

---

**Untersuchungen zur Modulation intraepithelialer  
Lymphozyten des Rindes durch Shigatoxin 1  
von *Escherichia coli***

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

---

Maike Blessenohl



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

**Untersuchungen zur Modulation intraepithelialer  
Lymphozyten des Rindes durch Shigatoxin 1  
von *Escherichia coli***

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

Eingereicht von  
Maike Blessenohl  
Tierärztin aus Meschede

Gießen 2003

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

Dekan:

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

---

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Prof. Dr. M. Bülte

Tag der Disputation:

04.07.2003

Meinen Eltern  
und meinen Freunden

In der Tat: dir sind die Unterschiede nicht sehr wichtig, mir aber scheinen sie das einzig Wichtige zu sein. ..., Wissenschaft heißt Unterscheidungskunst.

H. H.



**Abkürzungsverzeichnis**

AB	Antibiotikum
A/E	attaching and effacing
APC	Antigen-präsentierende Zellen
aufg.	aufgereinigt
BL Zellen	Burkitt`s Lymphomzellen
BL-3	bovine Lymphomzellen, Linie3
Bo, bo	bovin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation, Differenzierungscluster
CD <sub>50</sub>	zytotoxische Dosis 50%
CFU	colony forming units
ConA	Concanavalin A
cp	zytopathogen
CT	Choleratoxin
DC	dendritische Zellen
depc	Diethylenpyrocarbonat
DiO	Diocadecyloxacarbocyanin-Perchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiotreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
Fa.	Firma
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel, entspricht der Dome-Region
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatographie
GALT	gut associated lymphod tissue, Darm-assoziiertes lymphoides Gewebe
Gb3	Globotriaosylzeramid
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HC	Hämorrhagische Colitis
HeLa Zellen	humane Zervixkarzinomzellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HEV	high endothelial venules, hohes endotheliales Epithel am Übergang Kapillare-Venole in lymphoiden Geweben
Hu, hu	human
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-1, 2, etc	Interleukin-1, -2, etc

## Abkürzungsverzeichnis

---

kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
KGF	keratinocyte growth factor, Keratinozyten Wachstumsfaktor
L-15	Leibowitz`Medium 15
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
LPL	Lymphozyten der Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LT	hitzelabiles Enterotoxin von <i>E. coli</i>
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MØ.Diff.Ag	Makrophagendifferenzierungsantigen
min	Minuten
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	mucosal disease
MDA	Mega Dalton
MHC I und II	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex I und II
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5 Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Versuche
nep	nicht zytopathogen
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
oberfl.	oberflächenständiges
OD	optische Dichte
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase-chain-reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PMA	Phorbol-myristat-acetat
PFA	Paraformaldehyd
PHA-P	Phytohämagglutinin P
p.i.	post infectionem
PI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP	Peyer`sche Platten
PWM	Pokeweed Mitogen
rBoIFN	rekombinantes bovines Interferon
rBoIL-2	rekombimantes bovines Interleukin 2
RDEC-1	kaninchenspezifischer EPEC-Stamm
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	Polymerase-Kettenreaktion nach vorheriger reverser Transkription von mRNA in cDNA zur Expressionsanalyse
SCF	stem cell factor
SC-Rezeptor	secretory component, sekretorischer Rezeptor
SDS	Dodezylsulfat Natriumsalz
sIgA, sIgM	sekretorisches Immunglobulin A, Immunglobulin M

SPF	spezifisch-Pathogen-frei
STEC	Shiga-Toxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoxin
StxA1	A-Fragment von Stx1
StxB1	B-Untereinheit von Shigatoxin1
TcR	T-Zell Rezeptor
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
WC	Workshop cluster



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1 Funktion und Bedeutung lokaler Lymphozyten im Darm.....	3
2.1.1 Histologischer Aufbau des Darms.....	3
2.1.2 Immunologische Kompartimente .....	5
2.1.2.1 GALT (= gut-associated lymphoid tissue) .....	5
2.1.2.2 LPL (= Lamina propria lymphocytes) .....	7
2.1.2.3 IEL (= intraepitheliale Lymphozyten).....	9
2.2 Shigatoxin.....	13
2.2.1 Aufbau .....	14
2.2.2 Rezeptor.....	15
2.2.3 Wirkmechanismen .....	15
2.2.4 Wirkung von Shigatoxinen auf Darmepithel und Lymphozyten.....	18
2.2.4.1 Translokation durch epitheliale Monolayer.....	18
2.2.4.2 Modulation der Zytokinproduktion von Darmepithelzellen.....	18
2.2.4.3 Lymphozyten und Monozyten.....	19
2.2.4.3.1 B-Zellen .....	19
2.2.4.3.2 T-Zellen .....	21
2.2.4.3.3 Monozyten .....	23
2.3 STEC-Infektionen beim Rind.....	23
3. Eigene Untersuchungen.....	26
3.1 Material und Methoden .....	26
3.1.1 Charakterisierung des verwendeten Shigatoxin 1 .....	26
3.1.2 Charakterisierung der rekombinanten B-Untereinheit von Stx1 (rStxB1).....	28
3.1.3 Aufreinigung und Biotinylierung monoklonaler Antikörper .....	29
3.1.4 Zellkulturmethoden .....	30
3.1.4.1 Verozellen.....	30
3.1.4.2 BL-3-Zellen .....	31
3.1.4.3 Hybridomzellen .....	31
3.1.4.4 Isolierung und Kultur von bovinen PBMC .....	31
3.1.5 Gewinnung boviner IEL .....	32
3.1.5.1 Herkunft des Probenmaterials .....	32

3.1.5.2 Vorversuche zur Optimierung der Methodik .....	32
3.1.5.3 Präparation ilealer IEL für weiterführende Untersuchungen .....	36
3.1.6 Phänotypische Untersuchungen an IEL.....	38
3.1.6.1 Morphologie der isolierten Zellsuspension .....	38
3.1.6.2 Verwendete monoklonale Antikörper .....	39
3.1.6.3 Probenvorbereitung für die Dreifarbenfluoreszenz .....	39
3.1.6.4 Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz.....	42
3.1.6.5 Probenvorbereitung für Bindungsstudien im Rahmen einer Zwei- bzw. Drei-farbenfluoreszenz .....	42
3.1.6.6 Nachweis intrazellulären Zytokeratins .....	43
3.1.7 Funktionelle Untersuchungen an IEL.....	44
3.1.7.1 Bestimmung der induzierten Transformation nach <i>in vitro</i> Kultur .....	44
3.1.7.2 Untersuchung der Antigenexpression von IEL in Abhängigkeit von Stx1 oder StxB1 nach <i>in vitro</i> Kultur und Datenanalyse .....	45
3.1.7.3 Durchflusszytometrische Messung der NK-Aktivität .....	46
3.1.7.3.1 Präparation von Zielzellen.....	46
3.1.7.3.2 Durchführung des NK-Aktivitätstests mit frisch isolierten IEL.....	46
3.1.7.3.3 Durchführung des NK-Aktivitätstests nach Stx1-Exposition der IEL .....	47
3.1.7.3.4 Durchflusszytometrische Messung und Datenanalyse .....	47
3.1.7.4 Nachweis der Transkription boviner Zytokingene .....	48
3.1.7.4.1 Inkubation von IEL zur Untersuchung des Einflusses von Stx1 auf die Transkription von Zytokingenen <i>in vitro</i> .....	48
3.1.7.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA .....	48
3.1.7.4.3 Reverse Transkription.....	51
3.1.7.4.4 Polymerase-Kettenreaktion .....	52
3.1.7.4.5 Untersuchung des Einflusses von Stx1 auf die Transkription von Zytokin- genen durch PBMC und IEL <i>in vitro</i> .....	55
3.1.7.4.6 Datenanalyse.....	56
3.2 Ergebnisse.....	58
3.2.1 Etablierung und Optimierung der Präparation boviner ilealer IEL .....	58
3.2.2 Histologische Beurteilung des Probenmaterials.....	65
3.2.3 Phänotypische Charakterisierung boviner IEL.....	66
3.2.3.1 Expression von Oberflächenantigenen bei ilealen IEL <i>ex vivo</i> .....	66
3.2.3.2 Aktivierungszustand ilealer IEL-Subpopulationen <i>ex vivo</i> .....	68

---

3.2.3.3 Vergleich der Zusammensetzung von IEL aus Ileum, Zäkum und Kolon ..	70
3.2.4 Expression des Stx1-Rezeptors durch bovine IEL <i>ex vivo</i> .....	72
3.2.4.1 Expression von CD77 .....	72
3.2.4.2 Bindung der rekombinanten B-Untereinheit von Stx1 (rStxB1).....	73
3.2.5 Wirkung von gereinigtem Stx1 auf ausgewählte Funktionen boviner ilealer IEL in vitro .....	74
3.2.5.1 Wirkung auf Vitalität und Transformation von IEL.....	74
3.2.5.2 Wirkung auf Vitalität und Transformation einzelner IEL-Subpopulationen .....	76
3.2.5.3 Wirkung auf CD77 <sup>+</sup> Zellen in den einzelnen IEL-Subpopulationen.....	80
3.2.5.4 Untersuchungen zur neutralisierenden Wirkung von anti-StxB1 .....	82
3.2.5.5 Wirkung von Stx1 auf die „Natürliche Killerzell-Aktivität“ der IEL .....	85
3.2.5.6 Wirkung von Stx1 auf die Transkription von Zytokinen durch IEL .....	87
3.2.6 Wirkung von gereinigtem Stx1 auf die Transkription von Zytokinen durch PBMC .....	95
4. Diskussion .....	99
5. Zusammenfassung .....	109
6. Summary.....	111
7. Anhang .....	113
7.1 Reagenzien.....	113
7.2 Puffer, Medien und Lösungen .....	115
8. Literaturverzeichnis .....	121



## 1. Einleitung

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), die zum Pathovar der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) gehören, lösen beim Menschen hämorrhagische Kolitiden (HC) aus, die sich zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS) entwickeln können (107). Hauptvirulenzfaktor der EHEC sind die Shigatoxine (Stx1 und Stx2 mit Varianten). Zielzellen dieser Toxine sind v.a. Endothelzellen (233). Untersuchungen, die die Induktion von Apoptose und die Modulation der Wirkung von Interferonen bei humanen B-Zellen durch Stx1 beschreiben (125, 130), lassen auch Lymphozyten als potentielle Zielzellen erscheinen. Es wird sogar ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Aktivierung mukosaler Lymphozyten im Darm und der Ausbildung von HUS vermutet (74).

Der Mensch infiziert sich mit STEC v.a. durch die orale Aufnahme von mit Wiederkäuerkot verunreinigten Nahrungsmitteln. Da es keine spezifische Therapie für das STEC-bedingte HUS des Menschen gibt, hat die Verhinderung der Infektion größte Priorität. Eine Expositionsprophylaxe ist jedoch schwierig, da weltweit bis zu 60 % der Rinder den Erreger mit dem Kot ausscheiden (40). Rinder infizieren sich bereits in den ersten Lebenstagen durch geringste Infektionsdosen (8). Nach der Besiedlung des Darms kommt es zur Persistenz. Die Tiere scheiden den Erreger lebenslang aus (64). Die für die Bekämpfung entscheidende Frage, warum STEC in der Lage sind, Wiederkäuer persistent zu infizieren und welche bakteriellen Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist bisher noch nicht beantwortet. Bei Schafen ist die Fähigkeit der STEC zur Persistenz mit der Fähigkeit zur Bildung von Stx assoziiert (33). Da Stx1 auf bovine Lymphozyten des peripheren Blutes (PBMC) wirken kann und die Proliferation dieser Zellen behindert (141), könnte ein immunmodulatorischer Effekt von Stx1 auf das Darm-assoziierte Immunsystem des Rindes der Persistenz der Infektion Vorschub leisten. Die Bestätigung dieser Hypothese setzt voraus, dass die an bovinen PBMC erhobenen Befunde auf die funktionell erheblich differierenden Lymphozyten aus der Darmschleimhaut übertragbar sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss von Stx1 auf die Zusammensetzung und die Funktion boviner intraepithelialer Lymphozyten (IEL) zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur Gewinnung vitaler IEL aus dem Ileum adulter Kühe etabliert. Die Zellen wurden *ex vivo* hinsichtlich der Expression des Stx-Rezeptors bzw. der Bindung der B-Untereinheit von Stx1 charakterisiert und die

## 2 Einleitung

---

Wirkung von gereinigtem Stx1 auf die Proliferation, die Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ und die Zytokinen-Expression der IEL *in vitro* untersucht.

## 2. Literaturübersicht

### *2.1 Funktion und Bedeutung lokaler Lymphozyten im Darm*

Schleimhäute sind die Barriere des Körpers zur Außenwelt. Sie regulieren den Gasaustausch, die Absorption von Nährstoffen, den Flüssigkeitshaushalt des Körpers und die Sekretion von Enzymen. Gleichzeitig kommt ihnen aber auch wegen ihrer exponierten Lage eine essentielle Bedeutung in der Abwehr von Krankheitserregern zu. Pathogene versuchen die Schleimhautbarriere zu überwinden oder zumindest an der Mukosa zu adhären. Die mukosalen Oberflächen des Gastrointestinaltraktes werden also nicht nur permanent mit Nahrungsantigenen und Produkten der Mikroflora konfrontiert, sie müssen diese auch von pathogenen Erregern und von diesen gebildeten Molekülen unterscheiden können.

Das Verständnis der immunologischen Zusammenhänge der Infektabwehr an diesen Oberflächen kann neue Ansätze zur Therapie infektiöser Darmerkrankungen eröffnen.

#### **2.1.1 Histologischer Aufbau des Darms**

Der Verdauungstrakt von Säugetieren besteht aus vier Schichten. Die äußere Begrenzung bildet ein einschichtiges Plattenepithel, die Tunica serosa. Ihre glatte Oberfläche stellt die Beweglichkeit des Verdauungstraktes im Körper sicher. Sie ist einer Muskelschicht, der Tunica muscularis, aufgelagert, die von einer äußeren Längsmuskelschicht, dem Stratum longitudinale, und einer inneren Ringmuskelschicht, dem Stratum circulare gekennzeichnet ist. In diese Muskelschichten eingelagert findet man den Plexus myentericus, dessen Funktion die nervale Regulation der Darmperistaltik ist. Die bindegewebige Tela submucosa trennt die Tunica muscularis von der Tunica mucosa, der luminalen Begrenzung des Darmes. Die Tunica mucosa besteht ihrerseits wieder aus drei Schichten. Die Lamina muscularis mucosae trennt die Tunica mucosa von der Submucosa. Darüber liegt die Lamina propria mucosae. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen, Drüsen sowie lymphatischen Zellen. Die luminale Epithelzellschicht wird als Lamina epithelialis mucosae bezeichnet (101).

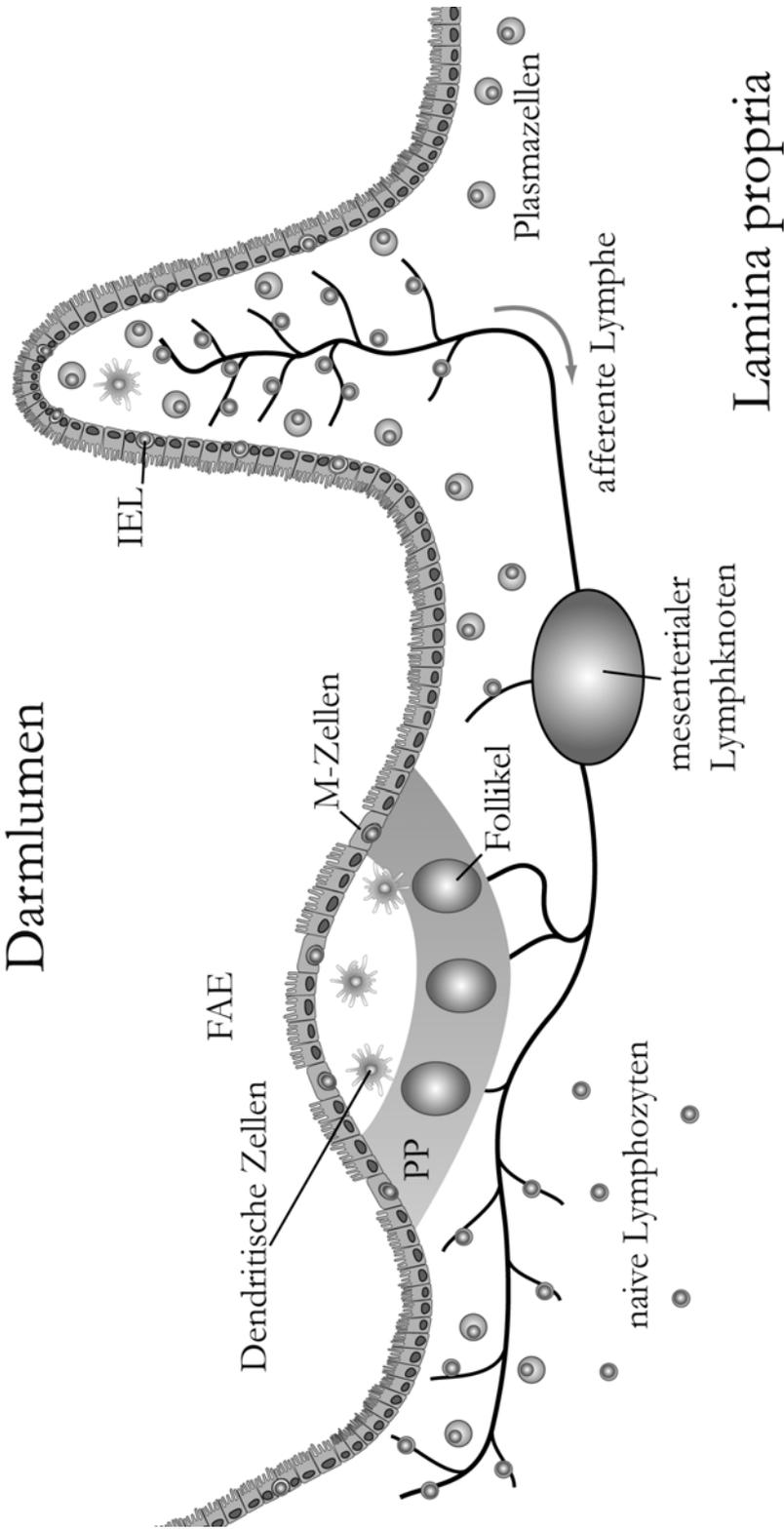


Abb. 1: Organisation des Darmschleimhautimmunsystems, FAE = Follikel-assoziiertes Epithel, PP = Peyer'sche Platten, IEL = intraepitheliale Lymphozyten

## 2.1.2 Immunologische Kompartimente

Der menschliche Gastrointestinaltrakt hat eine Oberfläche von  $400\text{m}^2$ , das 200fache der Hautoberfläche. Innerhalb dieses Gewebes befinden sich mehr Immunzellen als im gesamten restlichen Körper (146). Die Organisation des Darmschleimhautimmunsystems ist in Abb. 1 dargestellt.

Einzelne liegende Lymphozyten kommen im Darmschleimhautimmunsystem an zwei verschiedenen Orten vor. Entweder halten sie sich als intraepitheliale Lymphozyten (IEL) diffus verteilt an den basolateralen Oberflächen der intestinalen Epithelzellen oder innerhalb der Lamina propria auf. Zusätzlich kommen im Gastrointestinaltrakt organisierte lymphoide Strukturen vor. Jedes dieser immunologisch aktiven Kompartimente erfüllt unterschiedliche Aufgaben in der Infektabwehr und in der Erhaltung der Homöostase.

### 2.1.2.1 GALT (= gut-associated lymphoid tissue)

Lymphatische Gewebe des Gastrointestinaltraktes können aus solitären Lymphfollikeln und Ansammlungen von Lymphfollikeln bestehen (101). Im Dünndarm werden diese Ansammlungen von Lymphfollikeln als Peyer'sche Platten (PP) bezeichnet, im Kolon und Rektum als lymphatische Plaques (58). Bei der Maus wurden zusätzlich im Dün- und Dickdarm kleine Ansammlungen von Lymphozyten ( $<10^3$  Zellen) an der Basis der Mikrovilli identifiziert und als „Cryptopatches“ bezeichnet (103). Beim Menschen wurden auch Lymphozyten-gefüllte Mikrovilli beschrieben (142). Im Gegensatz zu den klassischen sekundären lymphatischen Geweben wie Milz und Lymphknoten sind die lymphatischen Gewebe des Gastrointestinaltraktes nicht von einer Kapsel umgeben und es führen keine afferenten Lymphbahnen zu den Follikeln (58). Die Lymphfollikel liegen in der Submucosa direkt unter der Lamina muscularis mucosae. Sie bestehen aus einem Keimzentrum mit proliferierenden B-Zellen, einigen  $\text{CD4}^+$  Zellen und mit phagozytierten apoptotischen Lymphozytenkernen gefüllten Makrophagen. Außen wird das Keimzentrum umlagert von kleinen Lymphozyten, die zu einem großen Teil IgA und IgD auf ihrer Oberfläche tragen. In der Interfollikulärzone sind dicht von Lymphozyten umlagerte hochendotheliale Venolen (HEV) zu finden (58). Diese sind die Eintrittspforte von aus dem Blut in die Follikel migrierenden Lymphozyten (244). Die PP des adulten Rindes bestehen zu 45 % aus T-Zellen und zu 25 % aus B-Zellen (152). Das Verhältnis  $\text{CD4}^+:\text{CD8}^+$  Zellen beträgt 1:1 (169). Sowohl vom Schaf als auch vom Rind ist bekannt, dass ihre B-Zellen in den Peyer'schen Platten

reifen können (67, 169). Für das Schaf konnte nachgewiesen werden, dass die PP im Jejunum v.a. der Induktion der mukosalen Immunität dienen (66), während die Bedeutung der ilealen PP in der antigenunabhängigen Diversifikation des Immunglobulin-Repertoires liegt (188). Die Follikel werden bei allen Spezies von spezialisierten Zellen des Epithels bedeckt, die als Dome-Region oder als Follikel-assoziiertes Epithel (FAE, siehe auch Abb. 1) bezeichnet werden. Jedes FAE ist ausschließlich einem Follikel zugeordnet. Es grenzt die Follikel vom Lumen ab und besteht neben der Epithelzellschicht aus verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Diese kommen oft gruppiert vor und sind in ihrer Zusammensetzung nicht identisch mit den IEL der Zotten. Zusätzlich sind dendritische Zellen und Makrophagen zu finden (58). Innerhalb der Epithelschicht befindet sich eine besondere Form von Epithelzellen, die M-Zellen. Diese Zellen machen speziesabhängig einen unterschiedlichen Prozentsatz des FAE aus. Beim Menschen beträgt der Prozentsatz M-Zellen an den Zellen des FAE ca. 10 % (165), beim Kaninchen 30-50 % (96) und bei Kalb und Schwein sind im Bereich des distalen Ileums nahezu alle Zellen des FAE auch M-Zellen (206). Aufgabe von M-Zellen ist der Transport von Antigen aus dem Darmlumen auf die basolaterale Seite der Zelle. Diese basolaterale Seite ist zu einer Tasche eingestülpt, so dass nur ein schmaler Zytoplasmasaum das Darmlumen von den unter den M-Zellen liegenden Lymphozyten und Makrophagen trennt. In der Nähe der apikalen Membran finden sich Vesikel mit hellem Lumen (155). M-Zellen transportieren Makromoleküle und feste Antigene in Vesikeln. Bei diesem Transport scheint es sich um eine Transzytose zu handeln (45, 110). Der Mangel an Lysosomen in M-Zellen gewährleistet, dass das Antigen unbeschädigt an der basolateralen Membran durch Exozytose abgegeben werden kann (58). Untersuchungen haben ergeben, dass die „tight junctions“ zwischen den M-Zellen und ihren Nachbarzellen dicht geschlossen sind, so dass ein parazellulärer Transport ausgeschlossen bzw. als unbedeutend bezeichnet werden kann (57, 128). Die Transzytose wird erleichtert durch die verglichen mit klassischen Enterozyten schwach ausgebildeten aggregierten Mikrofilamente an der Basis der M-Zellen (166). Es kommt jedoch auf der basolateralen Seite im Gegensatz zu klassischen Epithelzellen zu keiner Antigen-Präsentation. Das Antigen muß im Anschluß an die Transzytose noch bis zu den Keimzentren transportiert werden (174).

Die apikale Seite der M-Zellen zeichnet sich durch eine unregelmäßige Oberfläche aus. Beim Menschen befinden sich sogenannte Mikrofalten auf ihrer Oberfläche (164, 166), bei Kaninchen und Schweinen sind weit verzweigte Mikrovilli unterschiedlicher Dicke zu finden (57, 230). M-Zellen von Kälbern tragen stumpfe, dicht gepackte Mikrovilli, die eine unregelmäßige Form aufweisen (230). Es wird vermutet, dass die unregelmäßige

Oberflächenstruktur eine Adhärenz von Makromolekülen oder Mikroorganismen erleichtert. So binden bestimmte Bakterien bevorzugt an die Mikrovilli von M-Zellen. Dies ist für *Escherichia coli* (*E. coli*) (83, 84), *Vibrio cholerae* (167) und *Shigella flexneri* (171) beim Kaninchen gezeigt worden. Auch Typ1 Reoviren (250) und *Salmonella enterica* subspezies *typhimurium* (30, 99) binden im Mausmodell bevorzugt an die apikale Membran von M-Zellen. Beim Rind wurde ein ähnliches Verhalten von Astroviren und Bredaviren beschrieben (251). Der Adhäsion von infektiösen Mikroorganismen an M-Zellen liegt i.d.R. ein spezifischer Mechanismus zugrunde. Hierbei bindet das Reovirus Typ1 über ein virales Hämagglutinin (250), *Vibrio cholerae* dagegen über ein äußeres Membranprotein, ein fukosespezifisches Adhäsion (253). *Shigella flexneri* und RDEC-1 (ein aus dem Kaninchen isolierter enteropathogener *E. coli*-Stamm, O15:NM) können sich nur dann an M-Zellen heften, wenn sie ein bestimmtes Pilusplasmid tragen (83, 236). Zusätzlich existiert eine IgA-vermittelte Adhärenz (109, 175), die dem Wirt eine verstärkte Immunantwort gegen bereits bekannte Erreger ermöglicht. Erreger, die bereits einmal eine Immunantwort ausgelöst haben, werden im Lumen durch sIgA gebunden und erneut im Gewebe präsentiert, so dass ein „Boostereffekt“ ausgelöst wird (13, 168).

#### 2.1.2.2 LPL (= Lamina propria lymphocytes)

In der Lamina propria befindet sich ein großes Reservoir vereinzelt liegender Lymphozyten. 80 % aller immunoglobulinproduzierenden Immunozyten des Körpers befinden sich in diesem immunologischen Kompartiment (beim Menschen  $10^{10}$  Zellen/m Darm (20)). Dabei sind in der *Lamina propria* deutlich mehr Plasmazellen als B-Zellen zu finden (58). Die B-Zellen dieser Region gelangen nach Stimulation in den Lymphfollikeln über afferente Lymphbahnen in die regionalen Lymphknoten und rezirkulieren anschließend im Blut. Die Zellen werden später v.a. wieder im Darm, aber auch an den Schleimhäuten der Milchdrüse, des Urogenitaltraktes, in der Lunge und in der Tränendrüse wiedergefunden. Diese Tatsache wird mit dem Konzept des „common mucosal immune system“ beschrieben. Aufgabe der aktivierten B-Zellen ist die Produktion von Antikörpern. Im Bereich der Schleimhäute wird beim Menschen v.a. sekretorisches IgA (= sIgA) und IgM (= sIgM) gebildet (18). Bei adulten Rindern dagegen wird kaum IgM produziert, sondern stattdessen IgA und IgG in etwa gleicher Menge ins Darmlumen sezerniert (156). sIgA zeichnet sich einerseits durch seine hohe Resistenz gegenüber enzymatischem Verdau aus, andererseits ist es im Gegensatz zu IgM und IgG nicht in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren und so eine Entzündung auszulösen (18). Diese Eigenschaft ermöglicht die Eliminierung vieler Antigene, ohne eine

entzündliche Reaktion hervorzurufen. Die in der *Lamina propria* produzierten Antikörper können sowohl an bereits in die Schleimhaut eingedrungene Antigene binden, als auch von Enterozyten in das Darmlumen transloziert werden und im Lumen Antigene neutralisieren (18). Von großer Bedeutung für die Erhaltung der Homöostase ist ihre Fähigkeit, bakterielle Toxine zu neutralisieren (11) und so Entzündungen und schweren Schädigungen des Gastrointestinaltraktes vorzubeugen. IgA wird als Monomer von den Zellen produziert und anschließend über eine sogenannte J-Kette zu einem Dimer verbunden. Diese Dimere, von denen vermutet wird, dass sie Antigene besser agglutinieren können als Monomere, binden an den secretory component Rezeptor (SC-Rezeptor), der konstitutiv von klassischen Enterozyten auf der basolateralen Membran exprimiert wird und mit hoher Affinität polymerisierte Immunglobuline wie IgA und IgM bindet. Diese werden anschließend durch den Enterozyten in das Darmlumen transloziert und dort unter Spaltung des Rezeptors freigesetzt (19). Hierbei wird auch ein Teil des Rezeptors, die sogenannte sekretorische Komponente (SC), in das Lumen abgegeben. Dieser Teil des Rezeptors hat sich im Laufe der Transzytose fest mit den Immunglobulinen verbunden. Er schützt Antikörper, insbesondere sIgA, vor Proteolyse. Die SC kann auch ohne vorhergehende Transzytose vom in der Epithelzelle verbleibenden C-terminalen Ende des Rezeptors abgespalten und in das Darmlumen freigesetzt werden. Das ca. 80 kD große Molekül stabilisiert die Struktur von sIgM und scheint eosinophile Granulozyten aktivieren zu können (119). Wird die SC in hohen Konzentrationen in das Darmlumen abgegeben, kann sie die Adhärenz von Enterotoxischen *Escherichia coli* (ETEC) an Epithelzellen verhindern (60).

Ca. 30 % der Zellen der Lamina propria sind T-Zellen. Das Verhältnis der CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> Zellen entspricht mit 2:1 etwa dem des Blutes (91). Ein großer Teil dieser Zellen befindet sich in einem aktivierten Zustand und zeichnet sich durch eine hohe Expression des IL-2-Rezeptors und von MHC II aus. Auf mitogene Stimulation reagieren diese Zellen mit einer verstärkten Transkription von IL-2 (255). T-Zellen der Lamina propria von Menschen, Primaten und Nagern zeigen nahezu ausschließlich den Phänotyp von Gedächtniszellen. Sie besitzen, verglichen mit T-Zellen aus dem Mesenteriallymphknoten, die ein Gemisch aus naiven und bereits differenzierten T-Zellen darstellen, die ausgeprägte Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen wie IL-2, Interferon- $\gamma$  und besonders IL-4 und IL-5. Gleichzeitig proliferieren sie in Anwesenheit von IL-2 stark (93). Die CD4<sup>+</sup> Zellen zeigen eine deutliche T-Helferaktivität (93). Es wird vermutet, dass ihre Hauptfunktion die Modulation von B-Lymphozyten zu Immunglobulin-produzierenden Zellen ist (58). Die CD8<sup>+</sup> Zellen, die nahezu alle die  $\alpha\beta$  Kette

des T-Zell-Rezeptors exprimieren, zeigen häufig den Phänotyp von zytotoxischen T-Zellen und seltener eine Antigenexpression, die auf eine Suppressoraktivität schließen läßt (92).

### 2.1.2.3 IEL (= intraepitheliale Lymphozyten)

Die intestinale Mukosa besitzt spezielle Immunzellen, die intraepithelialen Lymphozyten, die eingestreut an der basolateralen Membran der Epithelzellen liegen. Wegen der dicht geschlossenen „tight junctions“ der Epithelzellschicht haben sie keinerlei Kontakt zum Darmlumen. Beim Menschen kommen auf 100 Enterozyten im Dünndarm bis zu 20 IEL, im Dickdarm sind es nur etwa 5. Sie zeichnen sich durch einen ungewöhnlichen Phänotyp aus (49, 76). Diese Tatsache hat u.a. zu der Vermutung geführt, intestinale IEL könnten auch außerhalb des Thymus reifen. Die T-Zell-Population der IEL besteht sowohl aus Zellen, die die  $\alpha\beta$  Kette des T-Zell Rezeptors (TcR) exprimieren, als auch aus  $\gamma\delta^+$  T-Zellen. Bei vielen Spezies kommt die Subpopulation, die die  $\gamma\delta$  Kette des TcR trägt, zu einem auffallend hohen Prozentsatz innerhalb der IEL vor (207). Nahezu alle  $\alpha\beta$  T-Zellen sind, wie die meisten T-Zellen des Körpers, thymisch gereift (102), d.h. die unreifen T-Zellen, die zu diesem Zeitpunkt phänotypisch weder CD4 noch CD8 exprimieren, wandern aus dem Knochenmark in den Thymus. Im Anschluß an eine Differenzierungsphase werden die Zellen zunächst der positiven Selektion unterworfen, in der alle Zellen, die kein körpereigenes MHC erkennen, eliminiert werden. In der folgenden negativen Selektion werden die Zellen, die eine besonders hohe Affinität an körpereigenes MHC, das ein körpereigenes Peptid präsentiert, zeigen, apoptotisch (104). Die verbleibenden Zellen verlassen den Thymus in gereifter Form und exprimieren neben dem CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex entweder CD4 oder CD8. Es wird vermutet, dass die Reifung von T-Zellen auch extrathymisch, z.B. im Gastrointestinaltrakt stattfinden kann (121). Die extrathymische Reifung wird v.a. durch die Tatsache belegt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenso wie  $CD8\alpha\alpha^+$  T-Zellen (240) im Gegensatz zu den klassischen  $\alpha\beta$  T-Zellen auch in athymischen Mäusen als IEL nachweisbar sind (7). Bei der Maus wird in den neu entdeckten „Cryptopatches“ der Ort der intestinalen extrathymischen Reifung vermutet (103). Die lokale Reifung von Lymphozyten setzt Mechanismen voraus, die der positiven und negativen Selektion im Thymus gleichen, um autoreaktive Vorgänge durch extrathymisch gereifte IEL zu verhindern (102). Poussier *et al.* konnten eine positive und negative Selektion nicht nur in Mäusen mit physiologischer Thymusfunktion, sondern auch in athymischen Mäusen nachweisen, weshalb man davon ausgehen kann, dass auch im Darm eine Form der Selektion stattfindet (176). IEL besitzen z.T. eigene Signaltransduktionswege. Während bei

thymisch gereiften peripheren T-Zellen der CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex u.a. elementar aus den CD3 $\zeta$  und CD3 $\eta$  Polypeptiden besteht, nutzen CD8 $\alpha\alpha^+$  IEL neben der CD3 $\zeta$ -Kette auch das Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ -Polypeptid (68). Handelt es sich bei den CD8  $\alpha\alpha^+$  T-Zellen um  $\alpha\beta$  T-Zellen, so ist für ihre positive Selektion die Anwesenheit von MHC I essentiell, sind es dagegen  $\gamma\delta$  T-Zellen, reifen diese lokal unabhängig von MHC I und MHC II (116).

90 % der humanen IEL sind CD45R0 $^+$ , d.h. es handelt sich um Gedächtniszellen. Nur 10 % der Zellen zeigen mit einer Expression von CD45RA $^+$  den Phänotyp naiver T-Zellen (205). Während im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen des Menschen etwa 95 % der T-Zellen die  $\alpha\beta$  Kette des TcR tragen und nur 5 % die  $\gamma\delta$  Kette (207), beträgt der Anteil  $\gamma\delta^+$  T-Zellen innerhalb der IEL mit 5-15 % im Dünndarm und bis zu 40 % im Dickdarm einen deutlich höheren Prozentsatz (102). Bei der Maus stellen die  $\gamma\delta$  T-Zellen 50 % der IEL-Population (254). Der prozentuale Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Gesamt-T-Zellen im peripheren Blut des Rindes liegt mit 20-40 % deutlich höher als bei Mensch oder Maus (127). Im Gegensatz zu diesen ist somit der Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen im Dünndarm des Kalbes mit 23-27 % durchaus vergleichbar mit den Blutwerten (241). Während im Blut nahezu alle  $\gamma\delta$  T-Zellen zusätzlich zum T-Zell Rezeptor 1 (TcR1) auch die Antigene WC1 und N2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, sind diese Moleküle nur auf etwa 7-8 % (WC1), bzw. 8-9 % (N2) der bovinen Lymphozyten in Duodenum, Jejunum und Ileum zu finden. Betrachtet man den Dünndarm des Rindes, tragen ca. 86 % der Zellen im Duodenum, 72 % der jejunalen IEL und 65 % der ilealen Zellen das Antigen CD3. B-Zellen können v.a. im Ileum (15,2 %) nachgewiesen werden, im Jejunum (5,8 %) und Duodenum (2,1 %) ist der Anteil deutlich niedriger. Der prozentuale Anteil der CD8 $^+$  Zellen liegt im Ileum bei 28,2 %, der der CD4 $^+$  Zellen bei 5,8 %. Im Ileum tragen 23 % der Zellen MHC II, im Jejunum sind es 17 %, im Duodenum 10 %. Eine Expression von MHC I wurde auf 71 % der Zellen im Dünndarm adulter Rinder nachgewiesen (149). Die Expression von CD25, der  $\alpha$  Kette des IL-2-Rezeptors, ist im Duodenum am stärksten (23 %) und nimmt zum Ileum hin ab (17 %). 20-26 % der bovinen  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimieren ACT-2, ebenso wie 24-34 % der CD8 $^+$  Zellen, so dass diese Zellen als aktiviert bezeichnet werden können. Eine Koexpression von CD4 und CD8 konnte beim Rind nur auf 0,7-0,9 % der Zellen gefunden werden (241). Diese Zellpopulation (CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ ) kommt bei anderen Spezies in größerer Zahl vor, bei Mäusen macht sie einen großen Teil der CD4 $^+$  Population aus (144). Ihr wird wegen ihrer Fähigkeit zur Produktion von IL-2 und Interferon  $\gamma$  und zur Reaktion auf MHC I-Präsentation durch intestinale Epithelzellen eine bedeutende Rolle in der Infektabwehr zugeschrieben (254). Außerdem wird vermutet, dass diese T-Zellen athymisch reifen (69).

Die Fähigkeit, auf einen Stimulus mit Proliferation zu reagieren, gehört zu den Funktionen von Lymphozyten. IEL verschiedener Spezies zeigen *in vitro* ein unterschiedliches Verhalten auf mitogene Stimulation. Während porcine IEL auf eine Stimulation mit PHA-P, ConA oder PWM proliferieren, ist bei murinen IEL keine Aktivierung festzustellen (249). Diese beginnen erst nach Zugabe von aus der Milz isolierten adhärent wachsenden Zellen (Makrophagen oder dendritische Zellen) bei Zusatz von ConA, PHA-P oder LPS in das Medium zu proliferieren (145). Andere Autoren beschreiben allerdings eine gute Proliferation muriner IEL auf einen mitogenen Stimulus hin. Dies gilt jedoch nur für Thy-1<sup>+</sup> angereicherte Zellpopulationen (diese bestehen fast ausschließlich aus  $\alpha\beta$  T-Zellen), nicht aber für Thy-1<sup>-</sup> angereicherte Zellsuspensionen, die sich fast ausschließlich aus  $\gamma\delta$  T-Zellen zusammensetzen (235). Bovine IEL proliferieren nach Zugabe von rBoIL-2 und ConA (153). Wird rBoIL-2 durch rBoIFN- $\alpha$ 1 oder rBoIFN- $\gamma$  ersetzt, kommt es zu einer Hemmung der Proliferation (151). IEL können also stimuliert werden und reagieren auf exogen zugeführte Zytokine.

Sie sind auch in der Lage, *in vitro* selbst Zytokine zu synthetisieren. So wird von den  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus sowohl Interferon  $\gamma$  als auch IL-5 sezerniert (114). Taguchi *et al.* konnten zeigen, dass  $\alpha\beta$  T-Zellen der intestinalen Mukosa diese Zytokine in größerer Menge zu produzieren in der Lage sind. Die Zugabe von anti-CD8 Antikörpern erhöhte die Zytokinproduktion zusätzlich (226). Auch IL-3 wird v.a. von murinen  $\alpha\beta$  T-Zellen (Thy-1<sup>+</sup>) sezerniert, während die  $\gamma\delta$  T-Zellen (Thy-1<sup>-</sup>) auf Stimulation kaum IL-3 synthetisieren (235). Kulturüberstände von porcinen IEL hemmen die virale RNA-Synthese in der Zellkultur. Dabei geht eine stärkere Inhibition von den Überständen ConA stimulierter Zellen aus, verglichen mit Überständen unstimulierter IEL. Die anti-virale Aktivität und die Tatsache, dass der Effekt bei pH 2 deutlich abgeschwächt wird, deuten auf eine Produktion von Interferon  $\gamma$  durch IEL des Schweines hin (249). Die IL-2 Produktion durch bovine IEL *in vitro* ist beschrieben worden (1). Neuere Untersuchungen belegen, dass IEL noch viele andere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine synthetisieren. Dies dient u.a. der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase. Von intradermalen  $\gamma\delta$  T-Zellen ist bekannt, dass sie einen Wachstumsfaktor für die Epithelzellen der Haut produzieren, den **kertinocyte growth factor (KGF)** (14). Diesem kommt wahrscheinlich eine essentielle Bedeutung in der Wundheilung zu (94). Auch bei intestinalen  $\gamma\delta$  T-Zellen wird die Produktion eines solchen Wachstumsfaktors vermutet, der für die Differenzierung der Zellen in den Krypten von Bedeutung sein könnte. Diese Vermutung wird getragen von der Tatsache, dass die Zellteilung der Epithelzellen in  $\gamma\delta$  T-Zell-defizienten Mäusen zwar unverändert ist im Vergleich zum Wildtyp, diese aber auf dem Weg an die Zottenspitze vermehrt absterben

(118). Einen weiteren Beitrag zur Erhaltung der Homöostase bilden der von Epithelzellen gebildete stem cell factor (SCF) und sein Ligand auf IEL c-kit. Die genaue Bedeutung dieser zwei Komponenten ist noch nicht bekannt. Allerdings hat es sich gezeigt, dass SCF und c-kit defiziente Mäuse deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen IEL-Population aufweisen. Der Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen sinkt drastisch, während der Prozentsatz  $CD4^+CD8^+$  T-Zellen ansteigt (177).

Die Antigenerkennung durch IEL findet nicht auf dem Weg der klassischen MHC I-vermittelten Antigenpräsentation statt, sondern über MHC-verwandte Moleküle wie das humane CD1d (116). Erschwert wird das Verständnis der Antigenerkennung durch die Tatsache, dass das T-Zell-Rezeptor-Repertoire im Gegensatz zu dem peripherer Lymphozyten oligoklonalen Ursprungs ist (116) und deshalb nur die Erkennung weniger, eventuell stark konservierter Strukturen erlaubt. Das Superantigen von *Staphylococcus aureus* B, eine Struktur, die  $\alpha\beta$  T-Zellen unabhängig von der Spezifität ihres TcR stimuliert, aktivierte die Thy-1<sup>+</sup>-Population muriner IEL, nicht aber die Thy-1<sup>-</sup>Population (235). Bezüglich der  $\gamma\delta$  T-Zellen ist die oligoklonale Expression der  $\delta$ -Kette bei Adulten spezifisch für ein Individuum, das über Jahre Zellen des gleichen Ursprungs in der Darmschleimhaut beherbergt. Innerhalb einer Population zeigen sich allerdings keine Überschneidungen, d.h. jedes Individuum trägt eine spezifische  $\gamma\delta$  T-Zell-Rezeptorausstattung (28, 80). Die Struktur des  $\gamma\delta$  TcR ähnelt eher der Struktur von Antikörpern als der des  $\alpha\beta$  TcR (190). Tanaka *et al.* konnten zeigen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen Antigene auch dann erkennen, wenn sie nicht zu Peptiden prozessiert werden (227). Die Erkennung erfolgt unabhängig von einer MHC I-Präsentation (243). Dies ermöglicht  $\gamma\delta$  T-Zellen neoplastische oder infolge einer Infektion geschädigte Zellen ohne vorherige AG-Prozessierung allein durch direkte Bindung an eine bestimmte Oberflächenstruktur oder an ein bestimmtes Epitop zu erkennen (227). Alle IEL tragen ein bestimmtes Integrin,  $\alpha_E\beta_7$ , auf ihrer Oberfläche. Sein natürlicher Ligand ist das von Epithelzellen exprimierte E-cadherin.  $\alpha_E\beta_7$  wird von Zellen v.a. auf Stimulation mit TGF $\beta$  produziert (146). Seine Funktion wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird postuliert, dass die Bindung von  $\alpha_E\beta_7$  an seinen Liganden IEL unterhalb der Epithelzellen festhält (146). Andererseits ist zu bedenken, dass E-cadherin auf Epithelzellen nicht nur eine zentrale Rolle in den Zell-zu-Zell-Kontakten hat, sondern auch während der Wanderung der Epithelzellen aus den Krypten an die Zottenspitze exprimiert wird und vermutlich regulatorisch in die Differenzierungsvorgänge der Epithelzellen im Laufe dieser Wanderung eingreift. Die Expression von E-cadherin soll die Epithelzellen schützen vor einer IEL-induzierten Apoptose (63). Die Steuerung der Eliminierung der Epithelzellen an der Zottenspitze erfolgt vermutlich durch zytolytische  $\gamma\delta$  T-

Zellen (118) über eine Expression von FasL, der an Fas auf den Epithelzellen bindet (102). Gestützt wird diese These durch Beobachtungen am jejunalen Epithel von Rindern. Standen intraepitheliale  $\gamma\delta$  T-Zellen in engem Zell-zu-Zell-Kontakt zu Enterozyten der Zotten, zeigten diese für apoptotische Zellen charakteristische morphologische Veränderungen (221).

*In vitro* Untersuchungen verschiedener Autoren haben gezeigt, dass IEL zytotoxische Kapazität haben. Allerdings scheint es speziesspezifische Unterschiede zu geben. Beim Nager wurde sowohl eine Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ (NK-Zellen) (Maus) (117, 225), als auch eine Antigen-vermittelte und eine mitogen induzierbare Zytotoxizität (Meerschweinchen) nachgewiesen (5). Godson *et al.* konnten beim Kalb eine MHC I-unabhängige Zytotoxizität feststellen (61). Dagegen tragen beim Menschen 38,9 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen typische Oberflächenantigene für NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>). Diese zeigen aber kaum zytotoxische Aktivität. Im Gegensatz dazu exprimieren innerhalb der Lymphozyten des peripheren Blutes nur 6,4 % die entsprechenden Antigene, sie fallen aber durch eine deutlich höhere NK-Aktivität auf (41). Ein vergleichbares Ergebnis ergab die Untersuchung der NK-Aktivität von Lymphozyten des Schweines. Die Immunzellen des peripheren Blutes zeigten eine deutliche Zytotoxizität, IEL dagegen blieben inaktiv. Nach mitogener Stimulierung der Zellen mit PHA-P konnte jedoch eine verstärkte Zytotoxizität ermittelt werden (248).

Hoang *et al.* konnten zeigen, dass IEL aus dem Kolon des Menschen in der Lage sind, die Proliferation autologer Lymphozyten aus der Lamina propria zu hemmen (77). Auch von IEL des Rindes ist eine ConA-induzierte Suppressor-Aktivität beschrieben worden. Diese ist abhängig von der Anwesenheit von Monozyten/Makrophagen (150).

## 2.2 Shigatoxin

Bakterien der Gattung *Escherichia*, die Shigatoxin produzieren, werden als STEC bezeichnet. Das Toxin ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an dem Vorschlag von Calderwood *et al.* (25). Danach wird das Shigellentoxin als Stx bezeichnet, die Toxine von *Escherichia coli* erhalten arabische Ziffern und z.T. auch Buchstaben nachgestellt. Stx von *Shigella dysenteriae* und Stx1 von *Escherichia coli* unterscheiden sich auf Proteinebene in nur einer Aminosäure in der A-Untereinheit (89, 105, 159, 162). Die übrigen Stx sind mit weniger als 60 % Homologie deutlich von Stx und Stx1 zu unterscheiden. Innerhalb der Stx2 Untergruppe besteht eine mindestens 90 %ige-

Homologie bezüglich Stx2, Stx2c, Stx2d und Stx2e (135). Während Stx chromosomal kodiert ist, sind die übrigen Gene für Shigatoxine in Prophagengenome integriert (107, 158, 184, 242).

### 2.2.1 Aufbau

Shigatoxine gehören zu den heteromeren Proteintoxinen, die aus einer aktiven A-Untereinheit und einem für die Rezeptorbindung verantwortlichen Pentamer von B-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Es bestehen strukturelle Ähnlichkeiten zu dem pflanzlichen Toxin Rizin sowie dem hitzelablen Toxin von ETEC und dem Cholera-toxin von *Vibrio cholerae* (159). Das Holotoxin bildet sich durch spontane Zusammenlagerung der A- und dem Pentamer der B-Untereinheiten ohne Ausbildung kovalenter Bindungen aus (43, 87). Hierbei ist die A-Untereinheit asymmetrisch mit drei der fünf B-Untereinheiten verbunden (53). Das A<sub>2</sub>-Fragment ragt in eine von den B-Untereinheiten gebildete zentral gelegene ladungsneutrale Pore (15, 53, 189, 216).

