147).

## 1.5 Wirkung mutagenisierter Shigatoxine

Die zytotoxische Wirkung des A<sub>1</sub>-Fragments ist besonders von den AS auf den Positionen 167 und 170 abhängig. Durch eine gezielte Mutation von Glutaminsäure (E) an Position 167 zu Glutamin (Q) konnte die Zytotoxizität für Verozellen im Gegensatz zum Wildtyp um das 300.000-fache und die enzymatische Aktivität um das 12.500-fache reduziert werden (63, 180). Auch mit dem Einbringen einer zweiten Mutationsstelle (Position 170, Arginin (R)→Leucin (L)) konnten die oben genannten Reduktionen erzielt werden (126). Für Stx2e zeigte die Substitution der AS an diesen zwei Positionen (E167Q/R170L) eine vollständige Elimination der Zytotoxizität gegenüber Verozellen (94). Neben den Substitutionen an Position 167 und 170 wurden auch Mutationen an Positionen 77 und 114 durchgeführt, die sich im Hinblick auf die Reduktion der Toxizität als weniger wirkungsvoll erwiesen (30, 31).

Durch die unterschiedlichen Mutationsversuche im enzymatischen Zentrum der A<sub>1</sub>-Untereinheit von Stx wurde deutlich, dass eine punktgenaue Mutagenese dieser AS eine effektive Art der Inaktivierung des Toxins darstellt. Die besten Ergebnisse, gemessen an der Verozell-Zytotoxizität, wurden mit der Kombination von E167Q/R170L erreicht, da hier die enzymatische Aktivität reduziert bzw. eliminiert werden konnte.

Inwieweit die genannten Mutationen einen Einfluss auf die alternativen und die modulatorischen Wirkungen der Stx besitzen, wurde bislang nur wenig untersucht. In einer Studie wurde die Zytokinproduktion von CaCo-2-Zellen in Anwesenheit einer nicht-toxischen Mutante von Stx1 (E167Q/R170L) beurteilt. Hier zeigte sich im Vergleich mit Stx1 keine gesteigerte Produktion der gemessenen Zytokin-mRNA (179).

## 1.6 Bedeutung des Stx für die Pathogenese EHEC-bedingter Erkrankungen

Das primäre Manifestationsorgan bei EHEC-Infektionen des Menschen ist der Darm. Durch das erregereigene Typ III-Sekretionssystem (T3SS) werden verschiedenen Proteine freigesetzt, die für den Kontakt zwischen Wirtszelle und Erreger verantwortlich sind. Die Gene für das T3SS sind auf dem sogenannten LEE (*locus of enterocyte effacement*) zu finden. Mithilfe der sezernierten Proteine sind EHEC in der Lage, *attaching and effacing* (A/E) Läsionen im Darm zu verursachen. Durch die Freisetzung von EspA wird der Kontakt zwischen Erreger und Zelle vermittelt und der über die „molekulare Nadel“ des T3SS in die Wirtszelle injizierte *translocated intimin-receptor* (Tir) dient als Rezeptor für das Oberflächenmolekül Intimin. So kann der Erreger eine stabile Bindung mit den Darmzellen eingehen (138, 171). Der Mikrovillisaum der Wirtszelle wird zerstört (13, 41, 42). Im Zuge dieser Anheftung wird Stx freigesetzt. Durch die geschädigte Epithelschicht gelangt Stx in die Darmwand und führt hier zu einer Schädigung der Endothelschicht der Kapillaren (137). Durch den Umstand der Mikrovillisaum-Zerstörung und der Zerstörung der Endothelzellen sind Infektionen mit EHEC beim Menschen insbesondere gekennzeichnet durch Diarrhoe und hämorrhagischer Kolitis (HC). Nach einer Inkubationszeit von zwei bis vier Tagen kommt es bei 70-80 % der Infizierten zu wässriger Diarrhoe, meist in Kombination mit abdominalen Krämpfen. Nach einigen Tagen entwickelt sich aus dieser zunächst nur wässrigen Diarrhoe bei 50-60 % der Betroffenen eine HC. Von schwerwiegenden Folgen betroffen sind rund 10-15 % der Kinder mit HC, hier manifestiert sich ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), welches mit Thrombozytopenie, hämolytischer Anämie und Nierenversagen einhergeht. Bei 1 % der HUS-Patienten verläuft das HUS tödlich, rund 6 % behalten

dialysepflichtige Nierenschäden zurück (128). Der Organotropismus beim Menschen beruht vor allem auf der Expression von Gb<sub>3</sub>/CD77 in Endothelzellen der Tubuli und Glomeruli der Niere (72). Rezeptoren finden sich aber auch auf Endothelzellen im menschlichen Gehirn, sodass neurologische Komplikationen nicht selten sind. Der Weg, über den Stx aus dem Darm in andere Organe, insbesondere die Nieren, kommt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt (71). Einige Studien berichten über Bindungen von Stx an polymorphkernige Leukozyten (64, 155, 156), jedoch konnte dieser Transportweg bisher nicht bestätigt werden (48). Auch für die Hypothese, dass Mononzyten für den Transport verantwortlich zu machen sind, fehlt bislang ein sicherer Beleg (49).

## **1.7 Stx-Wirkung auf Zellen des Immunsystems**

Für die Wirkung von Stx auf Zellen ist ein Vorhandensein des Gb<sub>3</sub>/CD77-Rezeptors auf den Zellen Voraussetzung. Die Verteilung von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf Immunzellen ist bei Rind und Mensch unterschiedlich (103). Die spezifische Verteilung könnte für den Unterschied in der klinischen Ausprägung einer STEC-Infektion bei Mensch und Rind verantwortlich sein.

### **1.7.1 Auswirkung auf die Expression von zellspezifischen Markern**

Bei Mäusen konnte nach Injektion mit Stx2 ein Rückgang der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und der B-Zellen im peripheren Blut beobachtet werden (151). Studien über den Einfluss von Stx auf die Expression von zellspezifischen Marker bei humanen Zellen existieren nicht, da bei den meisten Arbeiten mit humanen Zelllinien (z. B. THP-1) gearbeitet wird.

In Anwesenheit von Stx kommt es bei allen Subpopulationen boviner peripherer Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$  T-Zellen, CD21<sup>+</sup>) zu einer reduzierten Expression von Gb<sub>3</sub>/CD77 (106). Auch auf bovinen iIEL war dieser Effekt zu beobachten (104).

### **1.7.2 Auswirkung auf die Produktion von Zytokinen**

In THP-1-Zellen führt die Inkubation mit Stx zu einer Steigerung der Produktion von TNF- $\alpha$  (40). Zudem konnte bei THP-1 die Produktion von mRNA für TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 nachgewiesen werden (56). Die Inkubation mit Stx1 und Stx2 ließ die mRNA-Produktion von TNF- $\alpha$  auch bei primären humanen Makrophagen ansteigen (20).

Bei bovinen iIEL konnte nach der Inkubation mit Stx1 eine erhöhte Transkription von *il-4* festgestellt werden. Bei PBMC wurde die Produktion von IL-4 in Anwesenheit von Stx im Vergleich zu Kontrollzellen leicht vermindert (111).

### 1.7.3 Auswirkungen auf die Proliferation

Zusätzlich zur Apoptose wurde bei Stx auch ein Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen. Sugatani *et al.* konnten nach der intravenösen Gabe von Stx2 bei Mäusen in deren Lymphozyten und Splenozyten einen Rückgang von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie B-Zellen nachweisen. Während bei der mitgeführten Kontrolle die Proliferation der Zellen deutlich zu erkennen war, sank diese bei behandelten Mäusen um 50,4 % (151).

Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei bovinen PBMC nachgewiesen werden. Stx1 bewirkt hier einen Rückgang der Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und, in geringerem Maße, auch von B-Zellen. Dass es sich hier tatsächlich um einen Rückgang der Proliferation und nicht um eine Zunahme der Apoptoserate handelte, zeigte der gleich bleibende prozentuale Anteil an toten Zellen in Kulturen mit Stx1 und Kulturen mit Stx1 und anti-StxB1 (108, 148). Auch bei bovinen IEL hemmt Stx1 die Proliferation *in vitro* (104).

### 1.7.4 Auswirkungen auf die Vitalität

Während Cameron *et al.* keinen Einfluss von Stx auf primäre humane Monozyten nachweisen konnten (20), zeigten sich bei THP-1-Zellen Unterschiede in der Reaktion auf Stx. Harrison *et al.* zeigten, dass Stx bei undifferenzierten, monozyten-ähnlichen THP-1-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate führte, während bei differenzierten, makrophagen-ähnlichen THP-1-Zellen die Apoptoserate deutlich niedriger war (55). Auch in weiteren Studien konnte bei THP-1-Zellen in Anwesenheit von Stx eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden (82, 83).

Sowohl in bovinen iIEL als auch in bovinen PBMC hat Stx keinen Einfluss auf die Apoptoserate (108, 111), während in humanen Neutrophilen die Apoptoserate nach Inkubation mit Stx2 sogar verzögert wurde (88).

## **1.8 Verlauf einer Infektion mit STEC beim Rind**

Obwohl STEC nicht zur normalen Darmflora von Mensch und Tier gehört (116), konnten STEC in klinisch unauffälligen Tieren nachgewiesen werden (51, 117). Diese Tiere stellen ein besonderes Risiko für eine Infektion des Menschen dar. Bereits früh nach der Geburt infizieren sich Kälber mit STEC, entweder bei ihren Müttern oder bei anderen bereits infizierten Tieren (44). Nur vereinzelt kommt es bei den infizierten Kälbern zu Durchfallerkrankungen (176), bei den meisten Tieren bleibt die Infektion ohne Symptome. Die Erregerausscheidung erfolgt bereits kurz nach der Infektion in unregelmäßigen Abständen (44).

Die Kolonisation des Darms mit STEC geht einher mit der Stx-Freisetzung. Eine Ak-Antwort auf Stx erfolgt in der frühen Phase der Infektion nicht (44, 61), jedoch sind Ak gegen O157-LPS nachweisbar (61). Der Beginn einer toxin-spezifischen Ak-Produktion ist erst mit Beginn des sechsten Lebensmonates festzustellen, ein deutlichen Ak-Titer gegen Stx1 ist bei den meisten Rindern mit 2,5 Jahren zu ermitteln (44). Ak gegen Stx2 finden sich bei natürlich infizierten Rindern unabhängig vom Lebensalter nur selten (44), (132). Durch die verzögerte Bildung endogener Ak und das Verschwinden maternaler Ak ca. in der sechsten bis achten Lebenswoche fällt die Erstinfektion der Tiere in einen Zeitraum ohne antitoxische Immunität.

Ein verändertes Zytokinprofil in der intestinalen Mukosa und die unterdrückte Proliferation der Immunzellen durch Stx bedingt eine verzögerte Immunantwort auf STEC. Hierbei wird die Entwicklung einer zellulären Immunantwort gehemmt, eine bereits bestehende Immunantwort jedoch nicht unterdrückt (103). Diese Wirkungen des Stx beim Rind begünstigen die Persistenz der bovinen STEC-Infektion und verlängern die Ausscheidung der Erreger.

## **2 Optionen zur Behandlung und Prävention EHEC-bedingter Erkrankungen**

### **2.1 Behandlung EHEC-infizierter Menschen**

Bisher ist die Behandlung von EHEC-Erkrankungen beim Menschen schwierig. Verschiedene Ansätze zur Entwicklung eines Therapeutikums werden verfolgt, jedoch konnte bisher kein nachhaltiger Erfolg erzielt werden (92). Unterschiede in der Therapieentwicklung betreffen vor allem den Ansatzpunkt. Entweder werden Therapeutika direkt gegen den Erreger (EHEC) oder das Toxin (Stx) entwickelt oder Therapeutika, die in Mechanismen

eingreifen, die durch EHEC/Stx ausgelöst werden (z. B. Aktivierung der MAP-Kinasen, Apoptose der Zellen) (10).

Zu den in der Entwicklung befindlichen Therapeutika gegen EHEC/Stx gehören Stx-bindende Agenzien wie Gb<sub>3</sub>-Rezeptor-Analoga und monoklonale Antikörper. Die erste Generation der Gb<sub>3</sub>-Analoga „Synsorb-PK“ (5) konnte bei Verozellen die Toxizität von Stx1 vermindern, hatte aber auf die Toxizität von Stx2 keine Wirkung. In einem klinischen Test an 145 HUS-erkrankten Kindern führte „Synsorb-PK“ nach oraler Verabreichung zu keiner Veränderung im Krankheitsverlauf (164). Weitere Gb<sub>3</sub>-Analoga zeigen *in vitro* gute Ansätze zur Neutralisation von Stx1 und Stx2, allerdings fehlen hier bisher klinische Daten (77, 113, 119, 175). Versuche mit humanen oder humanisierten monoklonalen Antikörpern gegen Stx in Tiermodellen (Maus, Ferkel) machen deutlich, dass die Antikörper im Modell durchaus in der Lage sind, den Verlauf der Erkrankung zu mildern. Auch zeigte sich, dass eine Verabreichung der Antikörper bis zu 48 Std. nach der Infektion den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen kann (142, 143, 178). Klinische Daten zum Einsatz beim Menschen fehlen bisher aber auch hier.

Therapeutika, die den Mechanismus von Stx in der Zelle oder im Gewebe verhindern, sind bisher wenig erforscht. Fu *et al.* konnten in einem Rattenmodell für HUS zeigen, dass ein p38 MAPK-Inhibitor die Serumspiegel von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  verringerte, was mit einer Verringerung der Nierenschäden einherging (46).

Der Nutzen einer prophylaktischen (während der klinischen Phase der hämorrhagischen Kolitis, die dem EHEC-bedingten HUS in der Regel vorausgeht) oder therapeutischen Antibiotikabehandlung bei HUS-Patienten wird kontrovers diskutiert. Es gibt Anzeichen dafür, dass die Gabe von Antibiotika möglicherweise kontraindiziert ist, bei Kindern eine Antibiotikagabe während einer EHEC-Erkrankung sogar förderlich für ein Entstehen von HUS sein kann (177). In einer Stellungnahme zum aktuellen EHEC-Ausbruch (2011) der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie wird jedoch der Einsatz von Carbapenemen oder neueren Makroliden für relativ unbedenklich gehalten, wenn eine Indikation für eine systemische Antibiotikatherapie gegeben ist. Abgeraten wird in diesem Zusammenhang von der Gabe von Aminoglykosiden, die zu einer verstärkten Stx-Freisetzung führen können (4). Die Anwendung von Antibiotika kann die Freisetzung von Stx aus EHEC fördern (174). Somit beschränkt sich die Behandlung HUS-Erkrankter meist auf Flüssigkeitssubstitution, Elektrolytgaben und intensivmedizinische Überwachung (71).

## 2.2 Subunit-Vakzine und Toxoid-Vakzine

Die Entwicklung von Stx-Impfstoffen wird als weitere Möglichkeit gesehen, das Erkrankungsrisiko des Menschen zu senken. Hierbei sind verschiedene Forschungsansätze im Fokus. Da Stx aus zwei Untereinheiten besteht, wurde die Möglichkeit von Subunit-Vakzinen als Impfstoff erforscht. Subunit-Vakzinen für Stx sind meist Vakzinen gegen die B-Untereinheit, in seltenen Fällen gegen die A-Untereinheit des Toxins. Hierbei wird angenommen, dass, wenn Ak gegen eine Untereinheit gebildet werden, das gesamte Toxin neutralisiert werden kann. Hierfür wurden die B-Untereinheiten kloniert und in Vektoren exprimiert. Anschließend wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, die klonierten B-Untereinheiten aufzureinigen und zu verimpfen. Die erhaltenen Untereinheiten wurden z. B. an Trägersubstanzen (*keyhole limpet hemocyanin*) gekoppelt und im Tiermodell (Maus) eingesetzt, wo anschließend die Antikörperbildung gegen die B-Untereinheit ermittelt wurde (96). Zur Aufreinigung der B-Untereinheit wurde in einer weiteren Studie „Synsorb-PK“ benutzt. Im weiteren Verlauf wurden Kaninchen mit dieser aufgereinigten Lösung geimpft (97). Als weitere Möglichkeit der Aufreinigung wurden eingefügte *HisTags* verwendet und Mäuse mit dem aufgereinigtem Produkt nasal immunisiert (165). Bei allen drei Methoden zeigten sich gute Ergebnisse im jeweiligen Tiermodell: Ak gegen die Untereinheit konnten nachgewiesen werden, auch eine *in vivo* Belastung mit Stx wurde gut toleriert, es gab aber keine Kreuzreaktionen zwischen Stx1 und Stx2 (96, 97, 165).

Eine Subunit-Vakzine gegen die A-Untereinheit von Stx2 wurde von Liu *et al.* vorgestellt. Hier wurden die Gensequenzen für die A-Untereinheit in A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> geteilt. Das Gen für die A<sub>1</sub>-Untereinheit wurde sequenziert, die Sequenz vor der Amplifikation um die Codons für 15 AS-Reste am Carboxyl-Ende verkürzt und anschließend amplifiziert. Dieses Fragment wurde in einen Vektor integriert und in BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Die Antigenität des Fragments wurde durch die Entfernung der 15 AS-Reste nicht verändert. Im Westernblot war eine Reaktion mit spezifischen Ak zu sehen. Ebenso produzierten Mäuse, die mit diesem Fragment immunisiert wurden, Ak, die Stx2 im Verozell-Neutralisationstest neutralisieren konnten. Auch bot diese Immunisierung den meisten Mäusen (11 von 15) Schutz gegen eine Belastung mit Stx2. Die Autoren schlossen daraus, dass das gekürzte Fragment von Stx2A<sub>1</sub> als Impfstoffkandidat infrage kommt (89).

Für den Einsatz beim Mensch würden sich Impfstoffe besser eignen, die gleichzeitig Ak gegen Stx1 und Stx2 induzieren. Aus diesem Grund wurde versucht, die A-Untereinheit von Stx2 mit der B-Untereinheit von Stx1 zu kombinieren und so Ak zu induzieren, die gegen

beide Stx-Hauptgruppen wirken. Smith *et al.* zeigten, dass ein Antigen aus einer nicht-toxischen A-Untereinheit von Stx2 und der nativen B-Untereinheit von Stx1 keine Zytotoxizität für Verozellen mehr besitzt und gleichzeitig in Mäusen einen hohen Antikörperspiegel gegen Stx1 und Stx2 hervorruft. Auch die Gabe einer letalen Dosis von Stx1 oder Stx2 wurde von den geimpften Mäusen toleriert (145). Klinische Studien zum Einsatz von Subunit-Vakzinen beim Menschen fehlen jedoch bisher.

Als einfachste Möglichkeit einer Impfung erschien, ähnlich wie bei dem Tetanus-Toxin (160), die chemische Inaktivierung von Stx mit Formaldehyd. In einer Studie mit einem so inaktivierten Stx2e konnte eine Reduktion der Toxizität auf Verozellen nachgewiesen werden, jedoch blieb die Toxizität noch nachweisbar. Dieses chemisch inaktivierte Toxin wurde im Ferkelmodell eingesetzt. Die Ferkel bildeten Ak gegen das Toxin, verloren aber gleichzeitig an Gewicht und bildeten die für die Ödemkrankheit typischen Läsionen im Darm aus. Hier wurde vermutlich durch die chemische Inaktivierung die Struktur des Toxins so verändert, dass die Zelltoxizität verringert, jedoch die Wirkung *in vivo* nicht aufgehoben wurde (52). In einer weiteren Studie wurden Versuche mit der Inaktivierung von Stx2e durch Glutaraldehyd gemacht, hierbei konnte die Toxizität im Verozell-Zytotoxizitätstest nicht mehr nachgewiesen werden. Ferkel wurden mit diesem Toxoid geimpft und entwickelten auch Ak, jedoch unterschieden sich die Ak-Titer der einzelnen Tiere deutlich. Bei einer Belastung mit unbehandeltem Stx2e erkrankten Ferkel mit hohen Ak-Titern nicht, bei Ferkeln mit niedrigen Ak-Titern kam es zu schwach ausgeprägten Zeichen der Ödemkrankheit (93).

Eine weitere Möglichkeit der Toxoid-Vakzine stellen mutagenisierte Toxine dar. Hierfür wurden im enzymatischen Zentrum von Stx2e E167 und R170 auf gentechnischem Wege ersetzt (63, 180). Ferkel wurden mit dem so veränderten Toxoid geimpft und nativem Stx2e ausgesetzt. Die Ferkel entwickelten keinerlei Symptome der Ödemkrankheit (52, 94). Diese Ergebnisse zeigten sich auch in Mausmodellen bei dem Einsatz von mutagenisiertem Stx1. Hier war nach der Impfung ein Anstieg von neutralisierenden Ak zu erkennen, ebenso erhöhte sich nach Belastung mit nativem Stx1 die Überlebensrate der Mäuse (68, 124).

### **2.3 Kandidatenantigene für eine Impfung zur Verringerung der STEC-Ausscheidung beim Rind**

Da die Entwicklung von Methoden zur Behandlung von EHEC-Erkrankungen des Menschen bislang nicht erfolgreich war, sind Präventionsmaßnahmen derzeit das Mittel der Wahl. Die Verhinderung von EHEC-Infektionen stellt vor allem hohe Anforderungen an die

Lebensmittelhygiene. Die Reduktion der STEC-Ausscheidung beim Rind wird als weitere Möglichkeit angesehen, der Infektion des Menschen vorzubeugen. Es wird die Verwendung unterschiedlicher Virulenzfaktoren als Impfstoff erforscht. Die bislang publizierten Ansätze lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen: Vakzinen, die a) Typ III-Sekretionsproteine, b) Kombinationen verschiedener STEC-Proteine und c) Stx1, Stx2 oder beide Toxine enthalten.

#### **a) Typ III-Sekretionssystem (T3SS)**

Die Proteine des T3SS sind an der Kolonisation des Darms durch STEC beteiligt und stellen unter diesem Gesichtspunkt einen möglichen Angriffspunkt einer STEC-Vakzine dar. Hier sind insbesondere die Proteine EspA, Intimin und Tir zu nennen (118).

#### **EspA (*E. coli* secreted protein A)**

EspA dient STEC als „Starthilfe“ bei der Kolonisation (134). Durch EspA wird ein erster Kontakt zwischen Wirtszelle und Bakterium aufgebaut, welcher dann über die Verbindung von Tir und Intimin gefestigt wird (1). Nach einer Impfung von Kälbern mit rekombinant hergestelltem EspA konnte eine Ak-Bildung gegen EspA nachgewiesen werden. Die gebildeten Ak waren in einem ELISA in der Lage, natürliches, an die Mikrotiterplatte gebundenes EspA zu erkennen. Die Dauer oder Menge der Ausscheidung eines inokulierten *E. coli* O157:H7 konnte aber nicht beeinflusst werden (34).

#### **Tir (*translocated intimin receptor*)**

Tir wird von dem Bakterium in die Wirtszelle eingeschleust, wo es dann als Rezeptor für Intimin dient (42, 76), was eine feste Verbindung zwischen Wirtszelle und Bakterium herstellt (28). Dies führt zur Bildung der charakteristischen A/E-Läsionen im Darm.

Nach einer Impfung mit Tir und EspA aus STEC-Überständen konnten bei den geimpften Kälbern eine deutliche Ak-Bildung und eine geringere Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 nachgewiesen werden, was auf eine verminderte Kolonisation hindeuten könnte. Auch bei Tieren, die nachweislich bereits STEC ausschieden, kam es zu einer verminderten Ausscheidung nach der Impfung. (134). Die gleiche Vakzine wurde zu einem späteren Zeitpunkt bei neun Rinderherden eingesetzt. Hierbei war die Dauer und Menge der Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 im Gegensatz zur Kontrollgruppe ohne Impfung nicht signifikant vermindert (169). Die tatsächliche Kolonisation der rektalen Mukosazellen im Vergleich zu ungeimpften Rindern verringerte sich jedoch (131).

## **Intimin**

Kälber, die mit einem rekombinant hergestellten Intiminfragment geimpft wurden, entwickelten entsprechende Ak. In den geimpften Tieren war trotzdem die STEC-Ausscheidung (Dauer und Menge) nach einer experimentellen Infektion gegenüber der Kontrollgruppe unverändert (168). Die nasale Immunisierung mit einem Intiminfragment in Kombination mit hitzelabilem *E. coli*-Enterotoxin bei Kälbern führte zu einem Anstieg an Ak im Nasensekret und im Speichel. Bei Kühen führte diese Immunisierung zu hohen Ak-Titern im Serum und Kolostrum. Inwieweit diese Ak Auswirkungen auf die Ausscheidung von STEC hatten, wurde nicht untersucht (181).

### **b) Andere STEC-Proteine**

McNeilly *et al.* impften eine Herde Rinder mit einer Vakzine aus H7-Flagellin. Dieses führte zu einem deutlichen Anstieg von spezifischen Ak. Die Ausscheidung von STEC nach einer experimentellen Infektion wurde in der immunisierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert, die ausgeschiedene Menge konnte durch diese Ak jedoch nicht beeinflusst werden (102).

Eine Erfolg versprechende Variante scheint die Kombination aus verschiedenen Proteinen zu sein. Hier wurde eine Kombination aus Intimin-531, EspA und Tir verwendet. Kälber wurden mit dieser Kombination dreimal geimpft und anschließend mit einem *E. coli* O157:H7 (stx-) inokuliert. Es konnten spezifische Ak gegen alle drei eingesetzten Proteine nachgewiesen werden und die Ausscheidungsrate des inokulierten *E. coli*-Stammes wurde bei den immunisierten Kälbern im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (101).

### **c) Stx1/2**

Mit Stx1 und Stx2 wurden bisher nur wenige Tiere geimpft. Kuribayashi *et al.* zeigten, dass die Impfung von zwei trächtigen Kühen mit gereinigtem Stx2 aus Bakterienkultur-Überständen zu einem Ak-Anstieg gegen Stx2 im Kolostrum der Kühe führte. Auch konnten nach der Immunisierung einer trächtigen Kuh mit Stx1- und Stx2-haltigem Kulturüberstand Ak gegen Stx1 und Stx2 im Kolostrum nachgewiesen werden. Ak aus dem Kolostrum wurden auf Mäuse übertragen und konnten die Überlebensrate der Mäuse nach experimenteller Inokulation mit STEC im Vergleich zur Kontrollgruppe steigern (79). Die gleiche Forschergruppe immunisierte später erneut zwei Kühe mit Stx2-haltigem Überstand, gewann Ak gegen Stx2 aus dem Kolostrum und setzte diese in experimentell mit STEC infizierten

Hunden (Beagle) ein. Die STEC-Ausscheidung der Beagle konnte durch die eingesetzten Ak aus dem Kolostrum reduziert werden (80).

Über die Ak-Konzentration im Blut der Kühe, die STEC-Ausscheidung und -Kolonisation der Kühe wurde bei beiden Impfversuchen nicht berichtet.

### 3 Ziel dieser Arbeit

In Ermangelung verfügbarer Therapieverfahren zur kausalen Behandlung von HC und HUS im Zusammenhang mit humanen EHEC-Infektionen und dem Fehlen wirksamer Impfstoffe zum Schutz des Menschen vor den Wirkungen der Stx kommt der Vorbeugung der Infektion eine zentrale Bedeutung zu. Seit Entdeckung der EHEC/STEC implementierte fleisch- und milchhygienische Maßnahmen haben sich bereits als wirksam erwiesen, jedoch spielt der Verzehr von kontaminierten pflanzlichen Lebensmitteln und der direkte Kontakt zu Rindern eine zunehmende Rolle als Quelle sporadischer EHEC-Infektionen und von Ausbrüchen. Zur Vorbeugung der Krankheitsfälle beim Mensch muss deshalb die bei vielen Rindern vorkommende, z. T. persistente Ausscheidung der Erreger reduziert werden.

Stx ist ein wichtiger STEC-Virulenzfaktor, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen des Menschen spielt, aber auch für die STEC-Besiedlung von Rindern bedeutsam ist. Stx1-spezifische Ak entwickeln sich bei Kälbern erst relativ spät. Der Titer maternaler anti-Stx1-Ak im Blut der Kälber fällt innerhalb von sechs bis acht Wochen unter die Nachweisgrenze. Stx2-spezifische Ak sind kaum nachweisbar. Die Erstinfektion mit STEC fällt deshalb in eine immunologische Lücke ohne Schutz vor der immunmodulierenden Wirkung der Stx. Im Zuge der Infektion verzögert Stx die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen und verhindert eine spezifische Immunantwort gegen STEC. Dies begünstigt eine persistente Infektion und die kontinuierliche Ausscheidung des Erregers.

Die Verwendung eines Shigatoxoids als Impfstoff würde Kälber in die Lage versetzen, frühzeitig Ak gegen Stx zu bilden. Stx könnte dann seine immunmodulatorische Wirkung nicht ausüben und die Erreger würden schnell und effektiv eliminiert. Für diesen Zweck muss ein Impfstoffkandidat entwickelt werden, der bei Erhalt der Immunogenität nicht nur die zytotoxische Wirkung gegenüber Verozellen verloren hat, sondern auch keinerlei modulierende Wirkung mehr besitzt. Für gentechnisch inaktivierte Shigatoxoide ist Ersteres beschrieben, jedoch war bislang unbekannt, ob die erhaltene Bindungsfähigkeit der Toxine an Zellen noch zu immunmodulatorischen Wirkungen auf Immunzellen des Rindes führt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, genetisch inaktivierte Shigatoxoide für Stx1 und Stx2 zu generieren und zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Effekte der wildtypischen Stx auf periphere Lymphozyten, intraepitheliale Lymphozyten und Makrophagen des Rindes bei diesen Toxoiden verloren gegangen sind.

## V Material und Methoden

### 1.1 Amplifikation der *stx1*- und *stx2*-Gensequenzen

#### 1.1.1 Anzüchtung des EHEC-Referenzstamms EDL 933

Für die Amplifikation der Toxingene wurde der EHEC-Referenzstamm EDL 933 (American Type Culture Collection (ATCC), 43895) verwendet. Dieser wurde in LB-Medium (37 °C, 180 rpm, 16 h) angezüchtet. Im Anschluss wurde das beimpfte Medium aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

#### 1.1.2 DNA-Präparation

Für die Präparation genomischer DNA aus dem EHEC-Referenzstamm EDL 933 wurde ein Aliquot des beimpften Mediums aufgetaut, 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

#### 1.1.3 Überprüfung auf das Vorhandensein der *stx1*- und *stx2*-Gene

Für die Toxingenamplifikation mit den Primern Stx1F/R bzw. Stx2F/R (Tab. 2) wurde eine PCR mit einer PANScript DNA-Polymerase durchgeführt (Reaktionsansatz siehe Tab. 3). Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Protokoll: 5 min Denaturierung bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung (94 °C), 1 min Anlagerung (52 °C) und 1 min 30 sec Verlängerung (72 °C). Jede Amplifikation wurde mit einer Inkubation für 5 min bei 72 °C abgeschlossen.

**Tab. 2: Primer für die Toxingen-Amplifikation**

| Primer | Sequenz (5' → 3')                          | Gen          | Referenz  |
|--------|--|--------------|-----------|
| Stx1F  | -ggagtattgtgt <u>CATATG</u> aaaat-         | <i>stxA1</i> | PubMed    |
| Stx1R  | -tattc <u>GAATTC</u> aacgaaaaataa-         | <i>stxB1</i> | AE005174  |
| Stx2F  | -tatatg <u>CATATG</u> aagtgtatattattttaaa- | <i>stxA2</i> | PubMed    |
| Stx2R  | -aacctg <u>GAATTC</u> agtcattattaaactgcact | <i>stxB2</i> | NC_000924 |

Schnittstellen sind unterstrichen und fett dargestellt, bei StxF für *NdeI*, bei StxR für *EcoRI*.

**Tab. 3: Reaktionsansatz für die Amplifikation des *stx1*- bzw. *stx2*-Gens**

| Reagenz                            | Menge/Ansatz | Endkonzentration/Testansatz |
|------------------------------------|--------------|-----------------------------|
| 10 x NH <sub>4</sub> -Puffer       | 3 µl         | 1 x                         |
| 50 mM CaCl <sub>2</sub>            | 1,2 µl       | 2 mM                        |
| dNTPs (4 mM/Nukleotid)             | 1 µl         | 133 µM/Nukleotid            |
| Stx1F bzw. Stx2F Primer<br>(20 µM) | 0,75 µl      | 0,3 µM                      |
| Stx1R bzw. Stx2R Primer<br>(20 µM) | 0,75 µl      | 0,3 µM                      |
| PAN Script Polymerase<br>(5 U/µl)  | 0,2 µl       | 0,03 U/µl                   |
| EDL 933 genomische DNA             | 3 µl         | -                           |
| <i>A. bidest</i>                   | ad 30 µl     | -                           |
| Volumen                            | 30 µl        | -                           |

#### 1.1.4 Herstellung des *stx1*- und *stx2*-Klonierungsinserts

Für die Herstellung der *stx1*- und *stx2*-Klonierungsinserts wurde eine rekombinante *Thermus thermophilus* (*rTth*)-XL-Polymerase mit „Proof-reading“-Aktivität gewählt (Tab. 4).

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: Denaturierung für 1 min bei 94 °C, gefolgt von 32 Zyklen mit je 15 sec Denaturierung (94 °C) und 5 min Annealing- und Extensionsphase (47 °C für *stx1* bzw. 52 °C für *stx2*), wobei ab dem 16. Zyklus die Annealing- und Extensionsphase um 15 sec je Zyklus verlängert wurde. Die abschließende Verlängerungsphase dauerte 10 min bei 72 °C.

Tab. 4: Reaktionsansatz zur Herstellung des *stx1*- bzw. *stx2*-Klonierungsinserts

| Reagenz                            | Menge/Testansatz | Endkonzentration/Testansatz |
|------------------------------------|------------------|-----------------------------|
| 1 x XL Puffer                      | 16 µl            | 1 x                         |
| 10 mM Mg(AOc) <sub>2</sub>         | 2 µl             | 0,4 mM                      |
| dNTPs<br>(4 mM/Nukleotid)          | 4,5 µl           | 800 µM/Nukleotid            |
| Stx1F bzw. Stx2F<br>Primer (20 µM) | 0,9 µl           | 0,36 µM                     |
| Stx1R bzw. Stx2R<br>Primer (20 µM) | 0,9 µl           | 0,36 µM                     |
| XL-Polymerase<br>(2,5 U/µl)        | 1 µl             | 0,05 U                      |
| EDL 933 genomische<br>DNA          | 1 µl             | -                           |
| <i>A. dest.</i>                    | ad 50 µl         | -                           |
| Volumen                            | 50 µl            | -                           |

### 1.1.5 Aufreinigung der *stx1*- und *stx2*-Klonierungsinserts

Die PCR-Produkte aus der XL-PCR wurden mit einem QIAquick PCR Purifikation Kit nach Herstellerangaben mit geringen Modifikationen aufgereinigt. Die PCR-Produkte wurden mit jeweils 5 Volumen des Puffers 1 gemischt, auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und für 60 sec bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt, die Säule mit 75 µl des PE-Puffers gewaschen und für 60 sec trocken zentrifugiert. Nach Überführung der Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden zur Elution der DNA 80 µl des EB-Puffers zur Säulenmatrix dazugegeben und für 60 sec bei 13.000 x g zentrifugiert. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden 5 µl der aufgereinigten Amplifikate mit 1 Volumen Ladepuffer versehen und auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Der Rest des aufgereinigten PCR-Produktes wurde für die nachfolgende Klonierung bei -70 °C eingefroren.

## 1.2 Klonierung der amplifizierten Toxingene

### 1.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

#### *Escherichia coli* BLR(DE3)

*E. coli* BLR(DE3)-Zellen (Fa. Novagen) dienten nach Transformation zur Proteinexpression. Die Anzucht erfolgte für 18 h bei 37 °C auf einer Blutagarplatte. Anschließend wurden einige Einzelkolonien in 2 ml LB-Medium verbracht und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (Starterkultur). Am nächsten Tag wurden 500 µl der Starterkultur mit 50 ml frischem LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>450nm</sub> von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Nach einer Zentrifugation (5 min, 4 °C, 3200 x g) wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 12,5 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation und der Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 2 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % Glycerin resuspendiert und in Aliquots à 100 µl bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### **XL1-Blue Zellen**

Die in dem Mutagenisierungs-Kit enthaltenen XL1-Blue superkompetenten Zellen (Fa. Stratagene, Amsterdam, NL) wurden entsprechend den Herstellerangaben für die Transformation der mutagenisierten Toxingene verwendet.

### 1.2.2 Vorbereitung des Plasmidvektors

#### **Vektorpräparation**

Als Vektor wurde ein pET-24b(+)-Plasmid (Fa. Novagen) ausgewählt. Die Präparation erfolgte mit dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 1/10 Vol. Na-Acetat und 2 Vol. 100 % Ethanol gefällt, in 80 µl autoklaviertem TE (pH 8,0) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### **Plasmidverdau**

Für die Klonierung wurde der pET-24b(+)-Vektor mit *EcoRI* und *NdeI* gemäß den Herstellerangaben verdaut. Der Reaktionsansatz (250 µl Gesamtansatz) für den Verdau mit *NdeI* enthielt 11,4 ng pET-24b(+)-Vektor-DNA, 1 x Puffer O (Orange, Fa. Fermentas) und 30 U *NdeI*. Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 37 °C. Für den nachfolgenden *EcoRI*-Verdau wurden zu den 250 µl des *NdeI*-Verdaus 20 U *EcoRI* gegeben und 18 h bei 37 °C inkubiert.

### **Aufreinigung der verdauten Vektor-DNA**

Das verdaute Aliquot des Vektors wurde mittels Phenol/Chloroform gereinigt. Hierzu wurden 250 µl der verdauten Vektor-DNA mit 250 µl TE-Puffer (pH 8,0) gemischt und ein Volumen Phenol dazugegeben. Diese Lösung wurde gevortext, 5 min bei 13000 x g (RT) zentrifugiert und im Anschluss der wässrige Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, gevortext, zentrifugiert (13000 x g, 5 min, RT) und der Überstand abgenommen. Es schloss sich eine Fällung des gereinigten Überstands mit 1/10 Vol. Na-Acetat und 2 Vol. 100 %-Ethanol und einem anschließendem Waschen mit 70 %-Ethanol an.

