

**Vergleichende Untersuchungen zur Wirtsadaption des
Escherichia coli O104:H4 Ausbruchsstammes des Jahres 2011
mit Zellen von Mensch und Rind**

Sarah Annette Stalb

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2017

© 2017 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-380-0

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

Justus-Liebig-Universität Gießen

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

**Vergleichende Untersuchung zur Wirtsadaption des *Escherichia coli* O104:H4
Ausbruchsstammes des Jahres 2011 mit Zellen von Mensch und Rind**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

im Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sarah Annette Stalb

Tierärztin aus Eckernförde

Gießen 2017

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

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Menge

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Doll

Tag der Disputation: 06.06.2017

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Vortrag:

Stalb S. Interaction of *E. coli* O104:H4 German outbreak strain with intestinal epithelial cells from different hosts. *E. coli* and the Mucosal Immune System (ECMIS), 10.-13.07.2015, Ghent, Belgien.

Poster-Präsentationen:

Stalb S, Schmidt N, Hamm K, Barth S, Blohm U, Liebler-Tenorio E, Teifke JP, Lange E, Tauscher K, Geue L, Menge C. Bovine immune response to *E. coli* O104:H4 German outbreak strain. 9th International Symposium and Workshop on Shigatoxin (verocytotoxin) - producing *Escherichia coli* infections, 13.-16.09.2015, Boston, U.S.A.

Stalb S, Barth S, Sobotta K, Geue L, Menge C. Pro-inflammatory capacity of *E. coli* O104:H4 German outbreak strain during colonization of intestinal epithelial cells from human and cattle. 9th International Symposium and Workshop on Shigatoxin (verocytotoxin) - producing *Escherichia coli* infections, 13.-16.09.2015, Boston, U.S.A.

Stalb S, Schmidt N, Hamm K, Barth S, Blohm U, Liebler-Tenorio E, Teifke JP, Lange E, Tauscher K, Geue L, Menge C. Bovine immune response to *E. coli* O104:H4 German outbreak strain. 5th European Veterinary Immunology Workshop, European Veterinary Immunology Group (EVIG), 02.-04.09.2015, Wien, Österreich.

Stalb S, Barth S, Geue L, Menge C. *In vitro*-comparison of the interaction of the German *E. coli* O104:H4 outbreak stain with bovine and human intestinal epithelial cells. German Symposium on Zoonoses Research and 7th International Conference on Emerging Zoonoses, 16.-17.10.2014, Berlin.

Stalb S, Barth S, Geue L, Menge C. Interaction of *E. coli* O104:H4 German outbreak strain with intestinal epithelial cells from different hosts. VAAV-Jahrestagung & 66. Jahrestagung der DGHM, 05.-08.10.2014, Dresden.

Stalb S, Barth S, Geue L, Menge C. Adhesion and Shiga Toxin Production of *Escherichia coli* O104:H4 in human and bovine intestinal epithelial cell cultures. Nachwuchswissenschaftlersymposium des Friedrich-Loeffler-Instituts, 19.-22.09.2014, Neustadt-Mariensee.

Stalb S, Barth S, Geue L, Menge C. Interaction of the Shiga toxin-producing *E. coli* strain O104:H4 with bovine and human intestinal epithelial cell cultures. Junior Scientist Zoonoses Meeting 2014, 02.-04.06.2014, Hannover.

Stalb S, Barth S, Geue L, Menge C. Adhesion and Shiga toxin production of *Escherichia coli* O104:H4 in human and bovine intestinal epithelial cell cultures, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, 26.-28.05.2014, Freising.

Stalb S, Hamm K, Barth S, Dean-Nystrom EA, Bielaszewska M, Karch H, Menge C. *In vitro*-comparison of pro-inflammatory and immunomodulating activities of *Escherichia coli* O104:H4, the German HUS outbreak strain, in different hosts. Nachwuchswissenschaftler-symposium des Friedrich-Loeffler-Instituts, 21.-24.08.2013, Jena.

Diese Arbeit wurde durch die Europäische Kommission im Rahmen des 7. Forschungsrahmenprogramms (FP7) im Projekt „ANTicipating the Global Onset of Novel Epidemics“ (ANTIGONE, Projekt-Nr. 278976) gefördert.

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	<i>Escherichia coli</i> als intestinale Krankheitserreger	2
2.2	STEC/EHEC.....	2
2.2.1	Definition.....	2
2.2.2	Reservoir in Säugetieren.....	3
2.2.3	Relevante Virulenzfaktoren	3
2.2.4	Erreger-Wirt-Interaktionen bei Infektionen von Mensch und Rind.....	4
2.3	EAEC.....	9
2.3.1	Definition.....	9
2.3.2	Reservoir in Säugetieren.....	9
2.3.3	Relevante Virulenzfaktoren	9
2.3.4	Pathogenese EAEC-bedingter Durchfallerkrankungen.....	10
2.4	HUS-Ausbruch in Deutschland und Europa 2011	11
2.5	Der EHEC/EAEC-Hybridstamm des HUS-Ausbruches 2011.....	12
2.5.1	Definition.....	12
2.5.2	Verwandtschaft und Vorfahren.....	12
2.5.3	Relevante Virulenzfaktoren	12
2.5.4	Phänotypische Eigenschaften	13
2.5.5	EHEC der Serogruppe O104 in Mensch und Tier.....	14
2.5.6	Wirtsadaption des Hybridstammes.....	14
2.6	Erreger-Wirt-Interaktionen im Darm	15
2.6.1	Darm als Immunorgan - mukosale Immunbarriere und Homöostase.....	15
2.6.2	Intestinale Entzündung – „steady state“ und Pathologie.....	16
2.7	Zielsetzung dieser Arbeit	17
2.7.1	Arbeitshypothese	17
2.7.2	Arbeitsansatz.....	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Bakterienstämme.....	18
3.2	Permanente Zelllinien	18
3.3	<i>Primer</i>	18
3.4	Antikörper und Konjugate	23
3.5	Bakteriologische Methoden.....	25
3.5.1	Anzucht der Bakterien.....	25
3.5.2	Keimzahlbestimmung.....	25

3.5.3	Inaktivierung von Probenmaterial.....	25
3.5.4	Negativkontrastpräparation zur Dartstellung im Transmissionselektronenmikroskop	26
3.5.5	Herstellung von <i>E. coli</i> -Ganzzelllysaten (GZL).....	27
3.5.6	Sterilfiltration von Probenmaterial	27
3.5.7	Sterilitätskontrolle.....	27
3.6	Zellkulturmethoden	27
3.6.1	Basistechniken für Epithelzellkulturen	27
3.6.2	Zellzahlbestimmung	28
3.6.3	Kultivierung und Vorbereitung der Epithelzellen für die Infektionsversuche.....	28
3.6.4	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER).....	31
3.6.5	Gewinnung primärer, boviner Kolonkryptenepithelzellen.....	31
3.6.6	Gewinnung und Kultivierung primärer, boviner Makrophagen	32
3.6.7	Gewinnung boviner, mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC).....	34
3.6.8	Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT).....	35
3.6.9	LDH-Zytotoxizitäts-Assay.....	35
3.7	Infektionsversuche im Zellkulturmodell	36
3.7.1	Infektion intestinaler Epithelzellen	36
3.7.2	Gewinnung konditionierter Überstände	36
3.7.3	Adhäsionsversuch.....	36
3.7.4	Herstellung zellfreier Stx-Überstände zur Bestimmung der relativen Stx- Freisetzung.....	38
3.7.5	Gentamicin-Protektions-Test.....	38
3.7.6	Messung des transepithelialen Widerstands bei Infektion der CaCo-2-Zellen ..	39
3.7.7	Probengewinnung für die Transmissionselektronenmikroskopie	40
3.7.8	Probengewinnung für die Analyse im Western Blot.....	40
3.8	Immunologische Methoden	41
3.8.1	Immunfärbung zum Nachweis von Zytokeratin und Vimentin	41
3.8.2	CD77/Gb ₃ -Nachweis	41
3.8.3	Western Blot-Analyse zur Markierung von Zytoskelettausstattung	42
3.8.4	Durchflusszytometrische Untersuchung	43
3.8.5	ELISA	43
3.9	Molekulargenetische Methoden	43
3.9.1	Präparation von RNS	43
3.9.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
3.10	Tierexperimentelle Studie	47
3.10.1	Versuchsaufbau.....	47

3.10.2	Probengewinnung	47
3.11	Statistische Auswertung.....	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Charakterisierung der Zellsysteme und <i>E. coli</i> -Stämme.....	49
4.1.1	Epithelzellmodelle	49
4.1.2	Charakterisierung der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	58
4.2	Interaktion des Hybridstammes mit wirtsspezifischen Epithelzellen <i>in vitro</i>	62
4.2.1	Adhäsion.....	62
4.2.2	Invasion (Gentamicin-Protektions-Test)	70
4.2.3	Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Interaktion von <i>E. coli</i> mit IEC.....	72
4.2.4	Modulation der Wirtszellantwort (qRT-PCR).....	81
4.2.5	Zellvitalität.....	97
4.2.6	Beeinflussung der Epithelintegrität polarisierter CaCo-2-Zellmonolayer	102
4.2.7	Expression von <i>E. coli</i> -Virulenzfaktoren	103
4.3	Indirekte Interaktion des Hybridstammes mit bovinen Makrophagen.....	110
4.4	Einfluss einer experimentellen Infektion mit dem Hybridstamm auf das Immunsystem des Rindes.....	114
5	Diskussion.....	118
5.1	Testsysteme zur Untersuchung der Wirtsadaption des Hybridstammes.....	118
5.2	Interaktion der <i>E. coli</i> mit den Wirtszellen	124
5.3	Reaktion der intestinalen Wirtszellen	130
5.4	Modulation der angeborenen Immunität im Rind.....	136
5.5	Modulation der erworbenen Immunität im Rind.....	138
5.6	Fazit.....	139
6	Zusammenfassung.....	140
7	Summary.....	142
8	Literaturverzeichnis	144
9	Anhang.....	160
9.1	Ergebnisse der statistischen Berechnungen	160
9.2	Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	175
9.2.1	Verwendete Geräte	175
9.2.2	Verwendete Chemikalien	177
9.2.3	Verwendetes Verbrauchsmaterial	181
9.3	Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	183
9.3.1	Puffer und Medien für bakteriologische Methoden	183
9.3.2	Puffer und Medien für Zellkulturmethoden.....	184

9.3.3	Puffer und Lösungen für Infektionsversuche im Zellkulturmodell.....	188
9.3.4	Puffer und Lösungen für immunologische Methoden	189
9.3.5	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	191
9.4	Abbildungsverzeichnis	191
9.5	Tabellenverzeichnis	193
10	Danksagung	195
11	Selbstständigkeitserklärung.....	197

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
µg	Mikrogramm	ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
µl	Mikroliter	EDTA	Ethylendiaminotetra- essigsäure
µm	Mikrometer	EGF	<i>epidermal growth factor</i>
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>	EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
A/E	<i>attaching/effacing</i>	<i>ehxA</i>	Enterohämolysin
AA	aggregative Adhäsion	EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
AAF	Aggregative-Adhäsions- fimbrien	ELISA	<i>enzyme linked immuno- sorbent assay</i>
<i>aaf</i>	<i>aggregative adherence fimbriae</i>	EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
Abb.	Abbildung	ESBL	Extended-Spektrum Beta- Laktamase
Ak	Antikörper	<i>esp</i>	<i>Escherichia coli</i> secreted <i>protein</i>
AP	alkalische Phosphatase	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
BAP	Blutagarplatte	EVOM	<i>epithelial voltohmmeter</i>
<i>bfp</i>	<i>bundle-forming pili</i>	F12	Ham's F12 Nutrient Mixture
Bp	Basenpaare	Fa.	Firma
BSA	bovines Serumalbumin	FACS	Durchflusszytometer, <i>fluorescence activated cell sorter</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>	<i>f.c.</i>	<i>final concentration</i>
CCLV	<i>Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine</i>	FITC	Fluorescein-Iso-Thiozyanat- Phalloidin
CD	<i>cluster of differentiation</i>	FKS	fötales Kälberserum
CD ₅₀	zytotoxische Dosis 50 %	FSC/SSC	<i>forwardscatter/sidescatter</i>
cDNS	komplementäre, einzelsträngige DNS	g	Gramm
cm ²	Quadratzentimeter	<i>g</i>	Erdbeschleunigung
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>	Gb ₃	Globotriaosylzeraamid
d	Tag	GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Da	Dalton	GRO-α	<i>growth related gene product, growth-regulated alpha protein, CXCL1</i>
DEPC-H ₂ O	Diethyl-Pyrocbonat- behandeltes Wasser	h	Stunde
DMEM	Dulbecco's Modified Eagels Medium	HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	HC	hämorrhagische Kolitis
DNS	Desoxyribonukleinsäure	HEp-2	humanes Larynxkarzinom- Epithel
dNTP	<i>desoxyribonucleotide triphosphate</i>		
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
<i>eae</i>	Intimin		

HF	Holstein Friesian	nd	<i>not determined</i> , nicht bestimmt
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom	NEAS	nicht-essenzielle Aminosäuren
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule</i>	NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i> , Transkriptionsfaktor
IE	internationale Einheit	nm	Nanometer
IEC	intestinale Epithelzellen	nM	Nanomolar
IEL	intraepitheliale Lymphozyten	OD	optische Dichte
IFN-γ	Interferon γ (gamma)	OmpC	<i>outer membrane protein C</i>
Ig	Immunglobulin	PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
IL	Interleukin	PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
IL-8	Interleukin-8, CXCL8	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
IP	intermediäre Proteinfilamente	PE	R-Phycoerythrin
K	kilo (x10 ³)	PFA	Paraformaldehyd
KbE	Kolonie-bildende Einheiten	PI	Propidiumiodid
KDa	Kilodalton	<i>p.i</i>	<i>post inoculationem</i>
L	Liter	PMB	Polymyxin B-Sulfat
LB	<i>lysogeny broth</i> , Luria-Bertani-Bouillon	PMN	<i>polymorphonuclear cells</i>
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>	pmol	Pikomol
LPS	Lipopolysaccharid	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
mAK	monoklonaler Antikörper	PWS	Phosphorwolframsäure
MAPK	<i>mitogen-activating protein kinase P38</i>	RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, CCL5</i>
max	maximal	RG	Reaktionsgefäß
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1, CCL2</i>	RNS	Ribonukleinsäure
MDM	<i>monocyte derived macrophages</i>	rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
MEM	Minimum Essential Medium	RT	Raumtemperatur
mg	Milligramm	RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
min	Minuten	SDS	Natriumdodecylsulfat
mind.	mindestens	sek	Sekunde(n)
ml	Milliliter	SEM	<i>standard error of the mean</i>
mm	Millimeter	STEC	Shigatoxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	Stx	Shigatoxin
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure	T3SS	Typ III Sekretionssystem
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Tab.	Tabelle
MΦ	Makrophage	TCR	T-Zell Rezeptor
n	Anzahl	TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i>
VI			

TEMED	Tetramethylethylendiamin	Tween20	Polyoxyethylen-(20) - Sorbitanmonolaurat
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>		
T _H	T-Helfer Zelle	U	Unit, Einheit
T _{reg}	regulatorische T-Zelle	U/min	Umdrehungen pro Minute
Tir	translozierter Intimin-Rezeptor	V	Volt, Einheit der elektrischen Spannung
TLR	<i>toll-like receptor</i>		
TNF- α	Tumornekrosefaktor α	v. a.	vor allem
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	VTEC	Verotoxin-bildende <i>E. coli</i>
TTP	thrombotisch thrombozytopenische Purpura	Z/ml	Zellen je Milliliter
		ZK	Zellkontrolle
		ZO	<i>zonula occludens</i>

Weitere Abkürzungen werden im Text erläutert.

1 Einleitung

Anfang Mai 2011 kam es zu dem größten durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) verursachten Gastroenteritis-Ausbruch Deutschlands und dem weltweit größten Ausbruch von Erkrankungsfällen des hämolytisch-urämisches Syndroms (HUS) [1]. HUS kann die schwere Folge einer humanen EHEC-Infektion sein, einhergehend mit Nierenstörungen, neurologischen Symptomen und vereinzelt Todesfällen [2].

Als infektiöses Agens wurde ein EHEC-Stamm des seltenen Serotyps O104:H4 identifiziert, der Virulenzfaktoren von zwei verschiedenen *E. coli*-Pathotypen vereint: das Shigatoxin (Stx) Typ 2 von Stx-produzierenden *E. coli* (STEC) und Charakteristika enteroaggregativer *E. coli* (EAEC), wie aggregative Adhäsionsfimbrien (AAF), die Fähigkeit zur Biofilmbildung und zur Synthese verschiedener Zytotoxine. Stx vermittelt im Rind die Fähigkeit der STEC zur persistenten Kolonisation, während es im Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen kann [3, 4]. Der Infektionsverlauf im jeweiligen Wirt ist folglich abhängig von spezifischen molekularen Pathogen-Wirt Interaktionen [4]. Das primäre Reservoir humanpathogener STEC sind Rinder [5], während EAEC hauptsächlich in der humanen Population zirkulieren [6]. Das natürliche Reservoir des Hybridstammes, der den Ausbruch 2011 verursachte, ist unbekannt. Es wird vermutet, dass er eher an den Menschen als an das Rind adaptiert ist [7]. Eine Adaption setzt dabei die Möglichkeit zur Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen den Virulenzfaktoren des Pathogens und der Immunantwort des natürlichen Wirts voraus [3].

Das Ziel dieser Arbeit war die relative Wirtsadaption des Hybridstammes an Mensch und Rind zu klären und die Fähigkeit des Hybridstammes zur möglichen, dauerhaften Persistenz im bovinen Reservoir abzuschätzen. Dazu wurde *in-vitro* die lokale Interaktion des Hybridstammes mit intestinalen Epithelzellen von Mensch und Rind untersucht. Hierfür wurden das Adhäsionsvermögen und die Regulation der Virulenzfaktoren bei Wirtszellkontakt verschiedener *E. coli*-Pathovaren im Vergleich zum Hybridstamm untersucht. Zudem wurde das proinflammatorische und immunmodulatorische Potential des Hybridstammes bei Interaktion mit den Darmepithelzellen von Mensch und Rind bewertet. Das Reaktionsprofil des Hybridstammes bei Interaktion mit den Epithelzellen wurde mit den Profilen von jeweils bovin und human assoziierten *E. coli*-Stämmen verglichen. Außerdem wurde das immunmodulatorische Potential des Hybridstammes im Rind untersucht. Dazu wurde einerseits die Fähigkeit des Hybridstammes zur Aktivierung der angeborenen Immunität *in-vitro* durch indirekte Stimulation von Makrophagen bestimmt. Andererseits wurde *ex-vivo*, im Rahmen einer Infektionsstudie mit Kälbern, die relative Fähigkeit des Hybridstammes zur Hemmung der erworbenen Immunität im Rind untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 *Escherichia coli* als intestinale Krankheitserreger

Menschen und viele Säugetiere tragen *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien als Teil der residenten Darmflora, als unschädliche oder fakultativ pathogene Mikroorganismen im Mukus des Kolons [8, 9]. Dennoch gibt es einige *E. coli*-Typen, die gastrointestinale Erkrankungen verursachen. Diese intestinalen *E. coli*-Pathotypen werden in sechs Gruppen unterteilt: enterotoxische (ETEC), enteropathogene (EPEC), Shigatoxin-produzierende (STEC), enteroinvasive (EIEC), diffus adhärente (DAEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAEC) [6, 8, 9].

Die *E. coli*-Pathotypen weisen unterschiedliche klinische, epidemiologische, genetische und phänotypische Profile auf [9]. Die generelle Infektionsstrategie der intestinalen Pathotypen umfasst (i) die mukosale Kolonisation, (ii) die Evasion der Wirtsabwehr, (iii) die Multiplikation und (iv) die Schädigung des Wirts [8], dabei weist jeder Pathotyp einzigartige Fähigkeiten bei der Interaktion mit den eukaryotischen Wirtszellen auf [9].

Pathogene *E. coli* besitzen Virulenzfaktoren, die häufig in mobilen genetischen Elementen (Transposon, Plasmid, Bakteriophage, Pathogenitätsinsel) kodiert sind und zwischen *E. coli*-Stämmen und anderen Mitgliedern der Familie der Enterobacteriaceae austauschbar sind [9]. Neue Kombinationen aus Virulenzfaktoren oder genetischen Elementen können stets im bakteriellen Genom verankert werden [9]. Der hochgradig virulente Ausbruchstamm von 2011 kombiniert Virulenzeigenschaften von EAEC und einer Untergruppe der STEC, den sogenannten enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), und stellt einen neuen *E. coli*-Pathotypen dar [10, 11].

2.2 STEC/EHEC

2.2.1 Definition

Als STEC, auch Verotoxin-produzierende *E. coli* genannt, werden alle *E. coli*-Stämme bezeichnet, die Shigatoxin (Stx) produzieren [9]. EHEC sind eine Untergruppe der STEC, die das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) im Menschen hervorrufen und zu einem überwiegenden Anteil die LEE (*locus of enterocyte effacement*)-Pathogenitätsinsel enthalten [9].

STEC sind weltweit bedeutende Erreger zoonotischer Erkrankungen. Die Pathogenität von zoonotischen Erregern ist meist auf den Menschen begrenzt, während Tiere als Reservoir fungieren und keine oder nur selten klinische Symptome entwickeln [3, 4]. Bei Menschen können STEC asymptomatische Infektionen und milde Diarrhö verursachen, EHEC-Stämme

können aber auch lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen, wie die hämorrhagische Kolitis (HC) [12, 13] oder HUS [2]. Menschen infizieren sich meist alimentär durch den Verzehr von mit STEC kontaminierten Nahrungsmitteln (*foodborne pathogen*) oder fäkal-oral durch direkten Kontakt mit infizierten Menschen oder Tieren [14, 15]. Dabei sind für einige EHEC-Stämme (z.B. des Serotyps O157:H7) extrem niedrige Infektiosdosen (10-100 KbE) nachgewiesen [16].

2.2.2 Reservoir in Säugetieren

Das Hauptreservoir von STEC und wichtigste Infektionsquelle für den Menschen stellen Wiederkäuer [17-19], insbesondere Rinder [2, 5, 12, 20], dar. Adulte Rinder sind häufig asymptomatische STEC-Träger [3, 14], können aber jahrelang und intermittierend STEC ausscheiden [21-23]. Nur vereinzelt ist das Auftreten von STEC in jungen Kälbern mit Diarrhö assoziiert [24]. Dabei beruht die Pathogenität auf der Fähigkeit, mukosale „*attaching and effacing*“ (A/E)-Läsionen zu induzieren, und ist unabhängig vom Stx [25-28].

Das bovine STEC-Reservoir ist gekennzeichnet durch eine hohe Diversität der Stämme mit mehr als 400 Serotypen (O:H) [2, 29, 30]. Die Mehrheit der hier nachweisbaren STEC-Stämme besitzt keine LEE-Pathogenitätsinsel [9]. Der wichtigste EHEC-Serotyp weltweit ist O157:H7 [31-33], dessen Fähigkeit, menschliche Erkrankungen zu induzieren, Tiere zu kolonisieren und in der Umgebung zu überleben, stark variieren kann [34]. STEC der O-Gruppe O157:H7/H- werden auch sporadisch in Rindern detektiert [22].

2.2.3 Relevante Virulenzfaktoren

Der Haupt-Virulenzfaktor von STEC ist das namensgebende, potente Shigatoxin (Stx), ein Bakteriophagen-kodiertes AB₅-Toxin [34-36]. Die pentamere B („*binding*“)-Untereinheit [37] vermittelt die Aufnahme in die Zielzelle und die enzymatisch aktive A-Untereinheit inhibiert die Proteinbiosynthese [38]. Dabei bindet Stx an Membran-Glykolipide, sogenannte Globotriaosylceramide (Gb₃ syn. CD77) [37], und kann in Gb₃-exprimierende Zielzellen eindringen [14, 34, 36, 39]. Stx wird in 2 Typen (Stx1 und Stx2) und etliche Subtypen (Stx1a, -c, -d, -e und Stx2a bis Stx2g) [40] eingeteilt, die unterschiedlichen Organ- und Gewebstropismus aufweisen [41, 42]. Stx2 zeigt eine höhere Affinität zu Nierenepithelien [43] und wird epidemiologisch mit einem höheren Risiko für die Entwicklung von HUS assoziiert [44].

Weitere virulenzassoziierte Gene sind häufig Bestandteil von Pathogenitätsinseln (PAI), das sind DNS-Abschnitte von meist unter 10 kb Länge, die Virulenzgene beinhalten [45]. Der häufig bei EHEC auftretende LEE ist eine chromosale PAI, die für ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) kodiert und unter anderem die Gene *eae* (für den Adhäsionsfaktor Intimin) und *tir* (für den in die Wirtszelle translozierten Intimin-Rezeptor) beinhaltet [46-48].

LEE-Produkte vermitteln die Adhäsion von STEC im Kolon unter Ausbildung von A/E-Läsionen in der intestinalen Mukosa vom Wirt. A/E-Läsionen sind gekennzeichnet durch den Verlust der Mikrovilli-Architektur und führen zu Veränderungen im Zytoskelett durch die Akkumulation von polarisiertem Aktin unterhalb der bakteriellen Bindungsstelle und der Bildung einer sockelartigen Struktur (*pedestal-like*). Durch die A/E-Läsionen wird eine proinflammatorische Wirtsantwort induziert [49, 50], wobei insbesondere Intimin die enge Adhäsion an die intestinalen Epithelzellen vermittelt [51] und so eine mukosale, zelluläre T_H1-Immunantwort und intestinale Kryptenhyperplasie stimuliert [52]. Die Mehrzahl humaner EHEC-Erkrankungen wird von LEE-positiven Stämmen verursacht [53, 54].

Auch LEE-(*eae*)-negative Stämme verursachen sporadisch HUS-Ausbrüche [9, 55, 56]. Die Virulenzplasmide von *eae*-negativen STEC sind eng verwandt und weisen eine eigenständige phylogenetische Entwicklung auf [57]. Meist exprimieren *eae*-negative STEC *iha*, ein Eisen-reguliertes, Adhäsion-vermittelndes Protein [58] sowie *pagC* [59] und es sind weitere potentielle Faktoren beschrieben [9, 59]. Neben der Kolonisation intestinaler Epithelzellen ist bei der Pathogenese LEE-negativer EHEC ein Invasionsmechanismus involviert [55], der partiell Flagellin-abhängig ist [60]: *In-vitro* zeigt sich, dass bei der Interaktion mit intestinalen Epithelzellen humanen Ursprungs (u.a. CaCo-2, HTC-8) einige LEE-negative STEC-Isolate intrazellulär in membrangebundenen Vakuolen vorliegen [55, 61].

2.2.4 Erreger-Wirt-Interaktionen bei Infektionen von Mensch und Rind

Ein unterschiedlicher Infektionsverlauf in verschiedenen Wirtsspezies kann der jeweiligen Fähigkeit zur Kolonisation der wirtsspezifischer Epithelzellen [4, 62], einer wirtsspezifischen Rezeptorverteilung [63, 64] und/oder einer unterschiedlichen Expression von bakteriellen Virulenzfaktoren im jeweiligen Wirten geschuldet sein [65]. Stx verursacht im Menschen bei systemischer Absorption lebensbedrohliche Erkrankungen [2, 9], während es im Rind die asymptomatische Persistenz der STEC ermöglicht [34, 66, 67].

Im Menschen – Inflammation und extensive Gewebszerstörung

Im Menschen kolonisieren EHEC den **Dickdarm** [68] und führen dort am stärksten zu Gewebsveränderungen [33]. Stx vermittelt lokale Schäden, induziert Apoptose und die lokale und systemische Freisetzung von chemotaktischen Faktoren, wie IL-8 und Zytokinen [9, 69-71]. Es kommt zur inflammatorischen Wirtsantwort im Darm mit verstärkter Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten [71-73] (**Abbildung 1**). Die starke Entzündung schwächt die Darmbarriere und erleichtert die systemische Absorption von Stx [71, 74]. Die Translokation von Stx aus dem Darmlumen erfolgt generell Gb₃-unabhängig [74]. Dabei überwindet Stx2

die Darmbarriere verstärkt parazellulär mit Schädigung des Epithels [74, 75] und Stx1 wird transzellulär durch intestinale Epithelzellen transportiert [76].

Stx bindet an humane, Gb₃-exprimierende **Endothelzellen**, induziert zytotoxische Effekte und Apoptose [67, 71, 77-79] und führt zur Zerstörung distaler Organe [14]. Der Organotropismus zu den Endothelzellen von Niere, Gehirn, Pankreas und Darm [17, 80] ist durch die Anzahl und Verteilung der Gb₃-exprimierenden Gewebe und Zelltypen zu erklären [67, 71, 79]. Zellen ohne Stx-Rezeptor sind dagegen resistent gegenüber dem toxischen Effekt von Stx [81]. Humane renale **Glomerular- und Tubularepithelzellen** exprimieren Gb₃. HUS entsteht bei Zerstörung der renalen Epithel- und Endothelzellen durch eine Kombination aus direkter Toxizität von Stx und Induktion lokaler Zytokin- und Chemokinproduktion. Das führt zum Verschluss der Mikrogefäße, Thrombozytopenie, mikroangiopathisch-hämolytischer Anämie und resultiert in einer renalen Entzündung mit akutem Nierenversagen [9, 35, 82, 83]. Im Blut von HUS-Patienten zirkulieren verstärkt inflammatorische Mediatoren wie IL-8, IL-6, TNF- α und MCP-1 als Indikatoren für deutliche Entzündungsreaktionen im Wirt [84-86]. Dabei ist TNF- α ein proinflammatorisches Schlüssel-Zytokin, das Inflammation und mikrovaskuläre Koagulation induziert [87, 88].

Die Bindung von Stx an humane **Makrophagen** und Monozyten verstärkt die proinflammatorische Immunantwort im Darm und beeinflusst die Expression und Sekretion von Zyto- (IL-1, TNF- α , IL-6) und Chemokinen (IL-8, MCP-1) [70, 72, 89-91]. Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α führt dabei zur Aktivierung humaner Endothelzellen mit verstärkter Gb₃-Expression und resultiert in einer gesteigerten Empfindlichkeit der Endothelzellen gegenüber Stx [92, 93]. Humane **Granulozyten** weisen, im Gegensatz zu bovinen Granulozyten, Gb₃ auf und spielen eine zentrale Rolle in der humanen EHEC-Pathogenese [71, 79]. Stx verstärkt die Transmigration von Granulozyten [94] und Freisetzung von Superoxid, was zur Schädigung der mukosalen Gewebe beiträgt [95]. In HUS-Patienten verstärkt TNF- α die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und schädigt diese verstärkt durch den Abbau von Fibronectin [96, 97]. Neutrophile Granulozyten transportieren Stx vom Darm zu den Nierengefäßen [98].

Auch humane Lymphozyten adhären verstärkt an Endothelzellen in Gegenwart von Stx, was u.a. durch die endotheliale Expression von MCP-1 und IL-8 vermittelt wird [99-101]. Stx induziert Apoptose in humanen **B-Zellen** (Burkitt *lymphoma cells*), die hochgradig empfänglich gegenüber der Stx-Wirkung durch Expression von Gb₃ auf der Zelloberfläche sind [102, 103]. Dennoch werden bei subklinischer Infektion anti-Stx-Antikörper detektiert [104] und in HUS-Patienten liegen Antikörper gegen Intimin und anderen LEE-kodierte Proteine vor [9]. Humane **T-Lymphozyten** werden nicht durch Stx aktiviert [105].

Im Rind – Immunmodulation und Erreger-Persistenz

Im Rind kolonisieren STEC meist asymptomatisch [106-108]. Dazu modulieren STEC die Immunantwort durch Beschränkung der intestinalen Entzündung und mukosalen Abwehr [3, 17, 64, 109-111], was eine kommensalenartige Lebensweise im Rind ermöglicht [3] (**Abbildung 1**). Im Rind kolonisieren EHEC des Serotyps O157:H7 verstärkt am Übergang von rektalem Zylinderepithel zum squamösen Epithels des Anus, der sogenannten „*recto-anal junction*“ (RAJ) [112]. Die Adhäsion der EHEC an das bovine **Epithel** erfolgt initial durch Flagellen [113], gefolgt von Intimin und Tir. Die bovinen Wirtszellen detektieren die Flagellen der STEC mit Toll-like-Rezeptoren (TLR), insbesondere TLR5. Primäre bovine Kolonkryptenzellen exprimieren *in-vivo* TLR1, TLR3, TLR4 und TLR5 [4]. Die Bindung an TLR5 induziert via MAPK und NF- κ B die Expression von proinflammatorischen und chemotaktischen Mediatoren, wie IL-8, IL-1 β und TNF- α [49, 114, 115]. Um die Aktivierungskaskade innerhalb der Wirtszelle zu unterbrechen und eine frühe Elimination durch den Wirt zu verhindern, sekretieren STEC sogenannte non-LEE-kodierte Effektoren (NleB, NleC, NleE und NleH) [49]. So modulieren die Mikroorganismen über das Gleichgewicht zwischen den pro-inflammatorischen extrazellulären Komponenten, wie z.B. Flagellin, und den anti-inflammatorischen Effektorproteinen (Nle) die bovine Immunantwort [49]. Weiterhin translozieren die STEC über das T3SS weitere LEE-kodierte Effektorproteine, wie den Intimin-Rezeptor Tir, EspA, EspB oder EspD, in die infizierte Wirtszelle [49, 116, 117]. Die Tir- und Intimin-vermittelte enge Adhäsion von STEC induziert eine zelluläre T_H1-Immunantwort mit Zytokinsekretion und Chemotaxis von Immunzellen [49]. Stx1 selbst hat keinen zytotoxischen oder modulatorischen Effekt auf primäre bovine Kolonkryptenzellen [64]. Nach *in-vitro* Stimulation mit LPS oder vitalen *E. coli* exprimieren Kolonkryptenzellen IL-8, GRO- α , MCP-1, RANTES und IL-10 [4].

Im Gegensatz zum Menschen exprimieren bovine **Endothelzellen** *in-vivo* vermutlich kaum Gb₃ [67, 71, 79]. Daher kann Stx nicht an die Blutgefäße binden, wird nicht endozytiert oder zu den distalen Organen transportiert [67, 71, 79]. Bovine **Granulozyten** aus Milch und Blut exprimieren ebenfalls kein Gb₃ und sind resistent gegenüber der Bindung und Aktivierung durch Stx1 [79]. Dennoch infiltrieren Granulozyten die Mukosa des Kolons bei einer STEC-Infektion, jedoch ohne eine intestinale Entzündung in adulten Rindern zu induzieren [118].

Hingegen bindet Stx1 an mukosale **Makrophagen** im Rind, die Gb₃ auf ihrer Oberfläche exprimieren [64]. Durch die Wirkung auf diese Zellen wird die direkte immunsuppressive Wirkung von Stx auf Lymphozyten verstärkt [119]. Stx1 bindet an mukosale Makrophagen, hemmt die Expression von Oberflächenmolekülen (CD14, CD172a) und Aktivierungsmarkern (CD80, CD86) und induziert eine verstärkte Transkription von *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-8* und *GRO- α* , aber nicht von *IL-12*, *TGF- β* , *MCP-1* und *RANTES* [119]. Neben Stx

detektieren bovine *monocyte-derived* Makrophagen (MDM) wahrscheinlich via TLR4 [120] weitere extrazelluläre bakterielle Komponenten wie LPS [49] von STEC O157:H7 [121]. LPS induziert hier einen Phänotyp, der durch Hochregulation von *IL-10*- und niedriger *IL-12*-Transkription gekennzeichnet ist [122]. Dies könnte die Ausbildung einer humoralen, T_H2-lastigen Immunantwort unterstützen [123]. Zudem wird die Transkription von *TNF*- und *IFN-γ*-induzierenden Genen induziert und die Apoptose der Zellen gehemmt [49].

Stx inhibiert *in-vivo* die Ausbildung einer zellvermittelten antigenspezifischen Immunität im Rind. Stx vermittelt so die Fähigkeit von STEC, die intestinale Mukosa im Rind transient und asymptomatisch zu kolonisieren [17, 66, 79, 109]. Im Gegensatz zu humanen **Lymphozyten** tragen bovine B- und T-Zell-Subpopulationen funktionelle Stx-Rezeptoren (Gb₃/CD77) [66]. *In-vitro* bindet Stx1 an periphere [111, 124] und intraepitheliale Lymphozyten [17, 109] und hemmt deren Funktion. Dabei inhibiert Stx1 insbesondere die Proliferation Gb₃/CD77⁺ positiver Subpopulationen wie CD8α⁺ T- und B-Zellen [66, 125] in einer frühen Aktivierungsphase, ohne Zelltod zu induzieren [109, 110]. In dieser frühen Aktivierungsphase exprimieren bovine Lymphozyten eine Isoform von Gb₃/CD77, die eine gesteigerte Affinität zu Stx besitzt [66]. Stx1 beeinflusst auch die Zytokingenexpression bei intraepithelialen Lymphozyten, die vermutlich das primäre Ziel von Stx1 im bovinen Darm darstellen [109]. Stx1 induziert eine bis zu 40-fache Hochregulation der Transkription von *IL-4*, wenn auch *IL-2*, *IL-10*, *IFN-γ*, *TGF-β*, *IL-8* und *MCP-1* nicht beeinflusst werden [17]. *In-vivo* tritt bei der Infektion von Kälbern mit einem Stx-bildenden *E. coli* O157:H7-Stamm eine Verzögerung der Ausbildung einer zellulären antigenspezifischen Immunität auf [126].

Die humorale Immunität scheint im Rind nicht protektiv zu sein, da Antikörper gegenüber Stx1, Stx2, LPS_{O157}, OmpC und H7-Flagellin nicht die EHEC-Kolonisation verhindern [127]. Zirkulierende IgG und IgA gegen LPS und H7-Flagellin reduzieren allerdings die fäkale Ausscheidung [49, 126, 127].

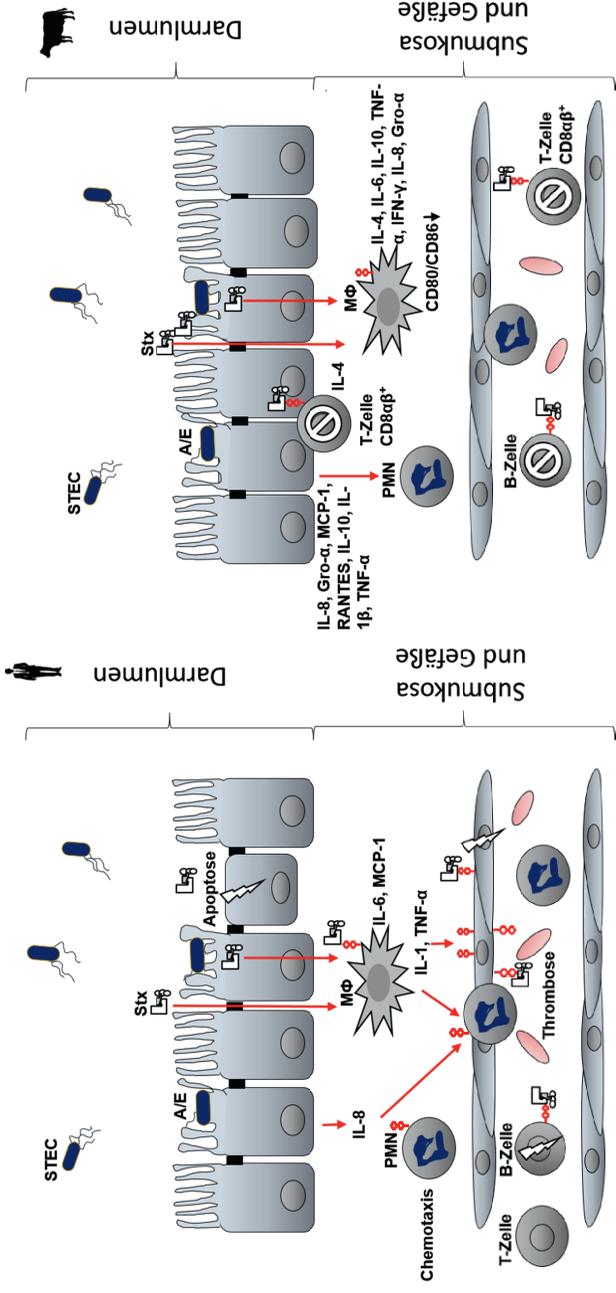


Abbildung 1: links: Pathogenese der humanen EHEC-Infektion, modifiziert nach O'Loughlin und Robbins-Browne (2001) [128];

rechts: Erreger-Wirt-Interaktionen bei der bovinen EHEC-Infektion, modifiziert nach Menge *et al.* 1999 [111], 2001 [125], 2004 a,b [109, 110], 2006 [79], 2015 [119], Stamm *et al.* 2002 [66], Moussey *et al.* 2006 [17] und Kerner *et al.* 2015 [129] („rote Acht“ = G_{b3}-Rezeptor; „Blitz“ = Induktion von Apoptose; „Parkenverboten-Schild“ = Hemmung der Proliferation)

2.3 EAEC

2.3.1 Definition

Als enteroaggregative *E. coli* (EAEC) werden avirulente bis hochgradig virulente *E. coli*-Stämme bezeichnet [9], die kein hitzestabiles (ST) oder -labiles (LT) Enterotoxin der ETEC bilden, aber eine charakteristische aggregative Adhäsion (AA) auf HEp-2 Zellen, die sogenannte „*stack-brick*“ Konfiguration zeigen [8, 130]. EAEC-Stämme werden abhängig vom Vorhandensein von *aggR* (siehe unten, Kapitel 2.3.3) in typische und atypische EAEC-Stämme eingeteilt [131].

2.3.2 Reservoir in Säugetieren

EAEC sind weltweit wichtige Auslöser von Diarrhö beim Menschen [132-139] und werden seit 2002 in den USA als Organismus mit bioterroristischem Potenzial angesehen [140].

EAEC sind weit verbreitet in der menschlichen Population und der Mensch gilt als natürliches Reservoir [6-8, 134, 140-143]. Bei Tieren werden EAEC dagegen nur vereinzelt gefunden, daher gelten Tiere nicht als Reservoir [131, 144-146]. In Proben von britischen Nutztieren und deutschen Schlachtrindern wurden keine EAEC detektiert [143, 145]. Dagegen waren atypische EAEC-Stämme ohne *aggR* im Kot von Kälbern, Ferkeln und Pferden auffindbar [131]. Diese atypischen EAEC wiesen meist andere Serotypen auf als typische humane Isolate. Weiterhin sind Lebensmittel-assoziierte EAEC-Ausbrüche bekannt [6] und EAEC konnten aus Lebensmitteln isoliert werden, insbesondere aus Gemüse [147]. Dennoch sind infizierte Menschen mit schlechter Hygiene die Hauptinfektionsquelle für EAEC-Erkrankungen [148].

Neben subklinischen Infektionen mit intestinaler Kolonisation können EAEC zu wässriger Diarrhö, gelegentlich auch mit Beimengung von Blut und Mukus führen [6, 149]. Eine EAEC-Infektion induziert eine starke Inflammation, gekennzeichnet durch die fäkale Ausscheidung von Laktoferrin und proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-8 [150, 151] und IL-1 β [152]. Auch bei asymptomatischen Trägern können histologisch Anzeichen einer milden Enteritis nachgewiesen werden [150].

2.3.3 Relevante Virulenzfaktoren

EAEC weisen eine heterogene Ausstattung mit Virulenzfaktoren auf, wobei bestimmte virulenzassoziierte Kombinationen aus chromosomalen Inseln und Virulenzplasmiden verbreitet sind [6]. Der namensgebende AA-Phänotyp der EAEC-Stämme ist auf dem EAEC-spezifischen **Virulenzplasmid pAA** (55-65 MDa) kodiert [8, 130]. Dieses Plasmid enthält zudem Gene für viele weitere virulenzassoziierte Faktoren, einschließlich dem zentralen

Transkriptionsregulator AggR (*aggR*), den Enterotoxinen Pet (*pet*) und EAST1 (*astA*) sowie den aggregativen Adhäsionsfimbrien (AAF), dem Adhäsin Dispersin (*aap*) und den Dispersin-Transporter Aat (*aat*) [6, 153-156].

Die **fimbriellen AAF-Adhäsine** sind essentiell für den AA-Phänotyp [132, 157-159] und befähigen EAEC zur Adhäsion an die Mukosa von Jejunum, Ileum und Kolon [160]. AAF induzieren die Bildung proinflammatorischer Zytokine in Dünn- und Dickdarm [161], öffnen epitheliale *tight junctions* in Epithelzellmodellen [161, 162] und sind an der Biofilmbildung beteiligt [9, 132, 157-159]. Jedes EAEC-Isolat besitzt nur die Gene für einen AAF-Subtyp, von denen bisher 5 morphologisch und genetisch distinkte AAF-Varianten bekannt sind (AAF/I-AAF/V) [6, 132, 157, 158, 163]. **AggR** reguliert die Expression vieler chromosomal und plasmidkodierter Virulenzassoziierten Gene von „typischen“ EAEC wie AAF und Dispersin [6, 153, 164, 165]. Das **Dispersin**, auch Antiaggregationsprotein (*aap*) genannt, gewährleistet ladungsabhängig die ordnungsgemäße Ausdehnung der AAF [6, 166].

Ein weiterer Bestandteil der EAEC-Pathogenese ist die Biofilmbildung, mit entscheidender Beteiligung der AAF und weiteren nicht identifizierter Faktoren, die ebenfalls durch AggR reguliert werden [6, 153, 167]. EAEC-Stämme produzieren mehrere Serinprotease-Autotransporter von Enterobacteriaceae (SPATEs), die an der mukosalen Schädigung und Kolonisation beteiligt sind [9, 168]. Zum Beispiel induziert die Serinprotease **Pic** (*protein involved in intestinal colonization*) eine Hypersekretion von Mukus, eine Erhöhung der Anzahl von Becherzellen und weist muzinolytische Aktivität auf. Die dicke Mukusschicht dient den EAEC somit als Nährstoffquelle, verschafft einen Wachstumsvorteil gegenüber der übrigen intestinalen Mikroflora [169] und trägt zur Protektion vor der Wirtsabwehr und Antibiotika bei [170].

Die von EAEC zudem sezernierten Entero- und Zytotoxine (**Pet**, **EAST-1**, **ShET1**) rufen eine inflammatorische Wirtsantwort hervor und tragen zur mukosalen Zytotoxizität bei [6, 8]. *In-vitro* ist die Gewebsschädigung gekennzeichnet durch Kryptendilatation, Verlust der Mikrovilli, „*ballooning*“ des apikalen Zytoplasmas und Vakuolisierung [6].

2.3.4 Pathogenese EAEC-bedingter Durchfallerkrankungen

Die EAEC-Pathogenese umfasst (i) die starke Adhäsion an Epithelzellen im terminalen Ileum und im Kolon, gefolgt von (ii) Biofilmbildung [6, 160, 171], (iii) Sekretion von Entero- und Zytotoxinen und (vi) der Induktion mukosaler Inflammation mit verstärkter Mukussektretion und mukosaler Zytotoxizität [6, 9, 172]. Bei der EAEC-Infektion ist der **direkte Epithelkontakt** von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der angeborenen Wirtsabwehr [173]. EAEC induzieren durch die AAF-Fimbrien eine starke proinflammatorische Wirtszellantwort [174], die (wie auch bei EHEC-Stämmen) durch die Bindung der Flagellen

(Flagellin FliC) an den TLR5-Rezeptor der Epithelzellen vermittelt wird [161]. Die Bindung an TLR5 induziert via MAPK und NF- κ B die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und resultiert u.a. in der Sekretion von IL-8, TNF- α , IL-1 β und IL-6 [149, 174, 175]. Die Hochregulation von *IL-8* ist ein Leitsymptom der humanen EAEC-Infektionen *in-vivo* [176] und *in-vitro* in CaCo-2-, T84- und HCT-8-Zellen [114, 150, 161, 177]. IL-8 ist ein potentes proinflammatorisches Chemokin, es ist verantwortlich für die Rekrutierung und Transmigration von neutrophilen Granulozyten [149] sowie von dendritischen Zellen [175]. Das Zusammenspiel der NF- κ B regulierten Zytokine von Epithel- und Immunzellen [178] resultiert in einer starken entzündlichen Reaktion bei EAEC-Infektionen, die eine Infiltration mit Leukozyten begünstigt [174]. Die mukosale Immunität bei EAEC-Infektionen, einschließlich der Rolle von T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen, ist jedoch noch nicht vollständig verstanden [174]. Experimentelle Infektionen von Mäusen mit EAEC zeigen, dass eine frühe, starke inflammatorische Immunantwort zu einer schnelleren Klärung der EAEC-Infektion führt [174].

2.4 HUS-Ausbruch in Deutschland und Europa 2011

Von Mai bis Juli 2011 kam es zu dem bisher größten EHEC-Ausbruch in Deutschland und dem weltweit größten Ausbruch mit HUS-Erkrankungsfällen [11, 179]. An diesem Ausbruch außergewöhnlich war die hohe Inzidenz von HC- und die hohe Anzahl von HUS-Fällen (22 %) [1, 144], einhergehend mit schweren neurologischen Symptomen (Enzephalopathie und epileptische Krampfanfälle) [54]. Weiterhin trat eine atypische Alters- und Geschlechtsverteilung auf und eine abweichende Inkubationsdauer im Vergleich zu herkömmlichen EHEC-Infektionen [18]. Insgesamt erkrankten 3.793 Menschen an der Infektionskrankheit, mit 966 Fällen akuter Gastroenteritis (davon 18 Tote; 0,6 %) und 827 Patienten mit HUS (davon 36 Tote; 4,2 %) [1, 180]. Die Mehrzahl der HUS-Patienten waren Erwachsene (88 %, mittleres Alter 42 Jahre), wobei Frauen überrepräsentiert waren (68 %) [1]. Die Inkubationszeit von der Infektion bis zu Beginn der Durchfall-Symptomatik lag bei 8 ± 2 Tagen und war somit verlängert im Vergleich zu Infektionen mit EHEC-Stämmen des Serotyps O157 (3-4 Tage). Die Latenz zwischen dem Beginn gastrointestinaler Symptome und dem Beginn des HUS betrug während des Ausbruches nur 5 ± 2 Tage und war damit verkürzt im Gegensatz zu Infektionen mit einem EHEC-Stamm des Serotyps O157 (7 Tage) [179]. Die außergewöhnliche Virulenz der Ausbruch-assoziierten Serogruppe O104 von 2011 [31] ist vergleichbar mit der Virulenz der Serogruppe O157, u.a. durch eine vergleichbare Letalität von 3,4 % [31]. Durch epidemiologische Studien, systematische Lebensmittelrückverfolgung und mikrobiologische Untersuchungen wurde importierter Bockshornkleesamen aus Ägypten als Infektionsquelle identifiziert [1, 181-183].

2.5 Der EHEC/EAEC-Hybridstamm des HUS-Ausbruches 2011

2.5.1 Definition

Bei dem Ausbruchstamm handelt es sich um einen enteroaggregativen, Stx2 (Subtyp Stx2a)-produzierenden *E. coli* des seltenen Serotyps O104:H4 [1, 11, 54, 184]. Dieser hochgradig virulente Hybridstamm kombiniert damit Virulenzfaktoren und phänotypische Charakteristika von EAEC und STEC [54].

2.5.2 Verwandtschaft und Vorfahren

Der Hybridstamm ist phylogenetisch nur entfernt verwandt mit Stämmen konventioneller EHEC-Serotypen [10, 11, 185, 186], aber eng verwandt mit EAEC und gehört phylogenetisch zur klonalen Linie des HUSEC041-Stammes (MLST-Sequenztyp 678) [11, 54, 187]. Der Hybridstamm besitzt 99,8 % DNS-Sequenzhomologie zu dem EAEC-Stamm 55989, ein *stx*-negatives O104:H4-Isolat aus einem HIV-Patienten in Zentralafrika [136, 157, 186]. Der EAEC-Stamm 55989 und der Hybridstamm gingen wahrscheinlich aus einem gemeinsamen O104:H4-EAEC-Vorfahren hervor. Hierbei erwarb der Hybridstamm schrittweise chromosomale und plasmidkodierte Virulenzfaktoren (AAF/I ~83 kb, ESBL-Plasmid [*tem*, *ctx-M-15*] ~90 kb, Stx2-Phage ~58 kb) und verlor die Gene für andere Faktoren (AAF/III ~75 kb) [11]. Solche tiefgreifenden chromosomalen Veränderungen können bereits während der kurzen Passagezeit durch den Intestinaltrakt entstehen [11].

2.5.3 Relevante Virulenzfaktoren

Der Hybridstamm unterscheidet sich von anderen O104:H4-EAEC-Stämmen durch seine Plasmid-Ausstattung (ESBL-, pAA-Plasmid) und weitere STEC-Virulenzfaktoren, wie den Stx2-kodierenden Prophagen [11, 184, 188].

STEC-assoziierte Virulenzfaktoren

Der Hybridstamm produziert Stx2 des Subtyps Stx2a [11, 40, 54, 184]. Das *stx2*-Gen des Hybridstammes weist eine hohe Sequenzhomologie (99 %) mit dem *stx2*-Gen des O157:H7-EHEC-Stammes EDL933 auf (GenBank AE005174), da je Untereinheit nur jeweils ein Nukleotidaustausch vorliegt [54]. Weiterhin ist der Stx2-Prophage im Hybridstamm an derselben Integrationsstelle (*wrbA*) lokalisiert, wie bei den EHEC-Stämmen EDL933 [189] und Sakai (RIMD 059952) [190]. Allerdings zeigen experimentelle Untersuchungen, dass der Stx2a-Prophage des Hybridstammes vermutlich aus einem bovinen STEC-Isolat entstammt [29]. Der Transfer des Stx-Phagen in den Hybridstamm kann aus der Umgebung oder im Darmtrakt des Wirts erfolgt sein [29]. Neben dem STEC Virulenzfaktor Stx2 besitzt der Hybridstamm noch die Adhäsine Iha und Lpf (*long polar fimbriae*) [54, 191]. Im Gegensatz zu klassischen EHEC (z.B. *E. coli* O157:H7) fehlt dem Hybridstamm aber das klassische EHEC-

Virulenzplasmid (pO157) sowie die Gene (LEE), die den A/E-Mechanismus kodieren [54, 191].

EAEC-assoziierte Virulenzfaktoren

Der Hybridstamm besitzt das EAEC-spezifische Virulenzplasmid pAA, auf dem die strukturelle Untereinheit der AA-Fimbrie Typ I (*aggA*), der Transkriptionsregulator AggR und das Adhäsins Dispersin kodiert werden. Außerdem besitzt der Hybridstamm chromosomal kodierte EAEC-Virulenzfaktoren, wie das *Shigella* Enterotoxin 1 (ShET1) und die Serin-Protease Pic [54, 153, 172, 192, 193]. Die AAF/I-Fimbrien vermitteln das Adhäsionsmuster und die Fähigkeit zur Biofilmbildung [54]. Es ist die erstmalige Beschreibung dieses Fimbrien-Typs (AAF/I) bei einem EHEC. Alle bisher beschriebenen Stx-positiven EAEC bzw. EHEC/EAEC O104:H4 wiesen AAF/III-Fimbrien auf. Die Kombination der Adhäsionsfaktoren (AAF/I, Iha, Lpf) könnte die intestinale Adhäsion verstärken und die systemische Stx-Aufnahme vereinfachen und so zu der hohen HUS-Inzidenz beigetragen haben [7, 54, 191]. Im Gegensatz zu typischen EAEC besitzt der Hybridstamm drei Proteasen (Pic, SigA und SepA) [191], aber kein *astA*-Gen, welches das hitzestabile Enterotoxin EAST1 kodiert und in HUSEC041 [54] sowie in zwei O104-Isolaten aus Frankreich beschrieben wurde [188]. STEC-Isolate aus Nutztieren besitzen dagegen häufig *astA* [194].

Ausstattung mit Resistenzplasmiden

Der Hybridstamm besitzt ein ESBL-Plasmid (pESBL, 88 kb), das bereits in verschiedenen *E. coli*-Stämmen von Mensch und Tier isoliert wurde und die β -Laktamasen CTX-M15 und TEM-1 kodiert [10, 184, 195]. Phänotypisch ist der Stamm resistent gegenüber einem breiten Spektrum von Antibiotika, einschließlich Cephalosporinen der 3. Generation [11, 54].

2.5.4 Phänotypische Eigenschaften

In-vitro adhärirt der Hybridstamm an humane intestinale Epithelzellen (HCT-8, T84) mit einem aggregativen Adhäsionsmuster [54, 152], mit hoher Intensität und umgebender Vakuolisierung der Mikrovilli [152]. Dieser Adhäsionstyp entspricht phänotypisch dem Adhäsionsmuster klassischer EAEC [160, 196]. Im Gegensatz zu Infektionen mit dem EAEC-Stamm O42 bleibt bei der Infektion mit dem Hybridstamm die Barrierefunktion und Integrität der *tight junction*-Proteine bei polarisierten, humanen T84-Zellen erhalten [152, 192]. Auch für einige STEC-Stämme wurde eine Abnahme der Barrierefunktion (Abnahme des trans-epithelialen elektrischen Widerstandes, TEER) bei T84-Zellen gezeigt, die nicht durch Stx alleine induzierbar war [76].

Der Hybridstamm produziert einen stabilen Biofilm *in-vitro* und *in-vivo*. Zudem korreliert *in-vivo* die *stx*-Genexpression hochgradig mit der Expression der biofilmassoziierten EAEC-Virulenzgene (*aggR*, *pgaA*), ist aber unabhängig von der Kolonisationsintensität [197]. Die

Virulenz des Hybridstammes korreliert mit der *stx2*-Expression im Maus- und Kaninchenmodell [198] und war am höchsten bei Hochregulation der Gene für Aggregation und Biofilmbildung, das charakteristisch für Bakterien in einem Biofilm ist [197]. Der Hybridstamm exprimiert stärker als andere Stämme einen Biofilm fördernden „*second-messenger*“ (c-di-GMP) und „*amyloid curli fibers*“, was im Wirt zu einer verstärkten Adhäsion und Inflammation führt [199].

Durch AAF/I induziert der Hybridstamm ebenfalls eine starke Entzündung im Darm und bewirkt neben der aggregativen Adhäsion eine verstärkte Translokation von Stx2 [192]. Die mikroaerobe Umgebung im humanen Kolon moduliert die Stx-Freisetzung und erhöht dessen Absorption [152]. Der Hybridstamm produzierte Stx2 mit Titern im Verozell-Zytotoxizitätstest (VeroZT) zwischen 64-1024 im Median 256 [54].

2.5.5 EHEC der Serogruppe O104 in Mensch und Tier

Stx-produzierende *E. coli* des Serotyps O104:H4 wurden bisher weltweit nur selten im Menschen detektiert oder mit HUS-assoziiert [146, 187, 198]. Vor 2011 erfolgte nur sporadisch die HUS-assoziierte Detektion von O104:H4, u.a. in Deutschland [187, 200], Frankreich [188, 201, 202], Großbritannien [203], USA [204], Georgien [146], Japan [205], Korea [206, 207], Italien [208] und Finnland [146], wobei letztere Infektion Reise-assoziiert in Ägypten erworben wurde [146]. Keine O104:H4-Infektion wurde bis zu diesem Zeitpunkt auf Lebensmittel zurück-geführt [146]. Sporadische HUS-Fälle zwischen 2001 und 2011 mit dem Serotyp O104:H4, unbeachtet auf Grund ihrer Seltenheit [188, 209], sind ein Indiz für mögliche Persistenz [188] und endemisches Vorkommen von O104:H4 in Europa [191], insbesondere in der humanen Population.