Die A-Untereinheit von Stx1 ist ein aus 293 Aminosäuren zusammengesetztes Polypeptid (35, 70); jede einzelne B-Untereinheit besteht aus 69 Aminosäuren (70, 204). Die *stx*-Gene kodieren jeweils für die Polypeptidketten, die die Untereinheiten bilden und eine vorgeschaltete Signalsequenz (35, 89, 203), die bei Ausschleusung in den periplasmatischen Raum abgespalten wird (44, 89). Die fünf B-Untereinheiten lagern sich spontan ohne Ausbildung kovalenter Bindungen zu einem Ring zusammen (180). Zwischen den Monomeren bildet sich eine Tasche, die an der Rezeptorbindung beteiligt ist (216).

Die A-Untereinheit besteht aus zwei verschiedenen Fragmenten, dem A<sub>1</sub>- und dem A<sub>2</sub>-Fragment. Sie enthält eine Disulfidbrücke (35) und eine Trypsin-sensitive Schnittstelle. Die Spaltung der A-Untereinheit in ein A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Fragment ist essentiell für die Ausbildung der enzymatischen Aktivität des A<sub>1</sub>-Fragmentes (120). Das A<sub>2</sub>-Fragment blockiert mit seinem C-terminalen Ende für die Aktivität der A<sub>1</sub>-Untereinheit wichtige Bereiche (53). Die Spaltung der A-Untereinheit erfolgt proteolytisch in Zytoplasma und Endoplasmatisches Retikulum (56). Das 27 kDa große A<sub>1</sub>-Fragment kann nach der Abspaltung seine N-Glycosidase-Aktivität entfalten. Die Funktion der A<sub>2</sub>-Untereinheit scheint dagegen ausschließlich die Sicherstellung der Struktur des Holotoxins zu sein, für die beide A-Fragmente notwendig sind (6, 35).

### 2.2.2 Rezeptor

Der Rezeptor von Stx1 ist Globotriaosylceramid (Gb<sub>3</sub>), der immunologisch auch als CD77 bezeichnet wird (90, 124, 193, 237, 238). Gb<sub>3</sub> gehört wegen der Art der chemischen Bindungen und der Abfolge der Zucker der Globo-Reihe der Glycosphingolipide an (71). Es besteht aus einem Trisaccharid, das an ein Ceramid, also ein Sphingosin verbunden mit einer Fettsäure, gebunden ist. Terminal liegt eine  $\beta$ 1-4 glykosidisch mit einer Glukose verbundene Galabiose. Die Glukose ist an das Ceramid über eine  $\beta$ 1-glykosidische Bindung an die endständige Hydroxylgruppe des Sphingosins gekoppelt (124, 170). Stx1 erkennt an dem Rezeptor die endständige Galabiose, d.h. zwei  $\alpha$ 1-4 glykosidisch verbundene Galaktosereste. Diese werden sowohl in Form eines Disaccharides (193) als auch integriert in Oligosaccharidketten erkannt (21, 123, 238). Die Bindung an lipidfreie Oligosaccharide erfolgt eher schwach (212). Sie findet bevorzugt an Moleküle statt, in denen die Kohlenhydratkette an Lipide oder Proteine gekoppelt ist (123). Das hydrophobe Ceramid liegt in die Zellmembran eingebettet, die hydrophile Kohlenhydratkette bildet einen nahezu rechten Winkel und steht aus der Membran heraus (170). Die Präsentation der Zuckerketten ist wichtig für die Affinität der Bindung des Toxins an den Rezeptor. Gb<sub>3</sub> ist eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen. Während die Kohlenhydratgruppe konserviert ist, kann sich das Ceramid aus verschiedenen Bestandteilen zusammensetzen. Sphingosin kann durch Dihydrosphingosin ersetzt werden (71, 170). Die Fettsäuren können in vollständiger, teilweiser oder nicht hydroxylierter Form vorliegen. Die Affinität der Bindung von Stx an Gb<sub>3</sub> hängt wesentlich von der Länge der Fettsäurekette ab (112).

Gb<sub>3</sub> wird im Anschluß an eine Stimulation *in vitro* von allen Subpopulationen boviner Lymphozyten des peripheren Blutes synthetisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert. Es wird zunächst nur mit geringer Rezeptordichte exprimiert, bei steigender Kulturdauer und vermehrter Aktivierung der Zellen jedoch immer stärker. Mit dem zunehmenden Aktivierungsgrad der PBMC verändert sich auch die Zusammensetzung der Fettsäureketten von Gb<sub>3</sub> auf den bovinen Zellen. Während zu Beginn der Stimulation noch Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 C-Atomen vorherrschen, sind nach 4tägiger Kultur v.a. Fettsäureketten mit 20 und mehr C-Atomen nachzuweisen (140).

### 2.2.3 Wirkmechanismen

Die Stx können verschiedene Wirkungen auf empfängliche Zellen haben. So können sie nach rezeptorvermittelter Internalisierung und Prozessierung ihre N-Glykosidase-Aktivität

entfalten und die Proteinbiosynthese der betroffenen Zellen hemmen (22, 24). Die Bindung an Gb<sub>3</sub> ruft jedoch nicht zwangsläufig eine Endozytose des Toxins hervor (88). Auch ohne Aufnahme des Toxins genügt bei bestimmten Zellen bereits die Bindung der B-Untereinheit an den Rezeptor um Apoptose auszulösen (162). Zusätzlich übt Stx in bestimmten Fällen einen funktionsmodulierenden Effekt aus.

Grundvoraussetzung für die Entfaltung der enzymatischen Aktivität des Toxins ist die endozytotische Aufnahme in die Zelle. Diese Internalisierung erfolgt i.d.R. über Rezeptorbindung in Clathrin-ausgekleideten Gruben (178, 200); es ist aber auch ein parallel existierender Aufnahmeweg in Zusammenhang mit Caveolin beschrieben (202). Nach Internalisierung liegt der Toxin-Rezeptorkomplex in einem Endosom vor (197). Dieses fusioniert mit sauren Vesikeln, so dass ein pH von 5-6 entsteht. Die Endosomen werden durch Mikrotubuli zum Golgi-Apparat transportiert (98, 194, 197, 199) und zum Endoplasmatischen Retikulum und der Kernmembran weitergeleitet (97, 195, 200). Je nach Länge der Fettsäuren des Gb<sub>3</sub>-Moleküls schlägt der Toxin-Rezeptorkomplex einen anderen Transportweg ein (196, 198). Alternativ kann das Toxin nach Internalisierung auch wieder an die Zelloberfläche transportiert, transzytotisch durch die Zelle geleitet oder in den Lysosomen verstoffwechselt werden (200). Zur Entfaltung der enzymatischen Toxinwirkung kommt es allerdings nur nach Transport bis in das ER oder zur Kernmembran. Die Abspaltung des A2-Fragments findet im Endosom oder im trans-Golgi-Apparat unter Beteiligung der Protease Furin statt (56, 120). Das A1-Fragment durchtritt die Vesikelmembran des ER, gelangt ins Zytosol (159) und zu seinen Zielstrukturen, den Ribosomen (47, 197). Die daraus resultierende Hemmung der Proteinbiosynthese durch Stx wurde bereits zu Beginn der Stx-Forschung nachgewiesen. Reisberg *et al.* (185) konnte 1981 in einem zellfreien System zeigen, dass Stx die ribosomale 60S Untereinheit eukaryotischer Zellen hemmt. Diese Untereinheit enthält drei Teile, eine 5S, eine 5,8S und eine 28S rRNA Untereinheit. Die Hemmung erfolgt durch Verhinderung der Bindung der t-RNA an die Akzeptor-Region der ribosomalen RNA (23, 160). Die *in vitro*-Gabe von Stx1 oder Stx2 zu Rattenribosomen verursachte die Freisetzung von Adeninbasen an der Position 4324 der 28S rRNA, woraus man auf die Inaktivierung der 60S Untereinheit durch Spaltung einer N-glykosidischen Bindung an dieser Stelle schließen kann (47). Eine ähnliche Wirkung wie auf eukaryotische Ribosomen konnte auch an bakteriellen Ribosomen beobachtet werden. Sie äußerte sich in einer sinkenden Vermehrungsrate infolge einer verminderten Proteinsynthese empfindlicher Bakterien, wie z.B. *E. coli* (209, 220). So kann durch Produktion von Stx ein Besiedlungsvorteil der STEC gegenüber anderen

Kommensalen, deren Wachstum durch Anwesenheit von Shigatoxin gehemmt wird, entstehen.

Shigatoxine können bei verschiedenen Zellen Apoptose auslösen. Der Mechanismus, über den Stx in der Lage sind, den programmierten Zelltod zu induzieren, scheint nicht immer identisch zu sein. Während bei Verozellen die charakteristische DNA-Fragmentierung nur in Anwesenheit von Stx1, nicht aber von StxB1 beobachtet werden kann (85, 201, 246), gelingt die Apoptoseinduktion bei humanen Astrozytomzellen sowohl durch Verwendung des Holotoxins als auch allein durch Inkubation mit der B-Untereinheit von Stx1 (4). Jones *et al.* beschreiben eine Induktion von Apoptose in HEp-2-Zellen sowohl mit dem Holotoxin als auch mit seiner B-Untereinheit, die allerdings in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegen muß (100). In transfizierten HeLa-Zellen, die die genetische Information für die Produktion von StxA1 oder StxB1 tragen, löst das enzymatisch aktive A-Fragment eine Nekrose der Zellen aus, die intrazellulär vorliegende B-Untereinheit jedoch eine Apoptose (154). Generell scheinen verschiedene zelluläre Faktoren beteiligt zu sein an der Auslösung des programmierten Zelltodes. Nach Bindung von Stx1 an Gb<sub>3</sub> auf Burkitt-Lymphom-Zellen (BL-Zellen) wurde eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, eine verstärkte Ceramid-Produktion und ein gestiegenes cAMP-Niveau der Zellen festgestellt. Letzteres führte zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Durch Hemmung der Calciumkanäle konnte die Stx1-abhängige Induktion der Apoptose verhindert werden. Gleichzeitig war eine Induktion der Apoptose von BL-Zellen durch Zugabe von exogenem Ceramid, Calciumionophoren oder durch Stimulation der intrazellulären cAMP-Freisetzung möglich (224). Auch von Verozellen ist eine Beteiligung der PKA bekannt. Zusätzlich wird die Aktivierung der ebenfalls cAMP-abhängigen Proteinkinase C (PKC) beschrieben (247). Weder die PKA noch die PKC sind am Eintritt des Toxins in die Zelle oder an seinem Transport beteiligt. Wichtige Voraussetzung für das Auslösen der Apoptose scheint generell ein erhöhter Ca<sup>2+</sup> und cAMP-Spiegel durch Stx oder StxB zu sein. Kiyokawa *et al.* stellten in Ramos BL-Zellen eine Stx1-induzierte sofortige Aktivierung der Kaspasen-3, -7 und -8 fest und fanden Hinweise auf einen der Fas-vermittelten Apoptose ähnlichen Ablauf der Kaspase-Kaskade (113). In HeLa-Zellen und Zellen einer Mausfibroblastenlinie (NIH3T3) wurde die Information für StxB1 in das Genom integriert. Ohne Anwesenheit der enzymatisch wirksamen A-Untereinheit aktivierte StxB1 im Zytoplasma von HeLa-Zellen die Kaspase-Kaskade, v.a. Kaspase-1 und die Kaspase-3 (154). Während die Versuche zur Expression von StxB1 in HeLa-Zellen und die daraus resultierende Apoptose nahelegen, dass nicht die Bindung mindestens der B-Untereinheit des Toxins an Gb<sub>3</sub> das auslösende Ereignis des

Toxin-abhängigen programmierten Zelltodes ist, zeigten Jones *et al.*, dass Stx1 zwar bei Gb<sub>3</sub> positiven CaCo2 und HEp-2-Zellen apoptotische Veränderungen induzieren kann, nicht aber auf Gb<sub>3</sub>-negativen T84-Zellen (100). Letzere sind allerdings durchaus, vermutlich über einen alternativen Rezeptor, in der Lage, Stx durch einen Monolayer und somit auch durch die Einzelzelle zu transportieren (3). Diese kontroversen Ergebnisse erklären sich vermutlich durch zellspezifische Unterschiede.

### **2.2.4 Wirkung von Shigatoxinen auf Darmepithel und Lymphozyten**

#### **2.2.4.1 Translokation durch epitheliale Monolayer**

Die zytotoxische Wirkung von Shigatoxin auf humane Primärkulturen von Kolon- und Ileumzellen ist bereits länger bekannt. Diese äußert sich v.a. in einer Reduktion der Proteinbiosynthese und der DNA-Synthese (147). In der Kultur humaner Darmepithelzelllinien (T84, CaCo2A) konnte nachgewiesen werden, dass Stx in der Lage sind, von apikal nach basolateral zu gelangen. Gleichzeitig verbleibt Inulin, eine Substanz, die die Membranen nur auf parazellulärem Weg passieren kann, in Anwesenheit von Stx auf der apikalen Seite (3, 172). Bei der Stx-Translokation durch Epithelzelllinien handelt es sich um einen sättigbaren Effekt. Auch nach 24 Stunden ist keine Beeinträchtigung der Integrität des Zellrasens festzustellen. Sowohl Stx1 als auch Stx2 sind nach der Translokation vollständig biologisch aktiv (2). Die Tatsache, dass die Translokation bei 4 °C drastisch reduziert wird und der Transport von Stx nahezu vollständig hemmbar ist durch Zugabe eines Inhibitors der oxidativen Phosphorylierung (2,4 dinitrophenol), lässt auf einen energieverbrauchenden Prozess schließen (3). Der Transport erfolgt grundsätzlich effektiver von apikal nach basolateral als umgekehrt und ist auch nachzuweisen, wenn Stx-produzierende Bakterien den Zellrasen besiedeln (2). Dass T84-Zellen kein Gb<sub>3</sub> exprimieren, aber trotzdem Stx durch einen Monolayer translozieren, weist auf einen Transportmechanismus hin, der an einen alternativen Rezeptor gekoppelt ist (172).

#### **2.2.4.2 Modulation der Zytokinproduktion von Darmepithelzellen**

Bei *Shigella dysenteriae* Typ 1-Infektionen des Menschen wurden deutlich erhöhte Zytokinkonzentrationen im Stuhl der Patienten gemessen (183). Gleichzeitig waren im Rektum vermehrt Epithelzellen mit erhöhter Zytokinproduktion nachzuweisen (182).

Untersucht wurden IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$  und GM-CSF (181, 183). Während ein Großteil der Zytokine in der akuten Phase der Erkrankung auch die höchsten Konzentrationen im Stuhl erreichten, war IFN  $\gamma$  erst in der Konvaleszenzphase erhöht (183).

Die Kultur humaner Hct-8-Zellen in Medium, das mit Stx angereichert war, resultierte in der vermehrten Freisetzung von chemotaktisch wirksamem IL-8 durch die Epithelzellen (229). Ähnlich wie bei TNF- $\alpha$  wird auch bei IL-8 eine Induktion über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vermutet (148). In diesem Versuch zeigte sich keine generelle Hemmung der Proteinbiosynthese, sondern Stx war in der Lage, die Freisetzung bestimmter, für die Homöostase der Darmschleimhaut und die Induktion einer Immunantwort wichtiger Moleküle selektiv zu modulieren. Diese Ergebnisse lassen auch eine Beeinflussung der Freisetzung verschiedenster Zytokine durch Zellen des Gastrointestinaltraktes des Wirtes im Rahmen einer Shigelleninfektion als mögliches Resultat der Wirkung von Stx erscheinen.

### 2.2.4.3 Lymphozyten und Monozyten

Gelingt es dem Toxin im Verlauf einer STEC-Infektion die Darmbarriere in biologisch aktivem Zustand zu überwinden, tritt es in direkten Kontakt zu den Immunzellen der Darmschleimhaut. Eine mögliche Modulation der Immunzellfunktionen könnte für den Verlauf einer STEC-Infektion von entscheidender Bedeutung sein.

#### 2.2.4.3.1 B-Zellen

Bei Menschen sind reife B-Zellen hochempfindlich für Stx. Der Shigatoxin-Rezeptor Gb<sub>3</sub> wird von reifen präapoptischen B-Zellen in den Keimzentren exprimiert (131). Es wird ein Zusammenhang der Gb<sub>3</sub>-Expression mit der physiologischen Selektion von B-Zellen in den Keimzentren vermutet (224). Auch auf B-Zellen des peripheren Blutes kann Gb<sub>3</sub> induziert werden. Voraussetzung ist eine langandauernde Bindung von CD40 an einen Liganden, wie sie bei der Aktivierung von B-Zellen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen gleicher Spezifität im Lymphknoten stattfindet (133). In Gb<sub>3</sub><sup>+</sup> BL-Zellen resultiert ein Kontakt mit Stx in der Induktion von Apoptose (130, 224). Mangeney *et al.* gelang es, die Apoptose auch durch sehr hohe Konzentrationen von StxB1 auszulösen (130). Dagegen konnten Marcato *et al.* eine Apoptose nur durch hohe Konzentrationen rStxB2, aber nicht durch rStxB1 induzieren. Es gibt Hinweise, dass die Apoptose nur nach Internalisierung von rStxB2 ausgelöst wurde (132). Für die Induktion des programmierten Zelltodes ist dementsprechend vermutlich kein

intaktes Holotoxin notwendig und der Effekt scheint in keinem kausalen Zusammenhang mit der Hemmung der Proteinbiosynthese durch die A-Untereinheit des Holotoxins zu stehen.

Von dem toxischen Effekt des Toxins scheinen v.a. IgG- und IgA-produzierende B-Zellen und weniger die IgM- und IgD-Produzenten betroffen zu sein (31). Vermutet wird, dass es durch die Zerstörung von B-Zellen zu der geringen Produktion von Antikörpern kommt. So konnten Bitzan *et al.* bei 3 % der gesunden Kontrollgruppe und lediglich bei 9 % der Patienten mit O157-assoziiertem HUS Antikörper gegen Stx1 finden (12). Andere Untersuchungen belegen jedoch eine hohe Seroprävalenz. Bei 70 % der HUS-Patienten wurden IgG-Antikörper gegen Stx2 festgestellt (126). Diese Ergebnisse werden gestützt von Untersuchungen, in denen Stx-Antikörpertiter von Stadtbewohnern verglichen wurden mit denen von Bewohnern bäuerlicher Milchviehbetriebe. Bei letzteren wurde durch häufige Keimexposition in geringen Mengen ein „Boostereffekt“ erwartet. Tatsächlich waren im Serum von 42 % der Bauern, aber nur von 7 % der Stadtbevölkerung Antikörper gegen Stx1 vorhanden (187). In Anbetracht der Ergebnisse erscheint es mehr als fraglich, dass *in vivo* die Induktion der Apoptose in B-Zellen des Menschen in einer reduzierten humoralen Immunantwort resultiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Seroprävalenz könnten entstehen, weil durch die Patienten im Verlauf einer Infektion unterschiedlich große Mengen an Stx aufgenommen werden. Es ist denkbar, dass in manchen Fällen die absolute Toxinmenge, wie dies bereits für das Tetanustoxin beschrieben ist, ausreicht, einen biologischen Effekt zu erzielen, aber zu niedrig ist, um eine messbare Antikörperproduktion zu induzieren (106).

Auch beim Schwein existieren widersprüchliche Untersuchungen zur Produktion von Antikörpern im Verlauf einer STEC-Infektion. Christopher-Hennings *et al.* untersuchten die Antikörpertiter gegen injizierte Schaferythrozyten von gnotobiotischen Schweinen, die zuvor mit einem Stx1-produzierenden STEC und einem *stx*-negativen EPEC infiziert worden waren. Sie zeigten, dass die Antikörpertiter der Tiere, die mit dem Stx-Produzenten besiedelt waren, signifikant niedriger ausfielen als in den EPEC-infizierten Schweinen (29). Da die beiden Bakterienstämme sich jedoch auch noch in anderen Virulenzfaktoren als der Toxinproduktion unterschieden, ist dieser Befund nicht zwangsläufig auf eine immunsuppressive Wirkung des Toxins zurückzuführen. Franke *et al.* bestimmten die Antikörpertiter an Ödemkrankheit erkrankter Schweine gegen Stx2e in einem Zeitraum von 40 Tagen. Während am Tag 4 nur 1 % der Tiere IgG Antikörper gegen Stx2 produzierten, waren es am Tag 40 bereits 10 % der Tiere (52). Die längere Dauer der Stx-Exposition scheint sich auch bei Schweinen positiv auf

die Bildung von Antikörpern ausgewirkt zu haben, so dass hier ein ähnlicher Effekt wie beim Menschen vermutet werden kann.

Bei Rindern, die als Reservoirwirt regelmäßig Kontakt mit STEC und ihrem Toxin haben, wird die Bildung von Antikörpern gegen Stx wesentlich häufiger beobachtet als bei Mensch oder Schwein (16, 173). Trotzdem konnten Ferens *et al.* auch hier bei BLV-positiven Rindern einen hemmenden Effekt von Stx1 Holotoxin oder seiner A-Untereinheit auf die virusinduzierte spontane Proliferation beobachten; die PBMC der BLV-negativen Kontrollgruppe zeigten keine Beeinträchtigung der Proliferationsrate durch Stx1. Die verminderte Proliferation war jedoch nicht auf ein vermehrtes Absterben von virushaltigen B-Zellen zurückzuführen (48). Dagegen stellten Menge *et al.* auch bei BLV-negativen Tieren eine deutliche Proliferationshemmung von mitogen-induzierten PBMC in Anwesenheit von Stx1 fest. B-Zellen zeigten sich besonders empfänglich für eine Stx1-Wirkung (141).

#### 2.2.4.3.2 T-Zellen

Zu den physiologischen Funktionen von Lymphozyten gehört ihre Fähigkeit, auf eine immunogene Aktivierung mit klonaler Expansion zu reagieren. *In vitro* kann dieser Effekt durch Zugabe mitogener Substanzen simuliert werden.

Humane PBMC zeigten bei Inkubation mit Stx dosisabhängig eine deutlich reduzierte mitogene Stimulierbarkeit durch Phytohämagglutinin (PHA), die mit einer Hemmung der Proteinbiosynthese einherging (111).

Beim Rind wiesen Menge *et al.* eine allgemeine Hemmung der Transformationsrate aller T-Zellsubpopulationen mitogen stimulierter PBMC durch Stx1 nach. In diesen Versuchen wurde die Population der  $CD8\alpha^+$  T-Zellen am deutlichsten inhibiert. Die reduzierte Transformationsrate ging einher mit einem verminderten Anteil  $CD77^+$  Zellen. Der Effekt scheint sich auf stimulierte Zellen zu beschränken und konnte nicht auf die Induktion von Apoptose oder Nekrose durch das Toxin zurückgeführt werden (141). Auch die Zugabe verschiedener Zytokine zum Kulturmedium (TNF- $\alpha$  und IL-2) beeinflusste den transformationshemmenden Effekt nicht. Nach Supplementierung des Kulturmediums mit Interferon- $\alpha$  wurde der Stx1-induzierte Effekt noch verstärkt. Da Interferon- $\alpha$  nur dann mit hoher Affinität an seinen Rezeptor binden kann, wenn dieser mit CD77 vergesellschaftet ist, lag die Vermutung nahe, dass eine hohe Interferon- $\alpha$  Konzentration den transformationshemmenden Effekt von Stx1 durch kompetitive Hemmung aufheben könnte. Diese Theorie wurde im Experiment jedoch nicht bestätigt (139). Die Ergebnisse lassen auf

eine direkte Beeinflussung der PBMC und nicht auf eine Zytokin-vermittelte Immunmodulation durch Stx1 schließen.

Die Expression von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf T-Zellen ist bisher ausschließlich beim Rind beschrieben worden. Auf frisch isolierten T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Rindern ist zunächst keine Rezeptorexpression festzustellen. Die Präsentation des Rezeptors auf der Zelloberfläche ist jedoch durch mitogene Stimulation bei verschiedenen Lymphozytensubpopulationen induzierbar. Die Rezeptorexpression und die Rezeptordichte auf den Einzelzellen ist abhängig von der Stärke des mitogenen Stimulus und vom Aktivierungsgrad der Zellen. Ruhende, nicht zu Blasten transformierte PBMC exprimieren CD77 nicht oder tragen nur wenige Moleküle auf ihrer Oberfläche. Transformierte Zellen dagegen tragen den Rezeptor in sehr hoher Dichte auf ihrer Oberfläche. Werden die Zellen mehr als 4 Tage *in vitro* kultiviert, steigt der Anteil CD77<sup>+</sup> Zellen mit hoher Rezeptordichte innerhalb der subvitalen Zellen stark an. Nicht nur die Rezeptordichte sondern auch die chemische Zusammensetzung von CD77 ändert sich im Verlauf der Kultur. Während zunächst Rezeptorstrukturen mit C16-Fettsäuren vorherrschen, enthalten die Zellen nach 4 tägiger Inkubation v.a. Rezeptoren bestehend aus C20-Fettsäuren (140). Wettbewerbsstudien haben gezeigt, dass bovine Stx1-Rezeptoren zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten rStxB1 mit unterschiedlicher Affinität binden. RStxB1 wurde v.a. zu einem frühen Zeitpunkt der Stimulation gebunden, zu dem die Expression von CD77 noch niedrig war. Daraus wurde geschlossen, dass bovine PBMC nur im Frühstadium ihrer Aktivierung empfänglich sind für eine Wirkung von Stx1.

Bovine PBMC sind *in vitro* in der Lage, Stx1 oder rStxB1 zu internalisieren. Für die Reduktion der metabolischen Aktivität und die Hemmung der Expansion der Zellen zu Blasten genügt bereits die Bindung von StxB1. Allerdings ist dazu eine 50000fach höhere Konzentration verglichen mit der des Holotoxins nötig (213).

Die meisten Daten, die Lymphozyten als Zielzellen von Stx ausweisen, wurden *in vitro* erhoben. Sugatani *et al.* konnten bei Mäusen *in vivo* nachweisen, dass die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten 24 Stunden nach intravenöser Applikation von Stx2 in Milz und peripherem Blut deutlich niedriger war als in den Kontrollgruppen. 45 Stunden nach der Injektion konnte eine verminderte Anzahl B220<sup>+</sup> Zellen (entspricht CD20<sup>+</sup> B-Zellen) in der Milz nachgewiesen werden. Wurde den Mäusen gleichzeitig mit Stx2 auch LPS injiziert, verstärkten sich die Effekte des Toxins. Bei einer Gabe von Stx2 gefolgt von einer LPS-Injektion wenige Stunden später reagierten die Lymphozyten der Milz bis zu 50 % weniger auf LPS als in den

Kontrolltieren. Ob der Nachweis einer geringeren Anzahl Lymphozyten auf einem vermehrten Absterben der Lymphozyten, einer verminderten Proliferation der Zellen oder aber auf einer Kombination beider Faktoren beruht, war durch dieses Experiment nicht zu klären (219).

Die PBMC gnotobiotischer mit STEC1 infizierter Schweine und STEC2 infizierter Kälber, zeigten im Vergleich zu den Lymphozyten der Kontrollgruppe, eine deutlich reduzierte Proliferation auf Stimulation mit verschiedenen Mitogenen (ConA, PHA, PWM) (29, 79) und bestätigen somit ebenfalls die *in vitro* erhobenen Daten.

#### **2.2.4.3.3 Monozyten**

Durch Modulation der Zytokinfreisetzung von Wirtszellen können bakterielle Exotoxine in die interzelluläre Kommunikation des Wirtsorganismus eingreifen. Stx gehört zu den potentesten Modulatoren der Zytokinproduktion (73). Erst die Veränderung der Zytokinmuster durch Stx ermöglicht die hohe biologische Aktivität von kleinen Toxinmengen, indem Zytokine z.B. die Gb<sub>3</sub>-Synthese durch empfängliche Zellen induzieren (233).

Stx bewirkt in humanen Monozyten (179) keine Hemmung der Proteinbiosynthese. Im Gegenteil, sowohl Stx1 als auch Stx2 können dosisabhängig die Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 (179) und IL-6 (234) aus Monozyten hervorrufen. Die verstärkte Transkription von TNF- $\alpha$  resultiert aus einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Stx1 und der Translokation von NF- $\kappa$ B und des Transkriptionsaktivatorkomplexes AP-1 in den Zellkern. Für die Signaltransduktion in der humanen monozytären Zelllinie THP-1 ist die Anwesenheit des Holotoxins nötig (192). Foster *et al.* beschreiben eine Abhängigkeit der Stx1-vermittelten TNF- $\alpha$  Synthese durch THP-1-Zellen von der Anwesenheit einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit des Toxins (51).

### **2.3 STEC-Infektionen beim Rind**

STEC-Infektionen können bei Kälbern bis zu einem Lebensalter von 3 Wochen Erkrankungen auslösen. So traten bei experimentellen Infektionen von Kälbern mit einem STEC O157:H7-Stamm profuse, z.T. auch blutige Durchfälle auf (38). Von entscheidender Bedeutung für die

Pathogenese war die Fähigkeit des STEC-Stammes das Protein Intimin zu synthetisieren. Dieses Protein wird zusammen mit anderen Virulenzfaktoren durch den bakteriellen „locus of enterocyte effacement“ codiert und ermöglicht die aktive Anheftung von Bakterien an die Darmschleimhaut des Wirtes unter Ausbildung von attaching and effacing-Läsionen (A/E). Bakterien, die diese Fähigkeit nicht besaßen, konnten auch keine Krankheitssymptome hervorrufen (40). Entsprechend waren bei erkrankten Kälbern histologisch A/E-Läsionen im Bereich von Ileum, Zäkum, Kolon und Rektum verbunden mit hochgradiger Entzündung des umliegenden Gewebes nachzuweisen. Der Verlauf der Infektion war abhängig vom Lebensalter der Tiere. Wurden Kälber im Alter von etwa 12 Stunden bzw. von 30-36 Stunden experimentell mit dem gleichen O157:H7-Stamm infiziert, erkrankten 18 Stunden p.i. Tiere beider Altersgruppen, aber bei den älteren Kälbern waren die histologisch nachweisbaren A/E-Läsionen deutlich reduziert (38). Eine vergleichbare Altersabhängigkeit ist auch für *E. coli*-Isolate anderer Serovare beschrieben worden (72, 129, 252). Allerdings konnten Dean-Nystrom *et al.* auch zeigen, dass sogar 3-4 Monate alte Kälber, die bis zum Zeitpunkt der Inokulation mit  $10^{10}$  CFU eines O157:H7-Stammes ausschließlich mit Milchaustauscher ernährt wurden, vier Tage p.i. A/E-Läsionen im Bereich von Rektum und Zäkum aufwiesen (39). Die Zeitspanne, in der Kälber empfänglich für STEC-Infektionen sind, hängt demnach auch von der Art der Ernährung ab. Bislang gibt es keinerlei Hinweise, dass Stx an der Pathogenese dieser auch nach natürlicher Infektion auftretenden Erkrankung der Kälber beteiligt sein könnte. So konnte die orale Gabe von Kolostrum, das Antikörper gegen Stx1 enthielt, die Tiere nicht vor einer Erkrankung schützen. Ausserdem waren 3 Tage p.i. bei STEC-infizierten Kälbern, die Durchfall entwickelten, keine Schädigungen von Endothelzellen, den Hauptzielzellen von Stx bei anderen Spezies, festzustellen (38).

Veterinärmedizinische Bedeutung hat die STEC-Infektion erwachsener Rinder, da diese Tiere neben anderen Hauswiederkäuern das Reservoir der humanpathogenen STEC darstellen (2, 9). Offensichtlich sind STEC gut an den Wiederkäuer adaptiert, denn verglichen mit anderen *E. coli* Pathotypen (ETEC und EPEC) verbleiben sie deutlich länger im Darm der Tiere (33) und werden intermittierend ausgeschieden (108). Bei experimentell infizierten adulten Rindern konnten weder klinische Symptome festgestellt noch pathologisch-histologische Befunde erhoben werden (34). Es ist bislang noch unbekannt, weshalb STEC in der Lage sind, Wiederkäuer persistent symptomlos zu infizieren und welche bakteriellen Faktoren hierbei eine Rolle spielen. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass Lymphozyten zu den Zielzellen von Stx1 beim Rind gehören und es gibt viele Hinweise auf eine immunmodulierende Wirkung des Toxins auf Immunzellen (siehe Kapitel 2.2.4.3). Allerdings

induziert Stx offensichtlich keine generelle Immunsuppression, denn die Tiere produzieren Antikörper gegen Stx (173) und sind auch gegenüber anderen STEC-Antigenen immunkompetent (239). Somit wirkt sich wahrscheinlich ein immunmodulatorischer, die Persistenz der bovinen STEC-Infektion begünstigender Effekt des Stx, nur auf die Schleimhaut des infizierten Darmabschnittes aus. Aufgrund ihrer grossen räumlichen Nähe zu den auf der Schleimhaut sich bildenden STEC-Mikrokolonien sind IEL die ersten Immunzellen, auf die das luminal gebildete Stx einwirken könnte .

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material und Methoden

##### 3.1.1 Charakterisierung des verwendeten Shigatoxin 1

Shigatoxin 1 wurde nach Produktion durch das bovine STEC-Feldisolat 2403 (STEC1, Serotyp rau:H-) (245) affinitätschromatographisch wie von Menge beschrieben (137) aufgereinigt und der Endotoxingehalt der konzentrierten Toxinlösung durch Passage über eine Detoxigel®-Säule reduziert. Das Toxin wurde bei  $-80\text{ °C}$  in aliquotierter Form gelagert und je Aliquot maximal 2 mal aufgetaut. Die verwendete Toxincharge enthielt nominal  $50000\text{ CD}_{50}/\text{ml Stx1}$ . Sie wurde je nach Bedarf durch Verdünnen in Medium oder NaCl-Lösung (Verozellen) auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Alle im Folgenden angegebenen  $\text{CD}_{50}$ -Werte wurden ausgehend von der oben genannten Konzentration der Toxincharge berechnet. Zur Überprüfung der Toxizität dieser Toxincharge wurden Verozellen parallel zu einem IEL-Versuch in unregelmäßigen Abständen in einem modifizierten Test nach Gentry und Dalrymple (1980) eingesetzt (59). In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurden drei Komponenten mit einem Volumen von je  $50\text{ }\mu\text{l}$  pipettiert. Die erste Komponente enthielt ein Aliquot der zu testenden Toxincharge verdünnt in NaCl-Lösung (0,89 %). Sie wurde logarithmisch verdünnt ( $\log_{10}$  Verdünnung). Als Positivkontrolle wurde SDS-Lösung (1 % in NaCl-Lösung) verwendet, als Negativkontrolle NaCl-Lösung. Die zweite Komponente enthielt das Zellkulturmedium 1. Als dritte Komponente wurde eine Zellsuspension mit  $4 \times 10^4$  Verozellen in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. In die äußeren Vertiefungen wurden je  $100\text{ }\mu\text{l}$  NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz pipettiert.

Jeder Test wurde im Dreifachansatz angesetzt und immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei  $37\text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und Wasserdampfsättigung im Brutschrank. Alle 24 h wurden die Platten mikroskopisch kontrolliert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer von 4 Tagen erfolgte die Auswertung des Tests. Zytotoxische und zytostatische Effekte wurden kolorimetrisch 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 lilafarbenem Formazan umgesetzt (65). Der im MTT-Test bestimmte Parameter wird als Stoffwechselaktivität bezeichnet. Der Test wurde in der Modifikation nach Tada *et al.* durchgeführt (223). Am Ende der Inkubationsdauer wurden je Ansatz 25  $\mu$ l der MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte 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  $\mu$ l SDS-HCl-Lösung (10 % in 0,01N HCl) mit anschließender Fortsetzung der Inkubation über Nacht.

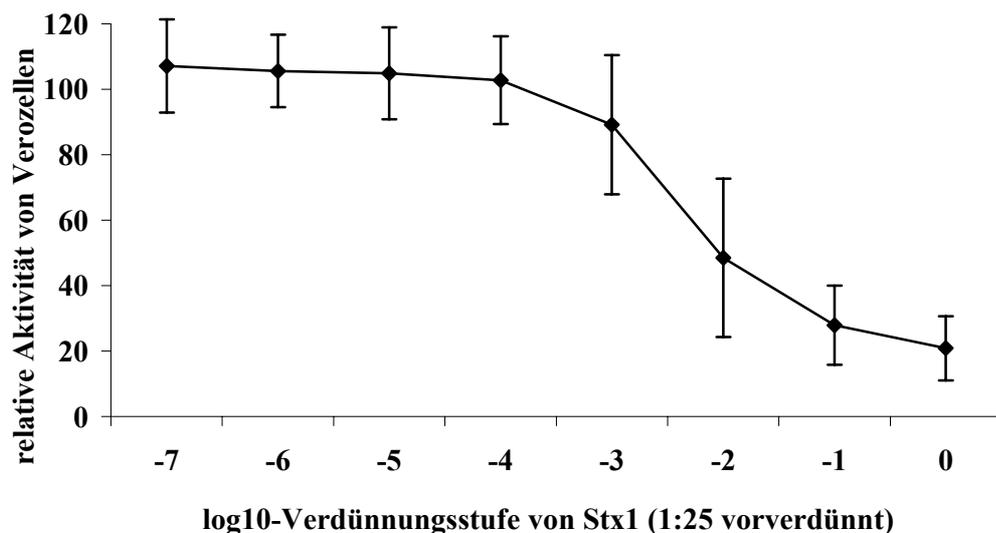


Abb. 2: Titration von Stx1 auf Verozellen; gezeigt wird die Abhängigkeit der relativen Stoffwechselaktivität von Verozellen (y-Achse) von der Stx1-Konzentration (x-Achse, log10-Verdünnung);  $n = 21$  Bestimmungen aus 7 Testansätzen, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen

Die Messung der Extinktionsdifferenzen  $OD_{abs}$  (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Vertiefungen erfolgte mit einem Titertek Multiskan® MCC/340 Plattenphotometer (Fa. Flow).

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

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

Die Abbildung 2 veranschaulicht die Mittelwerte aller während dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätskontrollen der verwendeten Stx1-Charge. Die daraus abgeleitete durchschnittliche toxische Dosis der unverdünnten Toxinpräparation zum Zeitpunkt der Verwendung bei IEL-Versuchen betrug 109125  $CD_{50}/\text{ml}$ . Die tatsächliche Toxinkonzentration lag damit über der in den Vorversuchen bestimmten Konzentration von 50000  $CD_{50}/\text{ml}$ . Da bei dem verwendeten Testsystem Abweichungen um den Faktor 2 als geringfügig betrachtet werden können, beziehen sich die Konzentrationsangaben für Stx1 in dieser Arbeit durchgängig auf die ursprünglich in den Vorversuchen ermittelte Konzentration.

Ein Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test, Fa. BioWhittaker, Inc.) wurde freundlicherweise durchgeführt von Frau Annette Bickenbach, Zentrum für Innere Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, und ergab einen Endotoxingehalt von 166  $\text{pg}/\text{ml}$  in der Stx1-Stammlösung der verwendeten Charge. Die Stx1-Toxincharge wurde in den Versuchen mit IEL und PBMC 1:250 mit endotoxinfreiem Zellkulturmedium verdünnt, so dass sich eine Endotoxin-Endkonzentration von 0,664  $\text{pg}/\text{ml}$  ergibt.

### 3.1.2 Charakterisierung der rekombinanten B-Untereinheit von Stx1 (rStxB1)

Die rekombinante B-Untereinheit von Stx1 (rStxB1) wurde von einem mit dem Plasmid pSU108 transformierten *E. coli* K12-Stamm DH5 $\alpha$  [pSU108] (218) (zur Verfügung gestellt von Frau Kirsten Niebuhr) produziert und säulenchromatographisch in geringfügig modifizierter Form nach der von Niebuhr beschriebenen Methode von Frau Ivonne Stamm, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen, aufgereinigt (157, 213). Es wurde ausschließlich rStxB1 einer Charge verwendet, das in einer Konzentration von 410,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vorlag. Der durch Frau Annette Bickenbach im LAL-Test (Fa. BioWhittaker Inc.) bestimmte Endotoxingehalt betrug 595  $\text{pg}/\text{ml}$ . Die rStxB1-Stammlösung wurde mit PBS zu einer Endkonzentration von 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt und in Bindungsstudien eingesetzt.

### 3.1.3 Aufreinigung und Biotinylierung monoklonaler Antikörper

Es wurden ca. 1,0 l antikörperhaltiger Zellkulturüberstand der Zelllinien IL-A 29, IL-A 105, IL-A 111 und J 11 produziert (siehe Kapitel 3.1.4.3). Die einzelnen antikörperhaltigen Überstände wurden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften auf bovinen Leukozyten überprüft. Zu diesem Zweck wurden von adulten Kühen aus der Medizinischen Veterinärklinik II der JLU Gießen 2 ml Vollblut entnommen und mit Gerinnungshemmern vermischt. 200 µl des Blutes wurden mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Reagenz versetzt, 5 Minuten in Zentrifugenröhrchen bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert (150 x g, 7 min, Raumtemperatur (RT)). Der Überstand wurde dekantiert und das verbleibende Zellpellet in 1200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Es wurden je 50 µl dieser Suspension in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner) eingesetzt. Eine Zweifarbenfluoreszenz wurde wie in Kapitel 3.1.5.4 beschrieben durchgeführt und diente als Qualitätskontrolle. Wenn die Markierung von Oberflächenantigenen durch die Zellkulturüberstände mit denen von Vergleichsantikörpern übereinstimmten, erfolgte die Aufreinigung der Kulturüberstände affinitätschromatographisch unter Verwendung einer Protein G Sepharose 4 FF-Säule (Fa. Amersham Biosciences, 2,6 cm innerer Durchmesser, 20 cm Länge); die Höhe des Gelbettes betrug 12 cm. Es wurden sowohl die Zellkulturüberstände als auch sämtliche verwendeten Puffer vor der Benutzung mit Hilfe eines Sterilfilters (Fa. Milipore, Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert und in einem Exsikkator entgast. Die Säule wurde zunächst unter Verwendung einer FPLC-Anlage der Fa. Amersham Biosciences mit Laufpuffer äquilibriert und anschließend mit antikörperhaltigem Überstand und Laufpuffer zu gleichen Teilen über Nacht beladen. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit Hilfe des Laufpuffers (100 %) gewaschen, bis der Durchfluss eine OD<sub>280</sub> von 0 erreicht hatte. Die Elution erfolgte anschließend unter Verwendung eines Glycin-HCl-Puffers (0,2 M, pH 2,5), der im Verhältnis von 4:1 mit Laufpuffer vermischt wurde. Der Elutionspeak wurde in verschiedenen Fraktionen aufgefangen und je ml Eluat mit 65 µl Tris-Lösung (1 M, pH 9) neutralisiert.

Je 1 µl der einzelnen Fraktionen wurde mit 49 µl PBS verdünnt, auf bovine Leukozyten gegeben und als Zweifarbenfluoreszenz vorbereitet. Nur Fraktionen, die im Durchflusszytometer ein korrektes Signal zeigten, wurden weiterverwendet.

Die affinitätschromatographisch aufgereinigten monoklonalen Antikörper wurden mit Hilfe einer Amicon-Filterzelle, Filter 10YC05 Diaflo Ultrafiltration Membranes oder des Centriprep 30 concentrators der Fa. Amicon nach Angaben des Herstellers in NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (50 mM, pH 8,5) umgepuffert. Dabei konnte die Proteinkonzentration um den Faktor 5-6 erhöht werden.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der einzelnen Fraktionen erfolgt unter Verwendung des BCA-Protein-Assay® der Fa. Pierce nach Herstellerangaben. Aus 1,0 l Hybridomzellkulturüberstand konnten 7,6 mg (IL-A 105), 4,6 mg (IL-A 29), 3,5 mg (IL-A 111) und 2,16 mg (J 11) Gesamtprotein gewonnen werden.

1 mg Sulfo-NHC-Lc-Biotin (Fa. Pierce) wurde in 1 ml A. bidest. gelöst und von dieser Stammlösung sofort 37,5 µl/mg Protein zu der antikörperhaltigen Lösung gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation auf Eis wurde überschüssiges Biotin mit der Amicon-Filterzelle, Filter10 (IL-A 105 und IL-A 29) oder mit einem Centricon 10 (IL-A 111 und J 11) entfernt und die antikörperhaltigen Lösungen gegen PBS (pH 7,4) umgepuffert.

Die so gewonnenen antikörperhaltigen Lösungen wurden mit Hilfe eines DynaGard-Sterilfilters, Porengröße 0,2 µm, sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt. Der optimale Verdünnungsfaktor der späteren Gebrauchslösung wurde auf Leukozyten des peripheren Blutes des Rindes mit Hilfe der Durchflußzytometrie (siehe Kapitel 3.1.6.4) bestimmt. Die Gebrauchslösungen wurden entweder frisch in PBS, pH 7,4 angesetzt oder in sterilem PBS-BSA (1 %), pH 7,4 über mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.1.4 Zellkulturmethoden

#### 3.1.4.1 Verozellen

Verozellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (Fa. Nunc) bei 37 °C, Wasserdampf-sättigung und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium wurde das Zellkulturmedium 1 verwendet. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen geteilt. Hierzu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 10 ml Hepes-Puffer gespült und die Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurden je 5 ml Trypsin und Hepes-EDTA-Puffer (0,2 %) in die Flasche pipettiert, leicht geschwenkt und die Flasche für 10-15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde nach dieser Inkubation

mikroskopisch kontrolliert und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner) überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit 10 ml Medium gewaschen und diese Flüssigkeit der Zellsuspension hinzugefügt. In einem Zentrifugationsschritt (7 min, 202 x g, RT) wurden die Zellen pelletiert, anschließend der Überstand dekantiert und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Hiervon wurde ein Aliquot in die Zellkulturflasche zurückgegeben, mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen wieder im Brutschrank kultiviert.

#### **3.1.4.2 BL-3-Zellen**

Die Zellen der bovinen, leukämischen Lymphoblasten Zelllinie BL-3 (ECACC-Nr. 86062401) wurden in Plastikflaschen (Fa. Greiner) bei 37 °C, Wasserdampfsättigung und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium diente das Zellkulturmedium 2. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 geteilt und die verbleibende Zellsuspension erneut mit Medium aufgefüllt.

#### **3.1.4.3 Hybridomzellen**

Die Kultivierung von Hybridomzellen erfolgte in Petrischalen (Fa. Greiner) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung im Brutschrank. Als Nährmedium diente das Zellkulturmedium 1. Zur Massenproduktion von mAk wurden die Hybridomzellen in einer Zelldichte von 10<sup>5</sup>/ml in Roux-Flaschen ausgebracht und bis zum Absterben der Zellen kultiviert. Die durch Zentrifugation (3291 x g, 10 min, 20 °C) gewonnenen Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Gewinnung von Überständen für die chromatographische Aufreinigung von Antikörpern wurden die Zellen in Medium kultiviert, das mit 2% Ultrosor®HY anstelle von 10 % FCS supplementiert wurde.

#### **3.1.4.4 Isolierung und Kultur von bovinen PBMC**

Von adulten weiblichen Rindern der Rasse Deutsch-Schwarzbunt der Lehr- und Forschungsstation „Oberer Hardthof“ der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde Vollblut durch Punktion der Vena jugularis gewonnen und zur Gerinnungshemmung sofort mit Natriumcitratlösung vermischt. Je 20 ml Zitratblut wurden mit 17 ml PBS-EDTA-Puffer gemischt und vorsichtig über 12 ml Ficoll-Paque® in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 45 Minuten bei 800 x g mit ungebremstem Auslauf. Die PBMC-enthaltende Interphase und die Ficollphase

wurden abpipettiert, in neuen Röhrchen mit dem 3-fachen Volumen an PBS-EDTA-Puffer gut gemischt und erneut zentrifugiert (249 x g, 8 min). Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die Zellen mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Reagenz versetzt und 5 min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (202 x g, 7 min) folgten je ein Waschschrift in PBS-EDTA und mit PBS. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml Zellkulturmedium 5 aufgenommen und die Zellzahl durch Auszählung eines Aliquots der Zellsuspension vermischt mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/150  $\mu$ l pro Vertiefung in einer vorbereiteten Mikrotiterplatte (F-Form, Fa. Nunc) ausplattiert und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung im Brutschrank über 96 Stunden inkubiert. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von 5  $\mu$ g/ml PHA-P. Die gesamte Präparation der Zellen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.1.5 Gewinnung boviner IEL**

#### **3.1.5.1 Herkunft des Probenmaterials**

Die Materialgewinnung erfolgte am Gießener Schlachthof. Dort wurden 30-50 cm des distalen Ileums adulter weiblicher Rinder der Rasse Deutsch-Schwarzbunt entnommen. Es lagen keine Angaben über Haltung, Fütterung oder Nutzung der Tiere vor.

#### **3.1.5.2 Vorversuche zur Optimierung der Methodik**

##### Vorversuch 1

Ziel des ersten Vorversuchs war es, eine Methode zu finden, die die Isolierung möglichst vieler Zellen mit einem hohen Anteil an Leukozyten ermöglicht. Deshalb wurden verschiedene Präparationsformen und der Einfluß unterschiedlicher Puffer miteinander verglichen.