Die gefällte DNA wurde in 100 µl *A. bidest.* resuspendiert. Zur Verhinderung der Religation des linearisierten Plasmids wurden 50 µl dieser Suspension in einem 100 µl-Gesamtansatz mit 1 x SAP (Shrimp-Alkaline-Phosphatase)-Puffer und 5 U SAP (Shrimp-Alkaline-Phosphatase) versetzt und für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min inaktiviert. Es folgte eine erneute Ethanol-fällung wie oben beschrieben und das Pellet wurde in 25 µl *A. bidest.* resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **1.2.3 Verdau der *stx1*- und *stx2*-Amplifikate**

Die aufgereinigten *stx1*- und *stx2*-Amplifikate der XL-PCR wurden ebenfalls einem Verdau mit *EcoRI* und *NdeI* unterzogen. Der Ansatz für den *NdeI*-Verdau (200 µl Reaktionsansatz) enthielt 75 µl des jeweiligen Amplifikats, 100 µl 2 x Puffer O und 25 U *NdeI*. Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 37 °C. Nach einer alkoholischen Fällung mit 1/10 Vol Na-Acetat und 2 Vol 100 %-Ethanol erfolgte ein Waschen des DNA-Fragments mit 70 % Ethanol. Im Anschluss erfolgte der Verdau mit *EcoRI*. Hierbei wurden in einem 200 µl-Reaktionsansatz 75 µl des jeweiligen Amplifikats, 100 µl 2 x Puffer O und 25 U *EcoRI* für 18 h bei 37 °C inkubiert. Die doppelt verdauten Amplifikate wurden über eine Agarose-Gel-Extraktion mit einem QIAEX II Gel Extraktions-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **1.2.4 Ligation**

Die Ligation der verdauten *stx1*- bzw. *stx2*-Amplifikate mit dem ebenfalls verdauten pET-24b(+)-Vektor erfolgte für 18 h bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 10 µl, bestehend aus 1 x Ligasepuffer, 1 U T4-Ligase, 50 ng pET-24b(+)-Vektor und 150 ng der jeweiligen Insert-DNA (Vektor/Insert-Verhältnis 1:3).

### **1.2.5 Transformation in *E. coli* BLR(DE3)**

Zur Transformation wurde ein Aliquot (100 µl) der vorbereiteten *E. coli* BLR(DE3)-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 ng (1 µl) des Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeimpuls (90 sec, 42 °C) wurden die Zellsuspensionen erneut auf Eis gelagert (2 min). Nach der Zugabe von 800 µl LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 37 °C und 180 rpm. Es schloss sich eine Zentrifugation (13000 x g, 15 sec, RT) an, gefolgt von der Entnahme des Überstands (700 µl). Das Pellet wurde in dem verbleibendem Medium resuspendiert, auf eine LB-Agar-Platte mit Kanamycin (f.c. 30 µg/ml) und Tetracyclin (f.c. 12,5 µg/ml) ausgebracht und 18 h bei 37 °C inkubiert.

### **1.3 Sequenzierung**

Als Material für die Sequenzierungen wurden PCR-Amplifikate vor und nach der Mutagenisierung sowie Plasmidpräparationen verwendet. Die Sequenzierung des Materials wurde von der Firma GENterprise GmbH, Mainz, durchgeführt.

### **1.4 Mutagenisierung der klonierten Toxingene**

#### **1.4.1 Plasmidpräparation**

Die transformierten *E. coli* BLR(DE3) wurden einer Plasmidpräparation unterzogen. Diese erfolgte mittels „Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben. Das Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer resuspendiert und photometrisch die Konzentration ermittelt.

#### **1.4.2 Synthese von mutierten *stx1*- und *stx2*-Gensequenzen**

Die Synthese der mutierten *stx1*- und *stx2*-Gensequenzen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Fa. Stratagene, Amsterdam, NL) (Tab. 5). Für die Mutations-PCR wurden eine *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*)-Polymerase und die entsprechenden Mutationsprimer (Tab. 6) verwendet. Die Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt: 16 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95 °C für 30 sec, einem Annealing bei 55 °C für 1 min und einer Elongation bei 68 °C für 390 sec. Danach wurden alle Ansätze direkt auf Eis gelagert.

**Tab. 5: Mutations-PCR, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Stx1 (Ansatz A) bzw. Stx2 (Ansatz B)**

| Reagenz   | Menge/Testansatz | Endkonzentration/Testansatz |
|---|------------------|-----------------------------|
| 10 x Reaktionspuffer                                  | 5 µl             | 1 x                         |
| DNTP<br>(4mM/Nukleotid)                               | 1 µl             | 80 µM/Nukleotid             |
| stx1A <sub>mut</sub> F bzw.<br>stx2A <sub>mut</sub> F | 1,4 µl           | 125 ng                      |
| stx1A <sub>mut</sub> R bzw.<br>stx2A <sub>mut</sub> R | 1,3 µl           | 125 ng                      |
| Pfu Polymerase<br>(2,5 U/µl)                          | 1 µl             | 0,05 U                      |
| Ansatz A: Stx1-Plasmid                                | 1,9 µl           | 5 ng                        |
| Ansatz B Stx2-Plasmid                                 | 3,5 µl           | 5 ng                        |
| <i>A. bidest</i>                                      | ad 50µl          | -                           |
| Volumen   | 50 µl            | -                           |

**Tab. 6: Primer für die Mutagenese**

| Primer                 | Sequenz (5' → 3')  | Gen          |
|------------------------|--|--------------|
| Stx1A <sub>mut</sub> F | -ctgtgacagct <u>C</u> aagctttac <u>T</u> tttcggcaaatacag-  | <i>stx1A</i> |
| Stx1A <sub>mut</sub> R | -ctgtatttgcgaaaa <u>A</u> gtaaagctt <u>G</u> agctgtcacag-  | <i>stx1A</i> |
| Stx2A <sub>mut</sub> F | -cactgtcacagca <u>C</u> aagccttac <u>T</u> cttcaggcagatac- | <i>stx2A</i> |
| Stx2A <sub>mut</sub> R | -gtatctgcctgaag <u>A</u> gtaaggctt <u>G</u> tgctgtgacagtg- | <i>stx2A</i> |

Ausgetauschte Basen sind fett und unterstrichen dargestellt.

### 1.4.3 *DpnI*-Verdau der Amplifikationsprodukte

Die Amplifikationsprodukte der Mutations-PCR wurden einem *DpnI*-Verdau unterzogen. *DpnI* verdaut ausschließlich die methylierte DNA des parenteralen Plasmids, sodass nur Plasmide mit der erwünschten Mutation zurückbleiben. Für diesen Verdau wurden 10 U *DpnI* direkt in den PCR-Ansatz gegeben, für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und danach bei -20°C eingefroren.

#### **1.4.4 Transformation in XL1-Blue**

Für die Transformation der Amplifikate der Mutations-PCR in XL1-Blue-Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und die Transformation wurde mittels Hitzeschock nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **1.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von PCR-Amplifikaten und Plasmiden erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit 0,5 bis 2 %iger Agarose, mit einer angelegten Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand über 1 bis 2,5 Stunden. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Gele wurden vor dem Gießen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Der Probenauftrag erfolgte durch Mischen des PCR-Ansatzes im Verhältnis 1:6 mit 10 x Loading-Puffer. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurden der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus oder die Genemarker λ HE und/oder Lambda *HindIII* mitgeführt. Die Sichtbarmachung der im elektrischen Feld aufgetrennten DNA-Moleküle erfolgte mit UV-Licht.

#### **1.6 Expression der mutierten Toxingene**

##### **1.6.1 Umtransformation der mutierten Toxingene in *E. coli* BLR(DE3)**

Die transformierten XL-Blue-Zellen wurden einer Plasmidpräparation unterzogen. Diese erfolgte mit dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben. Im Anschluss erfolgte eine Transformation des gewonnenen Plasmids in *E. coli* BLR(DE3)-Zellen mittels Hitzeschock wie oben beschrieben.

##### **1.6.2 Induktion**

Zur Induktion der Proteinexpression wurden die transformierten *E. coli* BLR(DE3)-Zellen in 200 ml LB-Medium mit Kanamycin (30 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) für 18 h bei 37 °C und 180 rpm angezüchtet. Im Anschluss wurde jeder Ansatz geteilt. Zu je einem Teil wurde 1 mM IPTG dazugegeben, der andere Teil wurde als Kontrolle ohne IPTG mitgeführt. Alle Ansätze wurden für 22 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert und im Anschluss die OD<sub>600nm</sub> ermittelt.

### 1.6.3 Fraktionierte Toxinpräparation

Für die fraktionierte Toxinpräparation wurden 10 ml von jedem Induktionsansatz in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 30 min bei 3290 x g zentrifugiert. Von den Überständen wurden je 2 ml in sterile 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und der Rest des Überstands verworfen. Nach einer Zentrifugation (10 min, 13000 x g, RT) wurden die Überstände in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und als „Überstand/Fraktion 1“ gekennzeichnet.

Zu den Pellets der Induktions-Ansätze wurden je 2 ml Polymyxin B gegeben, resuspendiert und für 45 min inkubiert (37 °C, 180 rpm). Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (20 min, 4 °C, 3290 x g). Die gewonnenen Überstände wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und als „Periplasma/Fraktion 2“ gekennzeichnet. Zu den verbliebenen Pellets wurden je 2 ml steriles *A. bidest* gegeben, resuspendiert und die Suspensionen für 2 x 20 sec mit Ultraschall (Stufe 4-5, Dauerbetrieb) behandelt. Zwischen den Ultraschallbehandlungen erfolgte eine Lagerung auf Eis für 20 sec. Danach wurden die Suspensionen in neue Reaktionsgefäße überführt, für 10 min zentrifugiert (13000 x g, RT) und im Anschluss die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt, die als „Pellet/Fraktion 3“ gekennzeichnet wurden. Alle Fraktionen wurden bei -70°C gelagert.

### 1.7 Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel

Die einzelnen Periplasma-Toxinpräparationen wurden mithilfe eines Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel in Säulenform von dem Lipopolysaccharid (LPS) gereinigt. Die Durchführung erfolgte analog der Anleitung. Hierbei wurden die benötigten Säulen mit dem 5-fachen Volumen der Säulenmatrix an Natrium-Deoxycholat regeneriert, im Anschluss mit dem 5-fachen Volumen der Säulenmatrix an *A. bidest* gespült und der Spülvorgang einmal wiederholt. Nach den Spüldurchgängen wurde die entsprechende Probe geladen, ca. 600 µl Durchfluss verworfen und der folgende Durchfluss gesammelt. Die Säulenmatrix wurde mit 3 ml *A. bidest* gespült, von diesem Durchfluss wurden etwa 1,5-2 ml gesammelt. Die Säulen wurden im Anschluss einmal mit Natrium-Deoxycholat und zweimal mit *A. bidest* gewaschen und anschließend bei 2-8 °C in 25 % Ethanol gelagert.

Der Durchfluss der einzelnen Periplasma-Toxinpräparationen wurde durch je einen Sterilfilter (0,22 µm, Fa. Schleicher und Schuell) gegeben, aliquotiert à 500 µl und bei -70 °C eingefroren. Alle Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

### 1.7.1 Überprüfung des LPS-Gehalts

Um den Rest-LPS-Gehalt des gereinigten Durchflusses zu ermitteln, wurden Aliquots der Proben im Labor L+S (Bad Bocklet-Großenbrach) mittels Limulus-Test (LAL-Test) untersucht.

## 2 Verozell-Zytotoxizitätstest

### 2.1 Zelllinie

Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurden Verozellen verwendet. Diese adhärente Zelllinie wurde von der ATCC (# CRL 1587, LGC-Promochem GmbH, Wesel) bezogen. Sie stammt ursprünglich von Nierenkarzinomzellen der grünen Meerkatze.

Verozellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>) kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung). Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1. Zum Ernten der Zellen für den Einsatz in Tests bzw. zur Ausdünnung der Zellen zur Weiterkultivierung wurden nach Entnahme des Mediums die Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit 10 ml HEPES-Puffer entfernt. Anschließend wurden jeweils 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung zu den Zellen gegeben und diese für 10 min im Brutschrank bis zur Ablösung des Monolayers inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen in 50 ml-Röhrchen überführt und das gleiche Volumen an fötalem Kälberserum (FKS)-haltigem Medium nach Ausspülen der Kulturgefäße hinzugefügt. Dann erfolgte eine 7-minütige Zentrifugation bei 202 x g und 20 °C (Sigma 4K15). Nach dem Dekantieren des Überstandes konnten die Zellpellets in jeweils 5 ml Zellkulturmedium 1 resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzählung entnommen werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zellzahl wurde durch die Zugabe von Zellkulturmedium 1 eingestellt.

### 2.2 Durchführung

Um die Zytotoxizität der verwendeten Toxinpräparationen (rStx1<sub>WT</sub>, rStx2<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>mut</sub>) sowie die Zytotoxizität der verwendeten Toxingebrauchslösung (200 CD<sub>50</sub> rStx1<sub>WT</sub>/ml bzw. rStx2<sub>WT</sub>/ml) zu kontrollieren, wurde ein Verozell-Zytotoxizitätstest (Verozell-ZT), modifiziert nach Gentry und Dalrymple (50), herangezogen.

Der Zytotoxizitätstest erfolgt im Mikrotiterformat, wobei drei Komponenten à 50 µl nacheinander in die Mikrotiterplatten pipettiert wurden:

#### 1. Komponente

Sie enthält die auf Zytotoxizität zu überprüfende Probe, welche in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt ist und dann in Zellkulturmedium 1 logarithmisch ausverdünnt wird. Die Positivkontrolle enthielt hier 50 µl einer 1 %-SDS-Lösung, die Negativkontrolle enthielt in dieser Komponente ausschließlich Zellkulturmedium 1. Bei der Überprüfung der Zytotoxizität des verwendeten Toxins wurde dieses zunächst 1:1000 verdünnt vorgelegt und anschließend in log<sub>10</sub>-Stufen in neun Schritten in Zellkulturmedium 1 titriert.

Im Falle der Überprüfung der Zytotoxizität der eingestellten Toxinlösung für die weiteren Versuche wurde die für den Test frisch angesetzte Toxin-Gebrauchslösung (200 CD<sub>50</sub>/ml) in Dreierstufen logarithmisch in Zellkulturmedium 1 ausverdünnt. Die Positivkontrolle enthielt bei allen Versuchen 50 µl einer 1 %-SDS-Lösung und die Negativkontrolle 50 µl Zellkulturmedium 1. Jede untersuchte Probe wurde in allen vorliegenden Verdünnungsstufen im Zweifachansatz getestet. Die Kontrollen waren den Testansätzen benachbart auf der Mikrotiterplatte angeordnet.

#### 2. Komponente

In dieser Komponente wurden jeweils 50 µl Zellkulturmedium 1 zu allen Vertiefungen gegeben.

#### 3. Komponente

Sie enthielt eine Verozellsuspension in Zellkulturmedium 1, eingestellt auf eine Zellzahl von  $4 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung.

In die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Inkubation des Testes erfolgte für 96 Stunden (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung).

### **2.3 Auswertung**

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), wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem violettfarbenen Formazan umgesetzt. Der im MTT-Test bestimmte Parameter wird als „Stoffwechselaktivität“ bezeichnet. Der Test wurde in der Modifikation von Tada *et al.* durchgeführt (153).

Am Ende der Inkubationsdauer wurden zu jedem Ansatz in 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 einer 10 %igen SDS-Lösung. Anschließend wurde die Inkubation über Nacht fortgeführt. Die Messung der Extinktionsdifferenzen (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Vertiefungen erfolgte mit einem ELISA-Platten-Lesegerät. Die absolute optische Dichte ( $OD_{abs}$ ) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

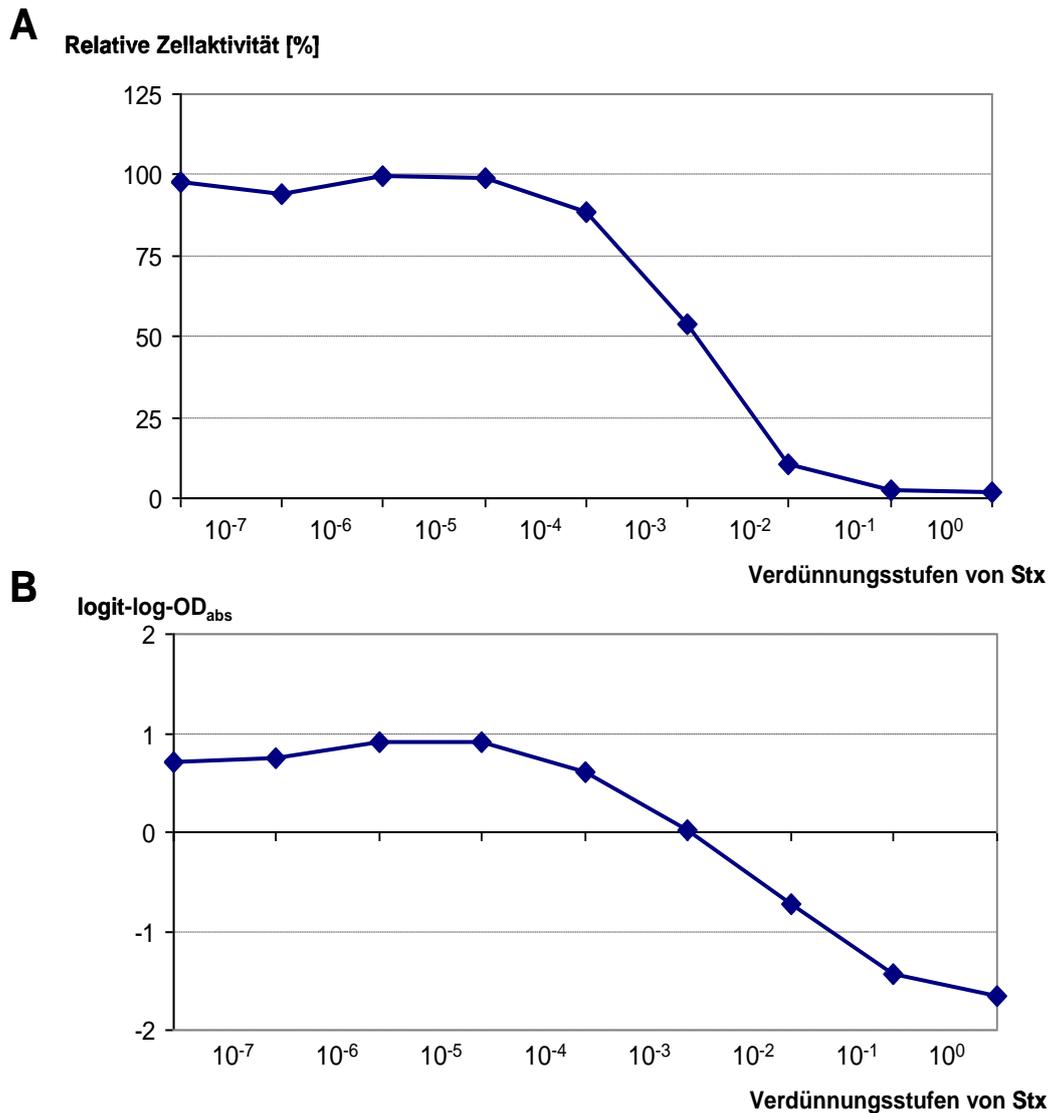
$$OD_{abs} = [OD_{Ansatz\ 1} + OD_{Ansatz\ 2}] / 2$$

Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen wurde in Bezug zur Positiv- ( $OD_{pos}$ ) und Negativkontrolle ( $OD_{neg}$ ) in der jeweiligen Mikrotiterplatte standardisiert. Dabei diente die folgende Formel der Ermittlung der relativen optischen Dichte  $OD_{rel}$ :

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

### **Berechnung der verozytotoxischen Dosis 50 %**

Zur Auswertung des Verozell-ZT wurde die „verozytotoxische Dosis 50 %“ pro Milliliter ( $CD_{50/ml}$ ) rechnerisch ermittelt. Dazu wurde zunächst die Stoffwechselaktivität von Verozellen (relative Zellaktivität,  $OD_{rel}$ ) nach Titration mit rStx1<sub>WT</sub>, rStx2<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub> und rStx2<sub>mut</sub> gegen die log-Verdünnungsstufen der zu bestimmenden Probe gezeichnet (Abb. 1 A).



**Abb. 1: Kurvenverlauf nach einer log<sub>10</sub>-Titration von Stx**

Darstellung der ermittelten Zellaktivität (**A**): Aufgetragen ist die relative Zellaktivität [%] gegen die entsprechenden log-Verdünnungsstufen des titrierten Stx. Grafische Darstellung der zugehörigen OD<sub>abs</sub>-Werte nach logit-log-Transformation (**B**): In die Berechnung zur Ermittlung des Schnittpunktes der Geraden mit der x-Achse (entspricht der Toxinverdünnung, bei der eine 50 %ige Zellaktivität vorliegt) gehen zwei logit-log-OD<sub>abs</sub>-Werte ober- und unterhalb des Schnittpunktes mit der x-Achse ein.

Anschließend wurden die ermittelten OD<sub>abs</sub>-Werte einer logit-log-Transformation unterzogen, um eine Linearisierung des mittleren Abschnittes dieser Kurve zu erreichen (Berechnung mit „Microsoft® Excel 2003“). Als Untergrenze (UG) wurde die OD<sub>abs</sub> der Positivkontrolle (OD<sub>pos</sub>) eingesetzt, sofern alle OD<sub>rel</sub>-Werte der Proben  $\geq 0$  % lagen. War dies nicht der Fall, wurde der kleinste OD<sub>abs</sub>-Wert minus 0,001 als Untergrenze festgesetzt. Als Obergrenze (OG) wurde die OD<sub>abs</sub> der Negativkontrolle (OD<sub>neg</sub>) eingesetzt, falls alle OD<sub>abs</sub>-Werte der Proben einen Wert  $\leq 100$  % aufwiesen. Traf dies nicht zu, wurde der größte OD<sub>abs</sub>-Wert plus 0,001

als Obergrenze definiert. Die logit-log-Transformation aller  $OD_{abs}$ -Werte erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{logit-log-}OD_{abs} = \log_{10} [(OD_{abs}-UG) / (OG-OD_{abs})]$$

Abb. 1 B zeigt den Kurvenverlauf der nach logit-log-Transformation der  $OD_{abs}$ -Werte eingetretene Linearisierung der Zellaktivitätskurve im mittleren Kurvenabschnitt.

Im nächsten Schritt wurde anhand der ermittelten logit-log- $OD_{abs}$ -Werte der Kurvenabschnitt ermittelt, bei dem eine 50 % relative Zellaktivität vorlag. Dies entspricht dem Schnittpunkt der nach logit-log-Transformation linearisierten Kurve mit der x-Achse (Abb. 1 B). Dazu wurden zwei Messwerte oberhalb und zwei Messwerte unterhalb dieses Schnittpunktes zur Berechnung der Toxinkonzentration  $CD_{50}/ml$  herangezogen. Es wurden nur dann weniger Messwerte in die Berechnung einbezogen, wenn Werte innerhalb der linearisierten Kurve nicht kontinuierlich anstiegen (Editierung der logit-log-transformierten Werte).

Mittels „Microsoft® Excel 2003“ wurden anschließend die Steigung „m“ und der y-Achsenabschnitt „b“ des entsprechenden Kurvenabschnittes mit den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Steigung } m = \text{INDEX (RGP(A:B;C:D);1)}$$

$$\text{y-Achsenabschnitt } b = \text{INDEX (RGP(A:B;C:D);2)}$$

Dabei war A die kleinste gültige logit-log- $OD_{abs}$ , B die größte gültige logit-log- $OD_{abs}$ , C die log-Verdünnungsstufe der kleinsten gültigen logit-log- $OD_{abs}$  und D die log-Verdünnungsstufe der größten gültigen logit-log- $OD_{abs}$ . Als log-Verdünnungsstufen wurden bei diesem Rechenschritt die Exponenten der jeweiligen log-Verdünnungsstufe eingesetzt (z. B. -2 bei der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ ).

Mit „m“ und „b“ wurde dann die Toxinkonzentration in  $CD_{50}/\text{Vertiefung}$  mit der Formel

$$CD_{50}/\text{Vertiefung} = x^{(b/m)}$$

berechnet. X stellt in diesem Fall den Modus der logarithmischen Verdünnung, z. B. 10 bei einer  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe, dar. Dieser Schritt ermöglichte es, die log-Verdünnungsstufe zu extrapolieren, bei der die transformierte Kurve die x-Achse schneidet, d. h. die Zellaktivität auf genau 50 % reduziert worden wäre.

Nachfolgend wurde durch Multiplikation des errechneten Wertes mit 20 die Toxinkonzentration in  $CD_{50}/ml$  ermittelt:

$$CD_{50}/ml = CD_{50}/\text{Vertiefung} \times 20$$

Diese Berechnung wurde für die hergestellten und aliquotierten Toxinlösungen auf unterschiedlichen Chargen von Verozellen jeweils sechsmal durchgeführt. Der dabei ermittelte  $CD_{50}$ -Wert diente der Berechnung der benötigten Menge dieser Ausgangslösung für die 200  $CD_{50}/ml$ -Toxin-Gebrauchslösung in den Versuchen mit den bovinen Zellen. Ebenfalls nach dieser Methode wurde der  $CD_{50}$ -Wert der Toxin-Gebrauchslösungen berechnet und so deren korrekte Einstellung auf 200  $CD_{50}/ml$  hin durch Rücktitration überprüft.

### **3 ELISA**

#### **3.1 Durchführung des Stx-ELISA**

Zum Nachweis von Stx1/2-Protein in den Proben der Toxinpräparationen wurde ein kommerziell erhältlicher qualitativer Mikrotiter-Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Shigatoxinen (Stx1 und Stx2) in humanen Stuhlüberständen oder angereicherter Kultur verwendet (Novitec® Verotoxin-Test). Die Durchführung des Tests erfolgte nach Herstellerangaben. Die einzusetzenden Proben der Toxinpräparationen wurden entsprechend verdünnt (alle 1:1000, Vektor unverdünnt), für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und alle 15 min gevortext. Im Anschluss daran wurde der Test mit den Proben nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **3.2 Durchführung des kompetitiven ELISA**

Das kommerzielle ELISA-Kit (Novitec® Verotoxin-Test) konnte aufgrund der voneinander getrennt vorliegenden Einzelkomponenten zu einem kompetitiven ELISA modifiziert werden.

Für den kompetitiven ELISA wurden die zu untersuchenden Seren mit bekannten Stx-Titern (44) mit negativen Seren gemischt, um einen annähernd gleichen Titer einzustellen. Die verdünnten Toxinpräparationen wurden zu gleichen Teilen mit den vorverdünnten Serumproben versetzt und für 30 min bei 37 °C präinkubiert. Bei jeder Versuchsreihe diente ein Ansatz mit  $rStx1_{WT}/rStx2_{WT}$  mit negativem Serum als Positivkontrolle, ein Ansatz mit

Vektor und Serum als Negativkontrolle. Außerdem wurden die testeigenen Positiv- und Negativkontrollen bei jedem Durchgang des kompetitiven ELISA mitgeführt. Nach der Präinkubation wurden je 100 µl der Lösung in die Mikrotiterkavitäten pipettiert und der ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt sowie spektralphotometrisch ausgewertet. Die Differenz der optischen Dichte bei 450 nm ( $OD_{450nm}$ ) und 690 nm ( $OD_{690nm}$ ) stellte die absolute optische Dichte für jeden Ansatz dar ( $OD_{abs}$ ):

$$OD_{abs} = OD_{450nm} - OD_{690nm}$$

Anschließend wurde für jedes untersuchte Serum die relative optische Dichte ( $OD_{rel}$ ) bestimmt, wobei die  $OD_{abs}$  der Positivkontrolle (Pos, Präinkubationslösung ohne Serum) mit 100 % gleichgesetzt wurde und die  $OD_{abs}$  des Serumansatzes mit dem Vektor im Präinkubationsgemisch gleich 0 % gesetzt wurde:

$$OD_{rel} = \frac{(OD_{abs}Serumansatz - OD_{abs}Serumansatz_{Vektor})}{(OD_{abs}Pos - OD_{abs}Serumansatz_{Vektor})} \times 100$$

Aus der  $OD_{rel}$  wurde weiter die „inhibitorische relative optische Dichte“ ( $IHOD_{rel}$ ) folgendermaßen berechnet:

$$IHOD_{rel} = 100 - OD_{rel}$$

#### 4 Berechnung der Stammlösung der Toxinpräparationen

Die Berechnung der Stammlösung (20.000  $CD_{50}/ml$ ) wurde mithilfe der ELISA OD durchgeführt. Hierfür wurden die Toxinpräparationen einer Verdünnungsreihe unterzogen, um eine Verdünnung zu ermitteln, die einer ELISA OD von 1,5 entspricht. Nach dieser Verdünnungsreihe konnte so jedem Verdünnungswert ein ELISA OD-Wert zugeordnet werden.

Die Stammlösung sollte eine 20.000  $CD_{50}/ml$  enthalten.

Für die  $rStx_{WT}$  wurde eine Verdünnung gewählt, die im Verozell-ZT ebendieser  $CD_{50}/ml$  entsprach. Da für die  $rStx_{mut}$  keine  $CD_{50}/ml$  im Verozell-ZT zu ermitteln war, musste die entsprechende Verdünnung mithilfe ihrer ELISA OD und der  $rStx_{WT}$  berechnet werden.

Hierfür wurde die  $rStx_{WT}$  ELISA OD und die entsprechende Verdünnung mit der Verdünnung, die im Verozell-ZT ermittelt wurde, gleichgesetzt. Die so errechnete OD wurde nun gleichgesetzt mit der ELISA OD und der entsprechenden Verdünnung von  $rStx_{mut}$ . Das nun errechnete Ergebnis ergab eine Verdünnung, die einer 20.000  $CD_{50}/ml$  für die  $rStx_{mut}$  entsprach. So wurde mit beiden  $rStx_{mut}$  und den jeweiligen  $rStx_{WT}$  verfahren.

Der Vektor wurde, da für ihn weder eine OD im ELISA noch eine  $CD_{50}/ml$  zu ermitteln war, mit der niedrigsten ermittelten Verdünnung eingesetzt.

Die Herstellung der Gebrauchslösung (200  $CD_{50}/ml$ ) erfolgte immer unmittelbar vor der Inkubation der Zellen in dem entsprechenden Medium.

## **5 Mononukleäre Zellen aus dem peripherem Blut (PBMC)**

### **5.1 Isolation**

Die Blutentnahme für die Gewinnung von mononukleären Zellen erfolgte an gesunden Milchkühen (Deutsche Holsteins) im Alter zwischen zwei und acht Jahren am Versuchsgut der Justus-Liebig-Universität Oberer Hardthof in Gießen.

Die Gewinnung der PBMC erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll (108). Hierzu wurden zur Vorbereitung der Präparation pro Gradient 17 ml PBS-EDTA-Puffer in ein 50 ml-Röhrchen vorgelegt, ebenso wurden für jeden Gradienten 12 ml Ficoll Paque® in ein 50 ml-Röhrchen vorgelegen. Für die Blutentnahme wurden 4 ml Citrat (3,8 %) in einer 60 ml-Spritze vorgelegt.

Vollblut wurde nach Stauung mittels Staukette durch Punktion der Vena jugularis gewonnen und sofort in der vorbereiteten 60 ml-Spritze mit 3,8 % Citrat zwecks Gerinnungshemmung gemischt. Nach Transport ins Labor (max. 30 min, RT) wurden je 20 ml des Blutes zu dem vorgelegten PBS-EDTA-Puffer zugegeben, gut gemischt und anschließend auf das vorgelegte Ficoll Paque® aufgeschichtet. Je nach Bedarf konnten so pro Tier mehrere Röhrchen befüllt und genutzt werden. Diese Röhrchen wurden dann bei 800 x g mit ungebremstem Auslauf (Ausschwingrotor, Sigma 4K15) für 45 min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Interphase und die Ficollphase abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Diese Abnahme erfolgte möglichst ohne die Abnahme von Erythrozyten. Das 50 ml-Röhrchen wurde mit PBS-EDTA-Puffer auf 45 ml aufgefüllt und gemischt. Im Anschluss daran erfolgte eine weitere Zentrifugation (8 min, 257 x g, RT).

Der entstandene Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde den Röhrchen jeweils 20 ml PBS-EDTA-Puffer zugegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (7 min, 212 x g, RT).

Im Anschluss wurde einmal mit PBS-EDTA-Puffer (20 ml) und einmal mit PBS (10 ml) gewaschen. Nach der Zentrifugation (7 min, 212 x g, RT) wurden die jeweiligen Überstände verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium 2 resuspendiert und es erfolgte die Zellzählung. Hierbei wurde eine Lebend-Tot-Differenzierung mittels Trypanblau (1:10) vorgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Zur weiteren Verwendung wurde die Zellzahl auf die benötigte Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Zellkulturmedium 2 eingestellt. Um die isolierten Zellen zur Proliferation anzuregen, wurde das Mitogen Phytohämagglutinin-P (PHA-P) in einer Konzentration von 5 µg/ml (f.c.) dem Medium der Zellen zugegeben.

Alle Präparationsschritte wurden bei Raumtemperatur unter der Sterilbank durchgeführt. Zum Pipettieren wurden Glaspipetten benutzt.

## **5.2 Inkubation mit den Toxinpräparationen**

Die Kultivierung der PBMC erfolgte in 96-Loch Flachbodenplatten. Nach dem Einstellen der benötigten Zellzahl ( $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden von den Zellen pro Toxinpräparation 3 ml in ein 15 ml-Röhrchen abgefüllt. Zu diesen 3 ml der Zellsuspension wurde die Stammlösung der Toxinpräparationen so zugegeben, dass eine Endkonzentration von 200  $CD_{50}$ /ml erreicht wurde. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung ausgebracht. Die Inkubation erfolgte für 96 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 %  $CO_2$ , Wasserdampfsättigung). Alle Schritte erfolgten unter der Sterilbank.

## **5.3 Immundekoration**

Die Vorbereitungen für die Vierfarbenfluoreszenz begannen mit der Herstellung einer Waschlösung (1 % BSA, 0,5 % Ziegen Serum, 0,01 %  $NaN_3$  in PBS). Diese Lösung wurde durchgängig zum Ansetzen der Antikörperverdünnungen benutzt, nur für die AnnexinV-Verdünnungen wurde AnnexinV-Bindungspuffer verwendet. Die benötigten Antikörper wurden in der gewünschten Kombination verdünnt und auf Eis gelagert.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die PBMC-Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Zellen wurden vor der Ernte für 10 min auf Eis gestellt, resuspendiert und in

eine Mikrotiterplatte (V-Form) überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation (400 x g, 3 min, 4 °C) und das Ausschlagen des Überstands. Das Zellpellet wurde mit 50 µl des verdünnten Primär-Antikörpers (Tab. 7) resuspendiert und für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation und einem Waschschrift wurden die Zellen mit 50 µl des Sekundär-Antikörpers (Tab. 7) resuspendiert. Hierfür wurden verschiedene Sekundär-Antikörper kombiniert, die mit unterschiedlichen Flouorchromen konjugiert waren. Zusätzlich wurde 7-Amino Actinomycin D (7AAD) in einer 1:50-Verdünnung der Sekundär-Antikörper Verdünnung zugefügt. Die Färbung mit 7AAD, welches die Fähigkeit zur Bindung an DNA besitzt, deutet auf eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran hin und kann zur Färbung von toten Zellen genutzt werden. Es schloss sich eine 20-minütige Inkubation im Dunkeln auf Eis und ein erneuter Waschschrift an. Die Zellen wurden in 50 µl des 1:400 verdünnten AnnexinV-PE resuspendiert und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. AnnexinV-PE ist ein direkt konjugiertes Protein (R-Phycoerythrin), das zu Detektion von apoptotischen Zellen benutzt werden kann. Zellen, die sich in einer frühen Phase der Apoptose befinden, zeichnen sich dadurch aus, dass die vormals innerhalb der Lipiddoppelschicht liegenden Phosphatidylserine nun auf der Oberfläche der Zellmembran zu finden sind, ohne dass die Zellmembran durchlässig wird. AnnexinV-PE bindet an diese Phosphatidylserine und zeigt so die Menge an Zellen an, die als früh-apoptotisch zu bezeichnen sind. Im Anschluss wurden die Zellen direkt in 5 ml-FACS-Röhrchen, die 200 µl Annexin-Bindungspuffer enthielten, überführt und der Messung am FACSCalibur™-Durchflusszytometer (Becton-Dickison, [BD], Heidelberg) zugeführt. Hier wurden zehntausend Ereignisse gemessen unter Verwendung der gerätespezifischen Software „Cell Quest Pro“.