STEC-Stämme mit dem Serotyp O104:H4 wurden noch nie im Tier [11] oder Lebensmitteln detektiert [146], im Gegensatz zu STEC-Stämmen mit den Serotypen O104:H7, O104:H12 oder O104:H21, die vereinzelt in tierischen Lebensmitteln oder Wiederkäuern detektiert wurden [11, 146]. Die Serogruppe O104 (*wzx_{O104}*) wurde in 20,6 % der Rinderkotproben bei Weidehaltung in den USA gefunden [210] und im Kot europäischer Schlachtrinder [211]. Zudem wurde die Serogruppe O104 (*wzx_{O104}*) sporadisch in Schaf und Jungrindern, in kontaminierten Fleischprodukten und Lebensmitteln, einschließlich rohem Hackfleisch, bovinen Schlachtkörpern, Schaffleisch und Milch detektiert [142, 146].

2.5.6 Wirtsadaption des Hybridstammes

Das natürliche Reservoir klassischer EHEC und damit auch die Hauptinfektionsquelle für den Menschen sind Wiederkäuer, v.a. Rinder [2, 12, 20]. Vor und während des Ausbruchs wurden keine STEC-Stämme des Serotyps O104:H4 oder typische EAEC-Stämme (*aggR*-positive) in Kotproben von Schlachtrindern in Norddeutschland [143] oder Frankreich [142]

detektiert. Das schließt ein seltenes Auftreten oder das Vorkommen in anderen Tieren jedoch nicht aus [188]. Typische EAEC-Stämme werden primär aus dem Menschen isoliert [6, 8, 134, 141], einschließlich der seltenen Serogruppe O104, und der Ausbruch ist vermutlich keine Zoonose [7]. Daher scheint der Mensch und nicht das Rind als Reservoir des Hybridstammes in Frage zu kommen [7].

Jedoch vermittelt Stx die Fähigkeit von STEC durch aktive Modulation der zellulären Immunantwort die intestinale Mukosa des Rindes persistent zu kolonisieren [17, 79, 109]. Der Hybridstamm ist fähig zur transienten und asymptomatischen Kolonisierung von experimentell infizierten Kälbern: Nach experimenteller Infektion zeigt der Hybridstamm zwar eine verkürzte Ausscheidungsdauer im Vergleich zu einem klassischen STEC-Stamm des Serotyps O157:H7 und den raschen Verlust des pAA-Plasmids mit zunehmender Infektionsdauer, wird aber länger und in höheren Keimzahlen ausgeschieden als ein avirulenter *E. coli*-Stamm [212]. Im natürlichen Wirt bildet sich ein Gleichgewicht zwischen den Virulenzfaktoren des Erregers und der Immunantwort des Wirtes aus [213]. Jedoch kam es auch bei den humanen enteralen Infektionen während des Ausbruches zu einem Verlust des pAA-Plasmids, einhergehend mit dem Verlust des aggregative Phänotyps und resultierend in einem geringeren Auftreten von HUS [214]. Der Hybridstamm wurde ebenfalls aus dem Darm infizierter Personen eliminiert, teilweise jedoch erst verzögert nach mehreren Monaten [215]. HUS-Patienten schieden den Erreger deutlich kürzer (Median 13-14 d) als nicht-HUS Patienten (Median 33-34 d) aus [215]. Seit dem Ausbruch 2011 gibt es keinen Hinweis einer endemische Etablierung des Erregers im Menschen in Deutschland [179]. Dennoch wurden Gene, die charakteristisch für den Hybridstamm sind (*stx2*, *aggR*, *wzx*_{O104}, *fliC*_{H4}), in Kotproben von Rindern an deutschen Schlachthöfen detektiert [211]. Das natürliche Reservoir des Hybridstammes ist damit weiterhin unbekannt und die Gefahr eines vergleichbaren Ausbruches besteht durch potentielle, symptomlose Träger [7] oder die Entstehung neuer Virulenzgenkombinationen.

2.6 Erreger-Wirt-Interaktionen im Darm

2.6.1 Darm als Immunorgan - mukosale Immunbarriere und Homöostase

Die Darmschleimhaut ist die Hauptinteraktionsfläche des Körpers mit Mikroben und stellt die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene dar [4, 216-218]. Die Herstellung eines Gleichgewichts (Homöostase) zwischen der Toleranz gegenüber Kommensalen und Nährstoffen und der Immunität gegenüber Pathogenen stellt eine einzigartige Herausforderung an das mukosale Immunsystem dar [216, 219, 220]. Die intestinale Homöostase ist eng durch den Dialog (*crossstalk*) zwischen kommensalen Mikroorganismen, intestinalen Epithelzellen (IEC) und mukosalen Immunzellen reguliert [218, 221]. IEC exprimieren Muster-Erkennungs-

rezeptoren (PRR = *pattern recognition receptors*), wie Toll-like Rezeptoren (TLR) und NOD-like Rezeptoren [217], die bestimmte bakterielle Strukturen, sogenannte MAMPs (*microbial-associated molecular patterns*) erkennen. Obwohl beide MAMPs besitzen [222], können IEC zwischen Kommensalen und Pathogenen diskriminieren [223, 224]. Bei der Abwehr von Pathogenen sezernieren IEC antimikrobielle Peptide und proinflammatorische Zytokine [225] sowie submukosal gebildetes Immunglobulin A in das Darmlumen [218, 219] und Chemokine [226-228] zur Alarmierung der Immunzellen in das unterliegende Gewebe. An der antimikrobiellen Immunität und Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen sind auch spezialisierte Immunzellpopulationen für die Antigenerkennung und -präsentation beteiligt [216]. In der Epithelschicht sind intraepitheliale Lymphozyten (IEL), hauptsächlich T-Zellen [216] und dendritische Zellen lokalisiert, die kontinuierlich luminale Antigene erfassen [229]. Die Immunzellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) setzen sich zusammen aus einer Anzahl von T-Lymphozyten, einschließlich $\gamma\delta$ T-Zellen, IgA-bildenden Plasmazellen, Makrophagen und dendritischen Zellen [220].

2.6.2 Intestinale Entzündung – „steady state“ und Pathologie

Das hoch dynamische Gleichgewicht zwischen Wirt und Erreger wird durch eine Vielzahl von molekularen und zellulären Wechselwirkungen aufrechterhalten [219, 230]. Es stehen die protektive Immunität und regulatorische Mechanismen des Wirts der proinflammatorischen Aktivität und der Darmflora gegenüber [216]. Im physiologischen Zustand induziert die kommensale Darmflora einen basalen Entzündungszustand im Darm [216], gekennzeichnet u.a. durch die Sekretion von Hitzeschockproteinen und proinflammatorischen Zytokinen. Dies betrifft Lymphozyten, aber auch intestinale und andere mukosale Zelltypen, deren *steady-state* Aktivität der einer leichten Entzündung entspricht (*low-intensity inflammation*) [216, 231, 232]. Dennoch überwiegen bei der Homöostase im Darm die regulatorischen Mechanismen gegenüber den proinflammatorischen Signalen, welche durch das Immunsystem bei Kontakt mit der normalen Flora induziert werden [216]. So reagiert das Immunsystem des Wirts nicht gegen harmlose, exogene Antigene [216]. Das Gleichgewicht kann jedoch verschoben werden, typischer Weise durch Akkumulation proinflammatorischer Mediatoren, auf Grund unterschiedlicher Genese [216]. Bei der Infektion mit pathogenen Erregern oder Zerstörung der Darmbarriere kommt es zu einer Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren durch direkten Kontakt der Antigene mit dem Immunsystem [216, 233]. Auch eine verminderte immunregulatorische Antwort führt zur Entzündung und paradoxer Weise führt selbst eine verminderte proinflammatorische Aktivität im Darm zur Entzündung, da das verstärkte Wachstum pathogener Mikroorganismen proinflammatorische Stimuli erhöht [233]. Wirtsadaptation bedeutet, dass die Virulenzfaktoren des Erregers der Immunantwort des Wirts entgegenwirken und es im natürlichen Reservoir zur Ausbildung eines Erreger-Wirt-Gleichgewichts kommt [213].

2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die relative Wirtsadaption des EHEC/EAEC-Hybridstammes des Serotyps O104:H4, der für den HUS-Ausbruch in Deutschland und Europa im Jahre 2011 verantwortlich war, an Mensch und Rind zu klären. Damit sollte eine experimentelle Grundlage für die Risikoabschätzung geschaffen werden, ob Hybridstämme dieses Typs nach Eintrag in die Population bzw. nach genetischer Rekombination zwischen STEC- und EAEC-Stämmen auch Rinder als Reservoir nutzen können.

2.7.1 Arbeitshypothese

„Der Hybridstamm ist besser an den Menschen adaptiert als an das Rind.“

Bei humanen Infektionen scheint eine asymptomatische Kolonisation durch den Hybridstamm möglich zu sein. Bei einer Verschiebung des Erreger-Wirt-Gleichgewichts können jedoch pro-inflammatorische Effekte schwere Erkrankungen hervorrufen. Es wurde erwartet, dass der Hybridstamm humane Epithelzellen gut kolonisieren kann und dabei ein Reaktionsprofil mit wenig proinflammatorischer Aktivität aufweist, vergleichbar mit dem Reaktionsprofil anderer, human assoziierter Stämme. Im Rind hingegen erwarteten wir eine qualitativ oder quantitativ andere Modulation des Immunsystems, einhergehend mit geringerer Adhäsion an Epithelzellen und stärkerer Induktion proinflammatorischer Aktivität im Vergleich zu aus Rindern isolierten STEC-Stämmen. Insgesamt nahmen wir jedoch an, dass aufgrund der Hybridvirulenz die Regulation der Virulenzfaktoren bei Wirtszellkontakt weniger ausbalanciert ist als bei Stämmen, deren Vorkommen stärker an Menschen bzw. Rinder als Träger gebunden ist. Dies sollte bei der Interaktion mit den wirtsspezifischen Epithelzellen eine übermäßige Expression der Virulenzfaktoren nach sich ziehen.

2.7.2 Arbeitsansatz

Wir verglichen die Interaktion des Hybridstammes *in-vitro* mit humanen und bovinen intestinalen Epithelzellen, jeweils aus Dünn- und Dickdarm, da diese die erste Verteidigungslinie des Wirts repräsentieren [4, 216-218]. Im jeweiligen Wirtssystem wurde das Adhäsions- und Invasionsvermögen sowie das inflammatorische und immunmodulatorische Potential des Hybridstammes mit dem Reaktionsprofil von bovin und human assoziierten Stämmen klassischer Pathovaren verglichen. Weiterhin wurde untersucht, ob der Hybridstamm die Stx-vermittelte Fähigkeit zur lokalen Immunmodulation im bovinen Darm besitzt und damit die Grundlage schaffen könnte, im Darm des Rindes zu persistieren. Hierzu wurden *in-vitro* primäre bovine Makrophagen stimuliert und die Fähigkeit des Hybridstammes zur systemischen Immunsuppression im Vergleich zu klassischen EHEC im homologen Tiermodell untersucht.

3 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Geräte, Puffer und Medien sind im Anhang (Kapitel 9.2, ab Seite 175) aufgelistet.

3.1 Bakterienstämme

Die **Tabelle 1** listet die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme mit ihren wichtigsten Eigenschaften auf.

3.2 Permanente Zelllinien

In **Tabelle 2** sind die relevanten Eigenschaften der verwendeten Zelllinien, die Herkunft und die Parameter der Kultivierung zusammengefasst. Adhärente, intestinale Epithelzellen von Mensch und Rind wurden verwendet und als Referenz-Zellsysteme wurden Vero- und HEp-2-Zellen mitgeführt.

3.3 Primer

Die verwendeten Oligodesoxyribonuklotide (*primer*) wurden von der Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg und der Fa. Jena Bioscience GmbH, Jena, hergestellt. Die lyophilisierten *primer* wurden gemäß der Herstellerangaben in *A. dest.* auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: *Escherichia coli*-Referenzstämme und Isolate und deren relevante Eigenschaften

Stamm	Gruppe	Serotyp	relevante Eigenschaften	Bezugsquelle	Wirtursprung	Referenz
C600	Kontrolle	O _{rough} ⁺	K12-Stamm	IHIT	-	[234]
E2346/69	EPEC	O127:H6	LEE; Referenzstamm für Adhäsionsassay	IHIT	Mensch	[235]
EDL933	EHEC	O157:H7	<i>stx1a</i> , <i>stx2a</i> , LEE	IHIT	Mensch	[12, 236]
123	Kontrolle	O43:H28	Nal ^R , avirulent, Kommensale	NADC	Schwein	[237]
86-24	EHEC	O157:H7	<i>stx2a</i> , LEE	NADC	Mensch	[238]
86-24 ^{Nal}	EHEC	O157:H7	<i>stx2a</i> , LEE, Nal ^R	NADC	Mensch	[239]
LB226692	EHEC/EAEC	O104:H4	<i>stx2a</i> , EAEC-Virulenzplasmid (pAA; <i>aggR</i> , <i>aaf/I</i>), pESBL (<i>blaTEM-1</i> , <i>blaCTX-M-15</i>), Nal ^R	IHM	Mensch	[54]
17-2	EAEC	O3:H2	pAA-Virulenzplasmid (<i>aggR</i> , <i>aaf/I</i>)	IHM	Mensch	[240]
55989	EAEC	O104:H4	pAA-Virulenzplasmid (<i>aggR</i> , <i>aaf/III</i>)	IHM	Mensch	[157]
12E0114	STEC	O156:H25	<i>stx1a</i> , LEE	FLI	Kalb	[21]
2403	STEC	O _{rough} :H-	<i>stx1a</i>	IHIT	Rind	[241]
12E0111	STEC	O157:H7	<i>stx2c</i> , LEE	FLI	Kalb	[22]
76-5	EIEC	O143:H _{ind}	Invasiv, Referenzstamm	IHM	-	[242]

Erläuterung: *aaf/I-III* = aggregative adherence *fimbriae*; **EAEC** = enteroaggregative *E. coli*; **EHEC** = enterohämorrhagische *E. coli*; **EIEC** = enteroinvasive *E. coli*; **ESBL** = extended-spectrum beta-lactamase; **FLI** = Friedrich-Loeffler Institut; **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig Universität Gießen; **IHM** = Institut für Hygiene, Münster; **LEE** = locus of enterocyte effacement; **NADC** = National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa, USA; **Nal** = Nalidixinsäure, ^R = Resistenz; **STEC** = Shigatoxin-bildende *E. coli*; **stx** = Shigatoxin, Nomenklatur nach Scheutz et al. (2012) [40]

Tabelle 2: Relevante Eigenschaften der verwendeten permanenten Zelllinien

Zellbezeichnung	Herkunft	Ursprungsgewebe	Bezugsquelle	Katalog-Nr.	Verwendete Subkulturen	Grundmedium	Zusätze zum Grundmedium	
							Kulturmedium	Testmedium
CaCo-2	Mensch	Kolon	DSMZ	ACC169	25-41	DMEM (4,5 g/l Glukose)	10 % FKS, 1 % NEAS, 1 % Pen/Strep	10 % FKS, 1 % NEAS, 1 % Mannose
FKD-R 971	Rind	Darmgewebe, fetal	CCLV	RIE-971	126-143	Ham's F12: IMDM (1:1)	10 % FKS, 1 % NEAS	10 % FKS, 1 % NEAS, 1 % Mannose
HEp-2	Mensch	Larynxkarzinom-Epithel	CCLV	RIE-0141	16-23	RPMI 1640 (mit stabilisiertem Glutamin)	10 % FKS, 1 % Pen/Strep	10 % FKS, 1 % Mannose
INT 407	Mensch	Darmgewebe, fetal	ECACC	85051004	25-42	MEM (2,2 mg/l NaHCO ₃)	10 % FKS, 1 % NEAS, 1 % Pen/Strep	10 % FKS, 1 % NEAS, 1 % Mannose
Vero	Affe	epitheliales Nierengewebe	ATCC	CRL-1587	19-30	RPMI 1640 (L-Glutamin)	10 % FKS, 1 % Pen/Strep	10 % FKS, 1 % Pen/Strep

Erläuterungen

ATCC = American Type Culture Collection; **CCLV** = Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Insel Riems; **DSMZ** = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; **ECACC** = European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK; **FKS** = fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert; **NEAS** = nicht-essentielle Aminosäuren; **Pen/Strep** = Penicillin-Streptomycin

Tabelle 3: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide für die konventionelle PCR zum Nachweis des Pathotyps nach Müller et al. [243]

Primernamen	Sequenz (5' - 3')	Gen	Konz. [µM]	Amplikon [bp]
MP3-escV-F	ATTCTGGCTCTCTTCTTTTATGGCTG	<i>escV</i>	0,4	544
MP3-escV-R	CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC	<i>escV</i>		
MP3-bfpB-F	GACACCTCATTGCTGAAGTCG	<i>bfpB</i>	0,1	910
MP3-bfpB-R	CCAGAACACCTCCGTTATGC	<i>bfpB</i>		
MP4-stx1A-F	CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	<i>stx1</i>	0,2	244
MP4-stx1A-R	AATGCCACGCTTCCCAGAATTG	<i>stx1</i>		
MP3-stx2A-F	GTTTTGACCATCTTCGCTGATTATTGAG	<i>stx2</i>	0,4	324
MP3-stx2A-R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC	<i>stx2</i>		
MP2-LT-F	GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG	<i>elt</i>	0,1	655
MP2-LT-R	CTTTCAATGGCTTTTTTTTGGGAGTC	<i>elt</i>		
MP4-STIa-F	CCTCTTTTAGYCACACARCTGAATCASTTG	<i>est-la</i>	0,4	157
MP4-STIa-R	CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG	<i>est-la</i>		
MP2-STI-F	TGTCTTTTTACCTTTCGCTC	<i>est-lb</i>	0,2	171
MP2-STI-R	CGGTACAAGCAGGATTACAACAC	<i>est-lb</i>		
MP2-invE-F	CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG	<i>invE</i>	0,2	766
MP2-invE-R	CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC	<i>invE</i>		
MP2-astA-F	TGCCATCAACACAGTATATCCG	<i>astA</i>	0,4	102
MP2-astA-R	ACGGCTTTGTAGTCTTCCAT	<i>astA</i>		
MP2-aggR-F	ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG	<i>aggR</i>	0,2	400
MP2-aggR-R	AATACAGAATCGTCAGCATCAGC	<i>aggR</i>		
MP2-pic-F	AGCCGTTTCCGCAGAAGCC	<i>pic</i>	0,2	1111
MP2-pic-R	AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG	<i>pic</i>		
MP2-uidA-F	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	<i>uidA</i>	0,2	1487
MP2-uidA-R	AAAGTGTGGTCAATAATCAGGAAGTG	<i>uidA</i>		

Tabelle 4: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide für qRT-PCR

Primer Name	Sequenz (5' - 3')	Gen	Amplikon [bp]	Referenz
GAPDH-2-forw	GC GATACTCACTCTTCTACCTTCG	bov. <i>gapdh</i>	82	[244, 245]
GAPDH-2-rev	TCGTACCAGGAAATGAGCTTGAC	bov. <i>gapdh</i>		
IL 8_Rind_forw	CACTGTGAAAAATTCAGAAATCATTTA	bov. <i>IL-8</i>	107	[246]
IL 8_Rind_rev	CTTCACCAAAATACCTGCACAACCTTC	bov. <i>IL-8</i>		
IL 10_Rind_for	GTGATGCCACAGGCTGAGAA	bov. <i>IL-10</i>	130	[247]
IL 10_Rind_rev	TGCTCTTGTTTTTCGCAGGGCA	bov. <i>IL-10</i>		
TNFa_Rd_for	TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAG	bov. <i>tnf-α</i>	103	[246]
TNFa_Rind_rev	CCATGAGGGCATTTGGCATAC	bov. <i>tnf-α</i>		

Primer Name	Sequenz (5' - 3')	Gen	Amplikon [bp]	Referenz
TGF-β-Rd-for	GGCCCTGCCCTTACATCTG	bov. <i>tgf-β</i>	74	[17]
TGF-β-Rd-rev	CGGGTTGTGCTGGTTGTACA	bov. <i>tgf-β</i>		
INFγ-Rd-Forw	TTCTTGAACGGCAGCTCTGAG	bov. <i>IFN-γ</i>	126	[246]
INFγ-Rd-Rev	TGGCGACAGGTCATTCATCA	bov. <i>IFN-γ</i>		
MCP-1-Schf-Forw	GCTGTGATTTTCAAGACCATCCT	bov. <i>mcp-1</i>	69	[248]
MCP-1-Schf-Rev	GGCGTCTGGACCCATTT	bov. <i>mcp-1</i>		
boGRO-for	CGCCTGTGGTCAACGAACT	bov. <i>clcx-1</i>	83	[244]
boGRO-rev	CACCTTCACGCTCTGGATGTT	bov. <i>clcx-1</i>		
RANTES-Rd-forw	CATGGCAGCAGTTGTCTTTATCA	bov. <i>rantes</i>	76	[120]
RANTES -Rd-rev	CTCTCGCACCCACTTCTTCTCT	bov. <i>rantes</i>		
For IL 12-Gie	GCAGTCTTTCATCAGGGACAT	hum. <i>IL-12</i>	87	[245]
Rec IL 12-Gie	CCTCCACTGCCGAGAATT	hum. <i>IL-12</i>		
IL-6-Rd-Forw	CTGAAGCAAAGATCGCAGATCTA	bov. <i>IL-6</i>	81	[245]
IL-6-Rd-Rev	CTCGTTTGAAGACTGCATCTTCTC	bov. <i>IL-6</i>		
IL-1β-Rd-forw	ACCTGAACCCATCAACGAAATG	bov. <i>IL-1β</i>	74	[249]
IL-1β-Rd-rev	TAGGGTCATCAGCCTCAAATAACA	bov. <i>IL-1β</i>		
boiNOS-12-for	GGAGTTTTCCCATGCAACCA	bov. <i>iNOS2</i>	129	[250]
boiNOS-12-rev	ATCCTTGACCCAATAGCTGCC	bov. <i>iNOS2</i>		
h-F-GAPDH	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	hum. <i>gapdh</i>	76	[251]
h-R-GAPDH	GCTAAGCAGTTGGTGGTGC	hum. <i>gapdh</i>		
h-F-IL 8	TCCTGATTTCTGCAGCTCTGT	hum. <i>IL-8</i>	161	[250]
h-R-IL 8	AATTTCTGTGTGGCGCAGT	hum. <i>IL-8</i>		
IL-10-hum for	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	hum. <i>IL-10</i>	191	[252]
IL-10-hum rev	ACCTGTCTCCACTGCCTTGCT	hum. <i>IL-10</i>		
hu-F-TNF-alpha	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA	hum. <i>tnf-α</i>	151	[250]
hu-R-TNF-alpha	CCTCTGATGGCACCACCAG	hum. <i>tnf-α</i>		
TGFbeta-HU-Forw	GGCCCTGCCCTTACATTTG	hum. <i>tgf-β</i>	74	[17]
TGF-beta-HU-Rev2	CGGGTTATGCTGGTTGTACA	hum. <i>tgf-β</i>		
INFgamma-HU-Forw	CCAACGCAAAGCAATACATGA	hum. <i>IFN-γ</i>	79	[253]
INFgamma-HU-Rev2	CCTTTTTCGCTTCCCTGTTTT	hum. <i>IFN-γ</i>		
MCP1-HU-Forw	GTGCAGAGGCTCGCGAGCTA	hum. <i>mcp-1</i>	138	[254]
MCP1-HU-neu-Rev2	CAGGTGGTCCATGGAATCCTG	hum. <i>mcp-1</i>		
huCXCL-1-for (= GRO-α-F)	AGTGGCACTGCTGCTCCT	hum. <i>clcx-1</i>	146	[255]
huCXCL-1-rev (= GRO-α-R)	TGGATGTTCTTGGGGTGAAT	hum. <i>clcx-1</i>		
RANTES-HU-	AACCCAGCAGTCGTCTTTGTCA	hum. <i>ccl5</i>	75	[256]

Primer Name	Sequenz (5' - 3')	Gen	Amplikon [bp]	Referenz
Forw (neu, CCL5)				
RANTES-HU-neu-Rev	CTCCCGAACCCATTTCTTCTCT	hum. <i>cc15</i>		
For IL 12-Gie	GCAGCTTCTTCATCAGGGACAT	hum. <i>IL-12</i>	87	[245]
Rec IL 12-Gie	CCTCCACCTGCCGAGAATT	hum. <i>IL-12</i>		
h-F-IL 1B	TGATGGCTTATTACAGTGGCAATG	hum. <i>IL-1β</i>	140	[257]
h-R-IL 1B	GTAGTGGTGGTGGGAGATTCCG	hum. <i>IL-1β</i>		
hu-IL-6F	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	hum. <i>IL-6</i>	143	[250]
hu-IL-6R	CCAGAGCTGTGCAGATGAGT	hum. <i>IL-6</i>		
GapA_for	GTTGTCGCTGAAGCAACTGG	<i>gapA</i>	171	[258]
GapA_rev	AGCGTTGGAAACGATGTCCT	<i>gapA</i>		
pic_F3696	CCTGACAGAGGACACGTTCA	<i>pic</i>	148	[197]
pic_R3842	TCAACCCTGTTCTTCCAAC	<i>pic</i>		
aggR_F486	TTCCGATAAGGTCAGAAACACA	<i>aggR</i>	169	[197]
aggR_R654	TGCTGCTTTGCTCATTTCTTG	<i>aggR</i>		
iha-f	CTGACTAACGCAGCCGCCAG	<i>iha</i>	132	mod. nach [259]
iha-r	CCTCCGGTTTTACCCGTACC	<i>iha</i>		[259]
RT-stx2F	CGACCCCTCTTTGAACATA	<i>stxA2a</i> , <i>-2b</i> . <i>-2c</i>	106	[260]
RT-stx2R	TAGACATCAAGCCCTCGTAT	<i>stxA2a</i> , <i>-2b</i> . <i>-2c</i>		

Erläuterungen **bov.** = bovin; **hum.** = human

3.4 Antikörper und Konjugate

Die verwendeten Primärantikörper sind in der **Tabelle 5** aufgeführt und die verwendeten Sekundärantikörper und Konjugate in der **Tabelle 6**.

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper

Bezeichnung	Klon/ Fluorochrom	Isotyp	Verteilung auf Zellen	Verdünnung
α-bovin CD4	IL-A11/-	Maus/IgG2a	T-Helfer-Zellen	1:1.000 (FP)
α-bovin CD8 Alexa Fluor® 647	CC63/Alexa Fluor® 647	Maus/IgG2a	Zytotoxische T-Zellen	1:500 (FP)
α-bovin CD25 (Interleukin-2 Rezeptor α)	CACT116A/-	Maus/IgG1	Aktivierungsmarker (B- & T-Zellen, Monozyten, T _{reg})	1:500 (FP)
α-bovin CD45RO	IL-A116/-	Maus/IgG3	Aktivierungsmarker, Gedächtniszellen	1:500 (FP)

Bezeichnung	Klon/ Fluorochrom	Isotyp	Verteilung auf Zellen	Verdünnung
α-bovin CD21	GB25A/-	Maus/IgG1	B-Zellen	1:300 (FP)
α-bovin γδTCR1-N24	GB21A/-	Maus/IgG2b	γδ T-Zellen, δ Ketten- spezifisch	1:300 (FP)
α-Vimentin	Vim 3B4/-	Maus/IgG2a, kappa	Mesenchymzell- marker, Intermediärfilament	1:13 (PBS) 1:500 (PBSx)
α-CD77	38-13	Ratte/IgM	unterschiedlich, Gb ₃ - Rezeptor	1:50 (FP)
α-Zytokeratin/ pan-FITC	C-11/FITC	Maus/IgG1	Epithelzellmarker, Zytokeratin	1:100 (PBS) 1:500 (PBSx)
α-ZO-2	-/-	Kaninchen/ IgG	<i>tight junctions/Zonula occludens</i> Protein 2	1:1.000 (PBS)

Erläuterungen **α** = anti; **FP** = Gebrauchsverdünnung in FACS-Puffer; **PBS** = Gebrauchsverdünnung in 1x PBS; **PBSx** = Gebrauchsverdünnung in PBS-Tween für Westernblot

Tabelle 6: Verwendete Farbstoffe, Konjugate und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Fluorochrom/ Enzym	Verdünnung
Ziege-α-Maus-IgG1-405	DyLight™405	1:500 (FP)
Ziege-α-Maus-IgG2a-APC/Cy7	APC/CY7 (Allophycocyanin/ <i>cyanine dye</i> 7)	1:250 (FP)
Ziege-α-Maus-IgG3-FITC	FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	1:1.000 (FP)
Ziege-α-Maus-IgG2b-PerCp	Peridinin-Chlorophyll (PerCP)- Komplex	1:2.000 (FP)
Ziege-α-Maus-IgG1-PE	PE (Phycoerythrin)	1:50 (FP)
Ziege-α-Ratte-IgM-FITC	FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	1:500 (FP)
PI	Propidium-Jodid	1:1.000 (PBS)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid	1:10.000 (PBS)
α-Kaninchen-IgG (H+L), F(ab')₂	Alexa Fluor® 594	1:2.000 (FP)
α-Kaninchen-IgG-AP	Alkalische Phosphatase	1:2.000 (PBSx)
α-Maus IgG-AP	Alkalische Phosphatase	1:2.000 (PBSx)

Erläuterungen **α** = anti; **FP** = Gebrauchsverdünnung in FACS-Puffer; **PBS** = Gebrauchsverdünnung in 1x PBS; **PBSx** = Gebrauchsverdünnung in PBS-Tween für Westernblot

3.5 Bakteriologische Methoden

3.5.1 Anzucht der Bakterien

Die Herstellung des Inokulums für Infektionsversuche im Zellkulturmodell erfolgte nach der Methode von Bridger *et al.* [4].

Herstellung einer Vorkultur (Starterkultur). Vierundzwanzig Stunden vor jedem Experiment wurden 2-3 Einzelkolonien je *E. coli*-Stamm von Blutagarplatte (BAP) in 2 ml LB-Medium (+ 1 % D-Mannose) überimpft und bebrütet (18 h, 37 °C, aerob, 180 U/min).

Herstellung des Inokulums (Hauptkultur). Am Testtag wurden die Vorkulturen 1:20 im jeweiligen Testmedium verdünnt und inkubiert (2 h, 37 °C, 180 U/min). Dann wurden 1.000 µl der Hauptkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße (RG) überführt und zentrifugiert (8 min, 6.200 x g, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml 0,89 %ige, sterile NaCl-Lösung resuspendiert und 500 µl der bakteriellen Suspension für die photometrische Keimzahlbestimmung verwendet (Kapitel 3.5.2). Die bakterielle Suspension wurde für Infektionsversuche auf eine Keimzahl von $4 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ KbE/ml eingestellt. Die Keimzahl im Inokulat wurde im Tropfplattenverfahren verifiziert (Kapitel 3.5.2).

3.5.2 Keimzahlbestimmung

Photometrische Bestimmung. Die Einstellung der Inokulums erfolgte photometrisch bei 600 nm gegen NaCl-Lösung als Leerwert. Dann wurden 500 µl der bakteriellen Suspension abzentrifugiert und anschließend mit einem berechneten Volumen Testmedium auf die optische Dichte (OD) von 0,6 eingestellt. Die Formel lautete:

$$\text{Testmedium } [\mu\text{l}] = \text{gemessene OD} / 0,6 \times 500 \mu\text{l}.$$

Tropfplattenverfahren. Zur Quantifizierung des Keimgehalts (KbE/ml) in einer bakteriellen Suspension wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe in sterilem 1x PBS angelegt. Je Verdünnungsstufe wurden 10 µl im Doppelansatz auf ein BAP aufgetropft und bebrütet (18 h, 37 °C, aerob). Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf denjenigen Platten ausgezählt, bei denen je Tropfstelle zwischen 10 und 100 gut abgegrenzte Kolonien gewachsen waren. Die Keimzahl der Ausgangsbouillon errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = (\text{Anzahl der Kolonien} \times 10^2) \times \text{Verdünnungsstufe}.$$

3.5.3 Inaktivierung von Probenmaterial

Hitzeinaktivierung. Für die Verwendung in konventionellen PCR-Analysen wurde das Probenmaterial für 10 min bei 100 °C im Thermoblock lysiert (Kochlyse). Proben zur Verwendung in Western Blot-Analysen wurden bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Inaktivierung durch Polymyxin B. Die Inaktivierung gewonnener Zellkulturüberstände für die Testung im ELISA und Verozell-Zytotoxizitätstest erfolgte durch Zugabe von Polymyxin B. Die Proben wurden zentrifugiert (10 min, 13.200 x g, RT), der Überstand in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und mit Polymyxin-B-Lösung in einer Endkonzentration von 50 µg/ml inkubiert (1 h, 37 °C). Anschließend erfolgte eine Sterilitätskontrolle und die inaktivierten Überstände wurden bis zur Testung bei -70 °C gelagert.

3.5.4 Negativkontrastpräparation zur Dartstellung im Transmissionselektronenmikroskop

Mit Phosphorwolframsäure. Einzelkolonien der *E. coli*-Stämme wurden von BAP abgenommen und in 100 µl 1x PBS resuspendiert. Die trübe Bakteriensuspension wurde mit 40 µl 2,5 %igem Glutaraldehyd in Kakodylatpuffer (pH 7,2) mit 0,1 mol Dextrose für 2 h bei 4 °C fixiert und anschließend einer Sterilitätskontrolle unterzogen. Die nachfolgende Präparation und die Auswertung am Elektronenmikroskop erfolgten durch die Arbeitsgruppe 230 „Pathologie und Pathophysiologie“, Institut für molekulare Pathogenese des FLI. Dazu wurde zunächst 40 µl der Suspension auf mit Formvar bedampfte, mit Kohle bedampfte, frisch beglimmte Trägernetze (3 mm Durchmesser, 400 mesh) aus Kupfer gegeben und bei Raumtemperatur für 7 min inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Zur Kontrastierung wurden die Netze mit der bedampften Seite auf einen Tropfen 0,1 %ige Phosphorwolframsäure (PWS) gelegt (10 min, RT). Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt, das Präparat getrocknet und im Transmissionselektronenmikroskop bei 80 KV durchgemustert und relevante Bereiche mit einer Plattenfilmkamera fotografiert. Der Plattenfilm wurde entwickelt und die Negative mit dem Scan Programm Silverfast 8.0 eingescannt [261].

Mit Ammoniummolybdat. Zur verbesserten Darstellung von Flagellen und Fimbrien erfolgte die Präparation mit Ammoniummolybdat [262]. Die *E. coli*-Stämme wurden in 10 ml LB-Medium angezüchtet (18 h, 37 °C, 5 % CO₂ oder 8 % CO₂, stehend) und in 0,89 % NaCl-Lösung gewaschen (300 x g, 5 min, ohne Bremse). Die bakterielle Suspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Ammoniummolybdat (2 %, pH 7) vorsichtig vermischt und auf Sterilität überprüft. Zur Adsorption der Erreger wurden 40 µl der Suspension für 2 min auf ein mit Formvar bedampftes, mit Kohle bedampftes, frisch beglimmtes Trägernetz gegeben. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt, das Präparat getrocknet und die Trägernetze in einer Hochvakuum-Bedampfungsanlage im 45° Winkel mit Goldpalladium für 20 sec besputtert. Die Proben wurden, wie oben beschrieben, im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

3.5.5 Herstellung von *E. coli*-Ganzzelllysaten (GZL)

Für die PCR-Untersuchung wurden die *E. coli*-Bakterien angezüchtet, auf eine Keimzahl von 4×10^8 KbE/ml eingestellt und mittels Tropfplattenverfahren verifiziert. Anschließend wurde die Suspensionen aliquotiert, hitzeinaktiviert, auf Sterilität geprüft und in einer Pathovar-PCR eingesetzt.

Für die Stimulation der PBMC im Rahmen des Kälberinfektionsversuchs wurden GZL in RPMI 1640-Medium der *E. coli*-Stamm 123, 86-24^{NaI} und LB226692 hergestellt. Dazu wurde eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium hergestellt (18 h, 37 °C), zentrifugiert (8 min, 13.000 x g), in RPMI 1640-Medium auf eine OD von 0,6 eingestellt und die Keimzahl mittels Tropfplattenverfahren überprüft. Dann wurde die bakterielle Suspension aliquotiert, hitzeinaktiviert (10 min, 100 °C), mittels Pathovar-PCR überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Direkt vor der Stimulation der PBMCs wurden die Aliquots aufgetaut und mit PBMC-Medium auf eine Konzentration von 2×10^5 KbE/ml eingestellt.

3.5.6 Sterilfiltration von Probenmaterial

Durch Sterilfiltration wurden sterile, konditionierte Überstände von *E. coli*-infizierten Epithelzellen (Kapitel 3.7.1) zur Stimulation von Makrophagen gewonnen. Die Überstände wurden aufgetaut (37 °C) und zentrifugiert (10 min, 13.000 x g). Die flüssige Phase wurde mit einer Spritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm) in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführen. Die Überstände wurden einer Sterilitätskontrolle unterzogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5.7 Sterilitätskontrolle

Die Überprüfung der Sterilität erfolgte bei allen Proben, die aus dem S3**-Laborbereich verbracht wurden. Dazu wurden 10 µl oder 100 µl der unverdünnten, inaktivierten Probe auf BAP aufgetropft, inkubiert (18 h, 37 °C) und am nächsten Tag auf Keimwachstum überprüft. Wenn Koloniewachstum nachweisbar war, wurde die entsprechende Inaktivierung erneut durchgeführt.

3.6 Zellkulturmethoden

3.6.1 Basistechniken für Epithelzellkulturen

Kultivierung permanenter Zellen. Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen (T₇₅) unter standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte) (siehe **Tabelle 2**).

Passagieren permanenter Zellen. Die Subkultivierung der adhärennten Zellen erfolgte durch enzymatischen Verdau mit Trypsin-EDTA-Lösung. Zellspezifische Unterschiede sind in **Tabelle 7** zusammengefasst. Die Aussaat der Zellsuspension erfolgte entweder in einer bestimmten Zelldichte für Infektionsversuche oder zur Erhaltung in einem festen Teilungsverhältnis. Regelmäßig wurden die Zellen kulturell und molekulargenetisch auf Mykoplasmenfreiheit überprüft (Arbeitsgruppe 210 „Chlamydien und Mykoplasmen“, Dr. C. Schnee, Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena).

Lagerung permanenter Zellen. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen auf eine Dichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und im Verhältnis 1:1 mit DMSO-haltigem Einfriermedium à 1 ml in *cryotubes* vermischt und schrittweise in folgenden Stufen eingefroren: 2 h bei 4 °C, 24 h bei -80 °C, Lagerung bei -196 °C.

Rekultivierung permanenter Zellen. Zur Wiederverwendung der Zellen wurden die *cryotubes* aufgetaut (37 °C), die Zellsuspension direkt in eine Zellkulturflasche (T₂₅) überführt, bis zur Adhärenz inkubiert (2 h, 37 °C, 5 % CO₂) und anschließend das DMSO-haltige Einfriermedium durch das jeweils benötigte Kulturmedium ersetzt (**Tabelle 2**). Empfindliche Zellen wurden nach dem Auftauen direkt mit Kulturmedium verdünnt und abzentrifugiert (900 x g, 8 min, RT), anschließend erfolgte die Aussaat und Kultivierung in eine Zellkulturflasche (T₂₅).

3.6.2 Zellzahlbestimmung

Permanente Epithelzellen, Makrophagen und Suspensionszellen. Die Anzahl vitaler Zellen wurde durch eine Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau (1:10 oder 1:20) und Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer (4 x 16 Gruppen-Quadraten) ermittelt. Nach der Berechnung der Zellzahl wurde die gewünschte Zelldichte durch Zugabe von Kulturmedium eingestellt. Die verwendete Formel lautet:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Gesamtzahl} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4.$$

Primäre Kolonkrypten. Für die Zählung der Krypten wurde 20 µl der finalen Krypten-Suspension (Kapitel 3.6.5) auf einen Objektträger gegeben, mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen bedeckt und meanderförmig ausgezählt.

3.6.3 Kultivierung und Vorbereitung der Epithelzellen für die Infektionsversuche

Permanente Zellen. Die Aussaat der permanenten Epithelzellen (INT 407, CaCo-2, FKD-R 971) erfolgte in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/Kavität/500 µl in 24-well-Zellkulturplatten. Nach 48 h erreichten die Dünndarmzellen (INT 407, FKD-R 971) 90-100 % Konfluenz, CaCo-2-Zellen wurden hingegen 10-14 d bis zur Differenzierung mit Ausbildung eines Bürstensaums kultiviert. Die Kultivierung der ausgesäten Zellen erfolgte in antibiotikumfreiem, zell-spezifischen Testmedium unter standardisierten Bedingungen

(37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung; **Tabelle 2**). Im Falle der CaCo-2-Zellen erfolgte jeden 2. Tag ein Mediumwechsel.

Primäre Epithelzellen. Primäre Kolonkryptenzellen wurden mit einer Dichte von 570 Krypten/Kavität in Kollagen-beschichtete 24-well-Zellkulturplatte ausgesät und kultiviert (37 °C, 8 % CO₂, 95 % Wasserdampfsättigung). Nach 24 h und jeden 3. Tag wurde das Medium gewechselt und bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, ca. am 6. Tag nach Aussaat, wurden die Kolonkryptenzellen für Infektionsversuche verwendet.

Vorbereitung der Epithelzellen für die Infektionsversuche. Bei allen Epithelzellen erfolgte 24 h, 1 h und unmittelbar vor der Infektion ein Mediumwechsel mit frischem, antibiotikumfreiem Testmedium (1 ml/Kavität). Außerdem wurde die Zellzahl/Kavität durch Auszählung von zwei repräsentativen Kavitäten bestimmt.

Tabelle 7: Parameter der Subkultivierung (Angaben je T₇₅-Zellkulturflasche)

Arbeitsschritt	CaCo-2	HEp-2	INT 407	FKD-R 971	Vero
Subkultivierung, wenn	90-100 % Konfluenz	100 % Konfluenz	80-90 % Subkonfluenz	100 % Konfluenz	100 % Konfluenz
Trypsinlösung [Volumen]	10 ml	10 ml	5 ml	5 ml	4 ml
Einwirkzeit Trypsin	10 min	10 min	3 - 4 min	5 min	5 min
Menge des Mediums zum Resuspendieren	5 ml	5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2 ml
Einsaat-Dichte [Zellen/ml]	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴
Subkultivierungsverhältnis	1:20 bis 1:30	1:20	1:50 bis 1:150	1:20 bis 1:100	1:20
Besonderheiten	Zellpellet gut in 1 ml Medium resuspendieren, dann auf 5 ml auffüllen	Leichtes Abklopfen bis zur Ablösung des Monolayers	Ablösung bei hoher Zelldichte	Trypsinierung: 5 ml Trypsin für 1 min, dann 4 ml Trypsin abnehmen und in verbliebenen 1 ml für 4 min inkubieren	keine

3.6.4 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Für die TEER-Messung wurden die permanenten Epithelzellen auf Filtereinsätzen (\varnothing 12 mm, Porengröße 0,4 μm) kultiviert und jeden dritten Tag das Medium gewechselt. Regelmäßig über 21 Tage wurde der TEER (*transepithelial electrical resistance*) mit einem EVOM-Gerät (*epithelial voltohmmeter* mit STX2-Elektrode) gemessen als indirektes Maß der Fähigkeit intakte *tight junctions* und Polarisation auszubilden.

Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein Filter ohne Zellen (Leerwert) im jeweiligen Zellkulturmedium gemessen. Der gemessene Zellwiderstand (R [Ω]) wurde wie folgt berechnet: $R_{\text{Zellen}} = R_{\text{Messwert}} - R_{\text{Leerwert}}$. Anschließend wurde der Wert noch auf die Fläche des verwendeten Filters normalisiert: $\text{TEER} [\Omega\text{cm}^2] = R_{\text{Zellen}} [\Omega] \times \text{Filteroberfläche} [\text{cm}^2]$.

3.6.5 Gewinnung primärer, boviner Kolonkryptenepithelzellen

Die Gewinnung primärer, boviner Kolonkryptenzellen erfolgte durch eine Kombination aus enzymatischem Verdau und leichter mechanischer Dissoziation nach Follmann *et al.* (2000) [263] mit Modifikationen nach Stamm *et al.* (2008) [64].

Probengewinnung und Vorbereitung des Kolons. Frisches Darmgewebe (ca. 30 cm/Kalb) des proximalen *Colon ascendens* (*Ansa proximalis coli*) wurde direkt nach der Euthanasie von klinisch unauffälligen 1-15 Monate alten Kälbern (Holstein Friesian) entnommen. Der Darminhalt wurde von kranial nach kaudal ausgesteift und anschließend der Darmschlauch in einem Becherglas mit steriler, 0,89 %iger NaCl-Lösung (4 °C) 2-4x gereinigt. Sichtbares Fettgewebe wurde mit einer Schere abgesetzt und der Darmschlauch längs eröffnet. Der Mukus wurde durch leichtes Abschaben mit einem sterilen Objektträger entfernt und das Darmstück anschließend mit insgesamt 10 Liter steriler, 0,89 %iger NaCl-Lösung (4 °C) gewaschen. Dann wurde das gewonnene Darmstück in 500 ml eisgekühltem Transportmedium ins Labor (max. 10 min) verbracht.

Isolierung der Kolonkripten Das frische Darmstück wurde auf einer sterilen Alufolie über Eis ausgebreitet und das Kolonepithel vom unterliegenden Gewebe mit 2 sterilen Objektträgern abgeschabt. Anschließend wurde das abgeschabte Gewebe mit Rasierklingen in einer sterilen Plastik-Petrischale in eiskaltem HBSS homogenisiert und auf acht 50 ml Zentrifugationsröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden bis zur 50 ml-Marke mit eiskaltem HBSS aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 130 x g, 4 °C). Die oberen Schichten (Zelldetritus und Einzelzellen) wurden mit dem Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Diese Prozedur wurde 3 bis 4 Mal wiederholt, um den Mukus zu entfernen. Das aus mehreren Röhrchen vereinigte Gewebepellet wurde dem 1. enzymatischen Verdau in einem Erlenmeyerkolben zugeführt, mit Zugabe von 60 ml Verdau-Lösung je 15 ml Zellpellet und

nachfolgender Inkubation auf einem Magnetrührer (100 U/min, 45 min, 37 °C, 8 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Dann wurde die Zellsuspension in eine Spritze überführt und einmal durch eine Einmalkanülen mit weitem Durchmesser (18G, 1,2 x 40 mm) und zweimal durch eine feine Einmalkanüle (23G, 0,6 x 25 mm) gepresst. Es folgte ein zweiter enzymatischer Verdau (100 U/min, 10 min, 37 °C, 8 % CO₂, Wasserdampfsättigung) und ein Waschschrift in kaltem HBSS (7 min, 202 x g, 4 °C). Nach diesem Schritt bestand die Zellsuspension aus Kolonkrypten und Einzelzellen. Um die Krypten zu isolieren, wurde die Suspension vier- bis fünfmal in einem 2 % Sorbitol-Gradienten resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 50 x g, 4 °C). Die schweren Krypten waren im lockeren Pellet enthalten und nach jeder Zentrifugation wurde der Überstandes mikroskopisch auf die Anzahl freier Zellen untersucht, bis diese abnahmen. Das finale Kryptenpellet wurde in 20 ml Gibco®DMEM-Medium resuspendiert.

Kultivierung der Kolonkrypten. Die Aussaat der Krypten erfolgte mit einer Dichte von 300 Krypten/cm² (60.000 - 90.000 Zellen/cm²) in Kollagen beschichtete 24-well-Zellkulturplatten und T₇₅-Zellkulturflaschen. Die Beschichtung der jeweiligen Kulturgefäße erfolgte am Vortag mit Kollagen (0,2 mg/ml Collagen R, 1:10 in 1x PBS, jeweils 28 µl/cm²) und anschließender Trocknung (2 h, RT, Lamina Flow). Vor der Einsaat der Krypten wurden die Kulturgefäße mit etwas Erstkulturmedium für Kolonkrypten befüllt und im Brutschrank (37 °C, 8 % CO₂) angemessen temperiert.

Die ersten 24 h erfolgte die Kultivierung der Kryptenzellen in Erstkulturmedium mit 10 % FKS zur verbesserten Anheftung der Krypten (37 °C, 8 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Bereits nach 24 h proliferierten erste Epithelzellen um die angehefteten Krypten. Dann wurde der FKS-Gehalt auf 1 % reduziert und alle 3 Tage das Medium gewechselt, wobei jeweils ein Rest des konditionierten Mediums im Kulturgefäß belassen wurde. Nach ca. 5-6 Tagen war ein konfluenter Zellrasen ausgebildet. Täglich wurden die proliferierenden Kolonkryptenepithelzellen makro- und mikroskopisch auf Kontaminationen und epitheliales Zellwachstum überprüft. Vor Infektionsversuchen wurde zusätzlich die Zytoskelettausstattung immunhistologisch bestätigt (Kapitel 3.8.1).

3.6.6 Gewinnung und Kultivierung primärer, boviner Makrophagen

Die Isolation von *monocyte-derived macrophages* (MDM) aus dem Vollblut von Kälbern erfolgte nach einem Protokoll von Werling *et al.* (1998) [264], modifiziert nach Kerner *et al.* (2015) [129] und Sobotta (2016) [250].

Isolation primärer Monozyten aus Vollblut. Das Blut wurde durch Punktion der *Vena jugularis* von klinisch unauffälligen Jungtieren gewonnen (Holstein-Friesian, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena), in einem sterilen Glasgefäß aufgefangen und 1:5 mit vorgelegtem Na-

Citrat-Puffer (3,8 %) vermischt. Dann wurden 40 ml Na-Citrat-Blut/Tier in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen zentrifugiert (20 min, 2.380 x g, RT, Beschleunigung 7, ungebremster Auslauf) und die *buffy-coats* entnommen. Je 2 *buffy-coats* wurden in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen vereint, auf 45 ml mit PBS-EDTA aufgefüllt, zentrifugiert (10 min, 800 x g, RT, Beschleunigung 7, ungebremster Auslauf) und der Überstand bis auf 5 ml dekantiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Anschließend folgte die Erythrozyten-Lyse; dazu wurden die Zellpellets in Erythrozyten-Lyse-Puffer (45 ml) resuspendiert und unter vorsichtigem Schwenken inkubiert (10 min). Es folgten ein Zentrifugationsschritt (10 min, 300 x g, RT, Beschleunigung 7, Bremse 9) und drei Waschschriffe mit PBS-EDTA.

Für die Gradientenzentrifugation (45 min, 800 x g, RT, Beschleunigung 5, ungebremster Auslauf) wurde das Zellpellet in 25 ml PBS-EDTA-Puffer resuspendiert und auf 20 ml Lymphozytentrennmedium (Pancoll Animal) aufgeschichtet. Jeweils zwei anschließend gewonnene Interphasen wurden in neue 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, bis zur 45 ml Marke mit 0,89 % NaCl-Lösung aufgefüllt und zentrifugiert (8 min, 600 x g, RT, Beschleunigung 7, Bremse 9). Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bis alle Zellpellets vereint waren (10 min, 300 x g, RT, Beschleunigung 7, Bremse 9). Das finale Zellpellet (*peripheral mononuclear cells*) wurde in 10 ml 0,89 % NaCl-Lösung resuspendiert und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen (Kapitel 3.6.2). Die restliche Suspension wurde erneut zentrifugiert (10 min, 300 x g, RT, Beschleunigung 7, Bremse 9) und mit Makrophagen-Beutelmiedium auf eine Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Generierung differenzierter Makrophagen. Je 25 ml der mononukleären Zellsuspension wurden in einen Zellkultur-Teflonbeutel überführt und kultiviert (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung). In den Teflonbeuteln differenzierten die Monozyten in einer Woche zu Makrophagen (*monocyte derived macrophages*, MDM). Die Zellernte erfolgte aus den Teflonbeuteln zunächst durch Kühlung (20 min, 4 °C), gefolgt von zweimaligem Resuspendieren und Spülung der Beutel mit 25 ml gekühlter 0,89 % NaCl-Lösung. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (10 min, 300 x g, Beschleunigung 9, Bremse 9), dann je 2 Zellpellets schrittweise vereint durch Resuspendieren in 0,89 % NaCl-Lösung (45 ml) und Zentrifugation (10 min, 300 x g, Beschleunigung 9, Bremse 9). Das finale Zellpellet wurde in 1 bis 5 ml Makrophagen-Kulturmedium resuspendiert und ein Aliquot zur Zählung der großen, granulierten Zellen entnommen.

Die Makrophagen wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Makrophagen/2 ml/Kavität in eine 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zur Adhärenz kultiviert (18 h, 37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Für die weitere Kultivierung wurden nicht adhärente Makrophagen durch

zweimaliges Spülen mit 5 ml 0,89 % NaCl-Lösung entfernt. Die weitere Kultivierung der adhärennten Makrophagen erfolgte in frischem Makrophagen-Kulturmedium ohne Antibiotikum-Zusatz. Frühestens nach weiteren 24 h Kultivierung wurden die Makrophagen für funktionelle Tests verwendet.

Stimulation und Beprobung primärer Makrophagen. Vierundzwanzig Stunden vor Verwendung der adhärennten Makrophagen erfolgte ein Mediumwechsel mit Makrophagen-Kulturmedium ohne Antibiotikum. Für die Stimulation wurden die adhärennten Makrophagen zunächst mit 2 ml/Kavität 1x PBS gewaschen und dann für 3 h (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung) mit je 2 ml/Kavität der angewärmten, sterilen Überstände inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Makrophagen erneut gewaschen und mit 350 µl RLT-Lyse Puffer/Kavität lysiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur RNS-Isolation und weiteren Verwendung der Proben erfolgte bei -80 °C.

3.6.7 Gewinnung boviner, mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

Isolation. Die Isolation erfolgte modifiziert nach einem Protokoll von Menge *et al.* (1999) [111] aus dem gerinnungsgehemmten Blut experimentell infizierter Kälber (Kapitel 3.10.1). Das Na-Citrat-Blutgemisch wurde 1:1 in PBS-EDTA-Puffer verdünnt, in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen auf Lymphozytentrennmedium (Pancoll Animal) geschichtet und zentrifugiert (45 min, 800 x g, 20 °C, ungebremstem Auslauf). Die Zellen aus dem Interphasering wurden entnommen und mit PBS-EDTA-Puffer vermischt und erneut zentrifugiert (8 min, 257 x g, RT). Kontaminierende Erythrozyten wurden entfernt durch Inkubation des Zellpellets in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (2-3 min, RT). Die Zellen wurden zweimal in PBS-EDTA-Puffer und einmal in 1x PBS gewaschen (7 min, 212 x g, RT). Die Zellsuspension wurde in PBMC-Medium auf eine Dichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Stimulation. Die Stimulation der PBMC zur Anregung der Proliferation erfolgte im Doppelansatz in einer 24-well-Zellkulturplatte für 5 Tage (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Dazu wurde 1:1 die PBMC-Zellsuspension zu dem jeweils vorgelegten Stimulanz bzw. Medium zugegeben (*f.c.* 2×10^6 Zellen/2 ml/Kavität). Als Stimulanzen verwendet wurden Ganzzelllysate (GZL) der Inokulationsstämme (123, 86-24^{Nal}, LB226692). Als Stimulationskontrolle diente Concanavalin A (ConA) und ein Mediumansatz als Negativkontrolle. Für die Stimulation wurden die Stammlösungen der Stimulantien jeweils frisch aufgetaut (37 °C) und in PBMC-Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt: GZL mit 2×10^5 KbE/ml (*f.c.* 1×10^5 KbE/Kavität) und ConA mit 0,67 µg/ml (*f.c.* 0,335 µg/Kavität). Während der Stimulation wurden die Zellkulturen täglich mikroskopisch beurteilt; am Ende der Inkubationszeit folgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer.

3.6.8 Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT)

Die Zytotoxizität von Zellkulturüberständen wurde durch Endpunkttitration im Vero-ZT quantifiziert, modifiziert nach der Methode von Gentry und Dalrymple *et al.* 1980 [265]. Zunächst wurden Verdünnungsreihen (log-3 oder log-10) der zu testenden Überstände im Dreifachansatz in Verozellkulturmedium in eine 96-well Mikrotiterplatte (je 50 µl/Kavität) vorgelegt. Anschließend wurde eine Verozellsuspension mit 4×10^4 Zellen/100 µl/Kavität hinzugegeben und die Platte inkubiert (96 h, 37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Als Positivkontrolle diente 1 % SDS-Lösung anstelle der Überstände und als Negativkontrolle Medium zur Beurteilung des ungestörten Zellwachstums. Die Zellvitalität der Verozellen wurde mikroskopisch und photometrisch bestimmt. Für letzteres wurden die Verozellen mit MTT-Lösung inkubiert (25 µl/Kavität, 4 h, 37 °C), der Farbumschlag mit 10 % SDS-Lösung abgestoppt (24 h, 37 °C) und die optische Dichte (OD) gemessen (Testwellenlänge: 540 nm; Referenzwellenlänge: 690 nm). Für die Auswertung wurden die absoluten OD-Werte der Dreifachansätze gemittelt und auf die OD-Werte der Positiv- und Negativkontrolle standardisiert. Es folgte eine logit-log-Transformation und Berechnung der verozytotoxischen Dosis 50 % (CD₅₀/ml), wie in der Dissertation Fröhlich (2009) [266] beschrieben.

Bei grafischer Darstellung der Titrationskurven ergaben sich bei einigen Zellkulturüberständen Hinweise auf zytotoxische Aktivität für Verozellen (≥ 50 % relative Zellvitalität). Die Messwerte lagen aber unterhalb der Nachweisgrenze für die Berechnung des CD₅₀-Werts. Diesen Proben wurde ein artifizierender Wert von $\frac{1}{2}$ der Nachweisgrenze zugeordnet, was einer CD₅₀/ml von 30 entsprach.

3.6.9 LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Als indirektes Maß der Zellschädigung wurde die Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand quantifiziert. Dazu wurde das LDH-Zytotoxizitäts-Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet, mit geringen Modifikationen bei der Auswertung. Ein Kit-interner LDH-Standard (10.000 µU/ml) wurde im jeweiligen Testmedium mitgeführt und die zu testenden Überstände im Dreifachansatz in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Flachboden) eingesetzt. Die maximale LDH-Freisetzung der Zellen (Positivkontrolle) wurde durch Zellyse mit 1 % Triton X-100 ermittelt und als minimaler Wert die spontane LDH-Freisetzung der Zellen in einer nicht infizierten Zellkontrolle gemessen (Mediumkontrolle). Weiterhin wurde das Hintergrund-Signal im jeweiligen Testmedium bestimmt (Leerwert).