Es wurden ca. 50 cm distales Ileum auf dem Gießener Schlachthof entnommen und mit Hilfe einer Pinzette die luminale Seite nach außen gezogen. Das Darmstück wurde unter fließendem kaltem Wasser von Darminhalt befreit und für 15 Minuten in PBS mit 1mM Dithiothreitol (DTT) bei Raumtemperatur inkubiert. Aus dem Überstand wurde eine Probe zur Identifizierung abgelöster Zellen entnommen.

Tabelle 1: Aufbereitung der verschiedenen Probenstücke zur vergleichenden Analyse unterschiedlicher Inkubationsbedingungen

Probe	Inkubationsbedingungen			
	Puffer	Puffer- wechsel	Vortexen	Puffer- zusatz
1. Darmstück abgebunden	PBS-AB-EDTA, 15 ml	alle 10 Minuten	-	1 mM DTT
2. Darmstück abgebunden	PBS-AB-EDTA, 15 ml	alle 10 Minuten	-	-
3. Darmstück abgebunden	PBS-AB-EDTA, 15 ml	alle 10 Minuten	vor jedem Puffer- wechsel 15 s	1 mM DTT
4. Darmstück abgebunden	PBS-AB-EDTA, 15 ml	alle 10 Minuten	vor jedem Puffer- wechsel 15 s	-
5. Darmstück abgebunden	PBS-AB, 15 ml	alle 10 Minuten	vor jedem Puffer- wechsel 15 s	-
6. Mukosa	PBS-AB-EDTA, 20 ml	-	-	1 mM DTT
7. Mukosa	PBS-AB-EDTA, 20 ml	-	-	-
8. Mukosa	PBS-AB-EDTA, 20 ml	-	3 Minuten	1 mM DTT
9. Mukosa	PBS-AB-EDTA, 20 ml	-	3 Minuten	-
10. Mukosa	PBS-AB, 20 ml	-	3 Minuten	-

Anschließend wurde das Ileum in 10 jeweils 5 cm lange Stücke geschnitten. Die Hälfte der Stücke wurde mit PBS gefüllt und an beiden Enden abgebunden. Die restlichen Stücke wurden der Länge nach aufgeschnitten und mit Hilfe eines seitlich in einem Winkel von 45 ° vorwärtsbewegten Objektträgers die Mukosa von der darunterliegenden *Tela submucosa* getrennt. Mit einem Messer wurde die Mukosa dann in Quadrate einer Kantenlänge von ca. 3 mm geschnitten. Die Darm- bzw. Mukosastücke wurden

anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen verbracht und 30 Minuten bei 37 °C wie in Tabelle 1 beschrieben behandelt.

Anschließend wurden alle Überstände entnommen bzw. die durch Pufferwechsel entstandenen Überstände der abgebundenen Darmstücke eines Ansatzes vereinigt, über Nylonwatte filtriert und die gewonnene Zellzahl durch Auszählung eines Aliquots der Zellsuspension gemischt mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Der Anteil von Leukozyten an der Gesamtzellsuspension wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenexpression von Antigenen bestimmt (siehe Kapitel 3.1.6.4). Die Analyse des Prozentsatzes PI positiver Zellen innerhalb der Gesamtzellsuspension ermöglichte eine Aussage über die Vitalität der gewonnenen Zellsuspension.

### Vorversuch 2

Die Auswertung der Parameter Zellzahl, Vitalität und Zellzusammensetzung des Vorversuchs 1 ließ es sinnvoll erscheinen, drei der angewandten Methoden genauer miteinander zu vergleichen. Für den zweiten Inkubationsschritt (ohne DTT) wurde bei allen drei Methoden PBS-AB-EDTA als Puffer benutzt.

Das Probenmaterial wurde wie unter Kapitel 3.1.5.1 beschrieben entnommen, im Schlachthof mit einer Pinzette die luminale Seite nach außen gezogen und unter fließendem kaltem Wasser von Darminhalt befreit. Der 15 Minuten dauernde Transport ins Labor erfolgte in 500 ml PBS (8 °C) in einem Erlenmeyerkolben (1000 ml). Dort wurde das Ileum in PBS unter Zusatz von 1 mM DTT für 20 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden drei verschiedene Inkubationsbedingungen vergleichend untersucht:

1. Darm abgebunden, Inkubation für 25 Minuten in 150 ml PBS-AB-EDTA-Puffer in einem Erlenmeyerkolben (500 ml)
2. Darm abgebunden, Inkubation für 15 Minuten in 150 ml PBS-AB-EDTA-Puffer in einem Erlenmeyerkolben (500 ml), anschließend 2 Minuten gevortext
3. Mukosa abgelöst und in Stücke zerschnitten, Inkubation für 20 Minuten in 3 Zentrifugenröhrchen (50 ml, Fa. Greiner) mit jeweils ca. 45 ml PBS-AB-EDTA-Puffer, anschließend 3 Minuten gevortext

Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden über Nylonwatte filtriert, die Filtrate in Zentrifugenröhrchen (50 ml, Fa. Greiner) aufgefangen und zentrifugiert (202 x g, 7 min, RT). Nach Dekantieren des Überstandes wurden alle Zellen eines Inkubationsansatzes in 40 ml PBS-EDTA resuspendiert und zentrifugiert (202 x g, 7 min, RT).

Nach erneutem Dekantieren der Überstände wurden die einzelnen Zellpellets in 25 ml Percoll der Dichte  $\delta=1,06088$  g/ml (Dichte eingestellt mit PBS-EDTA-Puffer) resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml, Fa. Greiner) auf 10 ml Percoll der Dichte  $\delta=1,08928$  g/ml (Dichte eingestellt mit PBS-EDTA-Puffer) geschichtet. Anschließend wurde die zellhaltige Suspension mit 10 ml L-15 Leibowitz-Medium überschichtet und die Röhrchen zentrifugiert (804 x g, 20 min, RT, Beschleunigung Stufe 3 von 9 möglichen, Verzögerung Stufe 1 von 9 möglichen). Während dieser Dichtegradientenzentrifugation bildeten sich drei verschiedene zellhaltige Schichten aus, die anschließend alle getrennt geerntet wurden. Die oberste Zellschicht (a) befand sich zwischen L-15 Leibowitz-Medium und Percoll der Dichte  $\delta=1,06088$  g/ml. Die zweite Zellschicht (b), in der die IEL vermutet wurden, war zwischen Percoll der Dichte  $\delta=1,06088$  g/ml und Percoll der Dichte  $\delta=1,08928$  g/ml zu finden.

Unterhalb von Percoll der Dichte  $\delta=1,08928$  g/ml konnten pelletierte Zellen (c) geerntet werden. Alle geernteten Zellen wurden zentrifugiert (202 x g, 7 min, RT), die Überstände dekantiert, in 40 ml PBS-EDTA-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (202 x g, 7 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in jeweils 35 ml PBS-EDTA-Puffer resuspendiert, die Zellzahl durch Auszählung eines Aliquots der Zellsuspension vermisch mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Oberflächenexpression von Antigenen im Durchflusszytometer analysiert.

### Vorversuch 3

Die Auswertung des Vorversuchs 2 zeigte, dass durch Ablösen der Mukosa eine große Anzahl vitaler Zellen zu gewinnen war. Allerdings entsprach der Phänotyp der Zellen nicht der aus der Literatur bekannten Antigenexpression von IEL. Deshalb wurde diese Präparationsmethode nochmals vergleichend zu einer weiteren Methode, die ebenfalls ein mechanisches Herauslösen der Zellen durch vortexen beinhaltet, untersucht.

Das Ileum wurde wie bereits beschrieben entnommen, ins Labor transportiert und dort unter Zusatz von DTT in PBS-Puffer inkubiert (siehe Vorversuch 2). Anschließend wurde das Darmstück in zwei ca. 15 cm lange Teile geschnitten und entweder in ca. 0,5 cm breite Streifen zerschnitten oder die Mukosa wie unter Vorversuch 1 bereits beschrieben von der

Submukosa getrennt. Das erhaltene Material wurde in jeweils drei mit 40 ml PBS-AB-EDTA-Puffer gefüllte Zentrifugenröhrchen (50 ml, Fa. Greiner) gegeben und für 20 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen bei maximaler Drehzahl für 2 Minuten gevortext. Die nachfolgende Aufreinigung der Zellen erfolgte wie bereits unter Vorversuch 2 beschrieben. Es wurden die Oberflächenexpression von Antigenen der drei verschiedenen Zellfraktionen des Dichtegradienten und der relative Anteil epithelialer Zellen an der Gesamtzellmenge der einzelnen Fraktionen durchflusszytometrisch ermittelt.

### Vorversuch 4

Die Analyse der Ergebnisse des Vorversuchs 3 ließ die Methode, Ileum in ca. 0,5 cm breite Streifen zu schneiden, als geeignet erscheinen, eine große Menge vitaler IEL zu gewinnen. Um die Reproduzierbarkeit dieser Methode und die Funktionalität der isolierten Zellen zu überprüfen, wurden noch weitere drei Präparationen von unterschiedlichen Tieren, wie in Vorversuch 3 beschrieben, durchgeführt. Die zwischen den beiden Percollphasen lokalisierten Zellen wurden anschließend bezüglich der Oberflächenexpression von Antigenen analysiert und in einem Test auf die Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ eingesetzt.

### 3.1.5.3 Präparation ilealer IEL für weiterführende Untersuchungen

Die in den Vorversuchen ermittelte Methode der Isolation von IEL wurde für die weiterführenden Untersuchungen leicht modifiziert und dann für alle Versuche wie folgt durchgeführt:

Auf dem Gießener Schlachthof wurde von adulten, weiblichen Schlachtrindern der Rasse Deutsch-Schwarzbunt ca. 30-50 cm Ileum entnommen, der Darminhalt herausgestrichen, der Darm äußerlich von Fett befreit, einmal der Länge nach durchgeschnitten und restlicher Darminhalt mit kaltem Leitungswasser abgespült. Der 10minütige Transport ins Labor erfolgte in gekühltem PBS-Puffer (8 °C). Dort wurde das Gewebe bei 37 °C im Schüttelwasserbad in PBS-Puffer mit 1 mM 1,4 DTT (Fa. Roth) zur Auflösung des Mukus unter beständigem Schwenken für 25 Minuten in einem Erlenmeyerkolben (1000 ml) inkubiert. Anschließend wurde der Darm unter Schonung der Peyer'schen Platten in ca. 0,5 cm breite Streifen geschnitten. Diese wurden in drei mit je 35 ml PBS-AB-EDTA-Puffer gefüllte 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner) verbracht und bei 37 °C für 20 Minuten im Schüttelwasserbad geschwenkt. Um die Ablösung der oberen Epithelzellschicht zu

unterstützen, wurden die 50 ml-Röhrchen ergänzend für je zwei Minuten bei maximaler Drehzahl gevortext. Die entstehende Zellsuspension wurde über zuvor mit 15 ml PBS-AB-EDTA-Puffer befeuchtete sterile Nylonwatte (Fa. Biotest) gegeben, um grobe Gewebereste zu entfernen. Die Watte wurde mit weiteren 10 ml PBS-AB-EDTA-Puffer gewaschen. Das Filtrat wurde erneut in drei 50 ml-Röhrchen aufgefangen, zentrifugiert (8 min, 202 x g, RT) und der Überstand dekantiert. Die Trennung der IEL von den anderen im Filtrat vorkommenden Zellen erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde Percoll ( $\delta=1,124\text{g/l}$ , Fa. Biochrom) für jeden Versuch frisch mit PBS-EDTA-Puffer in zwei verschiedenen Dichten angemischt. Die Lösungen hatten eine Dichte von  $\delta=1,08928\text{ g/ml}$  und  $\delta=1,06088\text{ g/ml}$ . In ein 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner) wurden zunächst 10 ml der Percolllösung höherer Dichte gegeben und diese mit den in 25 ml Percolllösung geringerer Dichte resuspendierten Zellen überschichtet. Anschließend wurden 10 ml L-15 Leibowitz-Medium über die zellhaltige Phase geschichtet. Die Trennung erfolgte in einem Zentrifugationsschritt (20 min, 804 x g, RT, Beschleunigung Stufe 3 von 9 möglichen, Verzögerung Stufe 1 von 9 möglichen). Die IEL befanden sich nach der Zentrifugation zwischen den beiden Percollphasen unterschiedlicher Dichte und wurden vorsichtig geerntet. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 25 ml PBS-EDTA-Puffer (Zentrifugation 7 min, 202 x g, RT) wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, die Zellen nochmals zentrifugiert (7 min, 202 x g, RT) und abhängig vom Verwendungszweck der IEL auf die jeweils benötigte Zelldichte in Zellkulturmedium 3 bzw. Zellkulturmedium 4 eingestellt.

Um beurteilen zu können, welche Zellschichten sich durch diese Methode lösen, wurden bei 10 Präparationen jeweils Teile der untersuchten Proben direkt im Schlachthof bzw. direkt nach Präparation entnommen und in 32 %igem Formalin fixiert. Diese Stücke wurden anschließend freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen als Paraffinschnitt nach Standardmethoden aufgearbeitet, histologische Objektträgerpräparate hergestellt und diese mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Präparation von IEL aus dem Zäkum oder Kolon erfolgte nach dem identischen Isolationsschema.

### **3.1.6 Phänotypische Untersuchungen an IEL**

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem EPICS™ Elite Analyser der Fa. Beckman-Coulter durchgeführt. Dieser war ausgestattet mit einem 488 nm Argonlaser und einer Filterkombination von 488 nm, 525 nm, 575 nm und 630 nm. Die Grundeinstellungen der Messprotokolle wurden in Vorversuchen ermittelt, abgespeichert und für alle weiteren Messungen verwendet. Die Negativkontrolle wurde für jeden Versuch neu bestimmt. Es wurden jeweils 5000 Ereignisse je Probe gemessen und diese Ereignisse als „Gesamtzellen“ definiert. Die IEL wurden anhand des ermittelten Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes verschiedenen Populationen zugeordnet.

#### **3.1.6.1 Morphologie der isolierten Zellsuspension**

Nach Präparation der Zellen wurden diese hinsichtlich ihrer Größe (=Vorwärtsstreulicht, FS) und Granularität (= Seitwärtsstreulicht, SS) untersucht. Es gab nur eine distinkte Population. Abbildung 3 veranschaulicht die Zuweisung eines Aquisitionsfensters zu dieser Population. Die Zellen sind charakterisiert durch ähnliche Größe und Granularität, belegt durch ein vergleichbares Verhalten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht des Durchflusszytometers. Die Ansammlung sehr kleiner und kaum granulierter Partikel unterhalb des Aquisitionsfensters enthält neben toten Zellen auch Zelltrümmer. Eine zuverlässige Analyse dieser Bestandteile ist nicht mehr möglich. Deshalb werden diese Partikel von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

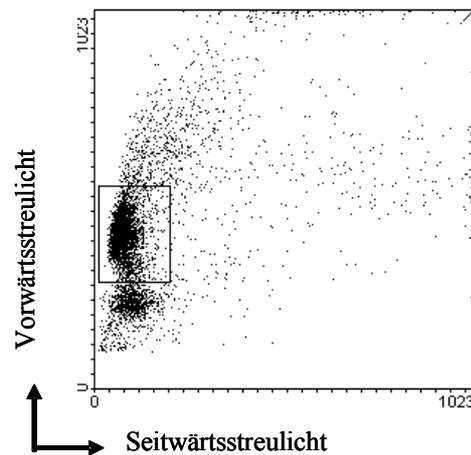


Abb. 3: Durchflusszytometrisch bestimmte Morphologie der untersuchten Zellsuspension. Darstellung des den Lymphozyten anhand der Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zugewiesenen Aquisitionsfensters, repräsentative Darstellung einer Zellpräparation

### 3.1.6.2 Verwendete monoklonale Antikörper

Für den Nachweis von oberflächenexprimierten Antigenen wurden verschiedene Antikörper verwendet, die in Tabelle 2 dokumentiert sind. Sie lagen z. T. als Aszitesflüssigkeit (Antikörper bezogen von VMRD, Inc.) und teilweise als Zellkulturüberstand (ZK-Überstand) (siehe Kapitel 3.1.4.3) vor. Die Hybridomzelllinie 13C4 wurde von ATCC (CRL 1794) bezogen. Die murinen Hybridomzelllinien IL-A 43, IL-A 11, IL-A 57, IL-A 105, IL-A 29, IL-A 30, IL-A 65, IL-A 24, IL-A 88, IL-A 118, J11, IL-A 111, IL-A 77, IL-A 79 und IL-A 96 wurden freundlicherweise von J. Naessens PhD., International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenia zur Verfügung gestellt.

Die Zellkulturüberstände der Linien IL-A 105, IL-A 111, IL-A 29 und J11 wurden aufgereinigt und biotinyliert. Sie lagen als konzentrierte Antikörperlösung in PBS vor (siehe Kapitel 3.1.3). Bei bovinem Zytokeratin handelt es sich um ein intrazelluläres Antigen.

### 3.1.6.3 Probenvorbereitung für die Dreifarbenfluoreszenz

Es erfolgte die gleichzeitige Detektion von zwei Oberflächenantigenen und eine Untersuchung auf die Durchlässigkeit der Zellmembran für PI.

1. Einsetzen von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner)
2. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
3. Resuspendieren des Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  antikörperhaltiger Flüssigkeit (siehe Tabelle 2)
4. Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
5. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes und resuspendieren der Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid, Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
6. Zugabe des ersten sekundären, mit FITC konjugierten, Antikörpers (anti-Maus IgG,  $\gamma$ -Ketten spezifisch, Fa. Medac, 1:100 verdünnt in PBS-BSA-Azid) in 50  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid mit 2  $\mu\text{g/ml}$  PI
7. Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
8. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes, resuspendieren des Zellpellets in 150  $\mu\text{l}$  eines unspezifischen IgG Antikörpers, Klon 1E8 (erkennt den C-Terminus des Alpha-Toxins von *Clostridium perfringens*), Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
9. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes, Zugabe des zweiten primären Antikörpers als antikörperhaltige Flüssigkeit (siehe Tabelle 2)
10. Inkubation für 30 Minuten auf Eis
11. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
12. Waschen der Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid, Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
13. Zugabe des zweiten sekundären, mit PE konjugierten, Antikörpers (anti-Ratte IgM,  $\mu$ -Ketten spezifisch, Fa. Immunotech, 1:200 verdünnt in PBS-BSA-Azid oder Streptavidin-PE, Fa. dianova, 1:100 verdünnt in PBS-BSA-Azid), gelöst in 50  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid mit 2  $\mu\text{g/ml}$  PI
14. Inkubation für 30 Minuten auf Eis
15. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes und anschließend zweimaliges Waschen der Zellen in je 100  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid
16. Aufnehmen der Zellen mit je 50  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid, überführen in ein Meßröhrchen mit 200  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid, Messung

Tabelle 2: Herkunft und Verdünnung der verwendeten monoklonalen Antikörper gegen Oberflächenantigene sowie gegen Zytoskelettbestandteile boviner Zellen

erkanntes Antigen	Zelllinie/Material	verwendete Antikörperlösung/ 2,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen
CD2	IL-A 43/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
CD3	MM1A/Maus-Aszites	50 µl (1:100 in PBS-BSA-Azid)
CD4	IL-A 11/ZK-Überstand	50 µ ZK-Überstand
CD6	IL-A 57/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
CD8α	IL-A 105/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand; biotinyliert 50 µl (1:50 in PBS-BSA-Azid)
CD8β	BAT82A/Maus-Aszites	50 µl (1:500 in PBS-BSA-Azid )
TcR1-N12	CACT61A/Maus-Aszites	50 µl (1:300 in PBS-BSA-Azid)
TcR1-N7	CACTB81A/Maus-Aszites	50 µl (1:300 in PBS-BSA-Azid)
TcR1-N6	CACTB6A/Maus-Aszites	50 µl (1:700 in PBS-BSA-Azid)
WC1	IL-A 29/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand; biotinyliert 50 µl (1:400 in PBS-BSA-Azid)
oberfl. IgM	IL-A 30/ZK-Überstand	50 µ ZK-Überstand
CD21	IL-A 65/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
Mø.Diff.Ag	IL-A 24/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
CD44	IL-A 118/ ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
MHC I	IL-A 88/ZK-Überstand	100 µl ZK-Überstand
MHC II	J11/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand; biotinyliert 50 µl (1:400 in PBS-BSA-Azid)
ACT2	CACT26A/Maus-Aszites	50 µl (1:400 in PBS-BSA-Azid)
CD25	IL-A 111/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand; biotinyliert 50 µl (1:400 in PBS-BSA-Azid)
CD71	IL-A 77/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
WC8	IL-A 79/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
WC9	IL-A 96/ZK-Überstand	50 µl ZK-Überstand
Zytokeratin	C-11/ZK-Überstand FITC-konj.	50 µl (1:40 in PBS-BSA-Azid )
CD77	38.13/aufg. ZK-Überstand	50 µl (1:10 in PBS-BSA-Azid )
anti-StxB1	13C4/ZK-Überstand	50 µl (45 µg/ml in PBS-BSA-Azid)

aufg. = aufgereinigt

CD = Cluster of differentiation

Mø.Diff.Ag = Makrophagendifferenzierungsantigen

WC = Workshop cluster

oberfl. = oberflächenständiges

konj. = konjugiert

#### 3.1.6.4 Probenvorbereitung für die Zweifarbenfluoreszenz

Für die Zweifarbenfluoreszenz wurde die Inkubationszeit der Zellen in den Schritten 4 und 7 auf 20 Minuten verkürzt, die Schritte 8-14 entfallen. Im Schritt 6 wurden alle genannten sekundären Antikörper bzw. das Streptavidin-PE-Konjugat eingesetzt.

#### 3.1.6.5 Probenvorbereitung für Bindungsstudien im Rahmen einer Zwei- bzw. Dreifarbenfluoreszenz

Für Bindungsstudien wurde die Probenvorbereitung zur Dreifarbenfluoreszenz wie folgt modifiziert.

1. Einsetzen von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner)
2. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
3. Resuspendieren des Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid mit 30  $\mu\text{g/ml}$  rStxB1
4. Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
5. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes und resuspendieren der Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid, Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
6. Resuspendieren des Zellpellets in je 50  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid mit 45  $\mu\text{g/ml}$  anti-StxB1
7. Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
8. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes, resuspendieren der Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid, Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes
9. Zugabe des ersten sekundären, mit FITC konjugierten, Antikörpers (anti-Maus IgG,  $\gamma$ -Ketten spezifisch, Fa. Medac, 1:100 verdünnt in PBS-BSA-Azid) in 50  $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Azid mit 2  $\mu\text{g/ml}$  PI
10. Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
11. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes, resuspendieren des Zellpellets in 150  $\mu\text{l}$  eines unspezifischen IgG Antikörpers, Klon 1E8 (erkennt den C-Terminus des Alpha-Toxins von *Clostridium perfringens*), Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
12. Zentrifugation ( $137,5 \times g$ , 7 min,  $4^\circ\text{C}$ ), dekantieren des Überstandes, Zugabe des zweiten primären Antikörpers als antikörperhaltige Flüssigkeit (siehe Tabelle 2)

13. Inkubation für 30 Minuten auf Eis
14. Zentrifugation (137,5 x g, 7 min, 4 °C), dekantieren des Überstandes
15. Waschen der Zellen in 100 µl PBS-BSA-Azid, Zentrifugation (137,5 x g, 7 min, 4 °C), dekantieren des Überstandes
16. Zugabe des sekundären, mit PE konjugierten, Antikörpers (anti-Ratte IgM, µ-Ketten spezifisch, Fa. Immunotech 1:200 verdünnt in PBS-BSA-Azid oder Streptavidin-PE, Fa. dianova, 1:100 verdünnt in PBS-BSA-Azid), gelöst in 50 µl PBS-BSA-Azid mit 2 µg/ml PI
17. Inkubation für 30 Minuten auf Eis
18. Zentrifugation (137,5 x g, 7 min, 4 °C), dekantieren des Überstandes und anschließend zweimaliges Waschen der Zellen in je 100 µl PBS-BSA-Azid
19. Aufnehmen der Zellen mit je 50 µl PBS-BSA-Azid, überführen in ein Meßröhrchen mit 200 µl PBS-BSA-Azid, Messung

War nur die Bindung von rStxB1 an die Zellen Gegenstand der Untersuchung, entfielen die Schritte 11-17.

### 3.1.6.6 Nachweis intrazellulären Zytokeratins

Zum Nachweis intrazellulären Zytokeratins wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner) eingesetzt und zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert. Die Fixation erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten bei RT in 100 µl 2 % Paraformaldehyd (PFA) (50 µl PBS + 50 µl Fixierungsreagenz mit 4 % PFA in PBS). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (7 min, 4 °C, 137,5 x g), der Überstand dekantiert, die Pellets in je 100 µl PBS-BSA-Azid resuspendiert und erneut zentrifugiert (7 min, 4 °C, 137,5 x g). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellpellets in 100 µl Permeabilisierungsreagenz (Digitonin 0,005 % in PBS) aufgenommen, über 10 Minuten bei RT inkubiert und zentrifugiert (7 min, 4 °C, 137,5 x g). Es folgte eine zweimalige Waschung der Zellen in je 100 µl PBS-BSA-Azid. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS-BSA-Azid mit FITC-konjugiertem anti-Zytokeratin Antikörper resuspendiert, über 30 Minuten auf Eis inkubiert und zentrifugiert (7 min, 4 °C, 137,5 x g). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen noch zweimal mit PBS-BSA-Azid gewaschen und in Meßröhrchen überführt.

### 3.1.7 Funktionelle Untersuchungen an IEL

#### 3.1.7.1 Bestimmung der induzierten Transformation nach *in vitro* Kultur

IEL wurden über drei Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung in Zellkulturmedium 3 supplementiert mit verschiedenen Stimulantien in Mikrotiterplatten (F-Form, Fa. Nunc) im Dreifachansatz inkubiert. Kontrollansätze enthielten 200 U/ml rekombinantes humanes IL-2 (rhuIL-2) und die in Tabelle 3 aufgeführten Stimulantien. In den Ansätzen mit Stx1 waren zusätzlich 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1, in den Ansätzen mit Stx1 und anti-StxB1 je 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 und 1,5 µg/ml anti-StxB1 enthalten. Toxin und anti-StxB1 wurden mindestens 90 Minuten vor der Zellzugabe bei RT miteinander vorinkubiert.

Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet, in Meßröhrchen für die Zytometrie verbracht und dort mit 200 µl PBS-BSA-Azid gemischt. Bis zum Zeitpunkt ihrer Messung wurden die Proben auf Eis gelagert. Im Durchflusszytometer wurden sie anhand ihres Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes charakterisiert. Es waren eine subvitale Population, eine Population der vitalen non-Blasten und eine Population der zu Blasten transformierten Zellen zu unterscheiden (siehe Abb. 4), deren relativer Anteil an der Gesamtmenge der Zellen bestimmt wurde. Insgesamt wurden 5000 Zellen pro Ansatz analysiert.

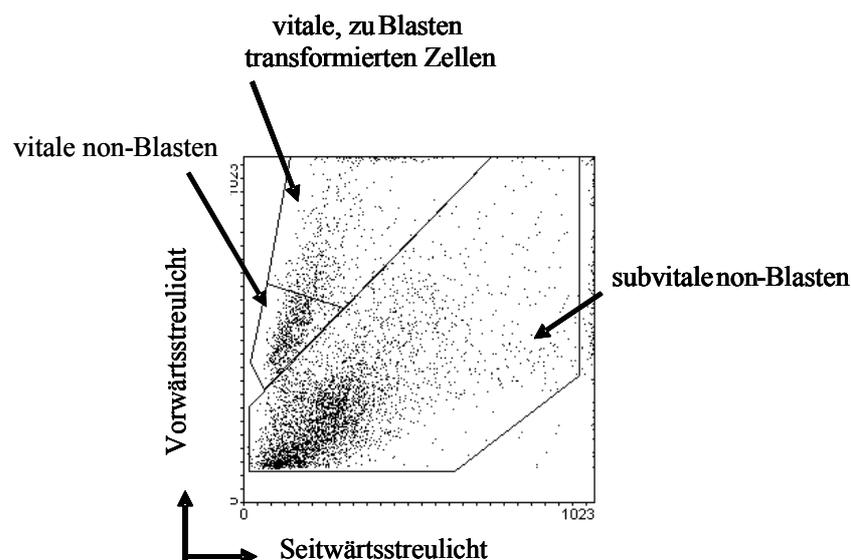


Abb. 4: Durchflusszytometrische Charakterisierung von IEL-Suspensionen anhand des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichtes. Darstellung der den vitalen non-Blasten bzw. Blasten zugewiesenen Aquisitionsfenster; repräsentative Darstellung einer Zellpräparation

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen untersuchten Stimulantien und Angabe der verwendeten Konzentrationen

Stimulans	Konzentration
ConA	2,5 µg/ml
PWM	2,5 µg/ml
PHA-P	2,5 µg/ml
PMA und Ionomycin	5 ng/ml 500 ng/ml
PWM und PMA	2,5 µg/ml 20 ng/ml

Stimulans	Konzentration
PHA-P und PMA	2,5 µg/ml 20 ng/ml
ConA und Ionomycin	2,5 µg/ml 500 ng/ml
PWM und Ionomycin	2,5 µg/ml 500 ng/ml
PHA-P und Ionomycin	2,5 µg/ml 500 ng/ml

### 3.1.7.2 Untersuchung der Antigenexpression von IEL in Abhängigkeit von Stx1 oder StxB1 und anti-StxB1 nach *in vitro* Kultur und Datenanalyse

IEL wurden über drei Tage kultiviert (siehe Kapitel 3.1.7.1). Als Stimulans wurde in allen Ansätzen PHA-P ( $c = 2,5 \mu\text{g/ml}$ ) verwendet. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Oberflächenexpression von Antigenen durchflusszytometrisch untersucht. Der Nachweis der Oberflächenantigene erfolgte wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaStat, Version 2.03, der Fa. SPSS. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde eine  $\log_{10}$  Transformation durchgeführt. Ergab die anschließende einfaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholung einen Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen von  $<0,05$ , wurde eine Signifikanzanalyse unter Verwendung des Student-Newman-Keuls-Testes durchgeführt.

### 3.1.7.3 Durchflusszytometrische Messung der NK-Aktivität

#### 3.1.7.3.1 Präparation von Zielzellen

Um durchflusszytometrisch eine Unterscheidung der Zielzellen von den Effektorzellen zu ermöglichen, wurden die als Zielzellen verwendeten BL-3-Zellen leicht modifiziert nach der Methode von Chang *et al.* (26) am Vortag des Versuches mit dem Farbstoff 3,3'-Diocadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO, Molecular Probes) markiert. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Medium, ergänzt mit 10  $\mu$ l DiO ( $c(\text{DiO}) = 2,5 \text{ mg/ml}$  in DMSO), resuspendiert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) für 4 Stunden im Wärmerraum bei 37 °C unter kontinuierlichem Schwenken (120 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in je 10 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 7 Minuten, 202 x g, RT), in 2 ml Zellkulturmedium 2 resuspendiert und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung im Brutschrank inkubiert. Kurz vor Ansetzen des NK-Testes erfolgte nochmals eine dreimalige Waschung der BL-3-Zellen und nach Einstellung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen erneut in 2 ml Medium pro  $1 \times 10^6$  Zellen aufgenommen.

#### 3.1.7.3.2 Durchführung des NK-Aktivitätstests mit frisch isolierten IEL

In verschiedenen Verdünnungsstufen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung,  $3,3 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung,  $1,1 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung,  $3,7 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung und  $1,2 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) wurden je 200  $\mu$ l frisch isolierte IEL, suspendiert in Zellkulturmedium 3 als Effektorzellen im Dreifachansatz in eine Mikrotiterplatte (F-Form, Fa. Nunc, 96 Vertiefungen), ausgesät. Anschließend wurden zu jedem Ansatz  $1 \times 10^4$  DiO-gefärbte BL-3-Zellen, suspendiert in 20  $\mu$ l Zellkulturmedium 2, als Zielzellen zugegeben, so dass IEL:BL-3 in einem Verhältnis von 100:1, 33:1, 11:1, 3,7:1 und 1,2:1 vorlagen. Zur Kontrolle des normalen Zelltodes der Zielzellen dienen DiO-gefärbte BL-3-Zellen, die in 20  $\mu$ l Zellkulturmedium 2 resuspendiert und in zusätzlichen 200  $\mu$ l Zellkulturmedium 3 inkubiert wurden (Negativkontrolle). Nach 18 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung wurde der Aktivitätstest durch Verbringen der Proben auf Eis abgestoppt. Die Zellen wurden aus der Platte entnommen und in je 200  $\mu$ l PBS mit 2  $\mu$ g/ml PI suspendiert (4 °C).

### 3.1.7.3.3 Durchführung des NK-Aktivitätstests nach Stx1-Exposition der IEL

IEL wurden direkt nach Präparation in einer Multischale (6 Vertiefungen, Fa. Nunc) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/150 µl Kulturmedium in einem Gesamtvolumen von 5-10 ml Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. In drei verschiedenen Ansätzen wurden die Zellen mit NaCl, mit 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 oder mit 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 und 1,5 µg/ml anti-StxB1 (Stx1 und anti-StxB1 wurden 90 Minuten bei RT vorinkubiert) versetzt. Nach 24 Stunden wurde in dem Ansatz mit Stx1 aber ohne anti-StxB1 das verbleibende freie Toxin durch Zugabe von 1,5 µg/ml anti-StxB1 und eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inaktiviert. Der NK-Aktivitätstest wurde anschließend wie in Kapitel 3.1.6.3.2 beschrieben angesetzt. Um den Erfolg der Inaktivierung des Toxins zu überprüfen und sicherzustellen, dass die gemessene Lyse von Zielzellen auf einer NK-Aktivität der IEL und nicht auf einer Stx1-induzierten Lyse der BL-3-Zellen beruhte, wurden zwei zusätzliche Kontrollen mitgeführt. BL-3-Zellen wurden wie in der Negativkontrolle in insgesamt 220 µl Medium (200 µl Zellkulturmedium 3 + 20 µl Zellkulturmedium 2 mit DiO-fluoreszenzmarkierten BL-3-Zellen) kultiviert. Eine Kontrolle enthielt mit 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 supplementiertes Zellkulturmedium 3 und demonstrierte die Stx1-induzierte Lyse der BL-3-Zellen. Das Medium der anderen Kontrolle wurde mit 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 und 1,5 µg/ml anti-StxB1 versetzt. Die Messergebnisse dieser Kontrolle wurden mit denen der Negativkontrolle verglichen und belegten die vollständige Neutralisierung der Stx1-induzierten BL-3 Zelllyse durch anti-StxB1.

### 3.1.7.3.4 Durchflusszytometrische Messung und Datenanalyse

Pro Einzelprobe wurden 2500 BL-3-Zellen erfaßt und analysiert. In einem ersten Analyseschritt wurden hierzu die DiO-fluoreszenz-markierten BL-3-Zellen identifiziert. Ein zweiter Analyseschritt ermöglichte die Bestimmung des Anteils PI-positiver Zellen unter den DiO<sup>+</sup>-Zellen. Dieser beschreibt den Anteil lysierter Zielzellen. Die NK-Aktivität berechnet sich aus der Differenz der Mittelwerte der PI-positiven Zellen aus den Testansätzen und der Negativkontrolle. Die Negativkontrolle entspricht dabei der spontanen Zelllyse.

### 3.1.7.4 Nachweis der Transkription boviner Zytokingene

Die Isolierung der RNA, die reverse Transkription und anschließende Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) erfolgte modifiziert nach de Gruijl *et al.* (36).

#### 3.1.7.4.1 Inkubation von IEL zur Untersuchung des Einflusses von Stx1 auf die Transkription von Zytokingenen *in vitro*

IEL von 6 Tieren wurden in Zellkulturmedium 4 resuspendiert. Von jedem Tier wurden die Zellen in einem unstimulierten und in einem stimulierten Kontrollansatz (c(PHA-P) = 2,5 µg/ml) sowie jeweils vergleichend in einem Ansatz mit Stx1 (c (Stx1) = 200 CD<sub>50</sub>/ml) inkubiert. Die Zellzahl betrug in allen Ansätzen 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/100 µl Zellkulturmedium. Jeweils 15 ml dieser Zellsuspension wurden für 4,5 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung in Petrischalen (Fa. Greiner) inkubiert.

Nach 4 Stunden wurde die Anzahl lebender Zellen innerhalb der einzelnen Ansätze durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau-Lösung bestimmt, nach Ablauf der 4,5 Stunden 1 x 10<sup>7</sup> Zellen entnommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) überführt. Waren weniger als 1 x 10<sup>7</sup> lebende Zellen vorhanden, wurde die gesamte Zellsuspension geerntet. Die Zellen wurden zweimal in 20 ml PBS (4 °C) gewaschen (Zentrifugation 7 min, 600 x g, 4 °C), dann in 1 ml PBS (4 °C) resuspendiert, in ein zweifach autoklaviertes Reaktionsgefäß (2 ml Safe-Lock, Fa. Eppendorf) verbracht und zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in je 2000 µl RNAzol<sup>TM</sup> (Fa. Wak-Chemie) resuspendiert. Diese Suspension wurde maximal drei Tage bei -80 °C eingefroren.

#### 3.1.7.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die in RNAzol<sup>TM</sup>® (Wak-Chemie) suspendierten und bei -80 °C eingefrorenen IEL wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 200 µl Chloroform zugegeben und beide Lösungen 30 Sekunden durch Vortexen gut miteinander vermischt. Anschließend wurden die verschiedenen Ansätze 5 Minuten auf Eis inkubiert, bis eine deutliche Trennung in eine blaue und eine klare Phase sichtbar wurde. Die Reaktionsgefäße (2 ml Safe-Lock, Fa. Eppendorf) wurden in einer vorgekühlten Eppendorf-Zentrifuge (5804R, Rotor Typ F45-30-11) bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert, dann die klare obere Phase abgenommen und in ein weiteres zweifach autoklaviertes 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Etwa das gleiche Volumen Isopropanol wurde zugegeben, die einzelnen Reaktionsgefäße geschwenkt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren, und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluß an eine erneute 15minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g wurden die Gefäße dekantiert, die Pellets in 1 ml Ethanol 75 % aufgenommen und erneut 5 Minuten bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgegossen und der Waschschrift mit 1 ml Ethanol 75 % wiederholt. Verbleibende Ethanoltropfen wurden von den Wänden des Gefäßes mit Hilfe einer autoklavierten Pipettenspitze entfernt und die Gefäße 30 Minuten bei RT offen unter ein Zellstofftuch gelegt, bis der restliche Ethanol verdunstet war. Das Pellet wurde entsprechend der erwarteten RNA-Menge in 60-80 µl Wasser für die Molekularbiologie (Fa. Carl Roth GmbH) aufgenommen und der Nukleinsäuregehalt in einem Photometer (Fa. Beckmann, DU® 640) bestimmt. Hierzu wurden 10 µl Aliquots der Proben 1:35 in A. bidest. verdünnt und bei verschiedenen Wellenlängen ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 280 \text{ nm}$  und  $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) gegen eine Kontrolle (10 µl Wasser für die Molekularbiologie 1:35, verdünnt mit A. bidest.) gemessen. Anhand der Messergebnisse konnte der RNA-Gehalt der einzelnen Ansätze mit Hilfe der folgenden Formel errechnet werden:  $(OD_{260} - OD_{320}) \times 40 \times \text{Verdünnung} = \text{RNA-Gehalt in ng/}\mu\text{l}$ . Je 250-500 ng RNA vermischt mit 2 µl Ladebuffer (loading dye, Fa. MBI Fermentas) wurden in einem 0,7 %igen Agarosegel mit 0,002 % Ethidiumbromid (Agarose und Ethidiumbromid gelöst in TAE-Puffer) elektrophoretisch über 45 Minuten bei 60 Volt (Kammer Fa. Keutz, Modell Mini) aufgetrennt. Seitlich der Nukleinsäuren wurde ein DNA-Größenmarker (Fa. MBI Fermentas) gemischt mit 2 µl Ladebuffer bei jeder Auftrennung mitgeführt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Analyse der gelelektrophoretischen Auftrennung ermöglichte eine Beurteilung hinsichtlich DNA-Kontaminationen oder einer Fragmentierung der isolierten RNA.

Abb. 5 dokumentiert die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA aus IEL. Es sind keine Kontaminationen mit DNA zu sehen. Die RNA zeigt ein typisches 3-Bandenmuster. Die auf dem gelelektrophoretischen Bild dargestellte RNA besteht fast ausschließlich aus ribosomaler RNA. In der oberen Bande stellt sich die 28S rRNA, in der mittleren die 18S rRNA und in der unteren Bande die 5,8 S rRNA sowie alle kleinen Fragmente, wie z.B. die small nuclear RNA dar. Die mRNA macht lediglich 1 % der Gesamt-RNA aus und ist wegen ihrer variablen Größe nicht einer bestimmten Bande zuzuordnen. Sie befindet sich im Bereich zwischen der mittleren und der unteren RNA-Bande im Gel. Die verbleibende RNA wurde entweder sofort in die Transkriptionsreaktion eingesetzt, oder in Aliquots zu

1 µg RNA in 50 µl Wasser für die Molekularbiologie unter Zugabe von 5 µl 3M Natrium-Acetat und 100-125 µl Ethanol 99 % bei -20 °C maximal 1 Woche eingefroren.

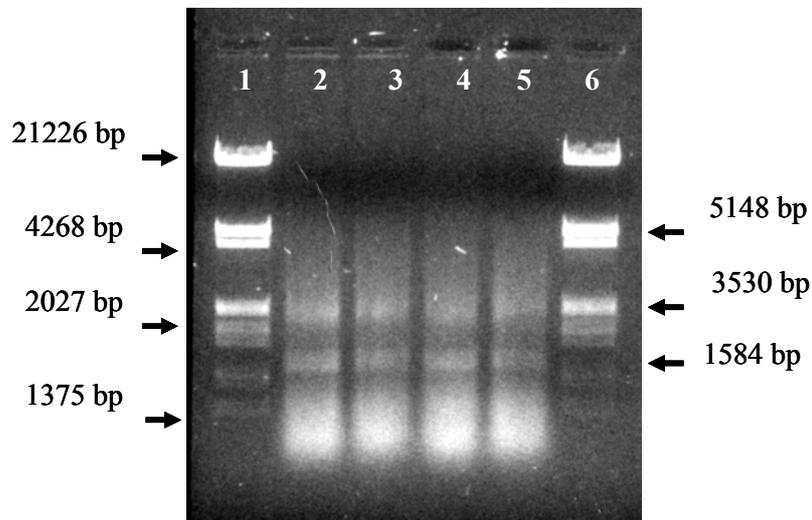


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 250 ng RNA in einem 0,7 %igen Agarosegel nach Isolierung aus IEL, Inkubationszeit = 4,5 h, repräsentative Darstellung

Legende Abb. 5:	Spur 1	Lambda DNA/Eco RI + Hind III Marker
	Spur 2	RNA aus unstimuliertem Kontrollansatz
	Spur 3	RNA aus Ansatz unstimulierter Zellen inkubiert mit 200 CD <sub>50</sub> /ml Stx1
	Spur 4	RNA aus Ansatz mit 2,5 µg/ml PHA-P (stimulierter Kontrollansatz)
	Spur 5	RNA aus Ansatz mit 2,5 µg/ml PHA-P und 200 CD <sub>50</sub> /ml Stx1
	Spur 6	Lambda DNA/Eco RI + Hind III Marker

### 3.1.7.4.3 Reverse Transkription

Sofern die RNA zuvor eingefroren war, wurden die exakt 1 µg RNA enthaltenden Aliquots 30 Minuten bei 12000 x g und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor Typ F45-30-11) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit 500 µl Ethanol 75 % gewaschen und anschließend 5 Minuten bei RT und 14000 x g erneut zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Rotor Typ F45-30-11). Der Überstand wurde dekantiert, die verbleibenden Tropfen mit Hilfe einer autoklavierten Pipettenspitze aus dem Reaktionsgefäß (2 ml Safe-Lock, Fa. Eppendorf) entfernt und das Gefäß 30 Minuten geöffnet unter ein Zellstofftuch gelegt, bis alle Ethanolreste verdunstet waren. Das verbleibende Pellet wurde in 13 µl Wasser für die Molekularbiologie aufgenommen. Ebenso wurde verfahren, wenn das 1 µg RNA enthaltende Volumen nach der RNA-Aufreinigung in mehr als 13 µl Volumen gelöst war. Anderenfalls wurde das RNA-haltige Volumen mit Wasser für die Molekularbiologie auf 13 µl aufgefüllt. Die RNA wurde in PCR Reaktionsgefäße (200 µl, Fa. Nerbe) überführt, mit 2 µl Oligo d(T)-Primern (= 0,5 µg, Fa. Applied Biosystems) versetzt und 5 Minuten bei 70 °C im Cyclor (Perkin-Elmer, GeneAmp PCR-System 9600) inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert. Das Reaktionsvolumen wurde durch Zugabe von 14 µl Wasser für die Molekularbiologie, 5 µl M-ML-V 5x Puffer (Fa. Promega), 5 µl dNTP-Mix (= 0,05 µmol je Nukleotid, Fa. MBI Fermentas) und 1 µl M-MLV RT (H) (= 200 U, Fa. Promega) auf 40 µl Gesamtvolumen je Ansatz ergänzt. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Ansätzen wurden von den verschiedenen Proben auch Kontrollen auf das Vorhandensein genomischer DNA durchgeführt. In diesen Fällen wurde die reverse Transkriptase durch 1 µl Wasser für die Molekularbiologie ersetzt. Alle Reaktionsgemische wurden im Cyclor (Fa. Perkin Elmer, GeneAmp PCR-System 9600) nach folgendem Protokoll behandelt:

37 °C 60 Minuten

94 °C 2 Minuten

4 °C ∞

Anschließend wurden die Proben entweder bei -20 °C eingefroren oder sofort in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.

### 3.1.7.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Jeder Ansatz sowie die entsprechende Kontrolle auf genomische DNA wurde auf die mRNA-Expression von 5 verschiedenen Zytokinen (IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 und Interferon  $\gamma$ ) und eines konstitutiv exprimierten Gens (GAPDH) untersucht. Die Basenfolge der Primer ist in Tabelle 5 dargestellt.

Je Primerpaar wurden spezielle Vorgemische (sogenannter „Mastermix“) angesetzt, die außer der cDNA alle zur Detektion eines spezifischen Transkriptionsproduktes nötigen Substanzen enthielten.

Tabelle 5: Basenfolge der Primer, die zur Detektion der Zytokingene bzw. des konstitutiv exprimierten Gens in die PCR eingesetzt wurden und erwartete Länge der Amplifikate der PCR

Primer	Basenfolge 5'bis 3'Ende	Länge des Amplifikats
GAPDH Forward <sup>1</sup>	-ATC ACT GCC ACC CAG-	149 bp
GAPDH Reverse <sup>1</sup>	-CAT GCC AGT GAG CTT-	
IL-2 Forward <sup>1</sup>	-TCT TGC ATT GCA CTA ACT CT-	425 bp
IL-2 Reverse <sup>1</sup>	-GCT TTG ACA AAA GGT AAT CC-	
IL-4 Forward <sup>1</sup>	-GCC ACT TCG TCC ATG GAC AC-	311 bp
IL-4 Reverse <sup>1</sup>	-TCC CAA GAG GTC TCT CAG CG-	
IL-8 Forward <sup>2</sup>	-GCA GTT CTG TCA AGA ATG AG-	236 bp
IL-8 Reverse <sup>2</sup>	-GGA TCT TGC TTC TCA GCT C-	
IL-10 Forward <sup>1</sup>	-TGT TGC CTG GTC TTC CTG-	411 bp
IL-10 Reverse <sup>1</sup>	-TCT CTT CAC CTG CTC CAC-	
Interferon $\gamma$ Forward <sup>1</sup>	-GCT TTA CTG CTC TGT GTG CT-	441 bp
Interferon $\gamma$ Reverse <sup>1</sup>	-GAC TTC TCT TCC GCT TTC TG-	

<sup>1</sup>beschrieben von Gohin *et al.* (62)

<sup>2</sup>beschrieben von Morsey *et al.* (143)

Der in Tabelle 6 dargestellte Mastermix wurde anschließend durch Zugabe von exakt 1  $\mu$ l cDNA (aus der Transkriptionsreaktion) ergänzt. Um eine mögliche Kontamination der

verwendeten Substanzen erkennen zu können, wurde je Primerpaar eine Kontrolle mitgeführt, die anstatt cDNA 1 µl A. bidest. enthielt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der im Mastermix pro PCR-Ansatz enthaltenen Substanzen

Substanz	verwendetes Volumen (in µl)	verwendete Menge	Bezugsquelle
A. bidest.	13,8	-	-
10x Puffer für Amplitaq Polymerase (mit MgCl <sub>2</sub> )	2,0	-	Applied Biosystems
Primer Forward	1,0	0,02 µmol	MWG Biotech AG
Primer Reverse	1,0	0,02 µmol	MWG Biotech AG
AmpliTaQ Polymerase	0,2	1 U	Applied Biosystems
dNTP	1,0	4 nmol je Nukleotid	Fa. MBI Fermentas

Anschließend wurde das gesamte Probenvolumen (20 µl) gevortext, 10 Sekunden mit 10000 x g bei RT zentrifugiert und im Cycler (Fa. Perkin Elmer, GeneAmp PCR-System 9600) die Zielsequenz nach folgendem Protokoll amplifiziert:

<u>94 °C</u>	<u>15 sec</u>	} 35 x
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
<u>72 °C</u>	<u>90 sek</u>	
<u>72 °C</u>	<u>5 min</u>	
4 °C	∞	

Zur Visualisierung der erhaltenen Amplifikate wurden 18 µl der PCR Produkte mit 2 µl loading dye gemischt und in die dafür vorgesehenen „Taschen“ im Agarosegel (2 % in TAE-Puffer mit 0,002 % Ethidiumbromid) gegeben. Seitlich der PCR-Produkte wurden je 10 µl bestehend aus 1 µl Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder, Fa. MBI Fermentas) gemischt mit 1 µl loading dye und 8 µl TAE-Puffer in die Taschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V über 60 Minuten.