Tab. 7: Antikörper und andere Substanzen zur Immundekoration

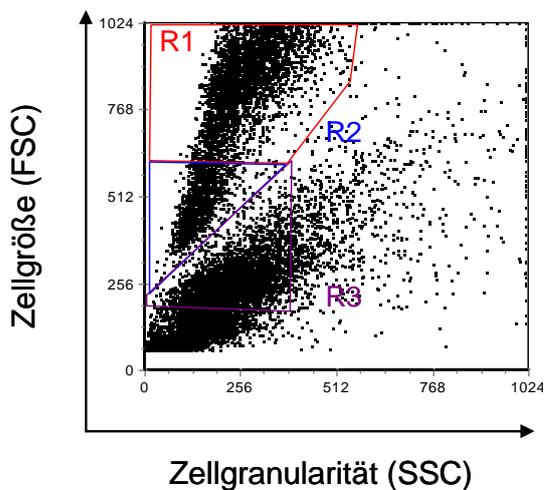
| Antigen<br>Spezifität        | Zelllinie/<br>Fluorochrom              | Isotyp                     | Verteilung auf<br>Zellen   | Bezugsquelle               | Einsatz          |
|------------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| CD77                         | Clone 38-13                            | Rat IgM                    | unterschiedlich            | AbDSerotech                | 50 µl, 1:50      |
| CD8β                         | BAT82A                                 | Mouse<br>IgG <sub>1</sub>  | zytotoxische T-<br>Zellen  | VMRD                       | 50 µl,<br>1:500  |
| CD21                         | GB25A                                  | Mouse<br>IgG <sub>1</sub>  | B-Zellen                   | VMRD                       | 50 µl,<br>1:300  |
| CD4                          | IL-A 11                                | Mouse<br>IgG <sub>2a</sub> | T-Helfer-Zellen            | VMRD                       | 50 µl,<br>1:500  |
| γδ T/N24                     | GB21A                                  | Mouse<br>IgG <sub>2b</sub> | γδ T-Zellen                | VMRD                       | 50 µl,<br>1:300  |
| CD335                        | Clone AKS1                             | Mouse<br>IgG1              | natürliche<br>Killerzellen | AbDSerotech                | 50 µl,<br>1:300  |
| CD14                         | CAM36A                                 | Mouse<br>IgG1              | Makrophagen                | VMRD                       | 50 µl,<br>1:1000 |
| CD11c                        | BAQ153A                                | Mouse<br>IgM               | dendritische<br>Zellen     | VMRD                       | 50 µl,<br>1:200  |
| CD80                         | N32/52-3                               | Mouse<br>IgG1              | aktivierte<br>Makrophagen  | Dirk<br>Werling,<br>London | 50 µl, 1:10      |
| CD86                         | IL-A190                                | Mouse<br>IgG1              | aktivierte<br>Makrophagen  | Dirk<br>Werling,<br>London | 50 µl, 1:10      |
| α-Rat IgM                    | Fluorescein<br>Isothiocyanat<br>(FITC) |                            |                            | Dianova                    | 50 µl,<br>1:200  |
| α-Mouse<br>IgG <sub>1</sub>  | Allophycocyanin<br>(APC)               |                            |                            | Jackson                    | 50 µl,<br>1:500  |
| α-Mouse<br>IgG <sub>2a</sub> | Allophycocyanin<br>(APC)               |                            |                            | Jackson                    | 50 µl,<br>1:500  |
| α-Mouse<br>IgG <sub>2b</sub> | Allophycocyanin<br>(APC)               |                            |                            | Jackson                    | 50 µl,<br>1:500  |
|                              | 7AAD                                   |                            |                            | Sigma                      | 50 µl, 1:50      |
|                              | AnnexinV-PE<br>(R-Phycoerythrin)       |                            |                            | Dianova                    | 50 µl,<br>1:400  |

#### 5.4 Analysestrategie im Durchflusszytometer

Zur Probenanalyse wurde ein BD FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) eingesetzt. Dieses Durchflusszytometer (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter) ist mit einem 488 nm-Argon-Ionen-Laser und mit einem 635 nm-Dioden-Laser ausgestattet. Die anhand von Vorversuchen eingestellten Geräteparameter wurden in Form

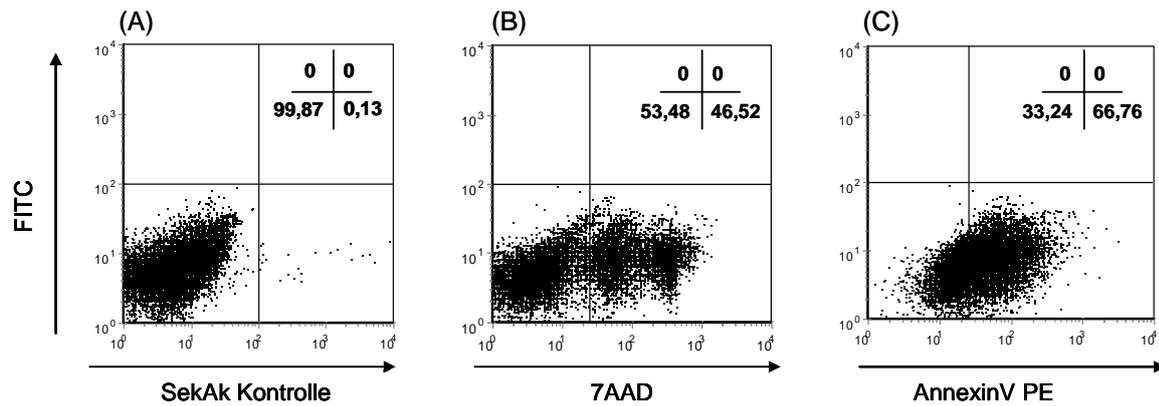
von Standardprotokollen gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Nach der Probenanalyse erfolgte die Aufarbeitung und Auswertung der Daten mithilfe des Programms „FCS Express“ (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada). Die Differenzierung der unterschiedlichen analysierten Zellarten gelang über die Parameter „Größe“ (Vorwärtsstreulicht oder „forward scatter“ (FSC)), „Granularität“ (Seitwärtsstreulicht oder „sideward scatter“ (SSC)) und/oder „Fluoreszenzeigenschaften“ (spezielle Kanäle). Zellpopulationen mit gleichen Eigenschaften konnten innerhalb elektronischer Auswertefenster („Gates“) zusammengefasst und genauer analysiert werden. Von jedem Probenansatz wurde stichprobenartig nur eine bestimmte Anzahl von Ereignissen gezählt, analysiert und als Zahl der „Gesamtzellen“ einer Probe definiert.

Die Auswertung erfolgte nach Ausrichtung der Auswertefenster an der Negativkontrolle. Hierfür wurden bei jedem Versuch Proben mitgeführt, die nur mit der Sekundär-Antikörper-Mischung gefärbt wurden und Proben, die nur mit den direkt markierten Proteinen (7AAD, AnnexinV-PE) gefärbt wurden (Abb. 2, Abb. 3).



**Abb. 2: Repräsentative Darstellung einer PBMC Kultur im Durchflusszytometer nach 96 h**

Dargestellt sind die verschiedenen Auswertefenster einer PBMC-Kultur, wobei R1 die Lymphoblasten, R2 die Lymphozyten und R3 tote und absterbende Zellen enthält



**Abb. 3: Repräsentative Darstellung von PBMC-Negativkontrollen im Durchflusszytometer**

Dargestellt sind eine Sekundär-Antikörperkontrolle (A), eine Sekundär-Ak-Kontrolle mit zusätzlichem 7AAD-Signal (B) und eine Sekundär-Ak-Kontrolle mit zusätzlichem AnnexinV-PE-Signal (C). Anhand dieser Negativkontrollen wurden die Fenster für die Auswertung gesetzt. Die Zahlen oben rechts geben den Anteil der gemessenen Zellen im jeweiligen Quadranten in Prozent an.

Die Auswertung der Zellen erfolgte hinsichtlich der Oberflächenmarker CD77, CD4, CD8 $\beta$ , CD21 und  $\gamma\delta$  T. Zusätzlich wurden apoptotische und nekrotische Zellen mit AnnexinV-PE und 7AAD identifiziert.

## 6 Ileale intraepitheliale Lymphozyten (iIEL)

### 6.1 Isolation

Ileale IEL wurden nach der bereits beschriebenen Methode (112) mit leichten Veränderungen isoliert. Hierfür wurde auf dem Giessener Schlachthof von adulten Schlachtrindern beiderlei Geschlechts ( $\leq 24$  Monate) ein ca. 30-50 cm langes Stück Ileum entnommen, der Darminhalt ausgestrichen, der Darm äußerlich von anhaftendem Fett befreit, einmal der Länge nach durchgeschnitten und der noch verbliebene Darminhalt mit kaltem Leitungswasser abgespült. Für den Transport (max. 45 min) ins Labor wurde der Darm in einem Glaskolben in 1000 ml gekühlten PBS-Puffer (8 °C) gegeben. Im Labor wurde das Gewebe im Schüttelwasserbad bei 37 °C in vorgewärmten PBS-Puffer mit 1 mM 1,4 Dithiothreitol (DTT) zur Auflösung des Mukus unter beständigem Schwenken für 25 min inkubiert. Anschließend wurde der Darm in ca. 1 cm breite Streifen geschnitten. Diese wurden in sechs mit je 32 ml PBS-AB-EDTA-Puffer gefüllte 50 ml-Röhrchen verbracht und bei 37 °C für 20 min im Schüttelwasserbad geschwenkt. Um die Ablösung der oberen Epithelzellschicht zu unterstützen, wurden die 50 ml-Röhrchen nach der Inkubation

ergänzend für je 2 Minuten bei maximaler Drehzahl gevortext. Die entstandene Zellsuspension wurde über zuvor mit PBS-AB-EDTA-Puffer befeuchtete sterile Nylonwatte gegeben, um grobe Gewebereste zu entfernen. Die Watte wurde einmal mit PBS-AB-EDTA-Puffer gewaschen. Das Filtrat wurde in sechs neuen 50 ml-Röhrchen aufgefangen, zentrifugiert (8 min, 202 x g, RT) und der Überstand dekantiert. Die Trennung der IEL von anderen im Filtrat vorkommenden Zellen erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde Percoll ( $\sigma = 1,124\text{g/l}$ ) für jeden Versuch frisch mit PBS-EDTA in zwei verschiedenen Dichten angemischt. Die Lösungen hatten eine Dichte von  $\sigma = 1,08928\text{ g/ml}$  und  $\sigma = 1,06088\text{ g/ml}$ . In ein 50 ml-Röhrchen wurden zunächst 10 ml der Percolllösung höherer Dichte gegeben und diese mit den in 25 ml Percolllösung geringerer Dichte resuspendierten Zellen überschichtet. Die Trennung erfolgte in einem Zentrifugationsschritt (20 min, 650 x g, RT, acc. 3 von 19, dec. 1 von 19). Die IEL befanden sich nach der Zentrifugation zwischen den beiden Percollphasen unterschiedlicher Dichte und wurden nach der Entfernung der oberen Schicht (Fett, tote Zellen) vorsichtig geerntet. Nach einem Waschschrift mit PBS-EDTA wurden die Zellen in 25 ml PBS-EDTA resuspendiert, auf 12 ml Ficoll Paque® aufgeschichtet und zentrifugiert (20 min, 800 x g, ungebremster Auslauf (Ausschwingrotor, Sigma 4K15), RT). Nach Abnahme der Interphase, Überführung in ein neues 50 ml-Röhrchen, zwei weiteren Waschschriften mit einmal PBS-EDTA und einmal PBS-Puffer (Zentrifugation 7 min, 202 x g, RT), wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Färbung (1:10) ermittelt und die benötigte Dichte sowohl für die Phänotypisierung im Durchflusszytometer als auch für die Inkubation mit den Toxinen in Zellkulturmedium 3 eingestellt.

## 6.2 Immundekoration und Analyse im Durchflusszytometer

Nach jeder Gewinnung wurden die iIEL auf ihre Zusammensetzung im Durchflusszytometer untersucht. Für diese Charakterisierung wurde das Standardprotokoll nach (112) verwendet. Hierfür wurde eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt, pro Probe 150  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension in eine Mikrotiterplatte (V-Form) überführt und die Immundekoration analog des bereits beschriebenen Schematas (siehe 5.3) mit den in Tab. 7 aufgelisteten Substanzen durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand in der nicht durchgeführten Färbung mit AnnexinV-PE.

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Am FACSCalibur™-Durchflusszytometer (Becton-Dickison, [BD], Heidelberg) wurden 6000 Ereignisse gemessen unter Verwendung

der gerätespezifischen „Cell Quest Pro“-Software. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem „FCS Express 2“-Programm (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Kanada).

Die Werte von CD8 $\beta$ <sup>+</sup> lagen bei  $45,7 \pm 17,02$ , von CD21<sup>+</sup> bei  $26,57 \pm 18,73$ .

### **6.3 Inkubation mit den Toxinpräparationen**

Die Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte ausgesät, insgesamt je 9 ml der Zellsuspension ( $1,5 \cdot 10^7$ /ml), mit der entsprechenden Toxin-Gebrauchslösung versetzt und für 6 h inkubiert. Um die Proliferation der Zellen anzuregen, wurde das Mitogen Phytohämagglutinin P (PHA-P) in einer Konzentration von 2,5  $\mu$ g/ml (f.c.) dem Medium der Zellen zugegeben.

### **6.4 Zellernte für RNA-Gewinnung**

Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Zellen in der 6-Loch-Platte auf Eis gestellt, resuspendiert und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Vertiefungen wurden mit je 5 ml PBS-EDTA gespült und die Spüllösung ebenfalls in die entsprechenden Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation der Röhrchen (300 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml PBS (4 °C) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1 ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Reste des PBS wurden mittels Pipettenspitze entfernt und zu dem Pellet 600  $\mu$ l RLT-Puffer, versetzt mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden gevortext und bei -70 °C eingefroren.

### **6.5 RNA-Gewinnung**

Die RNA-Isolation aus den geernteten Zellen erfolgte mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit der Firma QIAGEN gemäß dem Protokoll „Animal Cells I“ aus dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Handbuch mit leichten Modifikationen. Für die Präparation der RNA wurden die eingefrorenen Reaktionsgefäße für 20 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Um eine vollständige Homogenisierung zu erreichen, wurde jede Probe mindestens fünfmal durch eine 20-Gauge Nadel (0,9 mm Durchmesser) durchgedrückt. Zu jeder Probe wurde 1 Volumen 70 %-Ethanol zugegeben und gut gemischt. Dieses Gemisch wurde auf eine RNeasy<sup>®</sup> Mini Säule in einem 2 ml-Sammelröhrchen gegeben. Säule und Röhrchen wurden für 15 sek abzentrifugiert

(13000 x g, RT), der Durchfluss verworfen und nach einem Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer wurden die Säulen einem DNase-Verdau unterzogen. Hierfür wurden 70 µl des beiliegenden RDD-Puffers mit 10 µl QIAGEN DNase 1 (ca. 27 U) und 1 µl Amersham DNase (ca. 10 U) pro Probe versetzt und direkt auf die Silika-Gel-Membran der Säule gegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT erfolgte ein Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer. Nach diesem Waschschrift wurde die Säule in ein neues Auffangröhrchen gegeben und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Säule für 2 min zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen gegeben und zur Entfernung der Reste des RPE-Puffers für 2 min trocken zentrifugiert.

Für die Elution der RNA wurden 10 µl Ambion 10 x DNase 1-Puffer und 2 µl RNase-Inhibitor RNAsin (ca. 80 U) in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt, die Säulen in die Reaktionsgefäße überführt, zweimal mit je 43 µl DEPC Wasser eluiert und anschließend abzentrifugiert (15 sek, 13000 x g, RT). Im Anschluss erfolgte die Modifikation des RNeasy®-Protokolls. Für einen zweiten DNase-Verdau erfolgte die Zugabe von je 2 µl Amersham DNase (ca. 20 U) pro Reaktionsgefäß. Alle Reaktionsansätze wurden für 25 min im Wasserbad (37 °C) inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,6). Die Lösung wurde gevortext, 2 Volumen 99 %-Ethanol hinzugegeben, nochmals gevortext und für mindestens 30 min bei -70°C eingefroren. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 60 min) und die Überstände wurden vorsichtig entfernt. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl 70 %-Ethanol und die Zentrifugation für 5 min bei RT. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die im Reaktionsgefäß verbliebenen Reste des Alkohols mit einer Plastik-Pipettenspitze sorgfältig entfernt. Zur Trocknung der Pellets wurden die Reaktionsgefäße bei RT und geöffnetem Deckel unter einem Zellstofftuch für mindestens 30 min lang gelagert. Es folgte die Zugabe von 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 1,5 µl RNAsin (ca. 60 U). Die Proben wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und auf Eis gelagert.

Die Menge der isolierten RNA wurde im Photometer bestimmt. Aus 5 µl Probe und 65 µl TE-Puffer ließ sich eine 1:14-Verdünnung herstellen, die in einer UltraVette® bei verschiedenen Wellenlängen ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) gegen TE-Puffer (70 µl) als Leerwert gemessen wurde.

Die Berechnung des RNA-Gehaltes geschah nach folgender Formel:

$$(A_{260} - A_{320}) \times 40 (\text{RNA-Faktor}) \times 14 (\text{Verdünnungsfaktor}) = \text{ng RNA}/\mu\text{l RNA-Lösung}$$

Um die frisch isolierte RNA auf mögliche DNA-Kontaminationen oder Fragmentierungen hin zu untersuchen, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung vorgenommen. Das Gel wurde mit 500 ng RNA beladen. Die entsprechende Menge RNA-Lösung wurde mit 2 µl Ladepuffer vermischt und das fehlende Volumen auf 16 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,001 % Ethidiumbromid (Agarose und Ethidiumbromid gelöst in 1 x TAE-Puffer) elektrophoretisch über 30 min bei 80 Volt. Als DNA-Größenmarker wurde ein Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*-Marker seitlich der Nukleinsäuren mitgeführt. 1 x TAE-Puffer diente als Laufpuffer in der Gelelektrophoresekammer.

### 6.5.1 Reverse Transkription

Bei ausreichender Menge und Sauberkeit der RNA wurden 1000 ng RNA in komplementäre DNA (complementary-DNA (cDNA)) umgeschrieben.

Um zu kontrollieren, ob die genomische DNA des Ausgangsmaterials vollständig verdaut worden war, wurde von jeder Probe zusätzlich zu dem Ansatz für die Umschreibereaktion (plusRT-Ansatz) noch jeweils ein Ansatz angefertigt, der alle Substanzen außer den Primern und der Reversen Transkriptase (RT) enthielt. Diese minusRT-Ansätze wurden nach demselben Protokoll behandelt wie die umzuschreibenden Proben. Die entsprechende Menge RNA-Lösung wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 23 µl aufgefüllt und für den plusRT-Ansatz mit 2 µl Oligo-d(T)16-Primern (= 0,5 µg, Applied Biosystems) ergänzt. Für den minusRT-Ansatz wurden statt der Primer 2 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die Proben wurden kurz gevortext und abzentrifugiert und dann im Thermocycler 1 für 5 min auf 70° C erhitzt. Danach erfolgte die Lagerung auf Eis. Zu den 25 µl-Ansätzen wurden dann jeweils die in Tab. 8 aufgeführten Substanzen hinzugefügt.

**Tab. 8: Ansatz für die reverse Transkription**

| <b>Substanz</b>               | <b>verwendetes<br/>Volumen/Ansatz</b> |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| DEPC-H <sub>2</sub> O         | 1 µl                                  |
| M-MLV RT 5 x Reaktionspuffer  | 8 µl                                  |
| dNTP-Mix                      | 4 µl (0,5 mM)                         |
| Ribonuclease-Inhibitor RNAsin | 1 µl (40 U)                           |
| M-MLV Reverse Transkriptase   | 1 µl (200 U)                          |
| <b>Volumen</b>                | <b>15 µl</b>                          |

Statt der Reversen Transkriptase erhielt der minusRT-Ansatz 1 µl H<sub>2</sub>O.

Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben im Thermocycler 1 60 min auf 40 °C und 2 min auf 94 °C erhitzt. Anschließend wurde die gewonnene cDNA sogleich in die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen eingesetzt oder aber bei -20 °C eingefroren.

### **Überprüfung auf DNA-Kontamination**

In einer Test-PCR sollten eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Dazu bot sich die Untersuchung der nicht umgeschriebenen minusRT-Ansätze auf das „Housekeeping“-Gen an, welches für die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kodiert, die bei allen Vertebratenzellen exprimiert wird und somit in einer Test-PCR detektiert werden sollte. Die Primer wurden von der MWG Biotech AG hergestellt (Tab. 9).

Der pro Ansatz verwendete PCR-Mix zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen setzte sich wie in Tab. 10 dargestellt zusammen.

**Tab. 9: Basenfolge der Primer für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen**

| <b>Primer</b>    | <b>Basenfolge 5'-bis 3'-Ende</b> |
|------------------|----------------------------------|
| bo-GAPDH-forward | -GCGATACTCACTCTTCTACCTTCGA-      |
| bo-GAPDH-reverse | -TCGTACCAGGAAATGAGCTTGAC-        |

**Tab. 10: Ansatz für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen**

| <b>Substanz</b>               | <b>verwendetes<br/>Volumen/Ansatz</b> |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| DEPC-H <sub>2</sub> O         | 12,1 µl                               |
| 10 x Ampli Taq-Puffer         | 2,0 µl                                |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> lösl. | 1,2 µl                                |
| dNTP Mix                      | 1,0 µl (f.c. 0,2 mM)                  |
| GAPDH-Forward Primer          | 1,0 µl (f.c. 0,25 µM)                 |
| GAPDH-Reverse Primer          | 1,0 µl (f.c. 0,25 µM)                 |
| Ampli Taq-Polymerase          | 0,2 µl (1 U)                          |
| <b>Volumen</b>                | <b>18,5 µl</b>                        |

Zu jedem der Ansätze wurden dann 1,5 µl (37,5 ng cDNA) Probe bzw. 1,5 µl H<sub>2</sub>O für die Negativkontrolle pipettiert. Als PCR-Positivkontrolle fand eine PBMC- oder Kolonepithelzell-cDNA Verwendung. Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben (20 µl Gesamtvolumen) im Thermocycler 1 40-mal zunächst für 15 sek auf 94 °C, für 30 sek auf 60 °C und dann für 30 sek auf 72 °C erhitzt. Das Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Dazu wurden die gesamten PCR-Ansätze (je 20 µl) mit jeweils 2,5 µl Ladepuffer vermischt und auf ein 3 %iges Agarosegel (mit 0,003 % Ethidiumbromid, gelöst in 1 x TAE-Puffer) aufgetragen. Als Marker dienten 10 µl Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder. Unter Verwendung des Laufpuffers TAE erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 120 Volt über 30 min. Wenn bei keiner der Proben außer

der Positivkontrolle eine Bande zu sehen war, galt die Qualität als ausreichend für die Durchführung der „Real time“-TaqMan®-PCR.

### **6.5.2 „Real time“-TaqMan®-PCR**

Die Methode der „Real time“-TaqMan®-PCR basiert auf der Spaltung einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase während der PCR und der Messung der Fluoreszenzintensität durch ein automatisiertes Spektrophotometer, welches in das Sequenzdetektionssystem (ABI PRISM™ 5700, Applied Biosystems) integriert ist. Die quantitative Untersuchung der verschiedenen Proben und Kontrollen auf die mRNA-Transkription der bovinen Zytokin- und Chemokingene erfolgte im Vergleich mit dem konstitutiv exprimierten „Housekeeping“-Gen GAPDH. Für jedes Gen wurde im Doppelansatz ein eigener PCR-Mix mit den entsprechenden Primer-Paaren (MWG Biotech AG) und der passenden Sonde (Eurogentec, Liege, Belgien) angefertigt (Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13). Bei den iIEL wurde nur die Transkription von IL-4 untersucht.

Pro Ansatz (Tab. 12) wurden dann jeweils 1,5 µl bzw. 1 µl Probe (37,5 ng (iIEL) bzw. 25 ng (Makrophagen) cDNA) bzw. die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O für die Negativkontrolle hinzugefügt. Nachdem die Ansätze in die Vertiefungen einer „Optical 96-well Reaction Plate“ pipettiert und die Platte mit einer durchsichtigen Folie verschlossen worden war, wurden die Proben im TaqMan® Cyclyer einmal für 2 min auf 50 °C, einmal für 10 min auf 95 °C und 40-mal für 15 sek auf 95 °C und für 60 sek auf 60 °C erhitzt.

Tab. 11: Basenfolge der in der TaqMan®-PCR verwendeten Primerpaare

| Primer            | Basenfolge 5`-bis 3`-Ende       | Referenz |
|-------------------|---------------------------------|----------|
| GAPDH Forw        | -GCGATACTCACTCTTCTACCTTCGA-     | (154)    |
| GAPDH Rev         | -TCGTACCAGGAAATGAGCTTGAC-       |          |
| IL8 Forw          | -CACTGTGAAAAATTCAGAAATCATTGTTA- | (85)     |
| IL8 Rev           | -CTTCACCAAATACCTGCACAACCTTC-    |          |
| IL4 Forw          | -CATGCATGGAGCTGCCTGTA-          | (173)    |
| IL4 Rev           | -AATTCCAACCCTGCAGAAGGT-         |          |
| IL6 Forw          | -CTGAAGCAAAAATCGCAGATCTA-       | (8)      |
| IL6 Rev           | -CTCGTTTGAAGACTGCATCTTCTC-      |          |
| IL10 Forw         | -CCAAGCCTTGTCGGAAATGA-          | (154)    |
| IL10 Rev          | -GTTCACGTGCTCCTTGATGTCA-        |          |
| IL12-p40 Forw     | -GCAGCTTCTTCATCAGGGACAT-        |          |
| IL12-p40 Rev      | -CCTCCACCTGCCGAGAATT-           | (8)      |
| TNF $\alpha$ Forw | -TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGT-     |          |
| TNF $\alpha$ Rev  | -CCATGAGGGCATTGGCATAC-          | (85)     |

Tab. 12: Zusammensetzung des PCR-Mix für die TaqMan®-PCR pro Ansatz (25  $\mu$ l)

| Substanz              | verwendete Menge          |
|-----------------------|---------------------------|
| 2 x TaqMan® MasterMix | 12,5 $\mu$ l              |
| Forward Primer        | 1,5 $\mu$ l (f.c. 300 nM) |
| Reverse Primer        | 1,5 $\mu$ l (f.c. 300 nM) |
| Sonde                 | 1 $\mu$ l (f.c. 200 nM)   |
| DEPC-H <sub>2</sub> O | 7 $\mu$ l (7,5 $\mu$ l)   |
| Volumen               | 23,5 $\mu$ l (24 $\mu$ l) |

**Tab. 13: Basenfolge der in der TaqMan®-PCR verwendeten Sonden**

| Sonde        | Basenfolge 5`-bis 3`-Ende        |
|--------------|----------------------------------|
| GAPDH        | -CTGGCATTGCCCTCAACGACCACTT-      |
| IL8          | -AATGGAAACGAGGTCTGCTTAAACCCCAAG- |
| IL4          | -TGCTGCCCCAAAGAACACAACACTGAGAAG- |
| IL6          | -CACTCCAGCCACAAACACTGACCTGCT-    |
| IL10         | -AGCCTGTGGCATCACCTCTTCCAGGTAA-   |
| IL12-p40     | -CACCCAAGAACCTGCAACTGAGACCATTAA- |
| TNF $\alpha$ | -AGCCCACGTTGTAGCCGACATCAACTCC-   |

Referenzen vgl. Tab. 11.

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

1. Ermittlung der Mittelwerte der Ct-Werte aus den Doppelansätzen für jedes Gen
2. Normalisierung auf das „Housekeeping“-Gen:  

$$MW-Ct_{Zielgen} - MW-Ct_{„Housekeeping“-Gen} = \Delta Ct$$
3. Bestimmen des Ansatzes „Vektor“ als Referenzsystem (Kalibrator)
4. Normalisierung auf den Kalibrator:

$$\Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta Ct$$

(dadurch wird der Kalibrator = null)

5. Berechnung der relativen Mengen durch Einsetzen der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte in die

Formel:  $2(-\Delta\Delta Ct)$

(dadurch erreicht der Kalibrator den Wert 1 bzw. 100 %)

## 7 Makrophagen

### 7.1 Isolation der peripheren mononukleären Zellfraktion

Die Blutentnahme für die Gewinnung von Monozyten erfolgte an gesunden Milchkühen (Deutsche Holsteins) im Alter zwischen zwei und acht Jahren am Versuchsgut der Justus-Liebig-Universität Oberer Hardthof in Gießen. Insgesamt wurden elf Tiere beprobt.

Für die Monozytenisolation wurden 500 ml Vollblut aus der Vena jugularis entnommen. Hierfür wurde eine 14-Gauge-Nadel verwendet, die durch einen Adapter mit einem Silikonschlauch verbunden war. Am anderen Ende des Gummischlauchs befand sich eine 17-Gauge Stahlnadel. Diese wurde durch den Silikondeckel einer 500 ml Glasflasche gestochen, in der 100 ml 3,8 %iges Citrat zur Gerinnungshemmung vorgelegt worden waren. Unter ständigem Schwenken der Flasche wurde das Blut aufgefangen. Zur Entlüftung der Flasche wurde eine weitere Kanüle durch den Silikondeckel der Flasche gestochen.

Nach dem Transport (max. 30 min, RT) ins Labor wurden unter einer Sterilbank jeweils 40 ml des Blutes in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert und anschließend zentrifugiert (2380 x g, 20 min, RT, ungebremster Auslauf). Ein Teil des Plasmas wurde entfernt und der Buffycoat mit einer Glaspipette in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Hierbei war darauf zu achten, dass möglichst wenig Erythrozyten entnommen wurden. Das Volumen des entnommenen Materials sollte ca. 2-3 ml betragen, jedoch nicht mehr als 5 ml. Der Buffycoat von jeweils zwei Röhrchen wurde so in einem Röhrchen vereinigt. Die Röhrchen wurden mit PBS-EDTA-Puffer auf 45 ml aufgefüllt und nach vorsichtigem Schwenken erneut zentrifugiert (800 x g, 10 min, RT, ungebremster Auslauf). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Röhrchen erneut mit PBS-EDTA-Puffer auf 45 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (800 x g, RT, ungebremster Auslauf) (Waschschritt). Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 45 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, 10 min inkubiert und anschließend abzentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und es folgten drei Waschschriffe mit je 45 ml PBS-EDTA (300 x g, 10 min, 4 °C). Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet in 25 ml PBS-EDTA resuspendiert, vorsichtig auf 20 ml Ficoll Paque® aufgeschichtet und für 45 min bei 800 x g und RT zentrifugiert (ungebremster Auslauf). Nach Beendigung der Zentrifugation wurde die Interphase, in der sich die PBMC gesammelt hatten,

abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit eiskalter PBS ohne Mg und Ca, wobei die Zentrifugation variierte. Bei dem ersten Waschschrift wurden die Röhrchen bei 600 x g, 8 min, 4 °C und Bremsstufe 9 zentrifugiert, während bei den beiden folgenden Waschschriften die Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, 4 °C und Bremsstufe 9 durchgeführt wurde. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und ein Aliquot zur Zellzählung entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert und währenddessen wurde das Aliquot der Zelle mit Trypanblau in einer 1:10-Verdünnung versetzt und anschließend in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt.

Direkt nach der Isolation wurden die Zellen in Zellkulturmedium 4 in einer Dichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen.

## **7.2 Generierung einer Makrophagenkultur**

Mit einer 30 ml-Spritze wurden je 25 ml der Zellsuspension in einen Teflonbeutel (VueLife Bags, AFC) verbracht, wobei die Spritze mittels Luer-Lock-Anschluss auf die Teflonbeutel aufgeschraubt wurde. Danach wurden die Beutel verschlossen, einmal mit Ethanol 70 % eingesprüht, abgewischt und für acht Tage im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung).

Am Ende der Inkubation wurden die Zellen aus den Teflonbeuteln geerntet. Die Entnahme der Zellen begann mit der Lagerung der Beutel für 20 min im Kühlschrank. Danach erfolgte die eigentliche Entnahme der Zellen, die mit einem vorsichtigen Beklopfen der Beutel begann. Mithilfe einer 60 ml-Spritze wurde die Flüssigkeit aus den Beuteln entnommen, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Beutel zweimal mit eiskalter PBS gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Nach einem Zentrifugationsschrift der Röhrchen (300 x g, 10 min, RT) wurde der Überstand dekantiert und die Zellen einmal mit 45 ml PBS gewaschen. Nach dem Waschschrift erfolgte die Resuspension der Zellen in Zellkulturmedium 5, die Zählung aller großen, granulierten Zellen mittels Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer und die Einstellung der benötigten Dichte ( $2 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung). Die Zellen wurden in sterile Petrischalen (60 mm Durchmesser) in 5 ml Zellkulturmedium 5 ausgebracht und für 18 h zum Adhären in den Brutschrank verbracht.

Nach den 18 h wurde das Medium aus den Petrischalen entfernt und verworfen. Hierbei wurde ein großer Teil der nicht adhären Lymphozyten entfernt, während die Makrophagen auf dem Gefäßboden adhären hatten. Zur Entfernung möglichst aller Lymphozyten wurden

die Petrischalen dreimal mit PBS gespült und anschließend mit frischem Zellkulturmedium 5 versehen.

### **7.3 Inkubation mit den Toxinpräparationen**

Für die Inkubation der adhärennten Makrophagen mit den Toxinpräparationen wurden die Petrischalen mit der benötigten Menge an Gebrauchslösung von entweder rStx1<sub>WT</sub>, rStx2<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>mut</sub> oder Vektor versehen und für 6 h im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium aus jeder Schale abgenommen, in ein 50 ml-Röhrchen überführt, die Schalen mit 3 ml HEPES-Puffer gespült und diese Spüllösung ebenfalls in das entsprechende, auf Eis gelagerte Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurden die Schalen mit je 3 ml Accutase-Lösung versehen und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Überführung der Accutase-Lösung in die entsprechenden 50 ml-Röhrchen und dem mehrmaligen Spülen der Schalen mit kalter PBS (Spüllösung ebenfalls ins Röhrchen), folgte ein Zentrifugationsschritt (200 x g, 7 min, RT), die anschließende Resuspension des Pellets in 1 ml PBS, die Überführung von je 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte (V-Form) und die Vorbereitung für die Durchflusszytometrie.

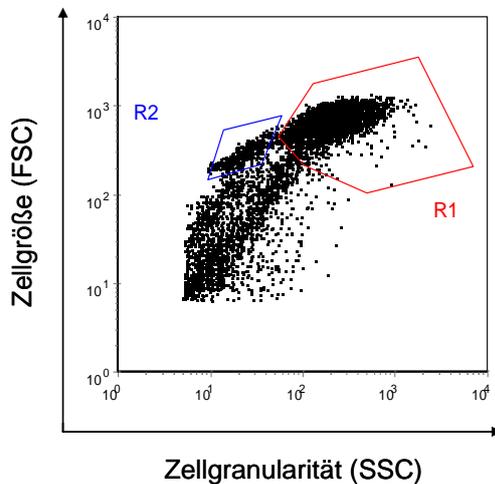
### **7.4 Immundekoration**

Die Immundekoration der gernteten Makrophagen wurde analog 5.3 mit den in Tab. 7 gelisteten Substanzen durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass kein 7AAD verwendet wurde. Im Anschluss wurden die Zellen der Messung am FACSCalibur™ Durchflusszytometer (Becton-Dickison, [BD], Heidelberg) zugeführt.

### **7.5 Analysestrategie im Durchflusszytometer**

Zur Probenanalyse wurde ein BD FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) eingesetzt (siehe 5.4). Die Einstellung der Parameter für die Makrophagen erfolgte mithilfe von Vorversuchen. Hierfür wurden Makrophagen wie oben gewonnen und kultiviert, jedoch ohne Zugabe der Toxinpräparationen. Die so erhaltenen Einstellungen, sowohl die Auswertefenster als auch die Einstellung der Laser, wurden als Standardprotokoll festgelegt und alle weiteren Versuche mit diesem Protokoll gemessen (Abb. 4). Die Auswertung erfolgte nach Ausrichtung der Gates an der Negativkontrolle. Es wurden 5000

Ereignisse in R1 (Makrophagen) gemessen unter Verwendung der gerätespezifischen „Cell Quest Pro“-Software. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem „FCS Express 2“ Programm (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Kanada).



**Abb. 4: Makrophagenkultur im Durchflusszytometer nach acht Tagen Kultivierung im Teflonbeutel und 18 h Plastik-Adhärenz**

Dargestellt ist eine repräsentative Kultur. Differenzierung der Zellen in R1 (Makrophagen) und R2 (Lymphozyten). Alle Ereignisse, die nicht in R1 oder R2 lagen, wurden als tote oder sterbende Zellen definiert.

## 7.6 RNA-Gewinnung

Für die RNA-Gewinnung wurden die Petrischalen mit den adhärennten Makrophagen mit der entsprechenden Gebrauchslösung der Toxinpräparation versetzt und für 6 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Im Anschluss wurden die Überstände der Petrischalen in 15 ml-Röhrchen gesammelt und auf Eis gelagert. In die Schalen ohne Überstand wurde 3 ml kalte PBS gegeben und die Zellen mittels eines Cellscrapers vorsichtig vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in die 15 ml-Röhrchen überführt, die Schalen mit 3 ml kalter PBS gespült und dieses ebenfalls ins Röhrchen gegeben. Nach Abzentrifugation der Röhrchen (7 min, 212 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 600 µl RLT-Puffer mit 2,5 % βME resuspendiert, gevortext und bei -70 °C eingefroren.

Die RNA-Gewinnung, das Herstellen und Verarbeiten der cDNA und die „Real Time“ TaqMan® erfolgte analog der Durchführung der iIEL (6.5, 6.5.1, 6.5.2).

## 8 Statistische Auswertung

Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm „SPSS für Windows“ (Version 15, SPSS Inc., USA) durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurden eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen sowie der Greenhouse-Geisser-Test verwendet.

Die statistische Signifikanzgrenze für die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten ( $p$ ) ist bei  $\leq 0,05$  definiert. Bei der Angabe der Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

n.s = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); wird nicht dargestellt

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

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

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

Befinden sich Sterne in einer Abbildung über einer Klammer, so bezieht sich der statistische Vergleich auf die durch die Klammer zusammengefassten Balken.

## VI Ergebnisse

### 1 Herstellung der mutagenisierten *stx1*- und *stx2*-Gene

Die *stx1*- bzw. *stx2*-Gene des Stammes EDL 933 konnten erfolgreich amplifiziert und mutagenisiert werden. Nach der Sequenzierung zeigte der Vergleich des rekombinanten Wildtyp-Stx (rStx1<sub>WT</sub> bzw. rStx2<sub>WT</sub>) und des rekombinanten mutagenisierten Stx (rStx1<sub>mut</sub> bzw. rStx2<sub>mut</sub>) die gewünschten Mutationen (Glutaminsäure → Glutamin, Arginin → Leucin) an den gewählten Stellen (Position 167 und 170) (Tab. 14). Die Gensequenzen für die rekombinant hergestellten rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> entsprachen den Originalsequenzen (Datenbankeintrag für Stx1 AE005174 (GenBank) bzw. für Stx2 NC\_000924 (NCBI)).