Bei der Auswertung wurde der Leerwert von dem mittleren OD-Wert (490 nm) der Dreifachbestimmung abgezogen. Die Ergebnisse wurden auf die Mediumkontrolle (100 % Vitalität) und die Positivkontrolle standardisiert. Die LDH-Freisetzung wurde in Relation zur LDH-Freisetzung des avirulenten K12-Stamms C600 angegeben.

3.7 Infektionsversuche im Zellkulturmodell

3.7.1 Infektion intestinaler Epithelzellen

Unmittelbar vor der Infektion der Epithelzellen in 24-well-Zellkulturplatten erhielten diese 1 ml/Kavität frisches antibiotikumfreies Testmedium. Die Infektion erfolgte durch Zugabe von 15 µl/Kavität frisch hergestellten Inokulats ($4 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ KbE/ml) und 135 µl Testmedium. Als Negativkontrolle wurde 150 µl des jeweiligen Testmediums je Kavität zugefügt. Nach der Infektion wurden die Zellen inkubiert (3 h-6 h, 37 °C, 5 % CO₂ bzw. Kolonkryptenzellen: 8 % CO₂, Wasserdampfsättigung), dabei erfolgte für die 6-stündige Inkubation ein Waschschriff und ein Mediumwechsel nach 3 h.

Repräsentative Kavitäten des konfluenten Epithelzellmonolayers wurden ausgezählt (Tabelle 8) und mit $6 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$ KbE/Kavität inokuliert, dies entsprach einer MOI (*multiplicity of infection*) von $20 \pm 9,3$.

Tabelle 8: Übersicht mittlere Zellzahl/Zellrasen/24-well

Epithelzelle	Zellen/Kavität
FKD-R 971	$3 \times 10^5 \pm 4 \times 10^5$
INT 407	$5 \times 10^5 \pm 6 \times 10^5$
CaCo-2	$4 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$
Kolonkryptenzelle	$2 \times 10^5 \pm 2 \times 10^4$

3.7.2 Gewinnung konditionierter Überstände

Nach 3 h und 6 h Koinkubation der Epithelzellen mit *E. coli*-Stämmen wurden die konditionierten Zellkulturüberstände gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Größere Volumina konditionierter Überstände für die Stimulation von Makrophagen wurden durch die Infektion von konfluenten Monolayern in Zellkulturflaschen (T₇₅) gewonnen. Diese wurden ebenfalls mit einer MOI von $20 \pm 9,3$ inokuliert. Nach 3 h wurde der Überstand gewonnen und das Medium ausgetauscht, nach weiteren 3 h erfolgte eine erneute Probennahme (6 h). Die gewonnenen Überstände wurden steril filtriert, auf Sterilität kontrolliert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7.3 Adhäsionsversuch

Für den Adhäsionsversuch wurden die Epithelzellen zusätzlich auf sterilen Deckgläsern (Ø 12 mm) kultiviert (Kapitel 3.6.3). Die Giemsa- und FAS-Färbung wurden stets parallel, im Doppelansatz (2 technische Replikate) und in mindestens 3 Wiederholungen (3 biologische Replikate) durchgeführt. Als Prozesskontrollen dienten die *E. coli*-Stämme C600, E2348/69

und EDL933 sowie unbeimpften Kavitäten. Zusätzlich wurden HEp-2-Zellen als Referenzsystem mitgeführt, die ebenfalls mit 2×10^5 Zellen/Kavität eingesät wurden.

3.7.3.1 Giemsa-Färbung

Durchführung. Die bakterielle Adhäsion wurde mit der Giemsa-Färbung modifiziert nach der Methode von Cravioto *et al.* 1979 [267] dargestellt. Die infizierten Epithelzellen (Kapitel 3.7.1) wurden zweimal für 3 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung), mit einem Waschschrift (3x, 500 µl/Kavität, 1x PBS) und Mediumwechsel nach 3 h. Der Zellkulturüberstand wurde jeweils nach 3 h und 6 h gewonnen (Kapitel 3.7.2). Vor der Fixation mit 70 %igem Ethanol (500 µl/Kavität, 30 min, RT) wurden alle nicht adhärenen *E. coli* vom Zellrasen entfernt (4-5x 500 µl vorgewärmter 1x PBS), die fixierten Zellen mit frisch angesetzter 10 %iger Giemsa-Gebrauchslösung gefärbt (500 µl/Kavität, 30–45 min, RT) und anschließend überschüssige Farbe mit *A. dest.* entfernt (2-3x, 1 ml/Kavität). Nach Lufttrocknung wurden die Deckgläser entnommen und mit einem Tropfen RotiMount-Eindeckmedium mit dem Zellrasen nach unten auf einem Objektträger fixiert.

Auswertung. Die Giemsa-Färbung wurde lichtmikroskopisch (Ölimmersion) ausgewertet. Eine Adhäsion lag vor, wenn ≥ 10 *E. coli*/Zelle anhefteten, unabhängig von der Anzahl betroffener Zellen. Adhärenente *E. coli*-Stämme wurden einem Adhäsionsmuster zugeordnet. Lokale Adhäsion (LA) bezeichnet die Adhäsion in Mikrokolonien auf der Zelloberfläche, typisch für EPEC-Stämme [268]. Autoaggregative Adhäsion (AA) ist gekennzeichnet durch Autoagglutination der *E. coli* untereinander in einer charakteristischen Schichtung, sowohl auf der Zelloberfläche als auch auf dem zellfreiem Untergrund, typisch für EAEC [269]. Diffuse Adhäsion (DA) liegt vor, wenn die *E. coli* auf der gesamten Zelloberfläche verteilt sind und nur kleine Aggregationen und geringe Adhärenz auf dem Objektträger aufweisen [8].

Eine semiquantitative Bewertung der Adhäsion erfolgte modifiziert nach einer Methode von Cleary *et al.* 2004 [270]. In jeweils 3-5 unabhängigen Infektionen wurde die Adhäsionsrate durch Zählen von 100 Zellen in repräsentativen Gesichtsfeldern bestimmt und die Prozentzahl von Zellen mit adhärenen Bakterien festgelegt. Auf Einzelzellebene wurde die Adhäsionsintensität ebenfalls semiquantitativ ausgewertet durch Zählen der Anzahl adhärenter Bakterien an 3 repräsentative Zellen in 3 repräsentativen Gesichtsfeldern in mindestens 3 unabhängigen Infektionen im Doppelansatz.

Auch die Zellvitalität wurde mikroskopisch beurteilt und der Anteil morphologisch intakter Zellen wurde in 0 %, 5 %, 25 %, 50 %, 75 %, 95 % und 100 % eingeteilt. Dabei entsprach 100 % Zellvitalität dem morphologischen Erscheinungsbild der nicht infizierten Zellkontrolle.

3.7.3.2 *Fluorescent-Actin-Staining (FAS)*

Durchführung. Die Fluoreszenz-Aktin-Färbung (FAS) wurde gering modifiziert nach einer Methode von Knutton *et al.* 1989a durchgeführt [50]. Bis zum Ende der 6-stündigen Inkubationszeit verliefen Giemsa-Färbung und FAS-Test gleich, allerdings erfolgt beim FAS-Test die Fixation der Zellen mit 2 %iger Paraformaldehyd (PFA)-Gebrauchslösung (500 µl/Kavität, 30 min, RT). Nach einem Waschschriff (3x, 500 µl/Kavität, 1x PBS) wurden die Zellen mit 0,1 % Triton-X 100 permeabilisiert (500 µl/Kavität, 5 min, RT) und erneut gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser in den jeweiligen Kavitäten zentriert und mit FITC (Fluorescein-Isotiozyanat)-Phalloidin-Gebrauchslösung gefärbt (20 µl/Kavität, 30-60 min, RT, feuchte Kammer, dunkel). Es folgten zwei Waschschriffe (1x PBS, 1 ml/Kavität, 4 °C) und die Kernfärbung mit Propidiumjodid (PI)-Gebrauchslösung (50 µl/Kavität, 2 min, RT, dunkel, feuchte Kammer). Nach zwei finalen Waschschriffen mit *A. dest.* (1 ml/Kavität, 4 °C), trockneten die Präparate an der Luft unter Lichtausschluss. Dann wurden die Deckgläser entnommen und mit 1 Tropfen DAPCO-Eindeckmedium mit dem Zellrasen nach unten auf Objektträgern fixiert.

Auswertung. Die Präparate wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (F-Aktin (grün), Zellkern/bakterielle DNS (rot)). Ein Isolat wurde als FAS-positiv eingestuft, wenn pro Zelle mindestens 10 FAS-Signale vorhanden waren, unabhängig von der Zahl betroffener Zellen. Als FAS-positiver Kontrollstamm wurde der EPEC-Stamm E2348/69 mitgeführt und eine PI-negative Färbekontrolle.

3.7.4 **Herstellung zellfreier Stx-Überstände zur Bestimmung der relativen Stx-Freisetzung**

Analog zur Infektion von Epithelzellen wurde das jeweilige Testmedium ohne Epithelzellen mit den *stx*-produzierenden *E. coli*-Stämmen und K12-Stamm C600 für 3 h inokuliert. Die Überstände wurden mit Polymyxin-B inaktiviert und im ELISA untersucht. Die Toxin-Produktion im zellfreien Ansatz wurde zur Bestimmung der basalen, wirtszellunabhängigen Stx-Produktion untersucht. Der Korrekturfaktor war der Quotient aus dem mittleren OD-Wert der Zellkulturüberstände und des jeweiligen epithelzellfreien Ansatzes. Im Vergleich zum zellfreien Ansatz wurde die Toxin-Produktion bei Zellkontakt als hochreguliert betrachtet ab einem Faktor von $\geq 1,5$ und als gehemmt ab $\leq 0,5$. Werte zwischen 0,5 bis 1,5 wurden als wenig reguliert durch Zellkontakt im Vergleich zum zellfreien Ansatz bewertet.

3.7.5 **Gentamicin-Protektions-Test**

Durchführung. Zur absoluten Quantifizierung der bakteriellen Adhäsion und Invasion wurde ein Gentamicin-Protektions-Test modifiziert nach einer Methode von Dibb-Fuller *et al.* (1999)

[271] durchgeführt. Die Infektion der konfluenten Epithelzelllinien erfolgte in 24-well-Zellkulturplatten (Kapitel 3.7.1), dabei wurden je *E. coli*-Stamm 4 Kavitäten infiziert. Analog zum Adhäsionstest erfolgte die Koinkubation für 3 h und 6 h (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung) mit einem Waschschrift (3x 500 µl 1x PBS) und Wechsel des Mediums (1 ml/Kavität) nach 3 h.

Die koloniebildenden Einheiten (KbE) im Inokulum und in drei verschiedenen Zellkompartimenten (Überstand, zellassoziert, intrazellulär) wurden durch Verdünnungsreihen im Tropfplattenverfahren ermittelt. Für die Bestimmung des Keimgehalts im Überstand der Zellkultur wurden die Überstände aus 4 Kavitäten gepoolt. Die Zahl zellassoziierter KbE setzte sich aus der Zahl adhärenter und invasiver KbE zusammen. Nach Ablauf von 3 bzw. 6 h Inkubation wurden nicht adhärenere *E. coli* abgewaschen (3x, 500 µl 1x PBS), die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 (200 µl/Kavität, 4 min) lysiert, im jeweiligen Testmedium (800 µl) aufgenommen und ausplattiert. Der Anteil intrazellulärer Bakterien wurde bestimmt nach Abtötung der extrazellulären *E. coli* mit Gentamicin-Gebrauchslösung (150 µg/ml, 1 ml/Kavität, 1 h, 37 °C, 5 % CO₂), gefolgt von Zell-Lyse und Ausplattieren.

Mindestens 3 biologische Replikate je Wirtszelle und Stamm wurden durchgeführt und die Kontrollstämme 17-2 und C600 mitgeführt. Zur Kontaminationskontrolle wurden nach 6 h Koinkubation die Kulturüberstände mit der Pathovar-PCR und die verwendeten Medien auf Sterilität überprüft. Weiterhin erfolgte eine Wachstumskontrolle der Bakterien ohne Zellrasen.

Auswertung. Die Anzahl adhärenter *E. coli* (KbE) errechnete sich aus der Differenz zellassoziierter KbE und invasiver KbE. Als tatsächliche Invasion wurde nur bezeichnet, wenn signifikant mehr als > 1 % des Inokulums intrazellulär aufzufinden war [272]. Der Invasionsindex errechnete sich nach 3 h als Prozent des eingesetzten Inokulums und nach 6 h als Prozent der zellassozierten KbE nach 3 h. Die Gesamtkeimlast je Kavität addierte sich aus den KbE der drei Kompartimente: Überstand, zellassoziert und intrazellulär.

3.7.6 Messung des transepithelialen Widerstands bei Infektion der CaCo-2-Zellen

Die CaCo-2-Zellen wurden auf Filtereinsätzen (Ø 12 mm, Porengröße 0,4 µm) kultiviert und Monolayer mit einer Resistenz $\geq 400 \Omega \times \text{cm}^2$ wurden als polarisiert bewertet. Einen Tag vor der Infektion wurden bewachsene Filtereinsätze in eine neue 24-well-Zellkulturplatte überführt und mit antibiotikumfreiem Testmedium (1 % D-Mannose) kultiviert. Die Infektion erfolgt im Doppelausatz mit 7,5 µl Inokulat je Filter zu 500 µl Testmedium. Die TEER-Messung erfolge in Triplets je Kavität, unmittelbar vor der Infektion, nach 3 h und 6 h, dazu wurde jeweils ein Filtereinsatz ohne Zellen als Leerwert mitgeführt und nach 3 h erfolgte ein Wechsel des Mediums. Der Stamm 123 induzierte als Negativkontrolle keine Veränderung

des TEER-Werts und der entsprechende Messwert wurde zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt als 100 % gesetzt. Der EPEC-Stamm E2348/69 diente als Positivkontrolle.

3.7.7 Probengewinnung für die Transmissionselektronenmikroskopie

Permanente Epithelzelllinien wurden in 6-well-Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Dabei erfolgte regelmäßig sowie unmittelbar vor der Infektion ein Wechsel des Mediums (2 ml/Kavität). Die Dünndarmzellen (INT 407, FKD-R 971) wurden mit 30 µl Inokulum/Kavität (MOI 20) infiziert und für 3 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung). Die CaCo-2 Zellen wurden mit dem doppelten Volumen infiziert (60 µl Inokulum/Kavität, MOI 40) und verlängert inkubiert (3,5 h). Sechs Kavitäten je getestetem *E. coli*-Stamm (EDL933, LB226692) und eine Mediumkontrolle wurden für die Probengewinnung benötigt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 2,5 %igem Glutaraldehyd in Kakodylatpuffer (pH 7,2) mit 0,1 mol Dextrose (2 ml/Kavität, 4 °C) fixiert. Nach 2 h wurde 1 ml Glutaraldehyd/Kavität entnommen und auf Sterilität geprüft. Der fixierte Zellrasen einer Kavität wurde mit einem Zellschaber gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 1.500 x g). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellsuspension der nächsten Kavität in das Reaktionsgefäß hinzugefügt. Wenn die Zellpellets der sechs Kavitäten vereint waren, wurde dieses mit Kacodylatpuffer (pH 7,2) bedeckt und bei 4 °C gelagert.

Die Präparation der Proben für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung und die Untersuchung erfolgte durch die Arbeitsgruppe 230 „Pathologie und Pathophysiologie“, Institut für molekulare Pathogenese, FLI. Das Zellpellet der jeweiligen Probe wurde zunächst in Agarose eingebettet und in 1mm³ große Würfel geschnitten. Diese wurden mit Osmium nachfixiert, entwässert und in Aradite CY212 eingebettet. Nach der Aushärtung wurden 300 nm dünne Semidünnschnitte am Ultracut hergestellt und mit Toluidinblau gefärbt. In den Semidünnschnitten wurden gezielt Gewebearale für die Ultramikrotomie ausgewählt. Von diesen wurden 80 nm dünne Ultradünnschnitte hergestellt und mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert. [261, 273]. Die Proben wurden im Transmissionselektronenmikroskop bei 80 KV untersucht und die Befunde mit einer Plattenkamera dokumentiert. Der Plattenfilm wurde entwickelt und die Negative mit dem Scan Programm Silverfast 8.0 eingescannt [261, 273, 274].

3.7.8 Probengewinnung für die Analyse im Western Blot

Zur Gewinnung von Gesamtprotein wurden konfluente Zellrasen in Zellkulturflaschen (T₇₅) infiziert (MOI = 20) und für 3,5 h inokuliert. Nicht infizierte Zellkontrollen (nur Testmedium) wurden mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen (1x PBS), trypsiniert (2 ml/T₇₅) und in dem jeweiligen Testmedium aufgenommen (2 ml/T₇₅). Die Zellsuspensionen

wurden auf 2 x 2 ml Reaktionsgefäße verteilt, hitzeinaktiviert (95 °C, 10 min), in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.8 Immunologische Methoden

3.8.1 Immunfärbung zum Nachweis von Zytokeratin und Vimentin

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden die Epithelzellen auf sterilen Deckgläsern (Ø 12 mm) in 24-well-Zellkulturplatten kultiviert. Zytokeratin ist ein Epithelzellmarker [275] und Vimentin das dominante Strukturprotein von mesenchymalen Zellen [276]. Der konfluente Zellrasen wurde zunächst gewaschen (2x, 500 µl 1x PBS) und fixiert (2 % PFA-Gebrauchslösung, 30 min, RT). Jedem Arbeitsschritt folgte ein Waschschrift. Dann wurden die Zellen permeabilisiert (0,1 % Triton X-100, 10 min, RT) und mit 100 % Methanol (15-30 sek, -20 °C) und mit 100 µl 50 nM NH₄Cl (15 min, RT) inkubiert. Die erste Zellfärbung erfolgte mit 100 µl Gebrauchslösung des PE-gekoppelten anti-Vimentin Antikörpers (1 h, RT, dunkel). Dazu wurden der anti-Vimentin Antikörper (1:13 in 1xPBS) und der PE-konjugierte Sekundäntikörper (1:50 in 1xPBS) präinkubiert (30 min, 4 °C, dunkel). Unspezifische Bindungen wurden mit 100 µl/Kavität Blockpuffer (20 min, RT) geblockt und nachfolgend die Zellen mit 50 µl des FITC-markierten anti-Zytokeratin Antikörpers (1:100) gefärbt (1 h, RT, dunkel). Es folgte die Kernfärbung mit 100 µl DAPI-Lösung (1:10.000, 7 min, RT, dunkel) und nach Trocknung wurden die Deckgläser mit einem Tropfen DAPCO-Eindeckmedium auf einen Objektträger fixiert und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.8.2 CD77/Gb₃-Nachweis

Im Durchflusszytometer wurden die Dünndarmepithelzellen (INT 407, FKD-R 971) auf das Vorkommen des Gb₃/CD77-Antigens auf der Zelloberfläche bzw. intrazellulär überprüft. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in FACS-Röhrchen überführt (1 x 10⁶ Zellen/ml) und zentrifugiert (7 min, 4 °C, 150 x g). Zum Nachweis intrazellulär lokalisierten Antigens wurden die Zellen zunächst fixiert (2 % PFA-Gebrauchslösung, 30 min, RT) und permeabilisiert (0,1 % Triton X-100 in 1x PBS, 10 min, RT). Jedem Arbeitsschritt folgte ein Waschschrift, bei dem die Röhrchen mit FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (5 min, 4 °C, 150 x g) und der Überstand dekantiert wurden. Für die erste Färbung wurden jeweils 100 µl der CD77-Antikörper-Gebrauchslösung (1:50 in FACS-Puffer) zu den Zellen pipettiert, kurz resuspendiert und inkubiert (15 min, 4 °C, in Dunkelheit). Nach Zugabe von Blockpuffer (15 min, 4 °C) wurden die Zellen in 100 µl der sekundären Antikörperlösung (anti-IgM-FITC, 1:500 in 1x PBS) inkubiert (15 min, 4 °C, dunkel). Vor der Messung im Durchflusszytometer erfolgten noch zwei Waschschriffe. Als Kontrollen wurden ungefärbte bzw. nur mit dem Sekundär-Antikörper behandelte Zellen mitgeführt. Für die durchfluss-

zytometrische Auswertung wurden Auswertefenster anhand der ungefärbten Kontrollen ausgerichtet (verwendete Spannung: FSC=165; SSC=300).

3.8.3 Western Blot-Analyse zur Markierung von Zytoskelettausstattung

Einzelne Bestandteile des Zytoskeletts (*tight junction*-Protein ZO-2, Zytokeratin und Vimentin) wurden in den Zellen durch Isolation des Gesamtproteins, Auftrennung mittels SDS-PAGE, Übertragung auf eine PVDF-Membran und Immunfärbung nachgewiesen.

Proteinisolation. Hitzeinaktivierte Zellkulturproben (Kapitel 3.7.8) wurden zentrifugiert (5 min, 400 x g, RT), dann je nach Größe des Zellpellet in 20 µl bis 50 µl NT/NP40-Puffer aufgenommen, gemischt (mind. 30 sek) und erneut zentrifugiert (20 min, 16000 x g, 4 °C). Im Überstand befand sich nun das Gesamtprotein, welches bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurde.

SDS-PAGE. Zunächst wurde ein Polyacrylamidgel hergestellt, das zu 3/4 aus einem Trenngel mit aufgelagertem Sammelgel bestand. Die Proben (100 µl) wurden mit 50 µl SSB-Probenpuffer versetzt und für 5 min gekocht. Für den Elektrophorese-Lauf wurde das Gel mit Anoden-/Kathodenpuffer bedeckt und 10-30 µl der Proben sowie in mindestens einer Spur ein Standard mit definiertem Molekulargewicht aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA, bis die blaue Lauffront das Gelende erreichte. Dann wurde das Gel entnommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel im Westernblot weiterverarbeitet.

Western Blot. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte mit dem *semi-dry*-Verfahren in einem elektrischen Feld (12 V, 15 min). Für den *blot* wurden zwischen die Anode und die Kathode zwei Transferpuffer-getränkte *blotting*-Filterpapiere, eine PVDF-Membran, das Trenngel und schließlich wieder zwei getränkte *blotting*-Filterpapiere gestapelt. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol eingelegt (15 sek) und in *A. dest.* gewaschen (2 min). Zunächst wurden freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit Blockierlösung (16-18 h, RT, ab jetzt alle Inkubationsschritte unter Schütteln) geblockt. Nach dreimaligem Waschen (PBS-Tween, 10 min, RT) wurden die PVDF-Membran mit den in PBS-Tween verdünnten Primäntikörper inkubiert (16-18 h, 4 °C oder 2 h, RT). Nach dreimaligem Waschen (PBS-Tween, 5 min, RT) wurde die PVDF-Membran mit dem jeweiligen Sekundäntikörper (PBS-Tween) inkubiert (1,5 h, RT). Es folgten zwei Waschschrte mit PBS-Tween und einer mit Alkalischem Phosphatase-Puffer (je 5 min, RT). Die Zugabe des Substrats erfolgte in der Immunfärbelösung (10-30 min, RT) und wurde durch Abspülen des *blots* mit *A. dest.* beendet, sobald die Reaktionsbanden deutlich blau bis violett erschienen. Abschließend wurde der *blot* auf Filterpapier getrocknet und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

3.8.4 Durchflusszytometrische Untersuchung

Im Rahmen einer Infektionsstudie mit Kälbern (Kapitel 3.10) wurden PBMC isoliert, *in vitro* stimuliert (Kapitel 3.6.7) und auf die Expression von Oberflächenmarkern und Proliferation im Durchflusszytometer untersucht. Die Antikörperverdünnungen (**Tabelle 5** und **Tabelle 6**) wurden in FACS-Puffer (4 °C, in Dunkelheit) angesetzt und die jeweiligen primären (CD4, CD25, CD45) und sekundären Antikörperkombinationen hergestellt. Nach Ablauf der Stimulation wurden 5×10^5 - 1×10^6 PBMC in 5 ml-FACS-Röhrchen überführt und gewaschen. Für einen Waschschrift wurden die FACS-Röhrchen mit FACS-Puffer (4°C) aufgefüllt, zentrifugiert (5 min, 150 x g, 4 °C) und der Überstand dekantiert. Die Zellpellets wurde in 50 µl der verdünnten Primäntikörperlösung resuspendiert und inkubiert (mind. 20 min, 4 °C, dunkel). Es folgte ein Waschschrift und nachfolgend wurden die Zellen in 50 µl der Sekundär-Antikörperlösung resuspendiert und inkubiert (mind. 20 min, 4 °C, dunkel). Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet mit dem direkt markierten CD8-Antikörper resuspendiert und inkubiert (mind. 20 min, 4 °C, dunkel). Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Messung am Durchflusszytometer BD FACSCanto™, dazu wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung mit Propidiumjodid (1:10.000) versetzt.

Zur Probenanalyse wurde ein BD FACSCanto™ II- Flow Cytometry System eingesetzt. Dabei wurden bis zu 30.000 Ereignisse mit der BD FACSDiva™ Software gemessen. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mittels FlowJo_V10 Software.

3.8.5 ELISA

Der Stx-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mit dem kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA „RIDASCREEN® Verotoxin“ nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Die durch Polymyxin-B inaktivierten Zellkulturüberstände wurden unverdünnt oder 1:3 verdünnt im Waschpuffer des ELISAs eingesetzt und parallel mittels *stx1/stx2*-Duplex-PCR überprüft. Bei der Auswertung wurden nur Proben mit mindestens der Extinktion der Kit-internen Negativkontrolle + 0,1 als positiv bewertet. Werte unterhalb dieses Grenzwertes wurden als negativ (0) gesetzt. Für eine semiquantitative Aussage wurde der lineare Messbereich des ELISAs durch Titration einer stark toxischen Probe (*E. coli*-Stamm 12E0114) ermittelt und interne Kontrollen (C600/Hep-2 und EDL933/CaCo-2) mitgeführt.

3.9 Molekulargenetische Methoden

3.9.1 Präparation von RNS

Zellernte zur RNS-Gewinnung. Für die RNS-Gewinnung aus adhärenenten Epithelzellen oder primären Makrophagen wurde der Zellrasen (max. 1×10^7 Zellen) nach Entfernung des

Mediums mit 1x PBS gewaschen, die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer (1 % β-Mercaptoethanol) lysiert und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren.

RNS-Isolation. Die RNS-Isolation wurde mittels RNeasy® Mini Kit nach Herstellerangaben (Protokoll: *Purification of total RNA from animal cells using spin technology*) vorgenommen. Die eingefrorenen Proben wurden aufgetaut (20 min, 37 °C) und 350 µl Probenmaterial mittels QIAshredder-Säule (Zentrifugation, 2 min, RT, max. g-Zahl) homogenisiert. Nach Zugabe von 350 µl 70 %igem Ethanol (-20 °C) wurden 700 µl Lysat auf eine RNeasy® Mini Säule gegeben und zentrifugiert (30 sek, 8.000 x g). Der Durchfluss wurde verworfen und nach einem Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer (Zentrifugation 30 sek, 8.000 x g) die DNS in den Proben durch Zugabe von 80 µl DNase-Gemisch (DNase I-Stammlösung (ca. 27 U) in RDD-Puffer [1:7]) verdaut. Nach Inkubation (15 min, RT) folgte ein Waschschriff mit RW1-Puffer (350 µl, Zentrifugation 15 sek, 8.000 x g) und einer mit RPE-Puffer (500 µl, Zentrifugation 15 sek, 8.000 x g). Es wurde nochmal RPE-Puffer (500 µl) hinzupipettiert und zentrifugiert (2 min, 12.600 x g). Die Säule wurde auf ein neues, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgesetzt, in das bei der RNS-Isolation aus primären Zellen (bovine Kolonkrypten und primäre Makrophagen) 1,5 µl RNase Inhibitor (ca. 60 Units) vorgelegt wurden. Für die Elution von RNS aus primären Zellen wurde 30 µl DEPC-Wasser, aus permanente Zellen 50 µl DEPC-Wasser direkt auf die Membran pipettiert und zentrifugiert (1 min, 12.000 x g). Die RNS im Eluat wurde sofort auf Eis gestellt, schockgefroren (-196 °C), bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert und ein Aliquot (à 2,5 µl) für die Konzentrationsmessung der RNS im NanoDrop verwendet.

RNS-Quantifizierung/Qualifizierung. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNS wurde spektrophotometrisch im NanoDrop bestimmt. Hierzu wurden 1,5 µl auf die Messeinheit aufgetragen und gegen einen Leerwert (DEPC-Wasser) gemessen. Einschlusskriterien für isolierte RNS waren: Der Quotient aus den Messwerten bei 260 und 280 nm liegt zwischen 1,8–2,0, der Quotient aus den Messwerten bei 260 und 230 zwischen 1,8–2,2.

3.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die verwendeten Oligodesoxyribonuklotide (*primer*) sind in **Tabelle 3** und **Tabelle 4** aufgelistet. Die PCRs wurden auf Eis pipettiert und mit den jeweiligen Parametern in einem *thermocycler* durchgeführt.

3.9.2.1 *stx1/stx2*-Duplex-PCR

Ein Reaktionsansatz (30 µl) der *stx1/stx2*-Duplex-PCR [243] enthielt 18,3 µl *A. dest.*, 1xNH₄-Mix, 2 mM MgCl₂, 0,5 µM je Primer, 133 µM je Nukleotid, 0,5 U/µl PanScript-Polymerase und als *template* 3 µl Hitzelysate der jeweiligen Bakteriensuspension (Kapitel 3.5.3). Als Positiv-

Kontrolle diente der *stx1*- und *stx2*-positive *E. coli*-Stamm EDL933, als Negativkontrolle wurde anstelle der Bakteriensuspension *A. dest.* eingesetzt. Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert und sofort in den *thermocycler* gestellt. Die Amplifikation erfolgte nach dem folgenden Temperaturprofil: Nach 60 sek Denaturierung (95 °C) folgten 34 Zyklen mit jeweils 20 sek Denaturierung (95 °C), 60 sek Anlagerung (55 °C) und 30 sek Verlängerung (72 °C). Jede Amplifikation wurde mit einem Verlängerungsschritt (5 min, 72 °C) beendet. Die Auswertung erfolgte in 2 %igen TBE-Agarosegelen nach Ethidiumbromid-Färbung.

3.9.2.2 Pathovar-PCR

Ein Reaktionsansatz (25 µl) der verwendeten Multiplex-PCR [243] setzte sich zusammen aus einem Multiplex-PCR 5x Master Mix Kit, 3,75 µl (25-100 nM je Primer) Multiprimermix (**Tabelle 3**), 15,25 µl *A. dest.* und 1 µl Hitzelysats des jeweiligen Bakterienstammes. Als Negativkontrolle wurden bei jeder PCR anstelle des Hitzelysats *A. dest.* und als Positivkontrolle Hitzelysate von Stämmen unterschiedlicher Pathovaren [EDL933 (EHEC), E2348/69 (EPEC), 76-5 (EIEC), 17-2 (EAEC)] eingesetzt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Amplifikation im *thermocycler* nach folgendem Profil: Nach 15 min Denaturierung (94 °C) folgten anschließend 29 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung (94 °C), 30 sek Anlagerung (63 °C) und 90 sek Verlängerung (72 °C). Die abschließende Verlängerung dauerte 5 min bei 72 °C. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Elektrophorese von 2 %iger TBE-Agarosegelen.

Agarosegel-Elektrophorese. Die Auftrennung der PCR-Amplifikate und qRT-PCR-Produkte erfolgte in 2 - 3 %igen Agarosegelen (mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid-Gebrauchslösung) in 1x TBE-Laufpuffer (ca. 6 V/cm Elektrodenabstand, 45 min). Vor dem Auftragen wurden 5 µl der PCR-Produkte mit 2 µl Ladepuffer gemischt und als Standard der GeneRuler® 100bp DNA Ladder Plus oder der GenRuler Low Range DNA Ladder mitgeführt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht im Geldokumentationssystem.

3.9.2.3 real-time quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Transkription bestimmter Zielgene aus Wirts- und Bakterienzellen wurde eine *two-step* qRT-PCR durchgeführt. Die zwei Schritte bestanden aus der reversen Transkription der mRNS, gefolgt von einer Polymerase-Kettenreaktion.

cDNS Synthese. Die cDNS (*complementary-DNA*)-Synthese aus isolierter RNS erfolgte unter Verwendung des Omniscript Reverse Transkription-Kits nach Herstellerangaben. Hierfür wurden 500 ng der isolierten mRNS-Proben in einem Volumen von 24 µl denaturiert (5 min, 65 °C). Die Umschreibung der Gesamt-RNS (eu- und prokaryotische RNS) in unspezifische cDNS erfolgte durch Inkubation (60 min, 37 °C) mit reverser Transkriptase. Ein Reaktionsansatz (40 µl) enthielt 1 µM *random* Hexanukleotide, 10 Units RNase Inhibitor, 8 Units Reverse Transkriptase, 1xRT-Puffer, 0,5 mM dNTP-Mix und 24 µl der vorverdünnten

RNS-*templates*. Als Kontrolle wurde ein minusRT-Ansatz mit 500 ng RNS verschiedener Proben aber ohne reverse Transkriptase zu Überprüfung auf Verunreinigung mit genomischer DNS mitgeführt. Außerdem wurde das für die Verdünnung der RNS-Proben verwendeten *A. dest.* auf Reinheit kontrolliert. Am Ende wurde die reverse Transkriptase inaktiviert (5 min, 93 °C) und die cDNS in die nachfolgende qRT-PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

qRT-PCR. Die Quantifizierung der mRNS-Transkription bestimmter Zielgene wurde mittels *real-time* RT-PCR unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I durchgeführt. Für die quantitative Untersuchung der Genexpression wurde *template*-cDNS eingesetzt. Die qRT-PCR-Reaktionen erfolgten in Mikrotiterplatten (MicroAmp® Optical 96-well *reaction plates*) in einem 7500 Fast Real-Time PCR System nach Herstellerangaben. Ein qRT-PCR Reaktionsansatz (25 µl) enthielt 1x SYBR® Green PCR Master Mix Kit (12,5 µl) und als *template* entweder 1,25 µl der cDNS für die Wirtszellgenexpression oder 2 µl cDNS für die *E. coli*-Virulenzgenexpression. Eine finale Konzentration von 450 nM je *primer* war ebenfalls enthalten (2,25 µl einer *primer*-Verdünnung (5 pmol/µl)). Jede Reaktion (cDNS-Probe und *primer*-Paar) wurde im Doppelansatz durchgeführt und Negativkontrollen (H₂O/minusRT-Ansatz) sowie eine Positivkontrolle (cDNS-Mischung aus mehreren Proben) wurden bei jedem Durchgang mitgeführt.

Das Temperaturprofil für jede Amplifikationsreaktion beinhaltete 1 Zyklus bei 50 °C für 2 min, 1 Zyklus bei 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 Minute und Fluoreszenzmessung. Eine Schmelzkurve (Dissoziationsschritt) wurde an jede Amplifikation angeschlossen zur Überprüfung des Vorhandenseins eines spezifischen PCR-Produkts 95 °C (15 sek), 60 °C (1 min), Fluoreszenzmessung, 95 °C (15 sek), 60 °C (1 min). Die Fragmentlänge des amplifizierten Produktes wurde außerdem stichprobenartig durch Auftragen auf ein 3 %iges TBE-Agarosegel überprüft.

Die relative Quantifizierung der Zytokingenexpression erfolgte nach der Effizienz-korrigierten Methode von Pfaffl unter Verwendung der Software REST© (*relative expression software tool*) [277, 278]. Dazu erfolgte die Schätzung der jeweiligen *primer*-Effizienzen (E) durch Berechnung der linearen Regression mit dem Programm LinRegPCR (Version 11.0, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Amsterdam, Niederlande). Als Datengrundlage dienten die Amplifikationskinetiken der individuellen Proben jedes einzelnen PCR-Laufs [279, 280].

Die Wirtszellantwort wurde in Relation zur Genexpression des avirulenten K12-Stamms C600 angegeben. Bei Signifikanz wurde eine Genexpression ab ≥ 2 als Hochregulation, 0,5–2 als unverändert und Werte $\leq 0,5$ als Herabregulation bewertet. Als

Stimulationskontrollen wurden *E. coli*-LPS (25 µg/ml) und eine hitzeinaktivierte Suspension des Hybridstammes („TotLB226692“) mitgeführt. Das inaktivierte Inokulat wurde mit 5×10^7 KbE/ml eingesetzt, um eine vergleichbare Stimulation (KbE/ml) über die Inkubationsdauer zu erzielen, wie bei Inokulation mit lebenden *E. coli*-Bakterien, die mit $6 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$ KbE/Kavität eingesetzt wurden. Dazu wurde zunächst der Wachstumskoeffizient des Hybridstammes in den Kavitäten von 0-3 h und 3-6 h berechnet und die daraus resultierende mittlere KbE in den Kavitäten über die Inkubationszeiträume bestimmt. Diese betrug bei dem Hybridstamm zum Zeitpunkt 0-3 h $1,55 \times 10^8 \pm 8,55 \times 10^7$ KbE/ml und zum Zeitpunkt 3-6 h $1,16 \times 10^8 \pm 5,44 \times 10^7$ KbE/ml.

Die relative Quantifizierung der Virulenzgenexpression der verschiedenen *E. coli*-Stämme wurde mittels der Δ CT-Methode errechnet, durch Differenzbildung der CT-Werte des Ziel- und des Referenzgens. Dies ermöglicht die Normalisierung der CT-Werte auf das *house-keeping* Gen (interne Kontrolle), den Ausgleich von Variationen in verwendeten cDNS-Mengen und die Standardisierung des CT-Wertes auf die Bakterienzahl. Eine Genregulation ≥ 2 wurde als Hochregulation betrachtet.

3.10 Tierexperimentelle Studie

3.10.1 Versuchsaufbau

Die Studie ist ausführlich in der Dissertationsschrift von Dr. Katharina Hamm beschrieben und wurde unter S3**⁻-Bedingungen in den Räumen der experimentellen Tierhaltung des Friedrich-Loeffler-Instituts, Insel Riems, durchgeführt [212]. Die Kälber (15 Holstein-Friesian-Kälber, 3-4 Monate, weiblich) wurden in 3 Gruppen à 5 Kälber eingeteilt und räumlich getrennt voneinander gehalten. Die experimentelle Infektion der Kälber erfolgte oral via Pansen-Sonde mit 10^{10} KbE/ml. Die 1. Gruppe (Negativkontrolle) wurde mit einem avirulenten Stamm (123, **Tabelle 1**) infiziert, der im Kalb nicht adhäriert. Die 2. Gruppe (Positivkontrolle) wurde mit einem klassischen EHEC-Erreger des Serotyps O157:H7 (86-24^{Nal}) infiziert, der im Rind kolonisieren kann. Kälber der 3. Gruppe wurden mit dem Hybridstamm (LB226692) infiziert.

3.10.2 Probengewinnung

Zur Untersuchung der zellvermittelten Immunantwort wurden PBMC der Kälber stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Kapitel 3.6.7). Die Blutentnahme erfolgte steril durch Punktion der *Vena jugularis* in ein geschlossenes, Na-Citrat-haltiges, kommerzielles Blutentnahmesystem (S-Monovette® mit Multiadapter). Die Beprobung erfolgte am Tag 0 vor der Inokulation sowie *post infectionem* nach 7, 14, 21 und 28 Tagen.

3.11 Statistische Auswertung

Es wurde das Programm IBM® SPSS® Statistics (Softwareversion 19, Firma IBM Corporation, Armonk, New York, USA) verwendet. Auf Grund des geringen Stichprobenumfangs (n=3-5) wurden nicht parametrische, exakte Testverfahren angewendet. Für unverbundene Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, für verbundene Proben der Wilcoxon-Rangsummen-Test. Als Signifikanzniveau wurde eine zweiseitige, exakte Signifikanz bewertet bei p-Werten $\leq 0,05$. Die Datensätze wurden jeweils nach verschiedenen Parametergruppen ausgewertet (*E. coli*-Stamm, Serotyp, Ursprungswirt und Pathotyp).

Die statistische Auswertung der unterschiedlichen Genexpression in der qRT-PCR erfolgte gruppenweise unter Verwendung der Software REST® (*relative expression software tool*) mit dem Randomisierungstest [277, 278].

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz des Gentamicin-Protektions-Tests wurde, wie beschrieben, der *Student's t-test* verwendet [272].

Im Rahmen der Kälberinfektionsstudie wurden signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der stimulierten PBMC aus den unterschiedlichen Tiergruppen durch den Kruskal-Wallis-Test und den *post hoc* Dunn's Test berechnet [281]. Dazu wurde das Programm GraphPad Prism 7 (©2016 GraphPad Software, Inc.) verwendet. Wenn signifikante Unterschiede vorlagen, wurde zusätzlich der Mann-Whitney-U Test durchgeführt zum statistischen Vergleich von je 2 Tiergruppen zu jedem Zeitpunkt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Zellsysteme und *E. coli*-Stämme

4.1.1 Epithelzellmodelle

Bovine Kolonkryptenzellen (PC)

Die isolierten, strumpfartigen Kolonkrypten hefteten sich zügig an die Kollagen-beschichteten Kulturgefäße an. Nach 24 h Kultivierung proliferierten bereits deutlich pflastersteinartige Zellen um die Kolonkrypten (**Abbildung 2**). Die auswachsenden Kolonzellen proliferierten, bis ca. am 5. Tag in Kultur ein geschlossener, einschichtiger Zellrasen vorlag. Der heterogene Zellrasen setzte sich zusammen aus Kryptenresten und umgebenden, ausgewachsenen Kolonzellen mit pflastersteinartiger Morphologie.

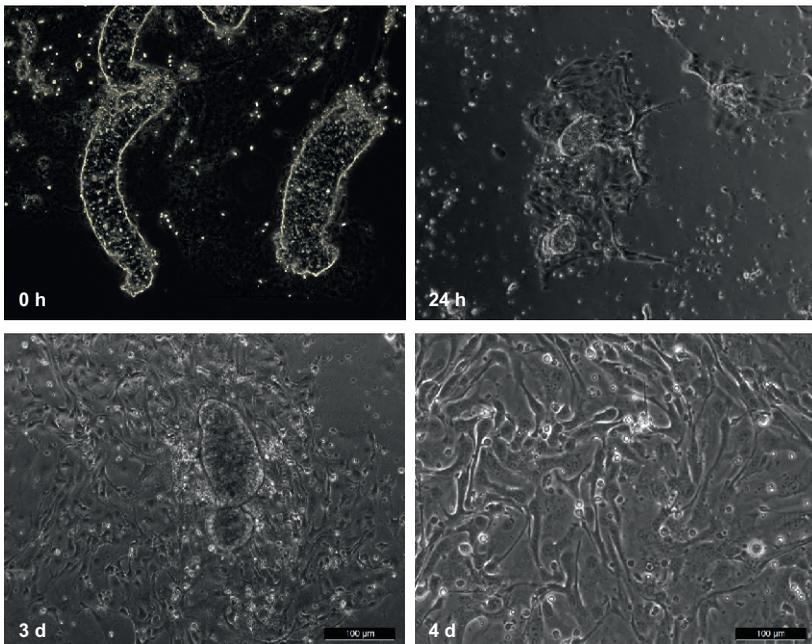


Abbildung 2: Entwicklung von Kulturen primärer, boviner Kolonkryptenzellen

Lichtmikroskopische Aufnahmen frisch präparierter Kolonkrypten (0 h) und von Primärkulturen boviner Kolonzellen nach 24 h sowie 3 bzw. 4 Tagen in Kultur

Die Epithelzelldifferenzierung der Kolonkryptenzellen bestätigte sich am 4. Kultivierungstag, einen Tag vor der Infektion, durch den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Epithelzellmarkers Zytokeratin und das Fehlen von Vimentin (**Abbildung 9**). Weiterhin erfolgte die Detektion von Zytokeratin, Vimentin und des ZO-2-Proteins, ein *tight junction* assoziiertes Protein in den Western Blot-Analysen (nicht gezeigt).

Bovine FKD-R 971-Dünndarmzellen

Lichtmikroskopisch bildete die embryonale FKD-R 971-Zelle einen homogenen, wirbelartigen, dichten Zellrasen mit spindelförmiger Zellmorphologie aus (**Abbildung 4**). Ultrastrukturell stellten sich die FKD-R 971-Zellen undifferenziert dar, mit spindelförmigem Aussehen und mit nur vereinzelt feinen Mikrovilli auf der Zelloberfläche. Die FKD-R 971-Zellen enthielten einen großen Zellkern sowie "*multivesicular bodies*" und Phagolysosomen im Zytoplasma. Der lockere, mehrlagige Zellverband setzte sich aus stark überlappenden Zellen zusammen. Beim Wachstum auf festem Untergrund bildeten FKD-R 971-Zellen nur rudimentäre Zellverbindungen aus, ohne deutlich erkennbare Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) und nur schwach erkennbare Zellpolarisation.

In FKD-R 971-Zellen wurde der Epithelzellmarker Zytokeratin, aber auch Vimentin immunfluoreszenzmikroskopisch (**Abbildung 9**) und bei den Western Blot-Analysen (**Abbildung 10**) detektiert. Zusätzlich exprimierten FKD-R 971-Zellen das ZO-2-Protein (Western Blot-Analyse). Bei der Kultivierung auf Filtern bildeten die FKD-R 971-Zellen aber keinen messbaren Anstieg des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER-Wert) aus (**Abbildung 11**), der als indirektes Maß zur Ausbildung funktioneller *tight junctions* gilt.

Im Durchflusszytometer stellten sich die FKD-R 971-Zellen als einheitliche Population (Größe im FSC (*forward scatter*): 20-100) mit starker Autofluoreszenz dar. Gb₃/CD77 konnte weder auf der Zelloberfläche (**Abbildung 3**) noch intrazellulär nachgewiesen werden. Ein vernachlässigbar schwaches FITC-Fluoreszenzsignal zeigte sich bereits bei den ungefärbten und sekundären Antikörper-Kontrollen.

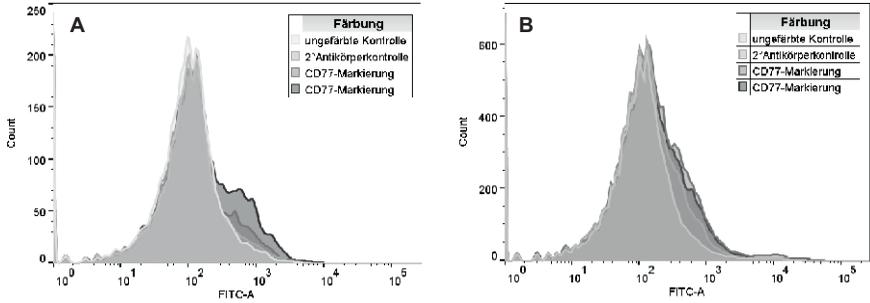


Abbildung 3: Overlay-Darstellung der Gb₃/CD77-(FITC)-Markierung von nicht permeabilisierten Zellen

A FKD-R 971-Zellen

B INT 407-Zellen

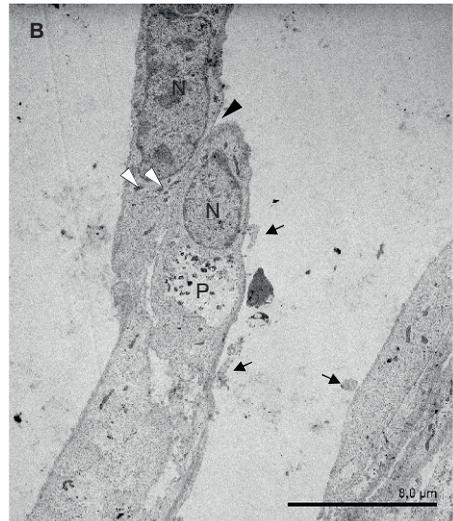
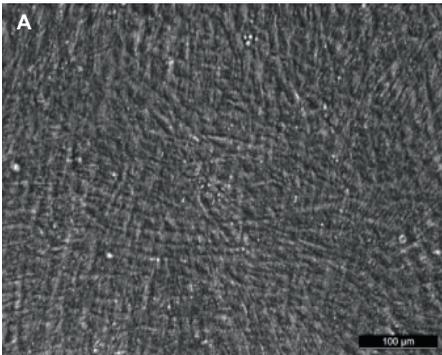


Abbildung 4: Morphologie von FKD-R 971-Zellen

A Lichtmikroskopische Aufnahme des homogenen Zellrasens von auf Filtern kultivierten Zellen

B Elektronenmikroskopische Aufnahme überlappender Einzelzellen mit rudimentären Mikrovilli (Pfeile, beispielhaft), ohne deutliche Zellverbindungen (Pfeilspitze schwarz) oder Polarisation bei Kultivierung auf Plastikoberfläche; Nukleus (N), Mitochondrien (Pfeilspitze weiß, beispielhaft), Phagolysosom (P)

Humane INT 407-Dünndarmzellen

Die embryonale INT 407-Zelllinie wies lichtmikroskopisch eine epitheloide Zellmorphologie auf. Dennoch bildeten die Zellen nur einen löchrigen Zellrasen aus, der aus Zellinseln und einer Vielzahl abgerundeter, aufliegender Einzelzellen bestand (**Abbildung 5**). Ultrastrukturell bildeten INT 407-Zellen einen mäßig polarisierten Zellverband, mit deutlich epitheloidem, einschichtigem Zellwachstum (**Abbildung 6**). Die Einzelzellen waren längsoval, mit einem großen, längsovalen Zellkern, der häufig nah der apikalen Oberfläche lokalisiert war. Das Zytoplasma wies viele Mitochondrien, ansonsten aber wenig Organellen auf. Die INT 407-Zellen zeigten auf der apikalen Membran in variabler Ausprägung teils viele lange, verzweigte und teils kurze, einzelne Mikrovilli. Die *tight junctions* waren rudimentär, trotz partiell vollständiger Fusion von benachbarten Zellmembranen. Oft lagen INT 407-Zellen überlappend ohne Verzahnung, sogenannte Interdigitation, vor (**Abbildung 6**).

Die Epithelzeldifferenzierung der INT 407-Zellen bestätigte sich immunfluoreszenzmikroskopisch durch das Vorhandensein von Zytokeratin und das Fehlen von Vimentin (**Abbildung 8**). In den Zellen wurde bei den Western Blot-Analysen Zytokeratin (**Abbildung 10**) und ZO-2-Protein detektiert (nicht gezeigt). Ebenfalls lag ein schwaches Signal für Vimentin vor (Western Blot-Analyse, **Abbildung 10**). Bei der Kultivierung auf Filtern bildeten die Zellen lichtmikroskopisch einen löchrigen Zellrasen aus und es fehlte ein messbarer Anstieg des TEER-Werts (**Abbildung 11**).

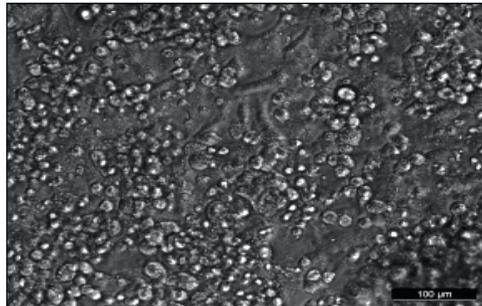


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme des löchrigen Zellrasens von auf Filtern kultivierten INT 407-Zellen

Im Durchflusszytometer erwiesen sich die INT 407-Zellen als einheitliche Population (Größe im FSC (*forward scatter*): 10-50) mit starker Autofluoreszenz. Gb3/CD77 war nicht nachweisbar, weder auf der Zelloberfläche noch intrazellulär (**Abbildung 3**).

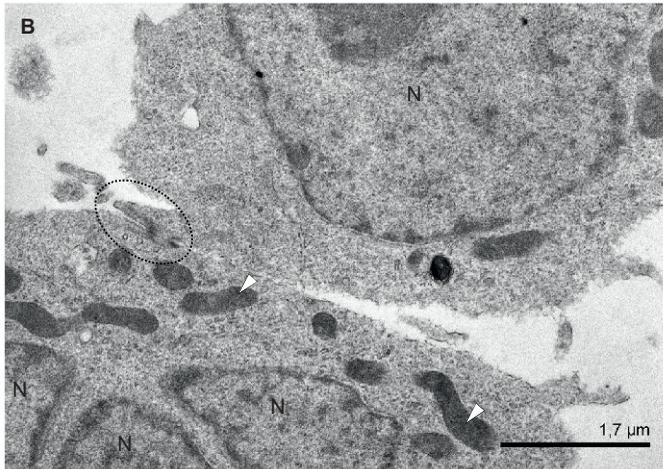
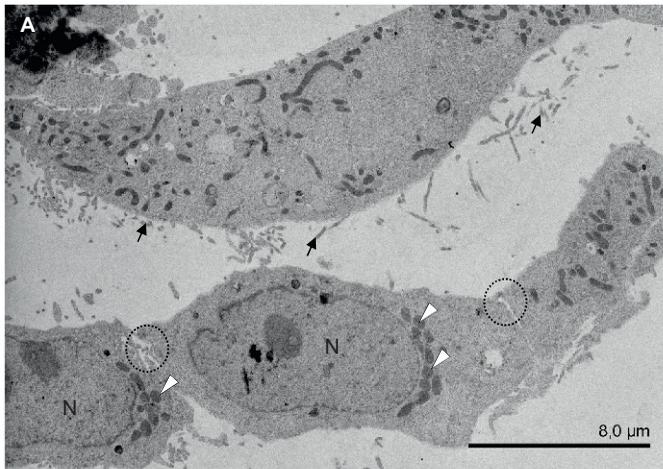


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der INT 407-Zellen bei Kultivierung auf Plastikoberfläche

A Epithelartiger Zellverband mit unregelmäßigen, teils langen Mikrovilli (Pfeile, beispielhaft) auf apikaler Seite und rudimentären *tight junctions* (gestrichelter Kreis). Nukleus (N), Mitochondrien (Pfeilspitze weiß, beispielhaft)

B Zellen mit *tight junction* (gestrichelter Kreis), Nukleus (N), Mitochondrien (Pfeilspitze weiß, beispielhaft)

Humane CaCo-2-Dickdarmzellen

Die CaCo-2-Zellen bildeten einen pflastersteinartigen, heterogenen Zellrasen aus, mit Kuppelbildung bei Kultivierung auf einer Plastikoberfläche (**Abbildung 7**). Auch ultrastrukturell wiesen CaCo-2-Zellen Epithelmorphologie auf, gekennzeichnet durch deutliche Polarisierung, kubisch bis hochprismatische Zellmorphologie, Ausbildung von *tight junctions* und einem deutlichen Mikrovillisaum auf der apikalen Seite. CaCo-2-Zellen lagen in einem einreihigen Epithelzellverband vor. Auffällig war die starke intra- und interzelluläre Vakuolisierung der CaCo-2-Zellen (**Abbildung 8**).

Die Epithelzelldifferenzierung der CaCo-2-Zellen bestätigte sich durch das Vorhandensein von Zytokeratin und das Fehlen von Vimentin, immunohistochemisch (**Abbildung 9**) und bei Western Blot-Analysen (**Abbildung 10**). CaCo-2-Zellen exprimierten das ZO-2-Protein. Bei der Kultivierung auf Filtern bildeten die Zellen einen deutlich polarisierten Phänotyp aus mit funktionellen *tight junctions*, gekennzeichnet durch den Anstieg des TEER-Wertes über die Kultivierungszeit (**Abbildung 11**). Der TEER-Anstieg korrelierte mit der lichtmikroskopischen Entwicklung des Zellrasens auf Filtern, von kleinen, vereinzelt Zellen, über Zellhaufen bis hin zu einem heterogenen, dichten Zellrasen.