Anschließend wurden die Banden mit Hilfe von UV-Licht visualisiert, mit einem Fotodokumentationssystem (Fa. Herolab) aufgenommen und als Dateien im tiff-Format in digitaler Form gesichert.

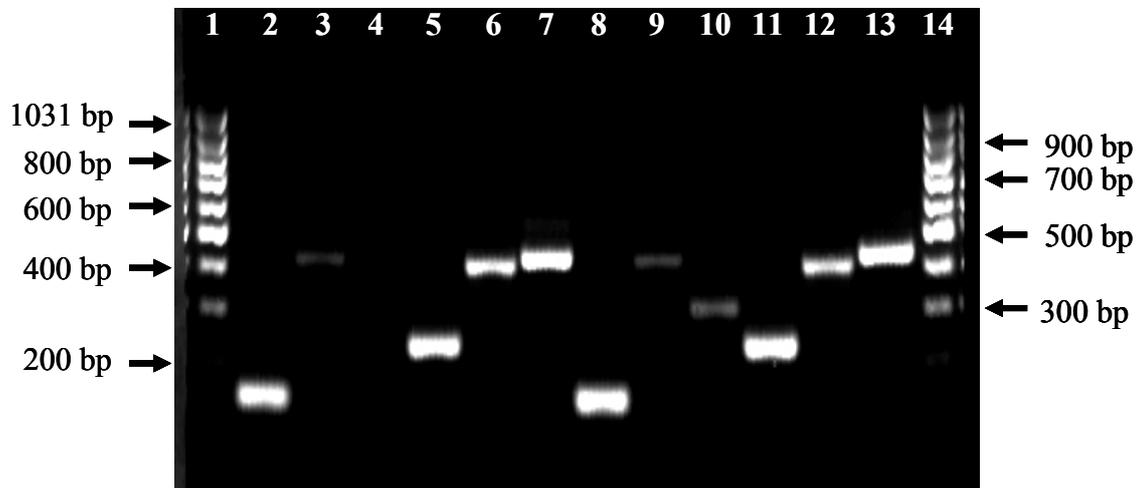


Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der bei Einsatz spezifischer Primer amplifizierten PCR-Produkte, unstimulierte Zellen, Inkubationszeit = 4,5 h, repräsentative Darstellung

Legende zu Abb. 4:	Spur 1	100 bp Marker, GeneRuler™
	Spur 2-7	Amplifikate unstimulierter IEL
	Spur 2	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für GAPDH
	Spur 3	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-2
	Spur 4	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-4
	Spur 5	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-8
	Spur 6	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-10
	Spur 7	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für Interferon $\gamma$
	Spur 8-13	Amplifikate unstimulierter IEL, inkubiert mit 200 CD <sub>50</sub> /ml Stx1
	Spur 8	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für GAPDH
	Spur 9	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-2
	Spur 10	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-4
	Spur 11	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-8
	Spur 12	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für IL-10
	Spur 13	cDNA nach Einsatz spezifischer Primer für Interferon $\gamma$
	Spur 14	100 bp Marker, GeneRuler™

Wie die Abb. 6 zeigt, wiesen die in der PCR erhaltenen Amplifikate die erwarteten Größen auf, so dass von einer spezifischen Bindung der Primer an die DNA ausgegangen werden konnte.

#### **3.1.7.4.5 Untersuchung des Einflusses von Stx1 auf die Transkription von Zytokinen durch PBMC und IEL *in vitro***

Die Untersuchung der Neutralisierbarkeit der Stx1-induzierten Änderungen der Zytokintranskription von IEL und von PBMC durch Zugabe von anti-StxB1 in den Inkubationsansatz wurde unter modifizierten Bedingungen durchgeführt. Bei der Untersuchung von IEL mit der unter 3.1.6.4.2 beschriebenen Methode traten häufig Probleme mit der Stabilität der mRNA auf. Die unten dargestellte Methode reduzierte die Probleme deutlich, u.a. durch eine wesentlich kürzere Isolationszeit der RNA. An dieser Stelle werden nur die Unterschiede zur bereits beschriebenen Methode dargelegt. PBMC wurden wie unter 3.1.4.4 beschrieben isoliert und über 4,5 Stunden unter Zugabe von 5 µg/ml PHA-P in einer 6 Loch-Platte inkubiert. PBMC und IEL wurden parallel in Kontrollansätzen bzw. mit 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 bzw. 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 und 1,5 µg/ml anti-StxB1 angesetzt und wie beschrieben geerntet. Im Anschluß an die Reinigung der Zellen von Mediumresten wurden sie jedoch nicht in RNAzol<sup>TM</sup>, sondern in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) je 5 x 10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen und bei -70 °C für maximal 3 Tage eingefroren. Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini-Kits nach Angaben des Herstellers. Die einzelnen Ansätze wurden unter wiederholtem Vortexen aufgetaut und die Proben durch mehrmaliges Aufziehen in eine 2 ml Spritze (Durchmesser der Kanüle = 0,7 mm) homogenisiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Es wurden 350 µl Ethanol 70 % zugegeben und die Suspension vorsichtig durch Pipettieren vermischt. Jede Probe wurde auf eine RNeasy-Säule gegeben und mit einer Tischmikrozentrifuge (Hettich Mikro 20) 15 Sekunden bei 13000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, jede Säule mit 700 µl Waschpuffer RW1 gefüllt und erneut zentrifugiert (15 sek bei 13000 x g). Jede Säule wurde anschließend zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen (Zentrifugation erster Waschschrift = 15 Sekunden bei 13000 x g; Zentrifugation zweiter Waschschrift = 2 Minuten bei 13000 x g), bevor die RNA von der Säulenmatrix eluiert werden konnte. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Säulenmembran mit 50 µl RNase-freiem Wasser befeuchtet, 1 Minute bei 13000 x g zentrifugiert und dieser Schritt nochmals mit 30 µl RNase-freiem Wasser wiederholt. Die in je 80 µl RNase-freiem Wasser gelöste RNA

wurde anschließend auf Eis gelagert und der Nukleinsäure-Gehalt photometrisch wie bereits für die IEL beschrieben ermittelt. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels einer gelelektrophoretischen Aufreinigung (siehe IEL, Kapitel 3.1.6.4.2). Bei zufriedenstellender Qualität der RNA wurden eventuell vorhandene Kontaminationen mit DNA, die im Agarosegel sichtbar wurden, mit Hilfe eines DNase-Verdau beseitigt. Zu diesem Zweck wurde zu der RNA 10 µl DNase Puffer (10fach) in depc-Wasser gegeben, die Suspension mit 60 U DNaseI (in 8 µl) supplementiert und das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl ergänzt. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37 °C über 45 Minuten. Anschließend wurden 5 µl SDS-Lösung 0,1 % zugegeben, das Enzym durch kurzes (2 sek) Vortexen mechanisch geschädigt und in den folgenden 2 Minuten bei Raumtemperatur durch SDS vollständig zerstört. Die RNA-haltige Suspension wurde durch 10 µl 3 M Natrium-Azetat-Lösung (pH 4,6) und 200-250 µl Ethanol 99 % ergänzt, kurz gevortext und 5 Sekunden abzentrifugiert und dann zum Fällen der Nukleinsäuren über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Das Auftauen der RNA und die reverse Transkription erfolgte wie bereits unter 3.1.6.4.3 beschrieben. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in leicht modifizierter Form wie unter 3.1.6.4.4 beschrieben durchgeführt. Die Modifikation bestand in einem veränderten GAPDH-Primer (GAPDH Forward: -GGG AAG CTC GTC ATC AAT GG-; GAPDH Reverse: -GCG TGG ACA GTG GTC ATA AGT C-), so dass eine Amplifikatlänge von 347 bp erwartet wurde, und einem wie folgt geänderten Protokoll zur Amplifikation der Zielsequenzen:

<u>94 °C</u>	<u>2 min</u>	} 35 x
94 °C	15 sec	
55 °C	30 sec	
<u>72 °C</u>	<u>1 min</u>	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

### 3.1.7.4.6 Datenanalyse

Der Vergleich der Größe und Extinktion der verschiedenen Banden wurde mit Hilfe des easywin 32 Computerprogramms der Firma Heralab durchgeführt. Die Emission der GAPDH-Bande wurde in jedem Ansatz als 100 % definiert. In den Abbildungen 17-21 ist die Emissionsstärke der Zytokin-/Chemokinbanden relativ zu der der GAPDH-Bande

dargestellt. Die Abbildungen 22-25 zeigen die relative Emissionsstärke (bezogen auf GAPDH) der Zytokin-/Chemokinbanden im Verhältnis zur für die Mediumkontrolle des jeweiligen Ansatzes ermittelten Emission. Eine Veränderung der Transkription um weniger als 10% wurde im gesamten Ergebnisteil als „nicht nachweisbar“ bezeichnet, eine Veränderung von 10 – 20 % als „geringfügig“, eine Änderung der Transkription um 20 – 50 % als „deutlich“ und eine darüber hinausgehende als „erheblich“ veränderte Transkription bezeichnet.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Etablierung und Optimierung der Präparation boviner ilealer IEL

#### Vorversuch 1

Um herauszufinden, welche Puffer, Inkubationszeiten und Aufbereitungen des Probenmaterials geeignet sind möglichst vitale IEL zu isolieren und die Kontamination von Lymphozyten durch Zellen anderen Ursprungs zu minimieren, wurden verschiedene Puffer und Aufbereitungsmethoden miteinander verglichen. In Tabelle 7 ist dargestellt, wieviele Zellen insgesamt isoliert wurden und wieviele Zellen der Gesamtzellsuspension als Epithelzellen bzw. Monozyten/Makrophagen identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurde die Expression von Lymphozytenoberflächenantigenen innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze bestimmt; die Zusammensetzung der Zellsuspension ermöglicht Rückschlüsse, ob es sich bei den gewonnenen Immunzellen um intraepitheliale Lymphozyten oder um Lymphozyten aus der *Lamina propria mucosae* handelt. Während Lymphozyten aus der *Lamina propria mucosae* v.a. immunglobulinproduzierende Plasmazellen sind und die T-Zellen zur Hälfte aus CD4<sup>+</sup> Helferzellen bestehen, findet man intraepithelial wenig B-Zellen und die Anzahl der CD8<sup>+</sup>-Zellen ist deutlich höher als der Prozentsatz an CD4<sup>+</sup>-Zellen (siehe Kapitel 2.1.2.2 und 2.1.2.3).

Zusätzlich wurde die Vitalität der Zellen im gewählten Aquisitionsfenster (siehe Kapitel 3.1.6.1) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Das zu untersuchende Stück Ileum eines Tieres wurde aufgeteilt und entweder mit seiner mukosalen Seite nach außen gezogen, mit PBS gefüllt und an beiden Enden abgebunden (Ansatz 1-5) oder die Mukosa isoliert und in Stücke geschnitten (Ansatz 6-10). Beide Methoden wurden mit drei verschiedene Pufferlösungen (PBS-AB-EDTA mit 1mM DTT: Ansatz 1, 3, 6, 8; PBS-AB-EDTA: Ansatz 2, 4, 7, 9 und PBS-AB: Ansatz 5, 10) durchgeführt und zusätzlich der Erfolg mechanisch unterstützten Herauslösen von Zellen aus dem Gewebeverband (vortexen, Ansatz: 3, 4, 5, 8, 9, 10) untersucht (siehe Kapitel 3.1.5.2).

Tabelle 7: Darstellung der gewonnenen Zellmenge bei unterschiedlicher Probenaufbereitung von Teilen eines Darmstückes ohne vorherige Aufreinigung der gewonnenen Zellsuspension über einen Dichtegradienten, n = 1 pro Art der Probenaufbereitung

Parameter	Art der Probenaufbereitung <sup>4</sup>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zellzahl <sup>1</sup>	17	17	10	6,3	49	56	38	32	29	24
Zytokeratin <sup>+2,3</sup>	2,9	5,5	3,6	3,6	3,5	2,5	7,3	16,7	5,7	2,6
MØ.Diff. AG <sup>+2</sup>	0,9	1,3	0,8	0,8	3,4	0,3	1,1	0,8	1,4	0,1

<sup>1</sup> x 10<sup>6</sup> Zellen absolut

<sup>2</sup> bezogen auf die gesamte durchflusszytometrisch analysierte Zellsuspension

<sup>3</sup> als Marker für Epithelzellen

<sup>4</sup> Erläuterung siehe Text im Kapitel 3.1.4.2

Tabelle 8: Darstellung der Verteilung der IEL-Subpopulationen und der Vitalität der Zellen *ex vivo* bei unterschiedlicher Probenvorbereitung von Teilen eines Darmstückes ohne vorherige Aufreinigung der gewonnenen Zellsuspension über einen Dichtegradienten, n = 1 pro Probenaufbereitung

Parameter	Anteil positiver Zellen an IEL <sup>1</sup> in % nach Probenaufbereitung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CD4 <sup>+</sup>	4,9	8,1	3,6	2,6	3,3	7,7	10,9	12,5	11,3	19,4
CD8α <sup>+</sup>	1,4	1,4	1,7	1,7	1,3	6,5	3,5	9,3	5,8	0,8
TcR1-N12 <sup>+</sup>	6,1	5,4	7,7	11,1	12,3	7,2	5,9	9,8	7,7	4,7
CD21 <sup>+</sup>	2,2	5,3	0,0	0,0	0,1	1,3	6,2	0,5	0,3	1,3
PI <sup>+2</sup>	62	58	41	47	65	55	88	37	60	55

<sup>1</sup> bezogen auf die Zellen im Aquisitionsfenster

<sup>2</sup> Wert der jeweils ersten Messung der Immunphänotypisierung eines Ansatzes, gerundet auf ganze Zahlen

Die Auswertung dieses Versuches ließ noch kein endgültiges Urteil über die Qualität der einzelnen Methoden zu. Ein weiterer Vorversuch sollte klären, welche Art der Probenvorbereitung geeignet ist, IEL zu isolieren. Als Puffer diente in den folgenden Versuchen PBS-AB-EDTA, weil er die Gewinnung einer ausreichenden Zellmenge gewährleistete.

#### Vorversuch 2

Es wurden sowohl Ansätze mit abgebundenem Darm als auch mit isolierter Mukosa untereinander verglichen. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte im Anschluß an die Isolierung über eine Dichtegradientenzentrifugation. Um festzustellen, ob die gewählten Dichten des Trennmediums von  $\xi = 1,06088$  g/ml und  $\xi = 1,08928$  g/ml geeignet sind, bovine IEL von anderen, gleichzeitig isolierten Zellen wie Darmepithelzellen oder Granulozyten zu reinigen, wurden alle in der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Zellfraktionen miteinander bezüglich ausgewählter Parameter verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Sie zeigt, dass aus dem Ileum besonders viele Zellen gewonnen werden konnten, wenn die Mukosa zuvor von den übrigen Bestandteilen der Darmwand getrennt wurde. Verglichen mit den Zellen der anderen Ansätze war die Membranintegrität (gemessen an der Durchlässigkeit für den Farbstoff PI) der aus isolierter Mukosa gewonnenen Zellen gut erhalten. Dies betrifft insbesondere die Zellen, die zwischen den beiden Percollfraktionen lokalisiert vorlagen. Der Anteil aufgereinigter Monozyten/Makrophagen und Epithelzellen war in diesen Ansätzen am niedrigsten. Allerdings wurden auch kaum  $CD4^+$ ,  $CD8\alpha^+$  oder  $TcR1-N12^+$  T-Lymphozyten isoliert. Die Zellen bestanden v.a. aus  $CD21^+$  B-Zellen. Aus dem Ansatz mit abgebundenem Darm, der nicht gevortext wurde, waren nur wenige Zellen zu isolieren. Zusätzlich war der Anteil  $PI^+$  Zellen besonders hoch. Nahezu die Hälfte der isolierten Zellen waren Epithelzellen. Die restlichen Zellen der Suspensionen der einzelnen Fraktionen bestanden aus  $CD8\alpha^+$  Zellen mit geringeren Anteilen von  $TcR1-N12^+$ ,  $CD4^+$  und  $CD21^+$  Zellen. Wurde der abgebundene Darm gevortext, resultierte dies in einer leicht erhöhten Gesamtzellzahl verglichen mit dem nicht gevortexten Stück abgebundenen Darmes. Die Zellen wiesen in allen untersuchten Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation weniger  $PI^+$  Zellen auf, als die nicht gevortexten Zellen, aber mehr, als in den aus isolierter Mukosa gewonnenen Zellen. Auch bei dieser Form der Probenvorbereitung war ungefähr die Hälfte der Zellen als Epithelzellen zu identifizieren. Die Zusammensetzung der Lymphozyten war vergleichbar mit der aus den nicht gevortexten Darmabschnitten isolierten Immunzellen.

Tabelle 9: Vergleichende Analyse von drei verschiedenen Präparationsmethoden für bovine IEL und der Trennung von Zellen unterschiedlicher Dichte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation, n = 1 Bestimmung aus 1 Präparation eines Tieres

Parameter (%)	Ansatz/Fraktion								
	1			2			3		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Zellzahl <sup>1</sup>	0,8	3,0	0,8	0,9	15,0	7,0	58,0	200,0	4,7
PI <sup>+2,3</sup>	89	54	58	53	40	36	47	28	34
Zytokeratin <sup>+3</sup>	60,8	44,2	53,0	64,1	44,5	45,5	75,2	38,4	57,7
MØ.Diff. AG <sup>+3</sup>	6,9	7,8	11,9	11,3	13,4	10,4	6,6	4,7	4,4
CD8 $\alpha$ <sup>+4</sup>	13,8	17,7	10,2	6,3	15,6	6,9	4,0	3,6	2,2
CD4 <sup>+4</sup>	3,0	4,0	4,0	2,3	6,4	4,4	3,0	4,9	2,8
TcR1-N12 <sup>+4</sup>	8,1	7,8	5,0	6,3	7,6	2,5	3,4	3,4	1,1
CD21 <sup>+4</sup>	5,9	7,5	4,4	24,2	18,5	7,3	40,3	39,4	17,2

<sup>1</sup> x 10<sup>6</sup> absolut

<sup>2</sup> ermittelt im Durchflusszytometer, Wert der jeweils ersten Messung der Immunphänotypisierung eines Ansatzes, gerundet auf ganze Zahlen

<sup>3</sup> Prozentsatz positiver Zellen bezogen auf die Gesamtmenge analysierter Zellen

<sup>4</sup> Prozentsatz positiver Zellen bezogen auf die Zellen im Aquisitionsfenster

Legende zu Tabelle 9:

1. Darm abgebunden und mit PBS-Puffer gefüllt, Inkubationszeit = 25 Minuten
  2. Darm abgebunden und mit PBS-Puffer gefüllt, Inkubationszeit = 15 Minuten, anschließend 2 Minuten gevortext
  3. Mukosa abgelöst, Inkubationszeit = 20 Minuten, anschließend 3 Minuten gevortext
- a Zellschicht geerntet zwischen L-15 Medium und Percoll der Dichte  $\xi = 1,06088$  g/ml
  - b Zellschicht geerntet zwischen den Percollschichten der Dichten  $\xi = 1,06088$  g/ml und  $\xi = 1,08928$  g/ml
  - c Zellpellet geerntet unterhalb der Percolllösung der Dichte  $\xi = 1,08928$  g/ml

### Vorversuch 3

Obwohl die Zellzusammensetzung der durch Ablösen der Mukosa von der *Lamina propria mucosae* und Vortexen im Anschluss an die Inkubationszeit gewonnenen Zellen nicht der aus der Literatur bekannten typischen Zusammensetzung von ilealen IEL entsprach, wurde diese Methode nochmals, diesmal im Vergleich mit in Streifen geschnittenen Stücken des Ileums, näher untersucht. Grund war die hohe Zahl isolierter Zellen und die geringe Durchlässigkeit der Zellmembran dieser Zellen für PI sowie die geringe Kontaminationsrate mit epithelialen Zellen.

Die in der Tabelle 10 dargestellten Ergebnisse dieses Versuches zeigten trotz der unterschiedlichen Probenaufbereitung keine deutlichen Unterschiede. Für das Zerschneiden des Ileums in Streifen sprach der geringere Anteil an isolierten Zytokeratin<sup>+</sup> Epithelzellen und die insgesamt schnellere und somit für die Zellen schonendere Handhabung.

### Vorversuch 4

Es wurde angestrebt, das Ileum wegen der oben genannten Vorteile dieser Präparationsmethode wie schon im Vorversuch 3 beschrieben, in Streifen zu schneiden. Um die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu untersuchen und festzustellen, ob die isolierten IEL geeignet sein würden in die geplanten Untersuchungen eingesetzt zu werden, wurden die Proben in drei aufeinander folgenden Versuchen identisch aufbereitet und die Zellen anschließend phänotypisch und funktionell charakterisiert. Die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen sind in Tabelle 11 dargestellt. Der Prozentsatz toter Zellen wurde wie bereits beschrieben für jede Versuchsreihe einmal bei Messung der ersten Probe bestimmt. Es ergab sich ein Durchschnittswert von 33 % mit einem Maximalwert von 55 % und einem Minimalwert von 15 %.

Die Fähigkeit der Zellen auf den Zusatz eines Mitogens mit Transformation zu reagieren wurde bei den Zellen aus zwei der drei Präparationen untersucht. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch. Hierbei überlebten die Zellen eine dreitägige Inkubation mit ConA (c = 2,5 µg/ml) und zeigten auch eine geringe Neigung typische Zellanhäufungen zu bilden, die eine Proliferation der Zellen signalisieren. Diese Zellansammlungen waren bei Stimulation mit PHA-P (c = 2,5 µg/ml) deutlicher ausgeprägt.

Die Fähigkeit „Natürlicher Killerzellen“ fremde Zielzellen zu lysieren wurde im Rahmen von 2 der 3 Präparationen ermittelt und nachgewiesen. Sie ist in der Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 10: Vergleichende Analyse von zwei verschiedenen Präparationsmethoden für bovine IEL und der Trennung von Zellen unterschiedlicher Dichte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation, n = 1 Bestimmung aus 1 Präparation eines Tieres

Parameter (%)	Ansatz/Fraktion					
	4			5		
	a	b	c	a	b	c
PI <sup>+</sup> Zellen <sup>1</sup>	84	65	40	76	61	50
Zytokeratin <sup>+2</sup>	3,7	6,3	13,4	10,6	29,1	19,7
MØ.Diff. AG <sup>+2</sup>	13,4	14,1	3,2	10,3	14,1	6,5
CD8α <sup>+ 3</sup>	7,4	7,5	0,7	6,1	5,7	1,3
CD8β <sup>+3</sup>	-	3,9	-	-	2,8	-
CD4 <sup>+ 3</sup>	2,0	3,1	1,0	1,8	1,8	-
oberfl. IgM <sup>+3</sup>	5,0	2,4	0,3	2,9	7,6	2,0
TcR1-N12 <sup>+ 3</sup>	25,8	13,3	3,1	18,7	11,4	4,5
WC1 <sup>+ 3</sup>	-	1,2	-	-	1,1	-

<sup>1</sup> ermittelt im Durchflusszytometer, Wert der jeweils ersten Messung der Immunphänotypisierung eines Ansatzes, gerundet auf ganze Zahlen

<sup>2</sup> Prozentsatz positiver Zellen an den Gesamtzellen einer Fraktion

<sup>3</sup> Prozentsatz positiver Zellen an den Zellen im Aquisitionsfenster

- nicht untersucht

Legende Tabelle 10:

4. Ileum in Streifen zerschnitten

5. Mukosa isoliert

a Zellschicht geerntet zwischen L-15 Medium und Percoll der Dichte  $\xi = 1,06088$  g/ml

b Zellschicht geerntet zwischen den Percollschichten der Dichten  $\xi = 1,06088$  g/ml und  $\xi = 1,08928$  g/ml

c Zellpellet geerntet unterhalb der Percolllösung der Dichte  $\xi = 1,08928$  g/ml

Tabelle 11: Oberflächenexpression verschiedener Antigene durch Zellen im Aquisitionsfenster *ex vivo*, gerntet zwischen den Percolllösungen der Dichten  $\xi = 1,06088$  g/ml und  $\xi = 1,08928$  g/ml, n = 3 Bestimmungen aus 3 Präparationen von 3 Tieren

Antigen	Anteil positiver Zellen an IEL (%)	
	Mittelwert in %	Standardabweichung
CD44 <sup>+</sup>	6,5	3,0
CD2 <sup>+</sup>	26,8	7,5
CD3 <sup>+</sup>	35,4	7,2
CD4 <sup>+</sup>	7,2	3,2
CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	19,4	4,1
oberfl. IgM <sup>+</sup>	12,3	7,1
TcR1-N12 <sup>+</sup>	6,5	3,1
TcR1-N7 <sup>+</sup>	2,1	1,8
TcR1-N6 <sup>+</sup>	1,2	0,4
WC1 <sup>+</sup>	1,0	0,7
MHC II <sup>+</sup>	34,3	7,7
CD71 <sup>+</sup>	19,5	6,2
CD25 <sup>+</sup>	2,3	1,2
ACT2 <sup>+</sup>	20,1	10,0
MØ.Diff. AG <sup>+</sup>	0,4	0,1
Zytokeratin <sup>+</sup>	29,6	27,4
CD77 <sup>+</sup>	9,7	6,1

Drei Experimente nach identischen Präparationsbedingungen zeigten eine tolerierbare Kontamination von IEL mit Zellen anderen Ursprungs. Die Zellausbeute und Funktionalität erwies sich als ausreichend für die durchzuführenden Versuche, so dass diese Methode leicht modifiziert zur Zellisolierung in den folgenden Versuchen als Standard beibehalten wurde.

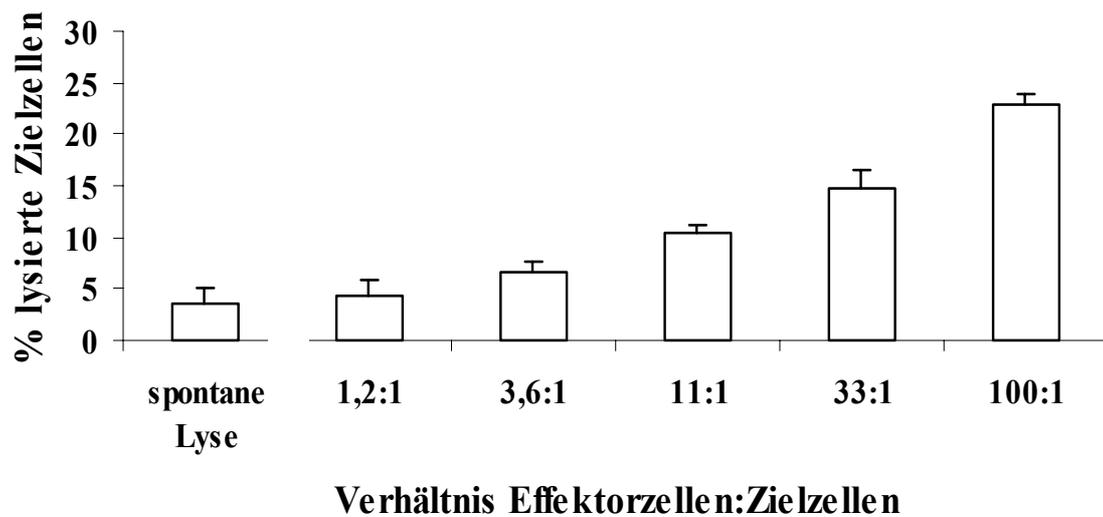


Abb. 7: Darstellung der Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ von IEL,  $n = 5$  Bestimmungen je Ansatz (Verhältnis Effektorzellen:Zielzellen) aus 2 Präparationen von 2 Tieren, Inkubationszeit = 18 Stunden

### 3.2.2 Histologische Beurteilung des Probenmaterials

Um überprüfen zu können, ob es sich bei den isolierten und untersuchten Lymphozyten hauptsächlich um intraepitheliale Zellen handelte und nicht um Zellen aus der Lamina propria oder aus Lymphfollikeln des Darms, wurden direkt im Anschluss an die Entnahme des Ileums im Schlachthof und nach Isolation der Zellsuspension Darmstücke entnommen und in Formalin fixiert. Die fixierten Proben wurden anschließend histologisch zu Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten aufgearbeitet.

Ein Vergleich des Aufbaus der Darmschleimhaut der Abbildung 8A und 8B zeigt das Ablösen der hochprismatischen *Lamina epithelialis mucosae* von der darunterliegenden *Lamina propria*. Dieses Ablösen erfolgte unvollständig, teilweise blieben nicht abgelöste Stücke Darmepithel zurück. Die Lamina propria blieb erhalten. Vergleichbare Ergebnisse ergab die mikroskopische Untersuchung vor und nach Präparation von allen 10 untersuchten Ileumstücken.

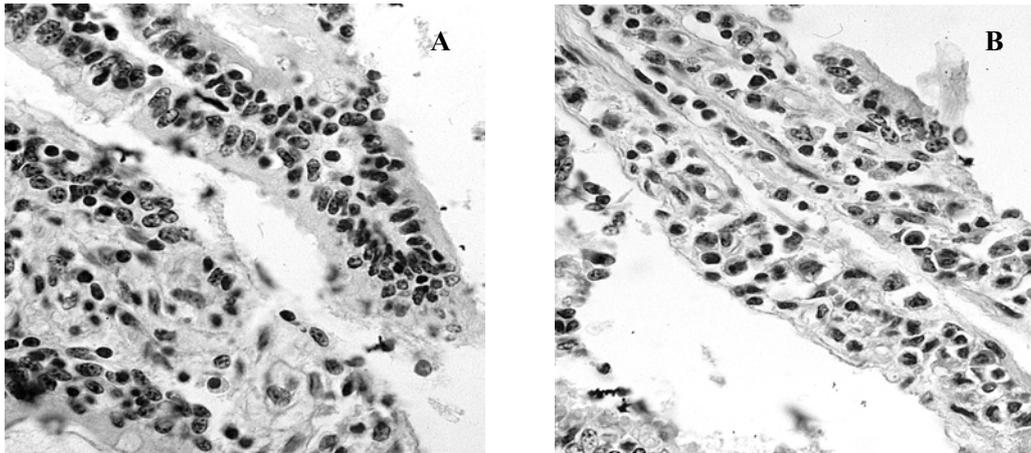


Abb. 8: Lichtmikroskopische Darstellung eines repräsentativen Stückes Ileumschleimhaut, Probenmaterial fixiert direkt im Anschluss an die Entnahme (A); vergleichbares Darmstück nach Abschluss der Isolation von IEL (B); Vergrößerung 400fach

### 3.2.3 Phänotypische Charakterisierung boviner IEL

#### 3.2.3.1 Expression von Oberflächenantigenen bei ilealen IEL ex vivo

Die Zellen im Aquisitionsfenster (siehe Abb. 3, Kapitel 3.1.5.1) wurden hinsichtlich der Expression von verschiedenen Leukozytenantigenen auf ihrer Oberfläche untersucht, um die prozentuale Verteilung der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen innerhalb der präparierten Zellen aufzuklären. Dabei wurde besonderer Wert auf die genaue Charakterisierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen gelegt, denen in der Mukosa eine besondere Bedeutung zukommt (siehe Kapitel 2.1.2.3).

Die isolierten IEL bestanden v.a. aus  $CD3^+$  T-Zellen. Sie konnten zu einem Großteil durch den Nachweis der Expression von  $CD6$  als reife T-Zellen identifiziert werden. Zusätzlich trugen die überwiegende Anzahl der Zellen das Antigen  $CD2$  auf ihrer Oberfläche, das von  $\alpha\beta$  T-Zellen exprimiert wird. Die T-Zellpopulation bestand insbesondere aus  $CD8^+$  Zellen, wobei eine Diskrepanz von 8 % zwischen den  $CD8\alpha^+$  und  $CD8\beta^+$  Zellen zugunsten der  $CD8\alpha^+$  Zellen festzustellen war. Ca. 1/5 (13,3 %) der T-Zellen waren  $CD4^+$  Zellen.

Tabelle 12: Oberflächenexpression von Leukozytenantigenen durch IEL im Aquisitionsfenster *ex vivo*, n = 10-24 Bestimmungen aus 5-12 Präparationen von 5-12 Tieren

Antigenexpression	Mittelwert in %	Variationsbreite in %*
MHC I <sup>+</sup>	94,6	86,2-98,9
CD44 <sup>+</sup>	63,6	54,1-85,1
CD2 <sup>+</sup>	53,2	29,5-75,5
CD3 <sup>+</sup>	61,0	39,4-87,1
CD4 <sup>+</sup>	13,3	3,3-28,0
CD6 <sup>+</sup>	48,6	26,3-72,9
CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	33,4	17,4-62,6
CD8 $\beta$ <sup>+</sup>	25,4	7,8-61,3
TcR1-N12 <sup>+</sup>	15,7	8,0-25,8
TcR1-N7 <sup>+</sup>	3,2	0,2-8,7
TcR1-N6 <sup>+</sup>	2,6	0,2-4,6
WC1 <sup>+</sup>	2,6	0,5-5,3
ACT2 <sup>+</sup>	42,8	28,4-61,2
CD25 <sup>+</sup>	6,1	2,9-33,5
CD71 <sup>+</sup>	8,1	1,1-19,7
MHC II <sup>+</sup>	14,7	4,4-52,5
WC8 <sup>+</sup>	0,1	0,0-0,5
WC9 <sup>+</sup>	11,3	2,5-31,1
CD21 <sup>+</sup>	11,6	0,6-33,6
oberfl. IgM <sup>+</sup>	9,6	0,3-34,0

\* gibt den gemessenen Minimal- bzw. Maximalwert an

Eine Oberflächenexpression der  $\alpha$  Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) und des Transferrinrezeptors (CD71) wurde auf weniger als 10 % der Zellen detektiert. Ein weiteres, von aktivierten T-Zellen exprimiertes Antigen, WC8, konnte auf IEL kaum nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde ACT2, ein gewebespezifischer Aktivierungsmarker, von nahezu der Hälfte der isolierten Zellen exprimiert (42,8 %). WC9, das auf verschiedenen B- und T-Zellsubpopulationen sowie auf Monozyten/Makrophagen und Granulozyten zu finden ist, wurde von ca. 10 %, MHC II von ca. 15 % der Zellen auf der Oberfläche exprimiert.

11,6 % der isolierten Zellen waren CD21<sup>+</sup> B-Zellen, eine etwa gleich große Anzahl Zellen trug oberflächenständiges IgM, das ausschließlich auf B-Zellen nachgewiesen werden kann.

Der Anteil der TcR1-N12<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen betrug 15,7 %. Sie setzten sich aus verschiedenen Subpopulationen wie den TcR1-N7<sup>+</sup>, den TcR1-N6<sup>+</sup> und den WC1<sup>+</sup> Zellen zusammen. Eine genauere Differenzierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Differenzierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen in die verschiedenen Subpopulationen *ex vivo*, n = 8-9 Bestimmungen aus 4-5 Präparationen von 4-5 Tieren; die Gesamtheit der TcR1-N12<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden als 100% definiert

Antigenexpression	Mittelwert in % aller $\gamma\delta$ T-Zellen	Variationsbreite in % *
TcR1-N12 <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	31,8	22,5-48,1
TcR1-N12 <sup>+</sup> CD8 $\beta$ <sup>+</sup>	18,3	7,3-38,9
TcR1-N12 <sup>+</sup> WC1 <sup>+</sup>	18,1	2,8-27,2

\* gibt den gemessenen Minimal- bzw. Maximalwert an

Die prominenteste Population war die der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen, die mehr als 30 % der gesamten Population von  $\gamma\delta$  T-Zellen ausmachte. Deutlich weniger Zellen waren CD8 $\beta$ <sup>+</sup>; sie hatten einen etwa gleichen Anteil an der Gesamtpopulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen wie die WC1<sup>+</sup> Zellen. Die Populationen der TcR1-N6<sup>+</sup> und TcR1-N7<sup>+</sup> Zellen wurden nicht bezüglich der Koexpression von dem Antigen TcR1-N12 untersucht. Es zeigte sich aber, dass durchschnittlich 53 % (Variationsbreite = 11,8 %-100,0 %) der TcR1-N6<sup>+</sup> Zellen ebenfalls das Antigen TcR1-N7<sup>+</sup> auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die genaue Zusammensetzung der  $\gamma\delta$  T-Zellen unterlag starken individuellen Schwankungen.

### 3.2.3.2 Aktivierungszustand ilealer IEL-Subpopulationen *ex vivo*

Um den Aktivierungszustand der Zellen zum Zeitpunkt ihrer Gewinnung zu kennen, wurden die Zellen auf die Oberflächenexpression der im aktivierten Zustand häufig exprimierten Antigene MHC II (Ergebnisse in Tabelle 14) und CD71 (Ergebnisse in Tabelle 15) untersucht und die aktivierten Zellen den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen zugeordnet.

Tabelle 14: Übersicht über die Expression von MHC II durch IEL-Subpopulationen *ex vivo*, n = 6-12 Bestimmungen aus 3-6 Präparationen von 3-6 Tieren

Antigenexpression	Mittelwert MHC II <sup>+</sup> Zellen in % aller Zellen einer Subpopulation	Variationsbreite in %*
MHC II <sup>+</sup> CD2 <sup>+</sup>	3,1	0,8-6,3
MHC II <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	3,5	0,7-6,9
MHC II <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	18,0	4,2-44,2
MHC II <sup>+</sup> CD6 <sup>+</sup>	4,6	0,8-9,2
MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	5,9	1,1-10,8
MHC II <sup>+</sup> CD8 $\beta$ <sup>+</sup>	5,8	0,3-16,0
MHC II <sup>+</sup> TcR1-N7 <sup>+</sup>	24,8	6,3-50,0
MHC II <sup>+</sup> WC1 <sup>+</sup>	28,8	10,0-66,7
MHC II <sup>+</sup> WC9 <sup>+</sup>	36,5	4,3-78,6
MHC II <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	87,7	78,6-99,2

\* gibt den ermittelten Minimal- bzw. Maximalwert an

Wie erwartet koexprimierten nahezu alle CD21<sup>+</sup> B-Zellen auch MHC II. Zusätzlich befanden sich unter den MHC II<sup>+</sup> Zellen Vertreter aller IEL T-Zell-Subpopulationen wie CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen. Während ein großer Teil der T-Zellen MHC II auf weniger als 6 % der jeweiligen Subpopulation exprimierte, trugen die CD4<sup>+</sup> Zellen als Vertreter der  $\alpha\beta$  T-Zellen und die TcR1-N7<sup>+</sup> bzw. WC1<sup>+</sup> Zellen als Subpopulationen der  $\gamma\delta$  T-Zellen MHC II zu 18 %-28,8 % auf ihrer Oberfläche. Etwa 1/3 der aktivierten WC9<sup>+</sup> T-Zellen koexprimierten zusätzlich MHC II.

Die Expression des Transferrinrezeptors CD71 konnte, wie schon die von MHC II, sowohl auf B-Zellen als auch auf verschiedenen T-Zell-Populationen nachgewiesen werden. Insgesamt exprimierten jedoch nur 4,9 % der CD3<sup>+</sup> T-Zellen dieses Antigen. Weder aus der Population der CD4<sup>+</sup> noch aus der der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> oder der CD8 $\beta$ <sup>+</sup> Zellen trugen mehr als 7,8 % den Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Im Gegensatz dazu war auf den beiden untersuchten Subpopulationen der  $\gamma\delta$  T-Zellen (TcR1-N7<sup>+</sup> bzw. WC1<sup>+</sup> Zellen) eine Oberflächenexpression bei mindestens 17,3 % der Zellen zu detektieren. Ähnlich wie schon bezüglich der Expression von MHC II festgestellt, konnte auch auf den WC9<sup>+</sup> Zellen eine Expression von CD71 durch

ca. 1/3 der Zellen nachgewiesen werden. Auf B-Zellen konnte ebenfalls eine Expression von CD71 durch ungefähr 1/3 der Zellen belegt werden.

Tabelle 15: Übersicht über die Expression des Transferrinrezeptors CD71 durch IEL-Subpopulationen *ex vivo*, n = 6-10 Bestimmungen aus 3-5 Präparationen von 3-5 Tieren

Antigenexpression	Mittelwert CD71 <sup>+</sup> Zellen in % aller Zellen einer Subpopulation	Variationsbreite in %*
CD71 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	4,9	1,8-10,8
CD71 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	7,8	2,1-13,3
CD71 <sup>+</sup> CD6 <sup>+</sup>	7,4	2,1-13,4
CD71 <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	6,1	1,3-18,2
CD71 <sup>+</sup> CD8 $\beta$ <sup>+</sup>	2,3	0,8-4,2
CD71 <sup>+</sup> TcR1-N7 <sup>+</sup>	17,3	2,6-50,0
CD71 <sup>+</sup> WC1 <sup>+</sup>	19,6	2,9-50,0
CD71 <sup>+</sup> WC9 <sup>+</sup>	35,2	20,3-50,6
CD71 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	32,9	12,5-69,1
CD71 <sup>+</sup> oberfl. IgM <sup>+</sup>	25,9	9,1-50,0

\* gibt den ermittelten Minimal- bzw. Maximalwert an

### 3.2.3.3 Vergleich der Zusammensetzung von IEL aus Ileum, Zäkum und Kolon

Das Ileum ist der immunologisch aktivste Teil des Gastrointestinaltraktes (101). In diesem Darmkompartiment ist die Anzahl IEL je Enterozyt besonders hoch (49), so dass leicht eine ausreichende Zahl IEL gewonnen werden kann. STEC kommen beim Rind jedoch bevorzugt im Dickdarm vor, dringen aber auch bis in das Ileum vor (64). Um herauszufinden, ob die an ilealen IEL gewonnenen Daten auch auf die Lymphozyten aus dem Kolon und Zäkum übertragbar sind, wurden IEL aus allen drei Darmabschnitten isoliert und vergleichend auf die Expression von Oberflächenantigenen untersucht.

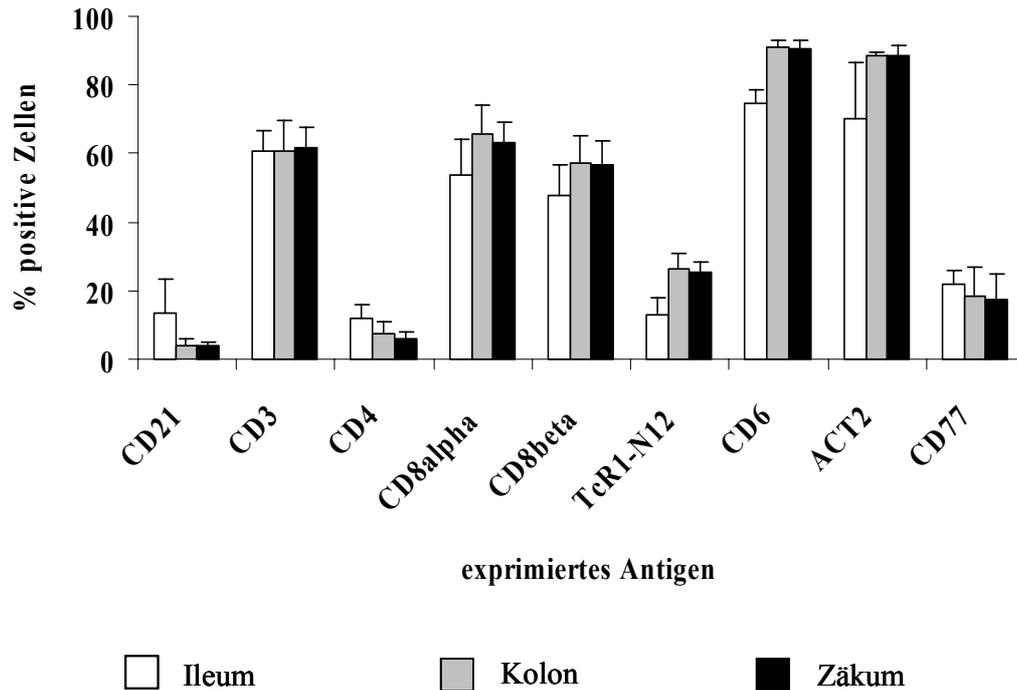


Abb. 9: Vergleichende Darstellung der Oberflächenexpression verschiedener Antigene durch IEL isoliert aus Ileum, Kolon und Zäkum *ex vivo*, n = 6 Bestimmungen aus 3 Präparationen von 3 Tieren, dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichungen

Die Expression von Oberflächenantigenen durch IEL aus verschiedenen Darmabschnitten zeigt nur geringe Variationen. Während die Expression der Antigene in Kolon und Zäkum sich nicht voneinander unterscheiden, sind im Ileum mehr CD21<sup>+</sup> B-Zellen nachzuweisen als in den beiden Dickdarmabschnitten. Während die Anzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nahezu gleich ist, ist der Anteil reifer CD6<sup>+</sup> T-Zellen sowie der CD8<sup>+</sup> und der TcR1-N12<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen im Ileum niedriger als im Dickdarm, der Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen ist dagegen leicht erhöht. Die Expression von ACT2 ist im Ileum verglichen mit den beiden Dickdarmkompartimenten um fast 20 % reduziert. Trotzdem exprimieren über 70 % der Zellen dieses Antigen. Ein etwa gleicher Prozentsatz der IEL aller untersuchten Kompartimente exprimierte den Stx1-Rezeptor CD77.

### 3.2.4 Expression des Stx1-Rezeptors durch bovine IEL *ex vivo*

#### 3.2.4.1 Expression von CD77

Im Anschluss an die Isolierung wurden ileale IEL auf die Expression des Stx1-Rezeptors CD77 untersucht. Insgesamt exprimierten  $14,9\% \pm 6,8\%$  der Zellen im Aquisitionsfenster (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 12$  Bestimmungen aus 6 Präparationen von 6 Tieren) CD77 auf ihrer Oberfläche.

Tabelle 16: Übersicht über die Expression des Stx1-Rezeptors CD77 durch IEL-Subpopulationen *ex vivo*,  $n = 4-12$  Bestimmungen aus 2-6 Präparationen von 2-6 Tieren

Antigen-expression	Mittelwert CD77 <sup>+</sup> Zellen in % aller Zellen einer Sub- population	Variations- breite in %*	Mittelwert der mittleren Fluoreszenz- Intensität	Variationsbreite der mittleren Fluoreszenz- intensität*
CD77 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	22,3	14,0-37,5	2,67	1,08-6,07
CD77 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	20,0	9,8-28,2	1,53	0,61-6,85
CD77 <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	38,7	23,7-52,7	3,28	2,33-4,24
CD77 <sup>+</sup> CD8 $\beta$ <sup>+</sup>	18,2	10,6-31,3	2,84	1,53-5,04
CD77 <sup>+</sup> TcR1-N7 <sup>+</sup>	47,8	25,9-91,7	5,30	0,81-10,00
CD77 <sup>+</sup> WC1 <sup>+</sup>	43,9	15,4-70,0	4,58	0,60-11,90
CD77 <sup>+</sup> WC9 <sup>+</sup>	21,0	11,5-36,7	2,17	0,72-6,45
CD77 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	30,2	0,0-50,0	1,00	0,70-1,36
CD77 <sup>+</sup> oberfl.	16,9	12,5-27,8	0,89	0,40-1,27
IgM <sup>+</sup>				
CD77 <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup>	28,4	20,8-48,1	1,50	0,93-1,96
CD77 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	25,8	0,0-46,7	2,40	0,60-8,87
CD77 <sup>+</sup> ACT2 <sup>+</sup>	29,3	17,2-47,2	3,78	1,64-5,98
CD77 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	23,3	16,5-32,1	2,52	1,97-3,24

\* gibt den ermittelten Minimal- bzw. Maximalwert an

Wie die Tabelle 16 zeigt, wird CD77 prinzipiell von allen IEL-Subpopulationen zu einem gewissen Anteil exprimiert. Durchschnittlich exprimierten ca. 20-30 % aller Zellen der Subpopulationen den Stx1-Rezeptor. Die einzige Ausnahme bilden die  $\gamma\delta$  T-Zellen. Deutlich mehr als 40 % der TcR1-N7<sup>+</sup> und der WC1<sup>+</sup> Subpopulation exprimiert CD77. Auch der Prozentsatz der CD77<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen, die zumindest teilweise auch TcR1-N12 koexprimieren (siehe Kapitel 3.2.3.1, Tabelle 13), war mit ca. 38 % erhöht. Die mittlere Fluoreszenzintensität, die eine Aussage über die Rezeptordichte auf den Einzelzellen ermöglicht, liegt bei maximal 2,5. Allerdings ist die mittlere Fluoreszenzintensität von MHCII<sup>+</sup>, oberflächenständigem IgM<sup>+</sup> und CD21<sup>+</sup> Zellen, also einer Population, die sich fast ausschließlich aus B-Zellen zusammensetzt, mit maximal 1,5 deutlich niedriger als bei anderen Populationen. In einem ähnlichen Bereich bewegt sich die mittlere Fluoreszenzintensität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz zu diesen CD77 in geringer Dichte exprimierenden Populationen tragen die Subpopulationen der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (nicht aber die CD8 $\beta$ <sup>+</sup> Zellen), TcR1-N7<sup>+</sup>, WC1<sup>+</sup> und ACT2<sup>+</sup> Zellen den Stx1-Rezeptor mit einer höheren Dichte auf ihrer Oberfläche als die meisten untersuchten Zellpopulationen.