**Tab. 14: Vergleich der Gensequenzen von Stx1 und Stx2 vor und nach der Mutagenese**

| Gen         |               | relevante Sequenz (5´- 3´-Ende) <sup>(1)</sup>          | Austausch an Position <sup>(3)</sup> |
|-------------|---------------|---|--------------------------------------|
| <i>stx1</i> | Wildtyp       | -ctgtgacagctgaagctttacgttttcggcaaatacag- <sup>(2)</sup> |                                      |
| <i>stx1</i> | mutagenisiert | -ctgtgacagctCaagctttacTtttcggcaaatacag- <sup>(2)</sup>  | E167Q,<br>R170L                      |
| <i>stx2</i> | Wildtyp       | -cactgtcacagcagaagccttacgcttcaggcagatac- <sup>(2)</sup> |                                      |
| <i>stx2</i> | mutagenisiert | -cactgtcacagcaCaagccttacTcttcaggcagatac- <sup>(2)</sup> | E167Q,<br>R170L                      |

<sup>(1)</sup> Ausgetauschte Nukleotide sind fett in Großbuchstaben dargestellt.

<sup>(2)</sup> Positionen 167 und 170 unterstrichen dargestellt

<sup>(3)</sup> E = Glutaminsäure, Q = Glutamin; R = Arginin; L = Leucin

### 2 Herstellung von Toxinpräparationen als Stammlösungen

Die BLR(DE3)-Transformanten mit dem eingefügten *stx*-Gen sowie mit dem leeren Vektor wurden zur Induktion der Proteinexpression mit IPTG inkubiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine Inkubation ohne Zugabe von IPTG mitgeführt. Im Anschluss an diese Induktion wurden sowohl die Transformanten mit IPTG als auch ohne IPTG einer fraktionierten Toxinpräparation unterzogen. Die dabei gewonnenen Fraktionen (Überstand, Periplasma, Pellet) wurden auf ihre Zytotoxizität und ihren Gehalt an Stx-Protein untersucht.

## 2.1 Zytotoxizität der aus den *stx*-Transformanten gewonnenen Fraktionen

In der Überstand-Fraktion der rStx1<sub>WT</sub>- und rStx2<sub>WT</sub>-Transformanten konnte nur eine sehr geringe Zytotoxizität für Verozellen (CD<sub>50</sub>/ml) nachgewiesen werden. Daher wurde diese Fraktion nicht weiter untersucht (Tab. 15).

Sowohl die Periplasma-Fraktion als auch die Pellet-Fraktion der rStx1<sub>WT</sub>- und rStx2<sub>WT</sub>-Transformanten zeigten eine hohe Zytotoxizität (Tab. 15). Bei diesen Fraktionen war die Zytotoxizität nach Anzucht ohne IPTG deutlich höher als nach Anzucht mit IPTG. Die Pellet-Fraktion der Vektorkontrolle zeigte ebenfalls eine toxische Aktivität. Da dies bei der Periplasma-Fraktion der Vektorkontrolle nur in einem geringen Umfang zu beobachten war, wurde die periplasmatische Fraktion aus der Aufarbeitung der IPTG-frei angezüchteten Transformanten für alle weiteren Arbeiten ausgewählt.

**Tab. 15: Zytotoxische Aktivität verschiedener Fraktionen von aufgearbeiteten Transformantenkulturen**

| Kultur       | Fraktion                  | Zytotoxizität [CD <sub>50</sub> /ml x 10 <sup>4</sup> ] <sup>(2)</sup> |                  |                            |                       | Vektor |
|--------------|---------------------------|--|------------------|----------------------------|-----------------------|--------|
|              |                           | <i>stx1</i> -Transformante   |                  | <i>stx2</i> -Transformante |                       |        |
|              |                           | WT   | mut              | WT                         | mut                   |        |
| mit<br>IPTG  | Überstand                 | 60   | - <sup>(3)</sup> | 100                        | -                     | -      |
|              | Periplasma                | 400  | -                | 10.000                     | < 0,02 <sup>(4)</sup> | -      |
|              | Pellet                    | > 200.000  | 0,4              | 88.000                     | -                     | < 0,02 |
| ohne<br>IPTG | Überstand                 | 20   | -                | 100                        | -                     | -      |
|              | Periplasma <sup>(1)</sup> | 1.500.000  | < 0,02           | 60.000                     | < 0,02                | < 0,02 |
|              | Pellet                    | > 200.000  | 0,6              | 750.000                    | -                     | < 0,02 |

<sup>(1)</sup> Für alle weiteren Versuche wurde die Periplasma-Fraktion ohne IPTG-Behandlung verwendet

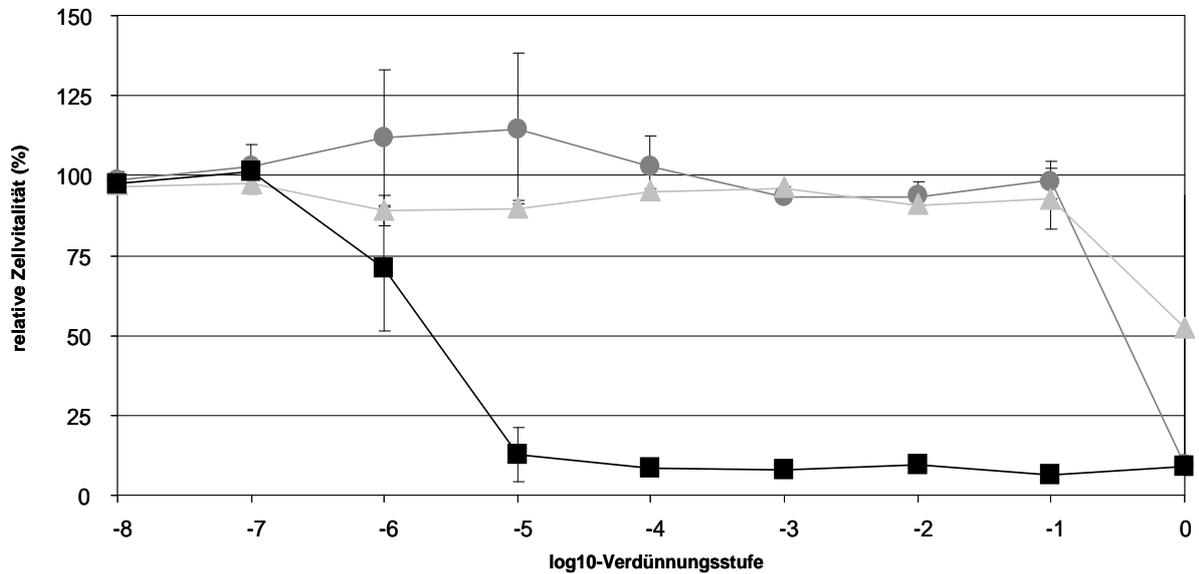
<sup>(2)</sup> gerundete Werte

<sup>(3)</sup> kein zytotoxischer Effekt nachweisbar

<sup>(4)</sup> Zytotoxizität in der ersten Verdünnungsstufe vorhanden, ab der zweiten Verdünnungsstufe nicht mehr nachweisbar; CD<sub>50</sub>/ml jedoch nicht berechenbar

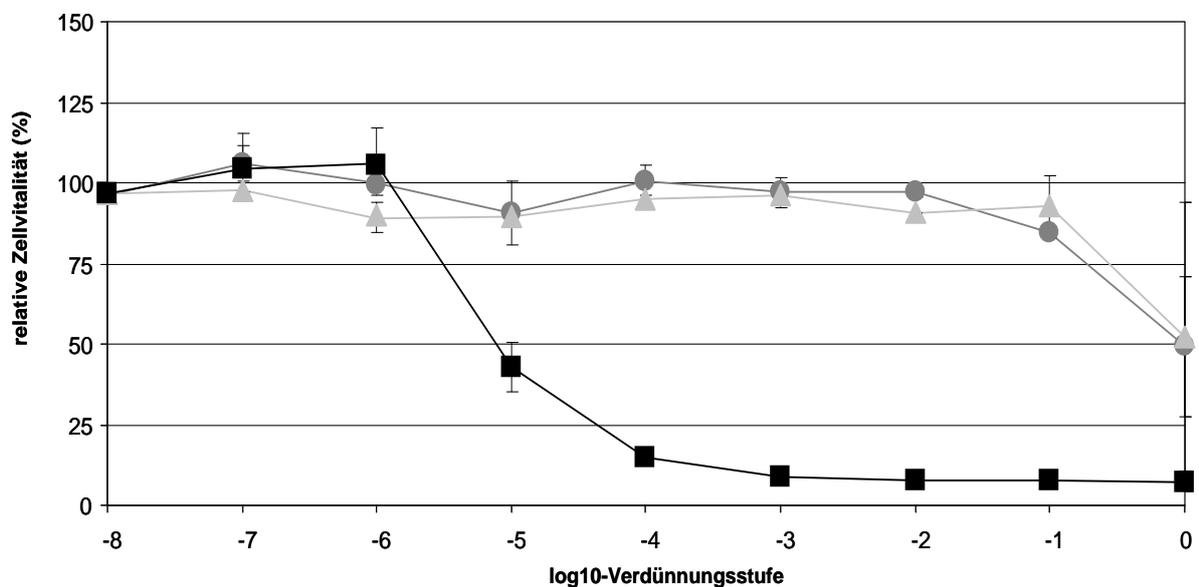
Für die weiteren Versuche sollten Periplasma-Fraktionen mit 200 CD<sub>50</sub>/ml eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden log-10-Verdünnungsreihen der Periplasma-Fraktion aller Transformanten (rStx1<sub>WT</sub>, rStx2<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>mut</sub>, Vektor) erneut im Verozell-ZT (n=3) eingesetzt (Abb. 5, Abb. 6). Sowohl die Präparationen mit mutagenisiertem Toxin als auch die Präparation des Vektor-Transformanten lösten nur in der höchsten Konzentration einen

zytotoxischen Effekt aus. Bei den Präparationen der rekombinanten Toxine zeigte sich ein deutlicher zytotoxischer Effekt in den sechs ( $rStx1_{WT}$ ) bzw. fünf ( $rStx2_{WT}$ ) höchsten Konzentrationen.



**Abb. 5: Zytotoxische Aktivität der Periplasma-Fractionen der  $rStx1_{WT}$ - und  $rStx1_{mut}$ -Transformanten in Abhängigkeit von der eingesetzten Verdünnung**

Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung eines repräsentativen Verozell-ZT; schwarzes Viereck:  $rStx1_{WT}$ , grauer Kreis:  $rStx1_{mut}$ , hellgraues Dreieck: Vektor



**Abb. 6: Zytotoxische Aktivität der Periplasma-Fractionen der  $rStx2_{WT}$ - und  $rStx2_{mut}$ -Transformanten in Abhängigkeit von der eingesetzten Verdünnung**

Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Verozell-ZT; schwarzes Viereck:  $rStx2_{WT}$ , grauer Kreis:  $rStx2_{mut}$ , hellgraues Dreieck: Vektor

## 2.2 Eigenschaften der Toxinpräparationen

Für die funktionellen Studien sollten die Stx möglichst in gleichen Konzentrationen eingesetzt werden. Da die mutagenisierten Toxine nicht über den Verozell-ZT quantifizierbar sind, wurde im ELISA die Verdünnung bestimmt, bei der eine  $OD_{450nm}$  von 1,5 für jede Fraktion nachgewiesen werden konnte. Durch die Kombination von ELISA und Verozell-ZT war es möglich,  $rStx_{WT}$  und  $rStx_{mut}$  auf einen einheitlichen Gehalt an spezifischem Toxin einzustellen. Das Ziel war eine Stammlösung von 20.000  $CD_{50}/ml$  für die Wildtyp-Toxine bzw. eine 20.000  $CD_{50}/ml$  entsprechende Stx-Konzentration für die mutagenisierten Toxine (Tab. 16). Da für die Vektor-Probe keine  $OD_{450nm}$  im ELISA und keine  $CD_{50}/ml$  im Verozelltest zu ermitteln war, wurde diese in einer Verdünnung analog zu  $rStx2_{WT}$  eingesetzt.

Die einheitlichen eingestellten Stammlösungen sollten als 1:100 verdünnte Gebrauchslösung (entsprechend 200  $CD_{50}/ml$ ) in die funktionellen Studien eingesetzt werden.

Zur Überprüfung der Gebrauchslösung wurde ein Verozell-ZT mit  $rStx_{WT}$  durchgeführt. Hier ergaben sich folgende Werte: 157  $CD_{50}/ml$  für die  $rStx1_{WT}$ -Gebrauchslösung und 106  $CD_{50}/ml$  für die  $rStx2_{WT}$ -Gebrauchslösung. Sowohl für den Vektor als auch für die  $rStx_{mut}$  konnte keine Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Der LPS-Gehalt aller Präparationen lag bei 5,1  $pg/ml$  in der Stammlösung oder darunter.

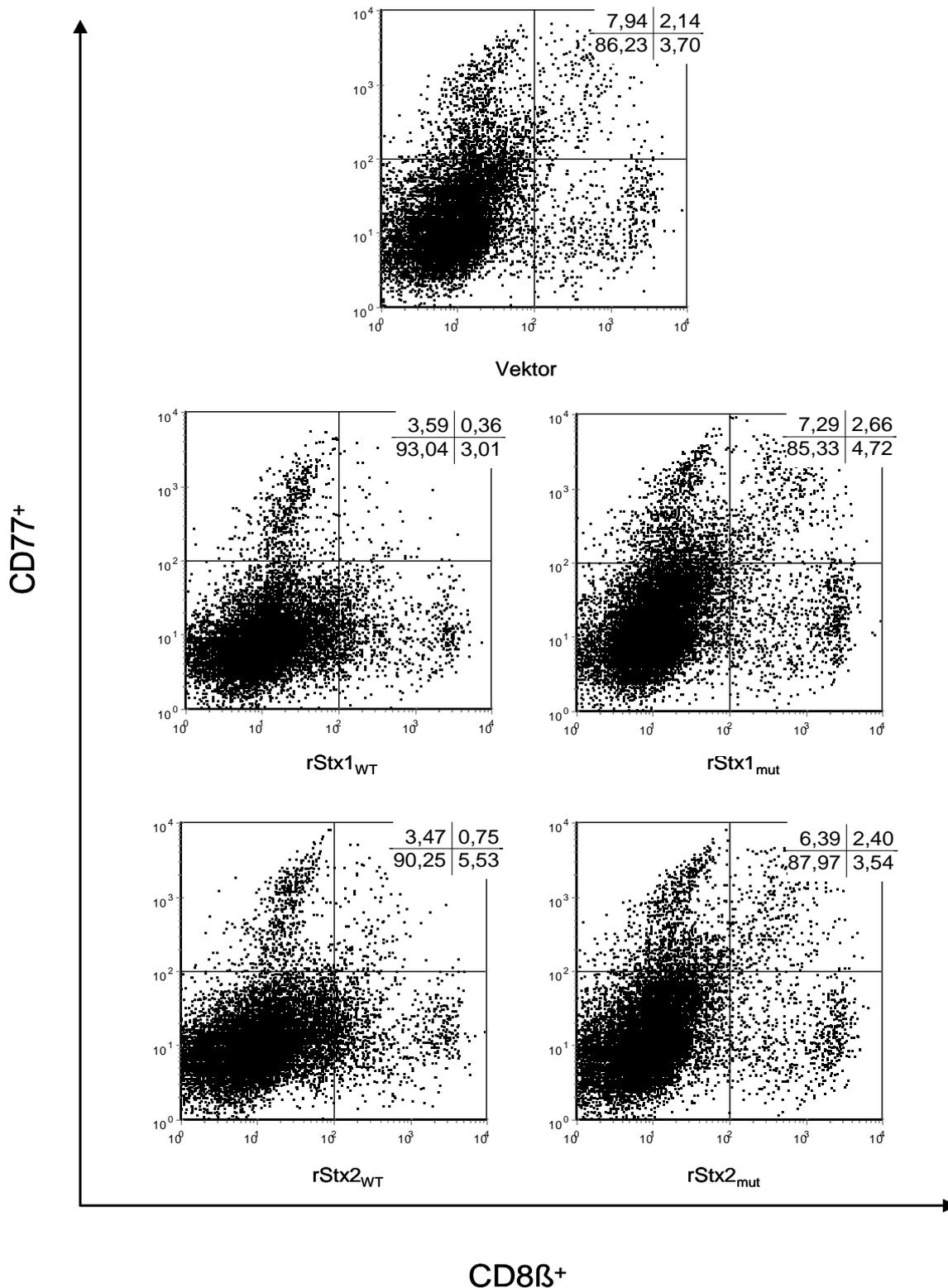
Tab. 16: Eigenschaften von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub>

|                      |   | rStx1 <sub>WT</sub> | rStx1 <sub>mut</sub> | rStx2 <sub>WT</sub> | rStx2 <sub>mut</sub> | Vektor     |
|----------------------|---|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|------------|
| Stamm-<br>lösung     | ELISA   |                     |                      |                     |                      |            |
|                      | - Verdünnung  | 1:350               | 1:1500               | 1:1000              | 1:4000               | unverdünnt |
|                      | - OD <sub>450nm</sub>   | 1,47                | 1,52                 | 1,49                | 1,55                 | 0,07       |
|                      | Verozell-ZT<br>[CD <sub>50</sub> /ml<br>(geom. Mittel)]       | 2.656.528           | 40                   | 785.099             | <20                  | <20        |
|                      | LPS-Gehalt<br>[pg/ml]   | 3,8                 | 4,0                  | 5,1                 | 4,9                  | 4,6        |
|                      | Verdünnung für<br>20.000 CD <sub>50</sub> /ml                 | 1:133               | 1:570                | 1:39                | 1:156                | 1:39       |
| Gebrauchs-<br>lösung | Verdünnung der<br>Stammlösung<br>für 200 CD <sub>50</sub> /ml | 1:100               | 1:100                | 1:100               | 1:100                | 1:100      |
|                      | LPS-Gehalt<br>[pg/ml]<br>(errechnet)                          | 0,038               | 0,04                 | 0,051               | 0,049                | 0,046      |

### 3 Wirkung des rStx<sub>WT</sub> und des rStx<sub>mut</sub> auf bovine PBMC

Nach 96-stündiger Inkubation der PBMC mit den Periplasma-Fractionen der rStx<sub>WT</sub>- und rStx<sub>mut</sub>-Transformanten und der Periplasma-Fraktion der Vektorkontrolle („Vektor“) erfolgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (Abb.7).

PBMC wurden auf Vitalität, Anteil der Subpopulationen und die Expression des Stx-Rezeptors Gb<sub>3</sub>/CD77 untersucht.



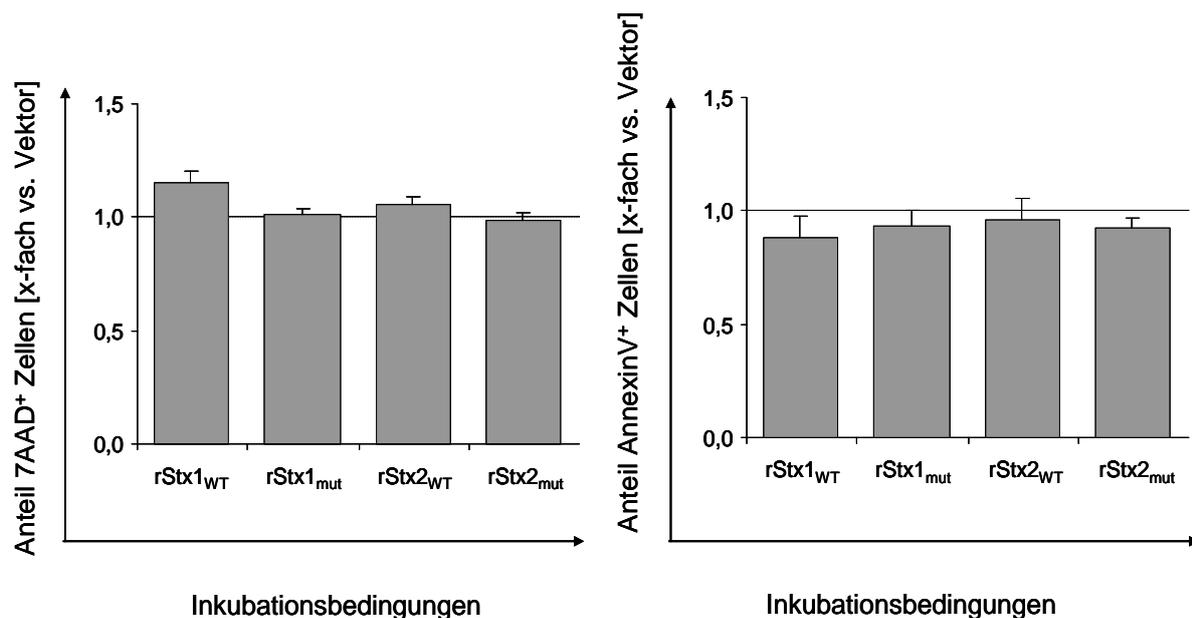
**Abb. 7: Durchflusszytometer-Analyse von CD77<sup>+</sup>-und CD8β<sup>+</sup>-Zellen**

Dargestellt ist eine repräsentative Analyse von PBMC im Durchflusszytometer. Im linken oberen Quadranten sind die CD77<sup>+</sup>-Zellen dargestellt, im rechten oberen Quadranten die CD77<sup>+</sup>-und CD8β<sup>+</sup>-Zellen, im rechten unteren Quadranten die CD8β<sup>+</sup>-Zellen und im linken unteren Quadranten die Zellen, die für beide Oberflächenmarker negativ sind. Die Zahlen im oberen rechten Quadranten geben die Anzahl der Zellen in Prozent an. Die Inkubationsbedingung ist unter dem jeweiligen Dotplot aufgeführt.

### 3.1 Vitalität

Für den Vergleich zwischen „Vektor“ und rStx1<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> bzw. rStx2<sub>mut</sub> wurden die absoluten Zahlen verwendet. Die absoluten Zahlen repräsentieren den Anteil der für den untersuchten Oberflächenmarker positiven Zellen in Prozent. Hier zeigte sich zwischen „Vektor“ und Toxin ein signifikanter Anstieg der 7AAD<sup>+</sup>-Zellen nach Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> (rStx1<sub>WT</sub>: p = 0,015; rStx2<sub>WT</sub>: p = 0,027), während der Anteil an AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen unverändert blieb (Ergebnisse der statistischen Auswertung siehe Tab. 17).

Nach der Normalisierung auf die Werte nach Inkubation mit dem „Vektor“ zeigte sich bei der Färbung mit 7AAD kein Unterschied zwischen den Toxinen. Weder die Inkubation mit den Wildtypen noch mit den mutagenisierten Toxinen führte zu einer signifikanten Zunahme nekrotischer Zellen (rStx1:p = 0,081; rStx2:p = 0,060). Auch bei der Färbung mit AnnexinV-PE konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Toxinen ermittelt werden (rStx1: p = 0,064; rStx2: p = 0,446) (Abb. 8).



**Abb. 8: Anteil an 7AAD<sup>+</sup>- (n=6) und AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen (n=5) in PBMC-Kulturen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichungen. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich rStx1<sub>WT</sub> versus rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>mut</sub> sowie rStx1<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>WT</sub>. Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linie) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

### 3.2 Anteil und Vitalität von PBMC-Subpopulationen

Der Anteil der CD21<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8β<sup>+</sup>- und γδ T<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamtzahl der morphologisch intakten Zellen veränderte sich je nach Inkubationsbedingung (Abb. 9). Grundsätzlich blieben die Anteile der untersuchten Zellpopulationen nach Inkubation mit beiden mutagenisierten Toxinen unverändert im Vergleich zum „Vektor“. Nur bei CD21<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich nach Inkubation mit rStx1<sub>mut</sub> im Vergleich zum „Vektor“ ein signifikanter Anstieg. Der Vergleich zwischen „Vektor“ und Wildtyp-Toxin ergab einen signifikanten Abfall des Anteils an CD21<sup>+</sup>-Zellen bei rStx1<sub>WT</sub> und einen signifikanten Abfall des Anteils an CD8<sup>+</sup>-Zellen bei beiden Wildtyp-Toxinen. Der Anteil der anderen Subpopulationen war nach Inkubation mit den Toxinen im Vergleich zum „Vektor“ unverändert (Tab. 17, Abb. 9).

In den auf den „Vektor“ normalisierten Daten zeigte sich nach der Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> bzw. rStx2<sub>WT</sub> im Vergleich zu den mutagenisierten Toxinen ein signifikanter Abfall des Anteiles an CD21<sup>+</sup> (rStx1: p = 0,005; rStx2: p = 0,026), der bei rStx1<sub>WT</sub> signifikant stärker war als bei rStx2<sub>WT</sub> (p = 0,031). Ebenso kam es bei den Wildtyp-Toxinen im Vergleich zu den mutagenisierten Toxinen zu einem signifikanten Abfall des Anteils an CD8β<sup>+</sup>-Zellen (rStx1: p = 0,002; rStx2: p = 0,002) (Abb. 10). Im Gegensatz dazu stieg der Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen nach Inkubation mit den Wildtypoxinen, welcher allerdings nur nach Inkubation mit rStx2<sub>WT</sub> signifikant war (rStx1: p = 0,073; rStx2: p = 0,037).

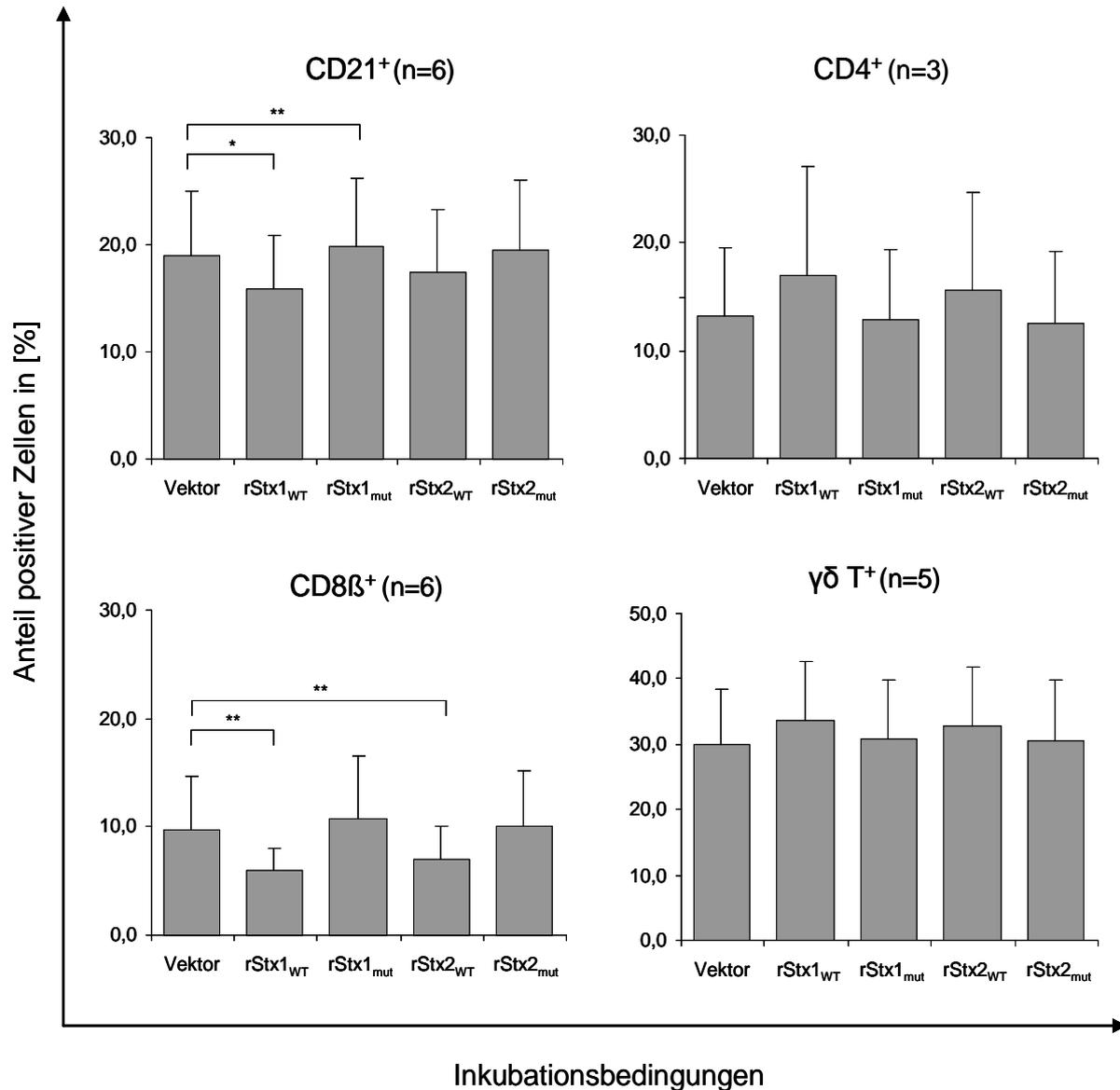
Der Anteil an 7AAD<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen blieb nach Inkubation mit rStx1<sub>mut</sub> und rStx2<sub>mut</sub> unverändert im Vergleich zum „Vektor“. Ein signifikanter Anstieg der 7AAD<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich bei rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> bei CD21<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zum „Vektor“ (rStx1<sub>WT</sub>: p = 0,004; rStx2<sub>WT</sub>: p = 0,036) (Tab. 17).

Im Vergleich zu rStx1<sub>mut</sub> erhöhte die Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> den Anteil 7AAD<sup>+</sup>-Zellen an den CD21<sup>+</sup>-Zellen (p = 0,031) und an den γδ T<sup>+</sup>-Zellen (p = 0,010) (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls erhöht war nach der Inkubation mit rStx2<sub>WT</sub> im Vergleich zu rStx2<sub>mut</sub> der Anteil 7AAD<sup>+</sup>-Zellen an den γδ T<sup>+</sup>-Zellen (p = 0,048). Zwischen rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> stellte sich ein signifikanter Anstieg der 7AAD<sup>+</sup> bei CD21<sup>+</sup>-Zellen (p = 0,006) dar. Bei allen anderen Subpopulationen zeigten sich bei der Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> keine Unterschiede.

Die Auswertung der AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen ergab im Vergleich zwischen Vektorkontrolle und Toxinpräparationen keinen Unterschied, lediglich der Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen fiel nach Inkubation mit rStx2<sub>mut</sub> signifikant ab (Tab. 17).

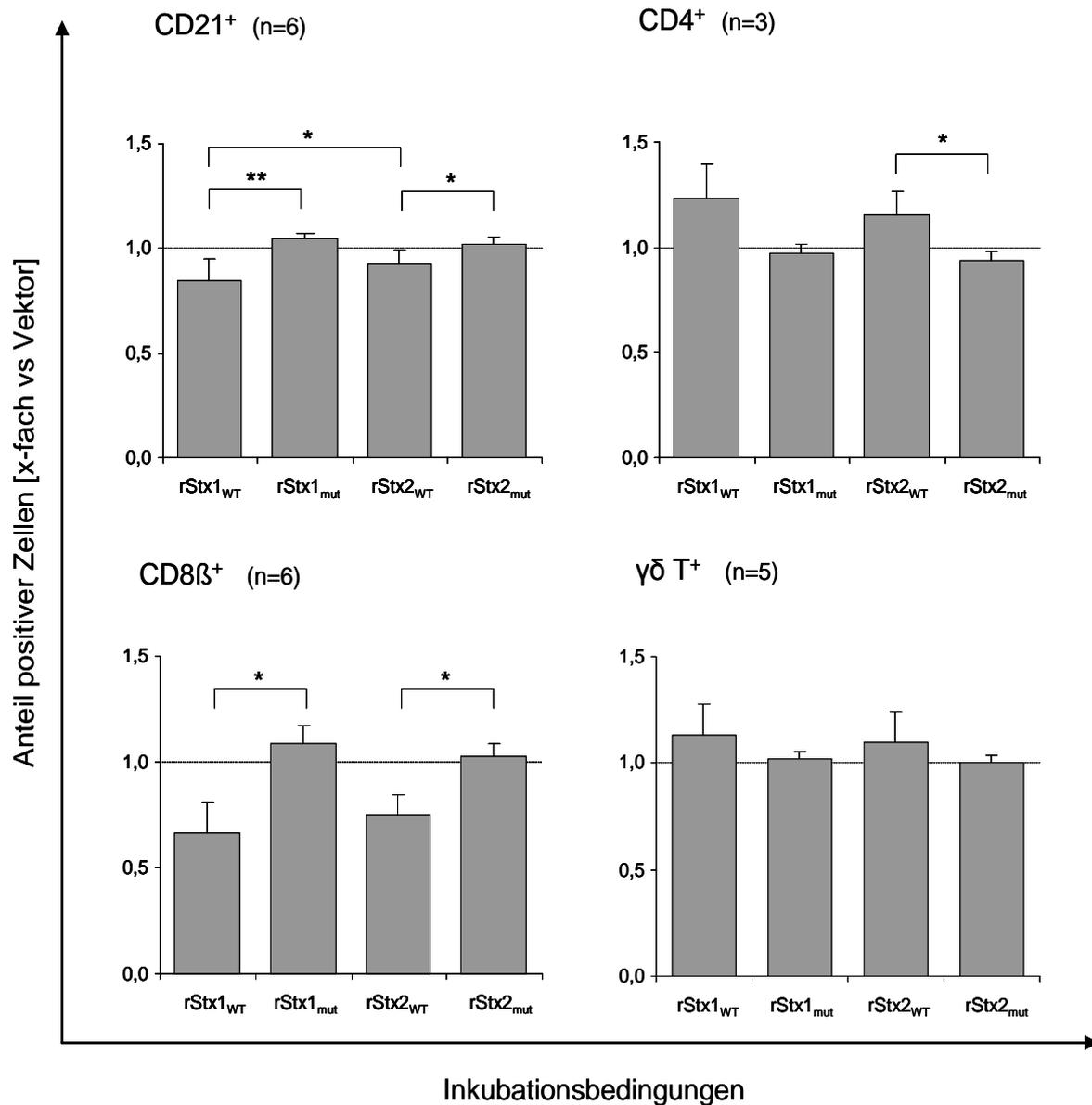
Im Vergleich rStx1<sub>WT</sub> versus rStx1<sub>mut</sub> stieg der Anteil an AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen nur bei CD8<sup>+</sup> signifikant an (p = 0,046).

Bei allen anderen Subpopulationen führte weder die Inkubation mit den mutagenisierten Toxinen noch mit den Wildtyp-Toxinen zu einer Veränderung im Anteil der AnnexinV<sup>+</sup>-Zellen.



**Abb. 9: Anteil der CD77<sup>+</sup>-, CD21<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8β<sup>+</sup>- und γδ T<sup>+</sup>-Zellen in [%] nach Inkubation mit den Toxinpräparationen**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich „Vektor“ versus rStx1<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> und rStx2<sub>mut</sub> (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 10: Anteil CD21<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8β<sup>+</sup>- und γδ-T<sup>+</sup>-Zellen in PBMC-Kulturen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich rStx1<sub>WT</sub> versus rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>mut</sub> sowie rStx1<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>WT</sub> (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ). Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linien) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

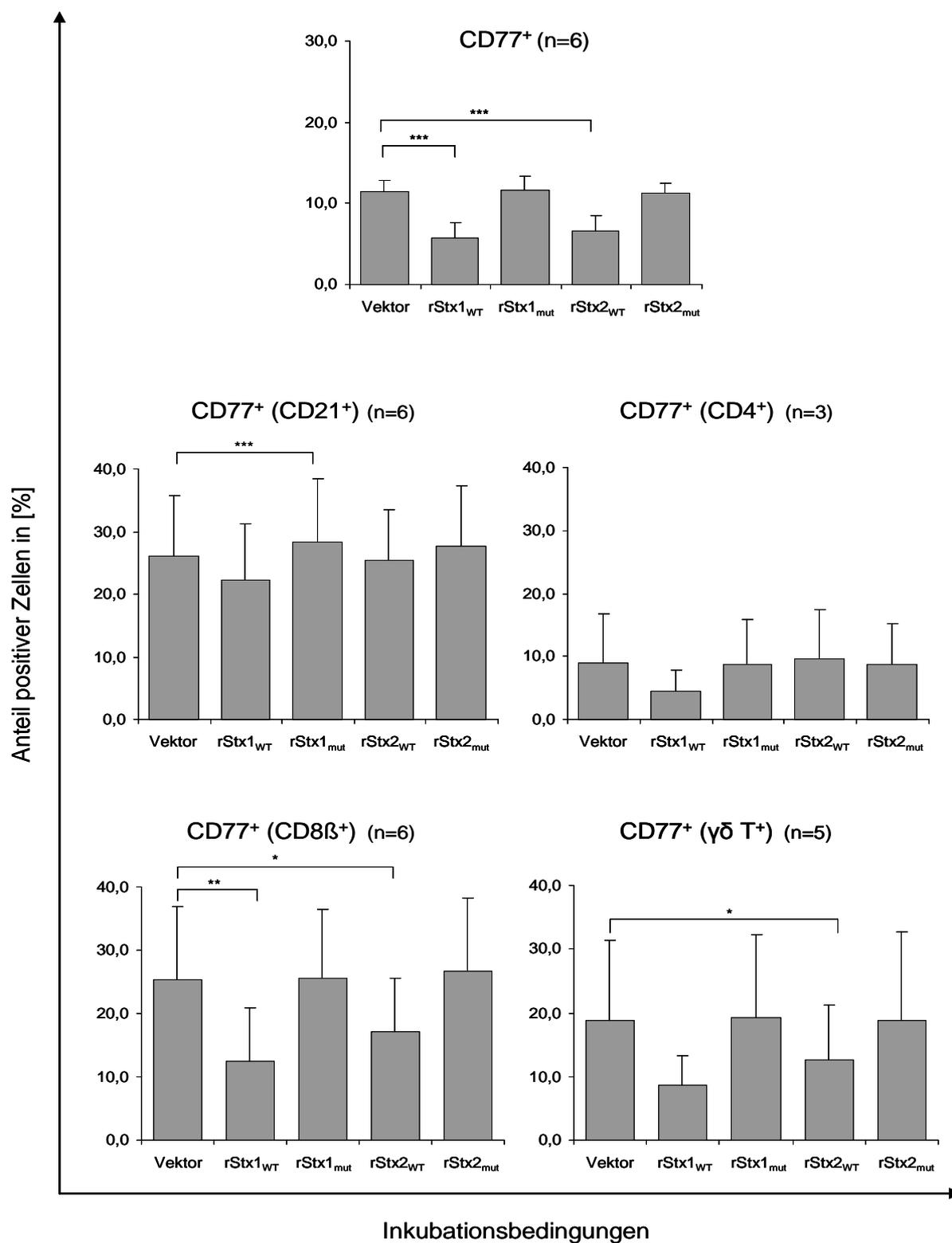
### 3.3 Stx-Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77

Nach Inkubation mit rStx1<sub>mut</sub> und rStx2<sub>mut</sub> exprimierte im Vergleich zum „Vektor“ ein unveränderter Anteil der Zellen CD77, während nach der Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> der Anteil CD77<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen der Kultur signifikant abfiel (rStx1: p = 0,000; rStx2: p = 0,001) (Tab. 17, Abb. 11).