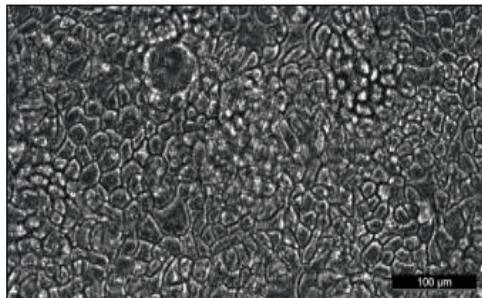


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen des heterogenen Zellrasens von auf Filtern kultivierten CaCo-2-Zellen

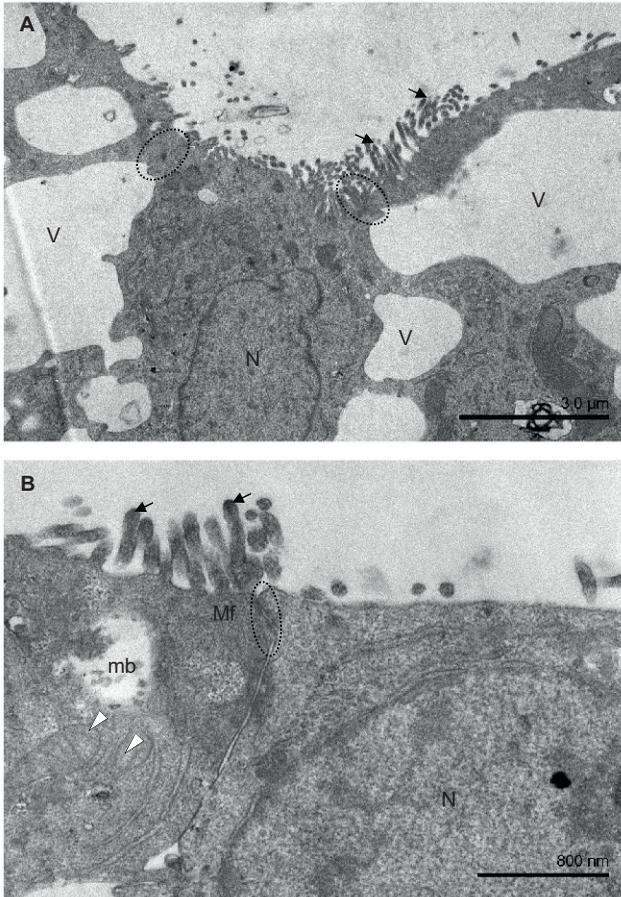


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen polarisierter CaCo-2-Zellen bei Kultivierung auf Plastikoberflächen

A Zellverband aus kubisch bis hochprismatischen Zellen mit elektronendichten *tight junctions* (gestrichelter Kreis), Mikrovilli (Pfeil, beispielhaft) und zahlreichen großen intra- und interzellulären Vakuolen (V, beispielhaft), Nukleus (N)

B Zellen mit Mikrovilli (Pfeil, beispielhaft), feinen Mikrofilamenten (Mf), elektronendichter *tight junction* (gestrichelter Kreis), Mitochondrien (Pfeilspitze weiß, beispielhaft), Nukleus (N) und *multivesicular bodies* (mb)

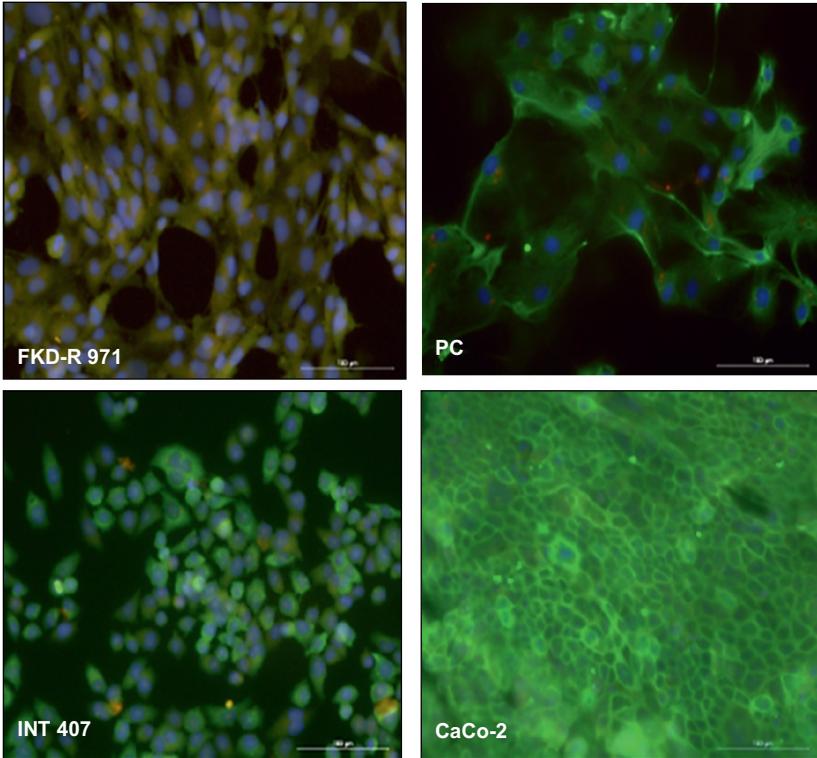


Abbildung 9: Zytoskelettausstattung intestinaler Epithelzellen
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: Zytokeratin = Epithelzellmarker (grün, FITC); Vimentin = Marker für Zellen mesenchymaler Herkunft (rot, PE); Kernfärbung (blau, DAPI)

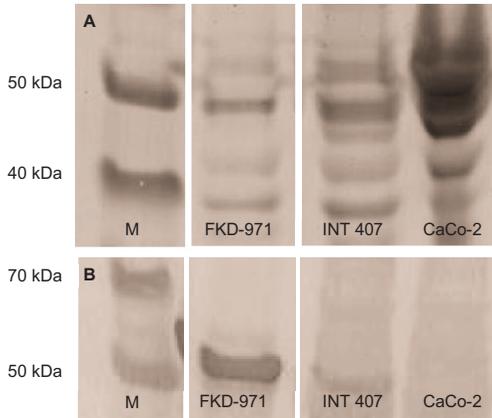


Abbildung 10: Nachweis von Zytokeratin und Vimentin in permanenten Epithelzellen mittels Western Blot

Die Größe der Banden des **M**: Molekularmassen-Standards (in Kilodalton, kDa) wurde am Rand aufgetragen; **A**: Zytokeratin (Nachweis mit Antikörper, der ein bei vielen Zytokeratinen konserviertes Epitop erkennt; 45 – 59 kDa) und **B**: Vimentin (55 kDa)

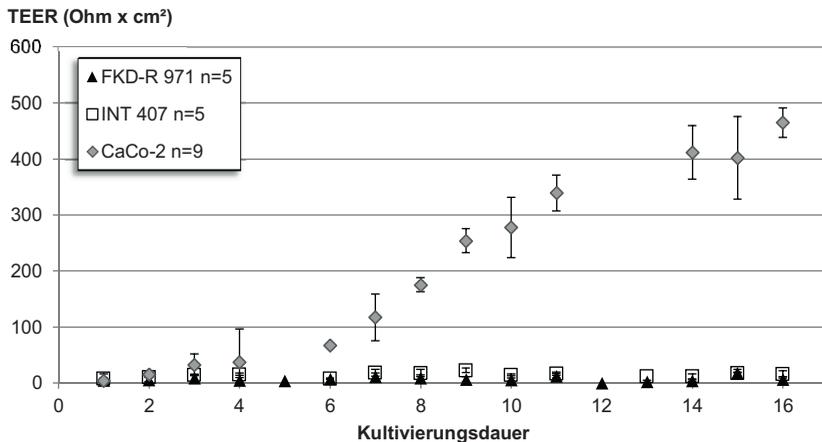


Abbildung 11: Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Darstellung der TEER-Entwicklung von auf Filtern (0,4 µm Porengröße) kultivierten Zelllinien über 16 Tage

4.1.2 Charakterisierung der verwendeten *E. coli*-Stämme

Überprüfung der verwendeten *E. coli* mittels konventioneller PCR

Das Vorhandensein pathovarspezifischer Virulenzgene bei den *E. coli*-Stämmen wurde vor und nach den Infektionsstudien jeweils mittels Pathovar-PCR überprüft.

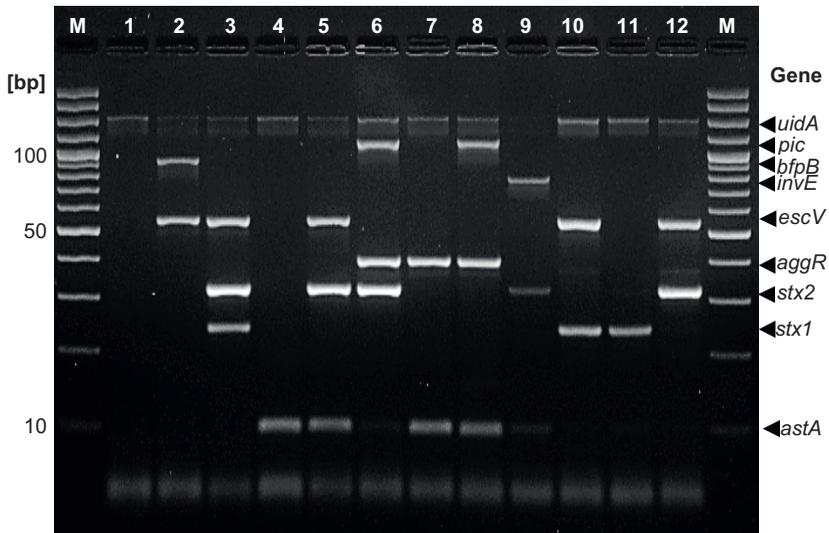


Abbildung 12: Pathovar-PCR zum Nachweis von *E. coli*-Virulenzgenen, modifiziert nach Müller *et al.* (2007) [243], beispielhafte Darstellung

M: Molekularmassen-Standard, **1:** *E. coli* K12 C600, **2:** EPEC E2348/69, **3:** EHEC EDL933, **4:** avirulenter *E. coli* 123, **5:** EHEC 86-24, **6:** EHEC/EAEC LB226692, **7:** EAEC 17-2, **8:** EAEC 55989, **9:** EIEC 76-5, **10:** STEC 12E0114, **11:** STEC 2403, **12:** STEC 12E0111

Der Hybridstamm war, wie erwartet, positiv für *stx2*, *aggR* und *pic*. Zum Vergleich mit dem Hybridstamm wurden Typstämme verschiedener gastrointestinaler *E. coli*-Pathovaren (EHEC/EAEC, EHEC, STEC, EAEC, EIEC, EPEC) und avirulenter *E. coli* (avirulenter *E. coli*-Stamm 123, K12-Stamm) verwendet. Klassische Vertreter der EAEC wiesen *astA*, *aggR* und zum Teil *pic* auf, klassische STEC- und EHEC-Stämme waren positiv für *stx1* oder/und *stx2* und zum Teil *escV*. Der avirulente K12-Stamm C600 enthielt keines der getesteten Virulenzgene, der avirulente *E. coli* 123 nur das Gen *astA*. Der EPEC-Stamm besaß *bfpB* und *escV* und der EIEC-Stamm *invE*.

Negativkontrastdarstellung im Elektronenmikroskop

In der Negativkontrastdarstellung zeigten der AAF/I-positive Hybridstamm und der AAF/III-positive EAEC-Stamm 55989 Autoaggregation (**Abbildung 13-A, B, C**). Bakterien des EAEC-Stamms 55989 lagerte sich in großen Aggregaten zusammen (**Abbildung 13-A**). Hingegen wies der Hybridstamm nur mäßig große Aggregate von ca. 2-15 Bakterien auf (**Abbildung 13-B**) und lag vermehrt vereinzelt vor.

Die Expression der Oberflächenadnexe (Flagellen und Fimbrien) unterschied sich ebenfalls bei beiden Stämmen. Bei dem EAEC-Stamm 55989 waren viele Flagellen, aber wenige Fimbrien erkennbar. Hingegen wies der Hybridstamm nur wenige Flagellen auf, deren Anzahl je Einzelzelle zudem noch variierte, und der Ursprung erschien variabel, nicht polar konzentriert zu sein (**Abbildung 13-B, D**). Der Hybridstamm zeigte insbesondere in den Aggregations-Bereichen lange, flexible Fimbrien, die dabei häufig um den Hybridstamm gewickelt waren, statt in einer „Strahlenkranz“-Anordnung vorzuliegen. Weiterhin waren vereinzelt Phagen darstellbar (nicht gezeigt).

Beide Stämme zeigten keine morphologischen Veränderungen nach Anzucht bei unterschiedlichem CO₂-Gehalt (5 % oder 8 %). Dabei wurden die Kultivierungsbedingungen entsprechend der *in-vitro* Infektionsstudien gewählt (37 °C mit 5 % bzw. 8 % CO₂, stehend). Zusätzlich wurden die Stämme von Festkultur (BAP) bei 4 °C untersucht. Dabei zeigten beide Stämme Autoaggregation, jedoch waren an der Außenseite der Aggregate nur vereinzelt Flagellen und Fimbrien mit variablem Ursprung erkennbar (nicht gezeigt).

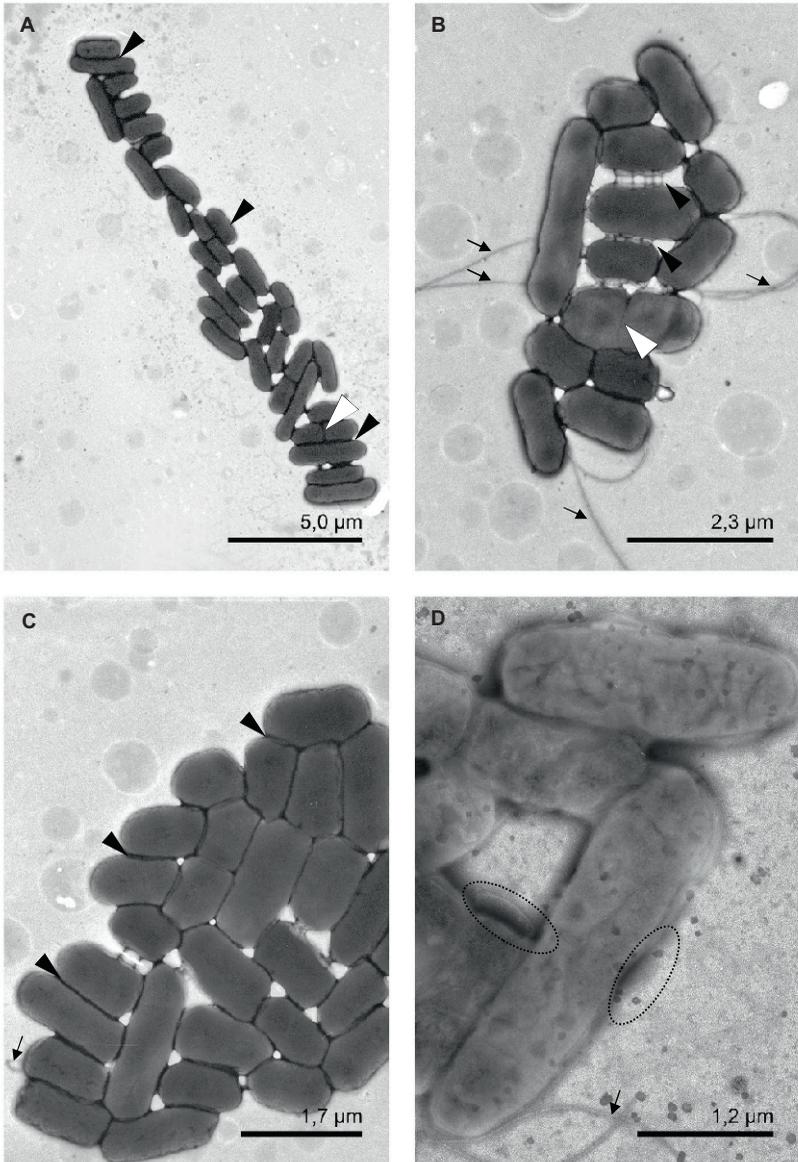


Abbildung 13: Negativkontrastdarstellung vom Hybridstamm LB226692 und EAEC-Stamm 55989 im Elektronenmikroskop
(Erklärung siehe umseitig)

Abbildung 13 (siehe vorherige Seite)

A Übersicht eines *E. coli*-Zellverbandes des Stammes 55989 mit parallel eng aneinander liegenden Bakterienzellen, sogenannter Fimbrien-vermittelter Autoaggregation (Pfeilspitzen schwarz, beispielhaft) und bakterieller Teilungsfigur (Pfeilspitze weiß) (5 % CO₂, 37 °C, Kontrastmittel 0,1 % Phosphorwolframsäure (PWS)).

B Kleinerer *E. coli*-Zellverband des Stammes LB226692 mit Fimbrien-vermittelter Autoaggregation, die präperationsbedingt deutlich zu erkennen ist (Pfeilspitze schwarz, beispielhaft), vereinzelt sind Flagellen (Pfeil, beispielhaft) und eine bakterielle Teilungsfigur (Pfeilspitze weiß) erkennbar (8 % CO₂, 37 °C, Kontrastmittel 0,1 % PWS).

C Stamm LB226692 zeigt Autoaggregation (Pfeilspitzen schwarz, beispielhaft) und vereinzelt Flagellen (Pfeil, beispielhaft) (8 % CO₂, 37 °C, Kontrastmittel 0,1 % PWS).

D Höhere Auflösung des Stammes LB226692 mit Flagellen (Pfeil, beispielhaft) und Fimbrien (weiße Struktur in gestricheltem Kreis) (5 % CO₂, 37 °C, Kontrastmittel 2 % Ammoniummolybdän (AM)).

4.2 Interaktion des Hybridstammes mit wirtsspezifischen Epithelzellen *in vitro*

Je nach Wirtsursprung bei Isolation wurden die *E. coli*-Stämme nachfolgend als human oder bovin assoziiert bezeichnet (Tabelle 1).

4.2.1 Adhäsion

Adhäsionsmuster

Der Hybridstamm wies auf den intestinalen Epithelzellen (IEC) von Mensch und Rind ein autoaggregatives Adhäsionsmuster auf (Tabelle 9, Abbildung 14). Generell variierte das Adhäsionsmuster der verschiedenen *E. coli*-Stämme bei Kontakt mit den unterschiedlichen Epithelzellen von Mensch und Rind kaum (Tabelle 9), lediglich die Abgrenzung zwischen lokaler und diffuser Adhäsion war teilweise nicht möglich. Der Hybridstamm induzierte keine Aktin-Akkumulation (FAS) unterhalb der bakteriellen Anheftungsstelle im Gegensatz zu klassischen EHEC- und STEC-Stämmen (Tabelle 9). In dieser Studie induzierte nur der EPEC-Stamm E2348/69 eine deutliche FAS-Reaktion. Der Hybridstamm induzierte hingegen unregelmäßige Zellränder mit ungeordneten Stressfasern und vereinzelt stark geschädigten Zellen, die sich stark mit Propidium Jodid (Pi) anfärbten, ähnlich dem EAEC-Stamm 55989.

Tabelle 9: Adhäsionsmuster und A/E-Läsionen von *E. coli*-Stämmen auf IEC

Stamm	intestinale Epithelzellen									
	HEp-2		FKD-R 971		PC		INT 407		CaCo-2	
	Muster	FAS	Muster	FAS	Muster	FAS	Muster	FAS	Muster	FAS
LB226692	AA	-	AA	-	AA	-	AA	-	AA	-
55989	AA	-	AA	-	AA	-	AA	-	AA	-
17-2	AA	-	AA	-	AA	-	AA	-	AA	-
EDL933	LA	(+)	LA	(+)	LA	(+)	LA	(+)	LA	(+)
86-24	LA/DA	+	DA	(+)	DA/LA	(+)	DA/LA	(+)	DA/LA	(+)
12E0114	DA	-	DA	-	DA	(+)	DA	-	DA	-
2403	DA	-	DA	-	DA	-	DA	-	DA	-
12E0111	DA	-	DA	-	LA/DA	(+)	DA	-	DA/LA	-
E2348/69	LA	+	LA	+	LA	+	LA	+	LA	+
C600	kA	-	DA	-	DA	-	kA	-	kA	-
123	DA	-	DA	-	DA	-	DA	-	DA	-

Erläuterung AA = aggregative Adhäsion; kA = keine Adhäsion; DA = diffuse Adhäsion; LA = Lokale Adhäsion; + = FAS positive Reaktion, mind. 10 Signale/Zelle, unabhängig der Anzahl betroffener Zellen; (+) = schwach positive Reaktion, vereinzelte FAS Signale, aber weniger als 10/Zelle; - = FAS-negative Reaktion, keine Detektion von Aktin-Akkumulation unterhalb der bakteriellen Bindungsstelle

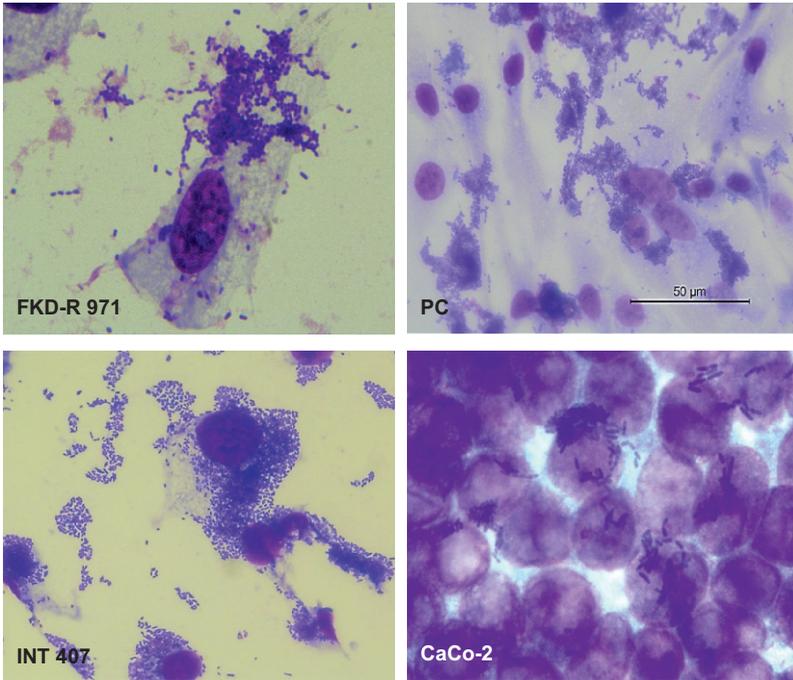


Abbildung 14: Aggregatives Adhäsionsmuster des Hybridstammes

Backsteinartiges Adhäsionsmusters des Hybridstammes, dargestellt bei der Interaktion mit intestinalen Epithelzellen (6 h *p.i.*, Giemsa-Färbung), Originalvergrößerung FKD-R 971, INT 407 und CaCo-2 100x und PC 40x

Adhäsionsrate

Der Hybridstamm adhärte hochgradig an die untersuchten Wirtszellen, mit Ausnahme der CaCo-2-Zellen. Das Adhäsionsvermögen des Hybridstammes ähnelte dabei human assoziierten Stämmen, insbesondere dem EAEC-Stamm 55989 (**Abbildung 15**). Die human assoziierten *E. coli*-Stämme adhärten signifikant stärker als bovin assoziierte *E. coli*-Stämme (HEp-2-, INT 407-Zellen $p \leq 0,024$), dabei wurde der Hybridstamm als humanes Isolat gewertet (**Tabelle 16**). Der humane EAEC-Stamm 17-2 unterschied sich vom Hybridstamm durch stärkere Adhäsion an CaCo-2-Zellen und die EHEC-Stämme durch geringere Adhäsion an Kolonkryptenzellen sowie variable Adhäsion an humane Zellen (**Abbildung 15**).

Generell adhärerten Vertreter von *E. coli*-Pathovaren signifikant stärker als avirulente *E. coli* (**Tabelle 15**). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen *E. coli*-Stämmen zeigten sich nur im Referenz-Zellsystem HEp-2 (**Abbildung 15**). Die Adhäsion an humane Dünndarmzellen (INT 407) war stark ausgeprägt und ähnelte der an HEp-2-Zellen. Hingegen war die Adhäsion der *E. coli*-Stämme an differenzierte CaCo-2-Zellen deutlich vermindert, mit Ausnahme des EPEC-Stamms E2348/69 (**Abbildung 15**). Der EPEC-Stamm E2348/69 zeigte als einziger Stamm eine stärkere Adhäsion an humane als an bovine Dickdarmzellen.

Generell zeigten die *E. coli*-Stämme eine Affinität für bovine Zellen, gekennzeichnet durch die verstärkte Adhäsion der avirulenten *E. coli*-Stämme (C600, 123). Insbesondere die bovinen FKD-R 971-Zelle wurden hochgradig kolonisiert.

Im Gegensatz zu der ausgeprägten und homogenen Kolonisation der einzelnen Dünndarmzellen wurden von den Dickdarmzellen einzelne Zellen stark und andere Zellen kaum kolonisiert. Dies spiegelte sich in der großen Streuung der Adhäsionsrate auf den Dickdarmzellen wieder (**Abbildung 15**).

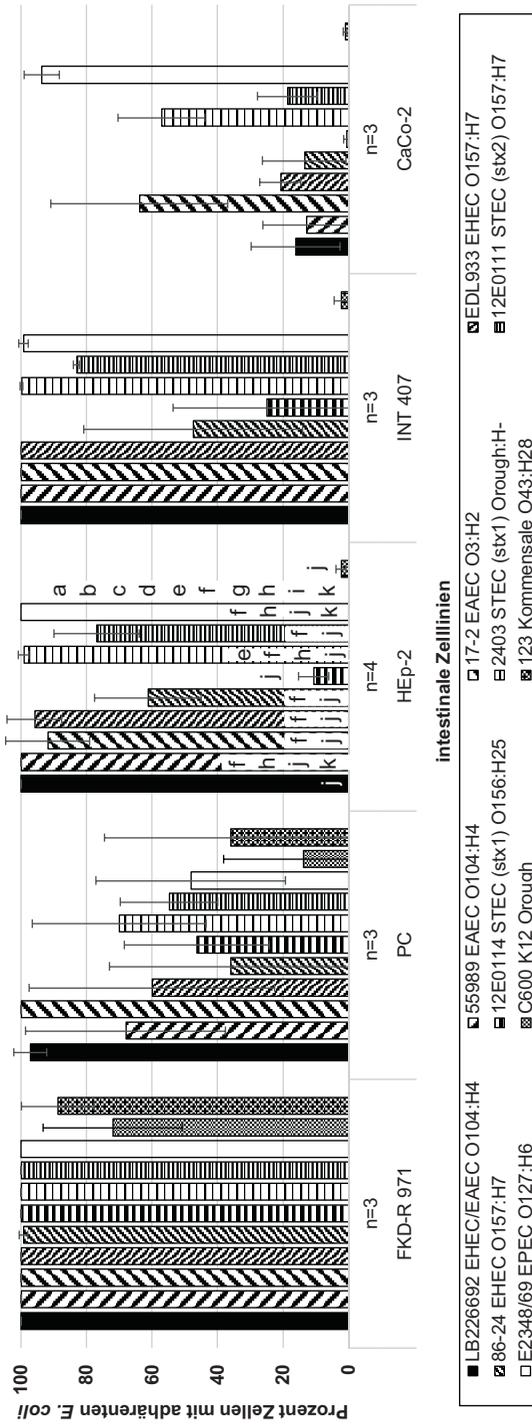


Abbildung 15: Adhäsionsrate verschiedener E. coli-Stämme 6 h p.i. auf verschiedenen IEC (Giemsa-Färbung)

Dargestellt sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von 3-4 unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten zeigten sich ausschließlich auf HEP-2-Zellen und wurden mit Buchstaben markiert (Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, $p \leq 0,029$). Signifikant zu Stamm **a** LB226692, **b** 55989, **c** 17-2, **d** EDL933, **e** 86-24, **f** 12E0114, **g** 2403, **h** 12E0111, **i** E2348/69, **j** C600, **k** 123

Adhäsionsintensität auf Einzelzelebene

Auf Einzelzelebene zeigte sich deutlich die erhöhte Assoziation der *E. coli* an bovine Zellen, da jeweils mehr *E. coli* an bovine Zellen adhärten als an humane Zellen (**Tabelle 10**). Insbesondere die FKD-R 971-Zellen wurden hochgradig von den untersuchten *E. coli*-Stämmen kolonisiert, einschließlich der avirulenten Stämme. Der Hybridstamm überwucherte die Wirtszellen vergleichbar mit den human assoziierten EAEC-Stämmen und dem EHEC-Stamm EDL933. Auf Einzelzelebene bestätigte sich die reduzierte Adhäsion des Hybridstammes an CaCo-2-Zellen und die geringe Adhäsion von EPEC-Stamm E2348/69 an die bovinen Kolonkryptenzellen.

Tabelle 10: Adhäsionsintensität je Einzelzelle

<i>E. coli</i>	Gruppe	Serovar	Anzahl <i>E. coli</i> pro Einzelzelle [Mittelwert von 3 ausgezählten Zellen]				
			FKD-R 971	PC	HEp-2	INT 407	CaCo-2
LB226692	EHEC/EAEC	O104:H4	na	na	na	na	20,6
55989	EAEC	O104:H4	na	na	na	na	na
17-2	EAEC	O3:H2	na	na	na	na	na
EDL933	EHEC	O157:H7	na	na	na	na	65,0
86-24	EHEC	O157:H7	na	112,2	37,6	40,1	44,4
12E0114	STEC (<i>stx1</i>)	O156:H25	na	47,7	17,5	16,2	23,3
2403	STEC (<i>stx1</i>)	O _{rough} :H-	na	na	89,5	59,6	56,0
12E0111	STEC (<i>stx2</i>)	O157:H7	na	40,1	50,4	40,1	39,9
E2348/69	EPEC	O127:H6	na	134,0	na	na	na
C600	K12	O _{rough} -	na	10,0	0,0	0,0	0,0
123	Kommensale	O43:H28	na	27,9	11,6	12,6	12,3

Erläuterung: na = nicht auszählbar, da >200 Bakterien je Zelle

Quantifizierung der Adhäsion im Gentamicin-Protektions-Test

Nach 3 h Koinkubation zeigten sich die meisten stammspezifischen Unterschiede der Adhäsion auf primären Kolonkryptenzellen (**Abbildung 16**). Dabei adhärten die human pathogenen *E. coli*-Stämme signifikant stärker als bovin assoziierte Stämme (**Tabelle 19**). Der Hybridstamm adhärte vergleichbar zu den Pathotypen EAEC und EHEC jeweils signifikant stärker als STEC und Kontrollen (K12, EPEC, EIEC) (**Tabelle 20**). Der Hybridstamm adhärte weiterhin signifikant stärker als der avirulente *E. coli* 123 (**Tabelle 20**). Ähnlich dem EAEC-Stamm 17-2 und dem EHEC-Stamm EDL933 adhärte der Hybridstamm signifikant stärker als alle weiteren untersuchten *E. coli*-Stämme an Kolonkryptenzellen. Die Adhäsion von EPEC-Stamm E2348/69 an Kolonkryptenzellen war verhältnismäßig gering. Im Gegensatz dazu adhärte der EPEC-Stamm E2348/69 an humane CaCo-2-Zellen bereits nach 3 h signifikant erhöht zu STEC-Stamm 12E0114 und EAEC-Stamm 55989 (**Abbildung 16, Abbildung 17**).

Nach 6 h Koinkubation traten zusätzlich zu den signifikanten Unterschieden auf den Kolonkryptenzellen stammspezifische Unterschiede auf Dünndarmzellen beider Spezies auf (**Abbildung 17**). Die human assoziierten *E. coli*-Stämme adhärten signifikant stärker an Dünndarmzellen als bovine Stämme oder K12 (**Tabelle 19**); Letzteres traf auch für Kolonkryptenzellen zu. Auf Kolonkryptenzellen adhärte der Hybridstamm vergleichbar zum EAEC-Pathotyp signifikant stärker als STEC und vergleichbar zu den Pathotypen EAEC und EHEC signifikant stärker als K12 und EPEC (**Tabelle 20**). Auch auf den Dünndarmzellen adhärten der Hybridstamm und die EAEC-Stämme signifikant stärker als STEC. Die signifikanten Unterschiede der verschiedenen Pathotypen auf den Dünndarmzellen beider Spezies waren vergleichbar. Die Adhäsion der Stämme vom EPEC-Pathotyp war weiterhin gering an Kolonkryptenzellen, im Gegensatz zur signifikant stärkeren Adhäsion als STEC-Stämme auf Dünndarmzellen (**Tabelle 20**).

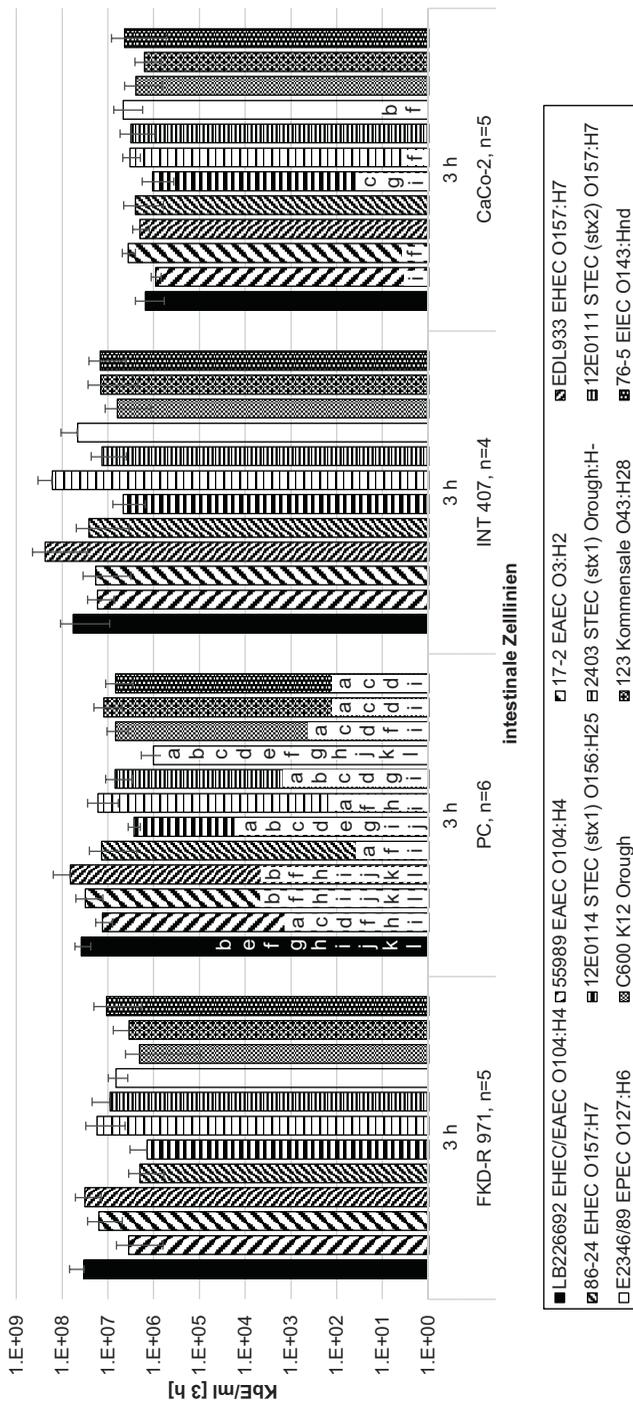


Abbildung 16: Quantitative Bestimmung der Adhäsion von *E. coli*-Stämmen an verschiedene IEC 3 h *p.i.*

Dargestellt sind KbE/ml (Mittelwerte ± Standardabweichung) von 4-6 unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten sind mit Buchstaben markiert (Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, $p \leq 0,041$); Signifikant zu Stamm a LB226692, b 55989, c 17-2, d EDL933, e 86-24, f 12E0114, g 2403, h 12E0111, i E2348/69, j C600, k 123, l 76-5

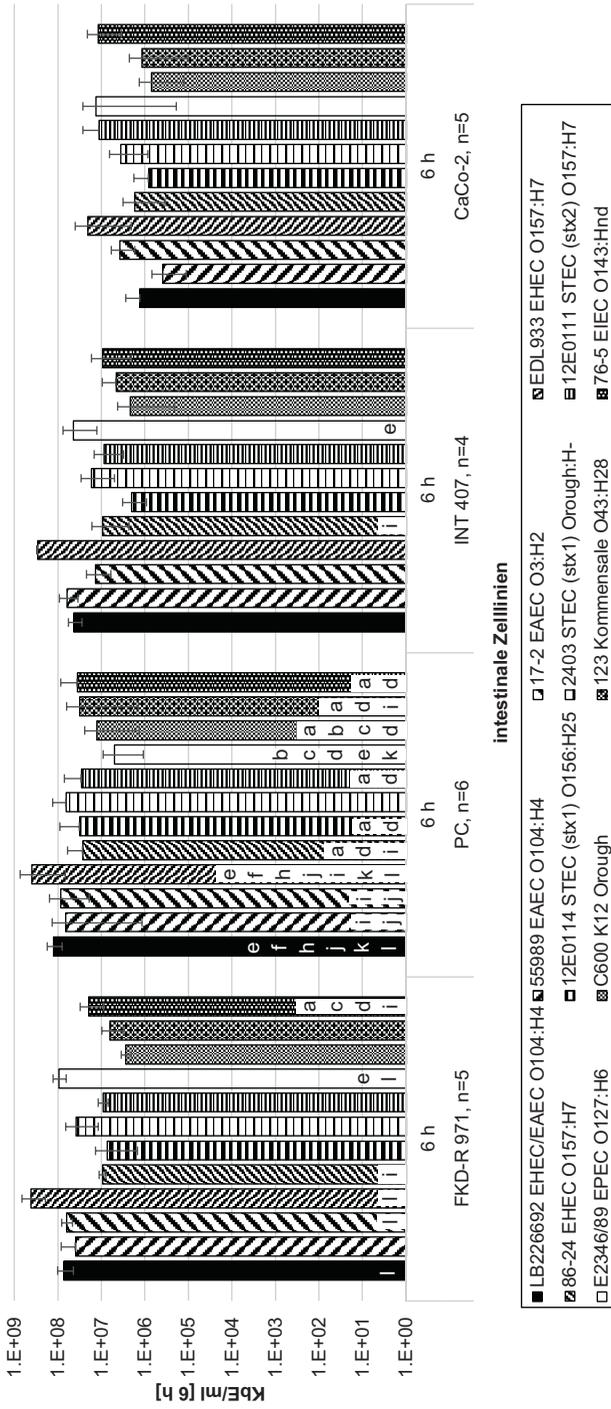


Abbildung 17: Quantitative Bestimmung der Adhäsion von E. coli-Stämmen an verschiedene IEC 6 h p.i.

Dargestellt sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von 4-6 unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten sind mit Buchstaben markiert (Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, $p \leq 0,05$): Signifikant zu Stamm a LB226692, b 55989, c 17-2, d EDL933, e 86-24, f 12E0114, g 2403, h 12E0111, i E2346/89, j C600, k 123, l 76-5

4.2.2 Invasion (Gentamicin-Protektions-Test)

Alle untersuchten *E. coli*-Stämme lagen nach 3 h und nach 6 h in einem geringen Umfang intrazellulär in den humanen und bovinen Wirtszellen vor (**Tabelle 11**). Im Mittel waren nach 3 h $0,7 \pm 1,1$ % der *E. coli* intrazellulär lokalisiert und nach 6 h $1,9 \pm 2,2$ % (Invasionsindex). Das geringe intrazelluläre Vorkommen des Hybridstammes sowie von dem EHEC-Stamm EDL933 bestätigte sich in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Kapitel 4.2.3). Der Hybridstamm ähnelte insbesondere den human assoziierten EAEC-Stämmen und dem EHEC-Stamm 86-24 durch vermehrte intrazellulär Lokalisation nach 6 h in humanen INT 407-Zellen (**Tabelle 11**). Im Unterschied zum Hybridstamm lagen einige Bakterienzellen boviner STEC-Isolate deutlich geschützt vor der Einwirkung von Gentamicin vor (**Tabelle 11**). Insbesondere der *eae*-negative STEC-Stamm 2403 und zusätzlich der *eae*-positive STEC-Stamm 12E0114 nach 6 h in Dickdarmzellen waren geschützt vor der Einwirkung von Gentamicin (**Tabelle 11**). Der EPEC-Stamm E2348/69 lag als Positivkontrolle ebenfalls intrazellulär in den Wirtszellen vor, hingegen zeigte der EIEC-Stamm 76-5 kaum intrazelluläre Lokalisation.

Tabelle 11: Invasivität verschiedener *E. coli*-Stämme in humane und bovine IEC

<i>E. coli</i> -Stamm	Gruppe	Serotyp	Invasion [%]							
			3 h ¹			6 h ²				
			FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2
LB226692	EHEC/EAEC	O104:H4	0,80±0,65	0,27±0,42	0,75±0,39	0,02±0,01	1,52±0,00	0,34±0,20	2,84±1,24	0,942±0,01
55989	EAE	O104:H4	0,15±0,11	0,33±0,62	0,28±0,37	0,03±0,03	0,68±0,48	0,45±0,71	1,54±2,38	0,54±0,25
17-2	EAE	O3:H2	0,04±0,01	0,61±0,81	0,85±0,71	0,03±0,03	0,04±0,01	0,20±0,12	2,83±3,40	0,47±0,34
EDL933	EHEC	O157:H7	0,42±0,13	0,29±0,07	0,46±0,67	0,02±0,00	0,93±0,42	0,37±0,37	0,19±0,01	0,53±0,17
86-24	EHEC	O157:H7	0,38±0,57	0,22±0,43	0,05±0,01	0,03±0,00	3,35±2,24	0,26±0,34	3,33±3,65	0,56±0,52
12E0114	STEC (stx1)	O156:H25	0,26±0,23	0,19±0,15	0,03±0,01	0,10±0,04	3,99±2,53	1,70±1,05*	0,71±0,92	1,77±1,26*
2403	STEC (stx1)	O _{rough} :H-	3,11±0,66*	1,05±0,64*	2,85±1,37*	0,19±0,12	5,11±2,56*	1,64±1,02*	1,43±0,18	1,21±0,66
12E0111	STEC (stx2)	O157:H7	0,29±0,26	0,03±0,03	0,20±0,03	0,08±0,12	1,26±0,70	0,29±0,36	0,50±0,29	0,75±0,28
E2346/89	EPEC	O127:H6	1,29±0,67*	0,14±0,03	2,16±0,88*	1,29±0,70*	3,06±1,99*	3,13±4,45*	9,88±4,28*	7,22±5,07*
C600	K12	O _{rough} -	0,25±0,18	0,10±0,13	0,01±0,01	0,02±0,01	1,79±0,90	0,61±0,59	0,33±0,34	0,47±0,34
123	Kommensale	O43:H28	0,47±0,30	0,12±0,10	0,01±0,00	0,01±0,01	2,65±0,25	0,37±0,08	0,73±0,92	0,84±0,46
76-5	EIEC	O143:Hnd	0,23±0,09	0,04±0,03	0,23±0,36	0,15±0,20	2,82±1,83	0,41±0,54	0,36±0,42	0,30±0,00

Erläuterung

1 = Gentamicin-geschützte Bakterien, als Prozentzahl des jeweiligen *E. coli* Inokulums ± Standardabweichung;

2 = Gentamicin-geschützte Bakterien, als Prozentzahl der zellassozierten *E. coli* nach 3 h ± Standardabweichung;

* = als invasiv gelten *E. coli*, wenn signifikant ≥ 1 % der ursprünglichen *E. coli* intrazellulär vorliegen (*Student's t-test*, p ≤ 0,05)

4.2.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Interaktion von *E. coli* mit IEC

Die Interaktion des Hybrid- und des EHEC-Stammes EDL933 mit den permanenten Zelllinien FKD-R 971, INT 407 und CaCo-2 wurde elektronenmikroskopisch dargestellt.

Interaktion mit bovinen FKD-R 971-Zellen

Viele Bakterienzellen des Hybridstammes ließen sich in den FKD-R 971-Zellpräparaten darstellen, jedoch meist ohne direkten Kontakt zu den Zellen (**Abbildung 18-A**). Der Hybridstamm adhärierte nur vereinzelt an den bovinen FKD-R 971-Zellen. Sofern eine Adhäsion erfolgte, bildete der Hybridstamm engen Zellkontakt mit der Zellmembran aus. Eine intrazelluläre Aufnahme war nicht zu beobachten (**Abbildung 18-B**). Ob die Interaktion zwischen den *E. coli* und den bovinen FKD-R 971-Zellen auf der apikalen oder basolateralen Zelloberfläche erfolgte, war nicht eindeutig erkennbar.

Auch der EHEC-Stamm EDL933 ließ sich in den FKD-R 971-Zellpräparaten zahlreich nachweisen. Es war jedoch kein direkter Zellkontakt zu den Zellen und keine intrazelluläre Aufnahme zu beobachten (**Abbildung 18-C**).

Interaktion mit humanen INT 407-Zellen

Zahlreiche Bakterien des Hybridstammes adhärierten an der apikalen Zellmembran der INT 407-Zellen und nur wenige *E. coli* waren intrazellulär lokalisiert. Mikro villi und Pseudopodien der Zellen umschlossen den Hybridstamm (**Abbildung 19-A, -C**). Zwischen den Bakterien und der Zellmembran befand sich ein gleichmäßig breiter, spaltförmiger Abstand (**Abbildung 19-C, -D**). In der höheren Vergrößerung waren zwischen Bakterienwand und Zellmembran Fimbrien und Flagellen zu erkennen (**Abbildung 19-D**). Der Hybridstamm war auch in den INT 407-Zellen zu finden (**Abbildung 19-C**). Nach Aufnahme einzelner Bakterien wiesen die Zellen keine morphologischen Veränderungen oder geringgradige frühe Zellschädigung mit wenigen Vakuolen und Fragmentierung des Zytoplasmas (**Abbildung 19-A**) auf. Einzelne INT 407-Zellen phagozytierten massenhaft Bakterien (**Abbildung 19-A**). Bei diesen Zellen war eine stärkere Zellschädigung zu beobachten. Dies äußerte sich durch abgerundete Zellen mit kondensiertem Zellkern und Kernwandhyperchromasie, die sich aus dem Zellverband lösten. Das Zytoplasma wurde abgeschnürt. Dies ist charakteristisch für den Zelluntergang in Form von Apoptose (**Abbildung 19-B**).

Der EHEC-Stamm EDL933 war überwiegend lose mit der apikalen Membran der INT 407-Zellen assoziiert und zeigte nur vereinzelt enge Adhäsion mit Ausbildung der charakteristischen A/E-Läsionen (**Abbildung 20-A, -B, -C, D**). Dies korrelierte mit den FAS-Ergebnissen (**Tabelle 9**). In den Zellen befanden sich Phagolysosomen und vereinzelt lagen

phagozytierte EDL933 intrazellulär vor (**Abbildung 20-C**). Auch im Phagosom lag die Wand der Bakterienzellen eng an der Membran der Phagosomen an (**Abbildung 20-C**). Ein Großteil der infizierten Zellen stellte sich morphologisch unverändert dar (**Abbildung 20-A**). Unterhalb der bakteriellen Anheftungsstellen war das Zytoplasma stellenweise aufgelockert (**Abbildung 20-A, -B**). Einzelne Zellen waren geringgradig abgerundet.

Interaktion mit humanen CaCo-2-Zellen

Bereits lichtmikroskopisch war die bakterielle Adhäsion an CaCo-2-Zellen gering (**Abbildung 15**). Obwohl für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine höhere Infektionsdosis und längere Inkubationszeit (3,5 h) verwendet wurden, ließen sich auch hier nur wenige *E. coli*-Zellen in den Präparaten nachweisen (**Abbildung 21-A, -B, -C, -D**). Die CaCo-2-Zellen stellten sich bereits in der nicht infizierten Zellkontrolle deutlich vakuolisiert dar (**Abbildung 8**). Die Vakuolisierung kann als Anzeichen von Zellschädigung interpretiert werden. Dies macht die Abgrenzung von infektionsbedingten Zellschäden schwierig.

Der Hybridstamm adhärierte vereinzelt an der apikalen Zelloberfläche der CaCo-2-Zellen an den Mikrovilli (**Abbildung 21-A**). Weiterhin befand sich der Hybridstamm im Interzellularraum und in intrazellulären Vakuolen (**Abbildung 21-B**). Vereinzelt deuteten Phagolysosmen darauf hin, dass die *E. coli* möglicherweise abgebaut wurden (**Abbildung 21-A, -B**).

Der EHEC-Stamm EDL933 war in Vakuolen und in dilatierten Interzellularräumen der CaCo-2-Zellen zu finden (**Abbildung 21-C, -D**). Der Stamm EDL933 induzierte deutliche A/E-Läsionen, wenn auch nur vereinzelt. Dies korreliert mit den Ergebnisse aus dem FAS-Test (**Tabelle 9**).

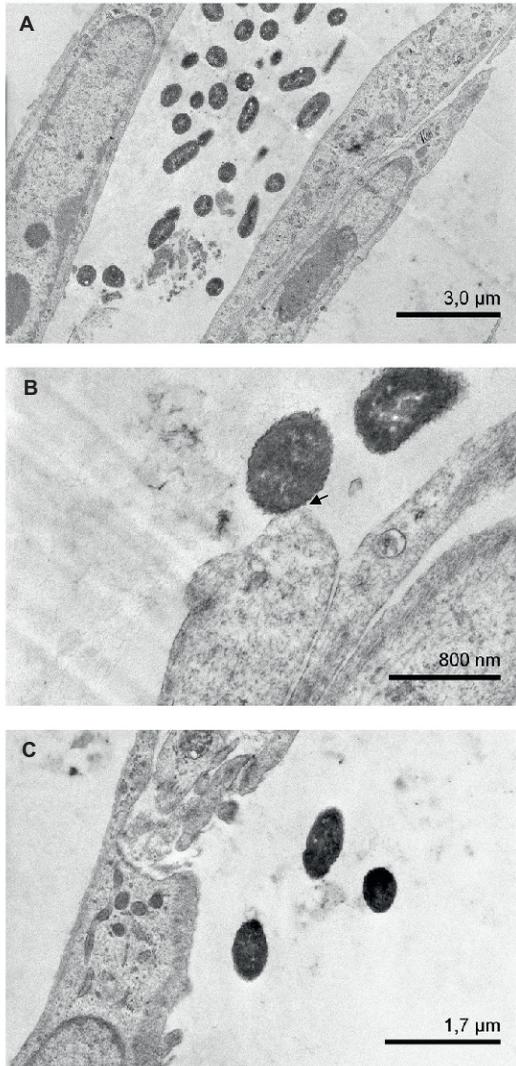


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie FKD-R 971 nach Inokulation mit Stamm LB226692 bzw. EDL933, 3 h *p.i.*
A Viele Bakterienzellen des Stammes LB226692 befinden sich im Präparat, aber meist ohne direkten Zellkontakt.
B Stamm LB226692 bildet vereinzelt engen Kontakt mit der Wirtszelle aus (Pfeil), dabei bleiben die Membranen voneinander abgrenzbar.
C Die Bakterienzellen des Stammes EDL933 zeigen keine Adhäsion an die Oberfläche der Epithelzellen.

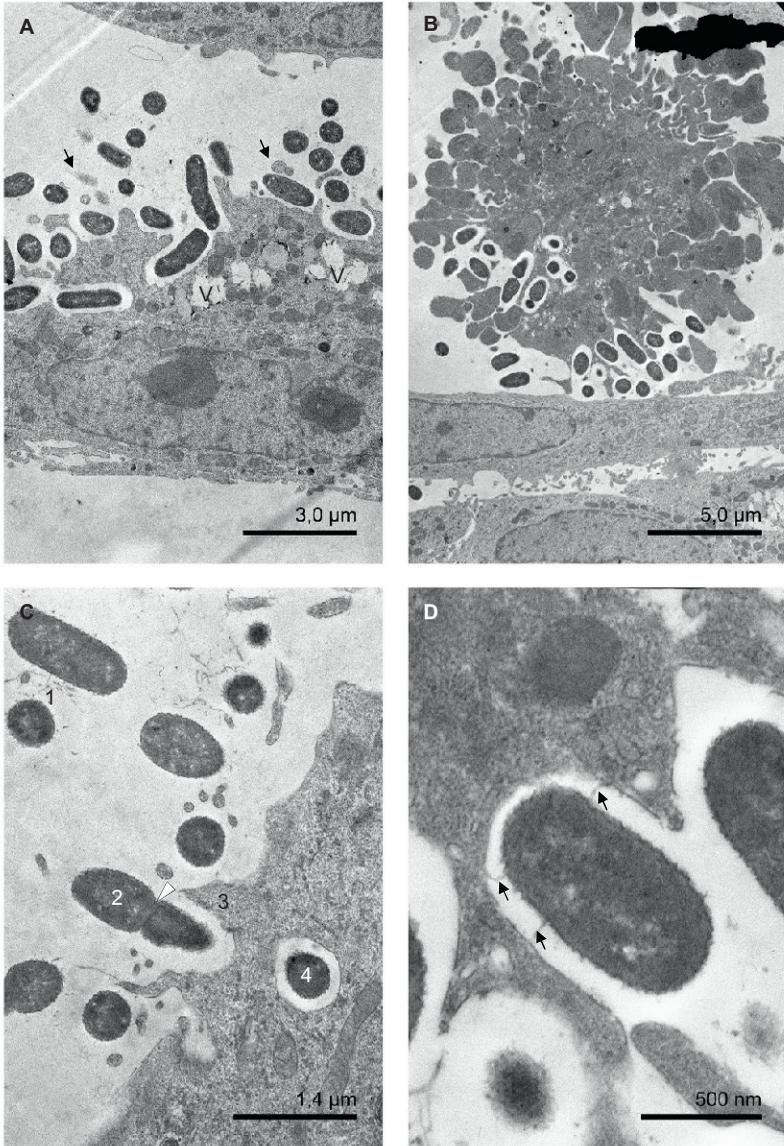


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von INT 407-Zellen nach Inokulation mit Hybridstamm LB226692, 3 h *p.i.*
 (Erklärung siehe umseitig)

Abbildung 19: (siehe vorherige Seite)

A Zahlreiche *E. coli* adhären an der Zelloberfläche; zum Teil sind die Erreger umflossen von Pseudopodien der Wirtszelle. Zwischen Bakterien- und Wirtszellemembran liegt stets ein gleichmäßiger Abstand vor. Die Zellen stellen sich polarisiert mit Mikrovilli dar (Pfeil, beispielhaft) mit multiplen, kleinen Vakuolen ohne strukturierten Inhalt (V, beispielhaft).

B Massenhafte Adhäsion des Hybridstammes an apoptotische Wirtszelle, Anzeichen der Apoptose sind Abrundung, Vakuolisierung, Abschnürung von Zytoplasma und der kondensierte Zellkern.

C Höhere Vergrößerung mit *E. coli* an der Oberfläche ohne Zellkontakt (1) und adhätierend mit Zellkontakt (2). Einer der adhätierenden Erreger befindet sich in Teilung (Pfeilspitze, weiß). Pseudopodien der Wirtszelle (3) umschließen die adhätierenden Erreger und ein Erreger (4) ist vollständig von der Epithelzelle umschlossen. Zwischen Wirt- und Erregermembran ist stets ein gleichmäßiger Abstand zu erkennen. Die Zellmembran, die den Erreger umschließt, weist keine Membranverdickungen auf, die für eine rezeptorvermittelte Phago-/Endozytose sprechen würden.

D Im Spalt zwischen Bakterienwand und Zellmembran sind Flagellen (Pfeil, beispielhaft) und feine Fimbrien erkennbar, die die Adhäsion vermitteln.

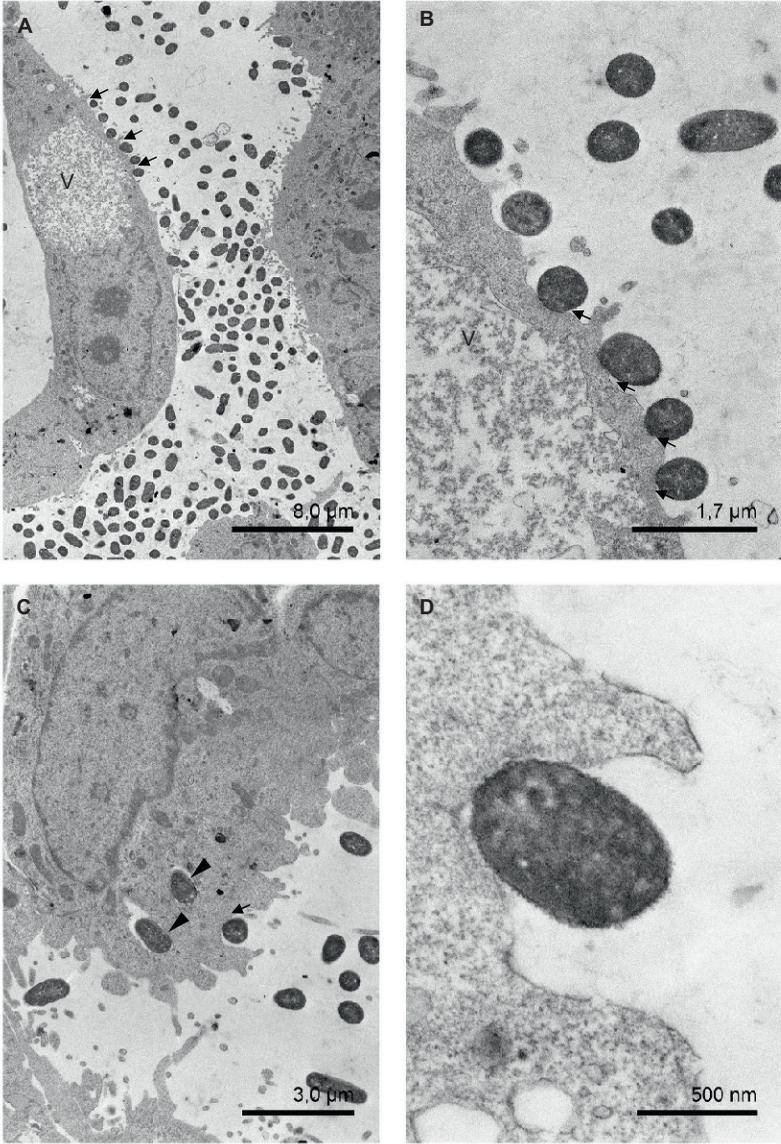


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von INT 407-Zellen nach Inokulation mit EHEC-Stamm EDL933, 3 h *p.i.*
(Erklärung siehe umseitig)

Abbildung 20: (siehe vorherige Seite)

A Viele *E. coli* zeigen keinen Kontakt zur Wirtszelle; einige *E. coli* adhären eng an der Zelloberfläche (*intimate attachment*, Pfeile, beispielhaft). Im Bereich unterhalb der adhärenen Bakterien zeigt sich eine Vakuolisierung (V) des Zytoplasmas mit granulärem Inhalt.

B Höhere Vergrößerung von vier *E. coli*, die eng an die Wirtszellmembran adhären (Pfeil, beispielhaft); zwei weitere *E. coli* weisen einen geringen Abstand zur Wirtszellmembran auf (vermutlich Schnittartefakt). Teilbereiche der Bakterienwand und der Wirtszellmembran sind nicht mehr trennbar; unterhalb der adhärenen Bakterien weist die Wirtszelle Vakuole (V) mit granulärem Inhalt auf.

C Enger Zellkontakt zwischen *E. coli* und der Wirtszellmembran (Pfeil) und auch zwischen phagozytierten Erregern und der Phagolysosomenmembran (Pfeilspitze), die Zellmembranen sind stellenweise nicht mehr abgrenzbar.

D Höhere Vergrößerung der engen Verbindung zwischen Bakterienwand und Wirtszellmembran.

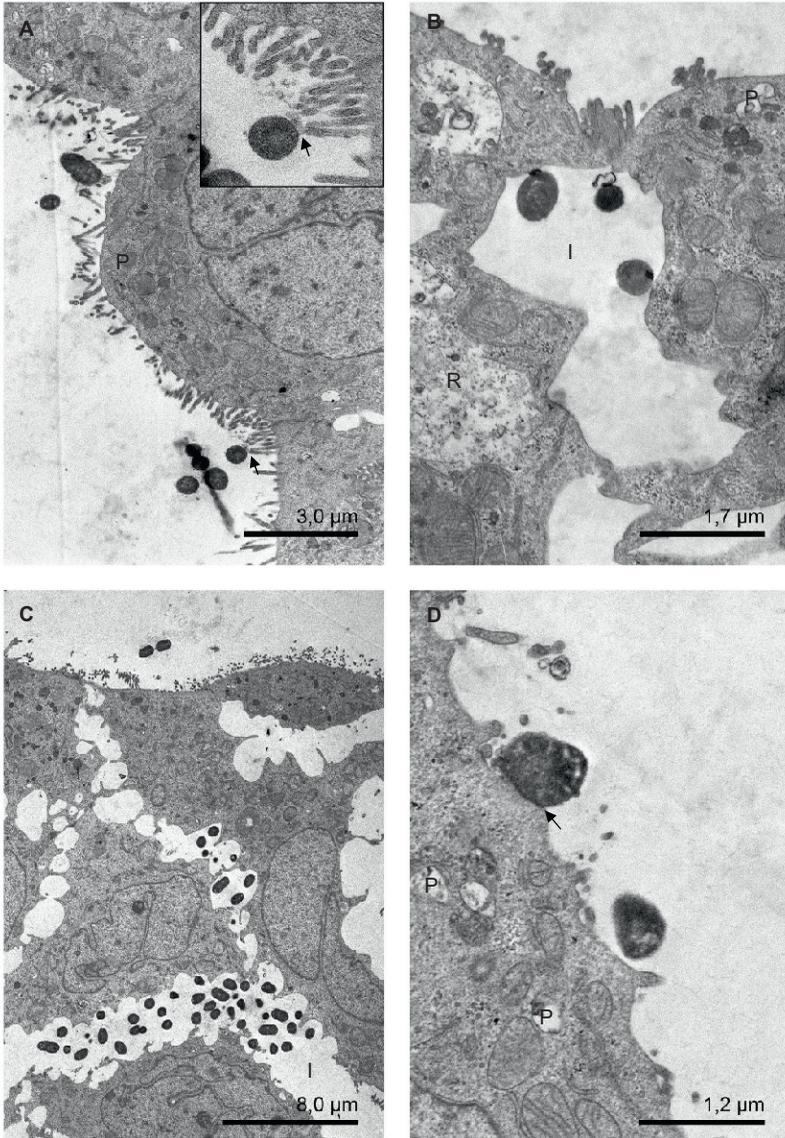


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie CaCo-2 nach Inokulation mit Stamm LB226692 bzw. EDL933, 3,5 h *p.i.* (Erläuterung siehe umseitig)

Abbildung 21: (siehe vorherige Seite)

A Nur wenig *E. coli* des Stammes LB226692 sind im Präparat zu finden und nur selten bilden die Bakterienzellen Kontakt mit den Mikrovilli aus (Pfeil und Insert).