#### **3.2.4.2 Bindung der rekombinanten B-Untereinheit von Stx1 (rStxB1)**

Nachdem die Expression von CD77 nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob die Zellen auch in der Lage waren, rStxB1 an ihrer Oberfläche zu binden.

Insgesamt konnten 7,9 % der Zellen mit einer Variationsbreite von 5,7 %-11,5 % rStxB1 binden (n = 10 Bestimmungen aus 5 Präparationen von 5 Tieren). Die Abbildung 10 veranschaulicht die Bindung von rStxB1 an verschiedene IEL-Subpopulationen.

Durchschnittlich 2,1 % der untersuchten Zellen waren CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen und banden gleichzeitig rStxB1 an ihrer Oberfläche (Variationsbreite 1,0 %-2,9 %). 1,8 % der Zellen zeichneten sich durch eine Oberflächenbindung von rStxB1 bei gleichzeitiger Expression von TcR1-N12<sup>+</sup> aus (Variationsbreite 0,9 %-2,9 %). Da diese beiden Populationen jedoch nicht die gesamte Menge rStxB1<sup>+</sup> Zellen abdecken, ist anzunehmen, dass auch andere IEL-Subpopulationen in der Lage sind rStxB1 zu binden. Auffallend ist, dass die Populationen der Zellen, die CD77 exprimieren und die der Zellen, die rStxB1 binden, sich überschneiden, aber nicht identisch sind. Neben den durchschnittlich 4,6 % (Variationsbreite 2,1 %-7,7 %) der Zellen, die CD77<sup>+</sup> und gleichzeitig rStxB1<sup>+</sup> sind, gibt es sowohl Zellen, auf deren Oberfläche ausschließlich die Expression von CD77 nachgewiesen wurde, als auch Zellen, die in der Lage sind rStxB1 zu binden ohne dass eine Expression von CD77 detektiert werden konnte.

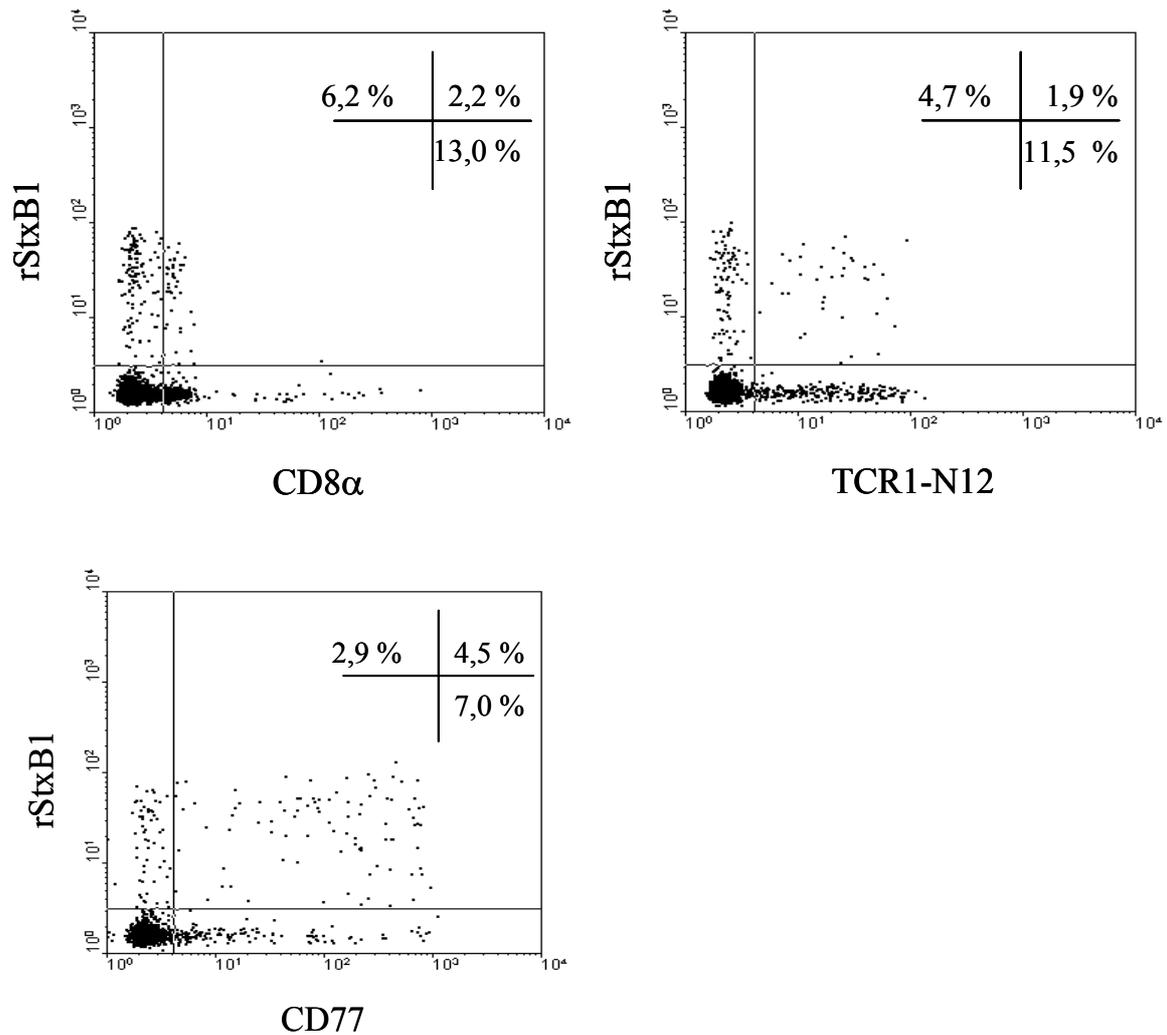


Abb. 10: Bindung von rStxB1 an verschiedene IEL-Subpopulationen *ex vivo*, durchflusszytometrische Analyse, dargestellt am Beispiel eines repräsentativen Tieres, n = 8-10 Bestimmungen aus 4-5 Präparationen von 4-5 Tieren

### 3.2.5 Wirkung von gereinigtem Stx1 auf ausgewählte Funktionen boviner ilealer IEL *in vitro*

#### 3.2.5.1 Wirkung auf Vitalität und Transformation von IEL

Die Proliferation von Lymphozyten als Reaktion auf eine Stimulation ermöglicht die klonale Expansion und eine effektive humorale oder zelluläre Immunantwort (95). Es ist bekannt, dass Stx1 die Proliferation boviner PBMC hemmt (213).

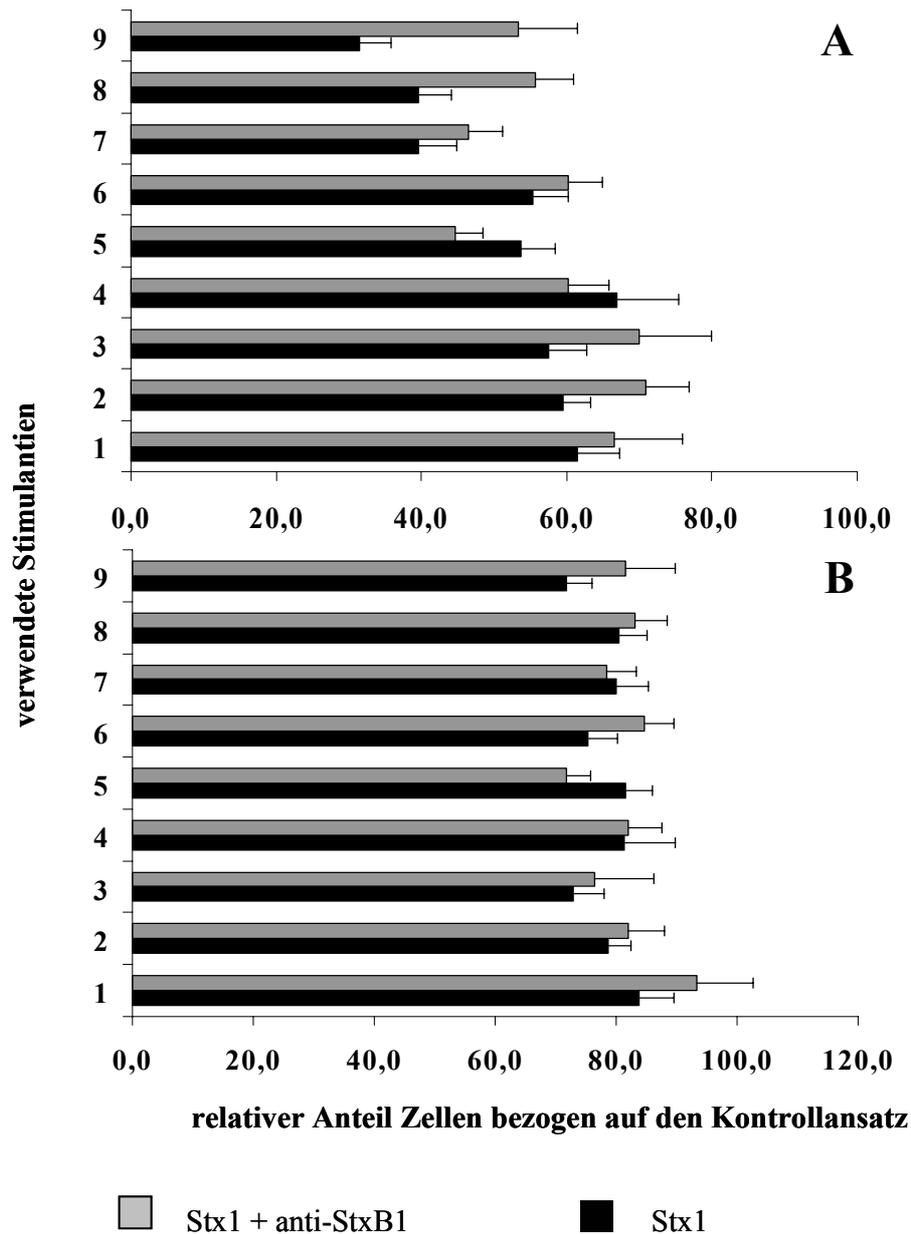


Abb. 11: Prozentsatz von **A** vitalen Blasten und **B** vitalen non-Blasten in IEL-Kulturen nach Inkubation mit Stx1 ( $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD}_{50}/\text{ml}$ ) oder Stx1 und anti-StxB1 ( $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) bezogen auf die jeweiligen Kontrollansätze ohne Toxin, Inkubationszeit = 3 Tage,  $n = 15$  Bestimmungen aus 5 Tieren und 5 Präparationen, dargestellt sind die Mittelwerte + mittleren Standardfehler

Legende zu Abb. 11:

- |   |  |
|---|--|
| 1. ConA 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$               | 6. PHA-P 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PMA 20 ng/ml        |
| 2. PWM 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$                | 7. ConA 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ionomycin 500 ng/ml  |
| 3. PHA-P 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$              | 8. PWM 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ionomycin 500 ng/ml   |
| 4. PMA 5 ng/ml + Ionomycin 500 ng/ml              | 9. PHA-P 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Ionomycin 500 ng/ml |
| 5. PWM 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + PMA 20 ng/ml |  |

Um festzustellen, ob das Toxin eine vergleichbare Wirkung auf die Vitalität und die Transformationsfähigkeit boviner IEL hat, wurden diese nach Kultivierung mit und ohne Stx1 bzw. anti-StxB1 unter Zusatz von 9 verschiedenen Stimulantien durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Die Zellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität den Populationen der vitalen non-Blasten, der vitalen Blasten und der subvitalen Zellen zugeordnet (siehe Abb. 4, Kapitel 3.1.7.1).

Wie die Abb. 11 zeigt, reduzierte sich unabhängig vom Stimulus sowohl der Prozentsatz der vitalen non-Blasten als auch der zu vitalen Blasten transformierten Zellen der Kulturen in Anwesenheit von Stx1. Dieser Effekt ließ sich durch Präinkubation des Toxins mit anti-StxB1 teilweise neutralisieren. Von insgesamt 45 Messungen (9 verschiedene Stimulantien untersucht auf den Zellen von 5 verschiedenen Tieren, Messungen jeweils im Dreifachansatz) war nur in 4 Einzelmessungen keine Reduktion, sondern eine geringfügige Erhöhung der Anzahl Zellen im Aquisitionsfenster der vitalen non-Blasten festzustellen. Im Aquisitionsfenster der Blasten war nur in einem Fall keine Reduktion durch Stx1 nachzuweisen. Aufgrund der hohen Standardabweichung wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

### **3.2.5.2 Wirkung auf Vitalität und Transformation einzelner IEL-Subpopulationen**

Bei der Bestimmung der Transformationsrate ergaben sich hohe individuelle Schwankungen. Deshalb erschien es sinnvoll, den Anteil der verschiedenen Subpopulationen an den insgesamt detektierten Zellen getrennt voneinander zu analysieren. Insgesamt befanden sich nach 3tägiger Kultur deutlich mehr Zellen im Aquisitionsfenster der vitalen non-Blasten als im Aquisitionsfenster der zu Blasten transformierten Zellen (siehe auch Abb. 4, Kapitel 3.1.7.1). Wie in Abb. 12 dargestellt, zeigt die Populationsverteilung innerhalb dieser zwei Aquisitionsfenster ähnliche Tendenzen. In beiden Aquisitionsfenstern befinden sich wenige B-Zellen und CD4<sup>+</sup> Zellen. Dagegen machen die CD8<sup>+</sup> Zellen einen Großteil beider Zellpopulationen aus. Die Anzahl der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> und der CD8 $\beta$ <sup>+</sup> Zellen ist nahezu identisch. Neben den CD8<sup>+</sup> Zellen ist v.a. die Population der  $\gamma\delta$  T-Zellen in den beiden Aquisitionsfenstern nachzuweisen. Sie besteht aus mindestens drei verschiedenen Subpopulationen, die sich gleichermaßen in den Aquisitionsfenstern der vitalen non-Blasten und der zu Blasten transformierten Zellen befinden. Im Gegensatz zu der Situation *ex vivo* tragen nach Kultur deutlich mehr Zellen CD25<sup>+</sup> als CD71<sup>+</sup> auf ihrer Oberfläche. ACT2 bleibt das von den meisten Zellen exprimierte Aktivierungsantigen.

Die Abb. 12 zeigt den prozentualen Anteil der verschiedenen IEL-Subpopulationen an allen untersuchten Zellen in An- und Abwesenheit von Stx1 bzw. Stx1 und anti-StxB1. Der Prozentsatz aller untersuchten Subpopulationen war deutlich reduziert in den Ansätzen mit Stx1. Diese Reduktion war in einigen Fällen signifikant. Außer bei einer Subpopulation, den WC1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen, konnten Signifikanzen nur bei Zellen aus dem Aquisitionsfenster der vitalen Blasten nachgewiesen werden. Anti-StxB1 neutralisierte die Wirkung des Toxins in den meisten Fällen ganz bzw. teilweise. In einigen Fällen blieb die erwartete Neutralisation aus oder die Zugabe von anti-StxB1 führte sogar zu einer verstärkten Reduktion einer Lymphozytensubpopulation.

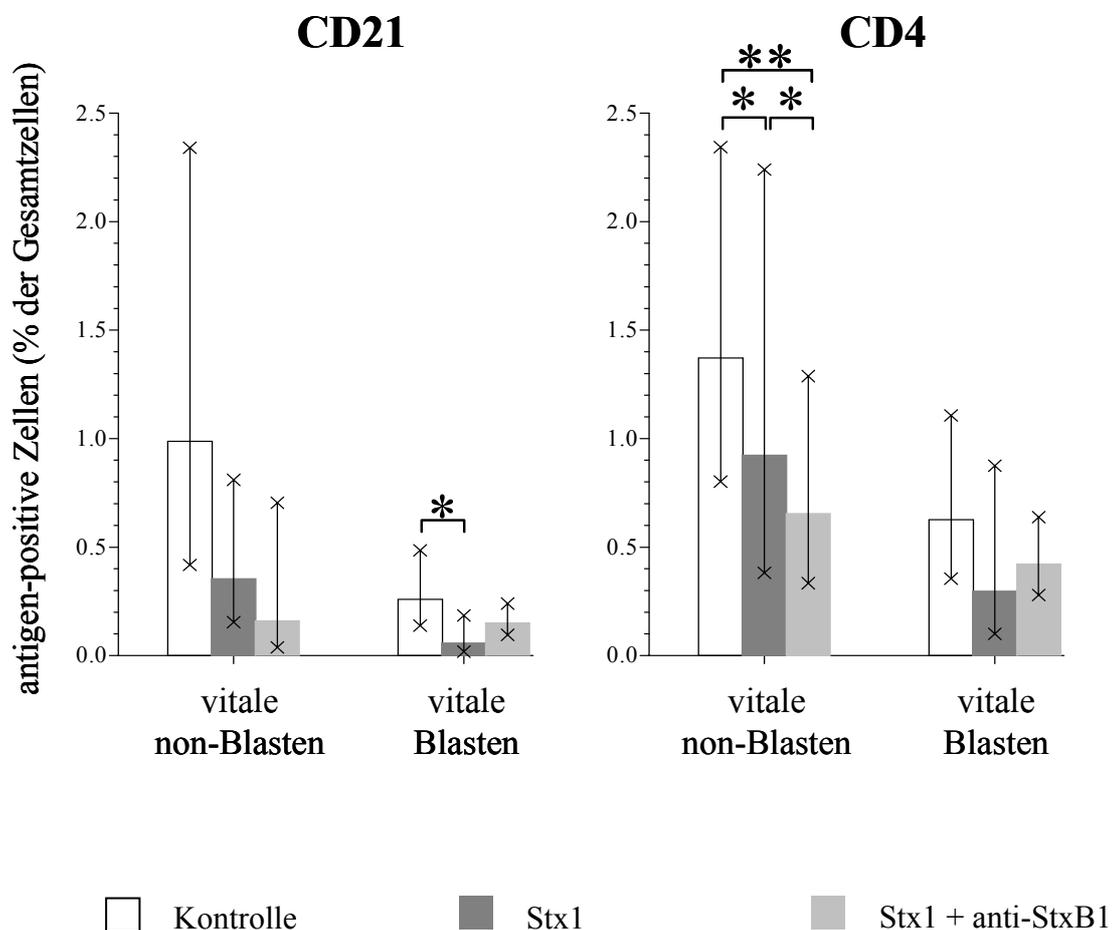
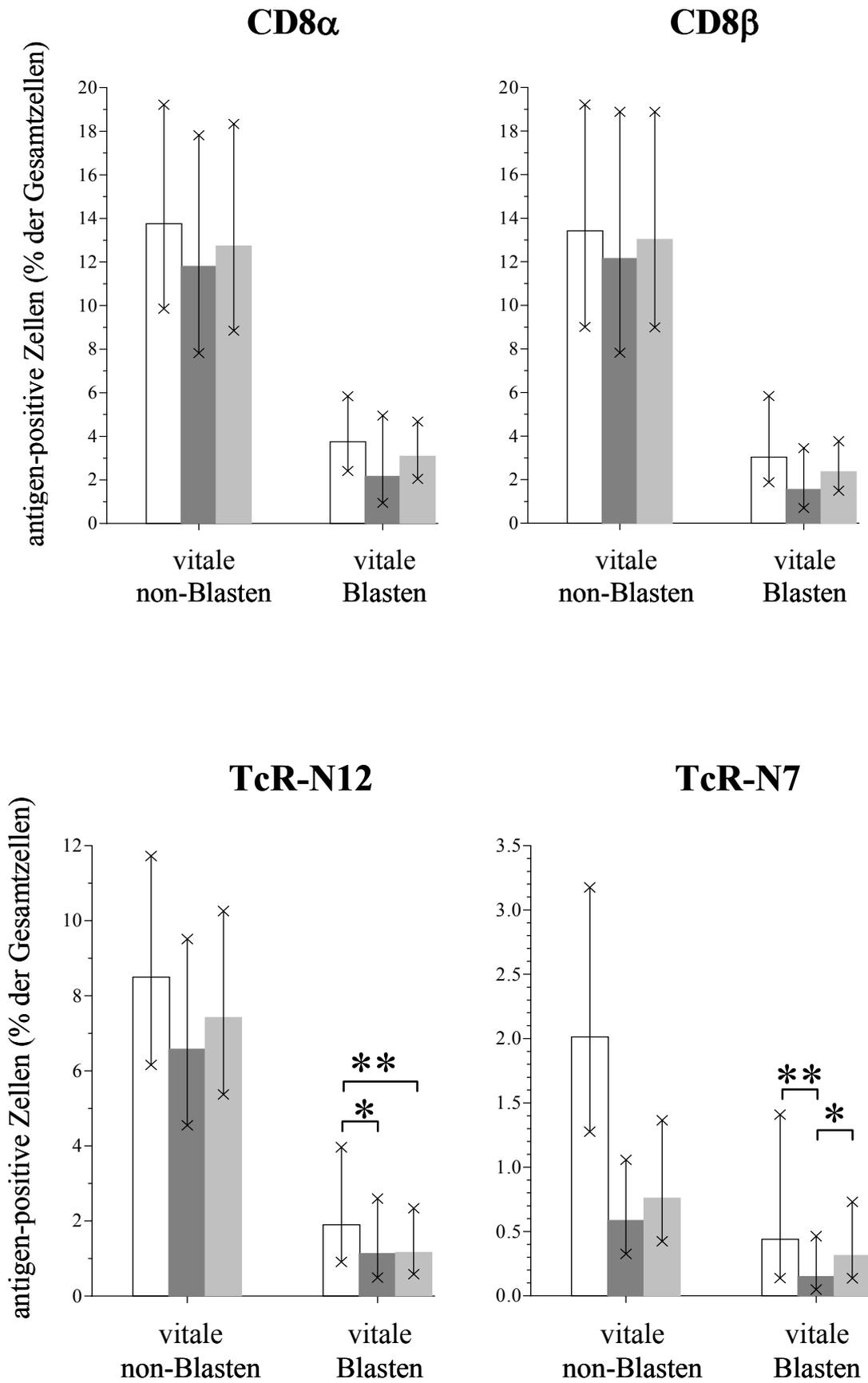
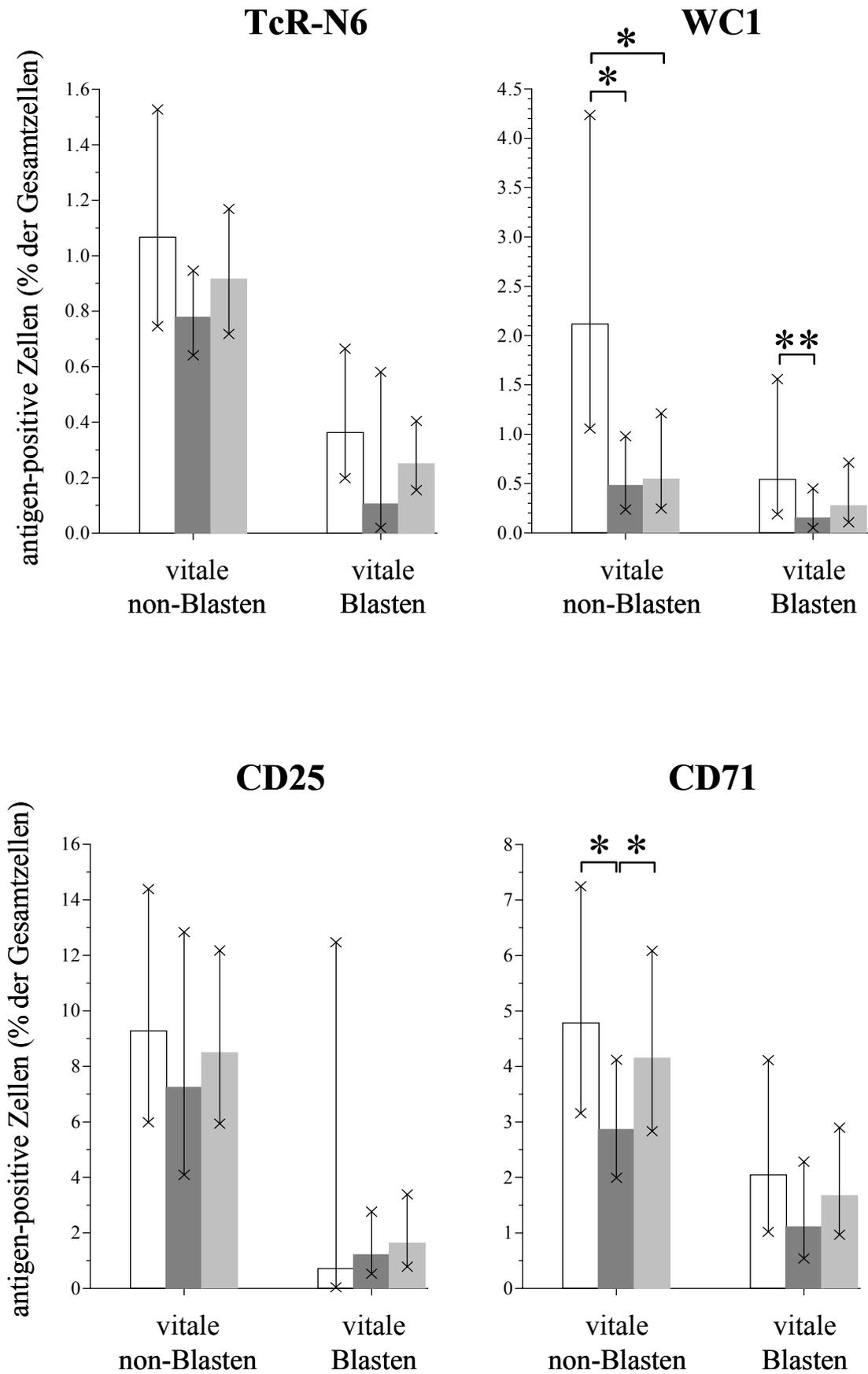


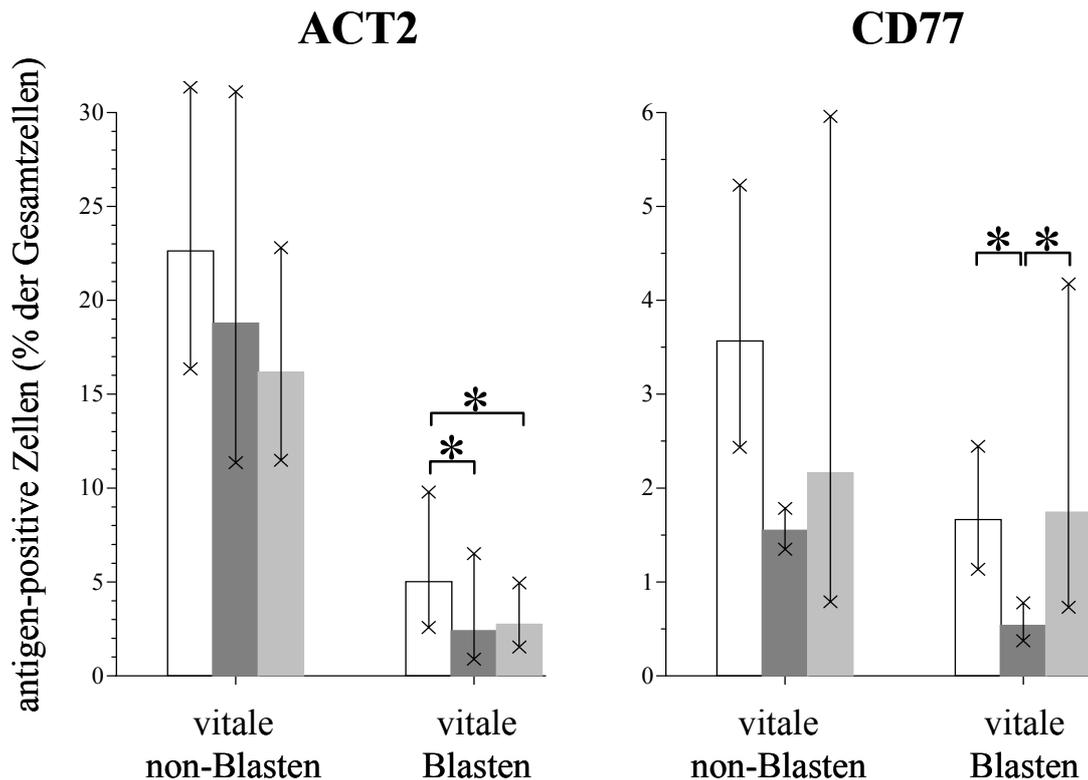
Abb. 12: Vergleich des prozentualen Anteils verschiedener IEL-Subpopulationen an der Gesamtpopulation in den untersuchten Aquisitionsfenstern nach Inkubation mit Stx1 ( $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD}_{50}/\text{ml}$ ) oder Stx1 und anti-StxB1 ( $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit Kontrollansätzen; Inkubationszeit = 3 Tage, Stimulans = PHA-P  $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 6-8$  Bestimmungen aus 4 Tieren und 4 Präparationen, bzgl. CD77  $n = 56$  Bestimmungen aus 4 Tieren und 4 Präparationen; dargestellt sind geometrische Mittelwerte und Streufaktoren



Fortsetzung Abb. 12



Fortsetzung Abb. 12



Fortsetzung Abb. 12

### 3.2.5.3 Wirkung auf CD77<sup>+</sup> Zellen in den einzelnen IEL-Subpopulationen

In Anwesenheit von Stx1 kann eine deutliche Reduktion der CD77-Expression beobachtet werden (siehe Abb. 12). Die folgende Tabelle dokumentiert die CD77-Expression von IEL unterschiedlicher Subpopulationen nach 3tägiger Kultur.

Die Tabelle 17 zeigt, dass alle untersuchten IEL Subpopulationen nach einer dreitägigen Inkubation den Stx1-Rezeptor unterschiedlich stark auf ihrer Oberfläche exprimieren. Während die Subpopulationen der CD4<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup> Zellen sowie vitale WC1<sup>+</sup> und TcR1-N7<sup>+</sup> Blasten den Rezeptor zu 50% oder mehr auf ihrer Oberfläche tragen, liegt der Anteil CD77<sup>+</sup> Zellen der anderen Subpopulationen ca. zwischen 17% und 38%. Die Expression wird in Anwesenheit von Stx1 von nahezu allen Subpopulationen reduziert.

Tabelle 17: Einfluss von Stx1 auf die CD77-Expression der verschiedenen Leukozytensubpopulationen der vitalen Blasten und der vitalen non-Blasten, Inkubationszeit = 3 Tage, n = 8 Bestimmungen aus 4 Präparationen von 4 Tieren, c(Stx1) = 200 CD<sub>50</sub>/ml, c(anti-StxB1) = 1,5 µg/ml, dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung, c(PHA-P) = 2,5 µg/ml

prozentualer Anteil CD77<sup>+</sup> Zellen an den Zellen einer Subpopulation im Aquisitionsfenster nach Inkubation mit:

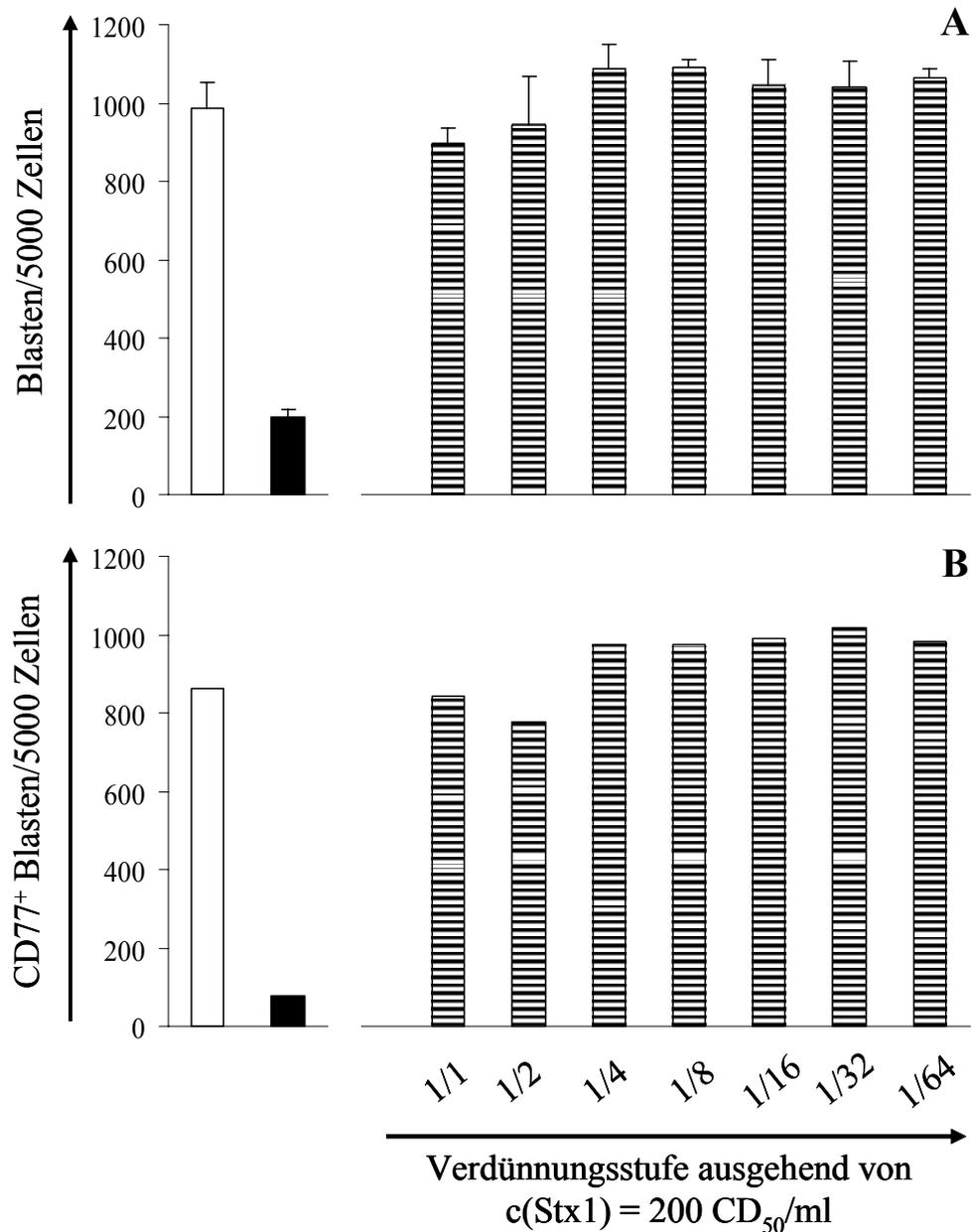
Antigen	Medium	Stx1	Stx1 + anti-StxB1
	MW ± s*	MW ± s*	MW ± s*
<b>CD77<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	73,3 ± 29,7	71,1 ± 27,4	85,7 ± 16,1
vitale non-Blasten	50,7 ± 30,8	42,11 ± 28,5	68,0 ± 27,1
<b>CD77<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	38,8 ± 20,4	34,3 ± 14,2	39,0 ± 16,0
vitale non-Blasten	18,2 ± 13,0	10,1 ± 4,1	18,3 ± 8,5
<b>CD77<sup>+</sup>CD8β<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	38,6 ± 17,9	20,4 ± 9,3	39,4 ± 12,8
vitale non-Blasten	16,9 ± 11,0	10,1 ± 4,2	19,1 ± 9,1
<b>CD77<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	98,2 ± 5,17	87,5 ± 35,4	100,0 ± 0,0
vitale non-Blasten	65,0 ± 22,8	74,5 ± 23,9	87,1 ± 23,8
<b>CD77<sup>+</sup>WC1<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	60,8 ± 26,2	45,0 ± 38,2	52,5 ± 31,6
vitale non-Blasten	31,7 ± 17,6	28,8 ± 21,4	68,5 ± 33,7
<b>CD77<sup>+</sup>TcR1-N7<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	49,6 ± 23,4	24,0 ± 20,7	48,1 ± 26,7
vitale non-Blasten	38,4 ± 20,1	24,8 ± 13,7	53,8 ± 27,2
<b>CD77<sup>+</sup>ACT2<sup>+</sup></b>			
vitale Blasten	33,3 ± 22,1	9,6 ± 6,7	48,1 ± 13,2
vitale non-Blasten	16,9 ± 13,0	4,4 ± 2,3	15,6 ± 8,8

\*MW = Mittelwert, s = Standardabweichung

Während diese Reduktion bei einigen Subpopulationen sehr deutlich ausfällt (vitale Blasten: CD8 $\beta$ <sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, WC1<sup>+</sup>, TcR1-N7<sup>+</sup>, ACT2<sup>+</sup>; vitale non-Blasten: CD4<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD8 $\beta$ <sup>+</sup>, TcR1-N7<sup>+</sup>, ACT2<sup>+</sup>), ist bei anderen Subpopulationen nur eine geringe Verringerung der CD77 Expression festzustellen (vitale Blasten: CD4<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, vitale non-Blasten: WC1<sup>+</sup>). Lediglich bei der Population der CD21<sup>+</sup> B-Zellen, die sich im Aquisitionsfenster der vitalen non-Blasten befinden, ist eine verstärkte Expression des Rezeptors nachzuweisen. Die durch Inkubation der IEL mit Stx1 hervorgerufene veränderte Expression des Stx1-Rezeptors auf den verschiedenen Subpopulationen lässt sich durch Präinkubation von Stx1 mit anti-StxB1 in den meisten Fällen neutralisieren.

#### **3.2.5.4 Untersuchungen zur neutralisierenden Wirkung von anti-StxB1**

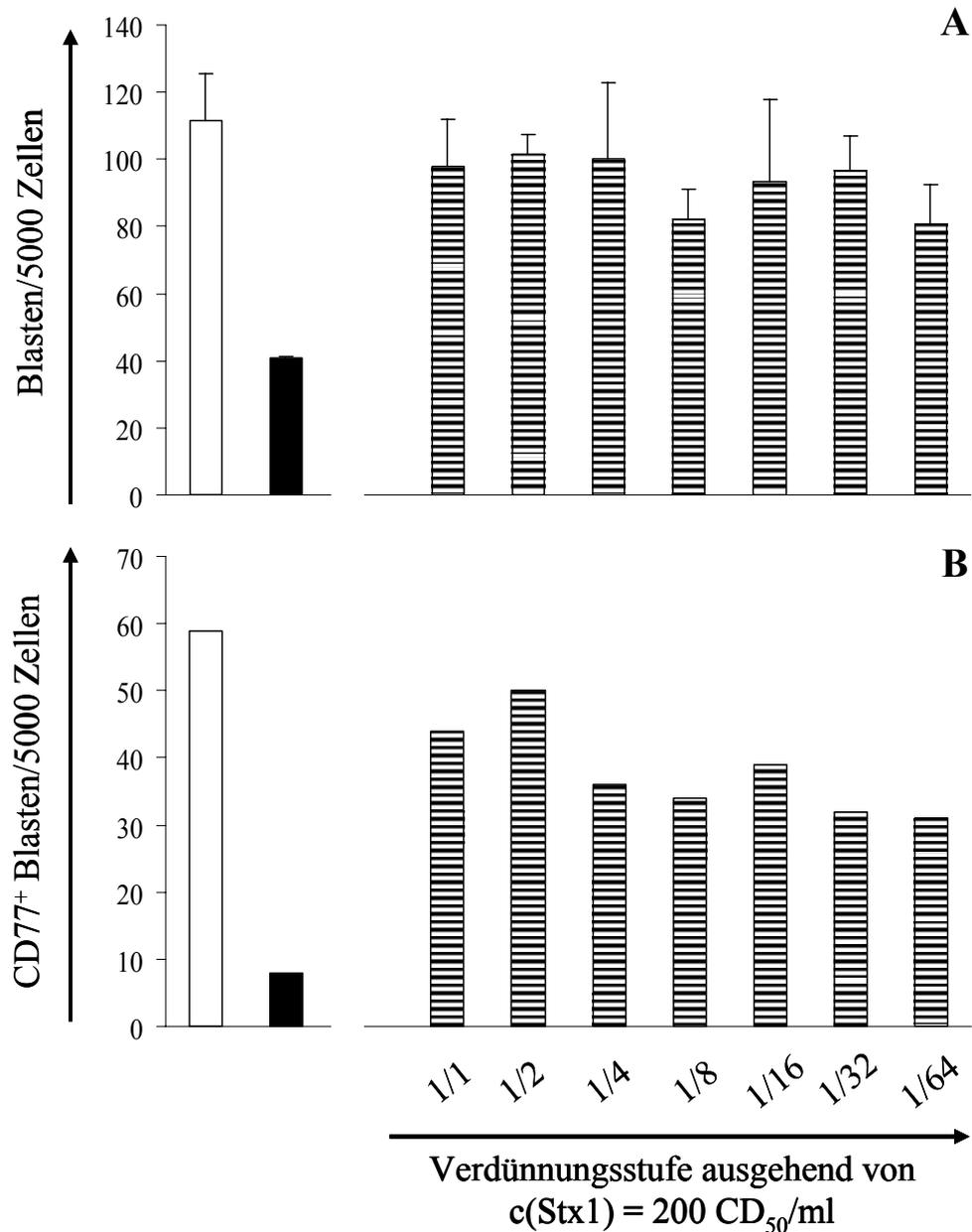
In den oben dargestellten Versuchsreihen hat sich gezeigt, dass 1,5  $\mu\text{g/ml}$  anti-StxB1, die ausreichen den zytotoxischen Effekt von 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 für Verozellen vollständig zu neutralisieren (siehe Abb. 2, Kapitel 3.1.1), die Wirkung von Stx1 auf IEL nur teilweise aufheben. Ähnliches beobachteten bereits Stamm *et al.* (214) bei bovinen PBMC. Die Autoren konnten darüber hinaus zeigen, dass der auch hier verwendete monoklonale Mausantikörper 13C4 die Bindung des Toxins nicht prinzipiell verhindert, sondern bei hohen Antigen-Antikörper-Verhältnissen die Bindung des Toxins sogar verstärken kann. Deshalb wurde in Analogie zu den Versuchen von Stamm *et al.* (214) untersucht, ob und bei welcher Toxinkonzentration eine vollständige Neutralisation der Stx1-Wirkung auf bovine IEL einsetzt. Dazu wurde vor der Zugabe zu Lymphozytenkulturen Stx1 in verschiedenen Konzentrationen von 200 CD<sub>50</sub>/ml bis 3,13 CD<sub>50</sub>/ml mit einer konstanten Menge anti-StxB1 (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Als Messparameter wurde der Anteil zu Blasten transformierter Zellen bzw. der Anteil CD77<sup>+</sup>-Blasten am Ende der Inkubation gewählt. Abbildung 13A und 13B zeigt, dass 1,5  $\mu\text{g/ml}$  anti-StxB1 die Wirkung von Stx1 auf die ausgewählten Parameter bei PBMC vollständig verhindern konnte. Bei IEL stellte sich jedoch heraus, dass die verwendete Konzentration anti-StxB1 zwar die von 200 CD<sub>50</sub>/ml Stx1 verursachte drastische Reduktion des Anteils an Blasten fast vollständig neutralisiert (Abb. 14A), die Wirkung des Toxins auf den Anteil der CD77<sup>+</sup>-Blasten wird jedoch selbst in der niedrigsten eingesetzten Konzentration von Stx1 nur etwa zur Hälfte aufgehoben (Abb. 14B).



Legende zu Abb. 13:

- Positivkontrolle 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-StxB1, kein Stx1
- Negativkontrolle 200  $\text{CD}_{50}/\text{ml}$  Stx1, kein anti-StxB1
- ▨ Stx1 log 2 verdünnt, anti-Stx1 konstant 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Abb. 13: Neutralisierbarkeit verschiedener Stx1-Konzentrationen durch anti-StxB1; Messparameter ist die Transformation von PBMC A) zu Blasten sowie B) die CD77-Expression boviner Blasten, Inkubationszeit PBMC = 4 Tage,  $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $c(\text{Stx1})$  log 2 verdünnt, Ausgangskonzentration = 200  $\text{CD}_{50}/\text{ml}$ , Endkonzentration 3,13  $\text{CD}_{50}/\text{ml}$ ,  $c(\text{PHA-P}) = 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Durchflusszytometrische Analyse der morphologisch als Blasten charakterisierten Zellen; untersucht wurde  $n = 1$  Tier, die Werte sind Ergebnis einer Dreifachbestimmung (A, dargestellt ist der Mittelwert + Standardabweichung) bzw. einer Einfachbestimmung (B)



Legende zu Abb. 14:

- Positivkontrolle 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-StxB1, kein Stx1
- Negativkontrolle 200  $\text{CD}_{50}/\text{ml}$  Stx1, kein anti-StxB1
- ▨ Stx1 log 2 verdünnt, anti-Stx1 konstant 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Abb. 14: Neutralisierbarkeit verschiedener Stx1-Konzentrationen durch anti-StxB1; Messparameter ist die Transformation von IEL A) zu Blasten sowie B) die CD77-Expression boviner Blasten, Inkubationszeit IEL = 3 Tage,  $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $c(\text{Stx1})$  log 2 verdünnt, Ausgangskonzentration = 200  $\text{CD}_{50}/\text{ml}$ , Endkonzentration 3,13  $\text{CD}_{50}/\text{ml}$ ,  $c(\text{PHA-P}) = 2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Durchflusszytometrische Analyse der morphologisch als Blasten charakterisierten Zellen; untersucht wurde  $n = 1$  Tier, die Werte sind Ergebnis einer Dreifachbestimmung (A, dargestellt ist der Mittelwert + Standardabweichung) bzw. einer Einfachbestimmung (B)

### 3.2.5.5 Wirkung von Stx1 auf die „Natürliche Killerzell-Aktivität“ der IEL

„Natürliche Killerzellen“ (NK-Zellen) gehören zur zellulären Sofortabwehr des Körpers und sind wichtiger Bestandteil der gastrointestinalen Abwehr eindringender Erreger. Sie überprüfen die MHC I Expression von Zellen und lysieren solche, die kein, zu wenig oder kein körpereigenes MHC I auf der Oberfläche tragen (10). Die NK-Aktivität boviner Lymphozyten wurde sowohl von PBMC (138) (unter Verwendung des identischen Testsystems) als auch von aus Kälbern isolierten intestinalen Lymphozyten (61) dokumentiert.

Um festzustellen, ob Stx1 nicht nur die Transformation von IEL zu Blasten beeinträchtigt, sondern auch andere Funktionen von IEL beeinflusst, wurde die Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob IEL adulter Rinder *in vitro* eine mit dem gewählten Testsystem nachweisbare Aktivität von NK-Zellen besitzen. Gemessen wurde die Lyse von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Zielzellen in Abhängigkeit von dem Verhältnis Effektorzellen:Zielzellen. Als Negativkontrolle wurde jeweils die spontane Lyse der Zielzellen bestimmt.

Während der Prozentsatz der lysierten Zielzellen in den niedrigen Verhältnissen Effektorzellen:Zielzellen sich nicht von dem Prozentsatz spontan lysierter Zielzellen unterscheidet, zeigt sich etwa ab einem Verhältnis von 33:1 ein gesteigerter Prozentsatz lysierter Zielzellen. Dieser Trend setzt sich bei einem Verhältnis von 100 Effektorzellen:1 Zielzelle fort, so dass bei diesem Verhältnis ein Prozentsatz von 53,9 % lysierter Zielzellen verglichen mit einer spontanen Lyse von 29,9 % gemessen werden konnte (siehe Abb. 15).