Auch die PBMC-Subpopulationen wurden auf den Anteil CD77<sup>+</sup>-Zellen untersucht. Nach Inkubation mit rStx1<sub>mut</sub> stieg der Anteil an CD77<sup>+</sup>-Zellen aller CD21<sup>+</sup>-Zellen (CD77<sup>+</sup>(CD21<sup>+</sup>)) im Vergleich zum „Vektor“ signifikant an. Im Gegensatz dazu war nach Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> ein signifikanter Abfall des Anteils an den CD77<sup>+</sup>-Zellen aller CD8<sup>+</sup>-Zellen zu sehen. Des Weiteren zeigte sich bei rStx2<sub>WT</sub> ein signifikanter Abfall des Anteils bei  $\gamma\delta$  T<sup>+</sup>-Zellen. In allen anderen untersuchten Subpopulationen zeigte sich ein unveränderter Anteil an CD77<sup>+</sup>-Zellen (Tab. 17).

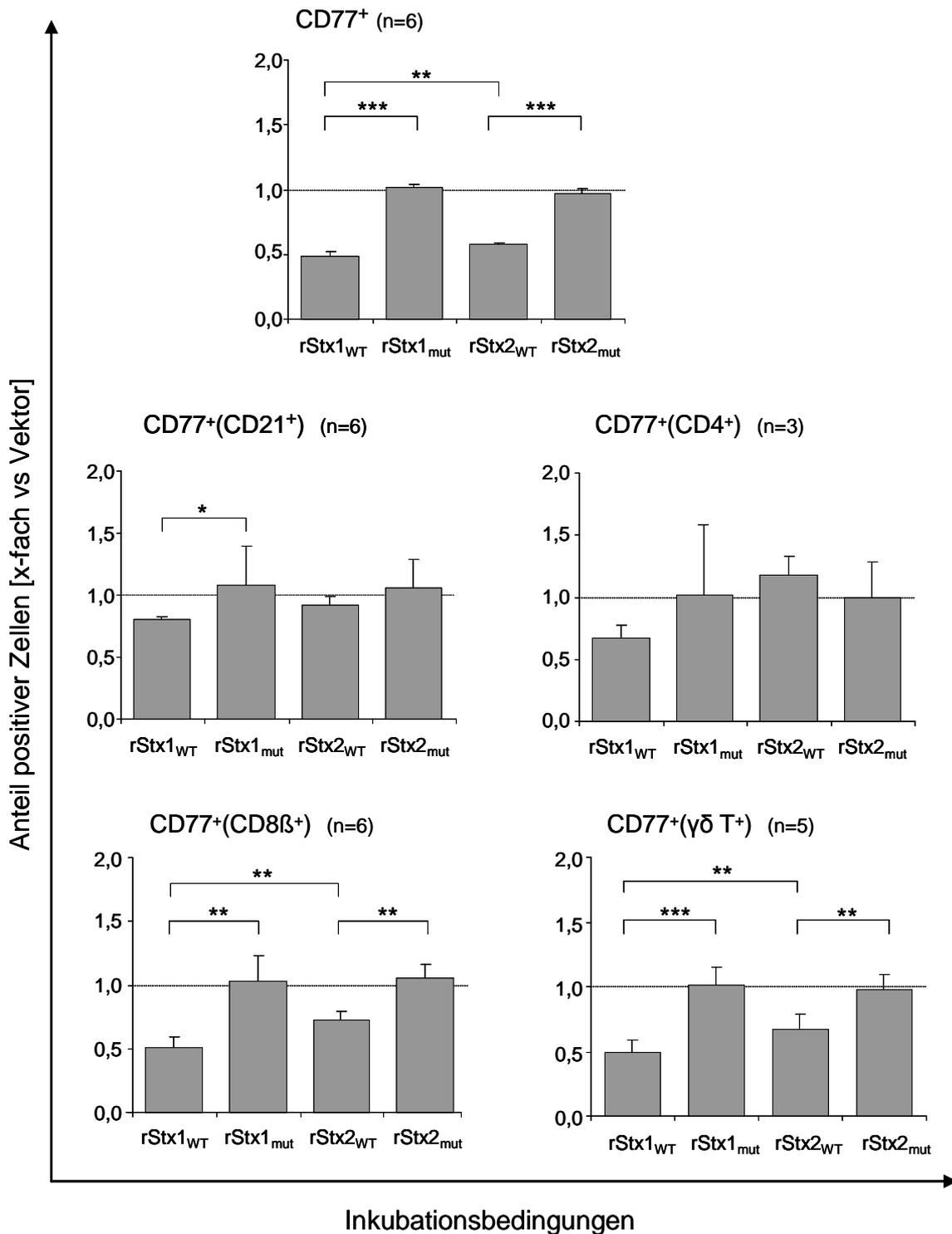
Sowohl bei CD77<sup>+</sup>(CD8 $\beta$ <sup>+</sup>)-Zellen als auch bei CD77<sup>+</sup>( $\gamma\delta$  T<sup>+</sup>)-Zellen zeigte der Vergleich zwischen rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>mut</sub>, rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> der auf den „Vektor“ normalisierten Daten einen signifikanten Abfall des Anteils an CD77<sup>+</sup>-Zellen (CD77<sup>+</sup>(CD8 $\beta$ <sup>+</sup>): rStx1: p = 0,002; rStx2: p = 0,003; CD77<sup>+</sup>( $\gamma\delta$  T<sup>+</sup>): rStx1: p = 0,000; rStx2: p = 0,003) (Abb. 12).

Vergleiche zwischen rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> zeigen, dass beide Toxinpräparationen eine ähnliche Wirkung auf PBMC haben. Dennoch waren auch hier signifikante Unterschiede im Anteil an CD77<sup>+</sup>-Zellen bei CD8 $\beta$ <sup>+</sup>-(p = 0,001) und  $\gamma\delta$  T<sup>+</sup>-Zellen (p = 0,001) zu ermitteln (Abb. 12).



**Abb. 11: Anteil CD77<sup>+</sup>-Zellen an allen Zellen und an den CD21<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8β<sup>+</sup>- und γδ-T<sup>+</sup>- Zellen in [%] nach Inkubation mit den Toxinpräparationen**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich „Vektor“ versus rStx1<sub>WT</sub>, rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> und rStx2<sub>mut</sub> (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 12: Anteil CD77<sup>+</sup>- Zellen an allen Zellen und an den CD21<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8β<sup>+</sup>- und γδ-T<sup>+</sup>- Zellen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich rStx1<sub>WT</sub> versus rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>mut</sub> sowie rStx1<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>WT</sub> (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ). Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linien) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

Tab. 17: Vergleich „Vektor“ versus Toxinpräparation

|                    | Parameter   | Vektor versus       |                      |                     |                      |
|--------------------|---|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                    |   | rStx1 <sub>WT</sub> | rStx1 <sub>mut</sub> | rStx2 <sub>WT</sub> | rStx2 <sub>mut</sub> |
| <b>PBMC</b>        | 7AAD <sup>+</sup>                                     | <b>0,015</b>        | 0,427                | <b>0,027</b>        | 0,805                |
|                    | 7AAD <sup>+</sup> (CD21 <sup>+</sup> ) <sup>(1)</sup> | <b>0,004</b>        | 0,143                | <b>0,036</b>        | 0,091                |
|                    | 7AAD <sup>+</sup> (CD4 <sup>+</sup> )                 | <b>0,004</b>        | 0,512                | 0,136               | 0,469                |
|                    | 7AAD <sup>+</sup> (CD8 <sup>+</sup> )                 | 0,321               | 0,504                | 0,498               | 0,381                |
|                    | 7AAD <sup>+</sup> (γδ T <sup>+</sup> )                | 0,073               | 0,622                | 0,259               | 0,405                |
|                    | AnnexinV <sup>+</sup>                                 | 0,274               | 0,498                | 0,797               | <b>0,010</b>         |
|                    | AnnexinV <sup>+</sup> (CD21 <sup>+</sup> )            | 0,526               | 0,888                | 0,985               | 0,595                |
|                    | AnnexinV <sup>+</sup> (CD4 <sup>+</sup> )             | 0,061               | 0,243                | 0,288               | 0,317                |
|                    | AnnexinV <sup>+</sup> (CD8 <sup>+</sup> )             | 0,892               | 0,229                | 0,196               | <b>0,009</b>         |
|                    | AnnexinV <sup>+</sup> (γδ T <sup>+</sup> )            | 0,749               | 0,814                | 0,558               | 0,591                |
|                    | CD21 <sup>+</sup>                                     | <b>0,029</b>        | <b>0,010</b>         | 0,078               | 0,147                |
|                    | CD4 <sup>+</sup>                                      | 0,215               | 0,281                | 0,262               | 0,107                |
|                    | CD8 <sup>+</sup>                                      | <b>0,034</b>        | 0,130                | <b>0,025</b>        | 0,241                |
|                    | γδ T <sup>+</sup>                                     | 0,105               | 0,273                | 0,175               | 0,593                |
|                    | CD77 <sup>+</sup>                                     | <b>0,000</b>        | 0,696                | <b>0,001</b>        | 0,254                |
|                    | CD77 <sup>+</sup> (CD21 <sup>+</sup> )                | 0,325               | <b>0,001</b>         | 0,807               | 0,077                |
|                    | CD77 <sup>+</sup> (CD4 <sup>+</sup> )                 | 0,378               | 0,664                | 0,686               | 0,705                |
|                    | CD77 <sup>+</sup> (CD8 <sup>+</sup> )                 | <b>0,006</b>        | 0,808                | <b>0,014</b>        | 0,070                |
|                    | CD77 <sup>+</sup> (γδ T <sup>+</sup> )                | 0,052               | 0,584                | <b>0,038</b>        | 0,978                |
|                    | <b>IEL</b>  | IL-4                | <b>0,012</b>         | 0,147               | <b>0,016</b>         |
| <b>Makrophagen</b> | CD14 <sup>+</sup> (CD77 <sup>+</sup> )                | <b>0,029</b>        | 0,128                | <b>0,007</b>        | 0,462                |
|                    | CD80 <sup>+</sup> (CD77 <sup>+</sup> )                | 0,456               | 0,935                | 0,458               | 0,555                |
|                    | CD86 <sup>+</sup> (CD77 <sup>+</sup> )                | 0,543               | 0,811                | 0,686               | 0,366                |
|                    | CD77 <sup>+</sup>                                     | 0,141               | 0,221                | 0,088               | 0,235                |
|                    | AnnexinV <sup>+</sup>                                 | 0,545               | 0,811                | 0,384               | 0,940                |

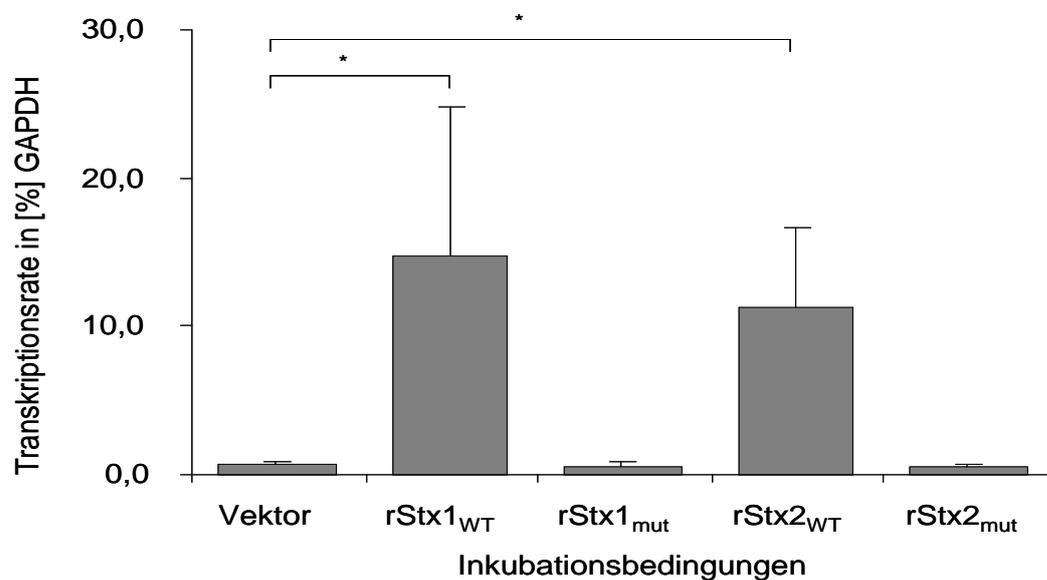
Dargestellt sind die p-Werte des Vergleichs „Vektor“ gegen Toxinpräparation, aufgeschlüsselt nach dem Testparameter, signifikante Werte sind fett gedruckt.

(1) zu lesen: Anteil 7AAD<sup>+</sup>-Zellen an allen CD21<sup>+</sup>-Zellen

#### 4 Wirkung von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub> auf bovine iIEL

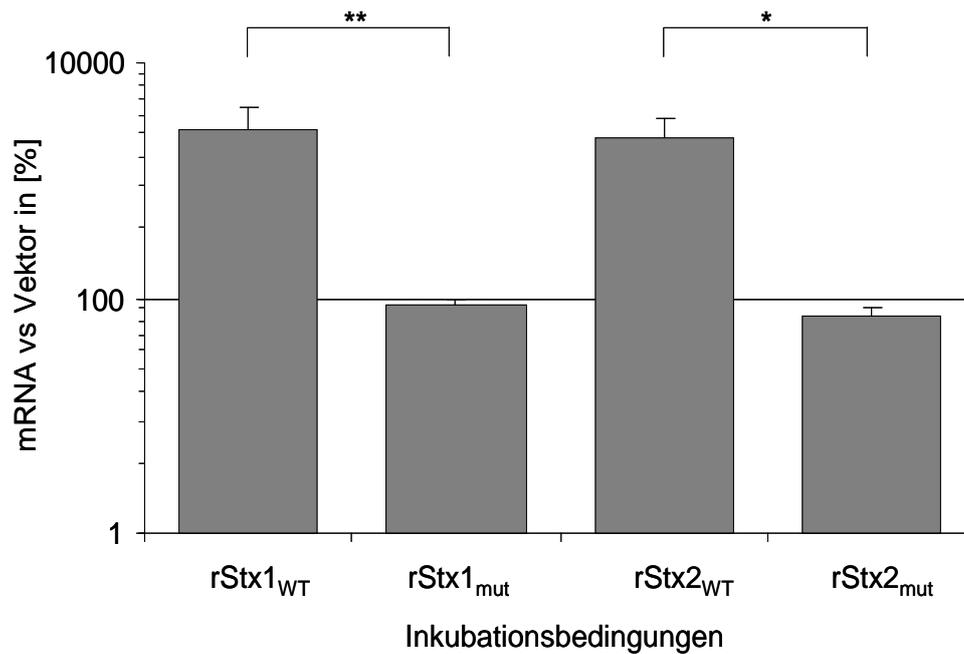
Nach Inkubation mit den mutagenisierten Toxinen für 6 h kam es im Vergleich zum „Vektor“ zu keiner Veränderung der Transkriptionsrate für IL-4 mRNA. Ein signifikanter Anstieg der Transkriptionsrate für IL-4 mRNA war jedoch nach der Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> bzw. rStx2<sub>WT</sub> zu beobachten (Tab. 17, Abb. 13).

Vergleiche zwischen der Inkubation mit Wildtyp-Toxinen und mutagenisierten Toxinen zeigten einen signifikanten Unterschied der Transkriptionsrate für IL-4 mRNA (rStx1:  $p = 0,013$ ; rStx2:  $p = 0,021$ ) (Abb. 14).



**Abb. 13: Vergleich der Transkriptionsraten von IL-4 in [%] GAPDH (n=3)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich „Vektor“ versus rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ).



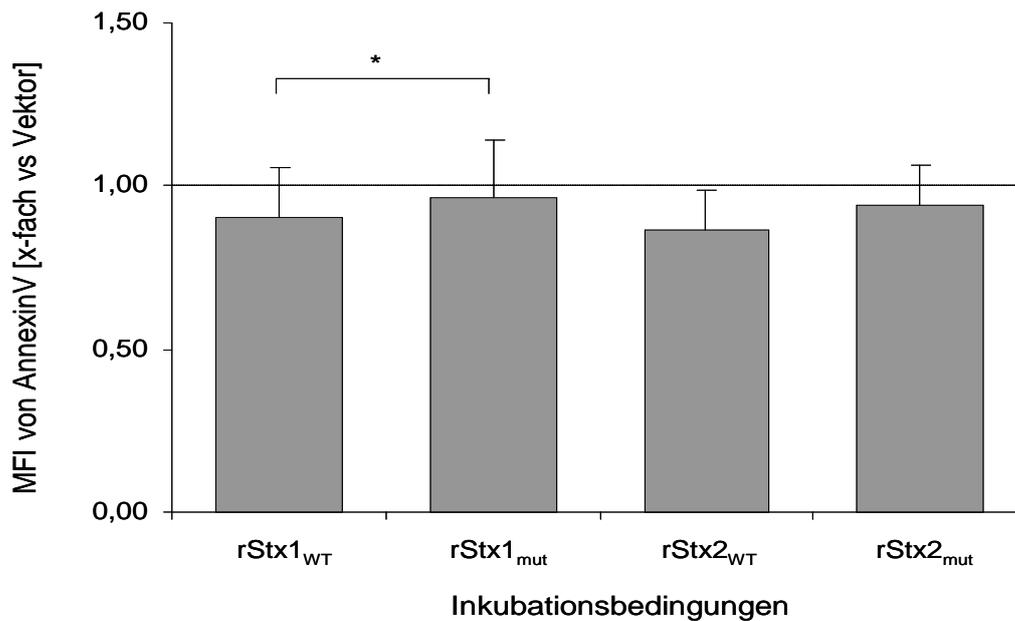
**Abb. 14: Transkriptionsrate in iIEL für IL-4 mRNA nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=3)**

Der Wert 100 (gestrichelte Linie) entspricht den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“ (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ).

## 5 Wirkung von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub> auf bovine Makrophagen

### 5.1 Vitalität

Die morphologisch intakten Zellen der jeweiligen Inkubationsbedingung wurden ermittelt und für die Auswertung genutzt. Hierfür wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) verwendet. Nach 6 h Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> kam es zu einem leichten, aber signifikanten Abfall der Expression von AnnexinV im Vergleich zu rStx1<sub>mut</sub> ( $p = 0,033$ ) (Abb. 15).



**Abb. 15: Nachweis der Expression von AnnexinV auf Makrophagen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=4)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich rStx1<sub>WT</sub> versus rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>mut</sub> sowie rStx1<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>WT</sub> (\*:  $p \leq 0,05$ ). Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linien) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

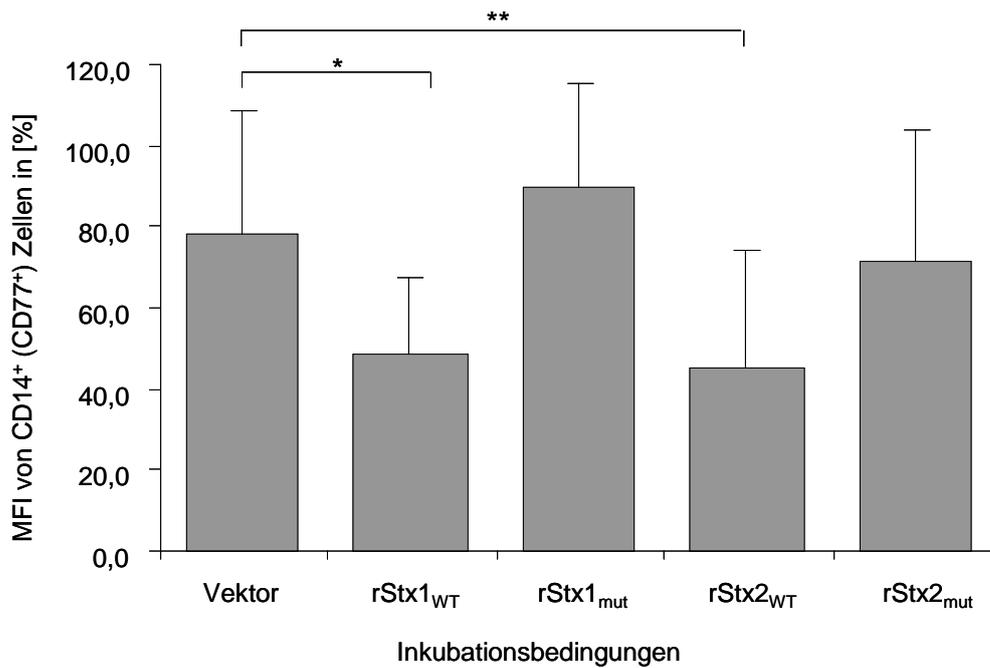
## 5.2 Oberflächenmarker

### 5.2.1 Expression von CD14, CD80 und CD86 auf CD77<sup>+</sup>-Zellen

Nach der Inkubation mit den mutagenisierten Toxinen kam es auf CD77<sup>+</sup>-Zellen weder bei CD14 noch bei CD80 oder CD86 zu einer Veränderung der Expression im Vergleich zur Inkubation mit dem „Vektor“. Die Inkubation mit den Wildtyp-Toxinen führte jedoch im Vergleich zum „Vektor“ zu einem signifikanten Abfall der CD14<sup>+</sup>-Expression der Zellen (Tab. 17, Abb. 16).

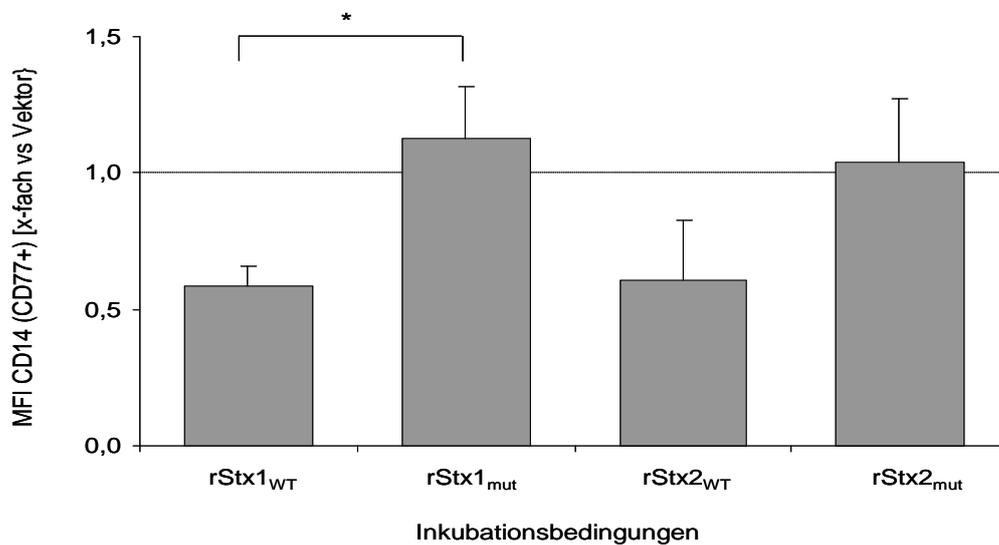
Im Vergleich der normalisierten Daten kam es nach Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> zu einem signifikanten Abfall der Expression von CD14 auf CD77<sup>+</sup>-Makrophagen ( $p = 0,029$ ) im Vergleich zur Inkubation mit rStx1<sub>mut</sub>. Der Unterschied in der CD14-Expression nach Inkubation mit rStx2<sub>WT</sub> und rStx2<sub>mut</sub> war zwar deutlich, aber statistisch nicht signifikant ( $p = 0,188$ ) (Abb. 17).

Die Inkubation mit den Wildtyp-Toxinen als auch mit den mutagenisierten Toxinen hatte keinen Einfluss auf die Expression von CD80/86 auf CD77<sup>+</sup>-Makrophagen (Abb. 18).



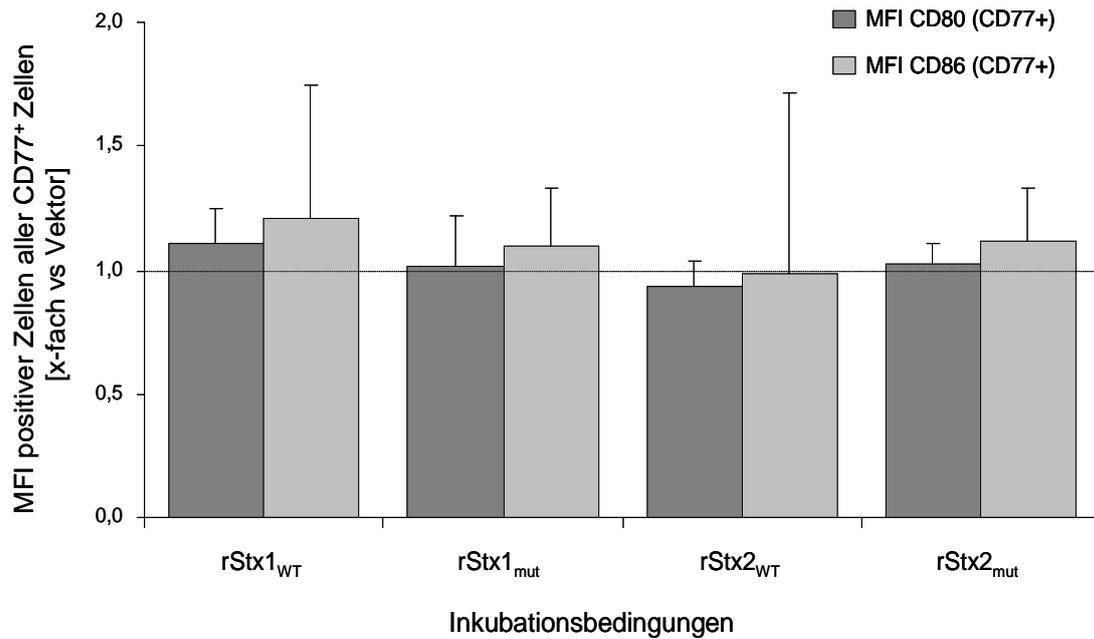
**Abb. 16: Expression (MFI) von CD14 auf CD77<sup>+</sup>-Makrophagen in [%]**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich „Vektor“ versus rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> (\*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 17: Expression (MFI) von CD14 auf CD77<sup>+</sup> Makrophagen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=4) (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Statistisch ausgewertet wurde der Vergleich rStx1<sub>WT</sub> versus rStx1<sub>mut</sub>, rStx2<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>mut</sub> sowie rStx1<sub>WT</sub> versus rStx2<sub>WT</sub> (\*:  $p \leq 0,05$ ). Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linien) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

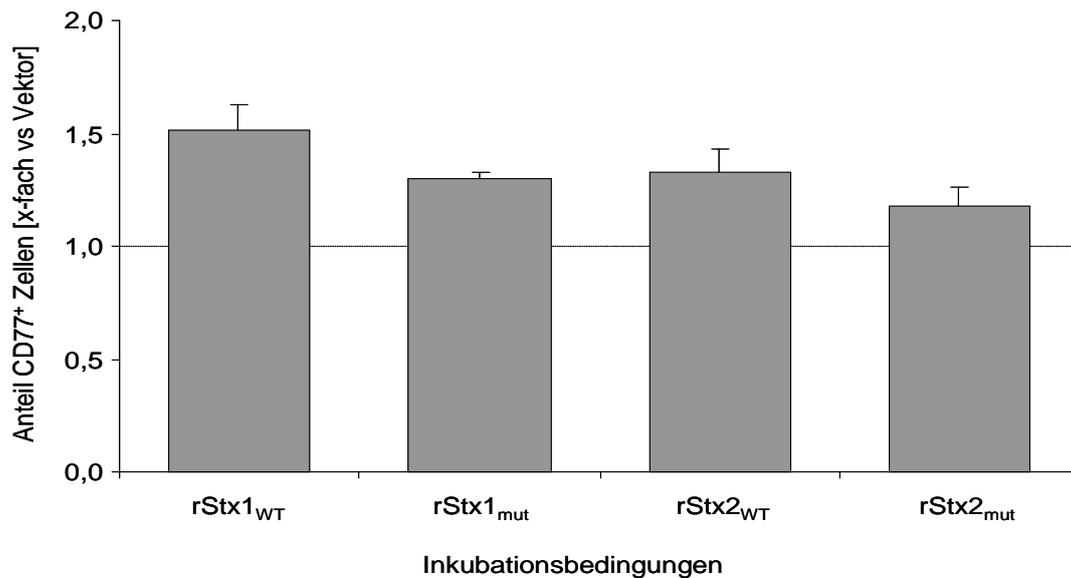


**Abb. 18: Expression (MFI) von CD80 und CD86 auf CD77<sup>+</sup>-Makrophagen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=4) (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linien) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

### 5.2.2 Stx-Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77

Weder die 6-stündige Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> bzw. rStx2<sub>WT</sub> noch die Inkubation mit rStx1<sub>mut</sub> bzw. rStx2<sub>mut</sub> löste eine signifikante Veränderung in der Expression von CD77 auf der Oberfläche der Makrophagen aus. Es konnte ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg des Anteils an CD77<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden (rStx1:  $p = 0,321$ ; rStx2:  $p = 0,342$ ) (Abb. 19). Auch der Vergleich zum Vektor zeigte keinen signifikanten Veränderungen (Tab. 17).

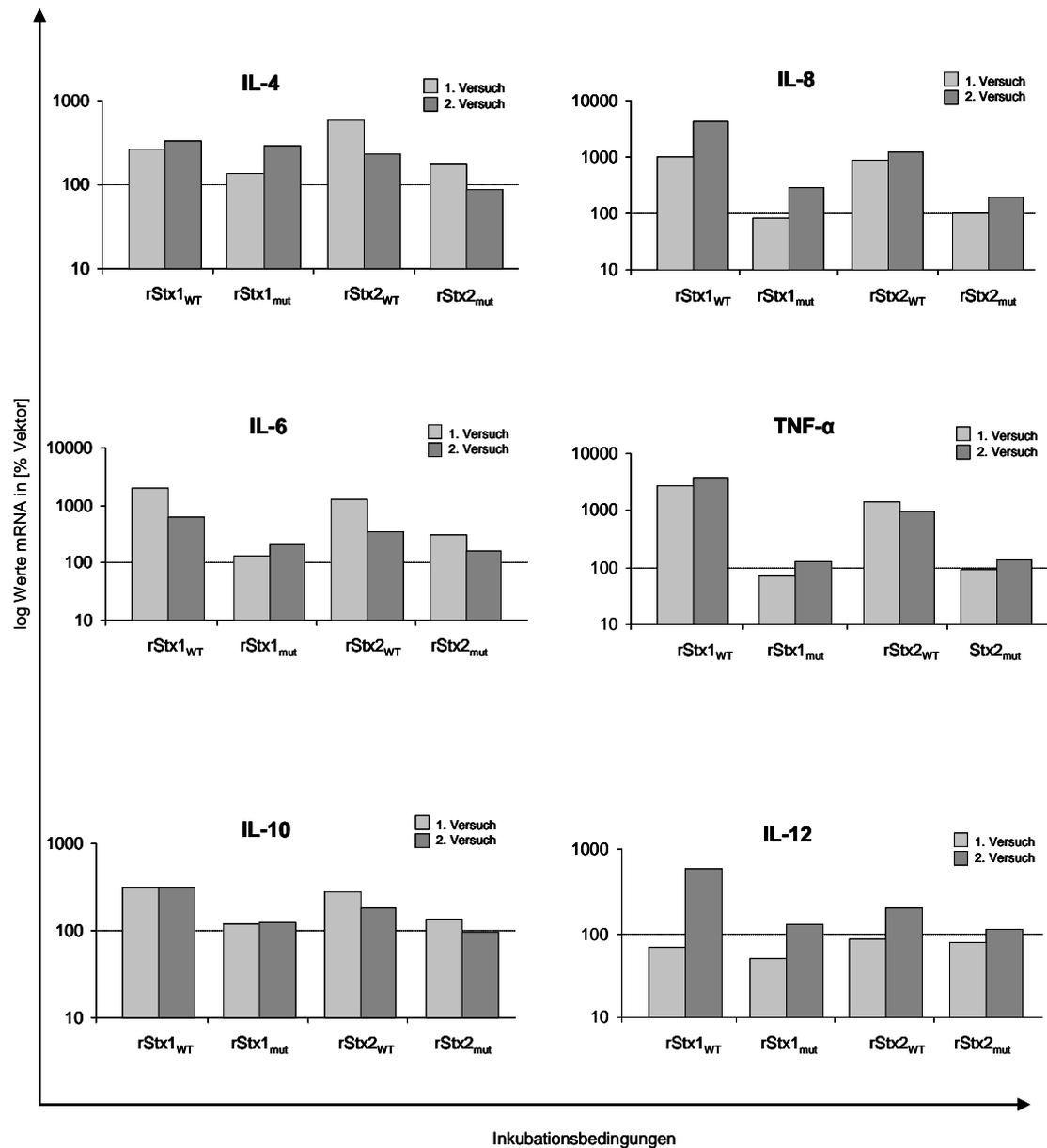


**Abb. 19: Expression (MFI) von CD77 auf Makrophagen nach Inkubation mit rStx1<sub>WT</sub> bzw. rStx2<sub>WT</sub> und rStx1<sub>mut</sub> bzw. rStx2<sub>mut</sub>**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung. Nach Normalisierung der Werte auf die Vektorkontrolle entspricht der Wert 1,0 (gestrichelte Linien) den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

### 5.3 Transkriptionsrate von verschiedenen Zytokinen/Chemokinen

Da bei dieser Analyse nur zwei Versuchsreihen durchgeführt werden konnten, wurde auf eine statistische Auswertung der Daten verzichtet. Bei TNF- $\alpha$  war ein deutlicher Unterschied zwischen den Inkubationsbedingungen erkennbar. Die Inkubation mit beiden Wildtyp-Toxinen führte im Vergleich zu den mutagenisierten Toxinen zu einer erhöhten Transkriptionsrate für TNF- $\alpha$  (Abb. 20).



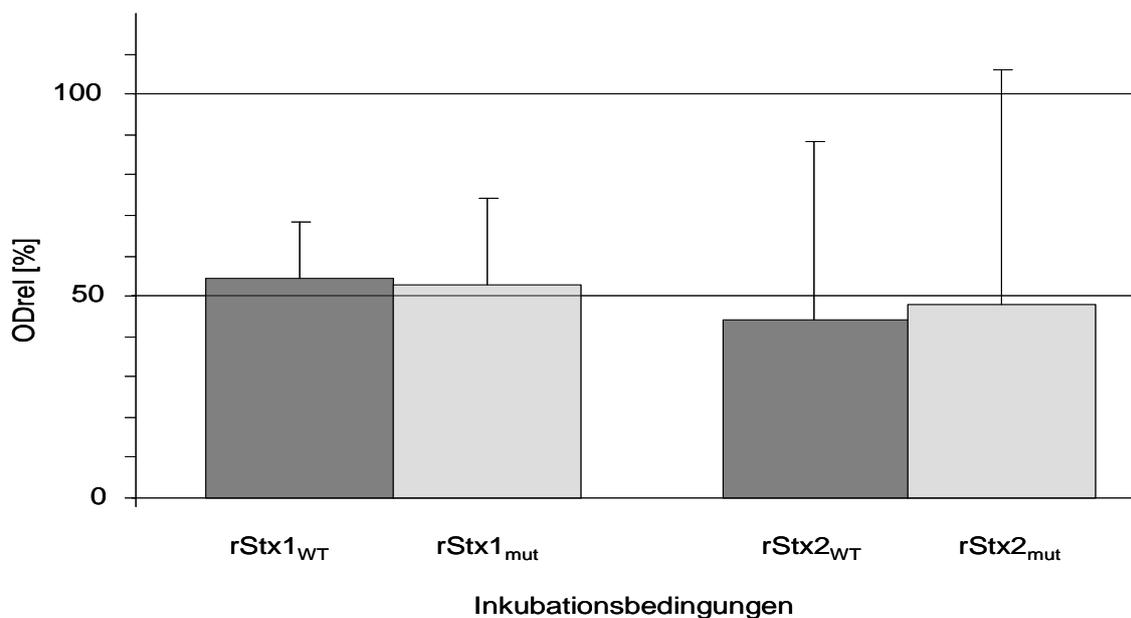
**Abb. 20: Vergleich der Transkriptionsraten in Makrophagen für ausgewählte Zytokine/Chemokine nach Inkubation mit den Toxinpräparationen im Vergleich zur Inkubation mit dem „Vektor“**

Dargestellt sind die logarithmierten Transkriptionsraten von zwei unabhängigen Versuchen, der Wert 100 (gestrichelte Linie) entspricht den Verhältnissen nach Inkubation mit dem „Vektor“.