B Drei Bakterienanschnitte von Stamm LB226692 sind im Interzellularraum (I) lokalisiert; in den CaCo-2 Zellen sind zahlreiche Residualkörper (R, sogenannte *multivesicular bodies*) und Phagolysosomen (P) erkennbar.

C Stamm EDL933 liegt im dilatierten Interzellularraum (I) vor, meist ohne direkten Zellkontakt auszubilden.

D Selten bildet der Stamm EDL933 einen ausgeprägten, engen Zellkontakt mit podestartigen Strukturen (Pfeil) aus, einige Phagolysosomen (P, beispielhaft) sind erkennbar.

4.2.4 Modulation der Wirtszellantwort (qRT-PCR)

Das inflammatorische und regulatorische Potential des Hybridstammes bei Interaktion mit den intestinalen Epithelzellen von Mensch und Rind wurde mit den Reaktionsprofilen klassischer, human und bovin assoziierter *E. coli*-Stämme verglichen. Die Ergebnisse der Genregulation wurden je Zelllinie und Untersuchungszeitpunkt in folgender Reihenfolge grafisch (**Abbildung 22** bis **Abbildung 29**) dargestellt: proinflammatorische Zytokine (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *IFN- γ* , *TNF- α*), antiinflammatorische Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*) und proinflammatorische Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *RANTES*, *MCP-1*). Als Bezugspunkt für eine Induktion oder Hemmung der Genexpression wurde die mittlere Genexpression der nicht stimulierten Mediumkontrolle (schwarzer Strich) gekennzeichnet. Die Genexpression wurde bei Stimulation gehemmt, wenn der Wert unterhalb dem der Mediumkontrolle lag. Hingegen wurde die Genexpression induziert, wenn der Wert bei Stimulation oberhalb der Mediumkontrolle lag. Da *in-vitro*, mangels protektiver Komponenten (Mukusschicht, residente Darmflora, etc.), die direkte Interaktion apathogener *E. coli*-Stämme bereits einen proinflammatorischen Effekt auf IEC haben kann, wurde die Genregulation außerdem in Relation zur Stimulation mit dem apathogenen K12-Stamm C600 angegeben. Die biologisch relevanten Transkriptions-unterschiede zwischen den infizierten Zellen und der C600-Kontrolle wurden wie folgt bewertet: ≥ 2 als Hochregulation im Vergleich zu C600; 0,5-2 als keine Induktion im Vergleich zu C600 (grau hinterlegter Bereich) und $\leq 0,5$ geringere Induktion als im Vergleich zu C600.

4.2.4.1 Bovine Wirtszellantwort

FKD-R 971-Zellen

Nach **3-stündiger Interaktion** mit bovinen FKD-R 971-Zellen (**Abbildung 22, Tabelle 38**) regulierte der Hybridstamm die Wirtszellgene nur wenig und in vergleichbarem Umfang wie der EAEC-Stamm 55989 und die STEC-Stämme 12E0114 und 2403. Der Hybridstamm induzierte die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF- α* so stark wie C600 (größer als Mediumwert) vergleichbar zu dem EAEC-Stamm 55989, dem Kommensalen 123 und den STEC-Stämmen 12E0114 und 2403. Im Unterschied zum Hybridstamm induzierten der EAEC-Stamm 17-2, die EHEC-Stämme sowie der STEC-Stamm 12E0111 und der EPEC-Stamm E2348/69 mindestens einen dieser Mediatoren signifikant geringer als C600. Der Hybridstamm hemmte die weiteren proinflammatorischen (*IL-12*, *IFN- γ*) und die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*). Dabei hemmte der Hybridstamm *TGF- β* (geringerer Wert als Mediumkontrolle) signifikant im Vergleich zu einer leichten Induktion durch C600. Die *IL-10* Expression wurde von C600 leicht reduziert. Trotz sehr niedriger Werte nach Inkubation mit dem EAEC-Stamm 17-2, dem STEC-Stamm 2403 und dem EPEC-Stamm E2348/69 unterschieden sich die Werte bei keinem Stamm signifikant von den

durch C600 ausgelösten Effekten. Der Hybridstamm induzierte die proinflammatorischen Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *RANTES*, *MCP-1*) so stark wie C600 und die EAEC- und STEC-Stämme 12E0114 und 2403. Hingegen induzierten die EHEC-Stämme und der EPEC-Stamm E2348/69 die Chemokine geringer als C600, dabei hemmte u.a. der EHEC-Stamm EDL933 das Chemokin *GRO- α* signifikant im Vergleich zu C600.

Mit zunehmender **Inkubationsdauer (6 h)** löste der Hybridstamm, ähnlich wie der EAEC-Stamm 55989, eine Entzündungsreaktion der FKD-R 971-Zellen aus (**Abbildung 23, Tabelle 39**). Der Hybridstamm und die EAEC-Stämme induzierten signifikant stärker als C600 das pro-inflammatorische Zytokin *IL-6* und unterschieden sich dadurch zu den anderen *E. coli*-Stämmen und nicht vermehrungsfähigen Stimulantien, die eine geringere *IL-6* Induktion aufwiesen (höherer Wert als Medium). Der Hybridstamm induzierte wie der EAEC-Stamm 55989, der EHEC-Stamm 86-24 und der STEC-Stamm 12E0114 die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* und *TNF- α* so stark wie C600. Im Unterschied zum Hybridstamm induzierten der EAEC-Stamm 17-2, der EHEC-Stamm EDL933, die STEC-Stämme 2403 und 12E0111 und der EPEC-Stamm E2348/69 mindestens einen dieser Mediatoren signifikant geringer oder signifikant stärker als C600. Dabei führten der EAEC 17-2 und der STEC-Stamm 12E0111 zu einer signifikant niedrigeren Stimulation der *IL-1 β* Transkription, aber zu einer signifikant höheren *TNF- α* Transkription. Während die Zellen auf die Inkubation mit C600 mit einer leicht erhöhten *IL-12* Transkription reagierten, blieb die Transkription dieses Zytokins durch die meisten anderen Stämme einschließlich des Hybridstammes unverändert. Lediglich die STEC-Stämme 2403 und 12E0111 sowie der EAEC-Stamm 17-2 induzierten *IL-12*. Der Hybridstamm, der EAEC-Stamm 55989 sowie die EHEC-Stämme hemmten das Zytokin *IFN- γ* , dabei zum Teil signifikant im Vergleich zu C600, letzterer induzierte eine leichte Steigerung dieses Zytokins. Zudem hemmte der Hybridstamm signifikant die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*), dabei *IL-10* weniger stark als C600 (Werte kleiner als Mediumkontrolle) und *TGF- β* stärker als C600, letzterer induzierte die *TGF- β* Transkription leicht. In Übereinstimmung mit dem Hybridstamm hemmten die human assoziierten Pathotypen und der EPEC-Stamm E2348/69 ebenfalls signifikant die Transkription von *TGF- β* , jedoch hemmte der EPEC-Stamm E2348/69 auch die Transkription von *IL-10* signifikant stärker als C600. Weiterhin induzierte der Hybridstamm das pro-inflammatorische Chemokin *GRO- α* stärker als C600 und die Chemokine *IL-8*, *MCP-1* und *RANTES* so stark wie C600 und vergleichbar zu den EAEC-Stämmen.

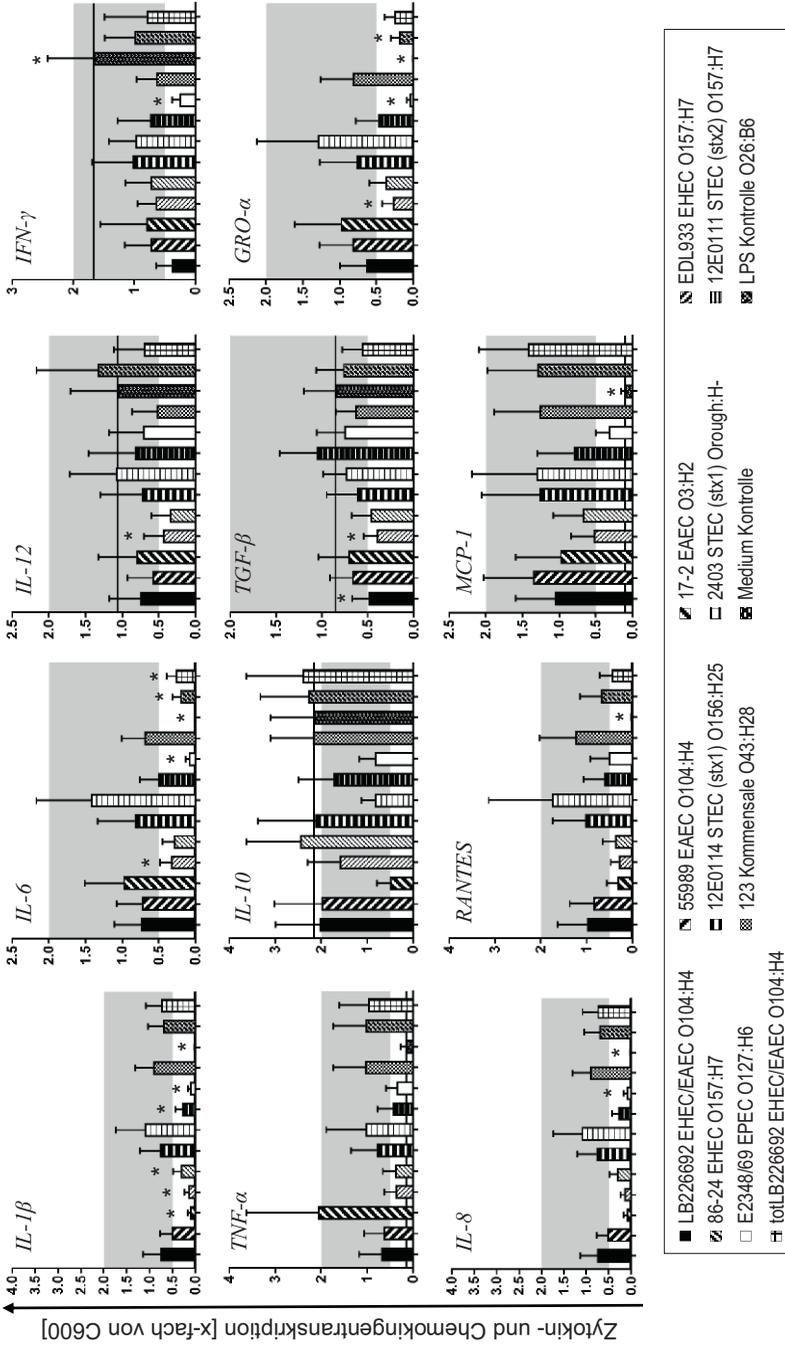


Abbildung 22: Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen FKD-R 971-Zellen nach 3 h Koinkubation

Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 38, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest) (Erklärung siehe umseitig)

Abbildung 22: (siehe vorherige Seite)

Die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Chemokine der Wirtszellen wurde nach Inokulation mit den *E. coli*-Stämmen oder nicht vermehrungsfähigen Stimulantien (L-PS, hitzeinaktivierter Präparation von LB2226692 („TotLB2226692“)) bestimmt. Die Genexpression wurde auf das *house-keeping* Gen GAPDH und die Genexpression nach Inokulation mit C600 normalisiert. Gekennzeichnet wurden der Mittelwert der Genexpression der nicht stimulierten Mediumkontrolle (schwarzer Strich), als Bezugspunkt für Induktion oder Hemmung der Transkription. Signifikante Expressionsunterschiede zur C600-stimulierten Kontrolle wurden gekennzeichnet (Sternchen, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest) und die Genexpression im Vergleich zur C600-stimulierten Kontrolle nach biologischer Relevanz gruppiert in: ≥ 2 -10 (Hochregulation), 0,5-2 (keine Regulation, grau hinterlegt) und $\leq 0,5$ (Hemmung).

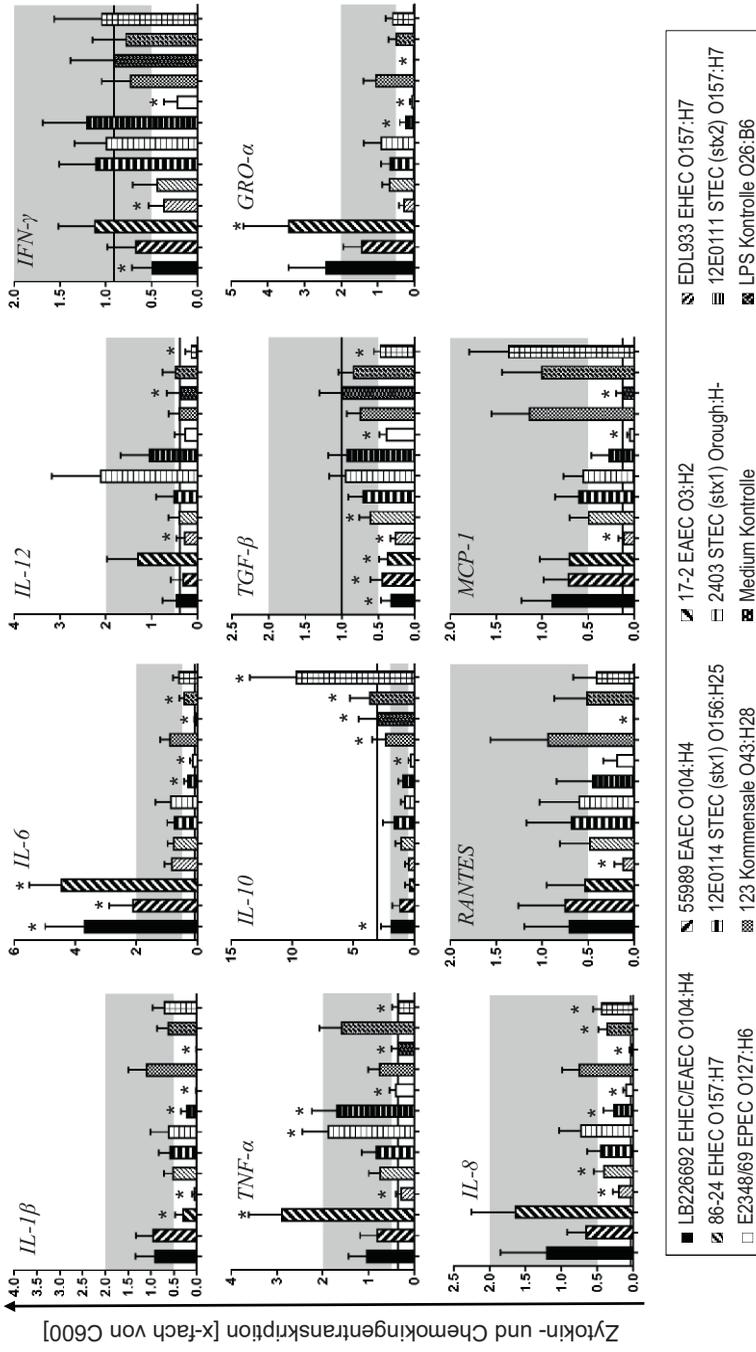


Abbildung 23: Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen FKD-R 971-Zellen nach 6 h Koinkubation
 Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 39, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest)
 (Erklärung siehe **Abbildung 22**)

Kolonkryptenzellen

Nach **3 h Koinkubation (Abbildung 24, Tabelle 40)** verursachte der Hybridstamm nur eine geringgradige Wirtszellreaktion in den Kolonkryptenzellen. Dabei induzierte der Hybridstamm leicht das proinflammatorische Zytokin *IL-6*, vergleichbar zu C600 (Werte oberhalb Mediumkontrolle) und zu den EHEC-Stämmen. Hingegen induzierten die EAEC- und STEC-Stämme *IL-6* geringer als C600. Der Hybridstamm induzierte das Zytokin *TNF- α* signifikant geringer als C600 (Werte oberhalb Mediumkontrolle) mit viel Gemeinsamkeit zum EAEC-Stamm 55989 und dem *eae*-negativen STEC-Stamm 2403. Die anderen *E. coli*-Stämme und nicht vermehrungsfähigen Stimulantien (LPS, TotLB226692) unterschieden sich vom Hybridstamm durch eine stärkere Induktion von *TNF- α* (Wert wie C600). Der Hybridstamm induzierte keines der weiteren proinflammatorischen Zytokine (*IL-1 β* , *IL-12*, *IFN- γ* ; Werte wie Mediumkontrolle) und hemmte signifikant die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*) (geringere Werte als Mediumkontrolle). Diese Zytokine hemmten der EAEC-Stamm 55989 und die STEC-Stämmen 2403 und 12E0111 teilweise ebenfalls signifikant. Die EHEC-Stämme unterschieden sich vom Hybridstamm durch stärkere Induktion einiger pro- (*IL-12*, *IFN- γ* , *TNF- α*) und antiinflammatorischer Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*). Dies traf auch auf den EPEC-Stamm E2348/69, den Kommensalen 123 und nicht vermehrungsfähige Stimulantien zu. Der Hybridstamm induzierte die proinflammatorischen Chemokine *GRO- α* und *MCP-1* so stark wie C600 und löste damit ein Reaktionsprofil vergleichbar zu den EAEC-Stämmen, dem sporadischen Rinder-STECC-Stamme 12E0111 und dem *eae*-negativen STEC-Stamme 2403 aus. Der Hybridstamm induzierte zudem leicht das Chemokin *IL-8* und dabei stärker als C600, letzterer hemmte *IL-8*. Die STEC-Stämme unterschieden sich jedoch vom Hybridstamm durch stärkere Induktion weiterer Chemokine. So induzierte der *stx1*-positive STEC-Stamm 12E0114 *IL-8* signifikant stärker als C600.

Mit zunehmender Inkubationsdauer (**6 h (Abbildung 25, Tabelle 41)**) induzierte der Hybridstamm die stärkste Entzündungsreaktion. Das Herausstellungsmerkmal war dabei die signifikante Hochregulation von *IL-6* (stärker als C600), ein proinflammatorisches Zytokin und Mediator für eine T_H2 -dominierte, humorale Immunantwort. Zudem induzierte der Hybridstamm das Zytokin *TNF- α* so stark wie C600, insbesondere vergleichbar zu den human assoziierten EAEC-Stämmen und im Unterschied zur geringeren Induktion durch bovin assoziierte STEC-Stämme, darunter besonders Stamm 2403. Das Zytokin *IL-1 β* induzierte der Hybridstamm leicht, jedoch signifikant geringer als C600 und damit vergleichbar zu den EAEC-, EHEC- und STEC-Stämmen 2403 sowie 12E0111. Weitere proinflammatorische Zytokine (*IL-12*, *IFN- γ*) hemmte der Hybridstamm, darunter *IL-12* signifikant unterschiedlich zu C600 und damit vergleichbar zu den EAEC- und STEC-Stämmen 12E0111 und 12E0114. Das anti-inflammatorische Zytokin *IL-10* wurde nur durch

die nicht vermehrungsfähigen Stimulantien leicht induziert. Das antiinflammatorische Zytokin *TGF-β* wurde durch den Hybridstamm signifikant stärker gehemmt als durch C600, dabei vergleichbar mit den EAEC-Stämmen, dem EHEC-Stamm EDL933 und dem STEC-Stamm 2403. Die starke Entzündungsreaktion durch den Hybridstamm zeigte sich zudem in der signifikant stärkeren Induktion des pro-inflammatorischen Chemokins *MCP-1* als C600 und damit vergleichbar zum human assoziierten EHEC-Stamm 86-24. Die proinflammatorischen Chemokine *IL-8* und *GRO-α* induzierte der Hybridstamm so stark wie C600 und im Unterschied zur signifikanten Regulation durch EHEC-Stamm 86-24 und STEC-Stamm 2403. Der Hybridstamm hemmte das Chemokin *RANTES* leicht, dabei signifikant im Unterschied zu einer leichten Induktion durch C600. Wie der Hybridstamm hemmten auch die EAEC-Stämme, der EHEC-Stamm EDL933, die STEC-Stämmen 12E0111 und 12E0114 sowie der EPEC-Stamm E2348/69 das Chemokin *RANTES* signifikant im Vergleich zu C600.

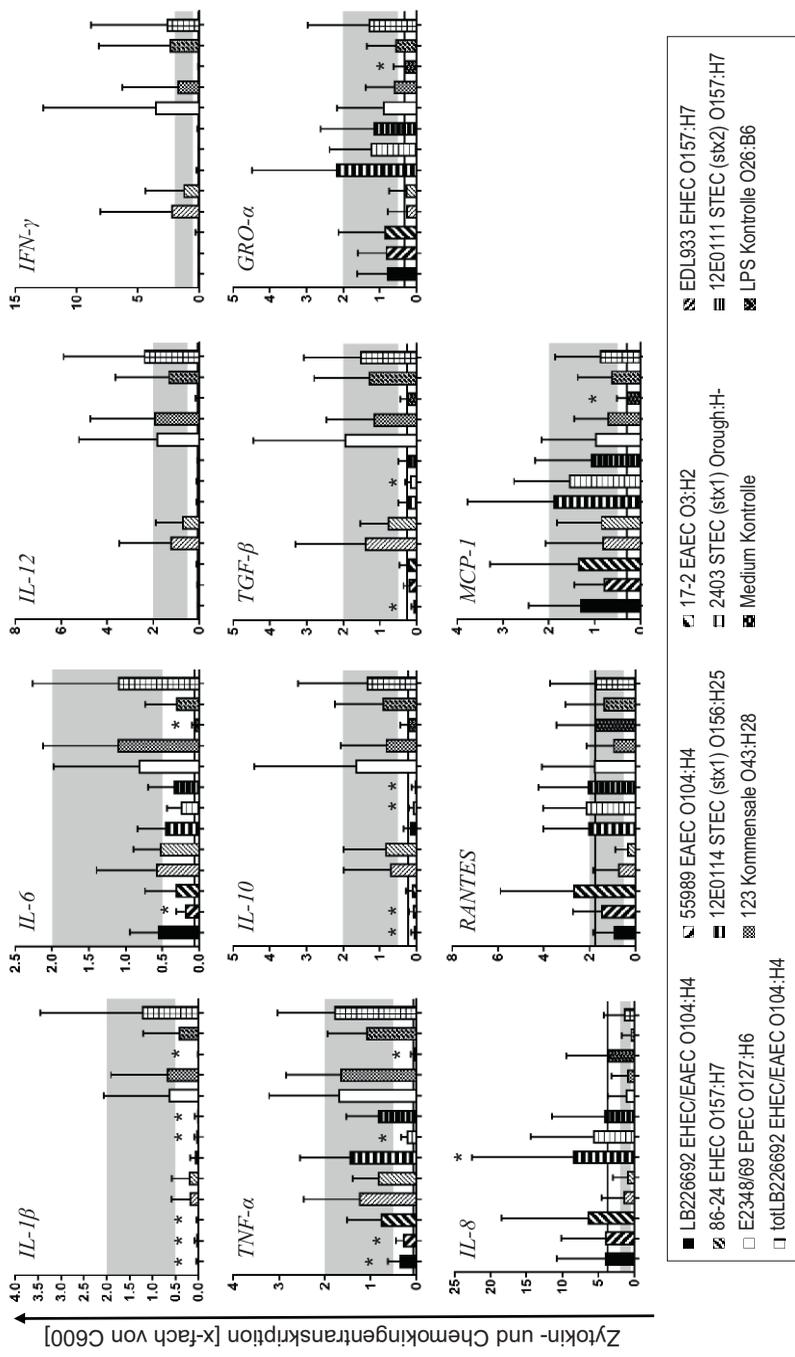


Abbildung 24: Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen PC-Zellen nach 3 h Koinkubation
 Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 40, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest)
 (Erklärung siehe Abbildung 22)

4.2.4.2 humane Wirtszellen

INT 407-Zellen

Nach 3 h Koinkubation (Abbildung 26, Tabelle 42) mit humanen INT 407-Zellen regulierte der Hybridstamm die Wirtszellgene nur wenig. Der Hybridstamm und die EAEC- und STEC-Stämme induzierten die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* und *TNF- α* in vergleichbarem Ausmaß wie C600 und in Abgrenzung zu den EHEC-Stämmen, letztere induzierten *TNF- α* signifikant weniger als C600. Der Hybridstamm hemmte die proinflammatorischen Zytokine *IL-12* und *IFN- γ* so stark wie C600 und in Abgrenzung zum EHEC-Stamm EDL933, der *IL-12* im Gegensatz zu C600 sogar signifikant steigerte. Der Hybridstamm und der EAEC-Stamm 55989 regulierten das Zytokin *IL-6* nicht (Werte wie Medium), im Unterschied zu einer leichten *IL-6* Induktion durch C600, den EAEC-Stamm 17-2 sowie die EHEC- und STEC-Stämme. Die antiinflammatorischen Zytokine wurden wenig reguliert (*IL-10*, *TGF- β*), nur der STEC-Stamm 2403 hemmte *IL-10* im Gegensatz zu C600 signifikant. Auch die proinflammatorischen Chemokine *GRO- α* und *RANTES* wurden wenig reguliert. Dabei wurde *GRO- α* nur vom STEC-Stamm 2403 und vom EPEC-Stamm E2348/69 signifikant gehemmt. Der Hybridstamm induzierte *IL-8* weniger stark als C600, dabei erreichte der Hybridstamm im Unterschied zu dem ebenfalls weniger stark induzierenden EAEC-Stamm 55989, dem EHEC-Stamm 86-24 und dem STEC-Stamm 2403 keine statistische Signifikanz. Während der EPEC-Stamm und die Kontrollstämme bzw. die nicht vermehrungsfähigen Stimulantien das Chemokin *MCP-1* nicht induzierten, steigerte der Hybridstamm die Transkription in ähnlichem Umfang wie C600 und insbesondere vergleichbar zu dem EAEC-Stamm 55989, aber deutlich geringer als EAEC-Stamm 17-2.

Der Hybridstamm induzierte in INT 407-Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer (6 h) (Abbildung 27, Tabelle 43) eine inflammatorische Wirtszellantwort, jedoch geringer ausgeprägt als bei Interaktion mit EAEC- und STEC-Stämmen. Der Hybridstamm induzierte die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* und *IL-6* so stark wie C600, dabei jedoch geringer als die EAEC-Stämme und die STEC-Stämme 12E0114 und 2403 sowie *IL-1 β* geringer als der EHEC-Stamm EDL933. Der Hybridstamm induzierte *TNF- α* signifikant stärker als C600, dabei insbesondere vergleichbar zum EAEC-Stamm 55989 sowie zum STEC-Stamm 12E0114 und geringer als durch den EAEC-Stamm 17-2 und den STEC-Stamm 2403. Weitere pro-inflammatorische Zytokine (*IL-12*, *IFN- γ*) sowie die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*) wurden wenig reguliert. Dabei hemmte der Hybridstamm *IL-10* stärker als C600 in vergleichbarem Umfang wie der EAEC-Stamm 55989 und die STEC-Stämme 2403 und 12E0111. Der Hybridstamm induzierte signifikant stärker als C600 das proinflammatorische Chemokin *IL-8*, dabei deutlich geringer als die EAEC-Stämme und der STEC-Stamm 2403 sowie stärker als die EHEC-Stämme. Das Chemokin

RANTES wurde von C600 nicht reguliert (Wert wie Mediumkontrolle) und vom Hybridstamm leicht gehemmt. Der EHEC-Stamm 86-24 und die STEC-Stämme hemmten *RANTES* sogar signifikant im Vergleich zu C600. Der Hybridstamm induzierte *MCP-1* leicht, vergleichbar zu C600 und in Abgrenzung zu einer signifikant stärkeren Induktion durch den EAEC-Stamm 17-2 und u.a. zu einer signifikanten Hemmung durch den EHEC-Stamm 86-24 und den STEC-Stamm 2403. Der EAEC-Stamm 17-2 unterschied sich zudem vom Hybridstamm durch eine signifikante Induktion des Chemokins *GRO- α* und der EHEC-Stamm EDL933 durch eine signifikante Hemmung im Vergleich zu C600.

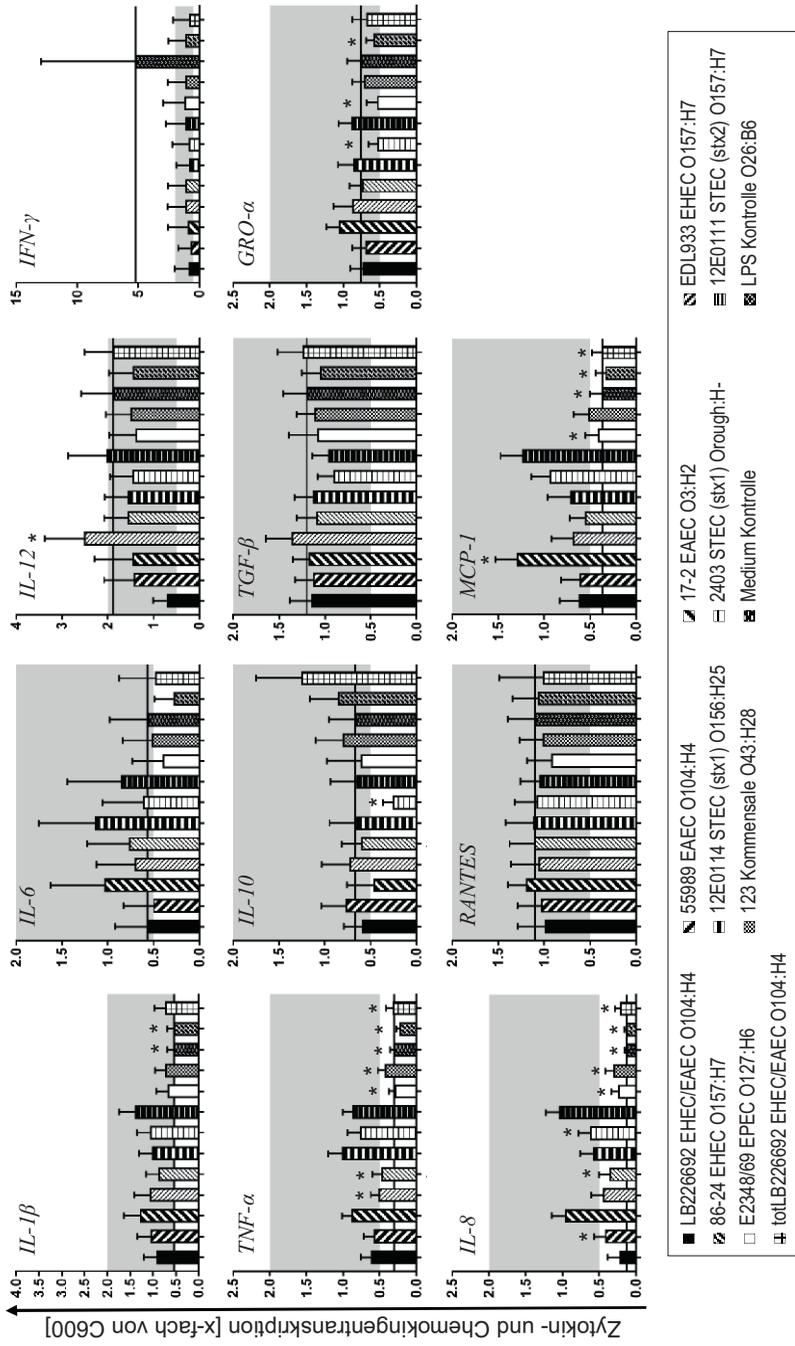


Abbildung 26: Transkription von Zyto- und Chemokingenen in humanen INT 407-Zellen nach 3 h Koinkubation

Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 42, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest)
(Erklärung siehe **Abbildung 22**)

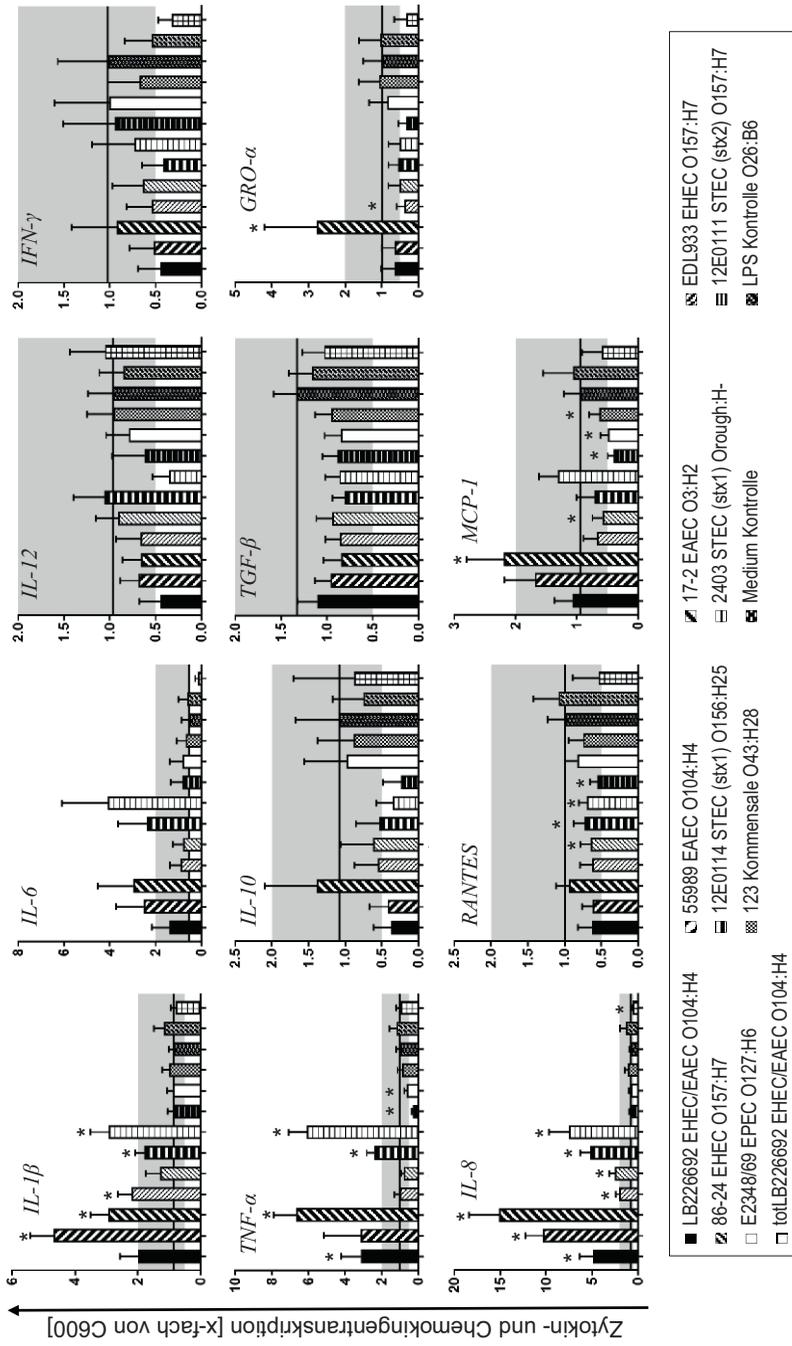


Abbildung 27: Transkription von Zyto- und Chemokinen in humanen INT 407-Zellen nach 6 h Koinkubation
 Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 43, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest)
 (Erklärung siehe **Abbildung 22**)

CaCo-2-Zellen

Der Hybridstamm induzierte nach **3 h Koinkubation (Abbildung 28, Tabelle 44)** nur wenig proinflammatorische Aktivität in den CaCo-2-Zellen, vergleichbar zu den human assoziierten EAEC- und EHEC-Stämmen und im Gegensatz zu einer deutlichen Entzündungsreaktion durch die STEC-Stämme 12E0114 und 12E0111. So induzierte der Hybridstamm leicht die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* und *IL-12* sowie als einziger Stamm *IL-6*. Die human assoziierten EAEC- und EHEC-Stämmen hemmten zum Teil *IL-1 β* sowie *IL-6* und die bovin assoziierten STEC-Stämme 12E0114 und 12E0111 induzierten *IL-1 β* signifikant stärker als C600. *TNF- α* wurde nur nach Inkubation der Zellen mit C600 und mit den bovin assoziierten STEC-Stämme 12E0114 und 12E0111 vermehrt transkribiert. Der Hybridstamm hemmte das antiinflammatorische Zytokin *TGF- β* signifikant weniger als C600, insbesondere vergleichbar mit den EHEC-Stämmen. Der Hybridstamm induzierte das proinflammatorische Chemokin *IL-8* leicht, dabei signifikant weniger als C600 und vergleichbar mit den human assoziierten EAEC- und EHEC-Stämmen und in Abgrenzung zu den bovin assoziierten STEC-Stämmen, die *IL-8* so stark wie (12E0114, 2403) oder signifikant stärker (12E0111) als C600 induzierten. *MCP-1* wurde nur von den STEC-Stämmen 12E0114 und 12E0111 stark induziert.

Nach **6 h Koinkubation** induzierte der Hybridstamm die proinflammatorischen Zytokine (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *IFN- γ* , *TNF- α*) vergleichbar zu C600 und in ähnlichem Ausmaß wie die human assoziierten Stämme (**Abbildung 29, Tabelle 45**). Der EAEC-Stamm 55989 und die EHEC-Stämme induzierten *IL-1 β* signifikant geringer und *TNF- α* signifikant unterschiedlich zu C600. Im Unterschied zum Hybridstamm induzierte der bovin assoziierte STEC-Stamm 12E0114 *IL-1 β* und *TNF- α* signifikant stärker als C600. Letzteres Zytokin wurde durch alle STEC-Stämme induziert. Der Hybridstamm regulierte die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*) vergleichbar zu C600 kaum und induzierte die proinflammatorischen Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *RANTES*, *MCP-1*) in vergleichbarem Ausmaß wie C600. Der EAEC-Stamm 55989 induzierte sowohl *IL-8* als auch *MCP-1* jeweils signifikant geringer als C600, Letzteres traf auch auf den EHEC-Stamm 86-24 zu. Im Unterschied dazu induzierte der STEC-Stamm 12E0114 das Chemokin *IL-8* signifikant stärker als C600.

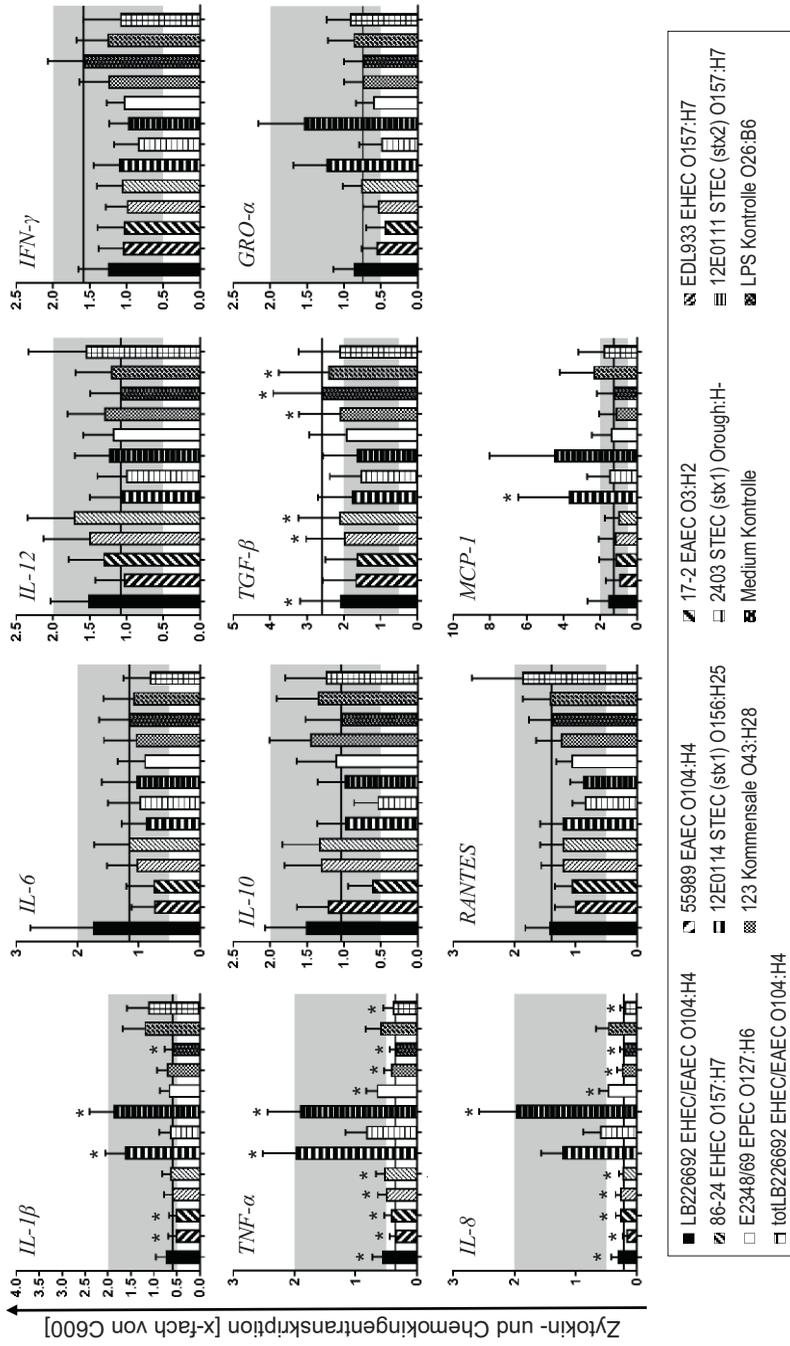


Abbildung 28: Transkription von Zyto- und Chemokinen in humanen CaCo-2-Zellen nach 3 h Koinkubation
 Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 44, p < 0,05, Randomisierungstest)
 (Erklärung siehe Abbildung 22)

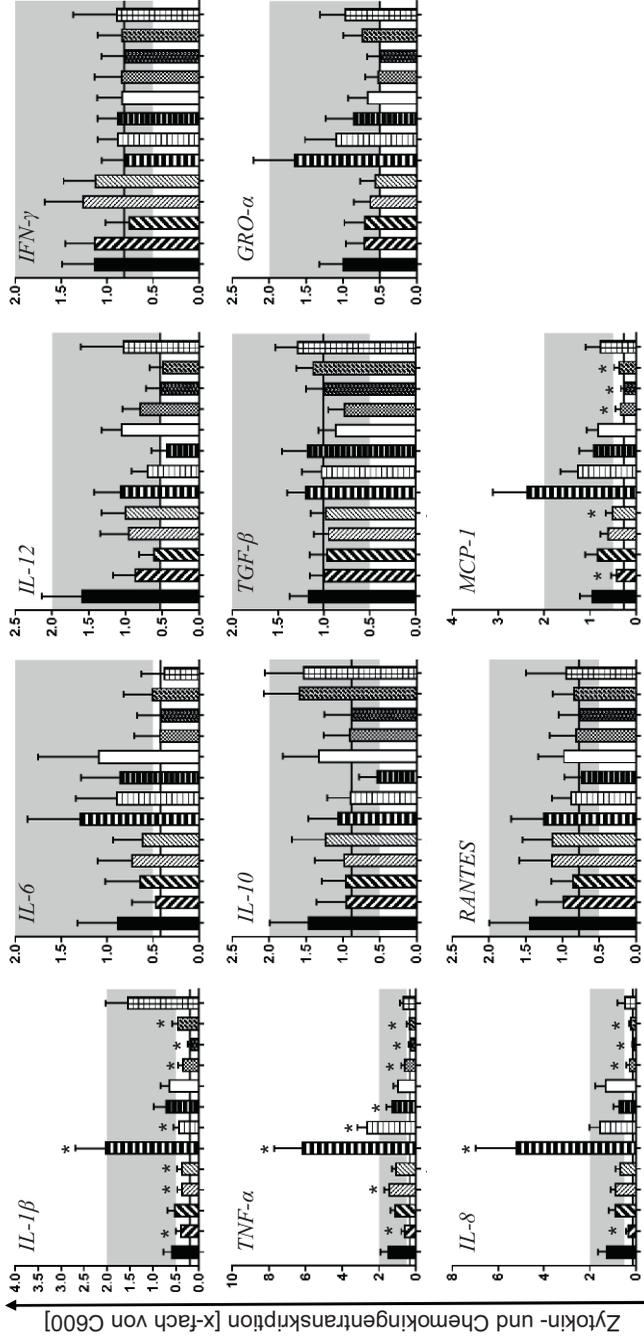


Abbildung 29: Transkription von Zyto- und Chemokinen in humanen CaCo-2-Zellen nach 6 h Koinkubation
 Signifikante Unterschiede zu C600 (siehe Tabelle 45, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest)
 (Erklärung siehe Abbildung 22)

4.2.5 Zellvitalität

Zellvitalität im Adhäsionsversuch

Der Hybridstamm wie weitere human assoziierte Stämme (EHEC-Stamm EDL933, EAEC-Stamm 55989, 17-2) überwucherten alle Wirtszellen weitestgehend, was die mikroskopische Beurteilung der Zellvitalität nach 6 h Koinkubation erschwerte. Im mikroskopischen Bild schädigte der Hybridstamm die Wirtszellen in vergleichbarem Umfang wie EAEC-Stamm 55989 (**Abbildung 30**).

Bezogen auf die Wirtsherkunft der Stämme schädigten die human und bovin assoziierten Stämme die Dünndarmzellen beider Spezies signifikant stärker als der apathogene K12-Kontrollstamm (**Tabelle 30**). Insbesondere der porcine EPEC-Stamm E2348/69 schädigte die Dünndarmzellen beider Spezies und Kolonkryptenzellen signifikant stärker als bovine oder human assoziierte Stämme. Die Dünndarmzellen (INT 407, FKD-R 971) wurden bei Inokulation mit EPEC-Stamm E2348/69 und EAEC-Stamm 17-2 weitestgehend abgelöst. Der EAEC-Stamm 17-2 führte auch bei Kolonkryptenzellen zu einer starken Exfoliation.

Auch bei getrennter Betrachtung der Pathotypen wurden Unterschiede deutlich (**Tabelle 29**). So schädigten die EHEC- und STEC-Stämme die Dünndarmzellen signifikant stärker als die Inokulation mit dem avirulenten *E. coli* 123. Der EHEC-Stamm EDL933 induzierte viel Apoptose und Zellteilung in den FKD-R 971-Zellen und der EHEC-Stamm 86-24 einen ausgedünnten Zellrasen mit vielen spindelartigen Zellen. Die Infektion der INT 407-Zellen mit EHEC-Stamm 86-24 führte zu einem mottenfraßartigen Erscheinungsbild und viel Zelldetritus. Die bovinen STEC-Isolate variierten in der Induktion von Detritus, apoptotischen und vakuolisierten Zellen bei Infektion der Dünndarmzellen beide Spezies.

Die CaCo-2-Zellen zeigten kaum zytotoxische Effekte bei der Inokulation mit *E. coli*-Stämmen, obwohl die CaCo-2-Zellen stellenweise stark mit *E. coli* kolonisiert waren.

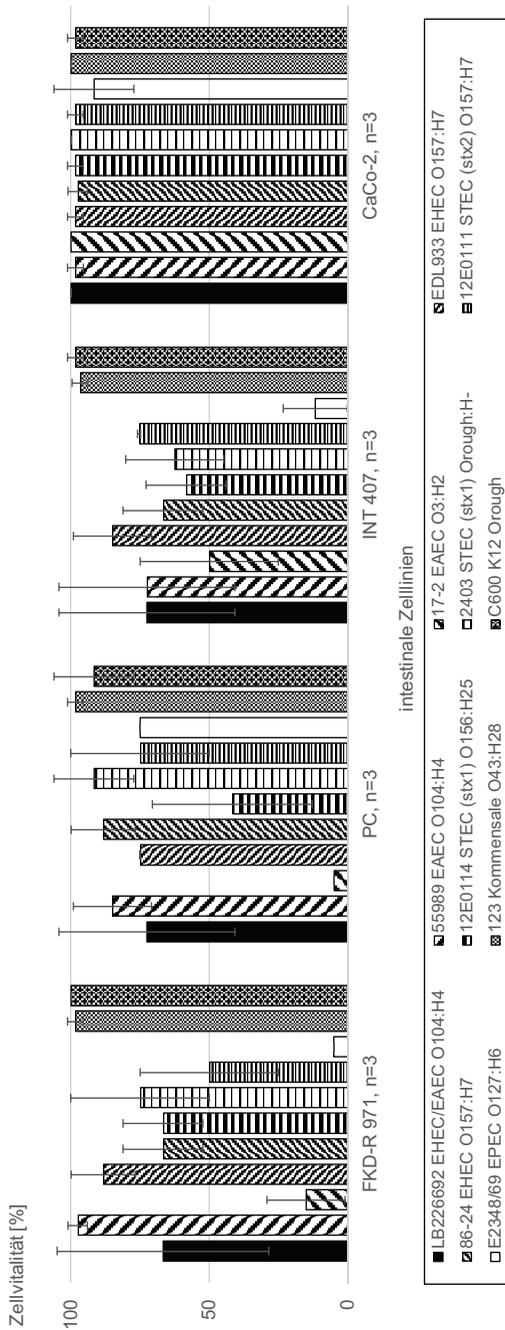


Abbildung 30: Zellviabilität von IEC 6 h p.i. mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von 3 unabhängigen Versuchen, ermittelt durch semiquantitative Auswertung des mikroskopischen Bildes (Giemsa-Färbung). 100 % Zellviabilität entsprach dem morphologischen Erscheinungsbild der nicht infizierten Zellkontrolle, bei 50 % Zellviabilität war die Hälfte der Zellen abgelöst oder zeigte eine veränderte Morphologie. Bei vollständiger Ablösung aller Zellen wurde die Zellviabilität mit 0 % bewertet.

Zelluntergang bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Durch den im Versuchsablauf enthaltenen Waschschrift der Ansätze nach 3 h Koinkubation mussten die Untersuchungszeitpunkte getrennt betrachtet werden.

Insgesamt besaß der Hybridstamm eine Zytotoxizität vergleichbar zu den Stämmen anderer Pathovaren, wobei die virulenten Stämme die Wirtszellen stärker schädigten als apathogene Stämme (**Tabelle 34**).

Nach **3 h Koinkubation** traten hinsichtlich der LDH-Freisetzung zwischen den Stämmen keine signifikanten Unterschiede auf (**Abbildung 31**). Dennoch induzierten die human assoziierten *E. coli* eine signifikant stärkere LDH-Freisetzung in humanen Dünndarmzellen als die apathogene K12-Kontrolle (**Tabelle 34**). Auch die STEC-Pathovaren induzierten signifikant mehr LDH-Freisetzung als der apathogene K12-Stamm (**Tabelle 35**).

Zusätzlich zu den INT 407-Zellen wurden nach **6 h Koinkubation** die bovinen Zellen signifikant stärker durch human und bovin assoziierte Stämme geschädigt als durch die apathogene Kontrolle (**Tabelle 34**). Auch der EHEC/EAEC-Pathotyp und die Pathotypen EAEC, EHEC und STEC induzierten signifikant mehr LDH-Freisetzung als der apathogene K12-Stamm (**Tabelle 35**). Auf den Kolonkryptenzellen induzierte der Hybridstamm eine signifikant stärkere LDH-Freisetzung als der EHEC-Stamm 86-24 (**Abbildung 33**).

Außerdem zeichnete sich, mit Ausnahme der bovinen FKD-R 971-Zellen (**Tabelle 32**, Wilcoxon-Test, $p=0,000$), keine klare Tendenz für eine Zunahme der über die LDH-Freisetzung bestimmten Zytotoxizität von 3 h nach 6 h Koinkubation ab.

LDH 3 h [x-fach C600]

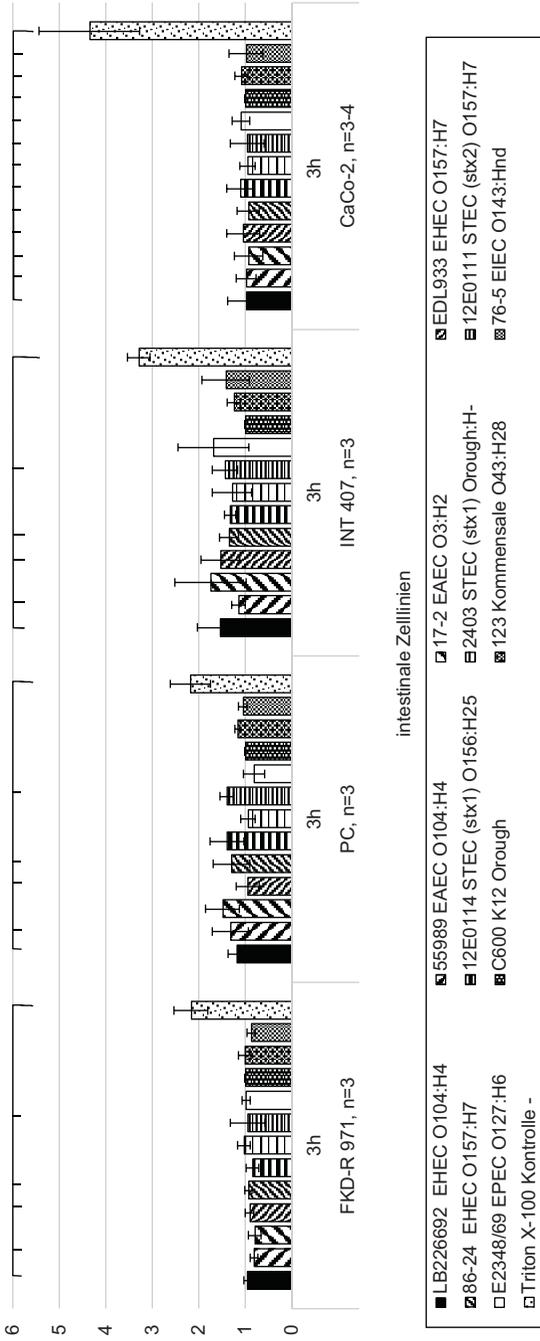


Abbildung 31: Umfang zytotoxischer Effekte in mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen inokulierten IEC-Kulturen 3 h p.i.

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus 3-4 unabhängigen Bestimmungen der LDH-Freisetzung.

Signifikanz (p \leq 0,029) waren nur zwischen dem Kontrollansatz mit Triton X-100 und einzelnen Stämmen nachweisbar (gekennzeichnet durch die schwarze Linie).

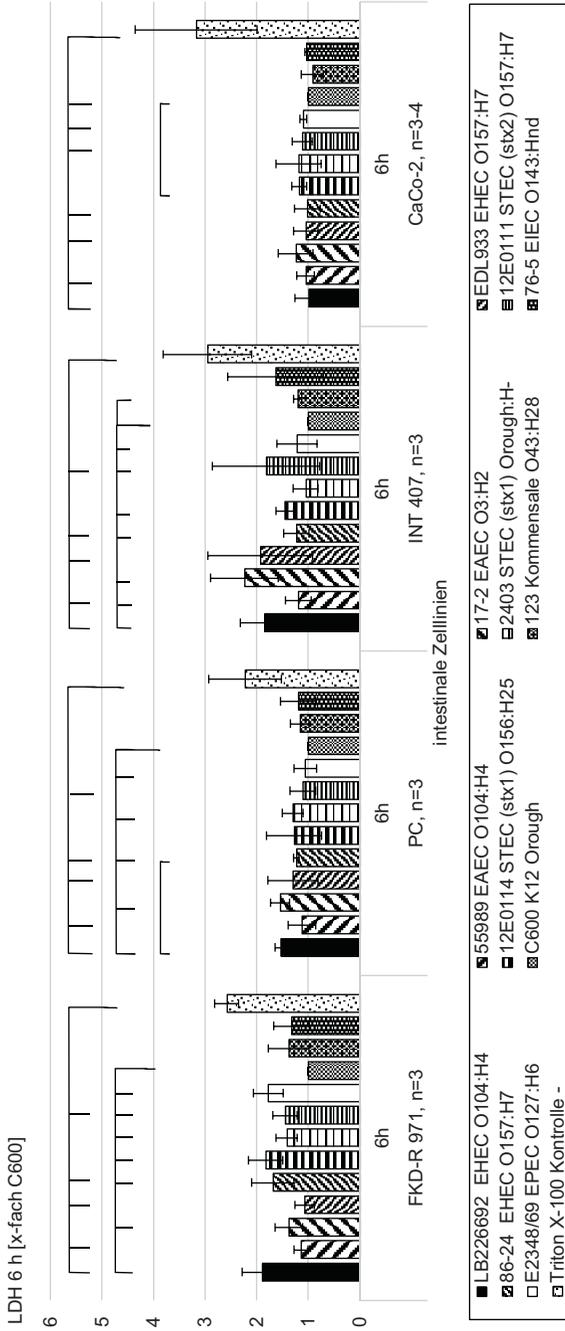


Abbildung 32: Umfang zytotoxischer Effekte in mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen inokulierten IE-C-Kulturen 6 h *p.i.*

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus 3-4 unabhängigen Bestimmungen der LDH-Freisetzung. Signifikanz ($p \leq 0,05$) sind mit schwarzen Linien gekennzeichnet.

4.2.6 Beeinflussung der Epithelintegrität polarisierter CaCo-2-Zellmonolayer

Die Integrität der Barrierefunktion der polarisierten CaCo-2-Zellen blieb bei Infektion mit dem Hybridstamm erhalten. Die Kinetik der Veränderung des TEER-Werts bei Inokulation mit dem Hybridstamm ähnelte dabei den human assoziierten EHEC- und EAEC-Stämmen (**Abbildung 33**). Der TEER-Wert bei Infektion mit den human assoziierten Stämmen stieg über den Untersuchungszeitraum in Relation zum apathogenen *E. coli* 123 an. Der *E. coli*-Stamm 123 induzierte absolut ebenfalls eine Zunahme des TEER-Werts über den Untersuchungszeitraum. Im Gegensatz zum Hybridstamm kam es bei Infektion mit dem bovinen STEC-Stamm 12E0114 und dem EPEC-Stamm zu einer Reduktion des TEER-Wertes.

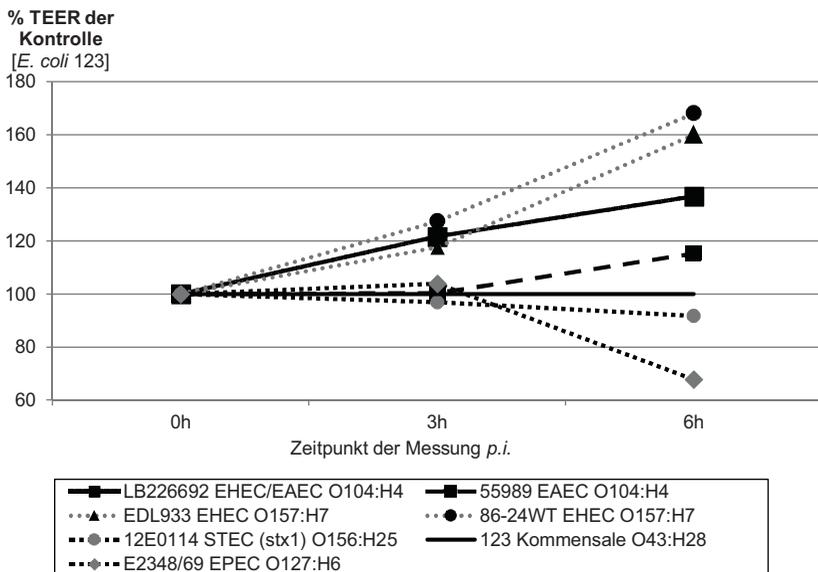


Abbildung 33: Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) polarisierter CaCo-2-Zellen nach Inokulation mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

4.2.7 Expression von *E. coli*-Virulenzfaktoren

Bei der Interaktion der *E. coli*-Stämme mit den wirtsspezifischen IEC wurde die Regulation von klassischen STEC- (*stx1*, *stx2*, *iha*) und EAEC-Virulenzgenen (*aggR*, *pic*) sowie das freigesetzte Stx bestimmt.