Um einen Effekt von Stx1 auf die Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ des Rindes nachweisen zu können, wurden diese Zellen für 24 Stunden mit Stx1 bzw. Stx1 und anti-StxB1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in den Funktionstest eingesetzt und nach weiteren 18 Stunden die durchflusszytometrische Analyse vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

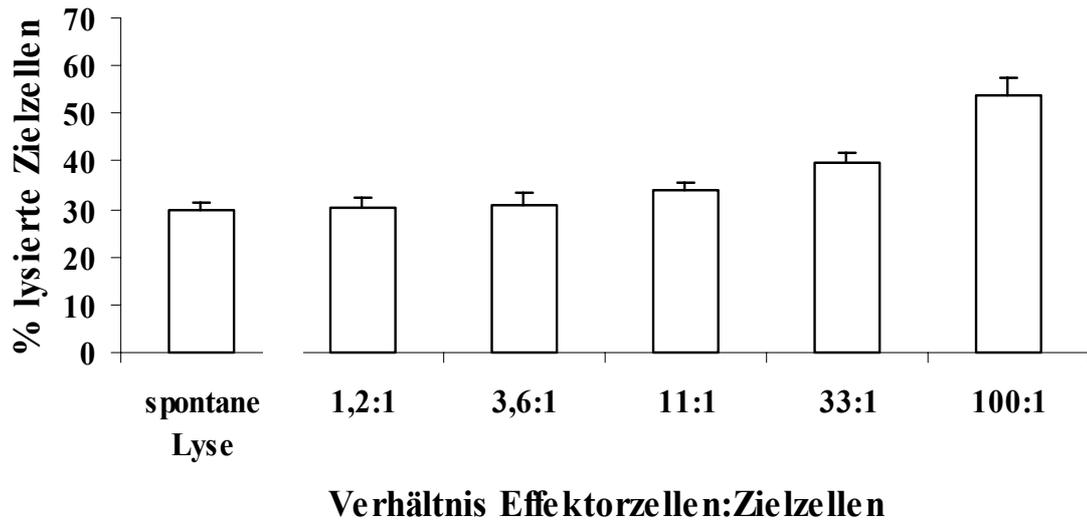


Abb. 15: Abhängigkeit der Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ ilealer IEL adulter Rinder vom Verhältnis Effektorzellen (IEL): Zielzellen (BL3), gemessen am Prozentsatz lysierter Zielzellen; n = 6 Bestimmungen aus 2 Tieren und 2 Präparationen, Inkubationszeit = 18 Stunden

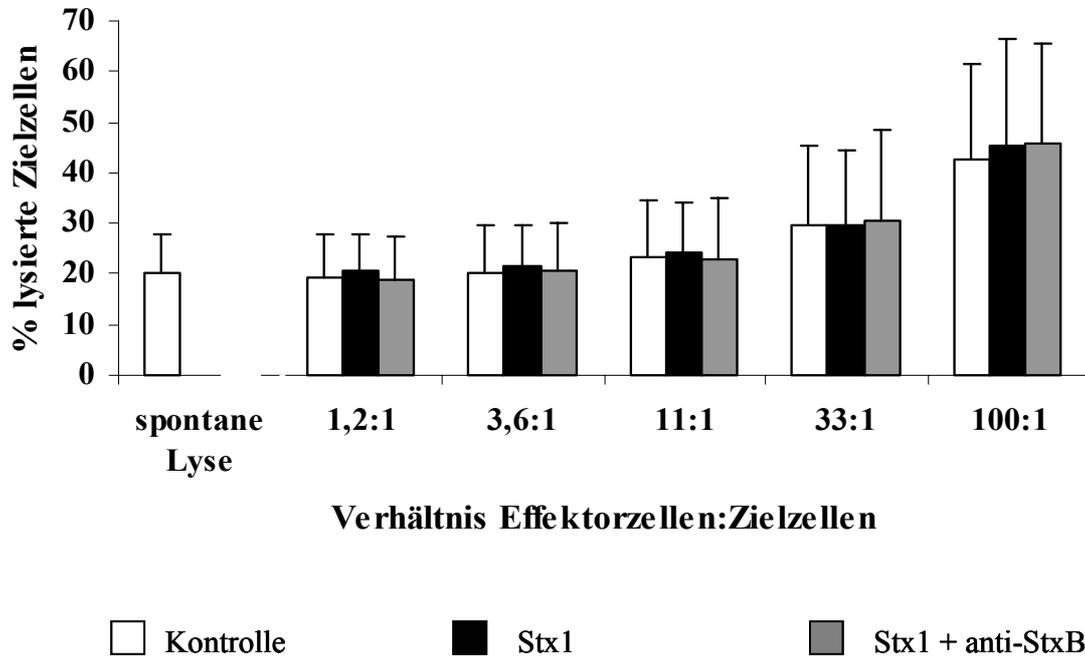


Abb. 16: NK-Aktivität von ilealen IEL bei steigendem Verhältnis Effektorzellen:Zielzellen in An- und Abwesenheit von Stx1 bzw. Stx1 und anti-StxB1; c(Stx1) = 200 CD<sub>50</sub>/ml, c(anti-StxB1) = 1,5 µg/ml, n = 15 Bestimmungen aus 5 Tieren und 5 Präparationen, Inkubationszeit = 24 Stunden Präinkubation in An- und Abwesenheit von Stx1 + 18 Stunden Testdauer = 42 Stunden

Trotz 24stündiger Präinkubation vor Durchführung des Testes war noch immer eine NK-Aktivität der Zellen nachzuweisen. Der Prozentsatz lysierter Zielzellen betrug bei einem Verhältnis von 100 Effektorzellen: 1 Zielzelle 42,7 % verglichen mit einer spontanen Lyse der Zielzellen von 20,2 %. Wurden die Effektorzellen über 24 Stunden mit Stx1 bzw. Stx1 und anti-Stx1 präinkubiert, konnte kein Einfluss des Toxins auf die Aktivität „Natürlicher Killerzellen“ nachgewiesen werden.

### 3.2.5.6 Wirkung von Stx1 auf die Transkription von Zytokinen durch IEL

Die Regulation der Immunantwort basiert entscheidend auf der Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1- (für die zellvermittelte Immunität) und T<sub>H</sub>2-Zellen (für die humorale Immunität) und den von diesen Zellen produzierten Zytokinen (95). Die oben dargestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass bovine CD4<sup>+</sup>-IEL weniger stark als andere Subpopulationen den Stx1-Rezeptor exprimieren. Von Stx1 ist jedoch bekannt, dass es vielfältige Wirkungen auf Zellen haben kann und so z.B. auch ohne messbare Zellschädigungen zu verursachen die Zytokinproduktion modifiziert (179). Dieser Effekt kann als Teil einer „ribotoxic stress response“ bereits wenige Stunden nach Zugabe von Stx1 zu Zellen messbar sein (229). Um den Einfluß von Stx1 auf die Steuerung der intestinalen Immunantwort weitergehend zu analysieren, wurde deshalb auch die Transkription von jeweils zwei T<sub>H</sub>1-spezifischen (IL-2, Interferon  $\gamma$ ) bzw. T<sub>H</sub>2-spezifischen Zytokinen (IL-4, IL-10) nach mehrstündiger Inkubation boviner IEL mit gereinigtem Stx1 untersucht. Zusätzlich wurde die mRNA-Produktion des für Granulozyten chemotaktischen Chemokins IL-8 unter diesen Bedingungen quantifiziert.

In einer ersten Untersuchungsreihe wurden 6 IEL-Präparationen über 4,5 h in An- und Abwesenheit von gereinigtem Stx1 inkubiert. Um einen Eindruck zu erhalten, ob sich ruhende Zellen anders verhalten als aktivierte, wurden sowohl unstimulierte als auch stimulierte (c(PHA-P) = 2,5  $\mu$ g/ml) Zellen untersucht. Abbildung 17 zeigt, dass unstimulierte IEL unter dem Einfluß von Stx1 (200 CD<sub>50</sub>/ml) gleichviel oder nur geringfügig weniger IL-2-spezifische mRNA bildeten als Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden. Stimulierte IEL bildeten in Abwesenheit von Stx1 trotz erheblicher Unterschiede zwischen den Präparationen im Durchschnitt mehr IL-2-mRNA als unstimulierte. Der Zusatz von Stx1 zu stimulierten Zellen führte in 3 von 6 Präparationen zu einer unterschiedlich starken Reduktion der IL-2-mRNA-Synthese, in einem Fall zu einer geringfügigen Erhöhung.

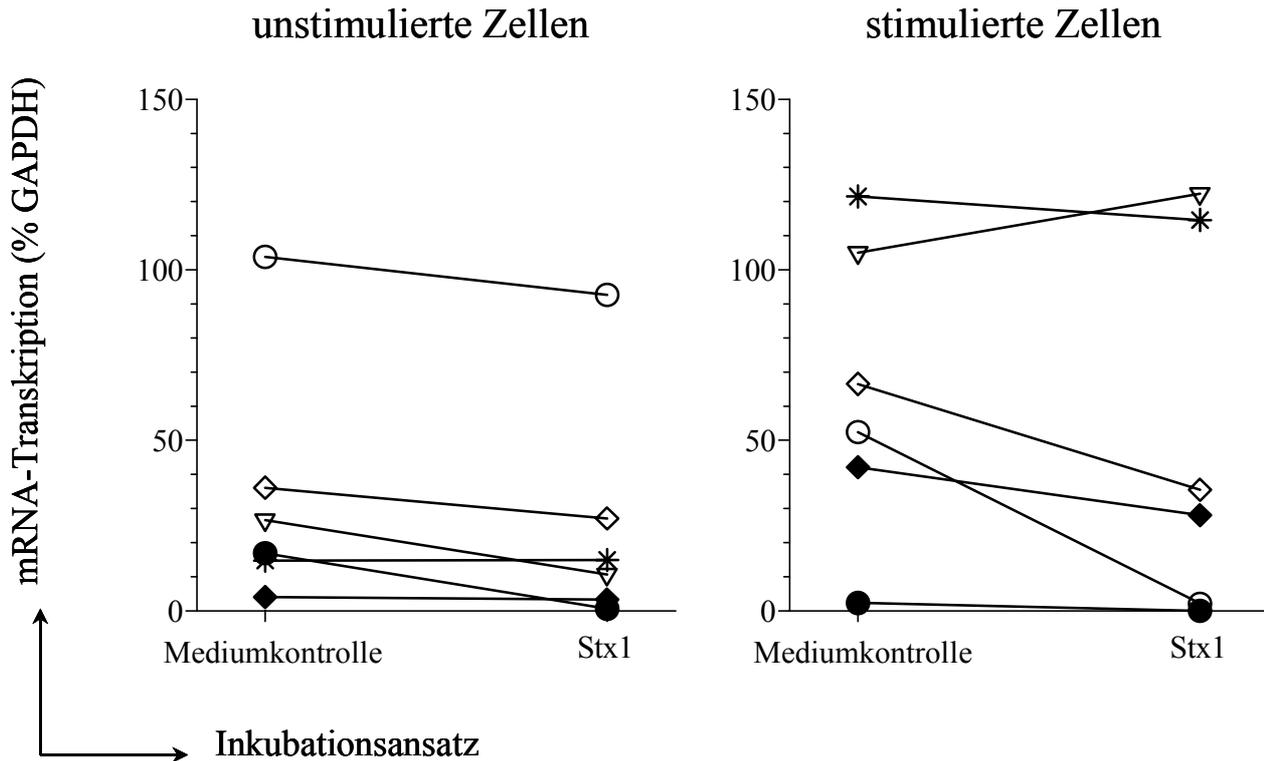


Abb. 17: Einfluss von Stx1 auf die Transkription von Interleukin 2 durch bovine IEL; unterschiedliche Symbole kennzeichnen IEL verschiedener Tiere, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD50/ml}$ , Stimulans =  $2,5 \mu\text{g/ml}$  PHA-P,  $n = 6$  Bestimmungen aus 6 Präparationen von 6 Tieren

Ein überwiegend hemmender Einfluß von Stx1 ließ sich auch auf die Transkription des Interferon  $\gamma$ -Gens feststellen (Abb. 18). Bei den unstimulierten Zellen der meisten Tiere war eine geringfügig bis deutliche Reduktion der Interferon  $\gamma$  mRNA-Synthese nachzuweisen. Bei den Zellen zweier Tiere dagegen konnte kein Einfluß von Stx1 auf die Transkription von Interferon  $\gamma$  festgestellt werden. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen war die Transkription von Interferon  $\gamma$  durch die IEL nach Stimulation in drei Fällen deutlich erhöht. Die Zellen eines Tieres produzierten unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines Stimulans gleichviel Interferon  $\gamma$  mRNA, die Zellen eines weiteren Tieres produzierten geringfügig weniger, die eines dritten erheblich weniger Interferon  $\gamma$  mRNA als die Zellen des vergleichbaren Ansatzes ohne Stimulans. Durch Zusatz von Stx1 zu den stimulierten Zellen reduzierten die IEL von 2 der 6 Tiere deutlich bis erheblich die Transkription von Interferon  $\gamma$ . Die Zellen von zwei weiteren Tieren zeigten eine unveränderte, die von zwei anderen Tieren eine geringfügig gesteigerte Interferon  $\gamma$  mRNA Produktion.

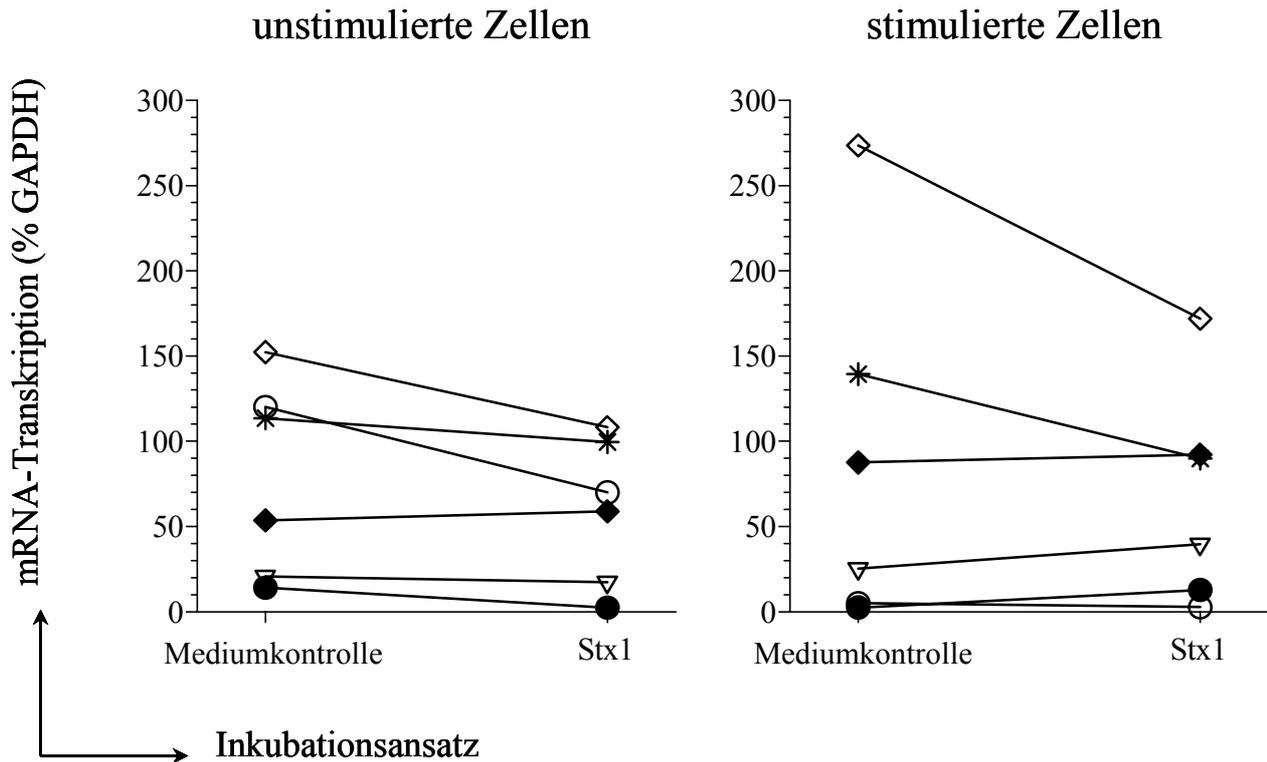


Abb. 18: Einfluss von Stx1 auf die Transkription von Interferon  $\gamma$  durch bovine IEL; unterschiedliche Symbole kennzeichnen IEL verschiedener Tiere, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD50/ml}$ , Stimulans =  $2,5 \mu\text{g/ml}$  PHA-P,  $n = 6$  Bestimmungen aus 6 Präparationen von 6 Tieren

Vergleicht man die mRNA Synthese von IL-4 in den Ansätzen unstimulierter Zellen mit und ohne Toxin, so lässt sich bei 5 von 6 Tieren eine deutliche bis erhebliche Zunahme der IL-4 mRNA in den Ansätzen mit Stx1 feststellen. Nur bei den Zellen eines Tieres ist keine Veränderung der Transkription von IL-4 durch Stx1 nachzuweisen. Die Stimulation der Zellen mit PHA-P resultiert bei den Zellen der meisten Tiere in einer unveränderten Synthese von IL-4 mRNA. Bei den Zellen zweier Tiere konnte jedoch eine deutliche Steigerung der IL-4 mRNA Produktion nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Stx1 zu diesen Ansätzen war bei den IEL von drei Tieren eine deutliche bis erhebliche Steigerung der IL-4 mRNA Synthese festzustellen. Die Zellen von weiteren drei Tieren zeigten eine durch die Zugabe von Stx1 unveränderte Transkription des IL-4 Gens (siehe Abb. 19).

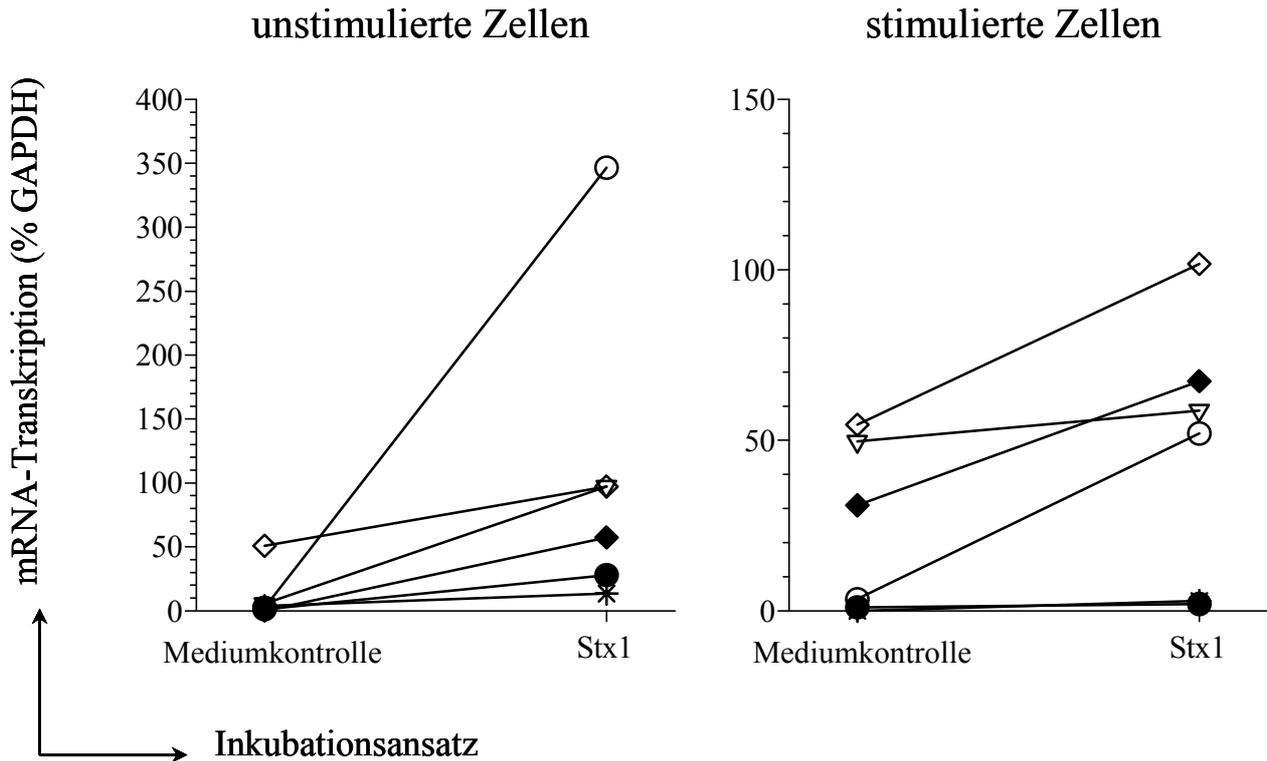


Abb. 19: Einfluss von Stx1 auf die Transkription von Interleukin 4 durch bovine IEL; unterschiedliche Symbole kennzeichnen IEL verschiedener Tiere, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD50/ml}$ , Stimulans =  $2,5 \mu\text{g/ml}$  PHA-P,  $n = 6$  Bestimmungen aus 6 Präparationen von 6 Tieren

Die mRNA-Produktion von IL-10 bei unstimulierten Zellen blieb bei 3 von 6 Tieren auch nach Zusatz von Stx1 zum Medium unverändert (dargestellt in Abb. 20). Die Zellen zweier Tiere verminderten die Transkription des IL-10-Gens deutlich, in den Zellen eines Tieres konnte dagegen deutlich mehr IL-10 mRNA nachgewiesen werden. Auch der Einfluß der Stimulation auf die Transkription des IL-10-Gens zeigte keine eindeutigen Trends. Während bei den Zellen zweier Tiere in Anwesenheit von PHA-P deutlich bzw. erheblich mehr IL-10 mRNA synthetisiert wurde, war bei den Zellen von zwei anderen Tieren kein Einfluß der Stimulation auf die IL-10 Transkription nachweisbar. Bei zwei weiteren Tieren konnte eine geringfügige Reduktion der IL-10 mRNA-Produktion festgestellt werden. Der Zusatz von Stx1 zu den stimulierten Zellen resultierte bei 5 von 6 Tieren in einer unveränderten IL-10 Transkription, nur die Zellen eines Tieres verringerten die IL-10 mRNA-Synthese erheblich.

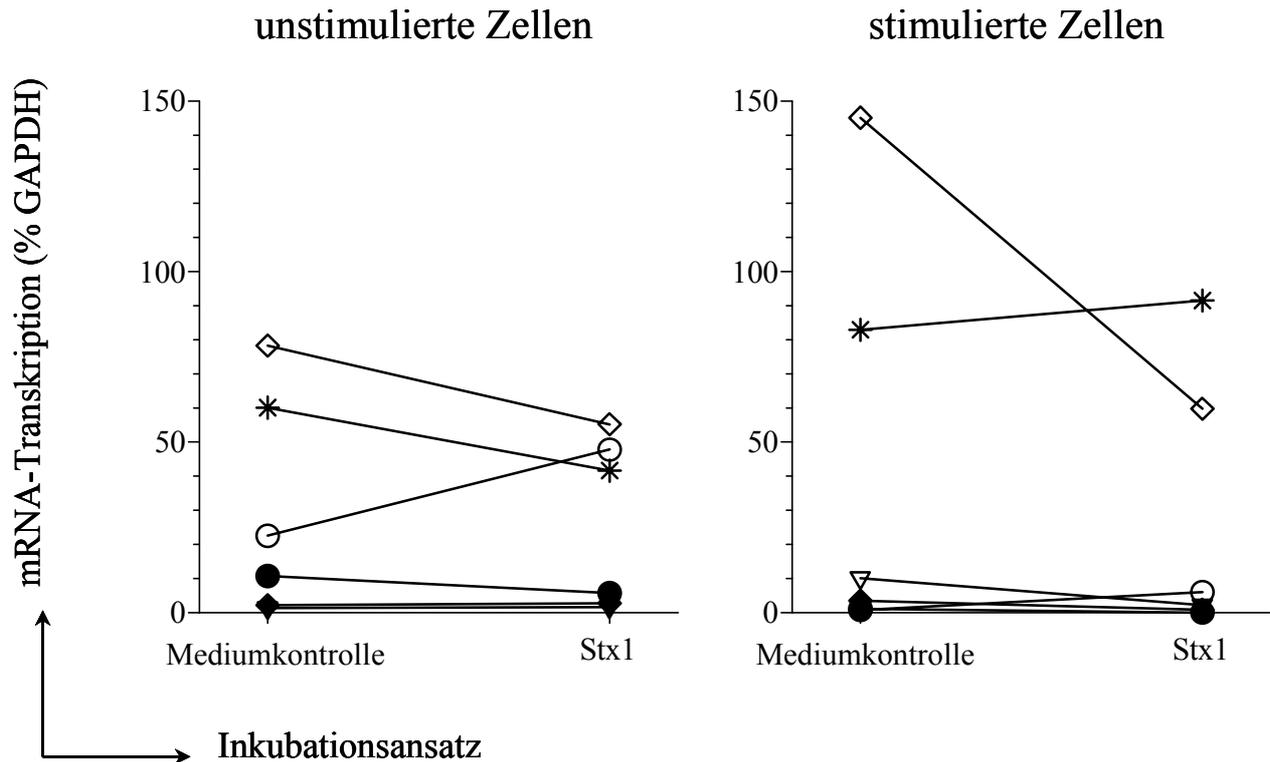


Abb. 20: Einfluss von Stx1 auf die Transkription von Interleukin 10 durch bovine IEL; unterschiedliche Symbole kennzeichnen IEL verschiedener Tiere, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD50/ml}$ , Stimulans =  $2,5 \mu\text{g/ml}$  PHA-P,  $n = 6$  Bestimmungen aus 6 Präparationen von 6 Tieren

Interleukin 8 ist v.a. für seine chemotaktische Wirkung auf Granulozyten bekannt. Wie in Abb. 21 zu sehen, wird es von den meisten unstimulierten IEL produziert, nur bei den Zellen zweier Tiere ist nahezu keine IL-8 mRNA nachzuweisen. Auf Zugabe von Stx1 zum Kulturmedium reagierten die Zellen zweier Tiere mit einer deutlich bis erheblich reduzierten Synthese von IL-8 mRNA. Im Gegensatz dazu war bei den Zellen von zwei weiteren Tieren ein deutlicher Anstieg der IL-8 mRNA Produktion festzustellen. Bei den Zellen eines Tieres konnte keine Veränderung der IL-8 mRNA Synthese nachgewiesen werden. Die stimulierten IEL aller Tiere produzierten IL-8 mRNA in einem gewissen Maß. Die Zugabe von Stx1 zum Kulturmedium stimulierter Zellen resultierte in nahezu allen Fällen in einer geringfügig bis erheblichen Reduktion der IL-8 mRNA-Produktion. Nur bei den Zellen eines Tieres blieb die mRNA-Synthese auch nach Zugabe von Stx1 unverändert.

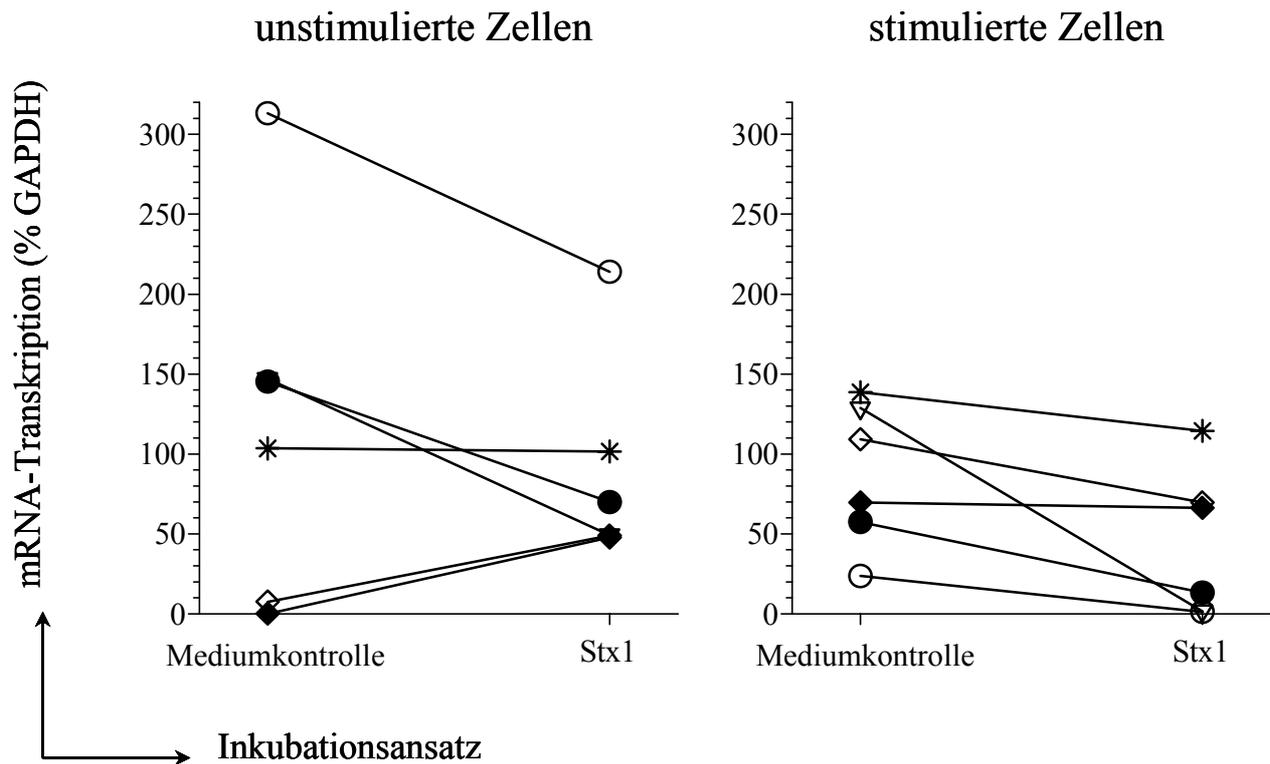


Abb. 21: Einfluss von Stx1 auf die Transkription von Interleukin 8 durch bovine IEL; unterschiedliche Symbole kennzeichnen IEL verschiedener Tiere, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD50/ml}$ , Stimulans =  $2,5 \mu\text{g/ml}$  PHA-P,  $n = 6$  Bestimmungen aus 6 Präparationen von 6 Tieren

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 4 IEL-Präparationen untersucht. Eine Modifikation der Methode der RNA-Extraktion erhöhte die Stabilität der mRNA vor der eigentlichen Quantifizierungsreaktion.

Da in den vorherigen Versuchen die Wirkung von Stx1 bei stimulierten Zellen deutlicher ausfiel als bei unstimulierten IEL, wurden ausschließlich PHA-P stimulierte Zellen analysiert. Für jeden Ansatz (Mediumkontrolle, Stx1 oder Stx1 + anti-StxB1) wurde der Anteil der Emission der einzelnen Zytokin/Chemokin- Bande an der Emission der GAPDH-Bande errechnet und die Ergebnisse dieser Berechnung der Mediumkontrollen anschließend als 100 % definiert. Die in Abb. 22 dargestellten Werte drücken die Ergebnisse der Ansätze mit Stx1 bzw. Stx1 + anti-StxB1 relativ zu den Werten der Mediumkontrollen aus. Sie erlauben die Beurteilung der Neutralisierbarkeit der Wirkung von Stx1 durch anti-StxB1.

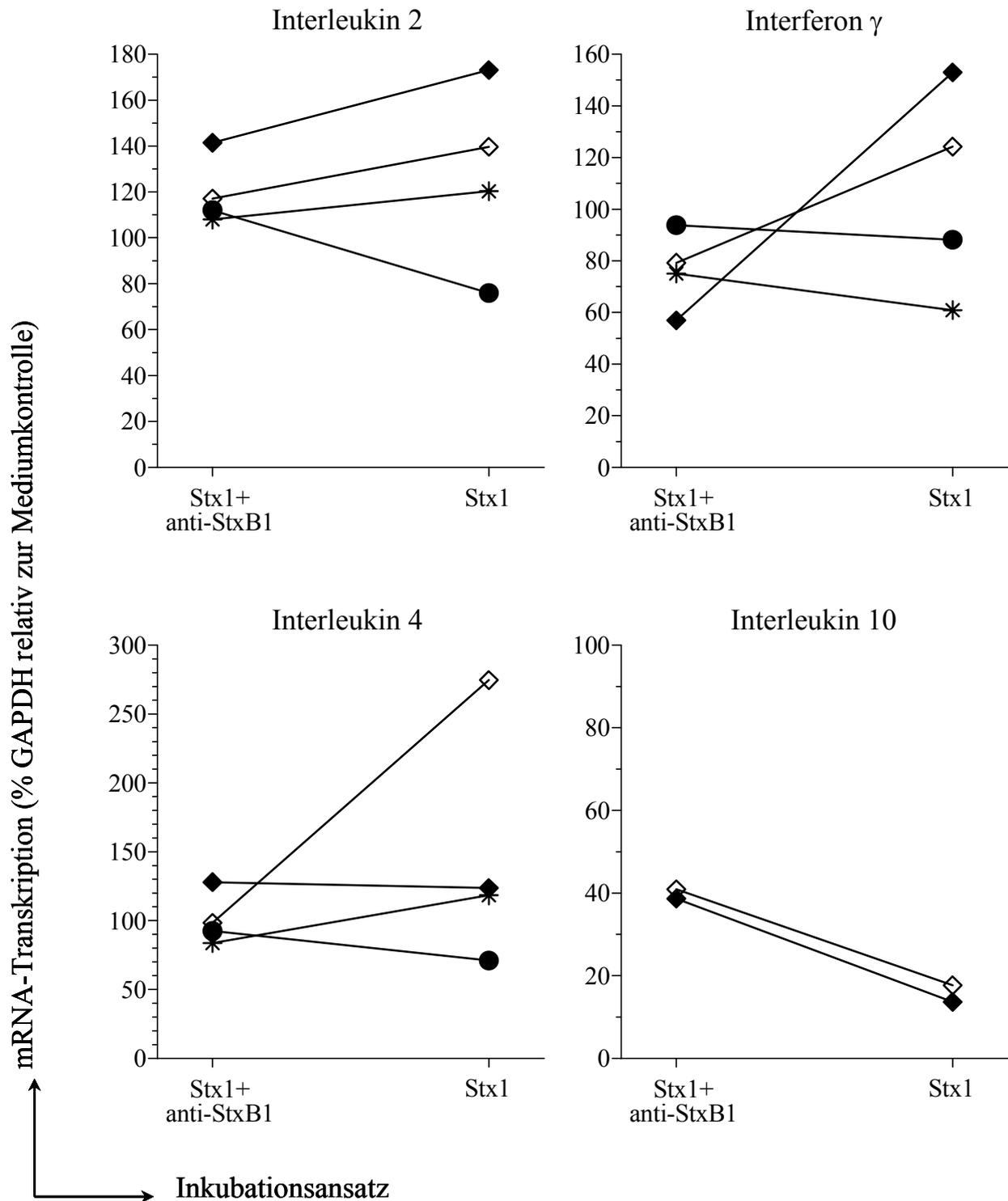
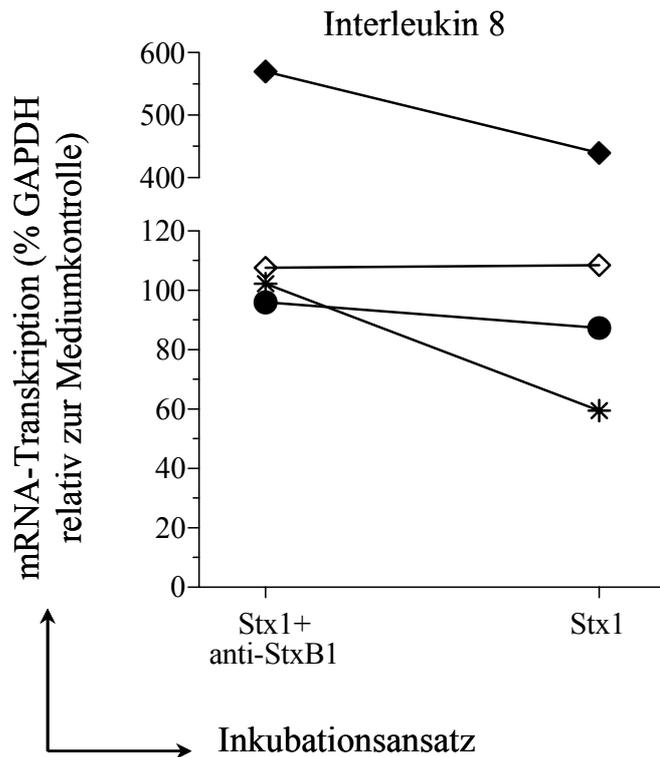


Abb. 22: Einfluss von Stx1 ( $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD}_{50}/\text{ml}$ ) bzw. Stx1 und anti-StxB1 ( $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf die Bildung von zytokin-/chemokinspezifischer mRNA durch IEL, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{PHA-P}) = 2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 4$  Bestimmungen aus 4 Präparationen von 4 Tieren, unterschiedliche Symbole kennzeichnen IEL verschiedener Tiere, Ergebnisse der relativen GAPDH-Expression bezogen auf die Mediumkontrolle



Fortsetzung Abb. 22

Im Vergleich zu den Ansätzen mit Stx1 + anti-StxB1 führte Stx1 in drei der untersuchten Präparationen zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Steigerung des Gehaltes an IL-2 mRNA, während in einer weiteren Präparation eine erhebliche Reduktion beobachtet werden konnte (siehe Abb. 22). Sowohl bei Interferon  $\gamma$  mRNA als auch bei IL-4 mRNA war in zwei Ansätzen mit Stx1 eine deutliche bzw. erhebliche Steigerung, bei zwei weiteren eine geringgradige bis deutliche Reduktion zu beobachten. IL-10 mRNA konnte nur in zwei Präparationen nachgewiesen werden. Hier führte Stx1 zu einer deutlichen Reduktion der IL-10 mRNA Synthese. IL-8 mRNA wurde bei drei Präparationen in Ansätzen mit Stx1 im Vergleich zu Ansätzen mit Stx1 + anti-StxB1 in unterschiedlichem Maße reduziert nachgewiesen. Insbesondere bei der Quantifizierung der mRNA von IL-10 und IL-8 ist allerdings festzustellen, dass die bestimmte mRNA-Menge in Ansätzen mit Stx1 + anti-StxB1 zum Teil erheblich von der Menge in den Kontrollansätzen abweicht (siehe Differenz zu 100 %). Dieser Effekt lässt sich teilweise auf eine nur partielle Neutralisation der Toxinwirkung zurückführen. Bei einigen IEL-Präparationen jedoch scheint die Anwesenheit des Antikörpers die Wirkung des Toxins verstärkt oder in das Gegenteil verkehrt zu haben.

### 3.2.6 Wirkung von gereinigtem Stx1 auf die Transkription von Zytokinen durch PBMC

Ziel dieser Arbeit war es u.a. aufzuklären, ob sich die bisher an bovinen PBMC erhobenen Befunde zur immunmodulatorischen Wirkung von Stx1 auch auf Immunzellen der enteralen Schleimhaut übertragen lassen. Die oben beschriebenen Ergebnisse von ilealen IEL weisen in vielen Punkten große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen von PBMC auf. Weitergehende Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Stx1 auf bovine Lymphozyten können somit auch mit Blutlymphozyten durchgeführt werden. Diese sind leichter zu gewinnen und zu kultivieren. Außerdem hatte sich bei der Etablierung der Methodik der RNA-Extraktion bereits gezeigt, dass die aus PBMC gewonnene RNA über eine deutlich höhere Stabilität verfügt als die aus IEL isolierte. Da die Wirkung von Stx1 auf die Transkription von Zytokinen bei PBMC noch unbekannt war, wurden entsprechende Untersuchungen auch mit PBMC-Präparationen durchgeführt. Bei frisch präparierten PBMC ist im Gegensatz zu IEL jedoch kein Stx1-Rezeptor nachweisbar. Dieser kann erst nach Kultivierung und Stimulation der Zellen auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden. Deshalb wurde die Bildung zytokin-/chemokinspezifischer mRNA nicht nur nach 4,5 Stunden Inkubationszeit mit Stx1 sondern auch nach 24 Stunden Inkubation mit dem Toxin bestimmt.

Auch bei PBMC war festzustellen, dass die mRNA-Menge in den Ansätzen mit Stx1 + anti-StxB1 zum Teil erheblich von der Menge in den Kontrollansätzen abweicht (siehe Differenz zu 100 %). Abb. 23 zeigt, dass trotz des fehlenden Rezeptors auch bei PBMC bereits nach 4,5 Stunden ein Effekt von Stx1 auf die Transkription von Zytokinen nachgewiesen werden kann. Im Hinblick auf IL-2-, Interferon  $\gamma$ - und IL-4-spezifische mRNA reduziert Stx1 die Synthese mehr oder weniger deutlich im Vergleich im Vergleich zu PBMC, die mit Stx1 + anti-StxB1 inkubiert wurden. IL-10-spezifische mRNA war nur bei zwei PBMC-Präparationen nachweisbar, die auf Stx1 gegensätzlich reagierten. Dieser Effekt war auch nach 24 Stunden in gleicher Weise, aber deutlicher ausgeprägt, nachweisbar (Abb. 24). Dagegen enthielten einige PBMC-Präparationen nach 24stündiger Inkubation mit Stx1 mehr IL-2-, Interferon  $\gamma$ - und IL-4-spezifische mRNA als nach Inkubation mit Stx1 + anti-StxB1.

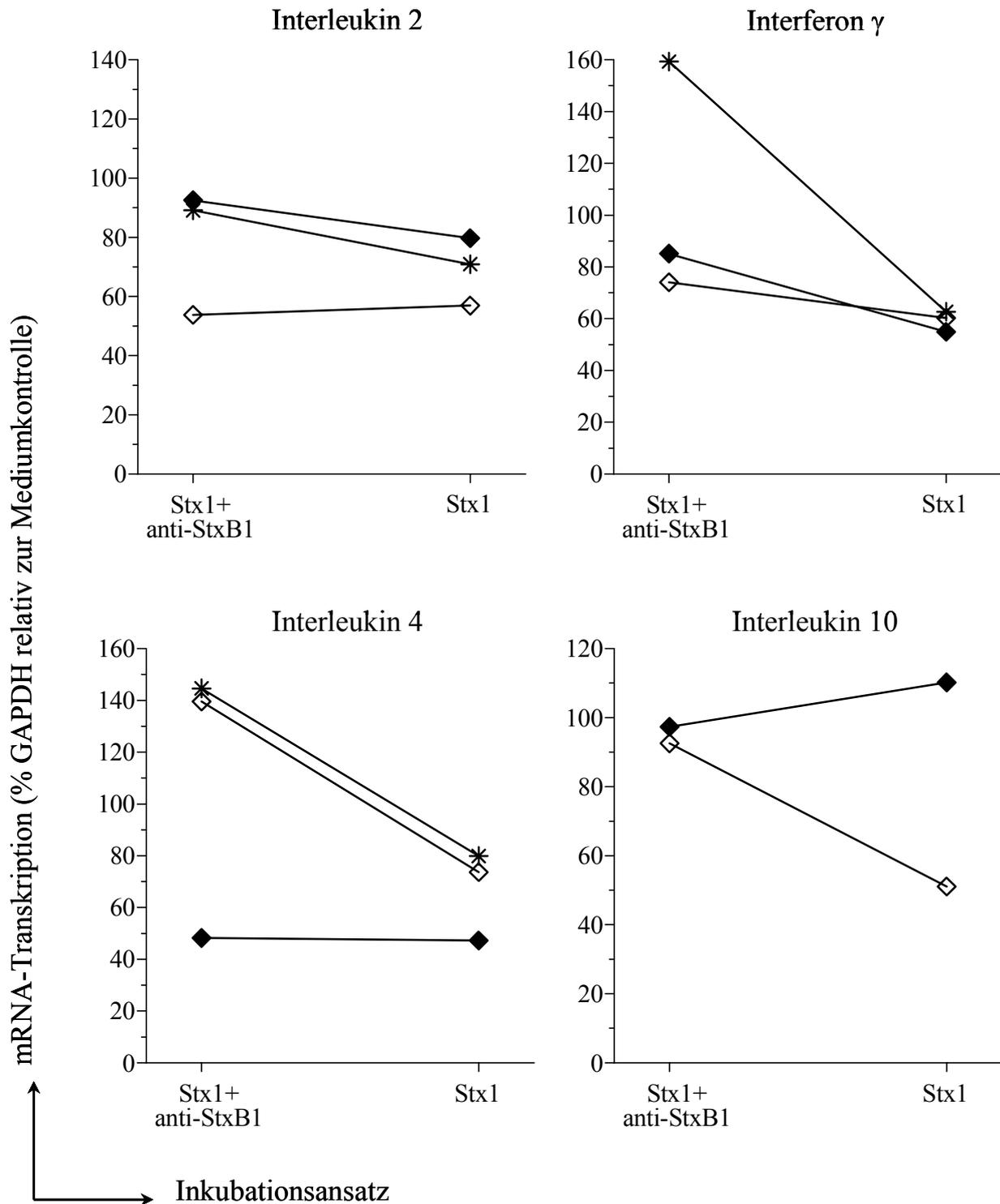


Abb. 23: Einfluss von Stx1 ( $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD}_{50}/\text{ml}$ ) bzw. Stx1 und anti-StxB1 ( $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf die Bildung von zytokinspezifischer mRNA durch PBMC, Inkubationszeit = 4,5 Stunden,  $c(\text{PHA-P}) = 2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 3$  Bestimmungen aus 3 Präparationen von 3 Tieren, unterschiedliche Symbole kennzeichnen PBMC verschiedener Tiere, Ergebnisse der relativen GAPDH-Expression bezogen auf die Mediumkontrolle

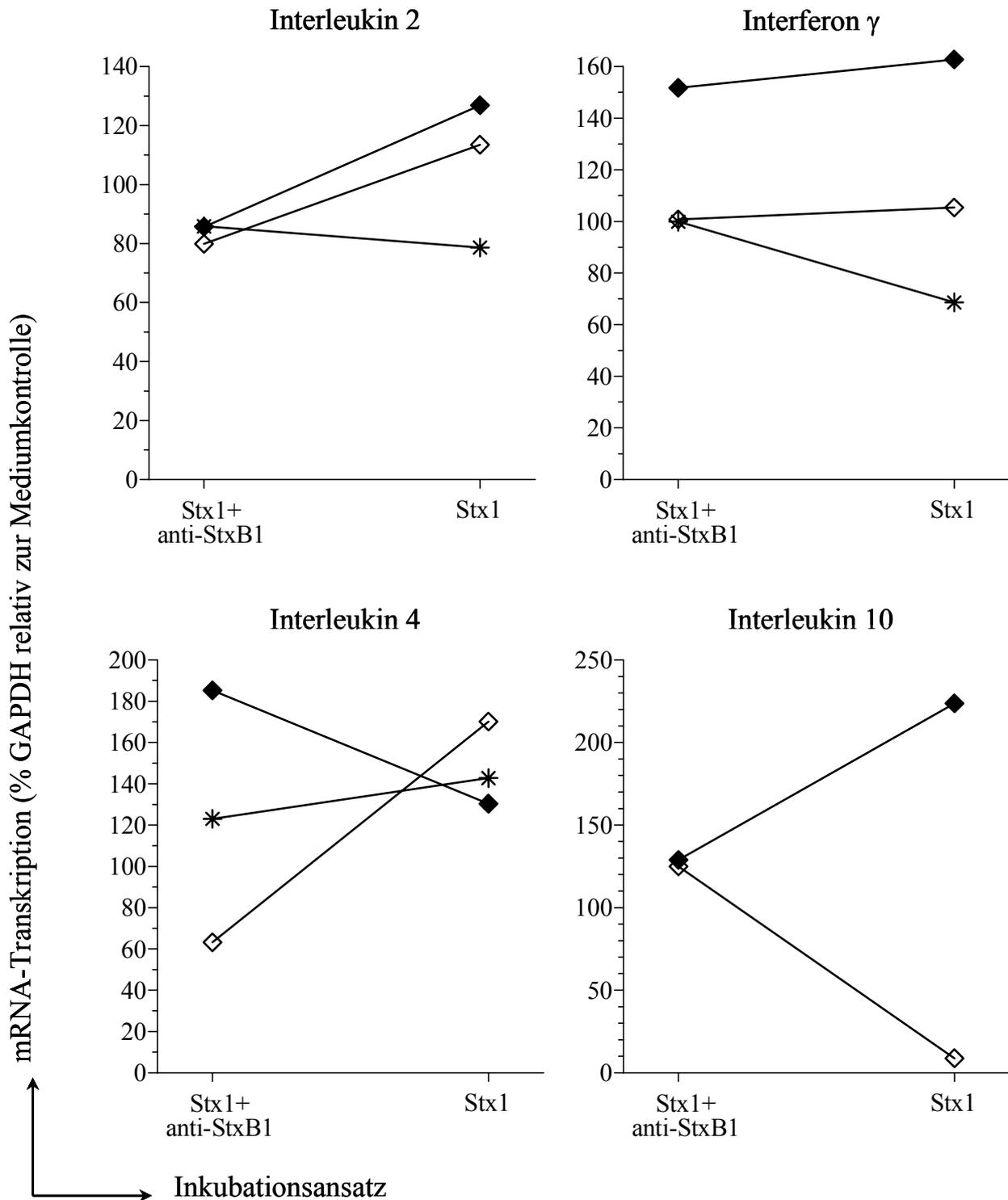


Abb. 24: Einfluss von Stx1 ( $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD}_{50}/\text{ml}$ ) bzw. Stx1 und anti-StxB1 ( $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf die Bildung von zytokinspezifischer mRNA durch PBMC, Inkubationszeit = 24 Stunden,  $c(\text{PHA-P}) = 2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 3$  Bestimmungen aus 3 Präparationen von 3 Tieren, unterschiedliche Symbole kennzeichnen PBMC verschiedener Tiere, Ergebnisse der relativen GAPDH-Expression bezogen auf die Mediumkontrolle

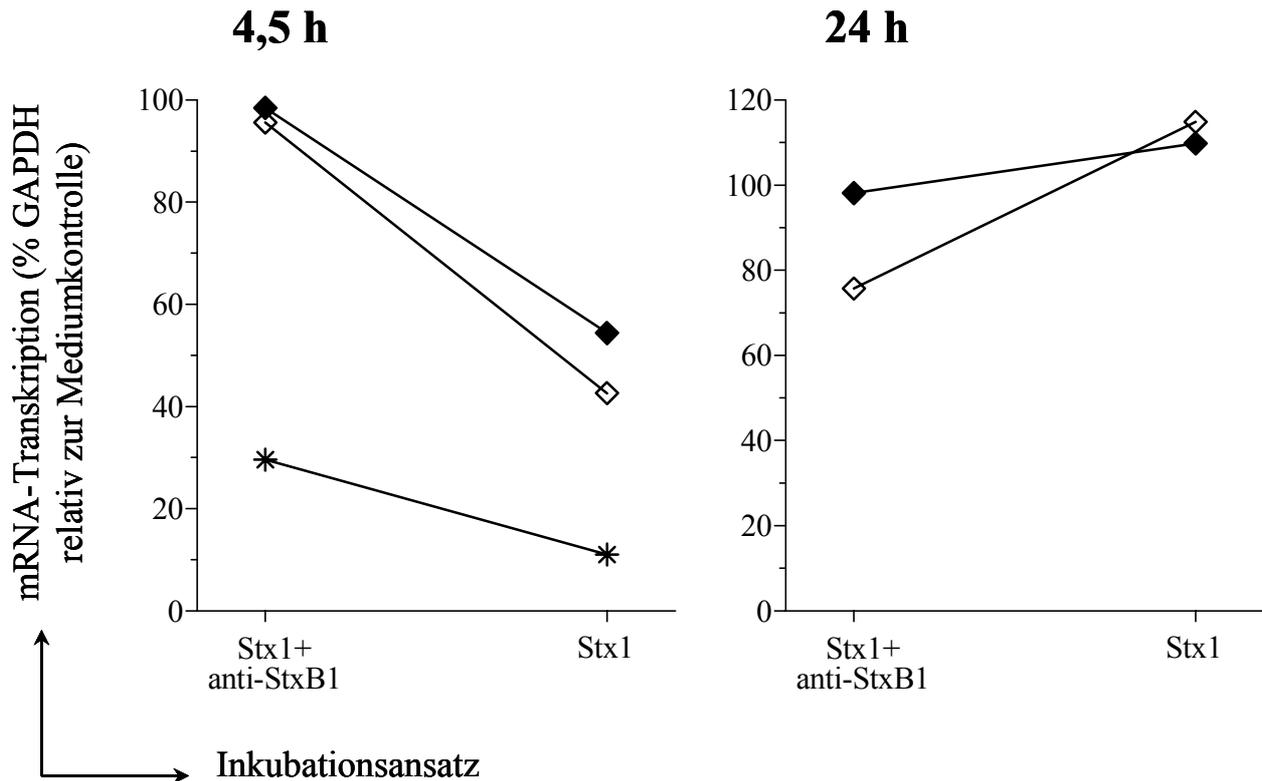


Abb. 25: Einfluss von Stx1 ( $c(\text{Stx1}) = 200 \text{ CD}_{50}/\text{ml}$ ) bzw. Stx1 und anti-StxB1 ( $c(\text{anti-StxB1}) = 1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf die Bildung von spezifischer IL-8 mRNA durch PBMC, Inkubationszeit = 4,5 Stunden bzw. 24 Stunden,  $c(\text{PHA-P}) = 2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 3$  Bestimmungen aus 3 Präparationen von 3 Tieren, unterschiedliche Symbole kennzeichnen PBMC verschiedener Tiere, Ergebnisse der relativen GAPDH-Expression bezogen auf die Mediumkontrolle

Dass bezogen auf die Gesamtheit aller Zellen der PBMC-Präparationen Stx1 die Synthese von Zytokin-mRNA nicht gänzlich blockiert, sondern möglicherweise nur verzögert, deutet sich insbesondere bei IL-8-spezifischer mRNA an (Abb. 25). Während nach 4,5-stündiger Inkubation mit Stx1 in allen drei Präparationen weniger IL-8 mRNA nachweisbar ist als in den Kontrollansätzen, enthalten die Stx1-behandelten Zellen nach 24 Stunden mehr dieser mRNA Spezies. Bei einer Präparation (nicht in der Abb. dargestellt) war weder in der Mediumkontrolle noch im Ansatz mit Stx1 + anti-StxB1 IL-8-spezifische mRNA nachweisbar. Nach Inkubation mit Stx1 konnte aber eine relative Transkription von 13,5 % GAPDH gemessen werden.