## 6 Überprüfung der Antigenität von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub>

Die Untersuchung zur Reaktivität der Toxinpräparationen mit Ak gegen Stx1 und Stx2 wurde im ELISA mit Seren durchgeführt, die bereits von FRÖHLICH (44) analysiert wurden und deren Gehalt an Stx-spezifischen Ak (Ak-Titer) somit bekannt war. Bei der Analyse auf Ak gegenüber Stx1 wurden die Seren in einer Konzentration eingesetzt, bei der eine Reduktion der Bindung des Stx1 im ELISA um 50 % zu erwarten war (Ak-Titer im verdünnten Serum von 30). Die Seren für Stx2 wurden unverdünnt eingesetzt, da hier bereits ein Ak-Titer von 30 vorlag.

Im kompetitiven ELISA zeigte sich, dass die natürlich gebildeten Ak mit den jeweiligen rStx<sub>WT</sub> und mit den dazu gehörigen rStx<sub>mut</sub> in gleicher Weise reagierten. Es konnte eine Reduktion der spezifischen Bindung an den Fangantikörper des ELISAs um 50 % nachgewiesen werden (Abb. 21).



**Abb. 21: Reduktion der spezifischen Bindung im ELISA von rStx<sub>WT</sub> und rStx<sub>mut</sub> nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern (Stx1: n=19, Stx2: n=4)**

Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichung der ODrel in Prozent.

## VII Diskussion

Durch die immunmodulatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften, die die Shigatoxine (Stx) bei der STEC-Erstinfection naiver Kälber besitzen (103, 108), ist die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort gegen STEC-spezifische Antigene verzögert. Dies führt zu einer persistenten Besiedlung des Rindes mit STEC und zu einer Dauerausscheidung der Erreger. Für den unverzüglichen Aufbau einer protektiven Immunantwort nach natürlicher Infektion wäre bei Kälbern ein früher Schutz durch Stx-spezifische Antikörper (Ak) notwendig. Da maternale (kolostrale) Stx-spezifische Ak schnell abgebaut werden und Kälber selbst nach früher STEC-Infektion nur selten Stx-spezifische Ak innerhalb der ersten sechs Lebensmonate bilden (44), könnte in der Fleisch- und Milchrinderhaltung eine Impfung gegen Stx die Kolonisation der intestinalen Mukosa durch STEC begrenzen, die Ausscheidung reduzieren, die Zirkulation dieser Zoonoseerreger in den Beständen verlangsamen und damit den Infektionsdruck für den Menschen reduzieren. Zur Entwicklung eines geeigneten Impfantigens sollte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass im aktiven Zentrum gentechnisch veränderte Stx ihre Wirkung auf die verschiedenen Immunzellen des Rindes verloren haben und die einen Impferfolg möglicherweise beeinträchtigenden immunmodulierenden Eigenschaften der wildtypischen Stx nicht etwa bereits durch die Bindung der Toxine an die Zellen ausgelöst werden können.

### 1.1 Herstellung der Toxine und Toxoide

Die rekombinante Herstellung von Stx1, von Stx2 und von Mutanten beider Stx erfolgte ausgehend von der Amplifikation und Klonierung der *stx*-Gene aus dem EHEC-Referenzstamm EDL 933 in einem Expressionssystem bestehend aus einem pET 24b(+)-Vektor und einem BLR(DE3) *E. coli*. Dieses Expressionssystem wurde bereits erfolgreich zur rekombinanten Herstellung von Stx2e verwendet (62). Durch IPTG als Induktor lässt sich hierbei die Expression des Proteins steuern. IPTG soll durch eine Hemmung des *lacI*-Repressors und einer Freigabe des T7*lac*- und *lacUV5*-Promotors zu einer Expression des eingefügten Proteins führen (33, 150). Die für die Transkription benötigte T7-RNA-DNA-Polymerase ist in BLR(DE3)-Zellen vorhanden. Daher wurde der Vektor mit den Toxingenen für Stx1 und Stx2 in diese Zellen transformiert. Zunächst wurden Transformanten für wildtypisches Stx1 und Stx2 hergestellt. Durch die anschließende Verwendung von Primern

mit der gewählten Mutation (E167Q, R170L) konnten mutagenisierte Varianten der Toxine hergestellt werden. Diese Stellen der Sequenz wurden ausgewählt, da hier eine Mutation die zytotoxische Aktivität der Toxine für Verozellen deutlich verringert (63, 180). Eine Sequenzanalyse bestätigte, dass sich die rekombinanten und die mutagenisierten Toxine nur in den gewünschten Stellen unterschieden.

Auffallend war, dass Kulturen von BLR(DE3) *E. coli* nach der Transformation, unabhängig davon, ob die im Vektor enthaltenen Stx-Gene mutagenisiert waren oder nicht, ein stärkeres Wachstum ohne IPTG-Zugabe zeigten als in Anwesenheit von IPTG. Möglicherweise sind die exprimierten Toxine auch für den verwendeten BLR(DE3) toxisch. In der Literatur wird vereinzelt diskutiert, dass Stx ihre N-Glykosidase-Aktivität auch bei prokaryontischen Ribosomen ausüben könnten. Skinner und Jackson zeigten, dass es bei einer Überexpression von Stx zu einer verminderten Wachstumsrate von *E. coli* kommen kann, die Wachstumsrate von *E. coli* hingegen von einem mutagenisiertem Stx nicht verändert wird (144). Dass in den vorliegenden Untersuchungen sowohl bei den Wildtypen als auch bei den mutagenisierten Toxinen eine verringerte Wachstumsrate zu beobachten war, lässt einen anderen zugrunde liegenden Mechanismus vermuten. Dieses Phänomen konnte zuvor auch bei der rekombinanten Expression von mutagenisiertem Stx2e beobachtet werden (62). Zur Erzeugung einer möglichst hohen Ausbeute an spezifischem Protein wurden die Transformantenkulturen ohne IPTG-Zugabe für die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Präparationen der Wildtyp-Toxine und der mutagenisierten Toxine wurden auf ihre Toxizität hin im Verozell-ZT untersucht (78, 126, 132). Die untersuchten Wildtyp-Toxine zeigten die für Stx typischen zytopathischen Effekte, die mit zunehmender Verdünnung nachließen. Die mutagenisierten Toxine und der „Vektor“ lösten in der höchsten eingesetzten Verdünnung einen zytopathischen Effekt aus, der jedoch mit der nächsten Verdünnung verschwand. Dieser Effekt könnte auf die hohe Konzentration von Begleitsubstanzen aus der Aufarbeitung der Bakterienpellets zurückzuführen sein. Eine Reaktion von Verozellen auf LPS kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da nach einer LPS-Entfernung der Gehalt an LPS in den unverdünnten Proben bei  $\leq 5,1$  pg/ml lag. Weitere Bestandteile der Toxinpräparation wurden nicht untersucht. Daher könnten auch andere *E. coli*-Proteine für die beobachteten zytopathischen Effekte der Präparationen mutagenisierter Toxine und des „Vektors“ verantwortlich sein. Nach Einstellung der Präparationen auf 200 CD<sub>50</sub>/ml bzw. deren Äquivalente war kein zytopathischer Effekt bei Präparationen mutagenisierter Toxine mehr nachweisbar, während die Wildtyp-Toxine immer noch eine typische Reaktion auslösten.

Nach Angaben in der Literatur ist Stx1 in STEC-Kulturen überwiegend zellassoziiert zu finden, während Stx2 in den Kulturüberstand sezerniert wird (149). Deshalb wurden bei der Aufarbeitung der Bakterienpellets zunächst alle drei Fraktionen (Überstand, Periplasma, verbleibendes Pellet) getrennt gewonnen und auf vorhandenes Stx untersucht. Hier konnten Unterschiede in der Menge an Stx gefunden werden, die für die geplanten Untersuchungen von Bedeutung waren. So konnte tatsächlich deutlich mehr Stx1 zellassoziiert gefunden werden als Stx2, Stx2 war in größerer Menge im Überstand zu finden. Eine vergleichbare Menge der Toxine war im periplasmatischen Raum zu finden, während die mutagenisierten Toxine und auch der „Vektor“ in dieser Fraktion nur eine geringe unspezifische Toxizität im Verozell-ZT zeigten. Aus diesem Grund wurde die Periplasma-Fraktion für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt.

## 1.2 Wirkung der Toxine und Toxoide auf PBMC

### 1.2.1 Vergleich zwischen rekombinantem rStx1<sub>WT</sub> und aufgereinigtem Stx1 und mögliche Bedeutung der Befunde für den Verlauf der bovinen STEC-Infektion

Die Wirkung von aufgereinigtem Stx1 auf bovine PBMC ist bereits umfangreich untersucht worden. Stx1 löst eine verminderte Proliferation der CD8<sup>+</sup>-Zellen, einen Rückgang der Gb<sub>3</sub>/CD77-(Stx-Rezeptor-)Expression auf allen untersuchten Lymphozytenpopulationen aber keine Zunahme apoptotischer oder nekrotischer Zellen aus (107, 108). Von Ferens *et al.* wurden von BLV-infizierten Tieren PBMC gewonnen und mit Stx1 konfrontiert. Auch hier wurde die spontane Proliferation von Lymphozyten gehemmt und die Zahl der toten Zellen blieb konstant (38). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit rekombinantem rStx1<sub>WT</sub> als Bestandteil einer periplasmatischen Präparation vergleichbare Resultate erzielt werden können. Ein Rückgang der Expression von Gb<sub>3</sub>/CD77 war ebenso deutlich zu erkennen wie die verminderte Proliferation von CD8<sup>+</sup>-Zellen. Auch war keine Zunahme von nekrotischen oder apoptotischen Zellen zu ermitteln.

Außer der Entfernung des LPS wurde das rekombinant hergestellte rStx1<sub>WT</sub> nicht weiter gereinigt. Andere, eventuell noch vorhandenen Bestandteile der Präparation, hatten aber offensichtlich nur geringfügige Effekte auf die die Toxinwirkung.

Sowohl in Untersuchungen mit aufgereinigtem Toxin als auch in den vorliegenden Untersuchungen wurden die PBMC-Kulturen mit PHA-P stimuliert. Dieses T-Zell-Mitogen führt in der Kultur zu einer spezifischen Proliferation der T-Zellen, die durch Stx gehemmt wird (103). Trotz dieser eigentlich spezifischen T-Zell-Stimulation und der Beschränkung der

Stx-Wirkung auf aktivierte Lymphozyten konnte auch ein Effekt von rStx1<sub>WT</sub> auf die CD21<sup>+</sup>-B-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Menge *et al.* (108) konnte auch hier eine Abnahme der CD77-tragenden Zellen gesehen werden. Dies wirft die Frage auf, ob eventuell vorhandene unspezifische Bestandteile der Toxinpräparationen diese Reaktion der B-Zellen verursachen. Da in den vorliegenden Untersuchungen der LPS-Gehalt der Stx-Präparationen zwar deutlich reduziert, aber nicht vollständig entfernt wurde, könnte der Effekt auf verbliebenen Spuren von LPS beruhen. Während LPS als B-Zell-Mitogen bei der Maus eingesetzt werden kann, ist seine mitogene Wirkung auf bovine B-Zellen jedoch nur äußerst gering. Der Gehalt der Stx-Präparationen an weiteren Bestandteilen des Vektor-exprimierenden *E. coli* wurde nicht quantifiziert. Diese Bestandteile könnten jedoch zu den Unterschieden beigetragen haben.

Da unter den Bedingungen einer STEC-Infektion *in vivo* Immunzellen zusätzlich zu Stx einer Vielzahl von Stimuli ausgesetzt sind, kann eine Wirkung von Stx auf das B-Zell-Kompartiment der Immunantwort nicht ausgeschlossen werden. B-Zellen haben im Immunsystem verschiedene Aufgaben. Ihre vorrangige Aufgabe ist die Produktion von Ak, die zu einer Elimination von Krankheitserregern führt (140). Im Verlaufe einer Infektion und bei einer Reinfektion können B-Zellen aber auch als antigenpräsentierende Zellen (APCs) fungieren. Durch diese Funktion können sie T-Helfer-Zellen aktivieren und helfen zudem bei einer Reinfektion dem schnelleren Wiedererkennen und Eliminieren von Erregern (114). Wird eine Proliferation von B-Zellen durch Stx verhindert, wie hier gezeigt, kann dieser Mechanismus nicht mehr greifen. In der Tat lassen sich bei adulten Rindern zwar regelmäßig Ak gegen Stx1 nachweisen, Ak gegen Stx2 sind jedoch, trotz weiter Verbreitung von Stx2-bildenden STEC in den Beständen, nur selten und dann in niedrigen Titern nachweisbar. Selbst Monate nach dem Beginn einer Ausscheidung von STEC durch Kälber sind im Blut der Tiere nur selten und wenige Stx-spezifische Ak nachweisbar (44).

Das relative Unvermögen von infizierten Rindern, auf einige STEC-Antigene zeitnah immunologisch zu reagieren, scheint bei T-Zell-unabhängigen Antigenen wie O157-LPS weniger ausgeprägt zu sein als bei T-Zell-abhängigen Antigenen wie den Stx-Proteine (61). Dies wäre über eine Wirkung von Stx auf T-Helfer-Zellen erklärbar.

Bei den CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte in dieser Untersuchung in Anwesenheit von rStx1 ein leichter, nicht signifikanter Anstieg in Anwesenheit von rStx1<sub>WT</sub> festgestellt werden. CD4<sup>+</sup>-Zellen, die CD77 exprimierten, veränderten sich in der Anzahl jedoch nicht. Dies ist in Übereinstimmung mit Menge *et al.* zu sehen (108). Auch der unveränderte Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen deckt sich mit den Angaben der Literatur (108). Ob

andere Funktionen CD77-exprimierender boviner CD4<sup>+</sup>-Zellen von Stx beeinflusst werden, bleibt zunächst ungeklärt.

$\gamma\delta$ -T-Zellen machen beim Rind einen deutlich größeren Anteil der T-Zellen als beim Menschen aus (58). Die genaue Funktion dieser Zellen ist bisher nicht abschließend geklärt, es wird jedoch eine intensive Interaktion mit Epithelzellen vermutet (70). Die Reaktion von  $\gamma\delta$ -T-Zellen auf Stx ist bisher wenig beschrieben. Blessenohl konnte zeigen, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einem Rückgang der Expression von CD77 auf die Anwesenheit von Stx1 reagieren (12). In den vorliegenden Untersuchungen führte rStx1<sub>WT</sub> bei  $\gamma\delta$ -T Zellen zu einem signifikanten Rückgang der rezeptortragenden Zellen. Bezug nehmend auf die mögliche enge Verbindung mit Epithelzellen, könnte bei einer verminderten Anzahl der Zellen die mukosale Abwehr gehemmt werden und dadurch die verlängerte Verweildauer von STEC im Darm erklärt werden.

### 1.2.2 Vergleich zwischen rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub>

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals die Wirkung von Stx1 und Stx2 auf bovine Immunzellen systematisch verglichen. Die Reaktionen der Zellen auf rStx1<sub>WT</sub> und auf rStx2<sub>WT</sub> waren qualitativ ähnlich, die Reaktion auf rStx2<sub>WT</sub> fiel jedoch immer ein wenig schwächer aus. So reagierten CD77<sup>+</sup>(CD8<sup>+</sup>)-(n=6), CD77<sup>+</sup>-( $\gamma\delta$  T<sup>+</sup>) (n=5) und der Anteil an CD77<sup>+</sup>-Zellen (n=6) signifikant stärker auf rStx1<sub>WT</sub> als auf rStx2<sub>WT</sub>. Die Konzentrationen der eingesetzten rStx1<sub>WT</sub>- und rStx2<sub>WT</sub>-Präparationen wurden im Verozell-ZT annähernd auf eine CD<sub>50</sub>/ml von 200 eingestellt. Bei der Rücktitration der verwendeten Gebrauchsverdünnungen ergab sich jedoch ein geringer Unterschied in den CD<sub>50</sub>-Werten von rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> (157 CD<sub>50</sub>/ml bzw. 106 CD<sub>50</sub>/ml). Die Größenordnung der Unterschiede in der Wirkung der eingesetzten rStx1<sub>WT</sub>- und rStx2<sub>WT</sub>-Präparationen korreliert damit recht gut mit den Unterschieden in der biologischen Aktivität, wie sie mit Verozellen bestimmt wurde. Es wurde bereits eine Reihe von erheblichen Unterschieden in der biologischen Aktivität zwischen Stx1 und Stx2 in verschiedenen Tierarten und Modellsystemen beschrieben. Stx2 löst bei bovinen PBMC dagegen qualitativ und quantitativ vergleichbare Effekte wie Stx1 (108) und wie gereinigtes Stx2 aus (Menge & Dean-Nystrom, 2004, unveröffentlicht). Hoffman *et al.* (61) konnten eine immunmodulatorische Wirkung von Stx2 auch schon *in vivo* nachweisen. Unterschiede in der Virulenz von EHEC-Stämmen für den Menschen werden mit dem von den Stämmen exprimierten Stx-Typ in Verbindung gebracht (43). Stx1- und Stx2-bildende STEC werden von Rindern unterschiedlicher Altersstufen mit unterschiedlicher Häufigkeit ausgeschieden (44). Der Nachweis einer vergleichbaren Wirkung von Stx1 und

Stx2 auf das bovine Immunsystem unterstreicht, dass prophylaktische Maßnahmen, die die STEC-Ausscheidung beim Rind begrenzen sollen, trotzdem gegen beide Toxine gerichtet sein müssen.

### 1.2.3 Vergleich der Wildtypen mit den mutagenisierten Toxinen

Beim Vergleich der Vitalität der Zellen fällt auf, dass ein Anstieg der nekrotischen Zellen nur in den absoluten Zahlen nach Inkubation mit den Wildtypen nachzuweisen war. Nach Normalisierung auf den „Vektor“ waren diese Anstiege jedoch nicht mehr zu erkennen. In der Literatur wird mehrfach die Auslösung von Apoptose durch Stx beschrieben (20, 22, 25, 47). Betrachtet man die mutagenisierten Toxine, fällt hier das Ausbleiben der Apoptose auf. Apoptose wird bei Stx durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst, u. a. durch die ribosomale Aktivität des Toxins (22). Da die mutagenisierten Toxine keine Apoptose auslösen, kann davon ausgegangen werden, dass hier die ribosomale Aktivität durch die gezielte Mutation im *stxA*-Gen analog zur Literatur (63, 180) tatsächlich unterbunden wurde.

Betrachtet man nun die Anteile an CD77<sup>+</sup>-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen, fällt auf, dass bei der Inkubation der Zellen mit den Wildtypen der Anteil an CD77<sup>+</sup>-Zellen signifikant vermindert war. Dies war bei der Inkubation mit den mutagenisierten Toxinen nicht der Fall. Auch die Zusammensetzung der Zellen änderte sich in Anwesenheit der Wildtypen: Während sowohl bei rStx1<sub>WT</sub> als auch bei rStx2<sub>WT</sub> die Anteile an CD8<sup>+</sup>-, CD21<sup>+</sup>- und  $\gamma\delta$  T<sup>+</sup>-Zellen reduziert waren, blieben diese in Anwesenheit von rStx1<sub>mut</sub> und rStx2<sub>mut</sub> im Vergleich zum „Vektor“ unverändert. Dies deutet darauf hin, dass hier die Proliferation der Zellen durch die mutagenisierten Toxine nicht beeinflusst wurde. Die Reaktion der CD4<sup>+</sup>-Zellen stellte sich etwas anders dar. Hier war eine Zunahme der CD4<sup>+</sup>-Zellen in Anwesenheit der Wildtypen zu erkennen, während sich der Anteil in Anwesenheit der mutagenisierten Toxine im Vergleich zum Vektor nicht veränderte. Dies könnte mit der Veränderung in der Zellzusammensetzung zu erklären sein. Während CD8<sup>+</sup>-Zellen stark durch Stx beeinflusst werden, ist der Einfluss von Stx auf CD4<sup>+</sup>-Zellen gering (108). Durch die Verringerung des Anteils an CD8<sup>+</sup>-Zellen und die konstante Zahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen steigt der Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen scheinbar an. In Anwesenheit der mutagenisierten Toxine zeigen die Zellen keine Veränderung in der Zellzusammensetzung.

### 1.3 Wirkung der Toxine und Toxoide auf intraepitheliale Lymphozyten des Ileums

#### 1.3.1 Vergleich der Wirkungen der Wildtyp-Toxine

Ileale intraepitheliale Lymphozyten sind die ersten Immunzellen, die mit Stx in Kontakt treten. Frühere Studien konnten zeigen, dass iIEL mit einem spezifischen Muster auf die Stimulation mit Stx1 reagieren. Während IL-4 als Reaktion auf Stx1 verstärkt transkribiert wird, werden andere Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-10) unverändert exprimiert (111). In den vorliegenden Untersuchungen konnte die Überexpression von IL-4 durch rekombinant hergestelltes Stx1 ausgelöst werden. Es konnte auch erstmals gezeigt werden, dass die Transkription von IL-4 in iIEL durch Stx2 hoch reguliert wird. Der Induktionsmechanismus von IL-4 ist bisher nicht vollständig geklärt. Bei bovinen PBMC unterdrückt Stx2 die Zahl IFN- $\gamma$ -bildender Zellen (Menge unveröff.). Diese Unterdrückung könnte eine reaktive Übertranskription von IL-4 durch andere T-Zellen in den Kulturen zur Folge haben. Jedoch kann bei bovinen PBMC - anders als bei iIEL - weder auf Proteinebene noch auf mRNA-Ebene ein Anstieg von IL-4 nachgewiesen werden (Menge unveröff.). Möglicherweise beruht die Hochregulation der IL-4-Expression in iIEL durch Stx auf einem direkten Effekt der Toxine. So konnte in THP-1-Zellen eine verstärkte Induktion von TNF- $\alpha$  nach Inkubation mit Stx1 nachgewiesen werden (57). Dieser Effekt wurde in Verbindung mit einer *ribotoxix stress response* gebracht und wird damit durch eine direkte Wirkung der Toxine auf die Ribosomen der Zytokin-bildenden Zelle verursacht.

#### 1.3.2 Vergleich zwischen Wildtyp-Toxinen und mutagenisierten Toxinen

Im Gegensatz zu den Wildtyp-Toxinen war bei den mutagenisierten Toxinen keine Erhöhung in der Transkription von IL-4 zu erkennen, was für eine normale Abwehrreaktion der Zellen spricht. Dieses Ergebnis konnte bereits in einer humanen Zelllinie (Caco-2) gezeigt werden. Hier konnte nach Inkubation mit einem mutagenisierten Toxin keine Erhöhung der Transkriptionsraten von verschiedenen Zytokinen nachgewiesen werden (179).

Neben der Induktion einer *ribotoxix stress response* wäre auch denkbar, dass eine Kreuzvernetzung von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf der Zelloberfläche zu einer Erhöhung der Transkription bestimmter Gene führt. In einer Studie wurden bovine iIEL mit Stx1, mit Stx1B und mit einem Antikörper gegen Gb<sub>3</sub>/CD77 für 4 h inkubiert. Nur bei Stx1 konnte eine Erhöhung der Transkriptionsrate gemessen werden. Weder eine Bindung von Stx1B noch des Antikörpers konnten eine verstärkte *il-4*-Transkription auslösen (111). In Verbindung mit den hier

vorgestellten Ergebnissen mit mutagenisierten Toxinen spricht alles dafür, dass für die Erhöhung der Transkriptionsrate von IL-4 ein intaktes aktives Zentrum in der A-Untereinheit vorhanden sein muss und der Mechanismus dieser Toxinwirkung ebenfalls die Inaktivierung von Ribosomen einschließt.

#### **1.4 Wirkung der Toxine und Toxoide auf Makrophagen**

Um primäre Makrophagen aus Rinder-PBMC zu erhalten, wurde ein Protokoll von Adler (3) modifiziert und erfolgreich etabliert (Loos, Dissertation im Abschluss). Über eine Aufkonzentration der mononukleären Zellen konnte die Ausbeute an Monozyten deutlich erhöht werden. Gelegentlich kam es zu Kontaminationen der Kulturen mit Trypanosomen, einem Blutparasiten, der bei Rindern häufig vorkommt. Die so kontaminierten Kulturen konnten nicht verwendet werden. Durch den Einsatz von Amphotericin B in einer subletalen Konzentration für Zellen (90) konnte die Vermehrung von Trypanosomen in den Kulturen verhindert und somit die Kulturverluste minimiert werden.

##### **1.4.1 Vergleich der Wirkungen der Wildtyp-Toxine**

Die Wirkung von Stx auf Makrophagen ist in verschiedenen Studien beschrieben, jedoch sind hier vor allem Zelllinien wie THP-1 untersucht worden (40, 56, 57). Untersuchungen an primären Makrophagen vom Menschen (20, 26, 49, 133, 170) bilden die Ausnahme. Untersuchungen von bovinen primären Makrophagen und den Reaktionen, die durch Stx ausgelöst werden könnten, wurden bisher nur vereinzelt durchgeführt. In Kulturen primärer Kolonzellen traten regelmäßig Zellen nicht-epithelialen Ursprungs auf, die besonders sensitiv für gereinigtes Stx1 waren und Eigenschaften von Makrophagen aufwiesen (110). Diese vermutlich Mukosamakrophagen darstellenden Zellen, die im Bereich der Krypten innerhalb der *lamina propria* durch eine starke CD77-Expression auffallen (147), exprimierten neben MHC I auch den Monozyten-/Makrophagen-Marker CD14 sowie das auf myeloiden und dendritischen Zellen vorkommende CD172a. Unter Einwirkung von Stx1 kam es zu einer Umverteilung des CD77-Rezeptors von der Zelloberfläche in intrazelluläre Kompartimente. In einer ersten Studie zum Einfluss von gereinigtem Stx1 auf bovine, von Monozyten des Blutes abgeleiteten Makrophagen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD14, CD77, CD80 und CD86 im Vergleich zu unbehandelten Zellen durch das Toxin vermindert wird (Loos, Dissertation im Abschluss). In den vorliegenden Untersuchungen konnte ein Effekt von LPS-reduzierten Bakterien-Präparationen auf die Expression von CD14, nicht aber auf die Expression von CD80, CD86 oder CD77 nachgewiesen werden.

Auch bei primären murinen DC führte die Inkubation mit Stx1 nicht zu einer Veränderung in der Ausprägung von CD80 und CD86 (125). Da die hier verwendeten Zellen keine DC und zudem noch bovinen Ursprungs waren, ist dieser Vergleich jedoch vorsichtig zu interpretieren.

THP-1-Zellen reagieren auf Stx1 mit der Produktion von unterschiedlichen Zytokinen, insbesondere von TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-1 $\beta$  (39, 56). Immortalisierte bovine Mukosamakrophagen reagieren auf LPS-Stimulation mit einer erhöhten *il-12*-Transkription (110). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von LPS und Stx1 synthetisierten sie jedoch vermehrt *il-10*-mRNA. Außerdem induzierte Stx1 die Transkription der Chemokingene *il-8*, *gro- $\alpha$* , *mcp-1* und *rantes*, die sich bei gleichzeitiger Einwirkung von LPS bis zum 6-fachen steigern ließ. In Kulturen boviner, Monozyten-abgeleiteter Makrophagen führt die Inkubation mit gereinigtem Stx1 zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Transkripte für die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie für die Chemokine IL-8 und GRO- $\alpha$  (Loos, Dissertation im Abschluss). Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten nur zwei unabhängige Versuche zur Zytokinbestimmung durchgeführt werden. Jedoch war die Tendenz zu erkennen, dass die Anwesenheit von rStx1<sub>WT</sub> in bovinen Makrophagen zu einer Zunahme der Transkriptionsrate von TNF- $\alpha$  im Vergleich zu den mutagenisierten Toxinen führt. Bei den anderen untersuchten Zytokinen konnte eine Tendenz zu einer Erhöhung in den Transkriptionsraten von IL-8 und IL-10 beobachtet werden.

Sowohl bei verschiedenen humanen als auch bei murinen Zellen konnte nach Inkubation mit Stx1 Apoptose nachgewiesen werden (73, 22). Auch in der humanen Zelllinie THP-1 war dies möglich (55). In den vorliegenden Ergebnissen konnte dieser Effekt bei rStx1<sub>WT</sub> nicht gezeigt werden. Es konnte statt dessen eine leichte, aber signifikante Abnahme der apoptotischen Zellen ermittelt werden. Dies steht in Diskrepanz zu den Untersuchungen von Loos (Loos, Dissertation im Abschluss), die eine Abnahme von vitalen Zellen nach Inkubation mit Stx1 ermitteln konnte. Die Ursache für diesen Unterschied ist unklar, könnte aber, wie oben bereits diskutiert, auf die Unterschiede der verwendeten Toxinpräparationen zurück zu führen sein, da Loos gereinigtes Toxin verwendet hat.

Die Wirkung von rStx2<sub>WT</sub> auf bovine Makrophagen ist vergleichbar mit der von rStx1<sub>WT</sub>. Auch hier konnte eine Abnahme der apoptotischen Zellen ermittelt werden, diese war jedoch nicht signifikant. Auch bei rStx2<sub>WT</sub> konnten keine Veränderungen in der Expression von CD80/86 gesehen werden. Die Expression von CD14 verringerte sich in Anwesenheit von rStx2<sub>WT</sub> ebenfalls wie in Anwesenheit von rStx1<sub>WT</sub>, jedoch war der Abfall hier nicht signifikant.

In einer Studie mit peritonealen Makrophagen der Maus konnte gezeigt werden, dass diese mit einer erhöhten Transkriptionsrate für TNF- $\alpha$  auf Stx2 reagieren (158). Aufgrund der zentralen Bedeutung von Makrophagen für die Immunantwort im Allgemeinen und die besondere Bedeutung in der Pathogenese des HUS des Menschen im Besonderen bedarf die Frage nach einer möglichen Wirkung von Stx auf Makrophagen und/oder DC des Rindes dringend der weiteren Bearbeitung.

#### **1.4.2 Vergleich zwischen Wildtypen und mutagenisierten Toxinen**

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 weder durch Wildtyp-Toxine noch durch die mutagenisierten Toxine beeinflusst wurde. In einer Studie mit primären murinen DC wurde die Expression von CD86 durch eine Stx1-Mutante erhöht (125). Auch nach intranasaler Gabe der Stx1-Mutante an Mäuse konnte in nasolarynealen DCs eine Erhöhung der Expression von CD80/CD86 nachgewiesen werden (124). Die Stx-Mutanten in diesen Studien entsprachen denen, die in den vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden. Die Unterschiede zwischen den Studien könnten auf die unterschiedlichen Tierarten zurückzuführen sein oder auch im Unterschied zwischen der *in vitro* Konfrontation und der *in vivo* Applikation begründet sein.

In Anwesenheit der mutagenisierten Toxine konnte keine Verringerung der CD14-Expression nachgewiesen werden, dies spricht dafür, dass für diese Reaktion eine aktive A-Untereinheit vorhanden sein muss.

Die Zytokinantwort der Makrophagen in Anwesenheit der mutagenisierten Toxine ist zu vergleichen mit der Reaktion der Zellen auf den „Vektor“, auf eine statistische Analyse wurde aufgrund von nur zwei unabhängigen Versuchen verzichtet.

### **1.5 Antigenität und Immunogenität der Toxine und Toxoide**

Die Untersuchungen auf Antigenität wurden mit Seren durchgeführt, die von natürlich infizierten Rindern stammten und deren Titer gegen Stx1 und Stx2 bekannt waren (44). Um sicherzustellen, dass natürlich gebildete Ak sowohl die rekombinant hergestellten Wildtyp-Toxine als auch die mutagenisierten Toxine erkennen, wurden die Toxine mit den Seren inkubiert und anschließend im ELISA überprüft, inwieweit die Bindung der Toxine an die Fangantikörper reduziert war. Hierbei zeigte sich eine annähernd gleiche Reduktion der Bindung der rekombinanten und der mutagenisierten Toxine. Das spricht dafür, dass bei den

mutagenisierten Toxinen die Strukturen wichtiger Epitope gegenüber den wildtypischen Toxinen nicht verändert sind.

Um inaktivierte Stx als Impfstoff einzusetzen, muss die Immunogenität erhalten bleiben. Die chemische Inaktivierung von Stx2e mit Formaldehyd zerstört zwar die Zytotoxizität für Zellkulturen. Die Applikation eines Formalin-inaktivierten Toxoid-Impfstoffes beeinflusst jedoch nicht den Krankheitsverlauf nach Belastung (52). Die Inaktivierung von Stx2e mithilfe des Austausches einer Aminosäure im aktiven Zentrum der A-Untereinheit wurde bereits erfolgreich durchgeführt und führte in einem Ferkelmodell zur Entwicklung von neutralisierenden Ak (52). Ebenso konnte in einem Mausmodell die Überlebensrate der Mäuse nach einer Stx1-Belastung auf 100 % erhöht werden, wenn sie mit einem mutagenisierten Stx1 (E167Q, R170L) immunisiert wurden (68). Die Beobachtung, dass sowohl bei Schweinen und auch bei Mäusen durch die Impfung mit mutagenisierten Toxinen protektive Ak induziert werden können, spricht für die prinzipielle Immunogenität der Toxoide. Dieses ist im Rind als Nächstes zu prüfen. Dies gilt besonders vor dem Hintergrund, dass bislang noch unklar ist, ob die schlechte Ausbildung einer anti-toxischen Antwort beim Rind nach natürlicher STEC-Infektion (45) auf einer aktiven Immunsuppression durch Stx beruht oder durch die geringe Immunogenität der Toxine bedingt ist. Letztere könnte auch mit der strukturellen Ähnlichkeit von Stx mit dem bovinen Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) in Verbindung stehen und damit Resultat einer zentralen immunologischen Toleranz sein. Erste eigene Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass durch die Applikation i. m. der hier generierten Toxoide in Verbindung mit Aluminiumhydroxid an Rinder sowohl Stx1- als auch Stx2-spezifische Serumantikörper induziert werden können (Kerner, Menge; unveröffentlicht).

## 1.6 Möglicher Einsatz der Shigatoxoide für Impfungen in Rinderbeständen

### 1.6.1 Biologische Sicherheit des Impfstoffes

Die isolierte B-Untereinheit von Stx1 hat keine Wirkung auf bovine iIEL (111). Stamm *et al.* konnten aber zeigen, dass die Bindung einer rekombinanten B-Untereinheit (rStxB1) an Gb<sub>3</sub>/CD77 eine Toxin-ähnliche Wirkung auslöst, wie eine Suppression der Lymphozytenproliferation (148). Die vielfältigen Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass immunmodulatorische Wirkungen mit den mutagenisierten Shigatoxoiden *in vitro* nicht ausgelöst werden konnten. Damit ist indirekt auch deutlich geworden, dass die

Wirkungen der Wildtyp-Toxine auf Immunzellen des Rindes auf ihrer enzymatischen Aktivität beruhen und nicht bereits durch die Bindung und Kreuzvernetzung von Gb<sub>3</sub>/CD77 ausgelöst werden können.

Der Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) zeigt in seinen extrazellulären Anteilen potenzielle Gb<sub>3</sub>-Bindungsstellen, die möglicherweise zu Bindungsstellen der B-Untereinheiten strukturverwandt sind (95). Bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Stx ist deshalb Sorge zu tragen, dass die Impfung keine Autoantikörper induziert, die sich gegen den IFNAR richten. Welche Gefährdung von durch Impfung induzierten Autoantikörpern ausgeht, zeigt die in den letzten Jahren neu aufgetretene bovine neonatale Panleukozytopenie. Hierbei werden über das Kolostrum von gegen BVDV geimpften Kühen anti-leukozytäre Ak auf das Kalb übertragen, die bei dem Kalb zu profunden Blutungen und einer Knochenmarksdepletion führen (17). Anti-Stx1 sind in Rinderbeständen allerdings weit verbreitet. Auch anti-Stx2 sind prinzipiell nachweisbar. Die Bindung an Gb<sub>3</sub>/CD77 ist für beide Toxine sehr spezifisch (115). Die Wahrscheinlichkeit durch eine Impfung gegen Stx Autoantikörper zu induzieren ist deshalb als gering einzustufen. Der Möglichkeit sollte jedoch bei der weiteren Entwicklung besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

### 1.6.2 Mögliche Wirksamkeit des Impfstoffes

Mutagenisierte Stx wurden bereits erfolgreich zur Immunisierung von Schweinen als Schutz gegen die klinischen Erscheinungen der Stx2e-bedingten Ödemkrankheit eingesetzt. Die Überlegung, ein mutagenisiertes Toxin als Impfantigen gegen STEC einzusetzen, ist für den Einsatz beim Rind neu. Bei dieser Tierart soll durch die Impfung die Persistenz des Erregers verhindert werden. Bisherige Versuche, Proteine des Typ III-Sekretionssystems als Impfantigene gegen STEC beim Rind einzusetzen, konnten zwar unter experimentellen Bedingungen die Ausscheidung eines homologen STEC-Stammes reduzieren, haben unter Feldbedingungen bei der Vielfalt der innerhalb einer Herde zirkulierenden STEC (45) jedoch nicht den erhofften Erfolg gebracht (134). Bei der Entwicklung dieser Impfstoffe wurde vor allem auf die Blockade der adhäsiven Eigenschaften der STEC abgezielt. Dabei wurde nicht beachtet, dass die Stx einerseits trotz weitgehenden Fehlens klinischer Symptome nach STEC-Infektion von Rindern (Kälbern) eine Bedeutung als (immunmodulierender) Virulenzfaktor haben. Andererseits stellen Stx den einzigen Virulenzfaktor dar, den alle STEC-Stämme gemeinsam haben. Ein auf Shigatoxinen basierender oder die Toxoide

einschließender Impfstoff lässt deshalb eine breite Kreuzprotektion erwarten, die den derzeit experimentell oder kommerziell verfügbaren Impfstoffen fehlt.