4.2.7.1 Wirts-induzierte Virulenzgenexpression

Bei Wirtszellkontakt kam es zu einer Hochregulation der untersuchten STEC- und EAEC-Virulenzgene bei den *E. coli*-Stämmen im Vergleich zur Expression von *gapA* (**Abbildung 34**). Die Adhäsion an Dünndarmzellen verstärkte die Transkription der Virulenzgene im Vergleich zum Zellkontakt mit differenzierten Dickdarmzellen, jedoch unabhängig der Wirtsspezies. Der Hybridstamm regulierte bei Zellkontakt die Transkription der untersuchten Gene nicht stärker herauf als die anderen *E. coli*-Stämme. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten *E. coli*-Stämmen (**Tabelle 21**).

Die Genregulation des STEC-Hauptvirulenzfaktors Stx wurde getrennt für ***stx1*** und ***stx2*** betrachtet. Auf CaCo-2-Zellen zeigte kein Stamm eine verstärkte Toxingentranskription. Hingegen war auf den Dünndarmzellen von Mensch und Rind bei den *stx2*-positiven human assoziierten Stämmen (EDL933, LB226692) eine stärkere *stx2*-Transkription festzustellen als bei dem bovin assoziierten Stamm (12E0111), der insgesamt nur sehr wenig *stx2*-mRNS bildete. Der humane EDL933-Stamm zeigte zudem eine verstärkte *stx1*-Transkription. Im Vergleich zum bovinen Stamm 12E0114 war die *stx1*-Transkription von EDL933 allerdings nur auf den bovinen Zellen erhöht, bei Kontakt mit humanen INT 407-Zellen auf einem vergleichbaren Niveau.

Das Gen des Adhäsionsfaktors ***Iha*** wurde nur von den human assoziierten Stämmen vermehrt transkribiert und dies bei den EHEC- und EAEC-Stämmen insbesondere nach Kontakt mit bovinen IECs. Der Hybridstamm transkribierte *iha* insbesondere bei Inkubation auf den beiden Dünndarmzelllinien.

Die Transkription der EAEC-Virulenzfaktoren (***aggR***, ***pic***) erfolgte bei dem Hybridstamm in ähnlichem Maß wie bei dem EAEC-Stamm 55989. Nur auf den bovinen Kolonkryptenzellen wurden beide Gene etwas stärker bei dem EAEC-Stamm 55989 induziert, als dies bei dem Hybridstamm der Fall war.

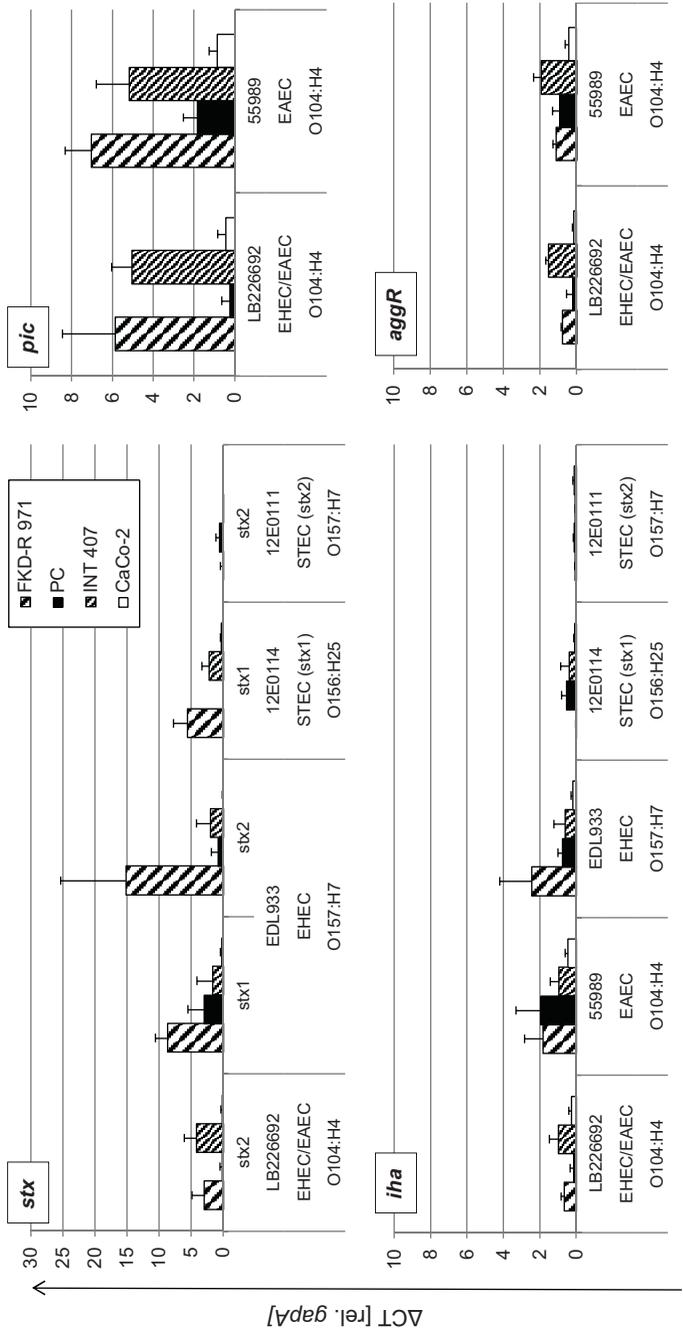


Abbildung 34: Virulenztranskription der *E. coli*-Stämme bei Adhäsion an IEC

Dargestellt sind Mittelwert (+ Standardabweichung) von 3 unabhängigen Versuchen nach 3-stündiger Inkubation in Relation zu *gapA*. Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten *E. coli*-Stämmen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz).

4.2.7.2 Untersuchungen der Stx-Produktion und -Freisetzung nach Kontakt zu IEC

Absolute Freisetzung von Stx im Zellkulturmodell zwischen 3 h und 6 h *p.i.* (ELISA)

Insgesamt betrachtet, sezernierte der Hybridstamm vergleichsweise geringe Mengen an Stx, unabhängig von der eingesetzten Zelllinie. So war das meiste Toxin nachweisbar bei den Stämmen, die ein *stx1*-Gen besaßen (EDL933, 12E0114, 2403). Alle Stämme, die ausschließlich für Stx2 kodierten (Hybridstamm, 86-24, 12E0111), exprimierten deutlich weniger Toxin. Unter den *stx2*-positiven Stämmen produzierte der Hybridstamm, vergleichbar mit den humanen EHEC-Stämmen, signifikant mehr Stx als der bovine STEC-Stamm 12E0111 (**Abbildung 35, Tabelle 22**). Der EHEC-Stamm EDL933 sezernierte allerdings signifikant mehr Toxin als der Hybridstamm, jedoch kodierte der EHEC-Stamm EDL933 beide Stx-Subtypen, die im eingesetzten ELISA nicht unterschieden werden.

Der Hybridstamm und die anderen Stx-produzierenden *E. coli*-Stämme sezernierten deutlich mehr Toxin bei Kontakt mit undifferenzierten Dünndarmzellen beider Spezies als bei Kultivierung mit differenzierten Dickdarmzellen. Ohne Unterscheidung des Stx-Subtyps lag die Stx-Freisetzung des Hybridstammes intermediär zu klassischen STEC-Stämmen (*stx1* und *stx2*) und geringer als zu humanen EHEC-Stämmen (*stx2* oder *stx1/2*) (**Tabelle 24**) und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den STEC- und EHEC-Pathotypen (**Tabelle 23**).

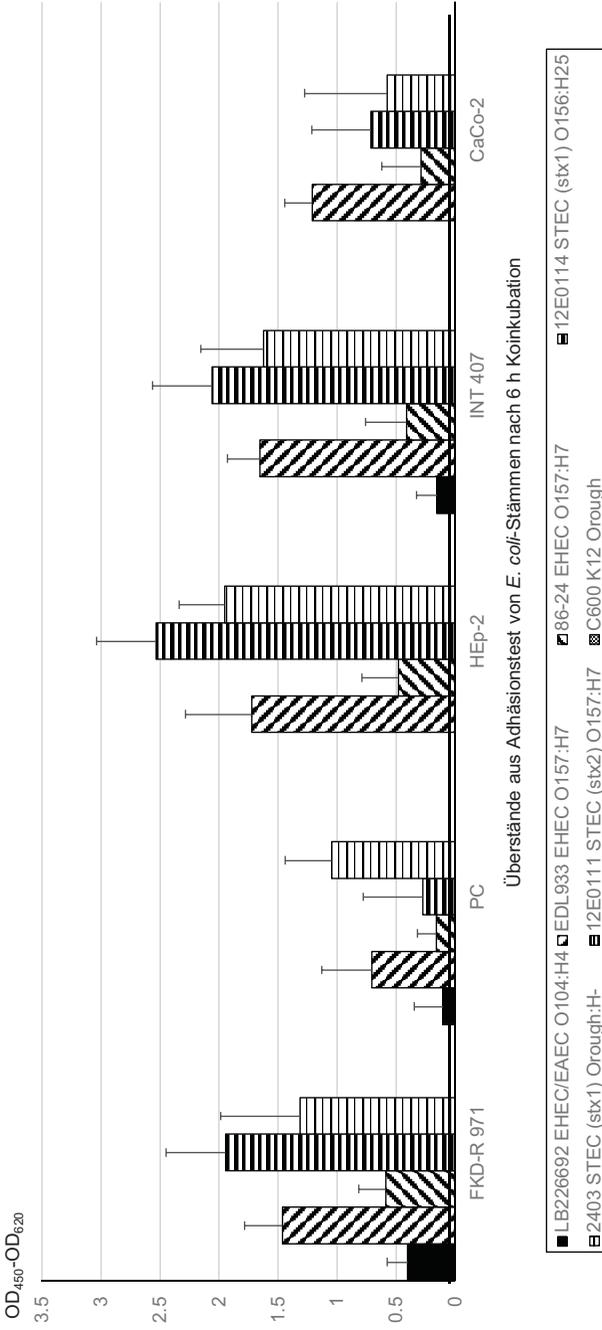


Abbildung 35: Shigatoxin-Freisetzung in den Kulturüberstand von *E. coli*-Stämmen nach 6 h Koinkubation auf verschiedenen Wirtszellen

Ergebnisse aus dem ELISA, dargestellt sind die absoluten OD-Mittelwerte (+ Standardabweichung) von 5 unabhängigen Infektionen (schwarze Linie = *cut-off*). Signifikante Unterschiede siehe **Tabelle 22**.

Relative Freisetzung von Stx als Maß für die Induzierbarkeit bei Wirtszellkontakt

Um den tatsächlichen Effekt des Wirtszellkontaktes auf die Stx-Sekretion zu beurteilen, wurden die absolut freigesetzten Mengen auf die stammspezifische Basalexpression von Stx in einem zellfreien Ansatz bezogen (**Tabelle 12**).

Dabei zeigte sich, dass der Hybridstamm nach Kontakt mit den FKD-R 971-, PC- und INT 407-Zellen deutlich mehr Stx freisetzte als die übrigen getesteten Stämme. Allerdings wirkte sich die Koinkubation auf CaCo-2-Zellen hemmend auf die Stx-Produktion des Hybridstammes aus. Für alle *E. coli*-Stämme bestätigte sich, dass die Stx-Produktion jeweils bei Wirtszellkontakt mit den undifferenzierten Dünndarmzellen beider Spezies stärker war als im Vergleich zur Koinkubation mit den jeweiligen Dickdarmzellen (**Tabelle 12**). Neben dem Hybridstamm steigerte nur der human assoziierte EHEC-Stamm EDL933 deutlich die Stx-Sekretion bei Kontakt mit humanen Dünndarmzellen. Auffällig war die deutliche Reduktion der Stx-Freisetzung bei dem STEC-Stamm 12E0111, die unabhängig von der Wirtszelle nachweisbar war.

Tabelle 12: Stx-Induzierbarkeit bei Wirtszellkontakt

Wirtszellen	Regulation der Stx-Expression nach Infektion von IEC ($\text{Stx-Titer}_{6\text{ h IEC-Koinkubation}}/\text{Stx-Titer}_{3\text{ h Medium Koinkubation}}$)					
	LB226692	EDL933	86-24	12E0114	2403	12E0111
	EHEC/EAEC	EHEC	EHEC	STEC (<i>stx1</i>)	STEC (<i>stx1</i>)	STEC (<i>stx2</i>)
	O104:H4	O157:H7	O157:H7	O156:H25	O _{rough} :H-	O157:H7
FKD-R 971	3,345	0,833	0,828	0,777	0,580	0,082
PC	2,430	0,540	0,363	0,190	0,545	0,165
INT 407	2,638	1,551	1,063	1,277	0,995	0,156
CaCo-2	0,065	0,889	0,788	0,460	0,399	0,083

Erläuterung $\text{Stx-Titer} = \text{OD}_{450} - \text{OD}_{620}$.

Regulation der Stx-Sekretion durch Wirtszellkontakt nach Verrechnung der basalen Stx-Sekretion der Stämme in 3 unabhängigen Versuchen ohne Zellkontakt: $\geq 1,5$ (Hochregulation, rot), $0,5 - 1,5$ (keine Regulation, grau) und $\leq 0,5$ (Hemmung, blau).

Quantitative Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx (VeroZT)

Im Verozell-Zytotoxizitätstest bestätigten sich die ELISA-Ergebnisse (**Abbildung 36**). Bei Betrachtung der *stx2*-positiven Stämme war festzustellen, dass der Hybridstamm und der EHEC-Stamm 86-24 bei Kokultivierung mit IEC bis zu 6 h *p.i.* kaum nachweisbar funktionelles Toxin freisetzen, während der EHEC-Stamm EDL933 dies in großen Mengen tat (**Abbildung 36**). Im VeroZT gelang sogar der Nachweis einer schwachen Stx-Aktivität (1/2 Nachweisgrenze) bei dem STEC-Stamm 12E0111, obwohl dieser im ELISA Werte unterhalb des *cut-offs* aufwies. Die Zytotoxizität der Vertreter der Pathovaren (EHEC, STEC, EHEC/EAEC) war signifikant erhöht zur Negativkontrolle (K12-Stamm) (**Tabelle 26**). Die verschiedenen Testmedien und mit dem K12-Stamm C600 konditionierten Überstände waren nicht zytotoxisch.

Auffallend war, dass die *stx1*-positiven STEC-Stämme (12E0114, 2403) viel Verozell-Zytotoxizität bei Kontakt mit IEC freisetzen. Ohne Unterscheidung des Stx-Subtyps variierte die Stx-Aktivität der *E. coli*-Stämme erheblich, selbst innerhalb eines Pathovars (**Abbildung 36**). Allerdings produzierten die bovinen Stämme auf bovinen Zellen im Mittel eine signifikant höhere CD_{50}/ml als die humanen Stämme (**Tabelle 27**). Ohne Unterscheidung der Stx-Subtypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität von STEC- oder EHEC-Pathotypen und in den Überständen von FKD-R 971-Zellen war nach Inokulation mit STEC- und EHEC-Stämmen signifikant mehr verozellzytotoxische Aktivität nachweisbar als nach Inokulation mit dem Hybridstamm (**Tabelle 26**).

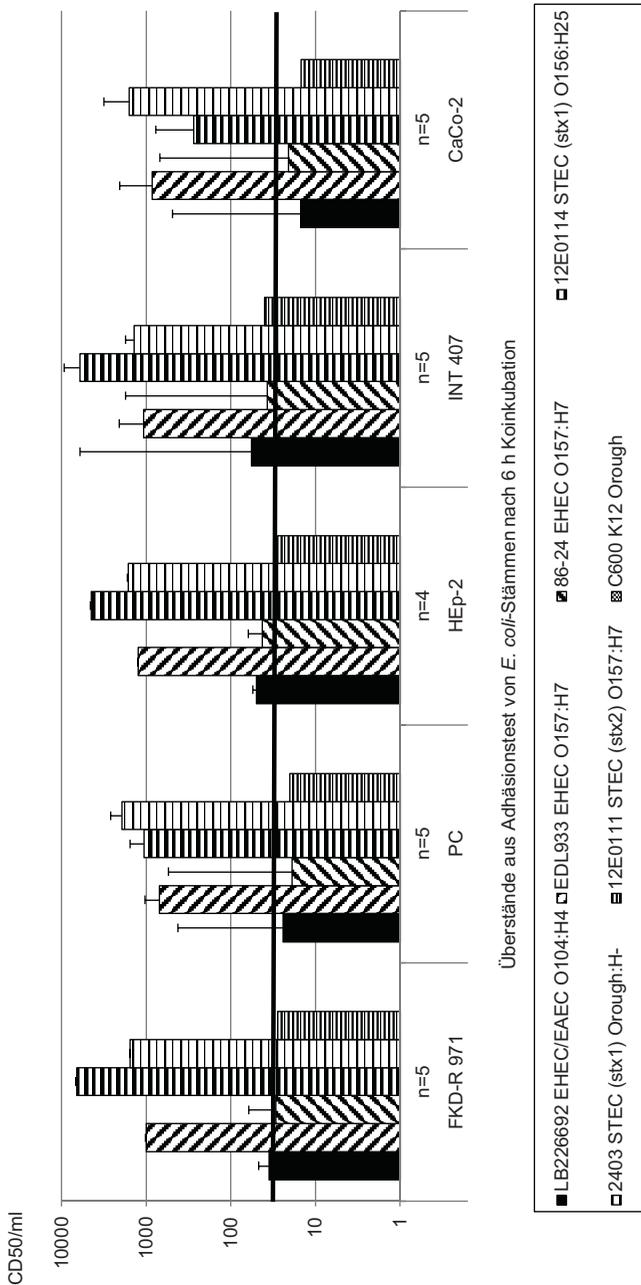


Abbildung 36: Quantitative Bestimmung der Shigatoxin-Bildung und –Freisetzung durch *E. coli*-Stämme nach Inokulation von IEC-Kulturen mittels Verzelltest

Dargestellt sind Mittelwerte (+ Standardabweichung) von 4–5 unabhängigen Versuchen zum Probenahmezeitpunkt nach 6 h Inkubation (schwarze Linie = Nachweisgrenze bei 30 CD₅₀/ml). Signifikante Unterschiede siehe **Tabelle 25**.

4.3 Indirekte Interaktion des Hybridstammes mit bovinen Makrophagen

Die Fähigkeit des Hybridstammes zur Modulation der mukosalen Immunität im Rind wurde *in-vitro* durch die Stimulation von primären Makrophagen untersucht. Zur Stimulation wurden Zellkulturüberstände verwendet, die aus einer 3-stündigen Kokultur von *E. coli* und bovinen Epithelzellen gewonnen wurden. So konnte in zwei Schritten die komplexe Interaktion luminaler Bakterien mit den intestinalen Epithelzellen und den darunter lokalisierten Immunzellen *in-vitro* simuliert werden.

Wirtszellantwort bei Stimulation mit Überständen von FKD-R 971-Zellen

Die Stimulation der Makrophagen mit konditionierten Überständen von infizierten FKD-R 971-Zellkulturen führte nur zu einer geringen Aktivierung der Makrophagen im Vergleich zur Inkubation mit Überständen von Zellen, die mit dem K12-Stamm C600 inokuliert worden waren (**Abbildung 37, Tabelle 46**). Die Überstände des Hybridstammes induzierten eine inflammatorische Wirtszellantwort, insbesondere vergleichbar mit der von human assoziierten *E. coli*-Stämmen und dem sporadischen STEC-Stamm 12E0111. Der Hybridstamm induzierte die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* und *IL-6* signifikant stärker als C600, dabei vergleichbar zu den human und bovin assoziierten Stämmen (EAEC, EHEC, STEC). Wie der Hybridstamm erreichten der EAEC-Stamm 55989, der EHEC-Stamm 86-24 und der STEC-Stamm 12E0111 Signifikanz bei der Stimulation von *IL-1 β* und letzterer auch für die Stimulation von *IL-6*. Das antiinflammatorische Zytokin *IL-10* induzierte der Hybridstamm signifikant stärker als C600, mit viel Gemeinsamkeit zum EAEC-Stamm 55989 und dem sporadischen STEC-Stamm 12E0111. Hingegen wurde das antiinflammatorische Zytokin *TGF- β* kaum reguliert. Die proinflammatorischen Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *MCP-1*, *RANTES*) und die *iNOS*-Transkription induzierte der Hybridstamm so stark wie C600 und damit vergleichbar zu den human und bovin assoziierten Stämmen (EAEC, EHEC, STEC). Der STEC-Stamm 12E0111 unterschied sich vom Hybridstamm durch die signifikante stärkere Induktion der Chemokine *GRO- α* und *IL-8* sowie durch die signifikant schwächeren Induktion von *iNOS* im Vergleich zu C600.

Wirtszellantwort bei Stimulation mit Überständen von Kolonkryptenzellen

Die konditionierten Kolonkryptenzellüberstände modulierten die Wirtszellgenexpression der Makrophagen stark, dabei führten die Überstände des Hybridstammes zu einer stark proinflammatorischen Wirtszellantwort, insbesondere durch Induktion von Chemokinen (**Abbildung 38, Tabelle 47**). Unter den proinflammatorischen Zytokinen (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *IFN- γ* , *TNF- α*) induzierte der Hybridstamm das Zytokine *IL-12* stärker als C600, jedoch ohne Signifikanz. Die human assoziierten EHEC-Stämme und der sporadische Rinder-STECC-110

Stamm 12E0111 induzierten ebenfalls *IL-12* stärker als C600, jedoch mit Signifikanz und darunter der EHEC-Stamm 86-24 am stärksten. Der *eae*-negative STEC-Stamm 2403 induzierte die Zytokine *IL-1 β* sowie *IL-6* und hemmte *IL-12* jeweils signifikant. Der bovin assoziierte STEC-Stamm 12E0114 hemmte alle proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine signifikant im Vergleich zu C600 und lediglich *IL-6* und *TGF- β* ohne Signifikanz. Der Hybridstamm regulierte die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*) kaum, hingegen induzierten der human assoziierte EAEC-Stamm 55989 sowie die bovin assoziierten STEC-Stämme 2403 und 12E0111 das antiinflammatorische *IL-10* signifikant stärker als C600. Dies traf auch für die EHEC-Stämme zu, jedoch ohne Signifikanz. Als Herausstellungsmerkmal der stark inflammatorischen Wirtszellantwort durch den Hybridstamm induzierte dieser um das mehr als 100-fache die proinflammatorischen Mediatoren *MCP-1* und *iNOS*, dabei jeweils signifikant im Vergleich zu C600. Die human assoziierten EAEC- und EHEC-Stämme induzierten diese proinflammatorischen Mediatoren mit geringer Intensität und nur EAEC-Stamm 55989 mit Signifikanz. Kein bovin assoziierter STEC-Stamm induzierte *iNOS*. Der STEC-Stamm 12E0114 hemmte zudem signifikant das Chemokin *MCP-1*, während die STEC-Stämme 2403 und 12E0111 eine leichte *MCP-1* Induktion zeigten, letzterer sogar mit Signifikanz. Die weiteren Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *RANTES*) regulierte der Hybridstamm kaum oder geringer als C600. Im Unterschied dazu induzierten die human assoziierten EAEC- und EHEC-Stämmen und STEC-Stamm 12E0111 einige dieser Chemokine mindestens so stark wie C600. Die bovin assoziierten STEC-Stämme 12E0114 und 2403 induzierten diese Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *RANTES*) ebenfalls nur wenig und STEC-Stamm 12E0114 hemmte *GRO- α* sogar signifikant im Vergleich zu C600.

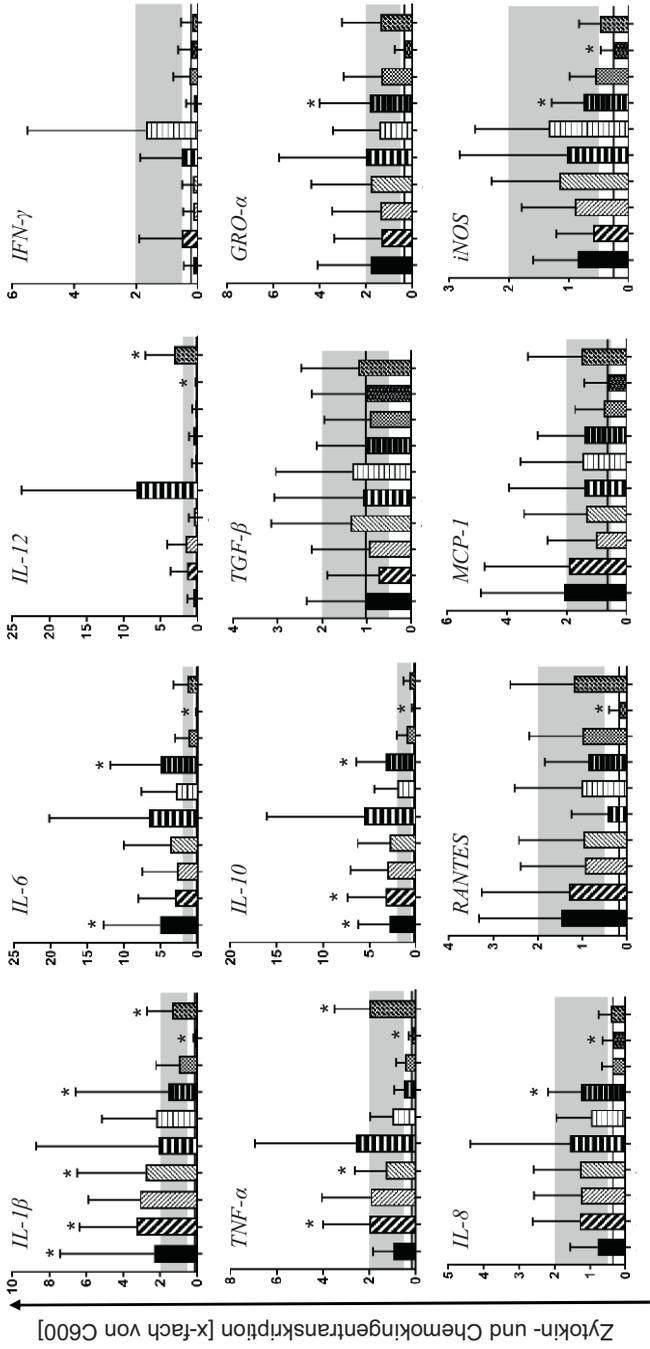


Abbildung 37: Transkription von Zyto- und Chemokingen boviner Makrophagen nach 3 h Koinkubation mit konditionierten FKD-R 971-Überständen (n=3)

Signifikante Unterschiede (siehe **Tabelle 46**, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest); Erklärung (siehe **Abbildung 22**), in Abweichung davon wurde die Genexpression hier auf die Genexpression nach Inkubation mit C600-konditionierten Überständen normalisiert.

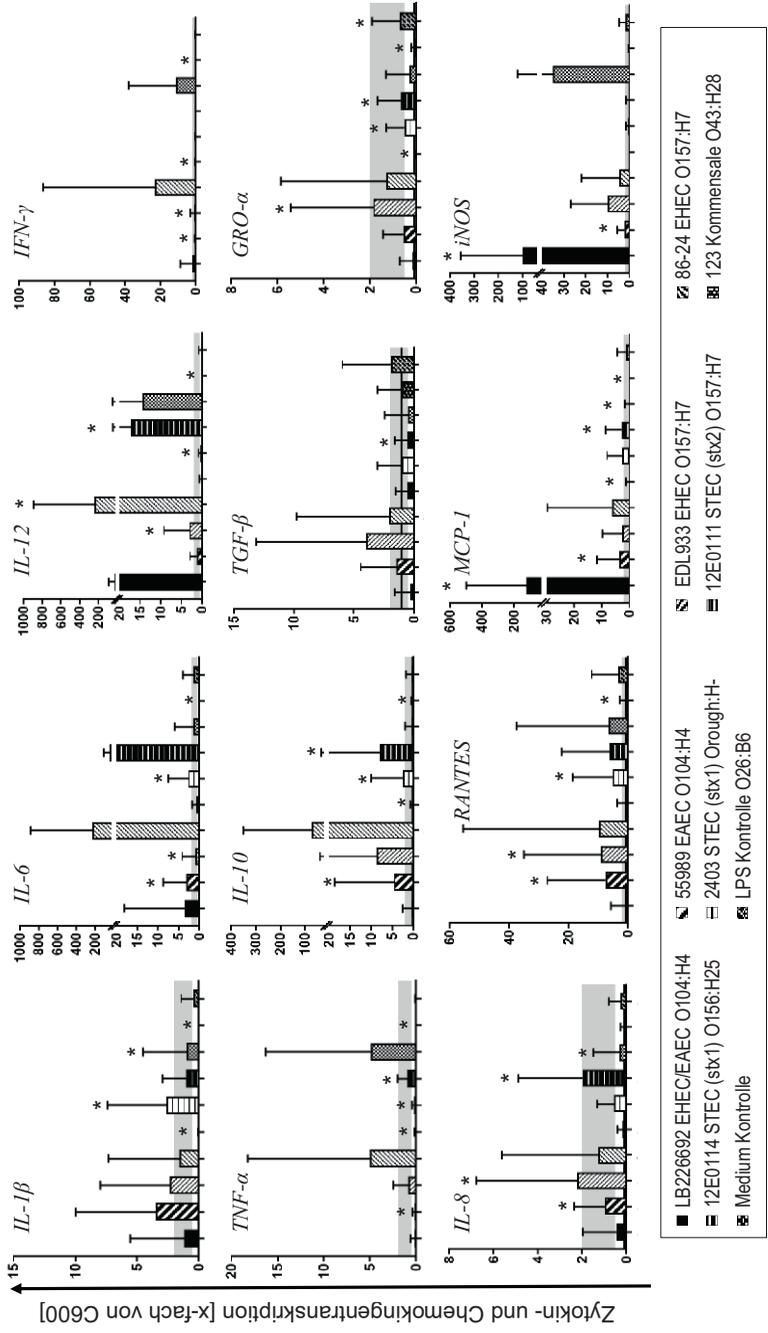


Abbildung 38: Transkription von Zyto- und Chemokingenen boviner Makrophagen nach 3 h Koinkubation mit konditionierten PC-Überständen (n=2-3)

Signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 47, $p \leq 0,05$, Randomisierungstest); Erklärung (siehe Abbildung 37)

IL-12/IL-10-Verhältnis bei Stimulation mit konditionierten Überständen

Die Transkription von *IL-10* und *IL-12* bei den Makrophagen variierte stark bei Stimulation mit den konditionierten Kolonkryptenzell(PC)-Überständen, im Gegensatz zur Stimulation mit FKD-R 971-Zell-Überständen (**Tabelle 13**). Die vom Hybridstamm konditionierten PC-Überstände induzierten eine Makrophagenantwort, die durch eine verstärkte Induktion von *IL-12* und geringe Induktion von *IL-10* gekennzeichnet war. Das *IL-12/IL-10*-Verhältnis, als Marker für eine T_H1/T_H2 -dominierte Immunantwort, war nach Inkubation mit Überständen, die mit dem Hybridstamm konditioniert worden waren, erhöht im Vergleich zu Ansätzen mit Überständen aus Versuchen mit anderen *E. coli*-Stämmen (**Tabelle 13**). Das *IL-12/IL-10*-Verhältnis war ebenfalls ohne Signifikanz erhöht bei Stimulation mit den Überständen des avirulenten *E. coli*-Stammes 123, sowie des EHEC-Stammes 86-24 und des bovinen STEC-Stammes 12E0111.

Tabelle 13: Verhältnis der Quantität der *IL-12*- und *IL-10*-spezifischen mRNS bei bovinen Makrophagen nach 3 h Koinkubation mit konditionierten Überständen boviner IEC

Stamm	<i>E. coli</i> -Stimulanz		<i>IL-12/IL-10</i> -Verhältnis	
	Gruppe	Serotyp	FKD-R 971	PC
LB226692	EHEC/EAEC	O104:H4	0.22	59.49
55989	EAEC	O104:H4	0.44	0.26
EDL933	EHEC	O157:H7	0.52	0.36
86-24	EHEC	O157:H7	0.18	3.31
12E0114	STEC (<i>stx1</i>)	O156:H25	1.47	0.53
2403	STEC (<i>stx1</i>)	O _{rough} :H-	0.17	0.14
12E0111	STEC (<i>stx2</i>)	O157:H7	0.17	2.16
123	Kommensale	O43:H28	0.32	40.98
Medium	Kontrolle	-	0.67	0.07
LPS	Kontrolle	O26:B6	5.02	0.74

Erläuterung Verhältnis berechnet mit Werten gemessen nach Inkubation mit konditionierten Überständen von FKD-R 971- (n=3) und Kolonkryptenzellen (PC, n=2-3).

4.4 Einfluss einer experimentellen Infektion mit dem Hybridstamm auf das Immunsystem des Rindes

Die Fähigkeit des Hybridstammes, die Entstehung einer zellulären Immunität im Rind zu unterdrücken, wurde im Rahmen einer Infektionsstudie untersucht, bei der Kälber mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen inokuliert wurden (Gruppe 1 = avirulenter *E. coli*-Stamm, Gruppe 2 = STEC-Stamm, Gruppe 3 = Hybridstamm). Dazu wurden über 4 Wochen die adaptive Immunantwort durch Quantifizierung der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T-Gedächtniszellen (T_M) nach (Re-)Stimulation mononukleärer Blutzellen mit hitzein-

aktivierten Lysaten der Infektionsstämmen bzw. eines polyklonal aktivierenden Mitogens (ConA) untersucht. Die Aktivierung der T-Gedächtniszellen wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt und als Änderung des *geometric mean* der Fluoreszenzintensität in Relation zur unstimulierten Kontrolle angegeben (**Abbildung 39, Abbildung 40**).

Die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf den **CD4⁺ T-Gedächtniszellen** bei Stimulation mit ConA und den *E. coli*-Ganzzelllysaten unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tiergruppen (**Abbildung 39, Tabelle 36**). Alle drei Gruppen reagierten nur gering gegenüber der Stimulation mit ConA. Die Gruppe 1, inokuliert mit dem avirulenten *E. coli*-Stamm 123, zeigte nur geringe Reaktivität gegenüber der *ex-vivo* Stimulation. Die Gruppe 2, inokuliert mit dem klassischen STEC-Stamm 86-24, zeigte ebenfalls nur wenig Aktivierung der CD4⁺ T_M-Zellen, sowohl bei der Stimulation mit den heterologen Ganzzelllysaten 1 (123) und 3 (LB226692) als auch gegenüber dem homologen Stimulanz (GZL 2). Die Gruppe 3, inokuliert mit dem Hybridstamm, zeigte ebenfalls nur eine geringe Aktivierung der CD4⁺ T_M-Zellen bei heterologer und homologer Stimulation.

Die CD25-Expression auf **CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen** (**Abbildung 40**) unterschied sich zwischen den Tiergruppen nur nach Stimulation mit dem Ganzzelllysate des STEC-Stammes 86-24 signifikant (**Tabelle 37**). Dabei zeigte sich eine signifikante Hemmung der CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen bei homologer Stimulation (GZL 2) der mit dem STEC-Stamm inokulierten Tiergruppe (Gruppe 2), im Vergleich zur Tiergruppe 3 (Hybridstamm) an Tag 0 und Tag 28 *p.i.*. Die mit dem Hybridstamm inokulierte Tiergruppe (Gruppe 3) zeigte eine signifikant stärkere Aktivierung der CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen bei heterologer Stimulation (GZL 2) als bei Infektion mit dem STEC-Stamm 86-24 und zusätzlich als bei Infektion mit dem avirulenten *E. coli*-Stamm 123. Das Stimulationsprofil der Tiergruppen, die mit einem Stx-haltigen Stamm inokuliert worden waren, ähnelte sich (Gruppe 2 und Gruppe 3). Gruppe 1, die mit dem avirulenten *E. coli*-Stamm inokuliert worden war, zeigte insgesamt nur eine geringe Erhöhung der CD25-Expression nach *in-vitro* Simulation.

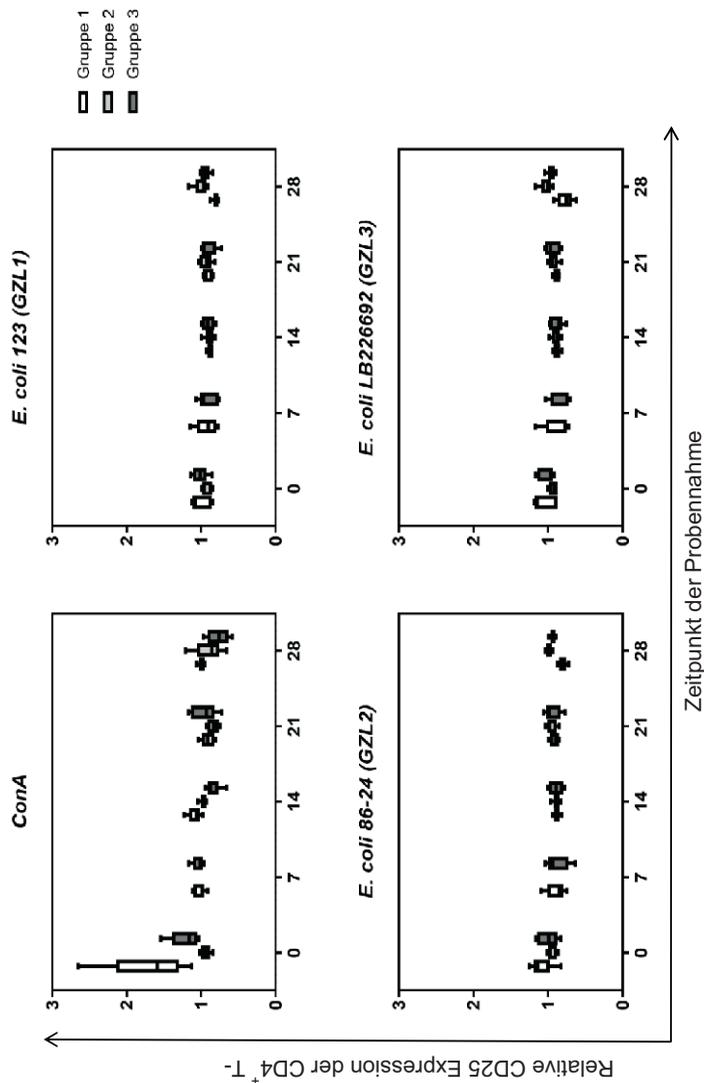


Abbildung 39: Expression von CD25 auf CD4⁺ T-Gedächtniszellen (CD45⁺, T_M)

Die relative Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4⁺ T_M-Zellen der infizierten Kälber (Gruppe 1 = avirulenter *E. coli*-Stamm 123, Gruppe 2 = STEC-Stamm 86-24, Gruppe 3 = Hybridstamm LB226692) wurde nach Stimulation mit ConA und Ganzzeillysaten der Inokulatstämme (123, 86-24 und LB226692) im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle angegeben. Keine signifikanten Unterschiede (siehe **Tabelle 36**)

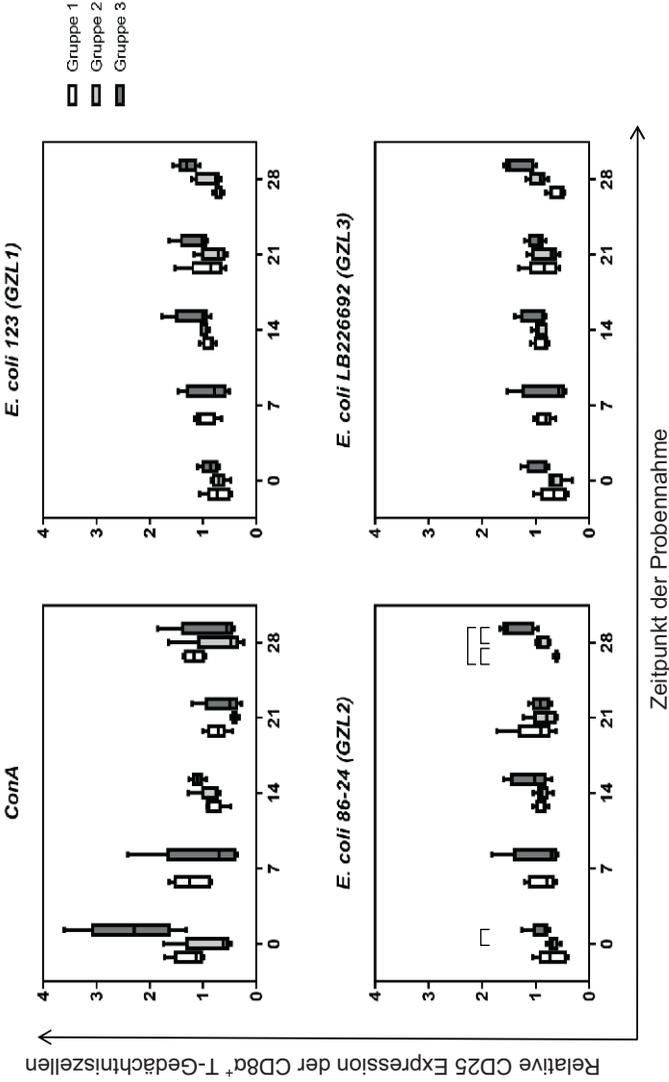


Abbildung 40: Expression von CD25 auf CD8 α^+ T-Gedächtniszellen (CD45 $^+$, T $_M$)

Die relative Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD8 α^+ T $_M$ -Zellen der infizierten Kälber (Gruppe 1 = 123, Gruppe 2 = 86-24, Gruppe 3 = LB226692) wurde nach Stimulation mit ConA und Ganzzelllysaten der Inokulatstämme (123, 86-24 und LB226692) im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle angegeben. (Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, $p \leq 0,05$, schwarze Linien, siehe auch **Tabelle 36** und **Tabelle 37**)

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, durch experimentelle Untersuchungen eine Grundlage für die Risikoabschätzung zu schaffen, ob EAEC/EHEC-Hybridstämme wie der Stamm, der den HUS-Ausbruch 2011 ausgelöst hat, nach Eintrag in die Population (bzw. nach genetischer Rekombination zwischen STEC- und EAEC-Stämmen) auch Rinder als Reservoir nutzen können. Ausgehend von der Hypothese, dass der Hybridstamm besser an den Menschen adaptiert ist als an das Rind, wurde erwartet, dass der Hybridstamm humane Epithelzellen besser kolonisieren kann als bovine Zellen, dabei jedoch weniger inflammatorische Aktivität der Zellen hervorruft. Aufgrund der Hybridvirulenz sollte die Regulation der Virulenzfaktoren bei Wirtszellkontakt weniger ausbalanciert sein, als bei Stämmen, deren Vorkommen stärker an Menschen bzw. Rinder als Träger gebunden ist. Nach umfangreicher Charakterisierung der Interaktion des Hybridstammes mit humanen und bovinen intestinalen Epithelzellen *in-vitro* zeigte sich, dass der Hybridstamm fähig war intestinale Epithelzellen aus Dünn- und Dickdarm von Mensch und Rind zu kolonisieren. Er verfügte über ein hochgradiges Adhäsionsvermögen und induzierte eine proinflammatorische Aktivität der Wirtszellen, vergleichbar mit human assoziierten Stämmen. Der Hybridstamm exprimierte die Virulenzfaktoren verstärkt bei Wirtszellkontakt mit Dünndarmzellen, unabhängig der Wirtspezies und vergleichbar zu andere Pathovaren. Die Interaktionen des EAEC/EHEC-Hybridstammes LB226692 mit intestinalen Epithelzellen unterschieden sich weniger deutlich von Stämmen anderer Pathovaren und weniger deutlich zwischen Zellen von Rindern und Menschen als vermutet. Insgesamt hat das Reaktionsmuster die größte Ähnlichkeit zum *stx*-negativen EAEC-Stamm 55989. EAEC/EHEC-Hybridstämme schienen damit besser an die Kolonisation des menschlichen Darmes angepasst zu sein als an den des Rindes.

5.1 Testsysteme zur Untersuchung der Wirtsadaption des Hybridstammes

***E. coli*-Vergleichsstämme.** In dieser Studie wurden die *E. coli*-Vergleichsstämme je nach Wirtsprung als bovin und human assoziiert bezeichnet (**Tabelle 1**). Die Isolation eines Stammes aus einem bestimmten Wirt bedeutet allerdings nicht zwingend, dass eine Adaption an diesen Wirt stattgefunden hat, da auch eine transiente Kolonisation oder zufällige Passage denkbar ist. Typische EAEC-Stämme wurden bisher nicht von Tieren isoliert [131, 145] und der Mensch gilt als EAEC-Hauptinfektionsquelle [148]. Dies lässt eine Adaption von EAEC, wie Stamm 55989, an den Menschen vermuten. Der EHEC-Stamm EDL933, der 1982 einen EHEC-Ausbruch auslöste [12, 236], produziert *Stx1a* und *Stx2a* (**Abbildung 12**). Daher wurde auch der Wildtyp-Stamm 86-24 mitgeführt, der wie der Hybridstamm nur *Stx2a* kodiert und dessen Nalidixinsäure-resistentes Derivat auch in der

Kälberinfektionsstudie verwendet wurde [212, 282]. Das STEC-Isolat 12E0114 weist typische EHEC-Virulenzfaktoren wie *stx1*, *eae* und das Enterohämolysin *ehxA* (*hlyA*) auf. Seine Fähigkeit zur dauerhaften Kolonisation im Rind *in-vivo* ist umfangreich belegt [21, 22]. Der STEC-Stamm 2403, ein *eae*-negatives Isolat, wurde aus einem Kalb ohne Diarrhö isoliert [241]. Bei Stämmen des Serotyps O157:H7 variiert die Fähigkeit zur Kolonisation im Wirt [34]. Im Rind kann der Serotyp O157:H7 intestinale Läsionen und Inflammation induzieren [49], was die Elimination des Erregers begünstigt. Nur ein kleiner Teil der heterogenen bovinen STEC-Stämme repräsentiert humane Pathogene. Dabei beruht die geringe Überschneidung auf einer Zahl von Phagen-Typen [283]. Für den Serotyp O157:H7 und insbesondere das bovine Isolat 12E0111 ist nur eine sporadische Detektion im Rind beschrieben [22]. Das Isolat 12E0111 ist *stx2c*-positiv und produzierte weniger Toxin als der Hybridstamm und die human assoziierten O157:H7-Stämme (**Abbildung 35, Abbildung 36**). Die vom Stamm 12E0111 induzierte Wirtszellantwort ähnelte jedoch eher der durch die human assoziierten O157:H7-Stämme und weniger der durch bovin assoziierte Stämme (**Abbildung 27, Abbildung 29**).

Der Hybridstamm adhärierte stärker an die Wirtszellen als der Kommensale 123 (**Abbildung 15 bis Abbildung 17**), der auch als nicht adhärenter Vergleichsstamm in der Kälberinfektionsstudie mitgeführt wurde [212, 282]. Die bovin assoziierten STEC-Stämme adhärierten *in-vitro* geringer an die Epithelzellen und induzierten vor allem weniger inflammatorische Reaktion im bovinen Wirtszellsystem als der Hybridstamm (**Abbildung 22 bis Abbildung 25**). Insbesondere die STEC-Stämme 12E0114 und 2403 produzierten viel Stx1 (**Abbildung 35, Abbildung 36**) ohne eine inflammatorische Antwort in bovinen Wirtszellen zu induzieren. Die human assoziierten O157:H7-Stämme (EDL933, 86-24) und der Hybridstamm adhärierten dagegen stärker an die Wirtszellen als das bovine O157:H7-Isolat 12E0111. Im Unterschied zum Hybridstamm war der EAEC-Stamm 17-2 stark zytotoxisch (**Abbildung 30**), obwohl dieser wie der Hybridstamm und nur wenige EAEC-Stämme AAF/III-Fimbrien exprimiert [8]. Das Reaktionsprofil des Hybridstammes ähnelte insbesondere dem human assoziierten EAEC-Stamm 55989 hinsichtlich des Adhäsionsvermögens (**Abbildung 15 bis Abbildung 17**) und der Modulation der Wirtszellantwort (**Abbildung 22 bis Abbildung 29**). Beide Stämme besitzen eine zu 99,8 % identische Nukleotidsequenz. Der EAEC-Stamm 55989 unterscheidet sich nur durch die Expression der AAF/III-Fimbrie und das Fehlen von *stx* [136, 157, 186].

Wirtsspezifische Epithelzellsysteme. Zur Untersuchung der Rolle wirts- und erregersabhängiger Faktoren bei der Infektion und Kolonisation von Wirten mit zoonotischen Pathogenen sind adäquate Wirtszellsysteme essentiell [4]. Enteropathogene adhären bevorzugt an intestinale Zellen *in-vitro* [284]. Die relevanten Charakteristika der verwendeten

Wirtzellen sind in der **Tabelle 14** zusammengefasst. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit werden die Wirtszellen ungeachtet des Differenzierungsgrades als Dünn- und Dickdarmzellen angesprochen. Jedoch waren die Dünndarmzellen jeweils weniger differenziert als die Dickdarmzellen [285], wie auch die vorliegende Studie zeigte (**Abbildung 4, Abbildung 6, Abbildung 8**). Differenzierte Epithelzellen (Zytokeratin positiv) behalten physiologische Eigenschaften bei wie Polarität (Ausbildung von *tight junctions*, Desmosomen), die Mukusproduktion [286], die Expression antimikrobieller Komponenten (bakteriolytische Enzyme, Peptide) [285] sowie die charakteristische büstensaumassoziierte Enzymaktivität [287].

Die Dünndarmzellen von Mensch (INT 407) und Rind (FKD-R 971) entstammen embryonalem Gewebe aus Ileum bzw. Jejunum [288, 289]. Der geringe Differenzierungsgrad der **FKD-R 971-Zellen** könnte der embryonalen Herkunft [289] oder der hohen Passagezahl (>102) geschuldet sein (**Tabelle 2**). Die Immortalisierung der **INT 407-Zellen** erfolgte vor der endgültigen Differenzierung, woraus ein geringer Differenzierungsgrad resultiert [286]. Im Vergleich der beiden Dünndarmzelllinien stellten sich die INT 407-Zellen elektronenmikroskopisch differenzierter dar mit rudimentären *tight junctions* (**Abbildung 6**) und partieller Polarisierung, gekennzeichnet durch die streng apikale Kolonisation der *E. coli* (**Abbildung 19, Abbildung 20**). Dies ist ein Qualitätsmerkmal für die verwendeten INT 407-Zellen. Die Adhäsion (**Abbildung 15**) und Stx-Produktion (**Abbildung 35**) bei Interaktion mit INT 407-Zellen und HEp-2-Zellen waren vergleichbar, was der Tatsache geschuldet sein könnte, dass beide Zelllinien HeLa-Derivate sein sollen [290]. Jedoch bereits in der Erstbeschreibung der INT 407-Zellen ähnelten diese morphologisch nach 60-100 Tagen den HeLa-Zellen, einschließlich des Reaktionsprofils und der Generationszeit [288]. Daher werden INT 407-Zellen als valides Zellsystem für normale, fetale, intestinale Zellen angesehen [291].

Als humanes Modell für Kolonepithelzellen wurde die heterogene Adenokarzinom-Mutterzelllinie **CaCo-2** verwendet (**Abbildung 7, Abbildung 8**), die *in-vitro* spontan zu polarisierten Enterozyten differenziert [292-296]. Differenzierte CaCo-2-Zellen weisen antimikrobielle Aktivität auf und beeinflussen so die Interaktion mit Pathogenen [285]. Die CaCo-2-Mutterzellen regulieren vergleichbar zu normalen Kolonepithelzellen bei Differenzierung Gene herauf, die für antimikrobielle Komponenten kodieren [297]. Jedoch ist die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen mit der CaCo-2-Mutterzelllinie in verschiedenen Laboren aufgrund der heterogenen Zellzusammensetzung und möglicher Entstehung verschiedener Subklone eingeschränkt [298]. Als bovines Äquivalent zu den CaCo-2-Zellen wurden für die Infektionsversuche die ebenfalls heterogenen Zellpopulationen der primären **Kolonkryptenzellen (PC)** (**Abbildung 2**) verwendet [263]. Die Kolonkryptenzellen

reflektieren gut die Situation *in-vivo* [4, 263, 299] und stellen ein etabliertes Model zur Untersuchung von infektionsimmunologischen Fragestellungen im Rind dar [4]. Ohne Passagierung weisen die Kolonkryptenzellen bis zu einer Woche *in-vitro* einen hohen Differenzierungsgrad auf. Damit geht die Erhaltung organspezifischer Funktionen einher, wie Mukussekretion und die bürstensaumassoziierte Enzymaktivität [4, 263, 299, 300]. Kolonkryptenzellen wurden in dieser Studie ohne Passage verwendet. Durch eine *in-vitro*-Passage würde ein homogenerer Zellrasen entstehen, jedoch nimmt der Differenzierungsgrad ab, was u.a. durch steigende Expression von Vimentin gekennzeichnet ist [64, 299, 300].

Alle Wirtszellen exprimierten den spezifischen Epithelzellmarker Zytokeratin [276]. Teilweise lag jedoch eine moderate Doppelfärbung für Zytokeratin und Vimentin vor, wie mittels Immunfluoreszenz (FKD-R 971; **Abbildung 9**) oder Westerblot (FKD-R 971, INT 407, PC; **Abbildung 10**) gezeigt. Nur die Expression von Zytokeratin diskriminiert Epithelzellen. Vimentin ist das vorherrschende intermediäre Proteinfilament von Zellen mesenchymaler Herkunft, kann aber auch in normalem Gewebe mit Zytokeratin koexprimiert werden [299, 301]. Insbesondere für die bovinen Enterozyten stellt Vimentin einen Differenzierungsmarker dar [299, 302]. Im Rinderdarm wird Vimentin konstitutiv exprimiert und erst posttranskriptional inhibiert [299]. Vimentin und Zytokeratin werden auf mRNA-Ebene bereits in frisch isoliertem bovinen Darmgewebe koexprimiert, aber erst mit steigender Passagezahl und Kultivierungsdauer als Anzeichen initialer Dedifferenzierung translatiert [4, 287, 299]. Durch den Kontaktverlust zur Basallamina und zu benachbarten Zellen konvertieren Epithelzellen *in-vitro* häufig zu spindelförmigeren Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften [303]. Diese „epithelial-mesenchymale Transformation“ führt zur Hemmung der posttranskriptionalen Inhibition von Vimentin und zum Verlust von Zelldifferenzierung und funktionellen Eigenschaften [286, 299, 304]. Insbesondere die FKD-R 971-Zellen wiesen eine hohe Passagezahl (**Tabelle 2**) und wenig Differenzierung auf (**Abbildung 4**). So waren die Kolonkryptenzellen zunächst fluoreszenzmikroskopisch negativ für Vimentin (Tag 5). Zu einem späteren Kultivierungszeitpunkt konnte Vimentin im Western Blot detektiert werden. Jedoch könnte dies auch methodisch einer höheren Protein-Konzentration im Western Blot geschuldet sein. Eine Kontamination der Kolonkryptenzellen mit Fibroblasten aus der *Lamina propria* ist unwahrscheinlich aufgrund der pflastersteinartigen Zellmorphologie, und da bei der Isolation Einzelzellen ausgeschlossen und vorhandene Fibroblasten durch FKS-armes (1 %) Medium im Wachstum gehemmt wurden [263, 299].

Das Protein ZO-2, ein membranassoziiertes Bestandteil der *tight junctions* von Epithelzellen [305], war bei allen Wirtszellen nachweisbar. Weiterhin wurde der TEER-Wert als *in-vitro* Indikator für die Ausbildung intakter *tight junctions* [296] und Polarisation des Zellrasens

[306, 307] verwendet. In Übereinstimmung mit der Literatur [307] polarisierten die CaCo-2-Zellen am deutlichsten. Dies war gekennzeichnet durch den Anstieg des TEER-Werts (**Abbildung 11**), deutlich ausgebildeten *tight junctions* sowie Abgrenzung einer apikalen und basolateralen Membran (**Abbildung 8**). Die Dünndarmzellen beider Spezies zeigten dagegen keinen Anstieg des TEER-Wertes. INT 407-Zellen bildeten trotz partieller Polarisation mit *tight junctions* und Desmosomen (**Abbildung 6**) nur einen subkonfluenten Zellrasen aus (**Abbildung 5**). Die FKD-R 971-Zellen bildeten lichtmikroskopisch einen konfluenten Zellrasen, aber elektronenmikroskopisch überlappten die Zellen nur großflächig ohne Ausbildung enger Zell-Zell-Verbindungen (**Abbildung 4**). Für primäre Kolonkryptenzellen ist ein leichter Anstieg des TEER-Werts beschrieben, jedoch geringer als für CaCo-2-Zellen, da die Kolonkryptenzellen in einem subkonfluenten Zustand verbleiben und nur partiell *tight junctions* ausbilden [300].