## 4. Diskussion

Noch ist keine Therapie der STEC-induzierten Erkrankungen beim Menschen bekannt. Deshalb kommt der Prävention der Infektion eine besondere Bedeutung zu. Voraussetzung einer erfolgreichen Reduktion der Durchseuchung des Reservoirwirtes Rind mit humanpathogenen STEC ist das Verständnis der Ursachen der Persistenz von STEC im Gastrointestinaltrakt der Rinder. Die Tatsache, dass bei adulten Tieren keine offensichtlichen Merkmale einer Entzündung festgestellt werden können, stützt die These, dass STEC wie Kommensalen im Wiederkäuerdarm leben (210). Obwohl histologisch keine Anzeichen einer Entzündung nachgewiesen werden können, ist die Situation aber nicht mit der Abwesenheit entzündlicher Reaktionen gleichzusetzen. Auch unter physiologischen Bedingungen befindet sich der Darm in einem Zustand der Entzündung. Die Entzündung ist durch eine Ansammlung von Leukozyten in den intraepithelialen und subepithelialen Kompartimenten charakterisiert. Allerdings ermöglichen komplizierte Regulationsmechanismen die Unterscheidung zwischen pathogenen, die Mukosa schädigenden Erregern, und Kommensalen (50). *E. coli*-Keime werden bei Säugetieren zur physiologischen Mikroflora gerechnet (134, 208) und gehören zu den ersten Bakterien, die den Darm von Neugeborenen besiedeln. Auch *E. coli*-Stämme des STEC-Pathovars besiedeln Kälber bereits in den ersten Lebenswochen (211). Sie besitzen im Gegensatz zu Kommensalen viele Virulenzfaktoren, die es ihnen ermöglichen, die Funktionen von Epithelzellen zu beeinflussen und charakteristische histopathologische Läsionen, das sogenannte „attaching and effacing“ (A/E), hervorzurufen. Der Grad der Veränderungen läßt es unwahrscheinlich erscheinen, dass keiner dieser Virulenzfaktoren im adulten Wirt eine über die „physiologische Entzündung“ hinausgehende Immunreaktion induziert (208). Trotzdem gelingt es den STEC in adulten Wiederkäuern, die Induktion einer „pathologischen Entzündung“ zu verhindern und ein homöostatisches Milieu zu schaffen, das letztendlich eine Persistenz der Bakterien ermöglicht. Seit bekannt ist, dass experimentell infizierte Schafe STEC-Stämme länger ausscheiden als *stx*<sup>-</sup> EPEC-Stämme (33), werden die Stx zu den bakteriellen Faktoren gezählt, die für die Kontrolle einer Entzündungsreaktion in Frage kommen. Unterstützt wird diese These von der Tatsache, dass bovine Lymphozyten aus dem peripheren Blut (PBMC) im Rahmen ihrer Aktivierung Gb<sub>3</sub>/CD77-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, von denen bestimmte Isoformen als funktionelle Stx1-Rezeptoren identifiziert werden konnten (140, 214). Über die Bindung an den Rezeptor hemmt Stx1 die Proliferation boviner PBMC *in vitro* (139, 141). *In vivo* besiedeln STEC v.a. Zäkum und

Kolon von Rindern, dringen aber auch bis in das Ileum vor (64). Am Fuße der Epithelzellen lokalisierte intraepitheliale Lymphozyten sind somit die einzigen Immunzellen im Körper, die sich in unmittelbarer Nähe zu STEC befinden. Sollten IEL wie PBMC funktionelle Stx1-Rezeptoren exprimieren und eine vergleichbare Sensitivität für eine Wirkung des Toxins besitzen, erscheint die Vermutung, Stx1 trage zur Kontrolle der Entzündungsparameter im Darm bei, begründet. Um dieser Frage nachzugehen wurden in dieser Arbeit IEL aus dem Ileum adulter Rinder *ex vivo* phänotypisch charakterisiert. *In vitro* wurde anschließend der Einfluss von gereinigtem Stx1 Holotoxin auf verschiedene Funktionen von IEL untersucht.

Die isolierten IEL exprimierten den Stx-Rezeptor *ex vivo* und waren sensitiv für eine Wirkung des Toxins nach Inkubation mit Stx1 *in vitro*. IEL aus Ileum, Zäkum und Kolon sind phänotypisch, auch bezüglich der Expression von CD77, sehr ähnlich. Auch wenn der experimentelle Beweis noch aussteht, kann man vermuten, dass die Sensitivität der IEL für Stx1 sich nicht auf ileale Lymphozyten beschränkt. 60 % aller T-Zellen des Körpers befinden sich in der Mukosa des Dünndarms (146). Es erscheint mehr als wahrscheinlich, dass die Wirkung von Stx1 auf eine so große Zahl von Immunzellen auch Veränderungen im Gesamtorganismus hervorruft. Tatsächlich konnten Hoffmann *et al.* im Anschluss an eine STEC-Infektion von Kälbern eine reduzierte Proliferationsfähigkeit der von diesen Tieren isolierten PBMC feststellen (79), obwohl die bovine STEC-Infektion auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt ist und nur in wenigen Fällen Bakterien in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden können (34).

Bovine IEL exprimierten, im Gegensatz zu PBMC des Rindes, bereits *ex vivo* Gb<sub>3</sub>/CD77. Allerdings zeigte sich, dass der Nachweis von CD77 auf IEL mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD77 nur bedingt Rückschlüsse auf die Expression von funktionellem Stx1-Rezeptor durch die Zellen erlaubte. Unlängst wurde nachgewiesen, dass der gegen humanes CD77-Antigen gerichtete Antikörper auch beim Rind eine homologe Struktur erkennt, die zur Familie der Globotriaosylzeramid-Moleküle gehört und Stx-Rezeptoren auf humanen und bovinen Zellen darstellt (140, 214). Entsprechend wurden bei der Untersuchung boviner IEL CD77<sup>+</sup> Zellen gefunden, die rStxB1 banden. Es fanden sich aber auch Zellpopulationen, die entweder CD77 exprimierten oder rStxB1 binden konnten. Ursache hierfür sind vermutlich unterschiedliche Isoformen von Gb<sub>3</sub>, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung auf der Oberfläche exprimiert werden. Auf bovinen PBMC wurden diese verschiedenen Isoformen bereits nachgewiesen (140). Die biochemische Analyse zeigte, dass PBMC zu Beginn ihrer Aktivierung v.a. Gb<sub>3</sub>-Moleküle mit kürzeren Fettsäureketten exprimierten (C16).

Gleichzeitig banden sie rStxB1 mit hoher Affinität. Mit Hilfe des anti-CD77-Antikörpers war zu diesem Zeitpunkt jedoch kaum CD77 nachzuweisen. Im Laufe der Aktivierung *in vitro* synthetisierten die Immunzellen vermehrt Gb<sub>3</sub> mit längeren Fettsäureketten. Gleichzeitig konnte CD77 bei sinkender Affinität von rStxB1 an den Rezeptor vermehrt nachgewiesen werden (214). Man kann deshalb vermuten, dass der CD77 detektierende monoklonale Antikörper und die B-Untereinheit von Stx1 mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen Isoformen des Rezeptors bei bovinen IEL bindet.

Die Expression von CD77 beschränkte sich nicht auf eine bestimmte Subpopulation der IEL, sondern wurde von allen Populationen gezeigt. Bestimmte Teilpopulationen der  $\gamma\delta$  T-Zellen (TcR1-N7<sup>+</sup>, WC1<sup>+</sup>) exprimierten CD77 zu einem höheren Prozentsatz und mit größerer Antigendichte. Verglichen mit anderen intraepithelialen T-Zellen exprimierten die Zellen dieser beiden Teilpopulationen auch die Antigene MHC II und CD71 vermehrt. Sie wiesen somit einen aktivierten Phänotyp auf. Auch bei CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen fiel *ex vivo* ein erhöhter Prozentsatz CD77<sup>+</sup> Zellen mit großer Rezeptordichte auf. Diese Zellen könnten sowohl zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen als auch zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen gehören. 31,8 % aller  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten CD8 $\alpha$ , nur 18,3 % CD8 $\beta$  auf ihrer Oberfläche. Der unterschiedliche Nachweis dieser beiden Teilketten des CD8-Rezeptors deutet auf die Existenz von CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der  $\gamma\delta$  T-Zellen hin. In Anbetracht der Tatsache, dass neben den CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen ausschließlich  $\gamma\delta$  T-Zellen einen verstärkten Anteil CD77<sup>+</sup> Zellen aufwiesen, liegt es nahe zu vermuten, dass besonders der Teil der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen, der zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen gehört und vermutlich das Homodimer CD8 $\alpha\alpha$  exprimiert, CD77 in großer Dichte auf der Zelloberfläche trägt.

Der Nachweis von CD77 auf der Oberfläche boviner IEL belegt, dass die Zellen grundsätzlich zur Synthese von Gb<sub>3</sub>-Molekülen in der Lage sind und möglicherweise in einem bestimmten Stadium ihrer Aktivierung auch Isoformen mit hoher Affinität für Stx1 exprimieren. Der Nachweis, dass bovine intraepitheliale TcR1-N12<sup>+</sup> und CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen *ex vivo* die B-Untereinheit von Stx1 an ihrer Oberfläche binden, lässt vermuten, dass Stx1 verstärkt auf  $\gamma\delta$  T-Zellen und auf CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen (die als T-Zell-Rezeptor sowohl die  $\alpha\beta$  als auch die  $\gamma\delta$  Kette exprimieren können) wirken. Die Funktion dieser Zellen im Gastrointestinaltrakt ist noch nicht abschließend geklärt. Bei der Maus wurde nachgewiesen, dass CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> IEL über CD8 $\alpha$  an das auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimierte und dem MHC verwandte Antigen TL binden und dadurch direkt aktiviert werden. Dies bedeutet, dass diese Zellen CD8 $\alpha$  nicht ausschließlich als Korezeptor nutzen (122) und somit für CD8<sup>+</sup> Zellen „untypische“ Aufgaben übernehmen könnten (55). Teitelbaum *et al.* identifizierten in Ratten intraepitheliale intestinale CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> Zellen, die Suppressor-Funktionen ausübten (228).  $\gamma\delta$  T-

Zellen werden noch weitere Funktionen zugeordnet. Es gibt Hinweise, dass sie an der Beseitigung infizierter oder beschädigter Epithelzellen beteiligt sind (17). Gleichzeitig sollen sie durch die Produktion von Wachstumsfaktoren die Erneuerung der Epithelzellschicht steuern und so die intestinale Homöostase unterstützen (118). Zusätzlich sind  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Lage unabhängig von MHC-Molekülen unprozessierte Antigene auf der Oberfläche von Mikroorganismen zu erkennen (27) und unterstützen die IgA-Produktion an mukosalen Oberflächen (54). Eine Schädigung oder Hemmung dieser Zellen durch Stx1 könnte für die Bakterien deshalb in mehrfacher Hinsicht von Vorteil sein. Einerseits würde die lokale Abwehrreaktion des Wirtes unterdrückt, andererseits würde eine Verzögerung der physiologischen Erneuerung der Epithelbarriere eine längere Besiedelung der Epithelzellen durch STEC ermöglichen.

Im Gegensatz zu der unterschiedlichen zellulären Verteilung der Stx-Rezeptoren auf bovinen IEL *ex vivo*, war nach Inkubation der Zellen über drei Tage *in vitro* in Anwesenheit von Stx1 unabhängig vom Stimulans und davon, ob die entsprechende IEL-Subpopulation *ex vivo* Gb<sub>3</sub>/CD77 mehr oder weniger stark exprimierte, eine reduzierte Transformation zu Blasten festzustellen. Da die Zellen im Aquisitionsfenster der vitalen Blasten als proliferierende Zellen angesehen werden können [Menge, persönliche Mitteilung], erscheint es legitim eine Hemmung nicht nur der Transformation zu Blasten, sondern auch der Proliferation von IEL in Anwesenheit von Stx1 zu postulieren. Gleichzeitig verringerte sich der Anteil vitaler non-Blasten. Da diese Zellen nicht in das Aquisitionsfenster der vitalen Blasten übergehen und auch keine Zellteilung durchführen [Menge, persönliche Mitteilung], ist anzunehmen, dass sie apoptotisch werden. Während nach Inkubation von PBMC mit Stx1 keine vermehrte Apoptose festzustellen war (141), ist eine solche Wirkung des Stx1 im Falle der IEL nicht vollständig auszuschließen.

Wegen der hohen Standardabweichungen bei den Untersuchungen zur induzierten Transformation nach *in vitro* Kultur mit Stx1 wurde keine statistische Auswertung durchgeführt. Die hohen Standardabweichungen beruhen v.a. auf den geringen Transformationsraten in den Kontrollansätzen. Von intraepithelialen Lymphozyten wird speziessübergreifend berichtet, dass sie schwierig zu stimulieren sind (145, 151, 248). Als Erklärung wird häufig angeführt, dass es sich um bereits ausdifferenzierte Zellen handelt. An 5 Tieren wurde die Vitalität und die durch 9 verschiedene Stimulantien induzierten Transformation von IEL in An- und Abwesenheit von Stx1 untersucht. Von diesen 45 Messungen, die jeweils im Dreifachansatz durchgeführt wurden, war nur in 4 Messungen

keine Stx1-induzierte Reduktion des Anteils der non-Blasten und nur bei einer Messung keine reduzierte Transformation festzustellen. Diese „untypischen“ Messungen erfolgten alle bei dem gleichen Tier, so dass bis auf diese Ausnahmen grundsätzlich eine Stx1-induzierte Reduktion der Transformation und des Prozentsatzes der vitalen non-Blasten festgestellt wurde. Die phänotypische Untersuchung der Zellen nach Kultivierung in An- und Abwesenheit von Stx1 über 3 Tage zeigte eine Reduktion der Zellen im Aquisitionsfenster der vitalen Blasten und der vitalen non-Blasten unabhängig von der IEL-Subpopulation. Diese Ergebnisse deuten an, dass Stx1 nicht selektiv bestimmte Funktionen der IEL beeinflusst, sondern generell auf alle Lymphozyten wirkt, wie dies für PBMC bereits gezeigt werden konnte (139).

Während NK-Zellen beim Menschen durch die Expression von Oberflächenmolekülen ( $CD3^+CD56^+$ ) eindeutig charakterisiert sind (10), konnten beim Rind bisher sowohl  $CD3^+CD8\alpha^+$  als auch  $CD3^-CD8\alpha^+$  NK-like Zellen identifiziert werden (81). Trotz der starken CD77-Expression bei  $CD8\alpha^+$  IEL war nach Inkubation mit Stx1 allerdings eine unveränderte Aktivität der „Natürlichen Killerzellen“ festzustellen. Wie bereits oben beschrieben, exprimieren bovine PBMC verschiedene Isoformen des Stx1-Rezeptors. Während im Frühstadium der Aktivierung v.a. Rezeptoren mit hoher Affinität für rStxB1 exprimiert werden, verschiebt sich der Schwerpunkt im Lauf einer fortschreitenden Aktivierung der Zellen in Richtung der Rezeptorisoform mit höherer Affinität für den monoklonalen anti-CD77 Antikörper (214). Man geht allgemein davon aus, dass NK-Zellen sich in einem Zustand permanenter Aktivierung befinden (10). Da sie nicht durch die Anwesenheit eines spezifischen Antigens aktiviert werden müssen, befinden sich die NK-Zellen unter den bovinen IEL vermutlich bereits seit längerem in einem aktivierten Zustand und exprimieren folglich  $Gb_3/CD77$ -Isoformen, die nur mit geringer Affinität rStxB1 binden. Die Funktion bereits aktivierter NK-Zellen zählt deshalb wahrscheinlich nicht zu den Abwehrmechanismen, die von Stx1 im Darm des Rindes supprimiert werden.

Das Zytokinmilieu innerhalb der IEL scheint eher von den  $T_H1$ -spezifischen Zytokinen IL-2 und Interferon  $\gamma$  dominiert zu werden als von den  $T_H2$ -spezifischen Zytokinen. Die mRNA von IL-4, dem klassischen Zytokin der  $T_H2$ -Zellen, war bei unstimulierten IEL nach 4,5 Stunden *in vitro*-Kultur nur bei einem Tier in geringem Maße nachzuweisen. Insgesamt fällt auf, dass innerhalb der untersuchten Tiere bereits in den Kontrollansätzen ohne Stx1 starke individuelle Unterschiede bezüglich der Produktion von mRNA eines bestimmten Zytokins

bestanden. Dank der dem Schlachtvorgang vorausgehenden Lebendbeschau und der anschließenden Untersuchung der Schlachtkörper kann davon ausgegangen werden, dass die Spendertiere zum Zeitpunkt der Schlachtung klinisch gesund waren. Trotzdem könnten unterschiedliche Haltungs- und Fütterungsformen sowie individuelle Eigenschaften der verschiedenen Tiere unterschiedliche Aktivierungszustände der isolierten IEL bedingt haben. Die Zugabe von Stx1 zum Kulturmedium resultierte hinsichtlich der Produktion von zytokin-spezifischer mRNA nicht in einer einheitlichen Reaktion der Zellen auf das Toxin. Bezüglich der Zytokine IL-2, Interferon  $\gamma$  und IL-10 reagierten die Zellen verschiedener Tiere unterschiedlich. Während bei IL-2 und Interferon  $\gamma$  ein eher hemmender Effekt auf die Transkription dieser Gene festzustellen war, wurde die mRNA-Synthese von IL-10 nach Zusatz von Stx1 individuell erhöht oder reduziert. Ein einheitlicheres Bild ergibt sich dagegen bei der Quantifizierung der Produktion von IL-4 mRNA durch IEL nach Inkubation mit Stx1. In Anwesenheit des Toxins produzierten IEL in 8 von 12 verschiedenen Ansätzen ( $n = 12$  Ansätze von 6 Tieren; je Tier 1 Ansatz mit unstimulierten und 1 Ansatz mit stimulierten Zellen) vermehrt IL-4 mRNA. Die Zellen von 4 weiteren Tieren zeigten eine unveränderte Produktion der IL-4 mRNA. Ursache der verstärkten Synthese von IL-4 mRNA durch IEL in Anwesenheit von Stx1 könnte die Aktivierung von  $T_H2$ -Zellen sein. Allerdings gehören Stx zu einer Gruppe von Toxinen, deren wichtigster Mechanismus die Hemmung der Ribosomen der Wirtszellen ist. Diese Toxine bewirken, bevor sie durch Hemmung der Ribosomen den Tod der Wirtszelle verursachen, als „Sofortreaktion“ die als „ribosomale Stress-Antwort“ („ribotoxic stress response“) bezeichnete verstärkte Transkription bestimmter Gene (86). In humanen PBMC induzieren Toxine, die die Aktivität von Ribosomen hemmen, die Synthese von IL-4 (215). Dies geht einher mit einer reduzierten Expression von Interferon  $\gamma$ . Demnach könnte die Induktion von IL-4 durch Stx1 bei bovinen IEL die Induktion von Apoptose ankündigen. Bei der Beurteilung dieser *in vitro*-Befunde muss bedacht werden, dass nur ein Messzeitpunkt untersucht wurde. Andere Messzeitpunkte können zu anderen Ergebnissen führen. So wurde die Synthese zytokinspezifischer mRNA bei bovinen PBMC durch 24stündige Inkubation mit Stx1 anders beeinflusst als nach 4,5 Stunden. Insbesondere die Transkription des IL-8 Gens, die nach 4,5 Stunden Inkubation mit Stx1, wie auch bei IEL, reduziert wurde, war nach 24 Stunden verstärkt nachzuweisen. Man kann vermuten, dass die in den ersten Stunden einer STEC-Infektion hervorgerufenen Veränderungen des Zytokinmilieus eher als eine „Sofortreaktion“ zu betrachten sind, während sich bei chronischer Einwirkung des Toxins ein anderes Milieu einstellt, das den Übergang der Infektion zur persistenten Kolonisierung widerspiegelt.

IL-4 beeinflusst als klassisches  $T_H2$ -Zytokin Immunreaktionen in Richtung einer  $T_H2$ -Antwort (95). Im Darm reguliert IL-4 aber auch verschiedene Funktionen der Epithelzellen. So konnten Colgan *et al.* nach der Präexposition von humanen intestinalen Epithelzellen *in vitro* zwar eine vermehrte  $\beta 2$ -Integrin abhängige Adhäsion von Granulozyten an das Epithel feststellen, die Migration der Granulozyten durch den epithelialen Monolayer ging jedoch zurück (32). Die durch IEL kontrollierte Migration von Granulozyten ist Teil der lokalen Immunreaktion gegen Bakterien, die den Darm besiedeln (222). Eine Induktion von IL-4 durch Stx1 könnte somit dazu beitragen, die Migration von Granulozyten in das Darmlumen zu verhindern und die Kolonisierung des Darmepithels durch STEC zu erleichtern. Darüber hinaus produzieren bovine Kolonepithelzellen *in vitro* nach Inkubation mit Stx1 weniger chemoattraktive Substanzen als unbehandelte Kontrollzellen (46). Nach Inkubation mit Stx1 war bei stimulierten IEL eine verminderte IL-8-spezifische mRNA-Synthese festzustellen. Da IL-8 auf neutrophile Granulozyten chemoattraktiv wirkt (232), könnte die reduzierte Produktion dieses Chemokins *in vivo* synergistisch zu der gesteigerten IL-4 Produktion wirken. Es ist jedoch zu bedenken, dass Kulturüberstände von IEL nach 4,5 Stunden Inkubation mit Stx1 auf bovine Granulozyten in gleichem Maße chemoattraktiv wirken wie Kulturüberstände nach Inkubation ohne Stx1 (46). Dies könnte bedeuten, dass sich die Stx1-induzierten Veränderungen nach 4,5 Stunden Inkubation zwar auf Ebene der mRNA niederschlagen, nicht aber auf Proteinebene, denn die Stx1-abhängige Modulation des Zytokinmilieus wurde mit Hilfe der semiquantitativen rt-PCR nachgewiesen. Mit dieser Methode lassen sich zwar sehr sensitiv und innerhalb weniger Stunden Veränderungen auf der Ebene der Transkription eines Gens und der Produktion der spezifischen mRNA ermitteln, aber es ist bekannt, dass diese nur teilweise auf die Proteinebene übertragen werden können. Es wäre aber auch möglich, dass neben IL-8 noch weitere chemotaktisch wirksame Substanzen in die IEL-Kulturüberstände abgegeben werden, auf deren Synthese Stx1 nicht oder andersartig einwirkt und wodurch der Effekt der reduzierten IL-8 Synthese wieder aufgehoben wird.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die verwendete Menge anti-StxB1 nicht immer in der Lage war, die durch Stx1 ausgelösten Effekte vollständig zu neutralisieren. Die Konzentrationen von Stx1 (200  $CD_{50}$ /ml) und anti-StxB1 (1,5  $\mu$ g/ml) wurden aus zuvor durchgeführten Experimenten mit Stx1 an Verozellen und bovinen PBMC übernommen. Sowohl bei Verozellen als auch bei PBMC neutralisierte anti-StxB1 in den genannten Konzentrationen vollständig die Wirkung von Stx1. Die nur teilweise zu erzielende Neutralisation des Stx1-Effektes bei IEL scheint demnach nicht auf einem relativen Mangel

an anti-StxB1 zu beruhen. Wäre dies der Fall, müsste eine Verringerung der Toxinmenge bei gleichbleibender Menge anti-StxB1 eine vollständige Neutralisation hervorrufen (vergl. Abb. 14). Dies ist jedoch nicht der Fall. Untersucht man verschiedene Parameter, fällt auf, dass bei PBMC, nicht aber bei IEL, eine vollständige Neutralisation des transformationshemmenden Effektes von Stx1 nachweisbar ist. Auch die durch Stx1 reduzierte Expression von CD77 wurde bei PBMC vollständig, bei IEL nur teilweise neutralisiert. Bezüglich der in Anwesenheit von Stx1 veränderten Transkription von Zytokinen ließ sich der Effekt dagegen nicht nur bei IEL, sondern auch bei PBMC lediglich teilweise neutralisieren.

Das Stx1 wurde affinitätschromatographisch gereinigt. Trotz der anschließenden Passage über eine Detoxigel®-Säule ergab die Untersuchung im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test, dass die Stx1-Stammlösung 166 pg/ml Endotoxin enthielt. Eingedenk der Verdünnung mit Zellkulturmedium ergibt sich eine Endkonzentration von 0,664 pg/ml Endotoxin in den Kulturmedien von PBMC und IEL. Lymphozyten können durch LPS stimuliert werden. Humane T-Lymphozyten werden durch 1 µg/ml LPS zur Produktion von Interferon  $\gamma$  mRNA angeregt (231). Murine IEL proliferieren bei Zugabe von 10 µg/ml LPS (42). Für bovine IEL liegen noch keine Daten vor, jedoch ist die verbleibende Endotoxinkonzentration mit 0,664 pg/ml im Kulturmedium sehr niedrig. Die Stimulation humaner Monozyten, die als besonders empfindlich für LPS gelten, wird mit 10 ng/ml durchgeführt (191). Auch ist zu bedenken, dass die Konzentration Endotoxin bei weiterer Titration des Toxins mit jeder Verdünnungsstufe reduziert wird, so dass sich dessen Effekt abschwächen müsste (vergl. Abb. 14). Die fehlende Neutralisation bleibt aber innerhalb einer Titrationsreihe konstant, so dass ein Einfluss von LPS auf die Zellen ausgeschlossen werden kann.

Die fehlende Neutralisationsfähigkeit von anti-StxB1 könnte vielmehr mit spezifischen Eigenschaften des Antikörpers bzw. mit Stx1-anti-StxB1-Komplexen und einer selektiven Wirkung auf die verschiedenen untersuchten IEL-Subpopulationen in Verbindung stehen. So befinden sich Fc-Rezeptoren auf dendritischen Zellen und NK-Zellen (95), wurden aber auch auf Lymphozyten, Thrombozyten (37) und intestinalen intraepithelialen T-Zellen nachgewiesen (161). Fc-Rezeptoren binden bevorzugt und mit hoher Affinität Immunglobuline, die bereits Antigene gebunden haben. Ursache ist vermutlich eine durch die Bindung des Antigens hervorgerufene Konformationsänderung, die die Bindung des Antigen-Antikörper-Komplexes an den Fc-Rezeptor erleichtert. Die Bindung dieser Komplexe an den Rezeptor induziert eine Signaltransduktionskaskade, die sowohl eine Aktivierung, als auch eine Suppression der Immunzelle zur Folge haben kann (37). Beim Rind kommen verschiedene Fc-Rezeptoren auf Lymphozyten aus dem peripheren Blut vor (163). Ohno *et al.*

haben bereits darauf hingewiesen, dass murine  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm einen besonderen Fc-Rezeptor exprimieren (161). Bislang sind keine Vergleiche der Fc-Rezeptoren von PBMC und IEL beim Rind bekannt; es wäre aber denkbar, dass die von den  $\gamma\delta$  T-Zellen oder anderen darmspezifischen IEL nach Bindung des Stx1-anti-StxB1-Komplexes ausgelöste Signaltransduktion zu der fehlenden „Neutralisationsfähigkeit“ von anti-StxB1 beiträgt. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Stamm *et al.* (214) nachweisen konnten, dass anti-StxB1 konzentrationsabhängig die Bindung von rStxB1 an bovine PBMC auch verstärken kann. Weiterhin vermuten die Autoren, dass die Wirkung von Stx1 auf bovine Lymphozyten nicht nur auf einer Internalisierung des Holotoxins in das Zytosol mit nachfolgender Inaktivierung der Ribosomen beruht, sondern auch auf einer durch die Bindung des Toxins an CD77 auf der Zelloberfläche eingeleitete Signaltransduktionskaskade. Letzteres kann möglicherweise bei den hier dargestellten Versuchen mit IEL in den verwendeten Konzentrationsverhältnissen zwischen Stx1 und anti-StxB1 nicht vollständig verhindert werden.

Bei der Gewinnung der IEL ist es schwierig festzustellen, ob es sich bei den untersuchten Immunzellen ausschließlich um intraepithelial gelegene Zellen handelt. Allerdings zeigt die histologische Untersuchung des Ileums vor und nach der Isolation der Zellen, dass die obere Epithelschicht von der darunterliegenden *Lamina propria mucosae* gerade abgelöst wird, während die Lamina propria erhalten bleibt. Auch entspricht die Zusammensetzung der isolierten Zellen den Ergebnissen, die Waters *et al.* an den IEL 4-8 Wochen alter Kälber erhoben haben (241).

Die Dichtegradientenzentrifugation ermöglichte eine Trennung von Zellen anhand ihrer Größe und ihres Gewichtes. Über 70 % der isolierten Zellen innerhalb des Aquisitionsfensters konnten anhand der Expression von Oberflächenmolekülen als Lymphozyten identifiziert werden. Die übrigen Zellen bestanden zu durchschnittlich 4 % aus Zellen epithelialen Ursprungs und 1 % der Zellen konnten als Monozyten/Makrophagen erkannt werden. Bei 24 % der isolierten Zellen war mit Hilfe der vorhandenen Antikörper keine Zuordnung zu einer bestimmten Zellpopulation möglich. Ob Dendritische Zellen (Dendritic Cells, DC) im Darmepithel vorkommen, ist noch umstritten. Neuere Veröffentlichungen lassen ihre Anwesenheit jedoch vermuten und beschreiben sogar aktive Prozesse der DC in der Infektabwehr (186). Beim Rind sind bisher zwei verschiedene Populationen von DC beschrieben worden, die MyD1<sup>-</sup> und die MyD1<sup>+</sup> DC (82). MyD1<sup>+</sup> DC wurden in den hier dokumentierten Untersuchungen durch den monoklonalen Antikörper IL-A 24 erkannt, nicht

jedoch die Population der MyD1<sup>-</sup> Zellen. In der afferenten Lymphe befinden sich v.a. MyD1<sup>+</sup> DC. Die Zusammensetzung der DC in der afferenten Lymphe erlaubt allerdings noch keine Aussage über den Phänotyp der DC im Darm. Ähnlich wie IEL könnten sie besondere Aufgaben versehen und sich deshalb auch phänotypisch unterscheiden. Auch der Phänotyp boviner NK-Zellen ist noch nicht endgültig charakterisiert. Es ist nicht auszuschließen, dass auch NK-Zellen existieren, die sich phänotypisch von den oben genannten CD3<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup> NK-like Zellen unterscheiden und die somit nicht mit den verwendeten Antikörpern detektiert werden können.

Die „Kontamination“ der Lymphozyten mit Zellen ungeklärten Ursprungs wirft die Frage auf, wie groß der Anteil dieser Zellen und ihrer Interaktion mit Stx1 an den beobachteten Effekten war. Die genaue Darstellung der Expression und Koexpression von Oberflächenantigenen der untersuchten Zellen stellt sicher, dass die Daten zur Proliferation der IEL Lymphozyten zugeordnet werden können. Allerdings sind Wechselwirkungen aller kultivierten Zellen miteinander und mit Stx1 im Zeitraum der Inkubation nicht auszuschließen.

Die intestinale Homöostase ist abhängig von einer Vielzahl Faktoren. Sie wird reguliert durch ein enges, fein aufeinander abgestimmtes Netzwerk, an dem neben Epithel- und Immunzellen auch Endothel-, Mesenchym- und Nervenzellen sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix beteiligt sind (50). Die Veränderung nur eines dieser vielen Parameter beeinflusst zwangsläufig die Regulation aller beteiligten Komponenten. Diese Arbeit hat gezeigt, dass funktionelle Stx1-Rezeptoren beim Rind nicht nur auf intestinalen epithelialen Zellen nachgewiesen werden können (78, 136), sondern auch von intraepithelialen Lymphozyten in der Darmschleimhaut exprimiert werden. Somit könnte tatsächlich das Stx von den STEC dazu genutzt werden, die intestinale Homöostase in ihrer Anwesenheit aufrechtzuerhalten. In Anbetracht des komplexen Netzwerkes, das für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase verantwortlich ist, erscheint es aber auch naheliegend, dass Stx gemeinsam mit anderen Faktoren der STEC wirkt. Hierfür kämen Lipopolysaccharid, Lymphostatin und Intimin in Frage (75, 115, 217), die ebenfalls über immunmodulatorische Eigenschaften verfügen. Auch wenn dies in zukünftigen Untersuchungen noch bewiesen werden muss, würde eine vielschichtige Interaktion von STEC mit ihrem Wirt für eine gut regulierte Kommunikation sprechen, die in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen resultiert, das Fehlen histopathologischer Schäden erklärt und die Persistenz der bovinen STEC-Infektion ermöglicht.

## 5. Zusammenfassung

Persistent infizierte Rinder sind das wichtigste Reservoir für humanpathogene Shigatoxin-bildende *E. coli*. Da Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Rindern sensitiv für Shigatoxin 1 (Stx1) sind, sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob Stx1 über eine Modulation der spezifischen Immunzellen in der intestinalen Mukosa die Persistenz der bovinen STEC-Infektion begünstigt. Zu diesem Zweck wurden intraepitheliale Lymphozyten (IEL) aus dem Ileum von Rindern *ex vivo* bezüglich ihrer Oberflächenantigene charakterisiert. Insbesondere wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von Stx1-Rezeptoren (Gb<sub>3</sub>/CD77) sowie die Fähigkeit zur Bindung der B-Untereinheit des Toxins untersucht und die Zusammensetzung der IEL-Subpopulationen mit der aus Zäkum und Kolon verglichen. *In vitro* wurde der Einfluss von gereinigtem Stx1 auf die Transformation ilealer IEL zu Blasten und die Aktivität Natürlicher Killerzellen ermittelt. Schließlich wurde die Transkription verschiedener Zytokingene, die für eine T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Immunantwort typisch sind bzw. chemotaktische Eigenschaften haben, in An- und Abwesenheit von Stx1 unter Verwendung einer semiquantitativen rt-PCR miteinander verglichen.

Bovine IEL exprimierten sowohl direkt nach ihrer Isolierung als auch nach 3tägiger Inkubation den Stx1-Rezeptor Gb<sub>3</sub>/CD77 auf allen IEL-Subpopulationen. Die Expression funktioneller Stx1-Rezeptoren wurde durch die Fähigkeit zur Bindung von rStxB1 bestätigt. Die Zusammensetzung der IEL in Zäkum und Kolon unterschied sich nur geringfügig von der ilealer IEL. Letztere wiesen einen geringfügig höheren Anteil von B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Lasten der CD8<sup>+</sup> und der  $\gamma\delta$  T-Zellen auf. In allen untersuchten Darmabschnitten konnten jedoch Gb<sub>3</sub>/CD77<sup>+</sup> IEL nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Stx1 zeigten die IEL eine verminderte Vitalität und Transformationsrate. Obwohl bestimmte IEL-Subpopulationen nach 3 Tagen Inkubation mit Stx1 Gb<sub>3</sub>/CD77 zu einem höheren Prozentsatz exprimierten als andere (CD4<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>), waren alle Zellen gleichermaßen von der Stx1-induzierten Reduktion der Transformation und des Anteils vitaler non-Blasten betroffen. Stx1 beeinflusste die Natürliche Killerzell-Aktivität boviner IEL zwar nicht, hatte aber eine modulierende Wirkung auf die Produktion von spezifischer Zytokin-mRNA. Der Effekt von Stx1 auf die Transkription von IL-2, IL-10 und Interferon  $\gamma$  war bei IEL-Präparationen von verschiedenen Tieren individuell unterschiedlich. Allerdings konnte sowohl bei unstimulierten als auch bei PHA-P-stimulierten Zellen in der Mehrzahl der Präparationen

nach Inkubation mit Stx1 eine verstärkte Transkription von IL-4 nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde die Produktion von IL-8 mRNA reduziert.

Bei der persistenten intestinalen Infektion von Rindern mit STEC stellen Zellen der lokalen spezifischen Immunabwehr somit Zielzellen für Stx1 dar. Da IEL Bestandteil des komplexen regulatorischen Netzwerks der intestinalen Mukosa sind, könnte Stx1 von den STEC dazu genutzt werden, die intestinale Homöostase auch in Anwesenheit pathogener Mikroorganismen aufrechtzuerhalten und damit sowohl histopathologisch nachweisbare Schäden zu vermeiden als auch die Persistenz der bovinen STEC-Infektion zu ermöglichen.

## 6. Summary

Persistently infected ruminants are the main reservoir of Shiga toxin-producing *E. coli* which can be pathogenic for humans. Since bovine PBMC are sensitive to Shiga toxin (Stx1), the goal of this study was to investigate if modulation of intestinal intraepithelial lymphocytic function by Stx1 supported persistent bovine STEC infection.

The expression of cell surface antigens on isolated ileal IEL was examined using flow cytometry. The expression of the toxin receptor Gb<sub>3</sub>/CD77, the binding of rStxB1 to IEL, and differences between the lymphocyte subpopulations of ileum, cecum and colon were all investigated. The influence of Stx1 on the ileal IEL transformation to blast cells and the activity of natural killer cells were also examined by flow cytometry. Additionally, the transcription of T<sub>H</sub>1 or T<sub>H</sub>2 cytokines/chemokines, and the chemotactic properties of these molecules were investigated in the absence and presence of Stx1 by semiquantitative rt-PCR.

After three days of *in vitro* incubation with Stx1, all bovine IEL subpopulations expressed Gb<sub>3</sub>/CD77 on their surfaces. The binding of rStxB1 on some IEL subpopulations proved that the receptor was functional. When ileal IEL were compared to IEL isolated from cecum and colon, no significant differences in the composition of lymphocyte subpopulations were observed. Ileal IEL revealed a marginal increase in CD4<sup>+</sup> T-cells and B-cells in combination with a decrease in CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T-cells. Independent of their source, all IEL expressed Gb<sub>3</sub>/CD77 on their surface. After incubation with Stx1, CD77 was also still expressed on every IEL subpopulation analysed, but the percentage of cells that had transformed to blast cells and the viability of these cells was markedly decreased compared to the control. Although some IEL subpopulations expressed CD77 at a higher percentage than the other subpopulations analyzed (CD4<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>), the Stx1-dependent decrease of transformed blast cells and viable non-blast cells could be detected in each lymphocyte subpopulation.

The transcription pattern of selected cytokine/chemokine genes was changed in the presence of Stx1. This modulation was heterogeneous for interleukin 2, interleukin 10 and interferon  $\gamma$ , suggesting a correlation to the individual state of activation of every animal studied. Interestingly, the transcription of the interleukin 4 gene was increased in most resting and activated cells while the transcription of interleukin 8 was decreased.

In contrast to the Stx1-induced changes in gene transcription and transformation obtained from IEL, the activity of natural killer cells was not influenced by the toxin.

IEL, as a component of the local intestinal specific immune defence, seem to be a potential target for Stx1. Since IEL are a part of the complex regulatory network of the intestinal mucosa, it seems possible that STEC utilise Stx1 to maintain the intestinal homeostasis. This may prevent the histopathologic damage caused by pathogenic bacteria and allow persistent STEC infection in ruminants.

## 7. Anhang

### 7.1 Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
1,4 Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH	6908.2
3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	M2128
3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-Perchlorat (DiO)	Molecular Probes	D-275
Agarose D-1 low EED	Pronadisa	8016
Amplitaq® DNA Polymerase (mit 10fach Puffer)	Applied Biosystems	N808-0161
Anti-ACT2, bovin	VMRD, Inc.	Klon CACT26A
Anti-CD3, bovin	VMRD, Inc.	Klon MM1A
Anti-CD8 $\beta$ , ovin	VMRD, Inc.	Klon BAT82A
Anti-CD77, Klon 38.13	Coulter Immunotech Diagnostics	IM0175
Anti-TcR1-N6, bovin	VMRD, Inc.	Klon CACTB6A
Anti-TcR1-N7, bovin	VMRD, Inc.	Klon CACTB81A
Anti-TcR1-N12, bovin	VMRD, Inc.	Klon CACT61A
BSA (bovines Serumalbumin) Fraktion V	Serva Electrophoresis GmbH	11930
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	C-2010
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D1407
DNTP-Mix	MBI Fermentas	R0181
EDTA	Serva Electrophoresis GmbH	11280
Ethidiumbromid		

---

EZ-Link™ Sulfo-NHC-Lc-Biotin	Pierce	21335
Ficoll-Paque®	Amersham Pharmacia Biotech	17-0840-03
FITC-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG, (γ-Ketten-spezifisch)	Medac GmbH	M30101
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies GmbH	8211
GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder mit loading dye	MBI Fermentas	SM0241
Gentamycin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G-1272
HEPES	Biomol Feinchemikalien GmbH	5288
Ionomycin Calcium Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	I0634
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker, 3 mit loading dye	MBI Fermentas	SM0191
Leibowitz's L-15 Medium	Life Technologies GmbH	41300-021
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH	25030-024
Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	63689
M-MLV RT (H <sup>-</sup> ) (mit 5fach Puffer)	Promega	M368B
Monoklonaler FITC-konjugierter Anti-Pan Zytokeratin Antikörper, Klon C-11	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F-3418
Nylonwatte	Biotest AG, Dreieich	830034
Oligo d(T)-Primer, 50μM	Applied Biosystems	N808-0128
Penizillin/Streptomycin-Lsg.	Life Technologies GmbH	15140-114
Percoll®	Biochrom AG	L-6145
Phorbol-myristat-acetat (PMA)	Orpegen Pharma	340332
Phytohämagglutinin P (PHA-P)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	L-8754
Pokeweed Mitogen (PWM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	L-9379
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P-4170
RNAzol™®	WAK-Chemie, Medical GmbH	WAK-CS- 105
R-Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin	dianova GmbH	016-110-084

R-Phycocerythrin-konjugierte Ziege-Anti-Ratte IgM-F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente (μ-Ketten-spezifisch)	Coulter-Immunotech-Diagnostics	1625
RPMI 1640-Medium	Life Technologies GmbH	51800-035
RPMI 1640-Medium mit stabilisiertem Glutamin	Biochrom AG	FG 1215
SDS (Dodezylsulfat Natriumsalz)	Serva Electrophoresis GmbH	20763
Spezifische Primer (Zytokine, GAPDH)	MWG-Biotech AG	
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH	4855
Trypsinlösung 0,25%	Life Technologies GmbH	25050-022
Ultroser®HY	Life Technologies GmbH	66029-018
Wasser für die Molekularbiologie, depc behandelt	Carl Roth GmbH	T-143.1

## 7.2 Puffer, Medien und Lösungen

### Puffer und Lösungen

#### **NaCl-Lösung (0,89%)**

NaCl	0,89 g
A. bidest.	ad 100 ml

#### **Na-Zitratlösung (3,8%)**

Na-Zitrat x 2 H <sub>2</sub> O	3,80 g
A. bidest.	ad 100 ml

#### **PBS 10-fach Lösung**

NaCl	100,00 g
KCl	2,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,50 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	18,00 g

A. bidest. ad 1000 ml

**PBS (pH 7,4)**

PBS 10-fach Lsg. 100 ml

A. bidest ad 1000 ml

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

PBS 10-fach Lsg. 100 ml

Penicillin/Streptomycin 100000 U Penicillin; 100 g Streptomycin

Gentamycin 500 µg

A. bidest ad 1000 ml

**PBS-BSA-Puffer (pH 7,4)**

BSA 1,00 g

PBS ad 100 ml

**PBS-BSA-Azid-Puffer (pH 7,4)**

BSA 1,00 g

NaN<sub>3</sub> 0,01 g

PBS 100 ml

**PBS-EDTA 10-fach- Lösung (pH 7,4)**

NaCl 80,00 g

KCl 2,00 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,00g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 14,20 g

Na<sub>2</sub>-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O 20,00 g

A. bidest. ad 1000 ml

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

PBS-EDTA 10-fach-Lsg. 100 ml

A. bidest. ad 1000 ml

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

NaC	18,00 g
KCl	0,20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,42 g
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	0,75 g
Glucose	1,00 g
Penicillin/Streptomycin	100000 U Penicillin; 100 g Streptomycin
Gentamycin	500 µg
A. bidest.	ad 1000 ml

**Trypanblau-Lösung**

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lsg.	1000 ml

**Erythrozyten-Lyse-Reagenz**

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

**HEPES-Puffer (pH 7,4)**

NaCl	8,00 g
KCl	0,30 g
HEPES	2,38 g
Glucose	2,00 g
A. bidest	ad 1000 ml

**HEPES-EDTA-Puffer (0,2% in HEPES-Puffer, pH 7,4)**

Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	2,00 g
HEPES-Puffer	ad 1000 ml

**Permeabilisierungsreagenz**

Digitonin	0,005 g
PBS	ad 100,0 ml

**Fixierung**

PFA	4,00 g
PBS	100,0 ml

**Glycin-HCL-Puffer (pH 2,5)**

Glycin	0,75 g
A. bidest.	100 ml

**Laufpuffer (pH 7,0)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,73 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	6,01 g
A. bidest.	ad 1000 ml

**Tris-Lösung (pH 9,0)**

Tris	121,14 g
A. bidest	1000 ml

**NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8,5)**

NaHCO <sub>3</sub>	0,42 g
A. bidest	100 ml

**3M Natrium-Azetat-Lösung -**

CH <sub>3</sub> COONa	24,60 g
A. bidest.	100 ml

**SDS-Lösung**

Dodezylsulfat Natriumsalz	1,00 g
NaCl-Lsg.	100 ml

**SDS-HCl-Lösung**

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

**0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)**

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

**TAE-Lösung 50-fach**

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

**TAE-Puffer**

TAE-Lsg. 50fach	200,0 ml
A. bidest.	ad 10000 ml

**Zellkulturmedien****Zellkulturmedium 1**

RPMI 1640	880,0 ml
FKS	100,0 ml
Penizillin/Streptomycin	1000 IE/1,0 g gelöst in 10 ml
Glutamin-Lsg. 200 mM	10,0 ml

**Zellkulturmedium 2**

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	56,0 ml
L-15	23,0 ml
FKS	20,0 ml
Penizillin/Streptomycin	100 IE/100 mg gelöst in 1,0 ml
Mercaptoethanol (1mM)	0,3 ml

**Zellkulturmedium 3**

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	890,0 ml
FKS	100,0 ml
Penizillin/Streptomycin	1000 IE/1,0 g gelöst in 10 ml

**Zellkulturmedium 4**

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	790,0 ml
FKS	200,0 ml
Penizillin/Streptomycin	1000 IE/1,0 g gelöst in 10 ml

**Zellkulturmedium 5**

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	900,0 ml
FKS	100,0 ml
Mercaptoethanol (1mM)	3,0 ml

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Abdelbagi, M., P. Nagi, and L. A. Babiuk** (1989). Interleukin-2 production by mitogen-stimulated intestinal mucosal leukocytes from cattle. *Am J Vet Res.* **50**:1591-7.
2. **Acheson, D. W. K., L. Lincicome, M. Jacewicz, and G. T. Keusch** (1998). Shiga Toxin interaction with intestinal epithelial cells, p. 140-7. *In* J. B. Kaper, O'Brien, A.D. (ed.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains*. ASM.
3. **Acheson, D. W. K., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky, and G. T. Keusch** (1996). Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun.* **64**:3294-300.
4. **Arab, S., M. Murakami, P. Dirks, B. Boyd, S. L. Hubbard, C. A. Lingwood, and J. T. Rutka** (1998). Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J. Neuro-Oncol.* **40**:137-50.
5. **Arnaud-Battandier, F., B. M. Bundy, M. O'Neill, J. Bienenstock, and D. L. Nelson** (1978). Cytotoxic activities of gut mucosal lymphoid cells in guinea pigs. *J Immunol.* **121**:1059-65.
6. **Austin, P. R., P. E. Jablonski, G. A. Bohach, A. K. Dunker, and C. J. Hovde** (1994). Evidence that the A2 fragment of Shiga-like toxin type I is required holotoxin integrity. *Infect Immun.* **62**:1768-75.
7. **Bandeira, A., S. Itohara, M. Bonneville, O. Burlen-Defranoux, T. Mota-Santos, A. Coutinho, and S. Tonegawa** (1991). Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor gamma delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:43-7.
8. **Besser, T. E., B. L. Richards, D. H. Rice, and D. D. Hancock** (2001). *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect.* **127**:555-60.
9. **Beutin, L., D. Geier, H. Steinruck, S. Zimmermann, and F. Scheutz** (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* **31**:2483-88.
10. **Bieger, W. P.** (1997). NK-Zellen: Eine aktuelle Übersicht. *Immun Infekt.* **1**:12-23.