Eine Impfung gegen enteral persistierende Zoonoseerreger wird auch im Hinblick auf andere Erreger entwickelt, besonders gegen Salmonellen und *Campylobacter*. Beide Erreger sind in Nutzgeflügelbeständen weit verbreitet, führen im Tier selbst zu keinen akuten Krankheitsgeschehen.

Für einen protektiven Salmonellenimpfstoff ist sowohl die Induktion von Ak als auch die von reaktiven T-Zellen unerlässlich. In Hühnerbeständen werden inaktivierte Ganzzelllysate in Kombination mit starken Adjuvanzen verwendet. Diese Mischung induziert bei Hühnern eine protektive Immunantwort. Trotz der Erforschung von anderen Impfstoffkandidaten ist dies zurzeit das Mittel der Wahl in Hühnerbeständen. In mit Salmonellen befallenen Rinderbeständen führt dieser Impfstoff jedoch nur zur Induktion von Ak. Eine T-Zell-Immunität wird nicht induziert, was zu mäßiger Protektivität der Impfung führt. Der Einsatz von Salmonellen-LPS, Oberflächenantigenen oder gar Zellextrakten als Impfstoff blieb bisher erfolglos. An dem Einsatz von mutagenisierten Salmonellenstämmen, die mit einer Deletion eines bestimmten Virulenzfaktors als Lebendimpfstoff verwendet werden sollen, wird zurzeit intensiv geforscht (98).

In der EU sind bis zu 90 % der Hühnerbestände mit *C. jejuni* infiziert. *C. jejuni* induziert beim Huhn keine Entzündungsreaktion. Trotzdem können Ak nachgewiesen werden, wenn auch die Bildung dieser Ak sehr langsam vorangeht. Bei infizierten Menschen finden sich im Gegensatz dazu sehr schnell hohe Ak-Titer. Als Impfstoff bei Tieren werden zurzeit, ähnlich wie bei den Salmonellen, inaktivierte Ganzzelllysate mit oder ohne Adjuvanz eingesetzt, jedoch nur mit mäßigen Resultaten. Untersuchungen zum Einsatz von Flagellin zeigen vielversprechende Resultate. Die Induktion von protektiven Ak konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch wird die Kolonisation des Darms verhindert. Unterschiedliche *Campylobacter*stämme besitzen allerdings unterschiedliche Flagellinstrukturen, sodass es nicht zu einer Kreuzreaktivität kommt (27).

Anhand dieser Beispiele zeigt sich die Schwierigkeit, im tierischen Reservoir persistierende Zoonoseerreger mit einer Impfung zu bekämpfen.

Die durch eine Impfung mit Shigatoxoiden induzierten Ak müssen Stx neutralisieren können. Durch die unveränderte B-Untereinheit sollten Ak induziert werden können, die die Bindung von Stx an Gb<sub>3</sub>/CD77 verhindern. Neutralisierende Ak sind bei natürlich infizierten

Rindern sowohl im Kolostrum als auch im Serum vorhanden. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Ak gegen Stx1, weniger gegen Stx2 (45, 69, 132). Die Ak sind vor allem gegen die A-Untereinheit gerichtet. In Impfversuchen wurden bisher sowohl die B-Untereinheit (96, 97, 166) als auch die A-Untereinheit (89) eingesetzt. Hierbei konnten auch Ak gegen die jeweilige Untereinheit induziert werden und diese waren auch wirksam gegen eine Belastung mit Stx. Es konnte keine Kreuzprotektivität zwischen Stx1 und Stx2 induziert werden. Auch die Kombination einer nativen B-Untereinheit von Stx1 und einer nicht-toxischen A-Untereinheit von Stx2 konnte Ak induzieren. Dabei konnten Ak gegen Stx1 und Stx2 nachgewiesen werden (145). Diese letzte Studie zeigt, dass eine nicht-toxische Variante von Stx als Impfstoff grundsätzlich geeignet ist. Der Einsatz von nicht-toxischen Varianten sowohl von Stx1 und Stx2 könnte Ak induzieren, die beide Toxine effektiv neutralisieren können. Solche Versuche wurden bisher nur mit Mäusen und Kaninchen durchgeführt. Impfstudien an Rindern fehlen bisher. Bereits Gordon *et al.* konnten aber zeigen, dass mit der Applikation eines Stx2e, das an den gleichen Stellen wie die in dieser Studie entwickelten Toxoide mutagenisiert wurde, der Verlauf der Ödemkrankheit bei experimentell infizierten Schweinen positiv beeinflusst wird (15, 52).

Der einzusetzende Impfstoff müsste Serum-Ak induzieren. Eine starke Induktion von mukosalen Ak ist möglicherweise nicht notwendig, da Stx zwar im Darmlumen freigesetzt wird, die immunmodulatorische Wirkung der Stx aber eine Aufnahme des Toxins durch die Darmschranke erfordert. Erst danach kann Stx an iIEL und andere Immunzellen andocken und seine Wirkung entfalten. Systemisch vorhandene Ak könnten hier effektiv wirken.

Die Applikation des Impfstoffs könnte parenteral erfolgen. Bei Schweinen führt die intramuskuläre Applikation einer nicht-toxischen Variante von Stx2e zu einer protektiven Immunantwort (52). Ähnliches konnte für Intimin in einem Schweineversuch gezeigt werden. Hierbei wurden trächtige Sauen mit Intimin geimpft und Kolostrum-Ak induziert. Die Ferkel dieser Sauen waren vor der Kolonisation mit EHEC geschützt (29). Als Alternative wäre eine intranasale Applikation zu überdenken. Die intranasale Applikation von Stx2B-Untereinheit oder einer nicht-toxischen Variante von Stx1 führt sowohl zu Serum- als auch zu mukosalen Ak (124, 166), die einen neutralisierenden Effekt zeigten.

Die Überprüfung der rStx<sub>mut</sub> als mögliche Impfstoffkandidaten erfordert eine Impfstudie. Zum Nachweis der Immunogenität müssen Kälber mit einem negativen Stx-Titer und ohne nachweisbare STEC-Ausscheidung verwendet werden. Diese wären in zwei Gruppen zu unterteilen, Kontrolle und Impfgruppe. Die Impftiere bekämen eine adäquate Dosis der rStx<sub>mut</sub> versetzt mit einem Adjuvanz appliziert, die Kontrolltiere nur Adjuvanz. Zum

Nachweis der Wirksamkeit des Impfstoffes wären Kälber, die bereits STEC im Kot ausscheiden, in einer weiteren Gruppe zu impfen. Hierbei wäre vor allem auf die Induktion von Ak und die Ausscheidung von STEC zu achten. Wichtig in diesem Zusammenhang ist hier zu wissen, dass in klinisch unauffälligen Herden die Möglichkeit besteht, bestimmte STEC-Klone sehr lange nachzuweisen (51), dies wäre bei der Probennahme und Überwachung zu berücksichtigen. Auch unterschiedliche Klone sind in einzelnen Herden zu finden (44), hier wäre das Monitoring der geimpften Tiere dahingehend anzupassen, dass auch festgestellt werden kann, ob ein Übertrag einzelner Klone auf andere Tiere verhindert werden kann.

## **1.7 Schlussfolgerung**

Im Hinblick auf die biologische Sicherheit eines auf genetisch erzeugten Shigatoxiden basierenden Impfstoffes war es ein zentrales Anliegen dieser Arbeit zu untersuchen, ob durch die Mutagenisierung alle bislang beschriebenen Wirkungen der Wildtyp-Toxine auf die verschiedenen Immunzellen des Rindes aufgehoben werden können. Die vielfältigen Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass immunmodulatorische Wirkungen mit den Shigatoxiden *in vitro* nicht ausgelöst werden konnten. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Applikation i. m. der hier generierten Toxoide an Rinder sowohl Stx1- als auch Stx2-spezifische Serumantikörper induziert werden können. Die generierten Toxide stehen damit für weitere Studien zum Nachweis der Immungenität, Unschädlichkeit und Wirksamkeit zur Verfügung. Da Stx nicht nur eine Bedeutung als Virulenzfaktor bei der persistierenden Infektion von Rindern mit STEC besitzen, sondern auch allen STEC-Stämmen gemeinsam sind, lässt der Einsatz von Shigatoxiden als Impfstoff, gegebenenfalls in Kombination mit weiteren STEC-Virulenzfaktoren, erwarten, dass die Erregerausscheidung in Rinderherden verringert und so das Infektionsrisiko für den Menschen vermindert wird.

## VIII Zusammenfassung

Shigatoxin-(Stx-)bildende *E. coli* (STEC) stellen ein Pathovar von *Escherichia coli* dar, das durch die Produktion potenter Zytotoxine gekennzeichnet ist. Stx-bildende, enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) verursachen beim Menschen Erkrankungen mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS). Rinder sind weltweit das Reservoir für STEC. Sie infizieren sich schon im Kälberalter durch geringste Infektionsdosen. Der initialen Vermehrung im Darm folgt monatelanges Ausscheidertum. Die Persistenz der Infektion wird durch die Bildung des Stx begünstigt. So bindet das Toxin an Rezeptoren, die von Lymphozyten, vor allem von intraepithelialen Lymphozyten in der Darmschleimhaut des Rindes, exprimiert werden, und supprimiert das bovine Immunsystem. Da Kälbern bei der Erstinfektion mit STEC Stx-spezifische Antikörper fehlen, könnte eine Impfung mit Stx die persistierende STEC-Infektion verhindern. Ziel der Studie war es deshalb, durch zwei Punktmutationen im *stxA*-Gen rekombinante Shigatoxoide (rStx<sub>mut</sub>) zu erzeugen und ihre immunmodulatorischen und antigenetischen Eigenschaften in Vergleich zu rekombinanten Wildtyp-Stx (rStx<sub>WT</sub>) zu beurteilen. Als Testsysteme wurden primäre Immunzellen vom Rind verwendet. Bei der Untersuchung von ilealen intraepithelialen Lymphozyten induzierten rStx1<sub>WT</sub> und rStx2<sub>WT</sub> einen signifikanten Anstieg der Menge an IL-4 mRNA. Sowohl rStx1<sub>WT</sub> als auch rStx2<sub>WT</sub> führten bei verschiedenen Arten von B- und T-Zellen aus dem peripheren Blut zu einer Verminderung der oberflächlichen Expression des Stx-Rezeptors CD77. Auf bovinen CD77<sup>+</sup>-Makrophagen reduzierte die Anwesenheit von rStx1<sub>WT</sub> oder rStx2<sub>WT</sub> die Expression des CD14-Antigens. Die Toxoide rStx1<sub>mut</sub> und rStx2<sub>mut</sub> lösten dagegen in vergleichbaren Konzentrationen keinen dieser Effekte aus. Die Bindung der Varianten wurde in einem kompetitiven ELISA durch bovine Seren mit Antikörpern gegen Stx1 bzw. Stx2 jedoch in gleichem Maße behindert wie die Bindung der Wildtyp-Toxine. Wir konnten damit zeigen, dass die Stx-Varianten bei Erhalt der Antigenität die immun-suppressiven Eigenschaften im Reservoirwirt verloren haben. Die Antigene sind damit als Impfstoffkandidaten zur Immunisierung von Rindern gegen STEC geeignet.

## IX Summary

Shiga toxin-(Stx-)producing *E. coli* (STEC) form an *E. coli* pathovar which is characterised by the production of potent cytotoxins. Stx-producing, enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) are the cause of serious infections with life-threatening complications in humans, e.g. the haemolytic uremic syndrome (HUS). Cattle are considered the most important reservoir for STEC worldwide. Recent studies clearly suggest that Stx modulates (suppresses) the bovine immune system resulting in a persistence of infection and long-term STEC shedding. Since the first infection of calves coincides with the lack of Stx-specific antibodies, we hypothesized that vaccination of calves prior to STEC infection may prevent the establishment of a persistent infection. The aim of this study was to generate recombinant Shiga toxoids (rStx1<sub>mut</sub> & rStx2<sub>mut</sub>) by site-directed mutagenesis of the enzymatic domain of the toxin and to assess their immunomodulatory and antigenic properties in comparison to recombinant wild type Stx (rStx1<sub>WT</sub> & rStx2<sub>WT</sub>). Bovine primary immune cells were used as test systems. In ileal intraepithelial lymphocytes, rStx1<sub>WT</sub> and rStx2<sub>WT</sub> induced a significantly elevated transcription rate of *il-4*. rStx1<sub>WT</sub> as well as rStx2<sub>WT</sub> reduced the expression of Stx-receptor CD77 on different types of peripheral blood B- and T-cells. On teflon bag generated primary bovine macrophages, rStx1<sub>WT</sub> or rStx2<sub>WT</sub> reduced the CD14 expression. In comparable concentrations, neither rStx1<sub>mut</sub> nor rStx2<sub>mut</sub> demonstrated any of these effects. Antibodies from sera of naturally infected cattle recognized the Shiga toxoids equally well as the recombinant wild type toxins in a competitive ELISA. While retaining their antigenicity, recombinant Shiga toxoids lost the immunomodulatory properties in cattle. We conclude that Shiga toxoids are promising vaccination candidates for use in cattle to reduce persistence and long-term STEC shedding.

---

## X Literaturverzeichnis

1. **Abe, A., U. Heczko, R. G. Hegele, and B. Brett Finlay.** 1998. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *J Exp Med* **188**:1907-16.
2. **Ackers, M. L., B. E. Mahon, E. Leahy, B. Goode, T. Damrow, P. S. Hayes, W. F. Bibb, D. H. Rice, T. J. Barrett, L. Hutwagner, P. M. Griffin, and L. Slutsker.** 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* **177**:1588-93.
3. **Adler, H., E. Peterhans, and T. W. Jungi.** 1994. Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* **41**:211-27.
4. **Anonymus.** 2011. EHEC und Antibiotikabehandlung.
5. **Armstrong, G. D., E. Fodor, and R. Vanmaele.** 1991. Investigation of Shiga-like toxin binding to chemically synthesized oligosaccharide sequences. *J Infect Dis* **164**:1160-7.
6. **Arthur, T. M., G. A. Barkocy-Gallagher, M. Rivera-Betancourt, and M. Koochmaraie.** 2002. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl Environ Microbiol* **68**:4847-52.
7. **Baljer, G., and L. H. Wieler.** 1999. [Animals as a source of infections for humans--diseases caused by EHEC]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **106**:339-43.
8. **Behrendt, J. H., C. Hermosilla, M. Hardt, K. Failing, H. Zahner, and A. Taubert.** 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet Parasitol* **151**:97-109.
9. **Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells, and P. M. Griffin.** 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Jama* **269**:2217-20.
10. **Bitzan, M.** 2009. Treatment options for HUS secondary to *Escherichia coli* O157:H7. *Kidney Int Suppl*:S62-6.
11. **Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, A. Mora, C. Prado, M. P. Alonso, M. Mourino, C. Madrid, C. Balsalobre, and A. Juarez.** 1997. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet Microbiol* **54**:309-19.
12. **Blessenohl, M.** 2003. Untersuchungen zur Modulation intraepithelialer Lymphozyten des Rindes durch Shigatoxin 1 von *Escherichia coli*. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
13. **Bohle, S.** 2006. Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung des Virulenzfaktors „Intimin“ von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* beim Rind. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
14. **Bonardi, S., E. Maggi, G. Pizzin, S. Morabito, and A. Caprioli.** 2001. Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol* **66**:47-53.
15. **Bosworth, B. T., J. E. Samuel, H. W. Moon, A. D. O'Brien, V. M. Gordon, and S. C. Whipp.** 1996. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect Immun* **64**:55-60.
16. **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 targetting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *J Exp Med* **177**:1745-53.
17. **Bridger, P. S., R. Bauerfeind, L. Wenzel, N. Bauer, C. Menge, H. J. Thiel, M. Reinacher, and K. Doll.** 2011. Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* **141**:1-10.
  18. **Brigotti, M., D. Carnicelli, E. Ravanelli, A. G. Vara, C. Martinelli, R. R. Alfieri, P. G. Petronini, and P. Sestili.** 2007. Molecular damage and induction of proinflammatory cytokines in human endothelial cells exposed to Shiga toxin 1, Shiga toxin 2, and alpha-sarcin. *Infect Immun* **75**:2201-7.
  19. **Byrne, C. M., D. J. Bolton, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, and I. S. Blair.** 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Lett Appl Microbiol* **30**:142-5.
  20. **Cameron, P., S. J. Smith, M. A. Giembycz, D. Rotondo, and R. Plevin.** 2003. Verotoxin activates mitogen-activated protein kinase in human peripheral blood monocytes: role in apoptosis and proinflammatory cytokine release. *Br J Pharmacol* **140**:1320-30.
  21. **Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugere, and E. Oswald.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* **36**:289-311.
  22. **Cherla, R. P., S. Y. Lee, and V. L. Tesh.** 2003. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* **228**:159-66.
  23. **Cody, S. H., M. K. Glynn, J. A. Farrar, K. L. Cairns, P. M. Griffin, J. Kobayashi, M. Fyfe, R. Hoffman, A. S. King, J. H. Lewis, B. Swaminathan, R. G. Bryant, and D. J. Vugia.** 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med* **130**:202-9.
  24. **Cohen, A., V. Madrid-Marina, Z. Estrov, M. H. Freedman, C. A. Lingwood, and H. M. Dosch.** 1990. Expression of glycolipid receptors to Shiga-like toxin on human B lymphocytes: a mechanism for the failure of long-lived antibody response to dysenteric disease. *Int Immunol* **2**:1-8.
  25. **Creydt, V. P., C. Silberstein, E. Zotta, and C. Ibarra.** 2006. Cytotoxic effect of Shiga toxin-2 holotoxin and its B subunit on human renal tubular epithelial cells. *Microbes Infect* **8**:410-9.
  26. **de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries.** 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* **174**:1209-20.
  27. **de Zoete, M. R., J. P. van Putten, and J. A. Wagenaar.** 2007. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. *Vaccine* **25**:5548-57.
  28. **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.
  29. **Dean-Nystrom, E. A., L. J. Gansheroff, M. Mills, H. W. Moon, and A. D. O'Brien.** 2002. Vaccination of pregnant dams with intimin(O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* **70**:2414-8.
  30. **Deresiewicz, R. L., P. R. Austin, and C. J. Hovde.** 1993. The role of tyrosine-114 in the enzymatic activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Mol Gen Genet* **241**:467-73.
  31. **Deresiewicz, R. L., S. B. Calderwood, J. D. Robertus, and R. J. Collier.** 1992. Mutations affecting the activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Biochemistry* **31**:3272-80.
  32. **Doyle, M. P.** 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* **12**:289-301.

33. **Dubendorff, J. W., and F. W. Studier.** 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* **219**:45-59.
34. **Dziva, F., I. Vlisidou, V. F. Crepin, T. S. Wallis, G. Frankel, and M. P. Stevens.** 2007. Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Vet Microbiol* **123**:254-61.
35. **Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barkocy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W. W. Laegreid.** 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:2999-3003.
36. **Falguieres, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero, and L. Johannes.** 2001. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* **12**:2453-68.
37. **Fegan, N., P. Vanderlinde, G. Higgs, and P. Desmarchelier.** 2004. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* **97**:362-70.
38. **Ferens, W. A., and C. J. Hovde.** 2000. Antiviral activity of shiga toxin 1: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect Immun* **68**:4462-9.
39. **Foster, G. H., C. S. Armstrong, R. Sakiri, and V. L. Tesh.** 2000. Shiga toxin-induced tumor necrosis factor alpha expression: requirement for toxin enzymatic activity and monocyte protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Infect Immun* **68**:5183-9.
40. **Foster, G. H., and V. L. Tesh.** 2002. Shiga toxin 1-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and p38 in the human monocytic cell line THP-1: possible involvement in the production of TNF-alpha. *J Leukoc Biol* **71**:107-14.
41. **Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton.** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**:911-21.
42. **Frankel, G., A. D. Phillips, L. R. Trabulsi, S. Knutton, G. Dougan, and S. Matthews.** 2001. Intimin and the host cell--is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol* **9**:214-8.
43. **Friedrich, A. W., W. Zhang, M. Bielaszewska, A. Mellmann, R. Kock, A. Fruth, H. Tschape, and H. Karch.** 2007. Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin Infect Dis* **45**:39-45.
44. **Frohlich, J.** 2009. Shigatoxin-spezifische Immunglobuline und Ausscheidung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Kälbern. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
45. **Frohlich, J., G. Baljer, and C. Menge.** 2009. Maternally and naturally acquired antibodies to Shiga toxins in a cohort of calves shedding Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **75**:3695-704.
46. **Fu, X. J., K. Iijima, K. Nozu, K. Hamahira, R. Tanaka, T. Oda, N. Yoshikawa, and M. Matsuo.** 2004. Role of p38 MAP kinase pathway in a toxin-induced model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **19**:844-52.
47. **Fujii, J., T. Matsui, D. P. Heatherly, K. H. Schlegel, P. I. Lobo, T. Yutsudo, G. M. Ciruolo, R. E. Morris, and T. Obrig.** 2003. Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect Immun* **71**:2724-35.

48. **Geelen, J. M., T. J. van der Velden, D. M. Te Loo, O. C. Boerman, L. P. van den Heuvel, and L. A. Monnens.** 2007. Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leucocytes. *Nephrol Dial Transplant* **22**:749-55.
49. **Geelen, J. M., T. J. van der Velden, L. P. van den Heuvel, and L. A. Monnens.** 2007. Interactions of Shiga-like toxin with human peripheral blood monocytes. *Pediatr Nephrol* **22**:1181-7.
50. **Gentry, M. K., and J. M. Dalrymple.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J Clin Microbiol* **12**:361-6.
51. **Geue, L., M. Segura-Alvarez, F. J. Conraths, T. Kuczus, J. Bockemuhl, H. Karch, and P. Gallien.** 2002. A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol Infect* **129**:173-85.
52. **Gordon, V. M., S. C. Whipp, H. W. Moon, A. D. O'Brien, and J. E. Samuel.** 1992. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect Immun* **60**:485-90.
53. **Hancock, D., T. Besser, J. Lejeune, M. Davis, and D. Rice.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* **66**:71-8.
54. **Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, D. E. Herriott, and P. I. Tarr.** 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* **118**:193-5.
55. **Harrison, L. M., R. P. Cherla, C. van den Hoogen, W. C. van Haaften, S. Y. Lee, and V. L. Tesh.** 2005. Comparative evaluation of apoptosis induced by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in human monocytic and macrophage-like cells. *Microb Pathog* **38**:63-76.
56. **Harrison, L. M., C. van den Hoogen, W. C. van Haaften, and V. L. Tesh.** 2005. Chemokine expression in the monocytic cell line THP-1 in response to purified shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides. *Infect Immun* **73**:403-12.
57. **Harrison, L. M., W. C. van Haaften, and V. L. Tesh.** 2004. Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. *Infect Immun* **72**:2618-27.
58. **Hein, W. R., and C. R. Mackay.** 1991. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* **12**:30-4.
59. **Heuvelink, A. E., F. L. van den Biggelaar, J. Zwartkruis-Nahuis, R. G. Herbes, R. Huyben, N. Nagelkerke, W. J. Melchers, L. A. Monnens, and E. de Boer.** 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J Clin Microbiol* **36**:3480-7.
60. **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.
61. **Hoffman, M. A., C. Menge, T. A. Casey, W. Laegreid, B. T. Bosworth, and E. A. Dean-Nystrom.** 2006. Bovine immune response to shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clin Vaccine Immunol* **13**:1322-7.
62. **Hoffmann, C.** 2010. Entwicklung und Prüfung eines Impfstoffes gegen die Ödemkrankheit der Schweine. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
63. **Hovde, C. J., S. B. Calderwood, J. J. Mekalanos, and R. J. Collier.** 1988. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:2568-72.

64. **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.
65. **Hussein, H. S.** 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* **85**:E63-72.
66. **Ikeda, M., Y. Gunji, S. Yamasaki, and Y. Takeda.** 2000. Shiga toxin activates p38 MAP kinase through cellular Ca(2+) increase in Vero cells. *FEBS Lett* **485**:94-8.
67. **Iordanov, M. S., D. Pribnow, J. L. Magun, T. H. Dinh, J. A. Pearson, S. L. Chen, and B. E. Magun.** 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol Cell Biol* **17**:3373-81.
68. **Ishikawa, S., K. Kawahara, Y. Kagami, Y. Isshiki, A. Kaneko, H. Matsui, N. Okada, and H. Danbara.** 2003. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. *Infect Immun* **71**:3235-9.
69. **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.
70. **Kabelitz, D., L. Marischen, H. H. Oberg, W. Holtmeier, and D. Wesch.** 2005. Epithelial defence by gamma delta T cells. *Int Arch Allergy Immunol* **137**:73-81.
71. **Karch, H., P. I. Tarr, and M. Bielaszewska.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* **295**:405-18.
72. **Karmali, M. A.** 2004. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol* **26**:117-22.
73. **Kashiwamura, M., K. Kurohane, T. Tanikawa, A. Deguchi, D. Miyamoto, and Y. Imai.** 2009. Shiga toxin kills epithelial cells isolated from distal but not proximal part of mouse colon. *Biol Pharm Bull* **32**:1614-7.
74. **Kassenborg, H. D., C. W. Hedberg, M. Hoekstra, M. C. Evans, A. E. Chin, R. Marcus, D. J. Vugia, K. Smith, S. D. Ahuja, L. Slutsker, and P. M. Griffin.** 2004. Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. *Clin Infect Dis* **38 Suppl 3**:S271-8.
75. **Katagiri, Y. U., T. Mori, H. Nakajima, C. Katagiri, T. Taguchi, T. Takeda, N. Kiyokawa, and J. Fujimoto.** 1999. Activation of Src family kinase yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J Biol Chem* **274**:35278-82.
76. **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.
77. **Kitov, P. I., J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, and D. R. Bundle.** 2000. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature* **403**:669-72.
78. **Kongmuang, U., T. Honda, and T. Miwatani.** 1988. Isolation of Shiga toxin-resistant Vero cells and their use for easy identification of the toxin. *Infect Immun* **56**:2491-4.
79. **Kuribayashi, T., T. Seita, M. Fukuyama, K. Furuhashi, M. Honda, M. Matsumoto, H. Seguchi, and S. Yamamoto.** 2006. Neutralizing activity of bovine colostrum antibody against verotoxin derived from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *J Infect Chemother* **12**:251-6.

80. **Kuribayashi, T., T. Seita, M. Matsumoto, K. Furuhashi, K. Tagata, and S. Yamamoto.** 2009. Bovine colostrum antibody against verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7: resistance to proteases and effects in beagle dogs. *Comp Med* **59**:163-7.
81. **Lauvraak, S. U., S. Walchli, T. G. Iversen, H. H. Slagsvold, M. L. Torgersen, B. Spilberg, and K. Sandvig.** 2006. Shiga toxin regulates its entry in a Syk-dependent manner. *Mol Biol Cell* **17**:1096-109.
82. **Lee, S. Y., R. P. Cherla, and V. L. Tesh.** 2007. Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1. *Infect Immun* **75**:1291-302.
83. **Lee, S. Y., M. S. Lee, R. P. Cherla, and V. L. Tesh.** 2008. Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell Microbiol* **10**:770-80.
84. **LeJeune, J. T., and A. N. Wetzel.** 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *J Anim Sci* **85**:E73-80.
85. **Leutenegger, C. M., A. M. Alluwaimi, W. L. Smith, L. Perani, and J. S. Cullor.** 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* **77**:275-87.
86. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**:377-89.
87. **Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali.** 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**:8834-9.
88. **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.
89. **Liu, L., H. Zeng, P. Luo, J. Wu, H. Chen, Y. Shi, W. Zhang, X. Mao, B. Xiao, and Q. Zou.** 2009. Cloning a truncated fragment (stx2a(1)) of the shiga-like toxin 2A (1) subunit of EHEC O157:H7: candidate immunogen for a subunit vaccine. *Mol Biotechnol* **43**:8-14.
90. **Lostrie-Trussart, N., J. J. Letesson, C. Didembourg, and A. Depelchin.** 1988. The use of amphotericin B in prevention of *Trypanosoma theileri* growth in bovine cell culture. *Vet Parasitol* **29**:9-17.
91. **Low, J. C., I. J. McKendrick, C. McKechnie, D. Fenlon, S. W. Naylor, C. Currie, D. G. Smith, L. Allison, and D. L. Gally.** 2005. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. *Appl Environ Microbiol* **71**:93-7.
92. **MacConnachie, A. A., and W. T. Todd.** 2004. Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in shiga toxin producing *Escherichia coli* infection. *Curr Opin Infect Dis* **17**:479-82.
93. **MacLeod, D. L., and C. L. Gyles.** 1991. Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. *Vet Microbiol* **29**:309-18.
94. **Makino, S., M. Watarai, H. Tabuchi, T. Shirahata, H. Furuoka, Y. Kobayashi, and Y. Takeda.** 2001. Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. *Microb Pathog* **31**:1-8.
95. **Maloney, M. D., B. Binnington-Boyd, and C. A. Lingwood.** 1999. Globotriaosyl ceramide modulates interferon-alpha-induced growth inhibition and CD19 expression in Burkitt's lymphoma cells. *Glycoconj J* **16**:821-8.

96. **Marcato, P., T. P. Griener, G. L. Mulvey, and G. D. Armstrong.** 2005. Recombinant Shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. *Infect Immun* **73**:6523-9.
97. **Marcato, P., G. Mulvey, R. J. Read, K. Vander Helm, P. N. Nation, and G. D. Armstrong.** 2001. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. *J Infect Dis* **183**:435-43.
98. **Mastroeni, P., J. A. Chabalgoity, S. J. Dunstan, D. J. Maskell, and G. Dougan.** 2001. Salmonella: immune responses and vaccines. *Vet J* **161**:132-64.
99. **Matthews, L., J. C. Low, D. L. Gally, M. C. Pearce, D. J. Mellor, J. A. Heesterbeek, M. Chase-Topping, S. W. Naylor, D. J. Shaw, S. W. Reid, G. J. Gunn, and M. E. Woolhouse.** 2006. Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:547-52.
100. **Matthews, L., I. J. McKendrick, H. Ternent, G. J. Gunn, B. Synge, and M. E. Woolhouse.** 2006. Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiol Infect* **134**:131-42.
101. **McNeilly, T. N., M. C. Mitchell, T. Rosser, S. McAteer, J. C. Low, D. G. Smith, J. F. Huntley, A. Mahajan, and D. L. Gally.** 2010. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. *Vaccine* **28**:1422-8.
102. **McNeilly, T. N., S. W. Naylor, A. Mahajan, M. C. Mitchell, S. McAteer, D. Deane, D. G. Smith, J. C. Low, D. L. Gally, and J. F. Huntley.** 2008. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infect Immun* **76**:2594-602.
103. **Menge, C.** 2006. Immunomodulatorische Wirkung und pathogenetische Bedeutung der *Escherichia coli* Shigatoxine beim Rind. Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
104. **Menge, C., M. Blessenohl, T. Eisenberg, I. Stamm, and G. Baljer.** 2004. Bovine ileal intraepithelial lymphocytes represent target cells for Shiga toxin 1 from *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**:1896-905.
105. **Menge, C., T. Eisenberg, I. Stamm, and G. Baljer.** 2006. Comparison of binding and effects of *Escherichia coli* Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **113**:392-403.
106. **Menge, C., I. Stamm, M. Blessenohl, L. H. Wieler, and G. Baljer.** 2003. Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb3/CD77+ bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:377-86.
107. **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.
108. **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.
109. **Merritt, E. A., and W. G. Hol.** 1995. AB5 toxins. *Curr Opin Struct Biol* **5**:165-71.
110. **Mohr, M.** 2007. Nachweis und Reaktivität epithelialer und mesenchymaler Zielzellen für *Escherichia coli* Shigatoxin in den Kolonkrypten des Rindes. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
111. **Moussay, E.** 2006. Effect of *Escherichia coli* Stx1 on the cytokine profile of bovine ileal intraepithelial lymphocytes. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

112. **Moussay, E., I. Stamm, A. Taubert, G. Baljer, and C. Menge.** 2006. Escherichia coli Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **113**:367-82.
113. **Mulvey, G. L., P. Marcato, P. I. Kitov, J. Sadowska, D. R. Bundle, and G. D. Armstrong.** 2003. Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands. *J Infect Dis* **187**:640-9.
114. **Myers, C. D.** 1991. Role of B cell antigen processing and presentation in the humoral immune response. *Faseb J* **5**:2547-53.
115. **Nakajima, H., N. Kiyokawa, Y. U. Katagiri, T. Taguchi, T. Suzuki, T. Sekino, K. Mimori, T. Ebata, M. Saito, H. Nakao, T. Takeda, and J. Fujimoto.** 2001. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **276**:42915-22.
116. **Nart, P., S. W. Naylor, J. F. Huntley, I. J. McKendrick, D. L. Gally, and J. C. Low.** 2008. Responses of cattle to gastrointestinal colonization by Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun* **76**:5366-72.
117. **Naylor, S. W., D. L. Gally, and J. C. Low.** 2005. Enterohaemorrhagic E. coli in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* **295**:419-41.
118. **Naylor, S. W., A. J. Roe, P. Nart, K. Spears, D. G. Smith, J. C. Low, and D. L. Gally.** 2005. Escherichia coli O157: H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. *Microbiology* **151**:2773-81.
119. **Nishikawa, K., K. Matsuoka, M. Watanabe, K. Igai, K. Hino, K. Hatano, A. Yamada, N. Abe, D. Terunuma, H. Kuzuhara, and Y. Natori.** 2005. Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. *J Infect Dis* **191**:2097-105.
120. **O'Brien, A. D., and R. K. Holmes.** 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* **51**:206-20.
121. **Obrig, T. G., T. P. Moran, and J. E. Brown.** 1987. The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem J* **244**:287-94.
122. **Obrig, T. G., R. M. Seaner, M. Bentz, C. A. Lingwood, B. Boyd, A. Smith, and W. Narrow.** 2003. Induction by sphingomyelinase of shiga toxin receptor and shiga toxin 2 sensitivity in human microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **71**:845-9.
123. **Ogden, I. D., M. MacRae, and N. J. Strachan.** 2004. Is the prevalence and shedding concentrations of E. coli O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiol Lett* **233**:297-300.
124. **Ohmura-Hoshino, M., M. Yamamoto, Y. Yuki, Y. Takeda, and H. Kiyono.** 2004. Non-toxic Stx derivatives from Escherichia coli possess adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine* **22**:3751-61.
125. **Ohmura, M., M. Yamamoto, C. Tomiyama-Miyaji, Y. Yuki, Y. Takeda, and H. Kiyono.** 2005. Nontoxic Shiga toxin derivatives from Escherichia coli possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect Immun* **73**:4088-97.
126. **Ohmura, M., S. Yamasaki, H. Kurazono, K. Kashiwagi, K. Igarashi, and Y. Takeda.** 1993. Characterization of non-toxic mutant toxins of Vero toxin 1 that were constructed by replacing amino acids in the A subunit. *Microb Pathog* **15**:169-76.
127. **Omisakin, F., M. MacRae, I. D. Ogden, and N. J. Strachan.** 2003. Concentration and prevalence of Escherichia coli O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol* **69**:2444-7.

128. **Orth, D., K. Grif, L. B. Zimmerhackl, and R. Wurzner.** 2008. Prevention and treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther* **6**:101-8.
129. **Ouyang, D. Y., Y. Y. Wang, and Y. T. Zheng.** 2005. Activation of c-Jun N-terminal kinases by ribotoxic stresses. *Cell Mol Immunol* **2**:419-25.
130. **Pearce, M. C., D. Fenlon, J. C. Low, A. W. Smith, H. I. Knight, J. Evans, G. Foster, B. A. Synge, and G. J. Gunn.** 2004. Distribution of *Escherichia coli* O157 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. *Appl Environ Microbiol* **70**:5737-43.
131. **Peterson, R. E., T. J. Klopfenstein, R. A. Moxley, G. E. Erickson, S. Hinkley, G. Bretschneider, E. M. Berberov, D. Rogan, and D. R. Smith.** 2007. Effect of a vaccine product containing type III secreted proteins on the probability of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and mucosal colonization in feedlot cattle. *J Food Prot* **70**:2568-77.
132. **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.
133. **Poirier, K., S. P. Faucher, M. Beland, R. Brousseau, V. Gannon, C. Martin, J. Harel, and F. Daigle.** 2008. *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infect Immun* **76**:4814-22.
134. **Potter, A. A., S. Klashinsky, Y. Li, E. Frey, H. Townsend, D. Rogan, G. Erickson, S. Hinkley, T. Klopfenstein, R. A. Moxley, D. R. Smith, and B. B. Finlay.** 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* **22**:362-9.
135. **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.
136. **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.
137. **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.
138. **Roe, A. J., D. E. Hoey, and D. L. Gally.** 2003. Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Biochem Soc Trans* **31**:98-103.
139. **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- $\kappa$ B and activator protein-1. *Blood* **92**:558-66.
140. **Samitas, K., J. Lotvall, and A. Bossios.** 2010. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**:209-25.
141. **Sandvig, K., S. Grimmer, S. U. Lauvrak, M. L. Torgersen, G. Skretting, B. van Deurs, and T. G. Iversen.** 2002. Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem Cell Biol* **117**:131-41.
142. **Sheoran, A. S., S. Chapman-Bonofiglio, B. R. Harvey, J. Mukherjee, G. Georgiou, A. Donohue-Rolfe, and S. Tzipori.** 2005. Human antibody against shiga toxin 2 administered to piglets after the onset of diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 prevents fatal systemic complications. *Infect Immun* **73**:4607-13.