Intestinale Epithelzellen haben als erste Verteidigungslinie des Wirts einen bedeutenden Anteil an den unterschiedlichen Folgen einer EHEC-Infektion im Mensch und im Rind [308]. So weisen humane intestinale Epithelzellen im Dün- und Dickdarm keine Gb₃-Rezeptoren auf. Im Gegensatz dazu besitzen aber die verwendeten permanenten CaCo-2-Zellen Gb₃-Rezeptoren auf der Oberfläche [74, 309]. Der Stx-Transport erfolgt in CaCo-2-Zellen via retrogradem Transport [74]. CaCo-2-Zellen können somit durch Stx1 und Stx2 geschädigt werden, resultierend in einer Hemmung der Proteinbiosynthese und einer Induktion von Apoptose [74]. Jedoch schädigt Stx2 *in-vitro* auch humane Organkulturen und Zellen ohne Gb₃-Rezeptor (z.B. T84-Zellen) über einen bisher ungekannten Mechanismus [74]. Dabei interagieren vermutlich weitere Rezeptoren, insbesondere in den humanen Kryptenregionen, mit Stx [74]. In der vorliegenden Studie war bei humanen INT 407-Zellen keine Expression von Gb₃-Rezeptoren nachweisbar (**Abbildung 3**). Mature, bovine Kolonkryptenzellen exprimieren ebenfalls keine Gb₃-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und Stx1 hat keinen zytotoxischen oder modulatorischen Effekt auf bovines Darmepithel [64]. Immature, proliferierende bovine Kryptenzellen exprimieren vereinzelt Gb₃-Rezeptoren [64, 308, 310]. Die FKD-R 971-Zellen zeigten ebenfalls kein deutliches Signal für die Expression von Gb₃-Rezeptoren (**Abbildung 3**). In Übereinstimmung damit sind Vimentin-positive bovine Kryptenzellen resistent gegenüber den zytolethalen Effekten durch Stx, aber Stx induziert die Expression von *IL-8*, *GRO-α*, *MCP-1* und *RANTES* auf mRNA-Ebene [64]. Bei der Interaktion mit Stx-positiven *E. coli*-Stämmen zeigten die FKD-R 971-Zellen ebenfalls keine erhöhte Zytotoxizität und in Relation zur Mediumkontrolle waren die oben genannten proinflammatorischen Mediatoren und zusätzlich noch *IL-6* und *IL-1β* erhöht (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 14: Übersicht der relevanten Eigenschaften der intestinalen Epithelzellen
(eigene Untersuchungen und Angaben aus der Literatur)

Wirtszelle Name	morphologische Untersuchungen										funktionelle Unter- suchungen		
	Wirts- spezies	Ursprungs- gewebe	Differen- zierung	Lichtmikroskopie	ELMI	Immunfluo- reszenz	Westernblot	Zyto- keratin	Zyto- keratin	Zyto- keratin	ZO-2	TEER	Gb ₃ / CD77
				Pflaster- stein- artig	TJ	Mikro- villi	Zyto- keratin	Zyto- keratin	Zyto- keratin				
FKD- R 971	Rind	Jejunum/ Ileum	fetal	-	(+) ¹	(+) ¹	+	+	+	+	+	-	-
PC	Rind	Kolon	juvenil	+	+ ⁴	+ ⁴	+	-	+	+	+	(+) ⁴	+ ⁵
INT 407	Mensch	Jejunum/ Ileum	embryonal	+	(+) ¹	(+) ²	+	-	+	+	+	-	-
CaCo-2	Mensch	Kolon	adult	+	+	+ ³	+	-	+	+	+	+	+ ⁵

Erläuterung **ELMI** = Elektronenmikroskop; **FACS** = Durchflusszytometer; **Fettdruck** = Literaturdaten, **ftk.** = funktionell; **IFT** = Immunfluoreszenz-Test; **LM** = Lichtmikroskopie; **TJ** = *tight junctions*; **Vim.** = Vimentin; **WB** = Western Blot; **ZO-2** = *Zonula occludens* Protein-2.

1) unregelmäßig und wenig entwickelt; **2)** apikaler gut-entwickelter Mikrovillisaum; **3)** Vereinzelt, schwach ausgebildete Zell-Zell-Verbindungen; **4)** partielle Ausbildung von Mikrovillisaum, *tight junctions* und TEER-Anstieg [300]; **5)** CaCo-2 [311] und primäre Kolonkrypten [64].

5.2 Interaktion der *E. coli* mit den Wirtszellen

Adhäsionsvermögen. An der intestinalen Kolonisation sind Erreger- und Wirtszellfaktoren beteiligt [270]. Die bakterielle Adhäsion an Enterozyten gilt dabei als erster Schritt der Kolonisation und Invasion von Enteropathogenen [312]. Insgesamt adhärten in der vorliegenden Untersuchung virulente *E. coli*-Stämme stärker an die Wirtszellen als avirulente *E. coli*-Stämme (**Abbildung 15 bis Abbildung 17**). Der klassische EHEC-Stamm EDL933 adhärte unter Ausbildung von A/E-Läsionen eng an die humanen Epithelzellen (**Tabelle 9, Abbildung 20, Abbildung 21**), wie schon mehrfach beschrieben [55]. Auffällig war, dass der EPEC-Stamm signifikant weniger an bovine Kolonkryptenzellen adhärte, sogar im Vergleich zu avirulenten *E. coli*-Stämmen (**Abbildung 15 bis Abbildung 17**). Im Gegensatz dazu kolonisierte der Stamm hochgradig die CaCo-2-Zellen und beide Dünndarmzelllinien. Die Interaktion lebender Bakterien und intestinaler Zellen ist sehr komplex und stark beeinflusst durch experimentelle Konditionen *in-vitro* [291]. Die Kolonkryptenzellen wurden im Gegensatz zu den anderen Zellen mit 8 % CO₂ inkubiert, jedoch zeigten die *E. coli*-Zellen elektronenmikroskopisch abhängig vom CO₂-Gehalt keine morphologischen Unterschiede (**Abbildung 13**). EPEC sind aber Pathogene des Dünndarms [9], was möglicherweise die geringe Adhäsion an das primäre Dickdarmzellsystem erklärt, während CaCo-2-Zellen nach Differenzierung viele Eigenschaften von Enterozyten des Dünndarms aufweisen können [298]. Die hochgradige Adhäsion des EPEC-Stamms E2348/69 an CaCo-2-Zellen wurde bereits beschrieben [270].

Trotz vergleichbarer Inokulationsdosis adhärten die *E. coli*-Stämme stärker an undifferenzierte Dünndarmzellen beider Spezies als an Dickdarmzellen (**Abbildung 15 bis Abbildung 17**). Dabei war die bakterielle Adhäsion auf den Dünndarmzellen homogen verteilt, während auf den Dickdarmzellen einzelne Zellen stärker bzw. weniger stark von den Bakterien kolonisiert wurden (**Abbildung 14, Abbildung 15**). Dieses Phänomen war bei den verwendeten bovinen Zellen noch nicht beschrieben. Hingegen ist eine stärkere und homogenere Adhäsion von *Lactobacillus* sp.-Stämmen an INT 407-Zellen im Vergleich zu CaCo-2-Zellen beschrieben und beruht auf den zellspezifischen Oberflächenstrukturen und Adhäsionsmechanismen [291]. INT 407-Zellen exprimieren eine komplexe fimbriale extrazelluläre Matrix, die kohlenhydratabhängig die Bakterien umschließt, während bei CaCo-2-Zellen die Adhäsion proteinabhängig vermittelt wird [291]. Weiterhin weisen differenzierte CaCo-2-Zellen stärkere antibakterielle Aktivität auf [285] und regulieren bei der Differenzierung Gene herauf, die für Verteidigungsmechanismen am Kolonepithel verantwortlich sind [297]. Dies könnte die, mit Ausnahme des EPEC-Stamms E2348/69, geringe Adhäsionsintensität der *E. coli*-Stämme an differenzierte CaCo-2-Zellen erklären. Das Keimwachstum bei Kultivierung der *E. coli* mit und ohne Wirtszellen unterschied sich nur

geringfügig, so dass mit Ausnahme der CaCo-2-Zellen die Epithelzellen das bakterielle Wachstum kaum gehemmt zu haben scheinen.

Die geringe Adhäsion an CaCo-2-Zellen bestätigte sich mikroskopisch im Adhäsionsversuch (**Abbildung 15**), in der Bestimmung des absoluten Keimgehalts (**Abbildung 16**, **Abbildung 17**) und in der elektronenmikroskopischen Auswertung (**Abbildung 21**). Bei Letztgenannter fanden sich, trotz erhöhter Infektionsdosis und verlängerter Inkubationszeit (3,5 h) im Vergleich zu den Dünndarmzellen (3 h), nur wenig *E. coli*. Auch die Gesamt-KbE, die Anzahl Zellassoziierter *E. coli* und die Adhäsion auf Einzelzellebene (Giemsa-Färbung, **Tabelle 10**) war reduziert bei Interaktion mit CaCo-2-Zellen. Weiterhin wirkten sich die Zellen hemmend auf die Stx-Produktion des Hybridstammes aus (**Tabelle 12**, **Abbildung 35**, **Abbildung 36**). Möglicherweise wurden die *E. coli* durch die antibakterielle Aktivität der differenzierten CaCo-2-Zellen abgetötet [285]. Ein elektronenmikroskopischer Hinweis dafür war das Vorkommen vereinzelter Phagolysosmen (**Abbildung 21**), sowie die verstärkte Autoaggregation und nur vereinzelt Adhäsion des Hybridstammes an die differenzierten CaCo-2-Zellen. Aufgrund der verminderten Adhäsion an CaCo-2-Zellen wurden nach 3 h viele nicht adhärenente *E. coli* entfernt. Danach adhärten nur lebende *E. coli* an die Wirtszellen, da der Keimgehalt (KbE, Gentamicin-Protektions-Assay; **Abbildung 17**) zum Zeitpunkt 6 h mit dem mikroskopischen Bild (Adhäsionsversuch; **Abbildung 15**) übereinstimmte. Jedoch war der Auswertungsbereich im mikroskopischen Verfahren kleiner, da erst ein minimaler Keimgehalt von 1×10^6 KbE/ml mikroskopisch detektiert wurde und ab einem Keimgehalt von 1×10^7 KbE/ml mikroskopisch alle Zellen betroffen waren.

Die Adhäsionsrate variierte insbesondere auf primären Kolonkryptenzellen (PC) (**Abbildung 16**, **Abbildung 17**). Die human assoziierten *E. coli*-Stämme und der Hybridstamm adhärten stärker an PCs als die bovin assoziierten STEC-Isolate. Die hochgradige Adhäsion (gemessen an der KbE) des Hybridstammes ähnelte den human assoziierten Stämmen EAEC 17-2 und EHEC EDL933, die jeweils signifikant stärker als alle weiteren untersuchten Stämme adhärten. Die zum EAEC-Stamm 17-2 vergleichbar starke Adhäsionsintensität, auch im Vergleich zum schwächer adhärrierenden EAEC-Stamm 55989, könnte dem AAF/I-Fimbrientyp geschuldet sein. Lichtmikroskopisch überwucherten jedoch der Hybridstamm und der EAEC-Stamm 55989 alle Wirtszellen, im Gegensatz zum EAEC-Stamm 17-2, der die Epithelzellen eher großflächig ablöste (**Abbildung 30**). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die ausgeprägte Interaktion des Hybridstammes über Flagellen und Fimbrien mit humanen Epithelzellen, insbesondere den INT 407-Zellen (**Abbildung 19**). Im Gegensatz dazu interagierte der Hybridstamm in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur sporadisch mit den bovinen FKD-R 971-Zellen (**Abbildung 18**), trotz großer Erregermengen im Präparat und vergleichbaren Keimzahlen

(**Abbildung 16**). Die humane Adaption des Hybridstammes zeigte sich in der hochgradigen Kolonisation der Wirtszellen, vergleichbar zu den anderen human assoziierten Stämmen. Dabei zeigte der Hybridstamm das auto-aggregative Adhäsionsmuster (**Abbildung 14**) der human assoziierten EAEC-Stämme, wie bereits für HCT-8-Zellen beschrieben [54].

Die starke Adhäsion der human assoziierten *E. coli*-Stämme und des Hybridstammes an die bovinen Zellen steht nicht im Widerspruch zur Wirtsadaption und bevorzugten Interaktion mit humanen Zellen. Die starke Adhäsion an bovine Zellen scheint auf unspezifischen Bindungen zu basieren: (1) Alle *E. coli*-Stämme, mit Ausnahme des EPEC-Stamms, kolonisierten bevorzugt die bovinen Zellen, trotz vergleichbarer Inokulationsdosis (**Abbildung 16, Abbildung 17**). Die Infektionsdosis der *E. coli*-Stämme wurde dabei je Kavität standardisiert und nicht auf die Zellzahl bezogen, da die Zellen unterschiedlich groß waren (**Tabelle 8**). (2) Auch auf Einzelzellebene (Giemsa-Färbung; **Tabelle 10**) zeigte sich lichtmikroskopisch die starke Assoziation der *E. coli*-Stämme an die bovinen Zellen, einschließlich des K12-Stammes C600 (**Abbildung 15**). Die Assoziation des K12-Stammes konnte auch mit intensivierten Waschschriffen (z.B. Zusatz von BSA-haltigem Waschpuffer [Daten nicht gezeigt]) nicht verringert werden. (3) In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen befanden sich große Erregermengen (EDL933, LB226692) oberhalb der FKD-R 971-Zellen, jedoch ohne bzw. nur mit vereinzelt direktem Zellkontakt (**Abbildung 18**). (4) FKD-R 971-Zellen besitzen viele Fibronektin-Rezeptoren, was unspezifische Bindungen begünstigen kann (persönliche Mitteilung Steffi Wilsky, Institut für molekulare Pathogenese, Jena).

Invasionsvermögen. Neben der Adhäsion wird eine geringgradige Invasivität der *E. coli* als eine effiziente Strategie zur Verhinderung der Elimination aus dem Darm des Wirtes vermutet [284, 313]. Die Invasion scheint allerdings nicht von zentraler Bedeutung für die frühe Pathogenese des Hybridstammes und anderer *E. coli*-Stämme zu sein, da sie nach Kokultur über wenige Stunden v.a. an der Zelloberfläche adhärirten (**Abbildung 15 bis Abbildung 17**) und nur vereinzelt Gentamicin-geschützt vorlagen (**Tabelle 11**). Neben bakterieller Biofilmbildung [314] könnten in dieser Situation die Erreger durch die Phagozytoseaktivität [315] der Epithelzellen vor der Einwirkung durch Gentamicin geschützt worden sein. Für eine nicht selektive Phagozytose von *E. coli* durch die verwendeten Epithelzellen spricht, dass (1) die absoluten, intrazellulären KbE-Werte der verschiedenen *E. coli*-Stämme vergleichbar waren. (2) Es ist beschrieben, dass INT 407-Zellen u.a. den EAEC-Stamm T8 mit initialer Entwicklung von becherartigen („cup like“) Einstülpungen und Adhäsionspodesten („adherence pedestals“) phagozytieren [313]. (3) Schließlich fehlten bei der Interaktion des Hybridstammes mit den Wirtszellen elektronenmikroskopische

Membranverdickungen, die auf angelagerte Clathrin-Moleküle als Hinweis auf rezeptorabhängige Phago- und Endozytose hingedeutet hätten (**Abbildung 19-C**).

Der Hybridstamm lag in geringem Umfang intrazellulär vor, z.B. in Vakuolen der INT 407-Zellen mit sehr regelmäßigem Abstand zur Vakuolenmembran (**Abbildung 19, Tabelle 11**). Dieser regelmäßige Abstand könnte durch die flexiblen AAF/I-Fimbrien vermittelt sein. Generell vermitteln AAF/I-Fimbrien die Adhäsion klassischer EAEC-Stämme [159]. EAEC-Stämme gelten als nicht invasive Pathogene [6], da bisher keine Invasion in humane intestinale Explanate gezeigt werden konnte [160], jedoch wird eine geringgradige Invasivität als Ursache der persistenten Diarrhö vermutet [316]. In Übereinstimmung damit ist *in-vitro* die intrazelluläre Lokalisation von EAEC-Stämmen in CaCo-2- und T84-Zellen und sogar Persistenz in membrangebundenen Vakuolen mit variabler Größe und Lokalisation beschrieben [316-318].

Im Unterschied zum Hybridstamm invadierten einige STEC-Stämme aktiv die Wirtszellen (**Tabelle 11**) und auch der *eae*-positive EHEC-Stamm EDL933 bildete intrazellulär engen Wirtszellkontakt aus (**Abbildung 20-C**). Der *eae*-negative STEC-Stamm 2403 invadierte die bovinen Dünndarmzellen schneller und stärker als die *eae*-positiven STEC-Isolate (12E0111, 12E0114; **Tabelle 11**). Die Invasion intestinaler Epithelzellen wird als Teil der Pathogenese *eae*-negativer EHEC-Stämme vermutet und ist partiell ein Flagellin abhängiger Mechanismus [60]. Zusätzlich invadierte nach 6 h Koinkubation der *eae*-positive STEC-Stamm 12E0114 die Dickdarmzellen, entsprechend dem Kolon, in dem die STEC-Pathogenese am prominentesten ist [33]. Weiterhin ist das intrazelluläre Vorkommen von *eae*-negativen und -positiven STEC-Stämme in membrangebundenen Vakuolen in humanen Darmepithelzellen (u.a. CaCo-2, HTC-8) beschrieben [55, 61, 284]. STEC sind fähig zur intrazellulären Persistenz und Multiplikation in CaCo-2- und T84-Zellen [284]. Die beiden invasiven STEC-Stämme 2403 und 12E0114 sezernierten auch viel Stx (**Abbildung 35, Abbildung 36**), was durch Zellschädigung eine Invasion erleichtern könnte. Allerdings schädigten diese Stämme insbesondere die Dünndarm- und bovinen Kolonkryptenzellen und nicht die CaCo-2-Zellen (**Abbildung 30**). Die starke Zellschädigung könnte das Eindringen von Gentamicin begünstigt haben und zur Abtötung intrazellulär lokalisierter Keime geführt haben. Jedoch zeigte der EPEC-Stamm E2348/69 einen invasiven Phänotyp in allen Zellen (**Tabelle 11**), trotz starker Zytotoxizität (**Abbildung 30**), wie sie auch im LDH-Zytotoxizitäts-Assay gezeigt wurde [55, 319]. Die absoluten, intrazellulären KbE-Werte stimmten ebenfalls mit bereits publizierten Daten überein, sowohl für die intrazelluläre Lokalisation des EHEC-Stammes EDL933 nach 3 h in CaCo-2-Zellen [55] als auch für die EAEC-Stämme in INT 407- [313] und in CaCo-2-Zellen [316]. Die Menge intrazellulärer lokalisierter *E. coli*

variiert bekanntermaßen zwischen Zelllinien (CHO-K1, CaCo-2, HCT-8 [55]; CaCo-2, T84 [316]; INT 407 [313]; T84, CaCo-2, Kolonmukosa [318]; HeLa, HT29, T84 [317]).

In dieser Studie war der EIEC-Stamm 76-5 nicht invasiv (**Tabelle 11**), obwohl EIEC u.a. einen Invasionsindex von 5-9 % in HCT-8-Zellen aufweisen [55]. Jedoch verlieren EIEC häufig bei *in-vitro* Passagen oder Lagerung das Invasions assoziierte Plasmid (*pInv*) [8]. Dies galt für den verwendeten Stamm, da trotz initialem Nachweis des *invE*-Gens (**Abbildung 12**) das Gen häufig am Ende eines Versuches mittels Pathovar-PCR nicht mehr nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

Expression von Virulenzfaktoren bei Wirtszellkontakt. Die Arbeitshypothese besagte, dass aufgrund der Hybridvirulenz eine schwächer ausgeprägte Wirtsadaption vorliegt als im Vergleich zu spezialisierten bovin oder human assoziierten Stämmen, und der Hybridstamm daher beim Wirtszellkontakt die Virulenzfaktoren übermäßig exprimiert. Tatsächlich regulierte der Hybridstamm die Virulenzgenexpression bei Wirtszellkontakt hoch, jedoch vergleichbar zu den anderen *E. coli*-Stämmen (**Abbildung 34**). Dabei war die Virulenzgenexpression der *E. coli*-Stämme insbesondere bei der Interaktion mit Dünndarmzellen erhöht, unabhängig der Wirtsspezies. Folglich beeinflussten andere zelllinienspezifische Faktoren die Expression der *E. coli*-Virulenzgene. Dies könnte dem unterschiedlichen Grad der Zelldifferenzierung geschuldet sein (**Abbildung 4, Abbildung 6, Abbildung 8**), einhergehend mit unterschiedlicher antimikrobieller Aktivität und Oberflächenstruktur, wie für INT 407- und CaCo-2-Zellen beschrieben [285, 291]. Weiterhin könnte sich die ursprüngliche Herkunft der Zellen aus Dick- oder Dünndarm auf die bakterielle Interaktion auswirken, da diese unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Erkrankungsprozessen und Umweltfaktoren aufweisen [287]. Dagegen spricht jedoch, dass die *E. coli*-Stämme bei der Interaktion mit CaCo-2-Zellen nur gering die Virulenzfaktoren hoch regulierten, obwohl differenzierte CaCo-2-Zellen morphologisch Enterozyten des Dünndarms ähneln (u.a. Mikrovilli) und dünndarmspezifische Genprodukte exprimieren [294, 295, 320, 321].

Als Hinweis für die humane Adaption des Hybridstammes regulierte dieser bei Wirtszellkontakt die EAEC-Virulenzgene (*aggR*, *pic*) vergleichbar zum EAEC-Stamm 55989 (**Abbildung 34**). Die Gene *aggR* und *pic* sind von zentraler Bedeutung für die Biofilmbildung von EAEC-Stämmen [197] und wurden jeweils verstärkt bei Dünndarmzellkontakt exprimiert. Die *pic*-Expression des Hybridstammes ist *in-vivo* (Maus) vergleichbar zur *in-vitro* Expression beim Wachstum ohne Wirtszellkontakt [197]. Pic weist mukolytische Aktivität auf und könnte dem Hybridstamm insbesondere im Dünndarm einen Wachstumsvorteil verschaffen [169]. Hingegen steigerten beide Stämme nur mäßig die Transkription von *aggR* bei Wirtszellkontakt, obwohl dieser globale EAEC-Transkriptionsregulator unter anderem die

Expression der AAF-Fimbrien und Dispersin kontrolliert, die mit für die Adhäsion verantwortlich sind [153, 165]. Jedoch ist beschrieben, dass der Hybridstamm *in-vitro aggR* um das 13-fache geringer exprimiert als *in-vivo* (Maus) [197]. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte der Hybridstamm einen gleichmäßigen Abstand zur Wirtszelle, der möglicherweise über die AAF-Fimbrien vermittelt wurde (**Abbildung 19-D**). Dies lässt vermuten, dass die Adhäsion des Hybridstammes dennoch hauptsächlich über AAF vermittelt wird. Auch die Expression des virulenzassoziierten EHEC-Adhäsionsfaktors (*iha*) war gering. *Iha* scheint bei der frühen Adhäsion des Hybridstammes an Wirtszellen nicht von zentraler Bedeutung zu sein, obwohl *Iha* häufig bei *eae*-negativen EHEC vorkommt [58].

Unter den ausgewählten Virulenzfaktoren wurde *stx*, der bedeutendste STEC-Virulenzfaktor, am stärksten transkribiert (**Abbildung 34**). Der Hybridstamm sezernierte verstärkt Stx2 bei Zellkontakt in Epithelzell-Kokulturen (**Tabelle 12**). Bekanntermaßen verstärkt Wirtszellkontakt mit intestinalen Epithelzellen oder Makrophagen die *stx2*-Expression von STEC-Stämmen [152, 322]. Die Induzierbarkeit von Stx1 und Stx2 ist unterschiedlich [14] und Stx2 schädigt humane *in-vitro* Organ-Kulturen aus Dünn- und Dickdarm stärker als Stx1 [74]. Folglich wurden die Stx-Expression und -Sekretion für die Toxin-Typen 1 und 2 getrennt betrachtet. Unter den Stx2-positiven Stämmen steigerten die human assoziierten EHEC-Stämme (EDL933, 86-24) und der Hybridstamm stärker die Transkription von *stx2* als der bovin assoziierte STEC-Stamm 12E0111 (**Abbildung 34**). Die stärkere Stx2-Bildung durch HUS-assoziierte Stämme im Vergleich zum bovin assoziierten Stamm bestätigte sich auf Proteinebene (**Abbildung 35**, **Abbildung 36**). Bei HUS-assoziierten EHEC-Stämmen übersteigt die basale Stx-Produktion häufig die von bovin assoziierten Stämmen [14]. Weiterhin verstärkt sich besonders die *stx2*-Produktion von HUS-assoziierten Stämmen bei Stimulation (Mitomycin C) [14]. In dieser Studie zeigte der Hybridstamm bei Wirtszellkontakt die stärkste Stx-Induzierbarkeit auf Proteinebene. Dies könnte eine weniger gut ausbalancierte Regulation der Virulenzgene als Folge des Hybridprofils darstellen.

Bei Kultivierung ohne Wirtszellen sezerniert der Hybridstamm dagegen relativ wenig Stx (**Tabelle 12**). Die *stx*-Transkription (**Abbildung 34**) und Stx-Sekretion (**Abbildung 35**, **Abbildung 36**) des Hybridstammes waren stärker bei der Interaktion mit Dünndarmzellen als bei der Interaktion mit Dickdarmzellen. Dabei waren die *stx*-Induktion und der Stx-Gehalt im Kulturüberstand bei der Interaktion mit CaCo-2-Zellen besonders gering. Möglicherweise wurde hier Stx durch Gb₃-Rezeptor gebunden, da bei 50-70 % Zellkonfluenz ca. 50 % der CaCo-2-Zellen Gb₃-positiv sind [311]. Der geringe Stx-Gehalt im Überstand ging jedoch mit geringer Adhäsion und reduzierter Expression des *stx*-Gens einher. Außerdem war die Stx-Menge auch auf Kolonkryptenzellen reduziert, obwohl diese im murenen Zustand keine Gb₃-

Rezeptoren exprimieren [64]. Der Differenzierungsgrad der Zellen und die dadurch gesteigerte antibakterielle Aktivität könnte die Stx-Menge beeinflusst haben [285].

Der Hybridstamm bildete weniger Stx als die human assoziierten O157:H7-Stämme, insbesondere jedoch als Stamm EDL933 (**Abbildung 35**, **Abbildung 36**). Unter allen Stämmen steigerte der EHEC-Stamm EDL933 bei Wirtszellkontakt am stärksten die Transkription von *stx1* und *stx2*, insbesondere auf bovinen Zellen. Tran *et al.* (2014) beschrieben, dass Stx2 der vorherrschende Toxintyp von EDL933 unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen sei und Stx1 nur 1-2% des Gesamtoxins *in-vitro* ausmacht [152]. In unserer Studie zeigte der Stamm EDL933 ebenfalls eine Tendenz zur stärkeren Zunahme der *stx2*-Expression bei Wirtszellkontakt, mit Ausnahme bei der Interaktion mit Kolonkryptenzellen (**Abbildung 34**). Auch im Darm experimentell infizierter Mäuse exprimieren O157:H7-Stämme im Mittel mehr *stx2* als der Hybridstamm nach 5 und 7 d *p.i.* [197]. Dabei nimmt die durchschnittliche *stx2*-Expression des Hybridstammes mit fortschreitender Infektionsdauer *in-vivo* zu, aber variiert erheblich zwischen den einzelnen Versuchstieren und Untersuchungszeitpunkten [197]. Die Virulenz des Hybridstammes korreliert *in-vivo* nicht mit der Kolonisationsintensität [197], sondern mit der Präsenz von *stx2* im Maus- und Kaninchenmodell [198] und der hochgradigen Expression der biofilm-assoziierten EAEC-Virulenzgene (*aggR*, *pgaA*) [197]. Letzteres ist ein typisches Charakteristikum bakterieller Zellen in Biofilmen [197] und ein Indiz dafür, dass die Virulenz des Hybridstammes hauptsächlich durch seine EAEC-Eigenschaften determiniert wird.

5.3 Reaktion der intestinalen Wirtszellen

Chemo- und Zytokinprofile der Epithelzellen. Bei der Interaktion mit den *E. coli*-Stämmen zeichneten sich wirtszellspezifische Unterschiede bei der Hochregulation bestimmter Zytokingene ab. So regulierten die humanen Zelllinien insbesondere *IL-8* (**Abbildung 27**, **Abbildung 29**) und die bovinen Zelllinien *IL-6* (**Abbildung 23**, **Abbildung 25**) herauf. Die Zytokinprofile der Dünn- und Dickdarmzellen einer Wirtsspezies waren dagegen jeweils ähnlich. Vergleichbare Zytokinprofile beider intestinaler Kompartimente auf mRNA- und Proteinebene wurden bereits für den Menschen beschrieben [323]. Weiterhin ist das Chemokinprofil der CaCo-2-Zellen bei bakterieller Infektion vergleichbar mit dem frisch isolierter Kolonepithelzellen [228]. Jedoch bilden im Gegensatz zu CaCo-2-Zellen 5 % des frisch isolierten humanen Kolonepithels zusätzlich *IL-6* [324]. Generell war die basale Transkription der untersuchten Gene im bovinen Wirtszellsystem bei *E. coli*-Infektion geringer als im humanen Zellmodell. Dies ist ein *in-vitro* Indiz dafür, dass *E. coli*-Infektionen nur wenig mukosale Entzündung im Rinderdarm verursachen und dazu beitragen, dass adulte Rinder häufig asymptomatische STEC-Träger sind [3, 14].

Die Regulation der Wirtszellgene wurde aus drei Gründen in Relation zur Stimulation mit dem avirulenten K12-Stamm C600 angegeben. Zum einen induzierte bereits die Interaktion der avirulenten *E. coli* mit den Wirtsepithelzellen eine Regulation der Zytokin- und Chemokingene (**Abbildung 22** bis **Abbildung 29**). Bekanntermaßen reguliert *in-vitro* bereits die direkte Interaktion von kommensalen *E. coli* mit humanen [223] und bovinen IEC [4] die Wirtszellgene, da die inhibitorischen Signale der normalen Mikroflora [325, 326], die Regulation der IEC durch Immunzellen [327] und die Kontaktvermeidung durch aufgelagerte Mukusschichten fehlen [4]. Zweitens ermöglichte die Standardisierung der Genexpression auf den Referenzstamm C600 eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Zellmodellen, da die Induzierbarkeit der Wirtszellgene in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich reguliert wird [328]. Aufgrund geringer Basalaktivität (Mediumkontrolle) war insbesondere die Genexpression der FKD-R 971-Zellen stark induzierbar (Daten nicht gezeigt). Drittens ermöglichte ein avirulenter Stamm als Referenzwert das Hervorheben der pathovarspezifischen Effekte. Hierzu wurden weitere Kontrollen, wie LPS von *E. coli* O26 und ein hitzinaktiviertes Lysat des Hybridstammes („TotLB226692“), mitgeführt. Die Wirtszellantwort gegenüber K12-Stamm C600 ist vergleichbar mit der LPS-Stimulation [4] und der Stimulation durch TotLB226692 (diese Studie). Die vom Ansatz mit TotLB226692 abweichende Regulation der Wirtszellgene bei Infektion mit dem lebenden Hybridstamm stellte folglich den Effekt von während der Infektion aktiv exprimierter Virulenzfaktoren dar.

Proinflammatorisches Potential des Hybridstammes im Rind. Das proinflammatorische Potential des Hybridstammes im bovinen Wirtszellsystem entfaltete sich mit zunehmender Inkubationszeit und mit viel Gemeinsamkeit zu den human assoziierten EAEC-Stämmen. Dies ließ eine geringe Adaption an das Rind als an den Menschen vermuten.

Zunächst (**3 h**) verursachte der Hybridstamm nur eine geringe proinflammatorische Wirtszellreaktion in bovinen IEC (**Abbildung 22**, **Abbildung 24**). Sowohl in den Kolonkryptenzellen als auch in den FKD-R 971-Zellen hemmte der Hybridstamm die anti-inflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*). Zudem induzierte der Hybridstamm in beiden bovinen Zellsystemen die proinflammatorischen Zytokine vergleichbar zu C600 (*IL-6*, *TNF- α*) und zusätzlich *IL-1 β* in den FKD-R 971-Zellen. Außerdem induzierte der Hybridstamm die pro-inflammatorischen Chemokine so stark wie C600, dabei *IL-8* in Kolonkryptenzellen sogar stärker als C600. In beiden bovinen Zellsystemen war das Reaktionsprofil des Hybridstammes vergleichbar mit dem des human assoziierten EAEC-Stammes 55989 und jeweils nur in einem der Systeme vergleichbar zum bovin assoziierten, *eae*-negativen STEC-Stamm 2403 bzw. zum STEC-Stamm 12E0114.

Mit zunehmender Inkubationszeit (**6 h**) verstärkte der Hybridstamm im bovinen Zellsystem seine proinflammatorische Aktivität (**Abbildung 23**, **Abbildung 25**) ähnlich wie die human

assoziierten EAEC-Stämme, insbesondere Stamm 55989. In beiden Zellsystemen wurde besonders das proinflammatorische Zytokin *IL-6* signifikant stärker induziert als durch C600. *IL-6* ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei bakterieller Invasion in Epithelzellen von diesen sezerniert wird [324, 329] und in die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten involviert ist [330]. Zudem induzierte der Hybridstamm in beiden Zellsystemen weitere proinflammatorische Zytokine entweder so stark wie oder geringer als C600 (*IL-1 β* , *TNF- α*) und hemmte *IFN- γ* sowie die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*). Die hitzeinaktivierte Kontrolle (TotLB226692) induzierte stark das regulatorische *IL-10* im Gegensatz zum lebenden Hybridstamm. *IL-10* ist ein regulatorischer Mediator und wirkt anti-entzündlich durch Hemmung der Freisetzung von Zytokinen der T_H1-Immunantwort [331]. Der Hybridstamm induzierte die Chemokine (*GRO- α* , *IL-8*, *MCP-1*) in beiden Zellsystemen, darunter in FKD-R 971-Zellen *GRO- α* und in Kolonkryptenzellen *MCP-1* jeweils stärker als C600. *RANTES* wurde in Kolonkrypten gehemmt und in FKD-R 971-Zellen induziert, jeweils vergleichbar zu C600. Das proinflammatorische *MCP-1* (*CCL-2*) wird ebenfalls bei bakterieller Invasion in Epithelzellen sezerniert und rekrutiert Immunzellen, u.a. Monozyten und T-Gedächtniszellen [324].

Bridger *et al.* (2010) beschrieben, dass Stämme verschiedener *E. coli*-Pathotypen (EHEC, EPEC, ETEC), avirulente Stämme (K12-Stamm C600, Kommensale) und LPS in primären Kolonkryptenzellen nach 6 h eine Zunahme der Transkription von *GRO- α* , *IL-8*, *MCP-1*, aber auch von *RANTES* und *IL-10* induzierten [4]. Allerdings wurden die Werte nicht wie in der vorliegenden Arbeit mit den Transkriptionswerten des Stammes C600 verrechnet. In dieser Arbeit induzierten die EHEC-Stämme mehr *IL-8* als der EPEC-Stamm. EPEC sind stärkere Induktoren von A/E-Läsionen als STEC bzw. EHEC, hemmen dabei die NF- κ B Aktivierung und nachfolgend die *IL-8*-Transkription [332]. Dies entspricht den von Bridger *et al.* (2010) beschriebenen zellulären Reaktionen [4].

Immunmodulatorisches Potential des Hybridstammes im Menschen. Im humanen Wirtszellsystem induzierte der Hybridstamm insgesamt nur wenig inflammatorische Reaktivität, ähnlich den kommensalen und human assoziierten *E. coli*-Stämmen und im Unterschied zum stärkeren proinflammatorischen Potential von bovin assoziierten STEC-Stämmen.

Zunächst (3 h) regulierte der Hybridstamm nur gering die humanen Wirtszellgene beider Zellsysteme. Dabei ähnelte das Reaktionsmuster überwiegend dem Profil des human assoziierten EAEC-Stammes 55989 (**Abbildung 26**, **Abbildung 28**). Dies kann als Indiz für die Möglichkeit der Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen Erreger und Wirt *in-vivo* gewertet werden. Der Hybridstamm induzierte die proinflammatorischen Zytokine in den humanen Zellsystemen höchstens so stark wie C600 (*IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-6*, *IL-12*). Letztere (*IL-*

6, *IL-12*) waren in INT 407-Zellen gehemmt. Zudem hemmte der Hybridstamm die Transkription von *IFN- γ* sowie von den antiinflammatorischen Zytokinen (*IL-10*, *TGF- β*), darunter *TGF- β* , sogar signifikant zu C600 in CaCo-2-Zellen. Das lokal wirksame *TGF- β* entfaltet nach posttranslationaler Aktivierung eine antiinflammatorische Wirkung auf die T_H1-Zellen der zellulären Immunabwehr [4]. In beiden humanen Zellsystemen wurde das Chemokin *MCP-1* so stark wie durch C600 und *IL-8* geringer als durch C600 induziert. In den CaCo-2-Zellen wurden zudem die proinflammatorischen Zytokine *GRO- α* und *RANTES* so stark wie durch C600 induziert. In Abgrenzung zum Hybridstamm induzierten einige bovin assoziierte STEC-Stämme bei der Interaktion mit CaCo-2-Zellen stärker proinflammatorische Mediatoren (*IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-8*).

Nach 6 h Kokultivierung verstärkte der Hybridstamm die proinflammatorische Aktivität im humanen Zellsystem, aber in geringerem Ausmaß als andere human und bovin assoziierte Pathovaren (**Abbildung 27**, **Abbildung 29**). In beiden humanen Zellsystemen induzierte der Hybridstamm so stark wie C600 die proinflammatorischen Zytokine *IL-1 β* , *TNF- α* und *IL-6*, darunter *TNF- α* in INT 407-Zellen sogar signifikant stärker als C600. *TNF- α* ist ein Zytokin von zentraler Bedeutung bei der Entzündung durch seine Beteiligung an der Aktivierung von Makrophagen, der Kostimulation von T-Zellen, der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine von Immunzellen, sowie Chemokine von Epithelzellen [333]. Dies passt zu der Beobachtung, dass in humanen Patientenserum bei bakteriellen Infektionen häufig erhöhte *TNF- α* , *IL-2* und *IL-6* Werte gefunden werden [334]. Die proinflammatorischen Zytokine *IL-12* und *IFN- γ* wurden so stark wie durch C600 induziert, gleichbedeutend mit einer Induktion in CaCo-2-Zellen und einer Hemmung in INT 407-Zellen. Der Hybridstamm induzierte die antiinflammatorischen Zytokine (*IL-10*, *TGF- β*) in CaCo-2-Zellen so stark wie C600, hingegen wurden diese in INT 407-Zellen geringgradig gehemmt. Der Hybridstamm induzierte das proinflammatorische Chemokin *IL-8* signifikant stärker in INT 407-Zellen als C600 und *MCP-1* so stark wie C600 in beiden Zellsystemen. In CaCo-2-Zellen induzierte der Hybridstamm zudem so stark wie C600 die Chemokine *RANTES* und *GRO- α* . Im Unterschied zum Hybridstamm induzierten die STEC-Stämme 12E0114 und 2403 und die EAEC-Stämme, insbesondere EAEC-Stamm 17-2, eine stärkere Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-12*, *TNF- α* , *GRO- α* , *IL-8*, *MCP-1*). Wirtsadaption bedeutet eine hoch dynamische Balance zwischen Erreger und natürlichem Wirt [216]. Die Induktion eines stark proinflammatorischen Zellzustands und die von C600 stark abweichend Gen-Regulation wurde als Indiz für eine geringe Adaption der EAEC-Stämme gewertet. Die durch die EAEC-Stämme ausgelöste proinflammatorische Wirtszellantwort steht jedoch nicht im Widerspruch zur Adaption an den humanen Wirt, da Menschen mit EAEC-Infektion sowie asymptomatische Träger Anzeichen einer geringen Enteritis aufweisen, gekennzeichnet durch die fäkale Ausscheidung von Lactoferrin und

weiteren proinflammatorischen Mediatoren wie *IL-8* und *IL-1 β* [150, 151, 269]. In Abgrenzung zum Hybridstamm induzierten die STEC-Stämme eine stärkere Entzündungsreaktion, insbesondere der bovin assoziierte Stamm 12E0114 in CaCo-2-Zellen mit signifikant stärkerer Induktion der proinflammatorischen Mediatoren *IL-1 β* , *TNF- α* und *IL-8* sowie ohne Signifikanz *MCP-1*. In beiden humanen Zellsystemen induzierte lediglich der STEC-Stamm 12E0111 des Serotyps O157:H7, der nur zur sporadischen Kolonisation im Rind fähig ist, ein Zytokinprofil vergleichbar mit dem der beiden humanen O157:H7-Stämme [22]. Es wurde bereits beschrieben, dass nicht invasive *E. coli* des Serotyps O157:H7 und avirulente *E. coli*-Stämme (z.B. DH5a) keine erhöhte Zytokinsekretion in CaCo-2-Zellen induzieren [324]. Die zu begrenzter Invasion fähigen STEC-Stämme 2403 und 12E0114 induzierten proinflammatorische Wirtzellgene. In Übereinstimmung damit ist beschrieben, dass bakterielle Invasion in humane Kolonepithelzellen u.a. zur Expression von *IL-8*, *MCP-1* und *TNF- α* führt [324]. Der EPEC-Stamm E2348/69 inhibierte trotz begrenzter Invasivität inflammatorische Mediatoren, wie bereits beschrieben [332].

Barrierefunktion. Der Hybridstamm beeinträchtigte nicht die Barrierefunktion der polarisierten CaCo-2-Zellen im 6-stündigen Untersuchungszeitraum (**Abbildung 33**). Unsere Studie deutet darauf hin, dass während der frühen Phasen der Infektion durch den Hybridstamm die mukosale Integrität erhalten bleibt. Da dies ebenfalls bei der Interaktion mit polarisierten, humanen T84-Zellen gezeigt wurde, [152, 192] ist eine massive Beeinträchtigung der Barrierefunktion keine Erklärung der hochgradigen Virulenz des Stammes. Allerdings kann *in-vitro* nur die frühe Interaktion mit den IEC untersucht werden und *in-vivo* weist der Hybridstamm eine verlängerte Inkubationszeit bis zur HUS-Entstehung auf [18].

Der Hybridstamm regulierte den TEER-Wert vergleichbar zu human assoziierten Stämmen (EHEC EDL933, 86-24; EAEC 55989). Bekanntermaßen beeinträchtigen der EHEC-Stamm 86-24 und kommensale *E. coli* nicht die Barrierefunktion humaner IEC [192]. Eine mögliche Erklärung des hohen TEER-Werts ist die hohe bakterielle Last und Biofilmbildung der Stämme. Dagegen spricht jedoch, dass der EPEC-Stamm E2348/69 den TEER-Wert trotz starker Adhäsion an CaCo-2-Zellen (**Abbildung 15**) und der Fähigkeit zur Biofilmbildung [335] reduzierte. Bekanntermaßen zerstört der EPEC-Stamm E2348/69 die *tight junctions* von polarisierten T84-Zellen [336]. Auch für einige EAEC-Stämme (O42) ist eine AAF-abhängige Zerstörung der epithelialen Integrität (T84-Zellen) mit Abnahme des TEER-Werts durch De-Lokalisation von *tight junctions*-Proteinen beschrieben, allerdings erfolgte hier die TEER-Messung erst verzögert nach der Abtötung der Bakterien durch Gentamicingabe [162].

Im Gegensatz zum Hybridstamm reduzierte der bovine STEC-Stamm 12E0114 den TEER-Wert, wenn auch nur gering. STEC-Isolate beeinträchtigen in der Regel nicht die Barrierefunktion, auch nicht das Shigatoxin alleine [76, 94]. Dennoch induzieren einige STEC-Stämme die Abnahme des transepithelialen Widerstands in T84-Zellen [76]. Eine Reduktion des TEER-Werts kann neben der Zerstörung der *tight junctions* auch aus einer physiologischen Modulation des Ionenflusses resultieren [162, 337]. Die Messung und Veränderung des TEER-Werts beruhen auf transzellulären Ionenflüssen [296, 338], jedoch regulieren *tight junctions* nur den parazellulären Ionen- und Wasserfluss [339].

Zellvitalität bei Infektion. Der Hybridstamm schädigte die Wirtszellen stärker als avirulente Stämme, aber vergleichbar mit Stämmen der anderen *E. coli*-Pathovaren (**Abbildung 31**, **Abbildung 32**, **Tabelle 34**). Eine besonders ausgeprägte zytotoxische Aktivität gegenüber intestinalen Epithelzellen bietet folglich keine Erklärung für die hochgradige Virulenz des Hybridstammes. Generell nahm die Zytotoxizität über den Infektionsverlauf zu. Dabei führten die humanpathogenen *E. coli* bereits nach 3 h zu einer verstärkten LDH-Freisetzung in humanen Zellen und nach 6 h auch in bovinen Kolonkryptenzellen. Nach 6 h schädigten auch die bovinen Stämme alle Wirtszellen signifikant stärker als die avirulente Kontrolle (**Tabelle 34**).

Die Infektion mit dem Hybridstamm schädigte insbesondere die Dünndarmzellen beider Spezies und die Kolonkryptenzellen, jedoch nicht die CaCo-2-Zellen (Giemsa, **Abbildung 30**; LDH, **Abbildung 31**, **Abbildung 32**). Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren die INT 407-Zellen bei Infektion mit dem Hybridstamm häufiger zytotoxisch verändert als bei Infektion mit dem EHEC-Stamm EDL933 (**Abbildung 19**, **Abbildung 20**). Analog dazu setzte der Hybridstamm nach 6 h tendenziell mehr LDH in INT 407-Zellen frei als der EHEC-Stamm EDL933 (**Abbildung 32**), obwohl letzterer mehr Stx produzierte als der Hybridstamm (**Abbildung 35**). Die morphologisch stärkere Zellschädigung durch den Hybridstamm scheint damit wesentlich auf den EAEC-assoziierten Eigenschaften des Stammes zu beruhen. Auch bei der Infektion der Kolonkryptenzellen setzte der Hybridstamm signifikant mehr LDH frei als EHEC-Stamm 86-24 (**Abbildung 32**). Die stärkere Wirtsschädigung durch den Hybridstamm könnte eine mögliche Erklärung für die schnellere Elimination als EHEC-Stamm 86-24 im Infektionsmodell mit Kälbern sein [212]. Im Elektronenmikroskop zeigten sich allerdings keine auffälligen Zellpathomorphologien der bovinen Dünndarmzellen (FKD-R 971, **Abbildung 18**) bei Infektion mit dem Hybridstamm oder dem EHEC-Stamm EDL933, wahrscheinlich aufgrund der geringen Ausprägung des direkten Zellkontakts.

Die Dünndarmzellen beider Spezies wurden bei Infektionen mit EPEC-Stamm E2348/69 und EAEC-Stamm 17-2 weitestgehend abgelöst (**Abbildung 30**). Der EAEC-Stamm 17-2 führte auch bei Kolonkryptenzellen zu einer starken Exfoliation. Jedoch fehlten signifikante

Unterschiede der Zellvitalität nach 6 h zwischen den einzelnen Stämmen, vermutlich dem geringen Stichprobenumfang (n=3-5) geschuldet (**Tabelle 28**). Eine mögliche Erklärung für die stärkere Zellschädigung der Dünndarmzellen ist die unterschiedliche Empfänglichkeit von Dünn- und Dickdarmepithel gegenüber Erkrankungsprozessen [287]. Eine Infektion und Schädigung von Dünndarmzellen führt in der Regel zur Apoptose mit Abschilferung der Zellen ins Lumen [287]. Weiterhin waren die Dünndarmzellen weniger differenziert und wiesen folglich weniger antibakterielle Aktivität auf [285].

In CaCo-2-Zellen führte die bakterielle Infektion kaum zu zytotoxischen Effekten (**Abbildung 30 bis Abbildung 32**). Eine verstärkte LDH-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle induzierten nur bovine STEC-Stämme nach 6 h Koinkubation. Diese Zellschäden könnten trotz geringer Stx-Sekretion (**Abbildung 35, Abbildung 36**) von Stx hervorgerufen werden, da das potente Stx bekanntermaßen in CaCo-2-Zellen die Proteinbiosynthese inhibiert und Apoptose induziert [74]. Elektronenmikroskopisch stellten sich bereits die nicht infizierten CaCo-2-Zellen hochgradig vakuolisiert dar (**Abbildung 8**). So waren keine zusätzlichen infektionsbedingten morphologischen Zellschäden erkennbar. Zudem ist ein Fehlen von morphologischen und zytotoxischen Effekten bei Infektion von CaCo-2-Zellen mit EAEC-Stamm O42 beschrieben [196]. Jedoch wird die Vakuolisierung und Ablösung von CaCo-2-Zellen sowie der Verlust intakter *tight junctions* durch andere EAEC-Stämme (*pet-*, *pic-* und *astA*-positiv) induziert [316]. Auch in humanen Darm-Explantaten induzieren adhärente EAEC-Stämme *in-vitro* milde, aber signifikante mukosale Schädigung, insbesondere auf Kolon-Explantaten [160].

5.4 Modulation der angeborenen Immunität im Rind

Chemo- und Zytokinprofile der bovinen Makrophagen. Die vom Hybridstamm konditionierten Epithelzellüberstände entfalteten zum Teil mehr proinflammatorische Aktivität in bovinen Makrophagen als die Überstände aus Versuchen mit anderen *E. coli*-Stämmen (**Abbildung 37, Abbildung 38**). Dabei beeinflussten die konditionierten Überstände von Kolonkryptenzellen stärker die Zytokingenexpression der Makrophagen als die von FKDR 971-Zellen. Da die Kolonkryptenzellen das überlegene bovine Wirtszellsystem mit guter Reflektion der Situation *in-vivo* durch Erhalt von organspezifischen Funktionen und Enzym-Aktivität [4, 263, 299, 300] darstellen, deutet die hochgradige Reaktion auf eine geringe Adaption des Hybridstammes an das Rind hin.

Die vom Hybridstamm konditionierten Kolonkryptenzellüberstände stimulierten in den bovinen Makrophagen die Transkription von *iNOS* und *MCP-1* am stärksten (**Abbildung 38**). Damit könnte der Hybridstamm bei Kolonisation des bovinen Intestinums eine hochgradige

bakterizide und inflammatorische Aktivität auslösen. MCP-1 ist ein Indikator für deutliche Entzündungsreaktion im Wirt und ein potentes Chemokin für Monozyten und Granulozyten [84]. Im Wirt ist die starke Phagozytose- und bakterizide Aktivität mukosaler Makrophagen bedeutender als die Zytokinen-Produktion [340]. Als Molekül der angeborenen Immunantwort produziert iNOS („*inducible NO synthase*“) große Mengen Stickoxid (NO), das zytotoxische, bakterizide und regulatorische Funktionen besitzt [341]. Die Genexpression von *iNOS* in Makrophagen wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert [342]. In Einklang damit induzierte der Hybridstamm auch verstärkt das proinflammatorische Chemokin *IL-8* nach 3-stündiger Interaktion mit den Kolonkryptenzellen (**Abbildung 24**), das ebenfalls durch den Transkriptionsfaktors NF- κ B aktiviert wird [343]. Allerdings wiesen auch Kolonkryptenzellen nach 3 h Koinkubation mit Stämmen anderer Pathovaren erhöhte Transkription von *IL-8* auf und die so konditionierten PC-Überstände induzierten ebenfalls einen proinflammatorischen Zellzustand in den bovinen Makrophagen, ähnlich dem Hybridstamm, aber mit nur geringer und nicht signifikanter Induktion von *iNOS* und *MCP-1*.

Im Gegensatz zum Hybridstamm verursachten die bovin assoziierten STEC-Stämme im Transferexperiment mit PC-Überständen keine nennenswerte Makrophagenreaktion und keiner der STEC-Stämme induzierte indirekt *iNOS* (**Abbildung 38**). Lediglich der sporadische Rinder-Stamm 12E0111 induzierte in diesem experimentellen Ansatz proinflammatorische Mediatoren. Dagegen hemmten die stark Stx1-produzierenden STEC-Stämme 12E0114 und 2403 (**Abbildung 35**, **Abbildung 36**) indirekt die Makrophagenreaktion. Da bovine mukosale Makrophagen Gb₃-Rezeptoren exprimieren, könnte die hohe Stx-Konzentration in den Überständen (12E0114 und 2403) direkt diesen Effekt ausgelöst haben, unabhängig von epithelialen Mediatoren und *in-vivo* den direkten immunsuppressiven Effekt von Stx1 auf Lymphozyten verstärken [119].

Nach Übertragung von konditionierten Überständen von Kolonkryptenzellen induzierte der Hybridstamm tendenziell eine T_H1-dominierte, zelluläre Immunantwort durch Hemmung von *IL-10* und Induktion von *IL-12*, wenn auch ohne Signifikanz (**Abbildung 38**, **Tabelle 13**). Die indirekte Stimulation mit EHEC-Stamm 86-24 induzierte ebenfalls eine T_H1-dominierte, zelluläre Immunantwort, gekennzeichnet durch die signifikante Induktion von *IL-12* und *IFN- γ* . Allerdings wurde auch *IL-6* induziert, ein Mediator der Akuten-Phase-Reaktion, aber auch Promoter einer humoralen T_H2-Immunantwort [344]. LPS verstärkt in bovinen Makrophagen eine T_H2-dominierte Immunantwort durch die Induktion von *IL-10* und Hemmung von *IL-12* [122, 123], während die mukosale T_H1-Immunantwort von Intimin (*eae*) stimuliert wird [52]. Stx1 fungiert als weiterer potenter Immunmodulator im Rind, um STEC eine asymptomatische und transiente Kolonisation im Darm zu ermöglichen [17, 79, 109]. Stx1

verstärkt in mukosalen Makrophagen u.a. die Transkription von *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IFN- γ* , *TNF- α* und *GRO- α* , jedoch ohne Regulation von *IL-12*, *TGF- β* , *MCP-1* und *RANTES* [119]. Im Unterschied dazu führte die Kolonisation von Kolonkryptenzellen durch den Hybridstamm in den bovinen Makrophagen zur starken Induktion von *IL-6*, *IL-12*, *MCP-1* und *iNOS* sowie zu einer geringen Induktion von *IL-1- β* und *IL-8* und zu keiner Regulation von *TNF- α* , *IL-10*, *GRO- α* und *RANTES* (**Abbildung 38**). In der Folge war das *IL-12/IL-10*-Verhältnis der Makrophagen als Maß für die T_H1/T_H2 -Balance [345] am höchsten bei Stimulation mit vom Hybridstamm konditionierten Kolonkrypten-Überständen. Lediglich der porcine Kommensale 123, der den Darm von Kälbern nicht kolonisieren kann [106, 212], verursachte ein ähnlich hohes *IL-12/IL-10*-Verhältnis. In diesem vereinfachenden Darmmodell für das Rind induziert der Hybridstamm damit eine immunologische Reaktionslage, die von seinen EAEC-Eigenschaften bestimmt wird und sich von der deutlich unterscheidet, die von wirtsadaptierten Stämmen ausgelöst wird.

5.5 Modulation der erworbenen Immunität im Rind

Weiterhin wurde die Fähigkeit des Hybridstammes zur Hemmung der Entstehung einer antigenspezifischen zellulären Immunität im Rind bestimmt. Dazu wurde die Aktivierung (CD25-Expression) [346] von CD45RO⁺-T-Zellen (T-Gedächtniszellen, T_M) [347] von Stx-empfindlichen T-Zellsubpopulationen (CD4⁺ T-Helfer-Zellen, CD8 $\alpha\beta$ zytotoxische T-Zellen) untersucht. CD8⁺ T-Zellen sind zytotoxisch und limitieren die Ausbreitung von Infektionserregern im Körper durch Erkennung, Abtötung infizierter Zellen oder Sekretion spezifischer Zytokine [348]. CD4⁺ T-Helferzellen produzieren Wachstumsfaktoren zur Entwicklung einer B- oder T-Zellantwort [348]. Allerdings lag bei allen Tiergruppen nur eine mäßige Aktivierung der **CD4⁺ T_M-Zellen** bei Stimulation mit ConA vor (**Abbildung 39**). Dies könnte der geringen ConA-Konzentration, einer zu langen Stimulation der Zellen *ex-vivo*, sowie einer generell mäßigen Reaktivität geschuldet sein. Eine antigenspezifische Reaktion der CD4⁺ T_M-Zellen war im Untersuchungszeitraum bis Tag 28 *p.i.* nicht messbar. Eine mögliche Erklärung ist die verwendete Methodik, die weniger sensitiv erscheint als die Markierung der T-Zellen mit [³H]-Thymidin zur Bestimmung der lymphoproliferativen Immunantwort [126]. Jedoch ist auch Tag 28 *p.i.* noch ein früher Zeitpunkt zur Untersuchung einer T-Gedächtniszellantwort. Bei Hoffman *et al.* (2006) zeigte sich eine signifikante Zunahme der antigenspezifischen Lymphozytenproliferation erst ab 7-10 Wochen *p.i.* in der Tiergruppe, die mit einem Stx-negativen *E. coli* inokuliert worden war [126]. Im hier dargestellten Tierversuch kolonisierte der Stamm 123 die infizierten Tiere nicht und wurde nur wenige Tage lang ausgeschieden [282]. Daher wurde möglicherweise keine zelluläre Immunität gegenüber diesem Stamm ausgebildet.

Die Aktivierung der **CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen** aus Kälbern, die mit dem Hybridstamm inokuliert worden waren, ähnelte dem Stimulationsmuster der Kälbergruppe, die mit dem STEC-Stamm 86-24 inokuliert worden waren (**Abbildung 40**). Allerdings proliferierten die Lymphozyten der mit dem Kommensalen inokulierten Gruppe 1 kaum, was eine definitive Aussage zur Fähigkeit des Hybridstammes hinsichtlich der Hemmung der Entstehung einer antigenspezifischen Immunität im Rind verhindert.

5.6 Fazit

Das Reaktionsprofil des Hybridstammes war vergleichbar zu human assoziierten *E. coli*-Stämmen, und hier insbesondere dem EAEC-Stamm 55989. Zudem wies der Hybridstamm eine Affinität zu humanen Dünndarmzellen auf und induzierte trotz starker Adhäsion kaum die Transkription proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in humanen Epithelzellen. Hingegen zeigte sich die geringere Adaption des Hybridstammes an das Rind durch eine erhöhte proinflammatorische Aktivität im bovinen Wirtszellsystem. Außerdem adhärierte der Hybridstamm stärker an alle Wirtszellen, im Unterschied zur geringeren Adhäsion der bovin assoziierten STEC-Stämme. Trotz der großen Erregermengen bildete der Hybridstamm kaum elektronenmikroskopisch nachweisbare, direkte Zellkontakte mit den bovinen Epithelzellen aus. Interessanterweise zeigte der Hybridstamm keine übermäßige Expression von Virulenzfaktoren bei Wirtszellkontakt, ähnlich den Stämmen bovin und human assoziierter Pathovare. Im Vergleich zu klassischen EHEC-Stämmen ist der Hybridstamm damit wenig an das Rind adaptiert, obwohl er nach experimenteller Inokulation Kälber transient kolonisieren kann [282]. Der Hybridstamm ist aber im Vergleich zum EHEC-Stamm 86-24 weniger gut zur dauerhaften Persistenz im Rind fähig [282]. Bei den hier beschriebenen *in-vitro*-Untersuchungen zeigte der Hybridstamm eine besondere proinflammatorische Aktivität bei der Interaktion mit dem bovinen Wirtsgewebe und dies könnte auf molekularer Ebene die Erklärung für die schnellere Elimination *in-vivo* darstellen.