11. **Biewenga, J., E. P. van Rees, and T. Sminia** (1993). Induction and regulation of IgA responses in the microenvironment of the gut. *Clin Immunol Immunopathol.* **67**:1-7.
12. **Bitzan, M., K. Ludwig, M. Klemt, H. König, J. Büren, and D. E. Müller-Wiefel** (1993). The role of *Escherichia coli* infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European, multicentre study. *Epidemiol Infect.* **110**:183-96.
13. **Bjerke, K., P. Brandtzaeg, and O. Fausa** (1988). T cell distribution is different in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches and villous epithelium. *Clin Exp Immunol.* **74**:270-5.
14. **Boismenu, R., and W. L. Havran** (1994). Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science.* **266**:1253-5.
15. **Boodhoo, A., Read, R.J., Brunton, J.** (1991). Crystallisation and preliminary X-ray crystallographic analysis of verotoxin-1 B-subunit. *J Mol Biol.* **221**:729-31.
16. **Borman-Eby, H. C., S. A. McEwen, R. C. Clarke, W. B. McNab, K. Rahn, and A. Valdivieso-Garcia** (1993). The seroprevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in Ontario dairy cows and associations with production management. *Prev Vet Med.* **15**:261-74.
17. **Born, W., M. P. Happ, A. Dallas, C. Reardon, R. Kubo, T. Shinnick, P. Brennan, and R. O'Brien** (1990). Recognition of heat shock proteins and gamma delta cell function. *Immunol Today.* **11**:40-3.
18. **Brandtzaeg, P., A. E. Berstad, I. N. Farstad, G. Haraldsen, L. Helgeland, F. L. Jahnsen, F. E. Johansen, I. B. Natvig, E. M. Nilsen, and J. Rugtveit** (1997). Mucosal immunity--a major adaptive defence mechanism. *Behring Inst Mitt*:1-23.
19. **Brandtzaeg, P., I. N. Farstad, G. Haraldsen, and F. L. Jahnsen** (1998). Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. *Dev Biol Stand.* **92**:93-108.
20. **Brandtzaeg, P., T. S. Halstensen, K. Kett, P. Krajci, D. Kvale, T. O. Rognum, H. Scott, and L. M. Sollid** (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology.* **97**:1562-84.
21. **Brown, J. E., P. Echeverria, and A. A. Lindberg** (1991). Digalactosyl-containing glycolipids as cell surface receptors for Shiga toxin of *Shigella dysenteriae* 1 and related cytotoxins of *E. coli*. *RID Suppl.* **4**:13:298-S303.

22. **Brown, J. E., D. E. Griffin, S. W. Rothman, and B. P. Doctor** (1982). Purification and biological characterization of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Infect Immun.* **36**:996-1005.
23. **Brown, J. E., T. G. Obrig, M. A. Ussery, and T. P. Moran** (1986). Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1 inhibits protein synthesis in reticulocyte lysate by inactivation of aminoacyl-t-RNA. *Microb Pathog.* **1**:325-34.
24. **Brown, J. E., S. W. Rothman, and B. P. Doctor** (1980). Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells by *Shigella dysenteriae* 1 toxin. *Infection and Immunity.* **29**:98-107.
25. **Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth** (1996). Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* **62**:118-9.
26. **Chang, L., G. A. Gusewitch, D. B. Chritton, J. C. Folz, L. K. Lebeck, and S. L. Nehlsen-Cannarella** (1993). Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods.* **166**:45-54.
27. **Chien, Y. H., and R. Jores** (1995). Gamma delta T cells. T cells with B-cell-like recognition properties. *Curr Biol.* **5**:1116-8.
28. **Chowers, Y., W. Holtmeier, J. Harwood, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff** (1994). The V delta 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon. *J Exp Med.* **180**:183-90.
29. **Christopher-Hennings, J., J. A. Willgohs, D. H. Francis, U. A. Raman, R. A. Moxley, and D. J. Hurley** (1993). Immunocompromise in gnotobiotic pigs induced by verotoxin-producing *Escherichia coli* (O111:NM). *Infect Immun.* **61**:2304-8.
30. **Clark, M. A., M. A. Jepson, N. L. Simmons, and B. H. Hirst** (1994). Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol.* **145**:543-52.
31. **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.
32. **Colgan, S. P., M. B. Resnick, C. A. Parkos, C. Delp-Archer, D. McGuirk, A. E. Bacarra, P. F. Weller, and J. L. Madara** (1994). IL-4 directly modulates function of a model human intestinal epithelium. *J Immunol.* **153**:2122-9.

33. **Cornick, N. A., S. L. Booher, T. A. Casey, and H. W. Moon** (2000). Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl Environ Microbiol.* **66**:4926-34.
34. **Cray, W. C., and H. W. Moon** (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* **61**:1586-90.
35. **De Grandis, S., J. Ginsberg, M. Toone, S. Climie, J. Friesen, and J. Brunton** (1987). Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J Bacteriol.* **169**:4313-9.
36. **de Gruijl, T. D., H. J. Bontkes, A. J. van den Muysenberg, J. W. van Oostveen, M. J. Stukart, R. H. Verheijen, N. van der Vange, P. J. Snijders, C. J. Meijer, J. M. Walboomers, and R. J. Scheper** (1999). Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer.* **35**:490-7.
37. **de Haas, M.** (2001). IgG-Fc receptors and the clinical relevance of their polymorphisms. *Wien Klin Wochenschr.* **30**:825-31.
38. **Dean-Nystrom, E., B. T. Bosworth, W. C. J. Cray, and H. W. Moon** (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the Intestines of Neonatal calves. *Infect Immun.* **65**:1842-8.
39. **Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, and H. W. Moon** (1999). Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 in weaned calves. *Adv Exp Med Biol.* **473**:173-7.
40. **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.
41. **Deusch, K., K. Pfeffer, K. Reich, M. Gstettenbauer, S. Daum, F. Luling, and M. Classen** (1991). Phenotypic and functional characterization of human TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol.* **173**:279-83.
42. **Dillon, S. B., and T. T. MacDonald** (1984). Functional properties of lymphocytes isolated from murine small intestinal epithelium. *Immunology.* **52**:501-9.
43. **Donohue-Rolfe, A., M. Jacewicz, and G. T. Keusch** (1989). Isolation and characterization of functional Shiga toxin subunits and renatured holotoxin. *Mol Microbiol.* **3**:1231-6.

44. **Donohue-Rolfe, A., and G. T. Keusch** (1983). Shigella dysenteriae1 cytotoxin: periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock. *Infect Immun.* **39**:270-4.
45. **Ducroc, R., M. Heyman, B. Beaufriere, J. L. Morgat, and J. F. Desjeux** (1983). Horseradish peroxidase transport across rabbit jejunum and Peyer's patches in vitro. *Am J Physiol.* **245**:G54-8.
46. **Eisenberg, T.** (2003). Untersuchungen zur Wirkung von Shigatoxin 1 von Escherichia coli auf Zellen der unspezifischen Immunabwehr bei Rind, Schaf und Ziege. *Vet. Med. Diss. Gießen*
47. **Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara, and K. Igarashi** (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from Escherichia coli O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem.* **171**:45-50.
48. **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.
49. **Ferguson, A.** (1977). Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut.* **18**:921-37.
50. **Fiocchi, C.** (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol.* **273**:G769-75.
51. **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.
52. **Franke, S., F. Gunzer, L. H. Wieler, G. Baljer, and H. Karch** (1995). Construction of recombinant Shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status of pigs. *Vet Microbiol.* **43**:41-52.
53. **Fraser, M. E., M. M. Chernaia, Y. V. Kozlov, and M. N. James** (1994). Crystal structure of the holotoxin from Shigella dysenteriae at 2,5 Å resolution. *Nat Struct Biol.* **1**:59-64.
54. **Fujihashi, K., J. R. McGhee, M. Yamamoto, T. Hiroi, and H. Kiyono** (1996). Role of gamma delta T cells in the regulation of mucosal IgA response and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* **778**:55-63.

55. **Gao, G. F.** (2002). CD8alphaalpha and CD8alphabeta: truly different?. *Trends Immunol.* **23**:177.
56. **Garred, O., B. van Deurs, and K. Sandvig** (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem.* **270**:10817-21.
57. **Gebert, A., and H. Bartels** (1991). Occluding junctions in the epithelia of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the rabbit ileum and caecum. *Cell Tissue Res.* **266**:301-14.
58. **Gebert, A., M. Göke, H. J. Rothkötter, and C. F. Dietrich** (2000). Mechanismen der Antigenaufnahme im Dün- und Dickdarm: die Rolle der M-Zellen für die Initiierung von Immunantworten. *Z Gastroenterol.* **38**:855-872.
59. **Gentry, M. K., and J. M. Dalrymple** (1980). Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J Clin Microbiol.* **12**:361-6.
60. **Giugliano, L. G., S. T. Ribeiro, M. H. Vainstein, and C. J. Ulhoa** (1995). Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli. *J Med Microbiol.* **42**:3-9.
61. **Godson, D. L., M. Campos, and L. A. Babiuk** (1991). Non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity of bovine coronavirus-infected target cells mediated by bovine intestinal intraepithelial leukocytes. *J Gen Virol.* **72**:2457-65.
62. **Gohin, I., M. Olivier, I. Lantier, M. Pepin, and F. Lantier** (1997). Analysis of the immune response in sheep efferent lymph during Salmonella abortusovis infection. *Vet Immunol Immunopathol.* **60**:111-30.
63. **Gordon, J. I., and M. L. Hermiston** (1994). Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol.* **6**:795-803.
64. **Grauke, L. J., I. T. Kudva, J. W. Yoon, C. W. Hunt, C. J. Williams, and C. J. Hovde** (2002). Gastrointestinal tract location of Escherichia coli O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol.* **68**:2269-77.
65. **Green, L. M., Reade, J.L., Ware, C.F.** (1984). Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods.* **70**:257-68.
66. **Griebel, P., and G. Ferrari** (1995). CD40 signalling in ileal Peyer's patch B cells: implications for T cell-dependent antigen selection. *Int Immunol.* **7**:369-79.
67. **Griebel, P. J., and W. R. Hein** (1996). Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol Today.* **17**:30-9.

68. **Guy-Grand, D., B. Rocha, P. Mintz, M. Malassis-Seris, F. Selz, B. Malissen, and P. Vassalli** (1994). Different use of T cell receptor transducing modules in two populations of gut intraepithelial lymphocytes are related to distinct pathways of T cell differentiation. *J Exp Med.* **180**:673-9.
69. **Guy-Grand, D., and P. Vassalli** (1993). Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* **5**:247-52.
70. **Gyles, C. L., S. A. De Grandis, C. MacKenzie, and J. L. Brunton** (1988). Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* **5**:419-26.
71. **Hakomori, S.** (1986). Glycosphingolipide. *Spektrum der Wissenschaft.* **7**:90-100.
72. **Hall, G. A., D. J. Reynolds, N. Chanter, J. H. Morgan, K. R. Parsons, T. G. Debney, A. P. Bland, and J. C. Bridger** (1985). Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet Pathol.* **22**:156-63.
73. **Henderson, B., M. Wilson, and B. Wren** (1997). Are bacterial exotoxins cytokine network regulators?. *Trends Microbiol.* **5**:454-8.
74. **Heyderman, R. S., M. Soriani, and T. R. Hirst** (2001). Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS?. *Trends Microbiol.* **9**:262-6.
75. **Higgins, L. M., G. Frankel, I. Connerton, N. S. Goncalves, G. Dougan, and T. T. MacDonald** (1999). Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science.* **285**:588-91.
76. **Hirata, I., G. Berrebi, L. L. Austin, D. F. Keren, and W. O. Dobbins, 3rd** (1986). Immunohistological characterization of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in control ileum and colon and in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* **31**:593-603.
77. **Hoang, P., H. R. Dalton, and D. P. Jewell** (1991). Human colonic intra-epithelial lymphocytes are suppressor cells. *Clin Exp Immunol.* **85**:498-503.
78. **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.
79. **Hoffman, M., T. Casey, and B. Bosworth** (1997). Bovine immune response to *Escherichia coli* O157:H7, 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections, Baltimore.

80. **Holtmeier, W., Y. Chowers, A. Lumeng, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff** (1995). The delta T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage. *J Clin Invest.* **96**:1108-17.
81. **Hope, J. C., P. Sopp, and C. J. Howard** (2002). NK-like CD8(+) cells in immunologically naive neonatal calves that respond to dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* **71**:184-94.
82. **Howard, C. J., G. P. Brooke, D. Werling, P. Sopp, J. C. Hope, K. R. Parsons, and R. A. Collins** (1999). Dendritic cells in cattle: phenotype and function. *Vet Immunol Immunopathol.* **72**:119-24.
83. **Inman, L. R., and J. R. Cantey** (1984). Peyer's patch lymphoid follicle epithelial adherence of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (strain RDEC-1). Role of plasmid-mediated pili in initial adherence. *J Clin Invest.* **74**:90-5.
84. **Inman, L. R., and J. R. Cantey** (1983). Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest.* **71**:1-8.
85. **Inward, C. D., J. Williams, I. Chant, J. Crocker, D. V. Milford, P. E. Rose, and C. M. Taylor** (1995). Verocytotoxin-1 induces apoptosis in vero cells. *J Infect.* **30**:213-8.
86. **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.
87. **Ito, H., T. Yutsudo, T. Hirayama, and Y. Takeda** (1988). Isolation and some properties of A and B subunits of Vero toxin 2 and in vitro formation of hybrid toxins between subunits of Vero toxin 1 and Vero toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7. *Microb Pathog.* **5**:189-95.
88. **Jacewicz, M. S., M. Mobassaleh, S. K. Gross, K. A. Balasubramanian, P. F. Daniel, S. Raghavan, R. H. McCluer, and G. T. Keusch** (1994). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin. *J Infect Dis.* **169**:538-46.
89. **Jackson, M. P., J. W. Newland, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** (1987). Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* **2**:147-53.

- 
90. **Jackson, M. P., E. A. Wadolkowski, D. L. Weinstein, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** (1990). Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunits by using site-directed mutagenesis. *J Bacteriol.* **172**:653-7.
  91. **James, S. P., C. Fiocchi, A. S. Graeff, and W. Strober** (1985). Immunoregulatory function of lamina propria T cells in Crohn's disease. *Gastroenterology.* **88**:1143-50.
  92. **James, S. P., C. Fiocchi, A. S. Graeff, and W. Strober** (1986). Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology.* **91**:1483-9.
  93. **James, S. P., W. C. Kwan, and M. C. Sneller** (1990). T cells in inductive and effector compartments of the intestinal mucosal immune system of nonhuman primates differ in lymphokine mRNA expression, lymphokine utilization, and regulatory function. *J Immunol.* **144**:1251-6.
  94. **Jameson, J., K. Ugarte, N. Chen, P. Yachi, E. Fuchs, R. Boismenu, and W. L. Havran** (2002). A Role for Skin gamma delta T Cells in Wound Repair. *Science.* **296**:747-9.
  95. **Janeway, C. A., and P. Travers** (1997). *Immunologie*, vol. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
  96. **Jepson, M. A., N. L. Simmons, G. L. Hirst, and B. H. Hirst** (1993). Identification of M cells and their distribution in rabbit intestinal Peyer's patches and appendix. *Cell Tissue Res.* **273**:127-36.
  97. **Johannes, L., and B. Goud** (1998). Surfing on a retrograde wave: how does Shiga toxin reach the endoplasmic reticulum?. *Trends Cell Biol.* **8**:158-62.
  98. **Johannes, L., D. Tenza, C. Antony, and B. Goud** (1997). Retrograde transport of KDEL-bearing B-Fragment of Shiga toxin. *J Biol Chem.* **272**:19554-61.
  99. **Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow** (1994). Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med.* **180**:15-23.
  100. **Jones, N. L., A. Islur, R. Haq, M. Mascarenhas, M. A. Karmali, M. H. Perdue, B. W. Zanke, and P. M. Sherman** (2000). Escherichia coli Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **278**:G811-9.

101. **Junqueira, L. C., J. Carneiro, and R. O. Kelley** (2000). Histologie, vol. 5. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Barcelona Hongkong London Mailand Paris Tokio.
102. **Kagnoff, M. F.** (1998). Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of gamma delta T cells in the intestine. *Am J Physiol.* **274**:G455-8.
103. **Kanamori, Y., K. Ishimaru, M. Nanno, K. Maki, K. Ikuta, H. Nariuchi, and H. Ishikawa** (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit<sup>+</sup> IL-7R<sup>+</sup> Thy1<sup>+</sup> lympho-hemopoietic progenitors develop. *J Exp Med.* **184**:1449-59.
104. **Kappler, J. W., N. Roehm, and P. Murrack** (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* **49**:273-80.
105. **Karch, H., F. Gunzer, A. Schwarzkopf, H. Schmidt, and M. Bitzan** (1993). Molekularbiologie und pathogenetische Bedeutung von Shiga- und Shiga-like Toxinen. *BioEngineering.* **3**:39-45.
106. **Karmali, M. A.** (1998). Human Immune Response and Immunity to Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* infection, p. 236-48. *In* J. B. Kaper, O'Brien, A.D. (ed.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains.* ASM.
107. **Karmali, M. A.** (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **2**:15-38.
108. **Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior** (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* **151**:775-82.
109. **Kato, T.** (1990). A study of secretory immunoglobulin A on membranous epithelial cells (M cells) and adjacent absorptive cells of rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn.* **25**:15-23.
110. **Keljo, D. J., and J. R. Hamilton** (1983). Quantitative determination of macromolecular transport rate across intestinal Peyer's patches. *Am J Physiol.* **244**:G637-44.
111. **Keusch, G. T., P. R. Papanhausen, M. Jacewicz, and K. Hirschhorn** (1976). Comparison of *Shigella* (S) and *Cholera* (C) toxin effects using lymphocytes as target cells. *Clin Res.* **24**:287A.
112. **Kiarash, A., B. Boyd, and C. A. Lingwood** (1994). Glycophospholipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially

- recognise different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem.* **269**:11138-46.
113. **Kiyokawa, N., T. Mori, T. Taguchi, M. Saito, K. Mimori, T. Suzuki, T. Sekino, N. Sato, H. Nakajima, Y. U. Katagiri, T. Takeda, and J. Fujimoto** (2001). Activation of the caspase cascade during Stx1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *J Cell Biochem.* **81**:128-42.
114. **Kiyono, H., K. Fujihashi, T. Taguchi, W. K. Aicher, and J. R. McGhee** (1991). Regulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes in mucosal responses. *Immunol Res.* **10**:324-30.
115. **Klapproth, J. M., I. C. Scaletsky, B. P. McNamara, L. C. Lai, C. Malstrom, S. P. James, and M. S. Donnenberg** (2000). A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun.* **68**:2148-55.
116. **Klein, J. R.** (1995). Advances in intestinal T-cell development and function. *Immunol Today.* **16**:322-4.
117. **Klein, J. R., and M. F. Kagnoff** (1984). Nonspecific recruitment of cytotoxic effector cells in the intestinal mucosa of antigen-primed mice. *J Exp Med.* **160**:1931-6.
118. **Komano, H., Y. Fujiura, M. Kawaguchi, S. Matsumoto, Y. Hashimoto, S. Obana, P. Mombaerts, S. Tonegawa, H. Yamamoto, S. Itohara, and et al.** (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:6147-51.
119. **Lamkhioed, B., A. S. Gounni, V. Gruart, A. Pierce, A. Capron, and M. Capron** (1995). Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur J Immunol.* **25**:117-25.
120. **Lea, N., J. M. Lord, and L. M. Roberts** (1999). Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology.* **145**:999-1004.
121. **Lefrancois, L., R. LeCorre, J. Mayo, J. A. Bluestone, and T. Goodman** (1990). Extrathymic selection of TCR gamma delta + T cells by class II major histocompatibility complex molecules. *Cell.* **63**:333-40.
122. **Leishman, A. J., O. V. Naidenko, A. Attinger, F. Koning, C. J. Lena, Y. Xiong, H. C. Chang, E. Reinherz, M. Kronenberg, and H. Cheroutre** (2001). T cell responses modulated through interaction between CD8alpha and the nonclassical MHC class I molecule. *TL Science.* **294**:1936-9.

123. **Lindberg, A. A., J. E. Brown, N. Strömberg, M. Westling-Ryd, J. E. Schultz, and K.-A. Karlsson** (1987). Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem.* **262**:1779-85.
124. **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.
125. **Lingwood, C. A., and S. K. Yiu** (1992). Glycolipid modification of alpha2 interferon binding. Sequence similarity between the alpha2 interferon receptor and Verotoxin (Shiga-like toxin) B-subunit. *Biochem J.* **283**:25-6.
126. **Ludwig, K., M. A. Karmali, M. Petric, V. Sarkim, and D. E. Müller-Wiefel** (1997). Antibody responses to Verotoxin 2 in patients with enteropathic hemolytic uremic syndrome (HUS), 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* infections, Baltimore.
127. **Mackay, C. R., and W. R. Hein** (1989). A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int Immunol.* **1**:540-5.
128. **Madara, J. L., W. A. Bye, and J. S. Trier** (1984). Structural features of and cholesterol distribution in M-cell membranes in guinea pig, rat, and mouse Peyer's patches. *Gastroenterology.* **87**:1091-103.
129. **Mainil, J. G., C. J. Duchesnes, S. C. Whipp, L. R. Marques, A. D. O'Brien, T. A. Casey, and H. W. Moon** (1987). Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am J Vet Res.* **48**:743-8.
130. **Mangeney, M., C. A. Lingwood, S. Taga, B. Caillou, T. Tursz, and J. Wiels** (1993). Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Res.* **53**:5314-9.
131. **Mangeney, M., Y. Richard, D. Coulaud, T. Tursz, and J. Wiels** (1991). CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol.* **21**:1131-40.
132. **Marcato, P., G. Mulvey, and G. D. Armstrong** (2002). Cloned Shiga toxin 2 B subunit induces apoptosis in Ramos Burkitt's lymphoma B cells. *Infect Immun.* **70**:1279-86.
133. **McCloskey, N., J. D. Pound, M. J. Holder, J. M. Williams, L. M. Roberts, J. M. Lord, and J. Gordon** (1999). The extrafollicular-to-follicular transition of human B lymphocytes: induction of functional globotriaosylceramide (CD77) on high threshold occupancy of CD40. *Eur J Immunol.* **29**:3236-44.

134. **McCracken, V. J., and R. G. Lorenz** (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol.* **3**:1-11.
135. **Melton-Celsa, A. R., and A. D. O'Brein** (1998). Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals, p. 121-8. *In* J. B. Kaper, O'Brien, A.D. (ed.), *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing Strains*. ASM, Washington DC.
136. **Menge, C., E. Schröpfer, I. Stamm, and G. Baljer** (2001). Cattle possess intestinal receptors for Escherichia coli Shiga Toxin 1. Vortrag auf der 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Aachen 2001.
137. **Menge, C.** (1996). Untersuchungen zur Wirkung des Shiga-like-Toxins-I (SLT-I) von Escherichia coli auf Immunzellen des Rindes. *Vet. Med. Diss.* Gießen
138. **Menge, C., B. Neufeld, N. Schmeer, G. Baljer, and L. H. Wieler** (1999). Establishment of immunological parameters to monitor the efficacy of biological response modifiers in cattle ex vivo in vitro. 26th World Veterinary Congress "Mondial Vet Lyon", Lyon.
139. **Menge, C., I. Stamm, M. Blessenohl, L. H. Wieler, and G. Baljer** (2003). Verotoxin 1 from Escherichia coli Affects Gb(3)/CD77(+) Bovine Lymphocytes Independent of Interleukin-2, Tumor Necrosis Faktor-alpha, and Interferon-alpha. *Exp Biol Med* (Maywood). **228**:377-86.
140. **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.
141. **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.
142. **Moghaddami, M., A. Cummins, and G. Mayrhofer** (1998). Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine. *Gastroenterology.* **115**:1414-25.
143. **Morsey, M. A., Y. Popowych, J. Kowalski, G. Gerlach, D. Godson, M. Campos, and L. A. Babiuk** (1996). Molecular cloning and expression of bovine interleukin-8. *Microb Pathog.* **20**:203-12.
144. **Mosley, R. L., D. Styre, and J. R. Klein** (1990). CD4+CD8+ murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Int Immunol.* **2**:361-5.

145. **Mowat, A. M., S. MacKenzie, M. E. Baca, M. V. Felstein, and D. M. Parrott** (1986). Functional characteristics of intraepithelial lymphocytes from mouse small intestine. II. In vivo and in vitro responses of intraepithelial lymphocytes to mitogenic and allogeneic stimuli. *Immunology*. **58**:627-34.
146. **Mowat, A. M., and J. L. Viney** (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*. **156**:145-66.
147. **Moyer, M. P., P. S. Dixon, S. Rothman, and J. E. Brown** (1987). Cytotoxicity of Shiga toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. *Infect Immun*. **55**:1533-5.
148. **Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima** (1994). Molecular mechanisms of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. **56**:554-8.
149. **Nagi, A. M., and L. A. Babiuk** (1989). Characterization of surface markers of bovine gut mucosal leukocytes using monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*. **22**:1-14.
150. **Nagi, A. M., and L. A. Babiuk** (1989). Concanavalin A-induced suppressor cell activity in intestinal mucosal leukocytes obtained from healthy cows. *Am J Vet Res*. **50**:1266-71.
151. **Nagi, A. M., and L. A. Babiuk** (1988). Effects of recombinant bovine interferons-alpha and -gamma on some in vitro immune functions of bovine intraepithelial and lamina propria leukocytes. *J Interferon Res*. **8**:495-505.
152. **Nagi, A. M., and L. A. Babiuk** (1988). Preparation, purification and characterization of bovine Peyer's patch leukocytes. *Can J Vet Res*. **52**:249-57.
153. **Nagi, A. M., and L. A. Babiuk** (1988). Response of bovine intestinal leukocytes to recombinant bovine interleukin-2. *J Biol Regul Homeost Agents*. **2**:125-33.
154. **Nakagawa, I., M. Nakata, S. Kawabata, and S. Hamada** (1999). Regulated expression of the Shiga toxin B gene induces apoptosis in mammalian fibroblastic cells. *Mol Microbiol*. **33**:1190-9.
155. **Neutra, M. R., T. L. Phillips, E. L. Mayer, and D. J. Fishkind** (1987). Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res*. **247**:537-46.
156. **Newby, T. J., and F. J. Bourne** (1976). The nature of the local immune system of the bovine small intestine. *Immunology*. **31**:475-80.
157. **Niebuhr, K.** (1991). Biochemische und immunologische Charakterisierung der rekombinanten B-Untereinheit des Shigatoxins, Dipl. Biol. Braunschweig.

158. **O'Brien, A. D., Holmes, R.K.** (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* **51**:206-220.
159. **O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch** (1992). Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* **180**:65-94.
160. **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.
161. **Ohno, H., S. Ono, N. Hirayama, S. Shimada, and T. Saito** (1994). Preferential usage of the Fc receptor gamma chain in the T cell antigen receptor complex by gamma/delta T cells localized in epithelia. *J Exp Med.* **179**:365-9.
162. **O'Loughlin, E. V., and R. M. Robins-Browne** (2001). Effect of Shiga toxin and Shiga-like-toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* **3**:493-507.
163. **Outteridge, P. M., and J. H. Dufty** (1981). Surface markers for characterisation of bovine blood lymphocyte populations and changes in these from birth to maturity. *Res Vet Sci.* **31**:315-22.
164. **Owen, R. L.** (1977). Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology.* **72**:440-51.
165. **Owen, R. L., and T. H. Ermak** (1990). Structural specializations for antigen uptake and processing in the digestive tract. *Springer Semin Immunopathol.* **12**:139-52.
166. **Owen, R. L., and A. L. Jones** (1974). Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology.* **66**:189-203.
167. **Owen, R. L., N. F. Pierce, R. T. Apple, and W. C. Cray, Jr.** (1986). M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis.* **153**:1108-18.
168. **Pappo, J., and R. L. Owen** (1988). Absence of secretory component expression by epithelial cells overlying rabbit gut-associated lymphoid tissue. *Gastroenterology.* **95**:1173-7.
169. **Parsons, K. R., C. J. Howard, B. V. Jones, and P. Sopp** (1989). Investigation of bovine gut associated lymphoid tissue (GALT) using monoclonal antibodies against bovine lymphocytes. *Vet Pathol.* **26**:396-408.

170. **Pellizzari, A., H. Pang, and C. A. Lingwood** (1992). Binding of Verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochem J.* **31**:1363-70.
171. **Perdomo, O. J., J. M. Cavaillon, M. Huerre, H. Ohayon, P. Gounon, and P. J. Sansonetti** (1994). Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med.* **180**:1307-19.
172. **Philpott, D. J., C. A. Ackerley, A. J. Kiliaan, M. A. Karmali, M. H. Perdue, and P. M. Sherman** (1997). Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am J Physiol.* **273**:G1349-G58.
173. **Pirro, F., L. H. Wieler, K. Failing, R. Bauerfeind, and G. Baljer** (1995). Neutralizing antibodies against Shig-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera from cattle. *Vet Microbiol.* **43**:131-41.
174. **Pohlenz, J., and E. M. Liebler** (1987). Zur Funktion und Morphologie des Darmschleimhautimmunsystems. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **94**:306-11.
175. **Porta, C., P. S. James, A. D. Phillips, T. C. Savidge, M. W. Smith, and D. Cremaschi** (1992). Confocal analysis of fluorescent bead uptake by mouse Peyer's patch follicle-associated M cells. *Exp Physiol.* **77**:929-32.
176. **Poussier, P., and M. Julius** (1995). T-cell development and selection in the intestinal epithelium. *Semin Immunol.* **7**:321-34.
177. **Puddington, L., S. Olson, and L. Lefrancois** (1994). Interactions between stem cell factor and c-Kit are required for intestinal immune system homeostasis. *Immunity.* **1**:733-9.
178. **Ramegowda, B., J. E. Samuel, and V. L. Tesh** (1999). Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents. *J Infect Dis.* **180**:1205-13.
179. **Ramegowda, B., and V. L. Tesh** (1996). Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun.* **64**:1173-80.
180. **Ramotar, K., B. Boyd, G. Tyrrell, J. Garipey, C. Lingwood, and J. Brunton** (1990). Characterization of Shiga-like toxin I B subunit purified from overproducing clones of the SLT-I B cistron. *Biochem J.* **272**:805-11.
181. **Raqib, R., A. A. Lindberg, L. Bjork, P. K. Bardhan, B. Wretling, U. Andersson, and J. Andersson** (1995). Down-regulation of gamma interferon, tumor necrosis

- factor type 1, interleukin 1 (IL-1) type I, IL-3, IL-4, and transforming growth factor beta type I receptors at the local site during the acute phase of Shigella infection. *Infect Immun.* **63**:3079-87.
182. **Raqib, R., A. A. Lindberg, B. Wretlind, P. K. Bardhan, U. Andersson, and J. Andersson** (1995). Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infect Immun.* **63**:289-96.
183. **Raqib, R., B. Wretlind, J. Andersson, and A. A. Lindberg** (1995). Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease activity and directed more to stool than to plasma. *J Infect Dis.* **171**:376-84.
184. **Recktenwald, J., and H. Schmidt** (2002). The Nucleotide Sequence of Shiga Toxin (Stx) 2e-Encoding Phage phiP27 Is Not Related to Other Stx Phage Genomes, but the Modular Genetic Structure Is Conserved. *Infect Immun.* **70**:1896-908.
185. **Reisberg, R., S. Olsnes, and K. Eiklid** (1981). The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit. *J Biol Chem.* **256**:8739-44.
186. **Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina, and P. Ricciardi-Castagnoli** (2001). Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology.* **204**:572-81.
187. **Reymond, D., R. P. Johnson, M. A. Karmali, M. Petric, M. Winkler, S. Johnson, K. Rahn, S. Renwick, J. Wilson, R. C. Clarke, and J. Spika** (1996). Neutralizing antibodies to Escherichia coli Vero cytotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents. *J Clin Microbiol.* **34**:2053-7.
188. **Reynaud, C. A., C. Garcia, W. R. Hein, and J. C. Weill** (1995). Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell.* **80**:115-25.
189. **Richardson, J. M., P. D. Evans, S. W. Homans, and A. Donohue-Rolfe** (1997). Solution structure of the carbohydrate-binding B subunit homopentamer of verotoxin VT-1 from E. coli. *Nat Genet.* **4**:190-3.
190. **Rock, E. P., P. R. Sibbald, M. M. Davis, and Y. H. Chien** (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med.* **179**:323-8.
191. **Rostaing, L., C. Peres, J. Tkaczuk, J. P. Charlet, P. Bories, D. Durand, E. Ohayon, C. de Preval, and M. Abbal** (2000). Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN-gamma, and TNF-alpha in

- monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* **20**:18-26.
192. **Sakiri, R., B. Ramegowda, and V. L. Tesh** (1998). Shiga toxin type 1 activates tumor necrosis factor-alpha gene transcription and nuclear translocation of the transcriptional activators nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Blood.* **92**:558-66.
193. **Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg, and H. C. Krivan** (1990). Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin Type II and Shiga-like toxin typeII variants. *Infect Immun.* **58**:611-8.
194. **Sandvig, K., E. Dubinia, O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen, and B. Van Deurs** (1993). Entry of Shiga toxin into cells. *Zentralbl Bakteriол.* **278**:296-305.
195. **Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen, and B. Van Deurs** (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmatic reticulum. *Nature.* **358**:510-2.
196. **Sandvig, K., O. Garred, A. Van Helvoort, G. Van Meer, and B. Van Deurs** (1996). Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell.* **7**:1391-1404.
197. **Sandvig, K., S. Olsnes, J. E. Brown, O. W. Petersen, and B. Van Deurs** (1989). Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol.* **108**:1331-43.
198. **Sandvig, K., M. Ryd, O. Garred, E. Schweda, P. K. Holm, and B. Van Deurs** (1994). Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol.* **126**:53-64.
199. **Sandvig, K., and B. Van Deurs** (1994). Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* **346**:99-102.
200. **Sandvig, K., and B. Van Deurs** (1996). Endocytosis, intracellular transport and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev.* **76**:949-66.
201. **Sandvig, K., and B. Van Deurs** (1992). Toxin-induced cell lysis: protection by 3-methyladenine and cycloheximide. *Exp Cell Res.* **200**:253-62.
202. **Schapiro, F. B., C. Lingwood, W. Furuya, and S. Grinstein** (1998). pH-independent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi-complex. *Am J Physiol.* **274**:C319-32.

- 
203. **Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann, and H. Karch** (1993). Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun.* **61**:534-43.
204. **Seidah, N. G., A. Donohue-Rolfe, C. Lazure, F. Auclair, G. T. Keusch, and M. Chretien** (1986). Complete amino acid sequence of Shigella toxin B-chain. A novel polypeptide containing 69 amino acids and one disulfid bridge. *J Biol Chem.* **261**:13928-31.
205. **Shanahan, F.** (1994). The intestinal immune system, p. 643-8. *In* J. LR (ed.), *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York.
206. **Siebers, A., and B. B. Finlay** (1996). M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* **4**:22-9.
207. **Sim, G. K.** (1995). Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol.* **58**:297-343.
208. **Simmons, C. P., S. Clare, and G. Dougan** (2001). Understanding mucosal responsiveness: lessons from enteric bacterial pathogens. *Semin Immunol.* **13**:201-9.
209. **Skinner, L. M., and M. P. Jackson** (1998). Inhibition of prokaryotic translation by the Shiga toxin enzymatic subunit. *Microb Pathog.* **24**:117-22.
210. **Smith, D. G., S. W. Naylor, and D. L. Gally** (2002). Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle. *Int J Med Microbiol.* **292**:169-83.
211. **Sobjinski, G.** (1998). Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen darmpathogener *Escherichia coli*-Keime bei Kälbern aus Milchviehbeständen, *Vet. Med. Diss.* Berlin.
212. **St. Hilaire, P. M., M. K. Boyd, and E. J. Toone** (1994). Interaction of the Shiga-like toxin type 1 B-subunit with its carbohydrate receptor. *Biochemistry.* **33**:14452-63.
213. **Stamm, I.** (2000). Untersuchungen zum Mechanismus der Shigatoxin-Wirkung auf Immunzellen des Rindes, *Vet. Med. Diss.* Gießen.
214. **Stamm, I., M. Wuhrer, R. Geyer, G. Baljer, and C. Menge** (2002). Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Microb Pathog.* **33**:251-64.
215. **Stein, G. M., U. Pfüller, M. Schietzel, and A. Bussing** (2000). Toxic proteins from European mistletoe (*Viscum album* L.): increase of intracellular IL-4 but decrease of IFN-gamma in apoptotic cells. *Anticancer Res.* **20**:1673-8.

216. **Stein, P. E., A. Boodhoo, G. J. Tyrrell, J. L. Brunton, and R. J. Read** (1992). Crystal structure of the cell-binding B-oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature*. **355**:748-50.
217. **Stevens, M. P., O. Marches, J. Campbell, V. Huter, G. Frankel, A. D. Phillips, E. Oswald, and T. S. Wallis** (2002). Intimin, Tir, and Shiga Toxin 1 Do Not Influence Enteropathogenic Responses to Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Bovine Ligated Intestinal Loops. *Infect. Immun.* **70**:945-952.
218. **Su, G. F., H. N. Brahmabhatt, J. Wehland, M. Rohde, and K. N. Timmis** (1992). Construction of stable LamB-Shiga toxin B subunit hybrids: analysis of expression in *Salmonella typhimurium aroA* strains and stimulation of B subunit-specific mucosal and serum antibody responses. *Infect Immun.* **60**:3345-59.
219. **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.
220. **Suh, J.-K., C. J. Hovde, and J. D. Robertus** (1998). Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eucaryotic ribosomes. *Biochemistry.* **37**:9394-8.
221. **Suzuki, Y., K. Mori, and T. Iwanaga** (1997). Intraepithelial gamma delta T cells are closely associated with apoptotic enterocytes in the bovine intestine. *Arch Histol Cytol.* **60**:319-28.
222. **Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund** (1999). Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol.* **2**:99-105.
223. **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.
224. **Taga, S., K. Carrier, Z. Mishal, C. Capoulade, M. Mangeney, Y. Lecluse, D. Coulaud, C. Tetaud, L. L. Pritchard, T. Tursz, and J. Wiels** (1997). Intracellular signalling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cells. *Blood.* **90**:2757-67.
225. **Tagliabue, A., A. D. Befus, D. A. Clark, and J. Bienenstock** (1982). Characteristics of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria. *J Exp Med.* **155**:1785-96.
226. **Taguchi, T., W. K. Aicher, K. Fujihashi, M. Yamamoto, J. R. McGhee, J. A. Bluestone, and H. Kiyono** (1991). Novel function for intestinal intraepithelial

- lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol.* **147**:3736-44.
227. **Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R. L. Modlin, M. B. Brenner, B. R. Bloom, and C. T. Morita** (1994). Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:8175-9.
228. **Teitelbaum, D. H., B. C. Reyes, R. M. Merion, and L. Mosley** (1996). Intestinal intraepithelial lymphocytes: identification of an inhibitory subpopulation. *J Surg Res.* **63**:123-7.
229. **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.
230. **Torres-Medina, A.** (1981). Morphologic characteristics of the epithelial surface of aggregated lymphoid follicles (Peyer's patches) in the small intestine of newborn gnotobiotic calves and pigs. *Am J Vet Res.* **42**:232-6.
231. **Ulmer, A. J., H. Flad, T. Rietschel, and T. Mattern** (2000). Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology.* **152**:37-45.
232. **Van Damme, J., R. A. Bunning, R. Conings, R. Graham, G. Russell, and G. Opdenakker** (1990). Characterization of granulocyte chemotactic activity from human cytokine-stimulated chondrocytes as interleukin 8. *Cytokine.* **2**:106-11.
233. **Van de Kar, N. C., T. Kooistra, M. Vermeer, W. Lesslauer, L. A. Monnens, and V. W. Van Hinsbergh** (1995). Tumor necrosis factor alpha induces endothelial galactosyl transferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific tumor necrosis factor receptors and protein kinase C. *Blood.* **85**:734-43.
234. **Van Stetten, 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.
235. **Viney, J. L., and T. T. MacDonald** (1992). Lymphokine secretion and proliferation of intraepithelial lymphocytes from murine small intestine. *Immunology.* **77**:19-24.
236. **Von Moll, L. K., and J. R. Cantey** (1997). Peyer's patch adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains in rabbits. *Infect Immun.* **65**:3788-93.

237. **Waddell, T., A. Cohen, and C. A. Lingwood** (1990). Induction of verotoxin sensitivity in receptor-deficient cell lines using the receptor glycolipid globotriosylceramide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**:7898-7901.
238. **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.
239. **Wagner, C.** (2000). Nachweis von Antikörpern gegen sezernierte Proteine des Locus of Enterocyte Effacement (LEE) von Shigatoxin- bildenden E.coli-Stämmen bei Kälbern, Vet. Med. Diss Berlin.
240. **Wang, J., and J. R. Klein** (1994). Thymus-neuroendocrine interactions in extrathymic T cell development. *Science*. **265**:1860-2.
241. **Waters, W. R., J. A. Harp, and B. J. Nonnecke** (1995). Phenotypic analysis of peripheral blood lymphocytes and intestinal intra-epithelial lymphocytes in calves. *Vet Immunol Immunopathol*. **48**:249-59.
242. **Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien** (1988). Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from Escherichia coli strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*. **170**:4223-30.
243. **Weintraub, B. C., M. R. Jackson, and S. M. Hedrick** (1994). Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol*. **153**:3051-8.
244. **Weninger, W., M. A. Crowley, N. Manjunath, and U. H. von Andrian** (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med*. **194**:953-66.
245. **Wieler, L. H., R. Bauerfeind, and G. Baljer** (1992). Characterization of Shiga-like toxin producing Escherichia coli (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl Bakteriol*. **276**:243-53.
246. **Williams, J. M., N. Lea, J. M. Lord, L. M. Roberts, D. V. Milford, and C. M. Taylor** (1997). Comparison of ribosome-inactivating proteins in the induction of apoptosis. *Toxicol Lett*. **91**:121-7.
247. **Williams, J. M., D. V. Milford, and C. M. Taylor** (1995). Intracellular signalling pathways involved in Verocytotoxin-induced apoptosis in Vero cells, Abstr. 7th Europ. Workshop Conference Bact. Prot. Toxins, Middelfart, Denmark.

- 
248. **Wilson, A. D., C. R. Stokes, and F. J. Bourne** (1986). Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology*. **59**:109-13.
249. **Wilson, A. D., C. R. Stokes, and F. J. Bourne** (1986). Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology*. **58**:621-5.
250. **Wolf, J. L., R. S. Kauffman, R. Finberg, R. Dambrauskas, B. N. Fields, and J. S. Trier** (1983). Determinants of reovirus interaction with the intestinal M cells and absorptive cells of murine intestine. *Gastroenterology*. **85**:291-300.
251. **Woode, G. N., J. F. Pohlenz, N. E. Gourley, and J. A. Fagerland** (1984). Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J Clin Microbiol*. **19**:623-30.
252. **Wray, C., I. McLaren, and G. R. Pearson** (1989). Occurrence of 'attaching and effacing' lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Rec*. **125**:365-368.
253. **Yamamoto, T., T. Kamano, M. Uchimura, M. Iwanaga, and T. Yokota** (1988). *Vibrio cholerae* O1 adherence to villi and lymphoid follicle epithelium: in vitro model using formalin-treated human small intestine and correlation between adherence and cell-associated hemagglutinin levels. *Infect Immun*. **56**:3241-50.
254. **Yoshikai, Y.** (1999). The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol Res*. **20**:219-35.
255. **Zeitz, M., W. C. Greene, N. J. Peffer, and S. P. James** (1988). Lymphocytes isolated from the intestinal lamina propria of normal nonhuman primates have increased expression of genes associated with T-cell activation. *Gastroenterology*. **94**:647-55.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Mittel, die zur Erstellung notwendig waren sowie für die Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Christian Menge für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die fachliche Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft bedanken. Seine Kritik und Anregungen haben sowohl die Arbeit im Labor als auch die Abfassung dieser Dissertationsschrift immer bereichert. Ich habe die Möglichkeit, selbstständig zu arbeiten und zu entscheiden mit der Gewissheit seiner fachlichen Kompetenz im Hintergrund sehr zu schätzen gewusst.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. J. Westermann. Er hat viel Verständnis für meine Situation aufgebracht und die Erstellung dieser Dissertationsschrift nachhaltig gefördert und beschleunigt.

Prof. Dr. E. Burkhardt aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen hat die histologischen Präparate für mich angefertigt und mich bei der Beurteilung der Schnitte unterstützt. Vielen Dank.

Die freundlicherweise von Annette Bickenbach, Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität, durchgeführten LAL-Tests erleichterten die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Bedanken möchte ich mich aber nicht nur für die Durchführung der Tests und die vielen weiteren wissenschaftlichen Anregungen, sondern v.a. für ihre Anteilnahme und Freundschaft.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat durch Überlassung eines Graduiertenstipendiums die finanziellen Voraussetzungen geschaffen, die für die Durchführung der Dissertation notwendig waren. Durch die Mitgliedschaft im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ habe ich viele zusätzliche Einblicke in verschiedene wissenschaftliche Arbeitsgebiete und Anregungen für die Durchführung meiner Dissertation erhalten.

Ivonne Stamm möchte ich danken für ihre Freundschaft und die ausführliche Einführung in zellbiologische Arbeitsmethoden sowie ihre ständige Bereitschaft, Ergebnisse zu diskutieren und zu hinterfragen.

Mein Dank gilt auch Gabriele Köpf für ihre versierte Einführung in molekularbiologische Arbeitsmethoden. Ihr Engagement endete nicht einmal im Schlaf. Ihre fachliche Kompetenz im Traum- wie auch im Wachzustand hatte großen Anteil am Gelingen dieser Doktorarbeit.

Mit Kai-Uwe Radomski und Axel Neubauer habe ich viele Mittagspausen und Abende die wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Unbillen des Lebens diskutiert. Vielen Dank für die immer vorhandene Unterstützung in allen Lebensbereichen. Ich vermisse unsere „Arbeitsessen“ genauso wie die gemeinsamen Streifzüge durch Gießen.

Für die menschliche und graphische Begleitung beim Umschiffen der Klippen der letzten Jahre danke ich Bernd Heilenz ganz herzlich.

Tobias Eisenberg hat mir oft den Arbeitsalltag „versüßt“, mich bei Bedarf zerstreut und die große Arbeitsbelastung des Graduiertenkollegs gemeinsam mit mir getragen, vielen Dank für Freundschaft und Kollegialität.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, insbesondere meinen Mitdoktoranden und den Mitarbeitern der Zellkultur, die bisher noch nicht erwähnt wurden, möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die immer vorhandene Unterstützung auf allen Gebieten danken.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern für die ungebrochene Unterstützung und Geduld bedanken, auch wenn sie wohl manchmal befürchtet haben, ich würde niemals einen Abschluss finden. Wissenschaft ist eben eine Frage des Standpunktes (Thomas Alva Edison: „I have not failed. I`ve just found 10 000 ways that won`t work.“).

“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.“