143. **Sheoran, A. S., S. Chapman, P. Singh, A. Donohue-Rolfe, and S. Tzipori.** 2003. Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing Stx2 variants. *Infect Immun* **71**:3125-30.
144. **Skinner, L. M., and M. P. Jackson.** 1998. Inhibition of prokaryotic translation by the Shiga toxin enzymatic subunit. *Microb Pathog* **24**:117-22.
145. **Smith, M. J., L. D. Teel, H. M. Carvalho, A. R. Melton-Celsa, and A. D. O'Brien.** 2006. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine* **24**:4122-9.
146. **Smith, W. E., A. V. Kane, S. T. Campbell, D. W. Acheson, B. H. Cochran, and C. M. Thorpe.** 2003. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **71**:1497-504.
147. **Stamm, I., M. Mohr, P. S. Bridger, E. Schropfer, M. Konig, W. C. Stoffregen, E. A. Dean-Nystrom, G. Baljer, and C. Menge.** 2008. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect Immun* **76**:5381-91.
148. **Stamm, I., M. Wuhler, R. Geyer, G. Baljer, and C. Menge.** 2002. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Microb Pathog* **33**:251-64.
149. **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.
150. **Studier, F. W., and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-30.
151. **Sugatani, J., T. Igarashi, M. Shimura, T. Yamanaka, T. Takeda, and M. Miwa.** 2000. Disorders in the immune responses of T- and B-cells in mice administered intravenous verotoxin 2. *Life Sci* **67**:1059-72.
152. **Synge, B. A., M. E. Chase-Topping, G. F. Hopkins, I. J. McKendrick, F. Thomson-Carter, D. Gray, S. M. Rusbridge, F. I. Munro, G. Foster, and G. J. Gunn.** 2003. Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows. *Epidemiol Infect* **130**:301-12.
153. **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.
154. **Taubert, A., H. Zahner, and C. Hermosilla.** 2006. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet Parasitol* **142**:214-22.
155. **te Loo, D. M., A. E. Heuvelink, E. de Boer, J. Nauta, J. van der Walle, C. Schroder, V. W. van Hinsbergh, H. Chart, N. C. van de Kar, and L. P. van den Heuvel.** 2001. Vero cytotoxin binding to polymorphonuclear leukocytes among households with children with hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* **184**:446-50.
156. **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.
157. **Tesh, V. L., and A. D. O'Brien.** 1991. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol Microbiol* **5**:1817-22.
158. **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.

- 
159. **Tetaud, C., T. Falguieres, K. Carlier, Y. Lecluse, J. Garibal, D. Coulaud, P. Busson, R. Steffensen, H. Clausen, L. Johannes, and J. Wiels.** 2003. Two distinct Gb3/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb3/CD77 mAb and verotoxin-1. *J Biol Chem* **278**:45200-8.
160. **Thaysen-Andersen, M., S. B. Jorgensen, E. S. Wilhelmsen, J. W. Petersen, and P. Hojrup.** 2007. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. *Vaccine* **25**:2213-27.
161. **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.
162. **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.
163. **Torgersen, M. L., S. U. Lauvrak, and K. Sandvig.** 2005. The A-subunit of surface-bound Shiga toxin stimulates clathrin-dependent uptake of the toxin. *Febs J* **272**:4103-13.
164. **Trachtman, H., A. Cnaan, E. Christen, K. Gibbs, S. Zhao, D. W. Acheson, R. Weiss, F. J. Kaskel, A. Spitzer, and G. H. Hirschman.** 2003. Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *Jama* **290**:1337-44.
165. **Tsuji, T., T. Shimizu, K. Sasaki, Y. Shimizu, K. Tsukamoto, H. Arimitsu, S. Ochi, S. Sugiyama, K. Taniguchi, P. Neri, and H. Mori.** 2008. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine* **26**:469-76.
166. **Tsuji, T., T. Shimizu, K. Sasaki, K. Tsukamoto, H. Arimitsu, S. Ochi, T. Shimizu, K. Taniguchi, M. Noda, P. Neri, and H. Mori.** 2008. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine* **26**:2092-9.
167. **Vaillant, V., E. Espie, H. de Valk, U. Durr, D. Barataud, P. Bouvet, F. Grimont, and J. C. Desenclos.** 2009. Undercooked ground beef and person-to-person transmission as major risk factors for sporadic hemolytic uremic syndrome related to Shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections in children in France. *Pediatr Infect Dis J* **28**:650-3.
168. **van Diemen, P. M., F. Dziva, A. Abu-Median, T. S. Wallis, H. van den Bosch, G. Dougan, N. Chanter, G. Frankel, and M. P. Stevens.** 2007. Subunit vaccines based on intimin and Efa-1 polypeptides induce humoral immunity in cattle but do not protect against intestinal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 or O26:H. *Vet Immunol Immunopathol* **116**:47-58.
169. **Van Donkersgoed, J., D. Hancock, D. Rogan, and A. A. Potter.** 2005. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *Can Vet J* **46**:724-8.
170. **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.
171. **Vlisidou, I., F. Dziva, R. M. La Ragione, A. Best, J. Garmendia, P. Hawes, P. Monaghan, S. A. Cawthraw, G. Frankel, M. J. Woodward, and M. P. Stevens.** 2006. Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **74**:758-64.

172. **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.
173. **Waldvogel, A. S., B. M. Hediger-Weithaler, R. Eicher, A. Zakher, D. S. Zarlenga, L. C. Gasbarre, and V. T. Heussler.** 2000. Interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol* **77**:201-12.
174. **Walterspiel, J. N., S. Ashkenazi, A. L. Morrow, and T. G. Cleary.** 1992. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection* **20**:25-9.
175. **Watanabe, M., K. Matsuoka, E. Kita, K. Igai, N. Higashi, A. Miyagawa, T. Watanabe, R. Yanoshita, Y. Samejima, D. Terunuma, Y. Natori, and K. Nishikawa.** 2004. Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic Escherichia coli infections. *J Infect Dis* **189**:360-8.
176. **Wieler, L. H., and R. Bauerfeind.** 2003. STEC as a veterinary problem. *Diagnostics and prophylaxis in animals. Methods Mol Med* **73**:75-89.
177. **Wong, C. S., S. Jelacic, R. L. Habeeb, S. L. Watkins, and P. I. Tarr.** 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 infections. *N Engl J Med* **342**:1930-6.
178. **Yamagami, S., M. Motoki, T. Kimura, H. Izumi, T. Takeda, Y. Katsuura, and Y. Matsumoto.** 2001. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing Escherichia coli. *J Infect Dis* **184**:738-42.
179. **Yamasaki, C., Y. Natori, X. T. Zeng, M. Ohmura, S. Yamasaki, Y. Takeda, and Y. Natori.** 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.
180. **Yamasaki, S., M. Furutani, K. Ito, K. Igarashi, M. Nishibuchi, and Y. Takeda.** 1991. Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic Escherichia coli for toxin activity. *Microb Pathog* **11**:1-9.
181. **Yokomizo, Y., F. Watanabe, Y. Imada, S. Inumaru, T. Yanaka, and T. Tsuji.** 2002. Mucosal immunoadjuvant activity of the low toxic recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin produced by Bacillus brevis for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Vet Immunol Immunopathol* **87**:291-300.
182. **Zschock, 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.

## XI Anhang

### 1 Übersicht über Blutspendertiere

Tab. 18: Blutspendertiere für PBMC und Makrophagen

| Ohrmarkennummer | Geburtsdatum | Rasse          |
|-----------------|--------------|----------------|
| DE 06616-94140  | 29.01.2002   | HF schwarzbunt |
| DE 06621-92480  | 26.11.2003   | HF schwarzbunt |
| DE 06619-99636  | 26.06.2004   | HF rotbunt     |
| DE 06625-33769  | 20.08.2005   | HF schwarzbunt |
| DE 06625-33780  | 07.11.2005   | HF rotbunt     |
| DE 06627-60305  | 25.12.2005   | HF rotbunt     |
| DE 06627-60306  | 05.01.2006   | HF schwarzbunt |
| DE 06627-60307  | 27.01.2006   | HF schwarzbunt |
| DE 06627-60309  | 20.02.2006   | HF schwarzbunt |
| DE 06627-60319  | 19.04.2006   | HF schwarzbunt |
| DE 06627-60324  | 23.06.2006   | HF schwarzbunt |

HF: Holstein-Frisian

### 2 Übersicht über verwendete Seren

Tab. 19: Stx1Ak-Titer

| Serumnummer | Ohrmarke       | Geburtsdatum | Stx1Ak-Titer |
|-------------|----------------|--------------|--------------|
| 1           | DE 06612-92355 | 22.12.2001   | 75,31        |
| 2           | DE 06616-94134 | 18.07.2001   | 293,17       |
| 3           | DE 06619-99625 | 24.04.2003   | 2008,32      |
| 4           | DE 06614-85430 | 02.04.2001   | 810,07       |
| 5           | DE 06614-95837 | 05.10.2000   | 1363,26      |
| 6           | DE 06616-94141 | 25.02.2003   | 1031,31      |
| 7           | DE 06621-92462 | 09.05.2003   | 248,12       |
| 8           | DE 06616-94118 | 31.07.2001   | 289,37       |
| 9           | DE 09361-60576 | 12.06.2003   | 89,91        |

| Serumnummer | Ohrmarke       | Geburtsdatum | Stx1Ak-Titer |
|-------------|----------------|--------------|--------------|
| 10          | DE 06618-47127 | 18.10.2002   | 736,10       |
| 11          | DE 06616-94119 | 29.01.2001   | 63,74        |
| 12          | DE 06621-92478 | 04.11.2003   | 491,56       |
| 13          | DE 06621-92479 | 19.11.2003   | 267,93       |
| 14          | DE 06619-99626 | 19.07.2003   | 872,56       |
| 15          | DE 06616-74839 | 14.06.2001   | 367,67       |
| 16          | DE 06625-33746 | 24.12.2004   | 325,45       |
| 17          | DE 06623-97713 | 07.07.2004   | 90,21        |
| 18          | DE 06619-99636 | 26.06.2004   | 294,37       |
| 19          | DE 06623-97770 | 27.02.2004   | 130,39       |

Tab. 20: Stx2Ak-Titer

| Serumnummer | Ohrmarke       | Geburtsdatum | Stx2Ak-Titer |
|-------------|----------------|--------------|--------------|
| 1           | DE 06612-92355 | 02.09.1999   | 30           |
| 2           | DE 06616-94134 | 18.07.2001   | 30           |
| 3           | DE 06616-74839 | 14.06.2001   | 30           |
| 4           | DE 06623-97705 | 25.05.2004   | 30           |

Tab. 21: Negative Seren

| Serumnummer | Ohrmarke       | Geburtsdatum | Stx1Ak/Stx2Ak<br>Titer |
|-------------|----------------|--------------|------------------------|
| 1           | DE 06623-97717 | 23.07.2004   | 15 / 15                |
| 2           | DE 06623-97725 | 02.10.2004   | 15 / 15                |
| 3           | DE 06623-97729 | 12.10.2004   | 15 / 15                |

### 3 Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 22: Verwendete Geräte

| Gerät/Modell   | Firma                      |
|----------------|----------------------------|
| Autoklav FVS/2 | Fa. FEDEGARI, ORT, Italien |

| Gerät/Modell   | Firma  |
|--|--|
| BD FACSCalibur™  | Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg                           |
| Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K                         | Fa. Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch                     |
| Brutschrank B 50 60 EK-CO <sub>2</sub>                         | Fa. Heraeus Instruments, Hanau                             |
| Brutschrank Typ BB 6220  | Fa. Heraeus Instruments, Hanau                             |
| Eismaschine UBE-50-35  | Fa. Ziegra, Isernhagen                                     |
| Elektrophoresekammer für Agarosegele (100 ml) (Electro 4)      | Fa. HYBAID GmbH, Heidelberg                                |
| Feinwaage AE 163   | Fa. Mettler-Waagen, Gießen                                 |
| Feinwaage EW600-2M   | Fa. Kern, Albstadt   |
| Inversmikroskop Labovert FS                                    | Fa. Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar                      |
| Inversmikroskop Leitz DM IL                                    | Fa. Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar              |
| Kühlung Colora   | Fa. Messtechnik Lorch                                      |
| Magnetrührer IKA COMBIMAG RED                                  | Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen                  |
| Mehrkanalpipette Research Mehrkanal 2-200µl                    | Fa. Eppendorf AG, Hamburg                                  |
| Mehrkanalpipette Research Mehrkanal 30-300µl                   | Fa. Eppendorf AG, Hamburg                                  |
| Microprocessor pH-Meter pH537                                  | Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim |
| Mikrowellengerät   | Fa. Durabrand  |
| Multistepper 50/100/150/200 µl                                 | Fa. Titertek®, für Labsystems GmbH, Meckenheim             |
| Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1000 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> ) | Fa. Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim                         |
| Photometer DU® 640   | Fa. Beckman Instruments, München                           |
| Pipetten, Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl | Fa. Eppendorf AG, Hamburg                                  |
| Plattenphotometer Titertek Multiscan Ascent                    | Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim                            |
| Schüttelwasserbad GFL 1083                                     | Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel           |
| Sicherheitswerkbank Microflow S1424/1                          | Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                          |
| Sorvall Zentrifuge RC 5B Plus                                  | Fa. Sorval-Dupont, Bad Homburg                             |
| Spannungsgerät 250/2.5 Power Supply                            | Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München                     |
| Sterilbank Laminar HB 2472                                     | Fa. Heraeus Instruments, Hanau                             |
| Stromgeber 3000 Xi Electrophoresis Power Supply                | Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München                     |
| Thermocycler 1, GeneAmp PCR Systems 9600                       | Fa. PERKIN ELMER, Norwalk, U.S.A.                          |
| Thermocycler 5, TGradient 96                                   | Fa. Biometra GmbH, Göttingen                               |
| Tischzentrifuge Mikro 20                                       | Fa. Hettich, über MAGV, Rabenau-Londorf                    |
| Ultraschallgerät Branson & Schallkopf, ½-Titan-                | Fa. G. Heinemann Ultraschall- und                          |

| Gerät/Modell                        | Firma   |
|-------------------------------------|---|
| Resonator Sonifer B15               | Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd  |
| Ultrazentrifuge L8-55 (Rotor Ti75)  | Fa. Beckmann, München   |
| UV-Kammer Stratalinker 1800         | Fa. Stratagene, La Jolla, U.S.A.  |
| Vortex Type RFAX 1R                 | Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf |
| Wasserbad                           | Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel                                  |
| Wippe                               | Eigenbau der Institutswerkstatt   |
| Zentrifuge/Sepatech Omnifuge 2.0 RS | Fa. Heraeus Instruments, Hanau  |
| Zentrifuge 5804R                    | Fa. Eppendorf AG, Hamburg   |
| Zentrifuge Sigma 4K15               | Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz                                 |

Tab. 23: Verwendete Chemikalien

| Reagenz   | Bezugsquelle                                   | Artikel-Nr.  |
|---|--|--------------|
| 1,4 Dithiothreitol (DTT)  | Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe         | 6908.2       |
| 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) | Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen     | M2128        |
| 7-Amino-Actinomycin D   | Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH                  | A-9400       |
| Accutase  | Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe               | L11-007      |
| Agarose   | Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg     | 11404        |
| Amphotericin B  | Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe               | P11-001      |
| Amplitaq® DNA-Polymerase, 10 x Puffer und 25 mM MgCl <sub>2</sub> | Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA | N808-0161    |
| Blut-Agar (Basis)   | Fa. Merck KGaA, Darmstadt                      | 1.10886      |
| BSA   | Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg     | 11930        |
| DNase I und 10 x Puffer   | Amersham Bioscience                            | 27-0514-02   |
| EDTA-Disodium   | Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg     | 11280        |
| Ethanol   | Fa. Merck KGaA, Darmstadt                      | 1.00983      |
| Ethanol 99 %  | Fa. Merck KGaA, Darmstadt                      | 1.00983.1011 |
| Ethidiumbromid  | Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg     | 21251        |

| <b>Reagenz</b>  | <b>Bezugsquelle</b>                               | <b>Artikel-Nr.</b> |
|---|---|--------------------|
| Ethidiumbromid 1%-ige Lösung  | Fa. Serva Electrophoresis GmbH,<br>Heidelberg     | 21251              |
| Ficoll-Paque™ Plus  | GE Healthcare                                     | 17-1440-03         |
| Fötales Kälberserum (FKS), dialysiert   | Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe                  | A15-245            |
| GeneRuler™ 100 bp DNA ladder  | Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                  | SM0241             |
| GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus   | Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                  | SM0242             |
| Gentamicin  | Fa. Biochrom AG, Berlin                           | A2710              |
| IMDM Medium (mit 4 mM stab. L-Glutamin, 3,024 mg/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne Phenolrot) | Fa. Invitrogen, Karlsruhe                         | 21056-023          |
| Isopropanol   | Fa. Merck KGaA, Darmstadt                         | 1.09634.2511       |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)   | Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                  | #R0392             |
| Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker  | Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                  | SM0191             |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM)  | Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach                   | MB-1101000         |
| M-MLV RTase (H <sup>-</sup> )   | Fa. Promega GmbH, Mannheim                        | M 3683             |
| M-MLV RTase Puffer  | Fa. Promega GmbH, Mannheim                        | M 5313             |
| NaCl  | Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Karlsruhe         | 3957.2             |
| NH <sub>4</sub> -Mix (10 x PCR-Puffer)  | Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach                   | MB-1101000         |
| Novitec® Verotoxin ELISA-Test (Verotoxine 1 & 2)  | Fa. HISS Diagnostics GmbH, Freiburg               | 710096             |
| Nukleotide, dNTP  | Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach                   | PAN 739026         |
| Nylonwolle  | Fa. Biotest AG, Dreieich                          | 830034             |
| Oligo d(T) <sub>16</sub> Primer   | Applied Biosystems, Carlsbad,<br>Kalifornien, USA | N808-0128          |
| PANScript Polymerase (5 U/μl)   | Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach                   | MB-1101000         |
| PCR Primer  | Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg                     | -                  |
| Penicillin/Streptomycin (100 x)   | Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe                  | P11-010            |
| Percoll®  | Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH                     | P-1644             |
| Phytohämatogglutinin P (PHA-P)  | Fa. Orpegen-Pharma, Heidelberg                    | 34008480           |
| Polymyxin B »Pfizer«  | Pfizer GmbH, Karlsruhe                            | -                  |
| Ribonuclease Inhibitor (RNasin)   | Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                  | E00312             |

| <b>Reagenz</b>  | <b>Bezugsquelle</b>                                   | <b>Artikel-Nr.</b> |
|---|---|--------------------|
| RNase-free DEPC behandeltes Wasser  | Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Karlsruhe             | T 143.2            |
| RNase-free DNase Set  | Fa. QIAGEN, Hilden                                    | 79254              |
| RPMI 1640 Medium (mit 2mM stab. L-Glutamin und 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> ) | Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach                       | P04-18500          |
| Salzsäure   | Fa. Merck KGaA, Darmstadt                             | 1.00319.2500       |
| SDS (Natriumdodecylsulfat)  | Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Karlsruhe             | 2326.2             |
| SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard-Marker                                  | Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe                        | LC5925             |
| Serva Blue G  | Fa. Serva Electrophoresis GmbH,<br>Heidelberg         | 35050              |
| Shrimp Alkaline Phosphatase   | Amersham Bioscience                                   | E70092Y            |
| Trypanblau  | Dr. G. Grübler & Co., Leipzig                         | -                  |
| Trypsin (10x)   | Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe                      | L-11-001           |
| β-Mercaptoethanol   | Fa. Flucka über Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, München | 63689              |

**Tab. 24: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

| <b>Artikel</b>                            | <b>Bezugsquelle</b>                                     | <b>Artikel-Nr.</b> |
|---|---|--------------------|
| 30 ml Analysegefäß für Ultraschall-Lysate | Fa. Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen              | 668102             |
| 30 ml Spritze                             | Fa. Becton Dickinson Braunschweig<br>GmbH, Braunschweig | -                  |
| 60 ml Spritze                             | Fa. Becton Dickinson Braunschweig<br>GmbH, Braunschweig | -                  |
| 15 ml Plastikröhrchen                     | Fa. Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen              | 188261             |
| 50 ml Plastikröhrchen                     | Fa. Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen              | 227261             |
| Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel        | Fa. Pierce, über Fa. Thermo Scientific,<br>Nidderau     | 20344              |
| Einmalkanülen 18 x 1,5 Unlock             | Fa. HMD Healthcare Limited, Horsham,<br>U.K.            | -                  |
| Einmalkanülen Neoject®, 17G x 2``         | Fa. DISPOMED WITT oHG,<br>Gelnhausen                    | -                  |

| <b>Artikel</b>   | <b>Bezugsquelle</b>   | <b>Artikel-Nr.</b> |
|--|---|--------------------|
| Einmal-Küvette (1,5 ml, halbmikro)                       | Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim                                 | 759015             |
| Einmal-Sterilfilter, 0,22 µm PVDF                        | Fa Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Karlsruhe                          | P 6661             |
| Gebrauchsfertige Filtereinheit Rotrand<br>FP 30/0,2 CA-S | Fa. Schleicher & Schuell über Fisher<br>Scientific GmbH, Nidderau | 10462200           |
| Kanülen, Sterican® (0,6 x 25 mm)                         | Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen                                 | 4657667            |
| Mikrowell-Platten, 96-Loch, Flachboden                   | Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                                 | 167008             |
| Mikrowell-Platten, 96-Loch, V-Form                       | Fa. Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen                        | 651101             |
| Multipipettenspitzen 5-200µl                             | Fa Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Karlsruhe                          | 8156.1             |
| PCR-Gefäße   | Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe                                  | 04.022.1100        |
| Petrischalen, steril, 60 mm                              | Fa. Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen                        | 628102             |
| Pipettenspitzen blau, gelb, kristall                     | Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich                                       | 2100611            |
| Pipettenspitzen Mehrkanal 20-300µl,<br>2-200µl           | Fa. Eppendorf AG, Hamburg   | 0030000897         |
| Polysterol-Einmalpipetten, 1, 5, 10 ml                   | Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                                 | 159609             |
| QIAGEN Plasmid Mini Kit/Midi Kit                         | Fa.QIAGEN, Hilden   | 12123/12143        |
| QIAquick PCR Purification Kit                            | Fa.QIAGEN, Hilden   | 28106              |
| QIAEX II Gel Extractions Kit                             | Fa.QIAGEN, Hilden   | 20021              |
| QuickChange Site-Directed Mutagenesis<br>Kit             | Fa. Stratagene, Amsterdam, NL                                     | #200518            |
| RNeasy® Mini Kit   | Fa.QIAGEN, Hilden   | 74106              |
| Reaktionsgefäß 1,5/2,0 ml                                | Fa. Eppendorf AG, Hamburg   | 0030120.086        |
| Vorfilter Millex® GV                                     | Fa. Millipore, über Fisher Scientific,<br>Nidderau                | 3422407            |
| Zellkultur-Flaschen 80 cm <sup>2</sup>                   | Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden                                 | 17 8905            |

## 4 Verwendete Puffer und Medien

### 4.1 Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturtechniken

#### Annexin-V – Bindungspuffer-Konzentrat (10 x, pH 7,4)

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Hepes/NaOH (pH 7,4) | 2,283 g  |
| NaCl                | 8,182 g  |
| CaCl <sub>2</sub>   | 0,277 g  |
| <i>A. dest.</i>     | 100,0 ml |

#### Annexin-V – Bindungspuffer (1 x)

|  |             |
|--|-------------|
| Annexin-V Bindungspuffer 10 x Konzentrat | 10,0 ml     |
| <i>A. dest.</i>                          | ad 100,0 ml |

#### Citratlösung (3,8 %)

|  |           |
|--|-----------|
| Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O | 38,0 g    |
| <i>A. dest.</i>                              | 1000,0 ml |

#### Erythrozythen-Lyse-Puffer

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

#### HEPES – Puffer-Stammlösung (10 x, pH 7,4)

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| NaCl                 | 80,0 g    |
| HEPES                | 23,8 g    |
| KCl                  | 3 g       |
| D-Glucose-Monohydrat | 22 g      |
| <i>A. dest.</i>      | 1000,0 ml |

#### HEPES – Puffer (1 x, pH 7,4)

|                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| HEPES – Puffer Stammlösung (10 x) | 100,0 g      |
| <i>A. dest.</i>                   | ad 1000,0 ml |

HEPES-Puffer + EDTA (0,1 %)

|  |              |
|--|--------------|
| HEPES – Puffer-Stammlösung 10 x            | 100,0 ml     |
| Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O | 1,0 g        |
| <i>A. dest.</i>                            | ad 1000,0 ml |

MTT-Stammlösung

|                  |          |
|------------------|----------|
| MTT              | 0,5 g    |
| PBS-Puffer (1 x) | 100,0 ml |

NaCl-Lösung (0,89 %)

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| NaCl            | 8,9 g     |
| <i>A. dest.</i> | 1000,0 ml |

PBS – Stammlösung 10 x (pH 7,4)

|   |           |
|---|-----------|
| NaCl  | 100,0 g   |
| KCl   | 2,5 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 2,5 g     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 18,0 g    |
| <i>A. dest.</i>                                       | 1000,0 ml |

PBS – Puffer (pH 7,4)

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| PBS 10 x Stammlösung | 100,0 ml     |
| <i>A. dest.</i>      | ad 1000,0 ml |

PBS –AB – EDTA Puffer (pH 7,4)

|  |           |
|--|-----------|
| NaCl   | 8,0 g     |
| KCl  | 0,2 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | 0,2 g     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O      | 1,42 g    |
| Na <sub>2</sub> -EDTA x H <sub>2</sub> O                   | 0,75 g    |
| D-Glucose-Monohydrat                                       | 1,1 g     |
| Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung | 10 ml     |
| Gentamicin   | 2,5 ml    |
| <i>A. dest.</i>  | 1000,0 ml |

PBS/BSA (1 %)

|     |        |
|-----|--------|
| BSA | 10,0 g |
|-----|--------|

---

|  |              |
|--|--------------|
| PBS – Puffer (1 x)   | 1000,0 ml    |
| <u>PBS – EDTA – Stammlösung 10 x (pH 7,4)</u>              |              |
| NaCl   | 80,0 g       |
| KCl  | 2,0 g        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | 2,0 g        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O      | 14,2 g       |
| Na – EDTA x H <sub>2</sub> O                               | 20,0 g       |
| <i>A. dest.</i>  | 1000,0 ml    |
| <u>PBS – EDTA – Puffer (pH 7,4)</u>                        |              |
| PBS – EDTA 10 x Stammlösung                                | 100,0 ml     |
| <i>A. dest.</i>  | ad 1000,0 ml |
| <u>SDS-Lösung (1 %ig in NaCl)</u>                          |              |
| Na-Dodecylsulfat   | 0,5 g        |
| NaCl-Lösung (0,89 %)                                       | 50 ml        |
| <u>SDS-Lösung (10 %ig, 0,01 n HCl)</u>                     |              |
| Na-Dodecylsulfat   | 100,0 g      |
| HCl 1N   | 10,0 ml      |
| <i>A. dest.</i>  | 1000,0 ml    |
| <u>Trypanblau-Lösung</u>                                   |              |
| Trypanblau   | 0,2 g        |
| NaCl-Lösung (0,89 %)                                       | 1000,0 ml    |
| <u>Trypsin-Lösung (1 x)</u>                                |              |
| Trypsin (10 x)   | 100,0 g      |
| HEPES-Puffer mit 0,1 % EDTA                                | 900,0 ml     |
| <u>Zellkulturmedium 1 = Verozellmedium</u>                 |              |
| RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin                      | 445,0 ml     |
| FKS  | 50,0 ml      |
| Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml) Lösung | 10,0 ml      |
| <u>Zellkulturmedium 2 = PBMC-Medium</u>                    |              |
| RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin                      | 89,0 ml      |

---

|  |          |
|--|----------|
| FKS  | 10,0 ml  |
| Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung | 1,0 ml   |
| 2-β-Mercaptoethanol (1 mM)                                 | 300,0 µl |

Zellkulturmedium 3 = IEL-Medium

|  |           |
|--|-----------|
| RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin                      | 195,0 ml  |
| FKS  | 50,0 ml   |
| Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung | 2,5 ml    |
| Amphotericin B (250 µg/ml)                                 | 2,5 ml    |
| Gentamicin (20 mg/ml)                                      | 2,5 µg/ml |

Zellkulturmedium 4 = Makrophagenmedium I

|  |           |
|--|-----------|
| IMDM ohne Phenolrot  | 195,0 ml  |
| FKS  | 50,0 ml   |
| Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung | 2,5 ml    |
| Amphotericin B (250 µg/ml)                                 | 2,5 ml    |
| 2-β-Mercaptoethanol (100 mM)                               | 0,5 µl/ml |

Zellkulturmedium 5 = Makrophagenmedium II

|  |           |
|--|-----------|
| IMDM ohne Phenolrot  | 480,0 ml  |
| FKS  | 10,0 ml   |
| Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung | 5 ml      |
| Amphotericin B (250 µg/ml)                                 | 5 ml      |
| 2-β-Mercaptoethanol (100 mM)                               | 0,5 µl/ml |

**4.2 Puffer für den ELISA**Waschpuffer-Gebrauchslösung

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Waschpuffer-Konzentrat (20 x) | 5,0 ml  |
| <i>A. dest.</i>               | 95,0 ml |

### 4.3 Puffer und Lösungen für PCRs

#### Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (1 x TAE)

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE) 200,0 ml  
*A. dest.* ad 10 L

#### Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris 242,0 g  
Eisessig 57,10 g  
0,5 M Na-EDTA x 2H<sub>2</sub>O pH 8.0 100,0 ml  
*A. dest.* ad 1000 ml

#### Ladepuffer (10 x)

Bromphenolblau (Na-Salz) 0,25 g  
Xylene Cyanole FF 0,25 g  
Glycerin 30,0 g  
autoklaviertes *A. dest.* 100 ml  
aliquotiert (1 ml), Lagerung bei -20 °C

#### Luria Bertani-(LB-) Medium

Trypton 10,0 g  
Hefe-Extrakt 5,0 g  
NaCl 5,0 g  
*A. dest.* ad 1000 ml  
NaOH 1 N pH ad 8,2

## XII Abbildungsverzeichnis

### 1 Abbildungen

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Kurvenverlauf nach einer log <sub>10</sub> -Titration von Stx .....   | 36 |
| Abb. 2: Repräsentative Darstellung einer PBMC Kultur im Durchflusszytometer nach 96 h. 44   |    |
| Abb. 3: Repräsentative Darstellung von PBMC-Negativkontrollen im Durchflusszytometer 45   |    |
| Abb. 4: Makrophagenkultur im Durchflusszytometer nach acht Tagen Kultivierung im Teflonbeutel und 18 .....  | 59 |
| Abb. 5: Zytotoxische Aktivität der Periplasma-Fraktionen der rStx1 <sub>WT</sub> - und rStx1 <sub>mut</sub> - Transformanten in Abhängigkeit von der eingesetzten Verdünnung.....   | 63 |
| Abb. 6: Zytotoxische Aktivität der Periplasma-Fraktionen der rStx2 <sub>WT</sub> -und rStx2 <sub>mut</sub> - Transformanten in Abhängigkeit von der eingesetzten Verdünnung.....  | 63 |
| Abb. 8: Anteil an 7AAD <sup>-</sup> (n=6) und AnnexinV <sup>+</sup> -Zellen (n=5) in PBMC-Kulturen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen .....   | 67 |
| Abb. 9: Anteil der CD77 <sup>-</sup> , CD21 <sup>-</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8β <sup>-</sup> und γδ T <sup>+</sup> -Zellen in [%] nach Inkubation mit den Toxinpräparationen .....   | 69 |
| Abb. 10: Anteil CD21 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8β <sup>+</sup> und γδ-T <sup>+</sup> -Zellen in PBMC-Kulturen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle) .....                                      | 70 |
| Abb. 11: Anteil CD77 <sup>+</sup> -Zellen an allen Zellen und an den CD21 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8β <sup>+</sup> und γδ-T <sup>+</sup> -Zellen in [%] nach Inkubation mit den Toxinpräparationen .....   | 72 |
| Abb. 12: Anteil CD77 <sup>-</sup> - Zellen an allen Zellen und an den CD21 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8β <sup>+</sup> und γδ-T <sup>+</sup> - Zellen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle)..... | 73 |
| Abb. 13: Vergleich der Transkriptionsraten von IL-4 in [%] GAPDH (n=3).....   | 75 |
| Abb. 14: Transkriptionsrate in iIEL für IL-4 mRNA nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=3) .....  | 76 |
| Abb. 15: Nachweis der Expression von AnnexinV auf Makrophagen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=4) .....  | 77 |
| Abb. 16: Expression (MFI) von CD14 auf CD77 <sup>+</sup> -Makrophagen in [%].....   | 78 |

|  |    |
|--|----|
| Abb. 17: Expression (MFI) von CD14 auf CD77 <sup>+</sup> Makrophagen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=4) (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle) .....                | 78 |
| Abb. 18: Expression (MFI) von CD80 und CD86 auf CD77 <sup>+</sup> -Makrophagen nach Inkubation mit den Toxinpräparationen (n=4) (Werte normalisiert anhand der Vektorkontrolle) ....       | 79 |
| Abb. 19: Expression (MFI) von CD77 auf Makrophagen nach Inkubation mit rStx1 <sub>WT</sub> bzw. rStx2 <sub>WT</sub> und rStx1 <sub>mut</sub> bzw. rStx2 <sub>mut</sub> .....               | 80 |
| Abb. 20: Vergleich der Transkriptionsraten in Makrophagen für ausgewählte Zytokine/Chemokine nach Inkubation mit den Toxinpräparationen im Vergleich zur Inkubation mit dem „Vektor“ ..... | 81 |
| Abb. 21: Reduktion der spezifischen Bindung im ELISA von rStx <sub>WT</sub> und rStx <sub>mut</sub> nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern (Stx1: n=19, Stx2: n=4) .....             | 82 |

## 2 Tabellen

|   |     |
|---|-----|
| Tab. 1: Aminosäurekodierung .....   | 3   |
| Tab. 2: Primer für die Toxingen-Amplifikation .....   | 25  |
| Tab. 3: Reaktionsansatz für die Amplifikation des <i>stx1</i> - bzw. <i>stx2</i> -Gens .....                | 25  |
| Tab. 4: Reaktionsansatz zur Herstellung des <i>stx1</i> - bzw. <i>stx2</i> -Klonierungsinserts .....        | 26  |
| Tab. 5: Mutations-PCR, Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Stx1 (Ansatz A) bzw. Stx2 (Ansatz B) ..... | 30  |
| Tab. 6: Primer für die Mutagenese .....   | 30  |
| Tab. 7: Antikörper und andere Substanzen zur Immundekoration .....  | 43  |
| Tab. 8: Ansatz für die reverse Transkription .....  | 50  |
| Tab. 9: Basenfolge der Primer für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen .....                     | 51  |
| Tab. 10: Ansatz für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen .....                                   | 51  |
| Tab. 11: Basenfolge der in der TaqMan <sup>®</sup> -PCR verwendeten Primerpaare .....                       | 53  |
| Tab. 12: Zusammensetzung des PCR-Mix für die TaqMan <sup>®</sup> -PCR pro Ansatz (25 µl) .....              | 53  |
| Tab. 13: Basenfolge der in der TaqMan <sup>®</sup> -PCR verwendeten Sonden .....                            | 54  |
| Tab. 14: Vergleich der Gensequenzen von Stx1 und Stx2 vor und nach der Mutagenese .....                     | 61  |
| Tab. 15: Zytotoxische Aktivität verschiedener Fraktionen von aufgearbeiteten Transformantenkulturen .....   | 62  |
| Tab. 16: Eigenschaften von rStx <sub>WT</sub> und rStx <sub>mut</sub> .....                                 | 65  |
| Tab. 17: Vergleich „Vektor“ versus Toxinpräparation .....   | 74  |
| Tab. 18: Blutspendertiere für PBMC und Makrophagen .....  | 112 |

|   |     |
|---|-----|
| Tab. 19: Stx1Ak-Titer .....                   | 112 |
| Tab. 20: Stx2Ak-Titer .....                   | 113 |
| Tab. 21: Negative Seren .....                 | 113 |
| Tab. 22: Verwendete Geräte.....               | 113 |
| Tab. 23: Verwendete Chemikalien.....          | 115 |
| Tab. 24: Verwendetes Verbrauchsmaterial ..... | 117 |

## XIII Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Menge bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, die Konzeption und die Betreuung der Arbeit. Sein umfangreiches Wissen und die Bereitschaft, dieses jederzeit zu teilen, sowie seine konstruktive Kritik und Geduld haben wesentlich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Hilfe bei der Finanzierung dieser Arbeit.

Meinem Betreuer, Herrn Philip S. Bridger, PhD, danke ich für die unermüdliche Unterstützung und die Bereitschaft, auch kniffligen Fragen bis auf den Grund zu gehen.

Frau Gabriele Köpf sei gedankt für ihre Einarbeitung in sämtliche molekularbiologische Techniken und ihr offenes Ohr bei allen fachlichen und menschlichen Problemen.

Frau Dr. Julia Fröhlich danke ich für die Einarbeitung in Zellkulturtechniken sowie die Bereitstellung der verwendeten Seren. Durch Frau Ursula Leidner waren selbst Rückschläge in der Zellkultur leichter zu verkraften, dafür danke ich herzlich.

Herrn PD Dr. Hermann Willems sei gedankt für die Unterstützung bei der Herstellung der rekombinanten Proteine.

Frau Dr. Stefanie Barth danke ich für die Beantwortung zahlloser Fragen und die prompte Hilfe bei allen PC-Problemen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts Oberer Hardthof, insbesondere bei Herrn Axel Brandt, für die tatkräftige Unterstützung bei den Blutentnahmen.

Allen Doktoranden möchte ich für die unvergessliche Zeit, die Unterstützung und den Zusammenhalt danken, es war wirklich toll mit euch!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 535.

Danke sagen möchte ich meiner Oma Magdalene Kerner, die ein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit hatte.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Renate und Jürgen Kerner, die mich in jeder Lebenslage bedingungslos unterstützen und fördern und ohne deren Glauben an mich diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

---

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

Katharina Kerner



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5917-0



9 783835 195917 0