Die Adaption des Hybridstammes an die humane Population macht den Menschen zum potentiellen Reservoirwirt, obwohl andere Reservoirs nicht endgültig ausgeschlossen werden können, auch als Ergebnis dieser Studie. Jederzeit kann ein vergleichbarer Ausbruch auftreten, da stets neuartige Genkombinationen durch den Austausch mobiler Virulenzfaktoren entstehen können. Dabei besteht die Gefahr für die öffentliche Gesundheit v.a. in symptomlosen Trägern und Reservoirwirten, die den Erreger ausscheiden oder als potentielle Infektionsquelle in Frage kommen. Bei zukünftigen EHEC-Ausbrüchen mit seltenen Virulenzprofilen müssen auch mögliche tierische Infektionsquellen berücksichtigt werden, um eine frühzeitige Eindämmung der Epidemie zu ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Der Sprossen-assoziierte EHEC-Ausbruch von 2011 wurde von einem neuartigen und hochgradig virulenten *E. coli*-Stamm verursacht, der Virulenzeigenschaften von STEC und EAEC kombinierte [54]. Klassische STEC-Stämme sind an das Rind adaptiert und modulieren die bovine Immunantwort für eine dauerhafte und asymptomatische Kolonisation [17, 29, 110, 111, 119, 124, 125, 143, 210]. Hingegen wird als natürliches Reservoir von EAEC-Stämmen der Mensch vermutet, da die Isolation typischer EAEC-Stämme bisher hauptsächlich aus dem Menschen erfolgte [131, 141, 145, 194, 211]. Vergleichbar schwere EHEC-Ausbrüche könnten jederzeit auftreten. Allerdings ist aufgrund der Hybridvirulenz des Ausbruchstammes die Herkunft und das natürliche Reservoir nach wie vor unbekannt [7]. Wir wollten die relative Wirtsadaptation des Hybridstammes an Mensch und Rind klären, um die Fähigkeit des Hybridstammes zur Persistenz im bovinen Reservoir abzuschätzen. Im natürlichen Reservoir bildet sich ein Gleichgewicht zwischen den Virulenzfaktoren des Erregers und der Immunantwort des Wirts aus [213]. Ist der Hybridstamm nicht ans Rind adaptiert, erwarten wir im Vergleich zu bovin assoziierten Stämmen eine weniger effektive Immunmodulation und mehr proinflammatorische Aktivität im bovinen Wirtszellsystem sowie eine erhöhte Expression von Virulenzgenen bei Wirtszellkontakt.

In-vitro untersuchten wir vergleichend die Interaktion des Hybridstammes mit intestinalen Epithelzellen von Mensch und Rind. Dabei wurden das Adhäsions- und Invasionsvermögen sowie das Potential des Hybridstammes zur Modulation der Wirtszellantwort von Mensch und Rind bestimmt, sowie die Expression von Virulenzfaktoren. Das Reaktionsprofil des Hybridstammes wurde vergleichend zu human und bovin assoziierten *E. coli*-Stämmen klassischer Pathovaren oder avirulenten Stämmen bewertet. Als Modell für die lokale Immunmodulation im Rind wurden primäre Makrophagen mit konditionierten, steril filtrierten Überständen aus der Koinkubation von *E. coli* mit Epithelzellen stimuliert. Das Potential zur systemischen Immunmodulation im Rind wurde *ex-vivo* untersucht.

Der Hybridstamm war fähig, die intestinalen Epithelzellen von Mensch und Rind jeweils aus Dünn- und Dickdarm zu kolonisieren. Elektronenmikroskopisch zeigte der Hybridstamm jedoch eine starke Affinität zu humanen Dünndarmzellen, im Gegensatz zu wenig direktem Zellkontakt mit bovinen Dünndarmzellen. Der Hybridstamm zeigte ein hochgradiges Adhäsionsvermögen, vergleichbar mit human assoziierten Stämmen. Im Gegensatz zum Hybridstamm adhärten die bovin assoziierten STEC-Stämme geringer an die Wirtszellen. Weiterhin war der Hybridstamm im Unterschied zum invasiven Phänotyp einiger bovin assoziierter STEC-Stämme nicht invasiv. Ähnlich wie kommensale und human assoziierte *E. coli*-Stämme induzierte der Hybridstamm in humanen Wirtszellen nur wenig proinflamm-

matorische Aktivität. Erst verzögert nach 6 h zeigte der Hybridstamm proinflammatorische Aktivität im humanen Wirtszellsystem, aber in geringerem Ausmaß als andere Pathovaren. Hingegen induzierte der Hybridstamm im bovinen Wirtszellsystem starke proinflammatorische Effekte, zunächst vergleichbar mit dem human assoziierten EAEC-Stamm 55989. Verzögert nach 6 h verursachte der Hybridstamm die stärkste proinflammatorische Aktivität von allen untersuchten *E. coli*-Stämmen. Auch in den bovinen Makrophagen induzierte der Hybridstamm indirekt einen stark proinflammatorischen Zellzustand. Bovin assoziierte STEC-Stämme verhinderten eher die Entstehung einer proinflammatorischen Reaktionslage in bovinen Epithelzellen und Makrophagen. Der Hybridstamm exprimierte die Virulenzfaktoren verstärkt bei Wirtszellkontakt mit Dünndarmzellen, unabhängig der Wirtspezies und trotz seiner Hybridvirulenz vergleichbar zu anderen Pathovaren. Unter den Stx2-positiven Stämmen war die Stx-Sekretion des Hybridstammes vergleichbar zum EHEC-Stamm 86-24 und stärker als beim bovin assoziierten STEC-Stamm. Absolut sekretierte der Hybridstamm weniger oder ähnlich viel Stx wie die klassischen human assoziierten EHEC-Stämme, aber die Stx-Induzierbarkeit bei direktem Wirtszellkontakt war am stärksten ausgeprägt beim Hybridstamm. Die Zytotoxizität des Hybridstammes war vergleichbar zu anderen Pathovaren und stärker als die avirulenter *E. coli*-Stämme. Wie human assoziierte Stämme beeinträchtigte die Infektion mit dem Hybridstamm nicht die Permeabilitätsbarriere bei humanen, polarisierten Darmepithelzellen.

Die beobachteten Reaktionsmuster aller in dieser Arbeit getesteten Stämme waren sehr heterogen. Trotz der Fähigkeit zur Stx-Produktion und Kolonisation der bovinen Zellen *in-vitro* und *in-vivo* [212] scheint der Hybridstamm eher an den Menschen als an das Rind adaptiert zu sein. In Übereinstimmung damit eliminierten experimentell infizierte Kälbern den Hybridstamm effizienter als den EHEC-Stamm 86-24 [212]. Insgesamt ergaben sich aber weniger deutliche Unterschiede im Reaktionsmuster des Hybridstammes zu dem von Stämmen, die andere Pathovaren repräsentierten, oder auch zu denen avirulenter *E. coli*-Stämme als vermutet. Bei zukünftigen Ausbrüchen mit seltenen EHEC-Stämmen und neuartigen Virulenzprofilen sollten deshalb auch mögliche tierische Infektionsquellen in Betracht gezogen werden, um eine frühzeitige Eindämmung der Epidemie zu ermöglichen.

7 Summary

In 2011, Germany was struck by the largest outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by a novel and highly virulent *E. coli* O104:H4 strain, combining virulence factors from both enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* (STEC) [54]. Cattle are the primary reservoir for STEC, which are capable of modulating the bovine immune system to promote a persistent and asymptomatic lifestyle [17, 29, 110, 111, 119, 124, 125, 143, 210]. EAEC are considered highly adapted to humans, since they have rarely been detected in animals before [131, 141, 145, 194, 211]. Due to the hybrid virulence profile, the natural reservoir of the outbreak strains remains obscure [7]; however, outbreaks of comparable severity may occur again. This study aimed at appraising the relative level of host adaption of *E. coli* O104:H4 outbreak strain to possible reservoir hosts. Virulence factors of bacterial pathogens counteract elements of the immune control in the natural reservoir, generating a balance between pathogen and host [213]. If cattle are not the reservoir of *E. coli* O104:H4 outbreak strain, we expect a less effective modulation of the bovine immune response as compared to bovine-associated *E. coli* strains. If the *E. coli* O104:H4 outbreak strain is not adapted to cattle, its interaction with bovine host cells might lead to a high-level of pro-inflammatory activity and overwhelming expression of virulence factors.

Therefore, we investigated the interaction of the *E. coli* O104:H4 outbreak strain with intestinal epithelial cells (IEC) of human and bovine origin. We assessed the outbreak strain's potential to adhere to and invade into host-specific IEC, as well as its capacity to modulate the host gene expression of selected cytokines. Furthermore, expression of bacterial virulence genes after host cell contact was quantified. The outbreak's strain reaction profile was compared to both bovine- and human-associated *E. coli* strains; the latter were representative of different pathovars or non-pathogenic *E. coli*. In addition, we evaluated the outbreak strain's immunomodulatory capability by stimulating primary, bovine macrophages with conditioned supernatants from previous infection studies with *E. coli* and intestinal epithelial cells. Finally, we assessed the outbreak strain's potential to suppress the development of an adaptive, antigen-specific cellular immune response in cattle in comparison to bovine-associated STEC.

The outbreak strain was able to adhere to intestinal (jejunal and colonic) epithelial cells (IEC) of human and bovine origin. Electron microscopy of infected cells revealed the strain's great affinity to human small intestinal cells, in contrast to few direct interactions with bovine small intestinal cells. The outbreak strain possessed a high-level of adhesive power, similar to human-associated *E. coli* strains and in contrast to bovine-associated STEC strains. The

bovine-associated STEC strains exerted low levels of adhesion to host-specific IECs. The outbreak strain displayed a non-invasive phenotype, in contrast to some bovine-associated *E. coli* strains which invaded into the host cells. During the initial interaction with human host cells, the outbreak strain induced only little inflammatory cell response, comparable to the extent of commensal bacteria and human-associated *E. coli* strains. After a prolonged incubation period (6 h), the outbreak strain provoked some pro-inflammatory activity in human cells, but to a lower extent as compared to other pathogenic *E. coli* strains. The outbreak strain induced marked pro-inflammatory activity interacting with bovine host cells. During the interaction with bovine cells, the outbreak strain initially induced an inflammatory cell response comparable to EAEC strain 55989. The outbreak strain induced the strongest delayed inflammatory response of all strains tested (i.e. after 6 h of co-incubation). In addition, the outbreak strain was capable of indirectly inducing a strong pro-inflammatory activity in bovine macrophages (by transfer of conditioned epithelial cell culture supernatants), which served as model for the innate immunity of the bovine gut. In contrast, bovine-associated *E. coli* strains limited the pro-inflammatory activity in bovine IEC and macrophages. The outbreak strain, like other pathogenic *E. coli* strains, enhanced the expression of virulence-associated factors after adhesion, especially after adhesion to small intestinal cells and fairly independent of the host species of the cells. Among Stx2-positive strains, the outbreak strain and EHEC strain 86-24 released comparable levels of Stx and both human-pathogenic strains released higher amounts of Stx compared to bovine-associated STEC. In total, the Stx secretion of the outbreak strain resembled that of other human-associated *E. coli* strains. However, the outbreak strain displayed the highest inducibility of Stx2 production upon host cell contact. The outbreak strain was capable of eliciting cytotoxic effects in host cells, comparable to other pathogenic *E. coli*, but in contrast to avirulent *E. coli* strains. Nevertheless, the outbreak strain was unable to disrupt the polarized monolayer of CaCo-2-cells as well as other human-associated *E. coli* strains.

The reaction patterns observed after interaction of the several strains included in this study with intestinal epithelial cells were strikingly heterogeneous. The *E. coli* O104:H4 outbreak strain seems to be more likely adapted to humans than to cattle, despite its capacity to produce Stx and transiently colonize bovine IEC *in-vitro* and *in-vivo* [212]. This is in accordance with the reduced and shortened fecal excretion of the outbreak strain after experimental infection of calves in comparison to strain 86-24 [212]. Nevertheless, overall patterns induced by the outbreak strain were less different from those induced by other pathogenic and even avirulent *E. coli* strains than anticipated. Health authorities should not prematurely exclude animals as an infection source when taking appropriate early intervention measures during future outbreaks with rare EHEC strains or strains with novel virulence profiles.

8 Literaturverzeichnis

1. Frank, C., et al., *Epidemic profile of Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104:H4 outbreak in Germany*. N Engl J Med, 2011. **365**(19): p. 1771-80.
2. Karmali, M.A., *Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2**(1): p. 15-38.
3. Smith, D.G., S.W. Naylor, and D.L. Gally, *Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle*. Int J Med Microbiol, 2002. **292**(3-4): p. 169-83.
4. Bridger, P.S., et al., *Primary bovine colonic cells: a model to study strain-specific responses to Escherichia coli*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **137**(1-2): p. 54-63.
5. Gyles, C.L., *Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview*. J Anim Sci, 2007. **85**(13 Suppl): p. E45-62.
6. Harrington, S.M., E.G. Dudley, and J.P. Nataro, *Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **254**(1): p. 12-8.
7. Karch, H., et al., *The enemy within us: lessons from the 2011 European Escherichia coli O104:H4 outbreak*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(9): p. 841-8.
8. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
9. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
10. Brzuszkiewicz, E., et al., *Genome sequence analyses of two isolates from the recent Escherichia coli outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic Escherichia coli (EAHEC)*. Arch Microbiol, 2011. **193**(12): p. 883-91.
11. Mellmann, A., et al., *Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22751.
12. Riley, L.W., et al., *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype*. N Engl J Med, 1983. **308**(12): p. 681-5.
13. Griffin, P.M., et al., *Illnesses associated with Escherichia coli O157:H7 infections. A broad clinical spectrum*. Ann Intern Med, 1988. **109**(9): p. 705-12.
14. Ritchie, J.M., et al., *Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(2): p. 1059-66.
15. Su, C. and L.J. Brandt, *Escherichia coli O157:H7 infection in humans*. Ann Intern Med, 1995. **123**(9): p. 698-714.
16. Tuttle, J., et al., *Lessons from a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties*. Epidemiol Infect, 1999. **122**(2): p. 185-92.
17. Moussay, E., et al., *Escherichia coli Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **113**(3-4): p. 367-82.
18. Frank, C., et al., *Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011*. Euro Surveill, 2011. **16**(21).
19. Hancock, D.D., et al., *A longitudinal study of Escherichia coli O157 in fourteen cattle herds*. Epidemiol Infect, 1997. **118**(2): p. 193-5.
20. Wells, J.G., et al., *Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype*. J Clin Microbiol, 1983. **18**(3): p. 512-20.
21. Geue, L., et al., *Rapid microarray-based genotyping of enterohemorrhagic Escherichia coli serotype O156:H25/H-/Hnt isolates from cattle and clonal relationship analysis*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(16): p. 5510-9.
22. Geue, L., et al., *A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) on four German cattle farms*. Epidemiol Infect, 2002. **129**(1): p. 173-85.

23. Fremaux, B., et al., *Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains on French dairy farms*. Vet Microbiol, 2006. **117**(2-4): p. 180-91.
24. Kang, S.J., et al., *Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 in calves associated with diarrhoea*. Vet Microbiol, 2004. **98**(3-4): p. 323-8.
25. Wieler, L.H., et al., *Virulence properties of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(6): p. 1604-7.
26. Wieler, L.H., et al., *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(12): p. 2980-4.
27. Moxley, R.A. and D.H. Francis, *Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of Escherichia coli in calves*. Infect Immun, 1986. **53**(2): p. 339-46.
28. Janke, B.H., et al., *Attaching and effacing Escherichia coli infection as a cause of diarrhea in young calves*. J Am Vet Med Assoc, 1990. **196**(6): p. 897-901.
29. Beutin, L., et al., *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from cattle as a source of the Stx2a bacteriophages present in enteroaggregative Escherichia coli O104:H4 strains*. Int J Med Microbiol, 2013. **303**(8): p. 595-602.
30. Hussein, H.S. and T. Sakuma, *Prevalence of shiga toxin-producing Escherichia coli in dairy cattle and their products*. J Dairy Sci, 2005. **88**(2): p. 450-65.
31. RKI (Robert Koch-Institut), *Epidemiologisches Bulletin, Virulenz Shigatoxin-produzierender Escherichia coli (STEC) O157 im Vergleich zu STEC anderer Serogruppen Studie auf Basis der Meldedaten*. 2013.
32. Gerber, A., et al., *Clinical course and the role of shiga toxin-producing Escherichia coli infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study*. J Infect Dis, 2002. **186**(4): p. 493-500.
33. Tarr, P.I., C.A. Gordon, and W.L. Chandler, *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1073-86.
34. Ferens, W.A. and C.J. Hovde, *Escherichia coli O157:H7: animal reservoir and sources of human infection*. Foodborne Pathog Dis, 2011. **8**(4): p. 465-87.
35. Karmali, M.A., et al., *Escherichia coli cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis*. Lancet, 1983. **2**(8362): p. 1299-1300.
36. Endo, Y., et al., *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, 1988. **171**(1-2): p. 45-50.
37. Tesh, V.L., *Induction of apoptosis by Shiga toxins*. Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 431-53.
38. Paton, A.W., et al., *AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP*. Nature, 2006. **443**(7111): p. 548-52.
39. Thorpe, C.M., J. M. Ritchie, and D. W. K. Acheson., *Enterohemorrhagic and other Shiga toxin-producing Escherichia coli*. , ed. E.c.v.m.o.a.v.p.A.P. In M. Donnenberg (ed.), San Diego, Calif. 2002.
40. Scheutz, F., et al., *Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(9): p. 2951-63.
41. Chark, D., et al., *Differential carbohydrate epitope recognition of globotriaosyl ceramide by verotoxins and a monoclonal antibody*. Eur J Biochem, 2004. **271**(2): p. 405-17.
42. Tam, P., et al., *Differential intracellular transport and binding of verotoxin 1 and verotoxin 2 to globotriaosylceramide-containing lipid assemblies*. J Cell Physiol, 2008. **216**(3): p. 750-63.
43. Rutjes, N.W., et al., *Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model*. Kidney Int, 2002. **62**(3): p. 832-45.
44. Thorpe, C.M., *Shiga toxin-producing Escherichia coli infection*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(9): p. 1298-303.

45. Gal-Mor, O. and B.B. Finlay, *Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence*. Cell Microbiol, 2006. **8**(11): p. 1707-19.
46. Coombes, B.K., M.W. Gilmour, and C.D. Goodman, *The evolution of virulence in non-o157 shiga toxin-producing Escherichia coli*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 90.
47. McDaniel, T.K., et al., *A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1664-8.
48. McDaniel, T.K. and J.B. Kaper, *A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12*. Mol Microbiol, 1997. **23**(2): p. 399-407.
49. Walle, K.V., D. Vanrompay, and E. Cox, *Bovine innate and adaptive immune responses against Escherichia coli O157:H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013. **152**(1-2): p. 109-120.
50. Knutton, S., et al., *Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. Infect Immun, 1989. **57**(4): p. 1290-8.
51. Jerse, A.E., et al., *A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7839-43.
52. Higgins, L.M., et al., *Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation*. Science, 1999. **285**(5427): p. 588-91.
53. Karmali, M.A., et al., *Association of genomic O island 122 of Escherichia coli EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 4930-40.
54. Bielaszewska, M., et al., *Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(9): p. 671-6.
55. Luck, S.N., et al., *Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic Escherichia coli*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 3063-71.
56. Paton, A.W. and J.C. Paton, *Molecular characterization of the locus encoding biosynthesis of the lipopolysaccharide O antigen of Escherichia coli serotype O113*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5930-7.
57. Newton, H.J., et al., *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains negative for locus of enterocyte effacement*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(3): p. 372-80.
58. Tarr, P.I., et al., *Iha: a novel Escherichia coli O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1400-7.
59. Ju, W., et al., *Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(11): p. 3406-12.
60. Luck, S.N., et al., *Contribution of FliC to epithelial cell invasion by enterohemorrhagic Escherichia coli O113:H21*. Infect Immun, 2006. **74**(12): p. 6999-7004.
61. Dytoc, M.T., et al., *Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing Escherichia coli of serotype O113:H21*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3494-505.
62. Sonntag, A.K., et al., *Shiga toxin 2e-producing Escherichia coli isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8855-63.
63. Mundy, R., et al., *Functional studies of intimin in vivo and ex vivo: implications for host specificity and tissue tropism*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 4): p. 959-67.
64. Stamm, I., et al., *Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to Escherichia coli Shiga toxin 1*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 5381-91.
65. Rashid, R.A., et al., *Expression of putative virulence factors of Escherichia coli O157:H7 differs in bovine and human infections*. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 4142-8.

66. Stamm, I., et al., *Bovine lymphocytes express functional receptors for Escherichia coli Shiga toxin 1*. Microb Pathog, 2002. **33**(6): p. 251-64.
67. Pruiimboom-Brees, I.M., et al., *Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157:H7 Shiga toxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10325-9.
68. Phillips, A.D., et al., *Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine*. Gut, 2000. **47**(3): p. 377-81.
69. Fitzpatrick, M.M., et al., *Interleukin-8 and polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood*. Kidney Int, 1992. **42**(4): p. 951-6.
70. Thorpe, C.M., et al., *Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6140-7.
71. Proulx, F., E.G. Seidman, and D. Karpman, *Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 2001. **50**(2): p. 163-71.
72. Thorpe, C.M., et al., *Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5985-93.
73. Yamasaki, C., et al., *Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity*. FEBS Lett, 1999. **442**(2-3): p. 231-4.
74. Schuller, S., G. Frankel, and A.D. Phillips, *Interaction of Shiga toxin from Escherichia coli with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 289-301.
75. Hurley, B.P., et al., *Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(12): p. 6670-7.
76. Philpott, D.J., et al., *Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. G1349-58.
77. Jacewicz, M.S., et al., *Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1439-44.
78. Obrig, T.G., et al., *Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells*. Infect Immun, 1988. **56**(9): p. 2373-8.
79. Menge, C., et al., *Comparison of binding and effects of Escherichia coli Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **113**(3-4): p. 392-403.
80. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro*. Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4173-9.
81. Waddell, T., A. Cohen, and C.A. Lingwood, *Induction of verotoxin sensitivity in receptor-deficient cell lines using the receptor glycolipid globotriosylceramide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7898-901.
82. Hughes, A.K., et al., *Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells*. Kidney Int, 2000. **57**(6): p. 2350-9.
83. Sandvig, K., *Shiga toxins*. Toxicon, 2001. **39**(11): p. 1629-35.
84. van Setten, P.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 1998. **43**(6): p. 759-67.
85. van de Kar, N.C., et al., *Plasma cytokine levels in hemolytic uremic syndrome*. Nephron, 1995. **71**(3): p. 309-13.
86. Inward, C.D., et al., *Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing Escherichia coli infection*. Arch Dis Child, 1997. **77**(2): p. 145-7.
87. Yamamoto, T., et al., *[Evaluation of thrombomodulin and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection]*. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1999. **41**(2): p. 60-4.

88. Akira, S., et al., *Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)*. FASEB J, 1990. **4**(11): p. 2860-7.
89. Harrison, L.M., et al., *Chemokine expression in the monocytic cell line THP-1 in response to purified shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 403-12.
90. Harrison, L.M., W.C. van Haaften, and V.L. Tesh, *Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 2618-27.
91. Tesh, V.L., B. Ramegowda, and J.E. Samuel, *Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 5085-94.
92. van de Kar, N.C., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome*. Blood, 1992. **80**(11): p. 2755-64.
93. Kaye, S.A., et al., *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3886-91.
94. Hurley, B.P., C.M. Thorpe, and D.W. Acheson, *Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6148-55.
95. King, A.J., et al., *Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters*. J Infect Dis, 1999. **179**(2): p. 503-7.
96. Forsyth, K.D., et al., *Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 1989. **2**(8660): p. 411-4.
97. Morigi, M., et al., *Verotoxin-1 promotes leukocyte adhesion to cultured endothelial cells under physiologic flow conditions*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4553-8.
98. te Loo, D.M., et al., *Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3396-402.
99. Zanchi, C., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1460-9.
100. Zoja, C., et al., *Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1*. Kidney Int, 2002. **62**(3): p. 846-56.
101. Geelen, J., et al., *Shiga-toxin-induced firm adhesion of human leukocytes to endothelium is in part mediated by heparan sulfate*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(10): p. 3091-5.
102. Mangeney, M., et al., *Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen*. Cancer Res, 1993. **53**(21): p. 5314-9.
103. Mori, T., et al., *Globotriaosyl ceramide (CD77/Gb3) in the glycolipid-enriched membrane domain participates in B-cell receptor-mediated apoptosis by regulating lyn kinase activity in human B cells*. Exp Hematol, 2000. **28**(11): p. 1260-8.
104. Reymond, D., et al., *Neutralizing antibodies to Escherichia coli Verotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(9): p. 2053-7.
105. Proulx, F., et al., *Circulating levels of transforming growth factor-beta1 and lymphokines among children with hemolytic uremic syndrome*. Am J Kidney Dis, 2000. **35**(1): p. 29-34.
106. Dean-Nystrom, E.A., et al., *Pathogenicity of Escherichia coli O157:H7 in the intestines of neonatal calves*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1842-8.
107. Cray, W.C., Jr. and H.W. Moon, *Experimental infection of calves and adult cattle with Escherichia coli O157:H7*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(4): p. 1586-90.
108. Wray, C., et al., *Natural and experimental infection of normal cattle with Escherichia coli O157*. Vet Rec, 2000. **147**(3): p. 65-8.

109. Menge, C., et al., *Bovine ileal intraepithelial lymphocytes represent target cells for Shiga toxin 1 from Escherichia coli*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 1896-905.
110. Menge, C., et al., *Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic Escherichia coli infection*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 6): p. 573-9.
111. Menge, C., et al., *Shiga toxin 1 from Escherichia coli blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2209-17.
112. Naylor, S.W., et al., *Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in the bovine host*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1505-12.
113. Mahajan, A., et al., *An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of Escherichia coli O157 : H7 with bovine intestinal epithelium*. Cell Microbiol, 2009. **11**(1): p. 121-37.
114. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
115. Miyamoto, Y., et al., *Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic Escherichia coli signalling of human colon epithelium in vivo*. Cell Microbiol, 2006. **8**(5): p. 869-79.
116. Dean-Nystrom, E.A., et al., *Escherichia coli O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4560-3.
117. Tree, J.J., et al., *Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic Escherichia coli*. Trends Microbiol, 2009. **17**(8): p. 361-70.
118. Schoonderwoerd, M., et al., *Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of Escherichia coli O111:NM*. Can J Vet Res, 1988. **52**(4): p. 484-7.
119. Menge, C., et al., *Bovine macrophages sense Escherichia coli Shiga toxin 1*. Innate Immun, 2015. **21**(6): p. 655-64.
120. Taraktsoglou, M., et al., *Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages exposed to bacterial antigens*. Vet Immunol Immunopathol, 2011. **140**(1-2): p. 130-9.
121. Chitko-McKown, C.G., et al., *Gene expression profiling of bovine macrophages in response to Escherichia coli O157:H7 lipopolysaccharide*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(6): p. 635-45.
122. Werling, D., et al., *Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists*. Immunology, 2004. **111**(1): p. 41-52.
123. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
124. Menge, C., et al., *Verotoxin 1 from Escherichia coli affects Gb3/CD77+ bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(4): p. 377-86.
125. Menge, C., et al., *Globotriaosylceramide (Gb3)/CD77 is synthesized and surface expressed by bovine lymphocytes upon activation in vitro*. Vet Immunol Immunopathol, 2001. **83**(1-2): p. 19-36.
126. Hoffman, M.A., et al., *Bovine immune response to shiga-toxigenic Escherichia coli O157:H7*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(12): p. 1322-7.
127. Bretschneider, G., E.M. Berberov, and R.A. Moxley, *Isotype-specific antibody responses against Escherichia coli O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **118**(3-4): p. 229-38.
128. O'Loughlin, E.V. and R.M. Robins-Browne, *Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells*. Microbes Infect, 2001. **3**(6): p. 493-507.
129. Kerner, K., et al., *Evaluation of biological safety in vitro and immunogenicity in vivo of recombinant Escherichia coli Shiga toxoids as candidate vaccines in cattle*. Vet Res, 2015. **46**: p. 38.

130. Vial, P.A., et al., *Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease*. J Infect Dis, 1988. **158**(1): p. 70-9.
131. Uber, A.P., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **256**(2): p. 251-7.
132. Boisen, N., et al., *New adhesin of enteroaggregative Escherichia coli related to the Afa/Dr/AAF family*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3281-92.
133. Tompkins, D.S., et al., *A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls*. Commun Dis Public Health, 1999. **2**(2): p. 108-13.
134. Okeke, I.N., et al., *Heterogeneous virulence of enteroaggregative Escherichia coli strains isolated from children in Southwest Nigeria*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 252-60.
135. Durrer, P., et al., *Intestinal infection due to enteroaggregative Escherichia coli among human immunodeficiency virus-infected persons*. J Infect Dis, 2000. **182**(5): p. 1540-4.
136. Mossoro, C., et al., *Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEP-2 adherent Escherichia coli in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 3086-8.
137. Glandt, M., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli as a cause of traveler's diarrhea: clinical response to ciprofloxacin*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(2): p. 335-8.
138. Adachi, J.A., et al., *Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic Escherichia coli infection among US travelers to Guadalajara, Mexico*. J Infect Dis, 2002. **185**(11): p. 1681-3.
139. Adachi, J.A., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(12): p. 1706-9.
140. Huang, D.B., H. Koo, and H.L. DuPont, *Enteroaggregative Escherichia coli: An Emerging Pathogen*. Curr Infect Dis Rep, 2004. **6**(2): p. 83-86.
141. Okeke, I.N., *Diarrheagenic Escherichia coli in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities*. J Infect Dev Ctries, 2009. **3**(11): p. 817-42.
142. Auvray, F., et al., *French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing Escherichia coli of serotype O104:H4*. Vet Microbiol, 2012. **158**(3-4): p. 443-5.
143. Wieler, L.H., et al., *No evidence of the Shiga toxin-producing E. coli O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative E. coli (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area*. Gut Pathog, 2011. **3**(1): p. 17.
144. Beutin, L. and A. Martin, *Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains*. J Food Prot, 2012. **75**(2): p. 408-18.
145. Cassar, C.A., et al., *Absence of enteroaggregative Escherichia coli in farmed animals in Great Britain*. Vet Rec, 2004. **154**(8): p. 237-9.
146. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority), *Shiga toxin/verotoxin - producing Escherichia coli in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104, S.E. 2011.*, Editor 2011.
147. Koo, H.L., et al., *Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(2): p. 218-21.
148. Oundo, J.O., et al., *High incidence of enteroaggregative Escherichia coli among food handlers in three areas of Kenya: a possible transmission route of travelers' diarrhea*. J Travel Med, 2008. **15**(1): p. 31-8.
149. Kaur, P., A. Chakraborti, and A. Asea, *Enteroaggregative Escherichia coli: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen*. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2010. **2010**: p. 254159.

150. Steiner, T.S., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells*. J Infect Dis, 1998. **177**(1): p. 88-96.
151. Greenberg, D.E., et al., *Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative Escherichia coli pathogenicity*. J Infect Dis, 2002. **185**(7): p. 944-9.
152. Tran, S.L., et al., *Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing E. coli O157:H7 and O104:H4*. Cell Microbiol, 2014.
153. Nataro, J.P., et al., *AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative Escherichia coli*. J Bacteriol, 1994. **176**(15): p. 4691-9.
154. Eslava, C., et al., *Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative Escherichia coli*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3155-63.
155. Savarino, S.J., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model*. J Clin Invest, 1991. **87**(4): p. 1450-5.
156. Nishi, J., et al., *The export of coat protein from enteroaggregative Escherichia coli by a specific ATP-binding cassette transporter system*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45680-9.
157. Bernier, C., P. Gounon, and C. Le Bouguenec, *Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative Escherichia coli as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4302-11.
158. Czczulin, J.R., et al., *Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative Escherichia coli*. Infect Immun, 1997. **65**(10): p. 4135-45.
159. Nataro, J.P., et al., *Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes*. Infect Immun, 1992. **60**(6): p. 2297-304.
160. Hicks, S., D.C. Candy, and A.D. Phillips, *Adhesion of enteroaggregative Escherichia coli to pediatric intestinal mucosa in vitro*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4751-60.
161. Harrington, S.M., et al., *Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative Escherichia coli*. Cell Microbiol, 2005. **7**(11): p. 1565-78.
162. Strauman, M.C., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli disrupts epithelial cell tight junctions*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4958-64.
163. Nataro, J.P., et al., *Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative Escherichia coli requires two unlinked plasmid regions*. Infect Immun, 1993. **61**(3): p. 1126-31.
164. Gallegos, M.T., et al., *Arac/XylS family of transcriptional regulators*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(4): p. 393-410.
165. Dudley, E.G., et al., *Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2006. **61**(5): p. 1267-82.
166. Velarde, J.J., et al., *Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2007. **66**(5): p. 1123-35.
167. Mohamed, J.A., et al., *Association of putative enteroaggregative Escherichia coli virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 121-6.
168. Dutta, P.R., et al., *Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 7105-13.
169. Harrington, S.M., et al., *The Pic protease of enteroaggregative Escherichia coli promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin*. Infect Immun, 2009. **77**(6): p. 2465-73.

170. Yamamoto, T., P. Echeverria, and T. Yokota, *Drug resistance and adherence to human intestines of enteroaggregative Escherichia coli*. J Infect Dis, 1992. **165**(4): p. 744-9.
171. Knutton, S., et al., *Ability of enteroaggregative Escherichia coli strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa*. Infect Immun, 1992. **60**(5): p. 2083-91.
172. Nataro, J.P., *Enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis*. Curr Opin Gastroenterol, 2005. **21**(1): p. 4-8.
173. Edwards, L.A., et al., *Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative Escherichia coli*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e27030.
174. Philipson, C.W., J. Bassaganya-Riera, and R. Hontecillas, *Animal models of enteroaggregative Escherichia coli infection*. Gut Microbes, 2013. **4**(4): p. 281-91.
175. Khan, M.A., J. Kang, and T.S. Steiner, *Enteroaggregative Escherichia coli flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation*. Immunology, 2004. **112**(4): p. 651-60.
176. Steiner, T.S., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1769-1777.
177. Huang, D.B., et al., *Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic Escherichia coli*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(3): p. 548-51.
178. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
179. RKI (Robert Koch-Institut), *Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak, Germany 2011.*, 2011.
180. RKI (Robert Koch-Institut), *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011, Datenstand: 1. März 2012*. 2012.
181. Buchholz, U., et al., *German outbreak of Escherichia coli O104:H4 associated with sprouts*. N Engl J Med, 2011. **365**(19): p. 1763-70.
182. Bundesinstitut für Risikobewertung, B., *Bedeutung von Sprossen und Keimlingen sowie Samen zur Sprossenherstellung im EHEC O104:H4 Ausbruchsgeschehen im Mai und Juni 2011*. 2011.
183. EFSA (European Food Safety Authority), *Tracing seeds, in particular fenugreek (Trigonella foenum-graecum) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing E. coli (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France.*, 2011.
184. Rasko, D.A., et al., *Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 709-17.
185. Rasko, D.A., et al., *Origins of the E. coli Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(8): p. 709-717.
186. Rohde, H., et al., *Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing E. coli O104:H4*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 718-24.
187. Mellmann, A., et al., *Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic Escherichia coli*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1287-90.
188. Monecke, S., et al., *Presence of enterohemorrhagic Escherichia coli ST678/O104:H4 in France prior to 2011*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(24): p. 8784-6.
189. Perna, N.T., et al., *Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Nature, 2001. **409**(6819): p. 529-33.
190. Hayashi, T., et al., *Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12*. DNA Res, 2001. **8**(1): p. 11-22.
191. Navarro-Garcia, F., *Escherichia coli O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative E. coli/Shiga Toxin-Producing E. coli Explosive Cocktail of High Virulence*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(6).
192. Boisen, N., et al., *The presence of the pAA plasmid in the German O104:H4 Shiga toxin type 2a (Stx2a)-producing enteroaggregative Escherichia coli strain promotes*

- the translocation of Stx2a across an epithelial cell monolayer.* J Infect Dis, 2014. **210**(12): p. 1909-19.
193. Sheikh, J., et al., *Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2001. **41**(5): p. 983-97.
 194. Veilleux, S. and J.D. Dubreuil, *Presence of Escherichia coli carrying the EAST1 toxin gene in farm animals.* Vet Res, 2006. **37**(1): p. 3-13.
 195. Smet, A., et al., *Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical Escherichia coli isolates: insertional events of transposons and insertion sequences.* PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11202.
 196. Nataro, J.P., et al., *T84 cells in culture as a model for enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis.* Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4761-8.
 197. Al Safadi, R., et al., *Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in Escherichia coli O104:H4.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41628.
 198. Zangari, T., et al., *Virulence of the Shiga toxin type 2-expressing Escherichia coli O104:H4 German outbreak isolate in two animal models.* Infect Immun, 2013. **81**(5): p. 1562-74.
 199. Richter, A.M., et al., *Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak Escherichia coli O104:H4.* EMBO Mol Med, 2014. **6**(12): p. 1622-37.
 200. Bockemuhl, J., S. Aleksic, and H. Karch, *Serological and biochemical properties of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing strains of Escherichia coli, other than O-group 157, from patients in Germany.* Zentralbl Bakteriol, 1992. **276**(2): p. 189-95.
 201. Boudailliez, B., et al., *Possible person-to-person transmission of Escherichia coli O111--associated hemolytic uremic syndrome.* Pediatr Nephrol, 1997. **11**(1): p. 36-9.
 202. Morabito, S., et al., *Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing Escherichia coli O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome.* J Clin Microbiol, 1998. **36**(3): p. 840-2.
 203. Willshaw, G.A., et al., *Properties of Vero cytotoxin-producing Escherichia coli of human origin of O serogroups other than O157.* J Infect Dis, 1992. **166**(4): p. 797-802.
 204. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), *Outbreak of acute gastroenteritis attributable to Escherichia coli serotype O104:H21, Montana, Helena.* 1994.
 205. Iyoda, S., et al., *[Molecular epidemiology of enterohemorrhagic Escherichia coli].* Nihon Saikingaku Zasshi, 2000. **55**(1): p. 29-36.
 206. Bae, W.K., et al., *A case of hemolytic uremic syndrome caused by Escherichia coli O104:H4.* Yonsei Med J, 2006. **47**(3): p. 437-9.
 207. Kim, J., et al., *Escherichia coli O104:H4 from 2011 European outbreak and strain from South Korea.* Emerg Infect Dis, 2011. **17**(9): p. 1755-6.
 208. Scavia, G., et al., *Enterohemorrhagic Escherichia coli associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis.* J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 9): p. 1141-6.
 209. Miko, A., et al., *Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104 strains from different origins and sources.* Int J Med Microbiol, 2013. **303**(8): p. 410-21.
 210. Paddock, Z.D., et al., *Detection of Escherichia coli O104 in the feces of feedlot cattle by a multiplex PCR assay designed to target major genetic traits of the virulent hybrid strain responsible for the 2011 German outbreak.* Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(11): p. 3522-5.
 211. Cabal, A., et al., *Detection of virulence-associated genes characteristic of intestinal Escherichia coli pathotypes, including the enterohemorrhagic/enteroaggregative O104:H4, in bovines from Germany and Spain.* Microbiol Immunol, 2015. **59**(8): p. 433-42.
 212. Hamm, K., *Experimentelle Infektion von Kälbern mit Escherichia coli O104:H4*, 2015, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen VVB Laufersweiler Verlag.
 213. Sansonetti, P.J., *War and peace at mucosal surfaces.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 953-64.

214. Zhang, W., et al., *Lability of the pAA Virulence Plasmid in O104:H4: Implications for Virulence in Humans*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66717.
215. Vonberg, R.P., et al., *Duration of fecal shedding of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4 in patients infected during the 2011 outbreak in Germany: a multicenter study*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(8): p. 1132-40.
216. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie, *Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 313-38.
217. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.
218. Muniz, L.R., C. Knosp, and G. Yeretssian, *Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 310.
219. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
220. Mayer, L., *Mucosal immunity*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 5.
221. Holzapfel, W.H., et al., *Overview of gut flora and probiotics*. Int J Food Microbiol, 1998. **41**(2): p. 85-101.
222. Werling, D. and T.W. Jungi, *TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **91**(1): p. 1-12.
223. Lan, J.G., et al., *Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(22): p. 3375-84.
224. Skjolaas, K.A., et al., *Effects of Salmonella enterica serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, Lactobacillus reuteri and Bacillus licheniformis on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **115**(3-4): p. 299-308.
225. Nagalakshmi, M.L., et al., *Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(5): p. 577-92.
226. Dwinell, M.B., P.A. Johannesen, and J.M. Smith, *Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa*. Surgery, 2003. **133**(6): p. 601-7.
227. Shibahara, T., et al., *Characterization of epithelial chemoattractants for human intestinal intraepithelial lymphocytes*. Gastroenterology, 2001. **120**(1): p. 60-70.
228. Yang, S.K., et al., *Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells*. Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1214-23.
229. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 361-7.
230. Rimoldi, M., et al., *Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 507-14.
231. Bauer, H., et al., *The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice*. Am J Pathol, 1963. **42**: p. 471-83.
232. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
233. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, *The immunology of mucosal models of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 495-549.
234. Appleyard, R.K., *Segregation of lambda lysogenicity during bacterial recombination in E. coli K-12*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1953. **18**: p. 95-7.
235. Baldini, G., *[Interaction of radiculo-vestibular torque and Goshgarian palatal arch expansion]*. Rev Orthop Dento Faciale, 1983. **17**(1): p. 81-7 contd.
236. O'Brien, A.O., et al., *Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin*. Lancet, 1983. **1**(8326 Pt 1): p. 702.
237. Moon, H.W., D.K. Sorensen, and J.H. Sautter, *Experimental enteric colibacillosis in piglets*. Can J Comp Med, 1968. **32**(3): p. 493-7.
238. Tarr, P.I., et al., *Genotypic variation in pathogenic Escherichia coli O157:H7 isolated from patients in Washington, 1984-1987*. J Infect Dis, 1989. **159**(2): p. 344-7.

239. Bilge, S.S., et al., *Role of the Escherichia coli O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an rfb locus*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4795-801.
240. Vial, P.A., K.L. Kotloff, and G.A. Losonsky, *Molecular epidemiology of rotavirus infection in a room for convalescing newborns*. J Infect Dis, 1988. **157**(4): p. 668-73.
241. Wieler, L.H., R. Bauerfeind, and G. Baljer, *Characterization of Shiga-like toxin producing Escherichia coli (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea*. Zentralbl Bakteriol, 1992. **276**(2): p. 243-53.
242. Nagy, G., et al., *Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic Escherichia coli strain 536*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1924-8.
243. Müller, D., et al., *Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(10): p. 3380-90.
244. Taubert, A., H. Zahner, and C. Hermosilla, *Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites*. Vet Parasitol, 2006. **142**(3-4): p. 214-22.
245. Behrendt, J.H., et al., *PMN-mediated immune reactions against Eimeria bovis*. Vet Parasitol, 2008. **151**(2-4): p. 97-109.
246. Leutenegger, C.M., et al., *Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction*. Vet Immunol Immunopathol, 2000. **77**(3-4): p. 275-87.
247. Lahouassa, H., et al., *Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Cytokine, 2007. **38**(1): p. 12-21.
248. Sow, F.B., et al., *Gene profiling studies in the neonatal ovine lung show enhancing effects of VEGF on the immune response*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(6): p. 761-71.
249. Magee, D.A., et al., *Innate cytokine profiling of bovine alveolar macrophages reveals commonalities and divergence in the response to Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis infection*. Tuberculosis (Edinb), 2014. **94**(4): p. 441-50.
250. Sobotta, K., *Biomarker zur Beurteilung der Virulenz von Coxiella burnetii in verschiedenen Wirten*, P.D. Menge, Editor 2016, Friedrich-Schiller-Universität Jena / Medizinische Fakultät; Friedrich-Loeffler Institut, Institut für molekulare Pathogenese.
251. Brink, N., et al., *Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo*. Inflamm Res, 2000. **49**(6): p. 290-6.
252. Giulietti, A., et al., *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*. Methods, 2001. **25**(4): p. 386-401.
253. Body-Malapel, M., et al., *NOD2: a potential target for regulating liver injury*. Lab Invest, 2008. **88**(3): p. 318-27.
254. Glushakova, O., et al., *Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(9): p. 1712-20.
255. Sanzari, J.K., M. Nuth, and A.R. Kennedy, *Induction of cytokine gene expression in human thyroid epithelial cells irradiated with HZE particles (iron ions)*. Radiat Res, 2009. **172**(4): p. 437-43.
256. Hu, S., et al., *Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-beta*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(6): p. 815-21.
257. Naldini, A., et al., *Cutting edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4267-70.
258. Blumer, C., et al., *Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of Escherichia coli*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 10): p. 3287-98.
259. Herold, S., et al., *Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of iha in Shiga-toxigenic Escherichia coli*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 11): p. 3554-63.
260. Zhang, W., et al., *Real-time multiplex PCR for detecting Shiga toxin 2-producing Escherichia coli O104:H4 in human stools*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(5): p. 1752-4.

261. Plattner, H. and H.P. Zingsheim, *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. 1987: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1987. 335 Seiten, 90 Abb., 23 Tab.
262. Knutton, S., et al., *Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic Escherichia coli producing colonization factor antigens III and IV*. Infect Immun, 1989. **57**(11): p. 3364-71.
263. Follmann, W., S. Weber, and S. Birkner, *Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes*. Toxicol In Vitro, 2000. **14**(5): p. 435-45.
264. Werling, D., et al., *Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **62**(3): p. 185-95.
265. Gentry, M.K. and J.M. Dalrymple, *Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin*. J Clin Microbiol, 1980. **12**(3): p. 361-6.
266. Fröhlich, J., *SHIGATOXIN-SPEZIFISCHE IMMUNGLOBULINE UND AUSSCHIEDUNG VON SHIGATOXIN-BILDENDEN ESCHERICHIA COLI BEI KÄLBERN*, 2009, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
267. Cravioto, A., et al., *Adhesive Factor Found in Strains of Escherichia-Coli Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes*. Current Microbiology, 1979. **3**(2): p. 95-99.
268. Levine, M.M., et al., *Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic Escherichia coli*. J Infect Dis, 1988. **158**(1): p. 224-8.
269. Nataro, J.P., et al., *Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells*. Pediatr Infect Dis J, 1987. **6**(9): p. 829-31.
270. Cleary, J., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 3): p. 527-38.
271. Dibb-Fuller, M.P., et al., *Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by Salmonella enteritidis*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 5): p. 1023-31.
272. Sasaki, M., et al., *Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease*. Lab Invest, 2007. **87**(10): p. 1042-54.
273. Reimer, L., *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden.*, ed. e.A. Zweite. 1967, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967. . 598 Seiten, 247 Abbildungen.
274. Robinson, D.G., et al., *Methods of Preparation for Electron Microscopy*. An Introduction for the Biomedical Sciences. 1987: Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1987.
275. Lane, E.B., *Monoclonal antibodies provide specific intramolecular markers for the study of epithelial tonofilament organization*. J Cell Biol, 1982. **92**(3): p. 665-73.
276. Cordell, J.L., et al., *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)*. J Histochem Cytochem, 1984. **32**(2): p. 219-29.
277. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
278. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
279. Ramakers, C., et al., *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. Neurosci Lett, 2003. **339**(1): p. 62-6.
280. Ruijter, J.M., et al., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(6): p. e45.
281. Schmidt, N., et al., *Decreased STEC shedding by cattle following passive and active vaccination based on recombinant Escherichia coli Shiga toxoids*, 2016.

282. Hamm, K., et al., *Experimental Infection of Calves with Escherichia coli O104:H4 outbreak strain*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32812.
283. Roldgaard, B.B., et al., *VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 isolates from Danish cattle*. Int J Med Microbiol, 2004. **294**(4): p. 255-9.
284. Cordeiro, F., et al., *Cell invasion and survival of Shiga toxin-producing Escherichia coli within cultured human intestinal epithelial cells*. Microbiology, 2013. **159**(Pt 8): p. 1683-94.
285. Bernet-Camard, M.F., et al., *Differentiation-associated antimicrobial functions in human colon adenocarcinoma cell lines*. Exp Cell Res, 1996. **226**(1): p. 80-9.
286. Nickerson, C.A., et al., *Three-dimensional tissue assemblies: novel models for the study of Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenesis*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 7106-20.
287. Chopra, D.P., et al., *Intestinal epithelial cells in vitro*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(1): p. 131-42.
288. Henle, G. and F. Deinhardt, *The establishment of strains of human cells in tissue culture*. J Immunol, 1957. **79**(1): p. 54-9.
289. Lenk, M., *Cell Line Passport: FKD-R (intestinal wall, jejunum/ileum, bovien, fetal), Catalogue No.: CCLV-RIE 971, FLI (Friedrich-Loeffler-Institut) and Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), Editors. 2004.*
290. Gartler, S.M., *Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines*. Nature, 1968. **217**(5130): p. 750-1.
291. Sarem, F., L.O. SaremDamerdjii, and J.P. Nicolas, *Comparison of the adherence of three Lactobacillus strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines*. Letters in Applied Microbiology, 1996. **22**(6): p. 439-442.
292. Pinto, M., et al., *Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 in Culture*. Biology of the Cell, 1983. **47**(3): p. 323-330.
293. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **59**(1): p. 221-6.
294. Saaf, A.M., et al., *Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4245-60.
295. Stierum, R., et al., *Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1650**(1-2): p. 73-91.
296. Kauffman, A.L., et al., *Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 79.
297. Mariadason, J.M., et al., *A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4791-804.
298. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. Cell Biol Toxicol, 2005. **21**(1): p. 1-26.
299. Rusu, D., et al., *Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures*. BMC Cell Biol, 2005. **6**: p. 42.
300. Mohr, M., *Nachweis und Reaktivität epithelialer und mesenchymaler Zielzellen für Escherichia coli Shigatoxin in den Kolonkrypten des Rindes*, 2007, Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
301. Azumi, N. and H. Battifora, *The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors*. Am J Clin Pathol, 1987. **88**(3): p. 286-96.
302. Ramirez, C. and A. Gebert, *Vimentin-positive cells in the epithelium of rabbit ileal villi represent cup cells but not M-cells*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(11): p. 1533-44.
303. Hay, E.D. and A. Zuk, *Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(4): p. 678-90.

304. Miller, V.L., *Tissue-culture invasion: fact or artefact?* Trends Microbiol, 1995. **3**(2): p. 69-71.
305. Betanzos, A., et al., *The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells.* Exp Cell Res, 2004. **292**(1): p. 51-66.
306. Gumbiner, B. and K. Simons, *A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide.* J Cell Biol, 1986. **102**(2): p. 457-68.
307. Halbleib, J.M., et al., *Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4261-78.
308. Hoey, D.E., et al., *Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity.* Cell Microbiol, 2003. **5**(2): p. 85-97.
309. Holgersson, J., P.A. Jovall, and M.E. Breimer, *Glycosphingolipids of human large intestine: detailed structural characterization with special reference to blood group compounds and bacterial receptor structures.* J Biochem, 1991. **110**(1): p. 120-31.
310. Hoey, D.E., et al., *Expression of receptors for verotoxin 1 from Escherichia coli O157 on bovine intestinal epithelium.* J Med Microbiol, 2002. **51**(2): p. 143-9.
311. Kovbasnjuk, O., et al., *The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19087-92.
312. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens.* Science, 2004. **304**(5668): p. 242-8.
313. Konar, M. and S. Ghosh, *Enteroaggregative Escherichia coli induced increase in intracellular calcium concentration modulates cytoskeletal F-actin rearrangement and bacterial entry in INT-407 cells.* Microb Pathog, 2012. **52**(5): p. 278-84.
314. Brown, M.R., D.G. Allison, and P. Gilbert, *Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?* J Antimicrob Chemother, 1988. **22**(6): p. 777-80.
315. Travaglione, S., et al., *Epithelial cells and expression of the phagocytic marker CD68: scavenging of apoptotic bodies following Rho activation.* Toxicol In Vitro, 2002. **16**(4): p. 405-11.
316. Pereira, A.C., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells.* Microb Pathog, 2008. **45**(5-6): p. 310-4.
317. Benjamin, P., M. Federman, and C.A. Wanke, *Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative Escherichia coli.* Infect Immun, 1995. **63**(9): p. 3417-21.
318. Abe, C.M., et al., *An enteroaggregative Escherichia coli strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa.* FEMS Microbiol Lett, 2001. **203**(2): p. 199-205.
319. Bourlioux, P., et al., *The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002.* Am J Clin Nutr, 2003. **78**(4): p. 675-83.
320. Natoli, M., et al., *The role of CDX2 in Caco-2 cell differentiation.* Eur J Pharm Biopharm, 2013. **85**(1): p. 20-5.
321. Engle, M.J., G.S. Goetz, and D.H. Alpers, *Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes.* J Cell Physiol, 1998. **174**(3): p. 362-9.
322. Wagner, P.L., D.W. Acheson, and M.K. Waldor, *Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic Escherichia coli.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1934-7.
323. Panja, A., E. Siden, and L. Mayer, *Synthesis and regulation of accessory/proinflammatory cytokines by intestinal epithelial cells.* Clin Exp Immunol, 1995. **100**(2): p. 298-305.

324. Jung, H.C., et al., *A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 55-65.
325. Frick, J.S., et al., *Identification of commensal bacterial strains that modulate Yersinia enterocolitica and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics*. Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3490-7.
326. Liu, C., et al., *Adhesion and immunomodulatory effects of Bifidobacterium lactis HN019 on intestinal epithelial cells INT-407*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(18): p. 2283-90.
327. Parlesak, A., et al., *Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria*. Scand J Immunol, 2004. **60**(5): p. 477-85.
328. Steiner, T.S., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1769-77.
329. Shirota, K., et al., *Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1990. **58**(4): p. 303-8.
330. Jarchum, I., et al., *Critical role for MyD88-mediated neutrophil recruitment during Clostridium difficile colitis*. Infect Immun, 2012. **80**(9): p. 2989-96.
331. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
332. Hauf, N. and T. Chakraborty, *Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing Escherichia coli*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2074-82.
333. Dionne, S., et al., *Modulation of cytokine release from colonic explants by bacterial antigens in inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 108-14.
334. Holub, M., et al., *Cytokines and chemokines as biomarkers of community-acquired bacterial infection*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 190145.
335. Moreira, C.G., et al., *Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(11): p. 3952-61.
336. Muza-Moons, M.M., E.E. Schneeberger, and G.A. Hecht, *Enteropathogenic Escherichia coli infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells*. Cellular Microbiology, 2004. **6**(8): p. 783-793.
337. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
338. Yu, H. and P.J. Sinko, *Influence of the microporous substratum and hydrodynamics on resistances to drug transport in cell culture systems: calculation of intrinsic transport parameters*. J Pharm Sci, 1997. **86**(12): p. 1448-57.
339. Ewert, P., et al., *Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjogren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(5): p. 1280-9.
340. Smythies, L.E., et al., *Human intestinal macrophages display profound inflammatory energy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 66-75.
341. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase in human diseases*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 147-56.
342. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(6): p. 327-43.
343. Kunsch, C. and C.A. Rosen, *NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6137-46.
344. Diehl, S. and M. Rincon, *The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation*. Mol Immunol, 2002. **39**(9): p. 531-6.

345. Watson, D.C., M. Sargianou, and G. Panos, *Interleukin-12 (IL-12)/IL-10 ratio as a marker of disease severity in Crimean-Congo hemorrhagic fever*. Clin Vaccine Immunol, 2012. **19**(5): p. 823-4.
346. McBride, J.W., et al., *Memory and CD8+ are the predominant bovine bronchoalveolar lymphocyte phenotypes*. Vet Immunol Immunopathol, 1997. **58**(1): p. 55-62.
347. Bembridge, G.P., et al., *CD45RO expression on bovine T cells: relation to biological function*. Immunology, 1995. **86**(4): p. 537-44.
348. Siegrist, C.-A., *Vaccine immunology, Section 1: General aspects of vaccination, in Vaccines (5th ed)*, W.A.O. S.A. Plotkin, P.A. Offit (Eds.), Editor. 2008, Saunders Elsevier: New York (2008). p. pp. 17–36.

9 Anhang

9.1 Ergebnisse der statistischen Berechnungen

Tabelle 15: Statistik zur Adhäsionsrate nach Pathotypen (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		HEp-2	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EAEC	EHEC	0,299	0,229	0,456	1,000	0,327
EAEC	EHEC/EAEC	1,000	1,000	0,714	1,000	0,702
EAEC	EPEC	0,418	0,333	0,060	1,000	0,167
EAEC	K12	0,002	0,012	0,024	0,018	0,036
EAEC	Kommensale	0,006	0,012	0,024	0,018	0,095
EAEC	STEC	0,028	0,009	0,388	1,000	0,092
EHEC	EHEC/EAEC	0,582	0,393	0,905	1,000	0,095
EHEC	EPEC	0,109	0,524	0,024	1,000	1,000
EHEC	K12	0,004	0,024	0,024	0,018	0,155
EHEC	Kommensale	0,012	0,024	0,024	0,018	0,548
EHEC	STEC	0,478	0,771	0,955	0,357	0,550
EHEC/EAEC	EPEC	1,000	1,000	0,100	1,000	0,100
EHEC/EAEC	K12	0,029	0,100	0,100	0,100	0,100
EHEC/EAEC	Kommensale	0,400	0,100	0,100	0,100	0,100
EHEC/EAEC	STEC	0,390	0,077	1,000	1,000	0,036
EPEC	K12	0,029	0,100	0,100	0,100	0,200
EPEC	Kommensale	0,029	0,100	0,100	0,100	0,700
EPEC	STEC	0,034	0,145	0,009	1,000	0,727
K12	Kommensale	0,029	0,100	0,100	0,200	0,300
K12	STEC	0,001	0,009	0,027	0,005	0,032
Kommensale	STEC	0,004	0,018	0,223	0,005	0,373

Tabelle 16: Statistik zur Adhäsionsrate nach *E. coli*-Wirtspezies (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Wirte		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		HEp-2	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,000	0,001	0,002	0,001	0,026
Kontrolle	Rind	0,001	0,009	0,027	0,005	0,032
Kontrolle	Schwein	0,029	0,100	0,100	0,200	0,300
Mensch	Rind	0,024	0,010	0,317	1,000	0,371
Mensch	Schwein	0,002	0,001	0,002	0,001	0,123
Rind	Schwein	0,004	0,018	0,223	0,005	0,373

Tabelle 17: Statistik zur Invasion (Gentamicin-Protektions-Test) nach *E. coli*-Wirtspezies (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3h				6 h			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,004	0,750	0,227	0,441	0,008	0,348	0,670	0,672
Kontrolle	Rind	0,036	0,250	0,379	0,537	0,064	0,082	0,469	0,553
Kontrolle	Schwein	0,400	0,400	0,486	0,699	0,200	0,200	0,700	0,421
Mensch	Rind	0,682	0,237	0,243	0,914	0,253	0,047	0,857	0,869
Mensch	Schwein	0,015	0,547	0,831	0,958	0,026	0,898	0,663	0,338
Rind	Schwein	0,064	0,057	0,599	0,871	0,209	0,115	0,811	0,445

Tabelle 18: Statistik zur Invasion (Gentamicin-Protektions-Test) nach Pathotypen (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3h				6 h			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EAEC	EHEC	1,000	0,818	0,026	0,713	0,662	0,937	0,017	0,313
EAEC	EHEC/EAEC	0,714	0,914	0,004	0,632	0,262	0,345	0,024	0,099
EAEC	EIEC	0,381	0,590	0,038	0,494	0,024	0,548	0,052	0,243
EAEC	EPEC	0,024	0,082	0,010	0,180	0,262	0,019	0,024	0,267
EAEC	K12	0,024	0,714	0,352	0,347	0,024	0,905	0,262	0,836
EAEC	Kommensale	0,095	0,964	0,038	0,820	0,024	0,381	0,167	0,308
EAEC	STEC	1,000	0,210	0,005	0,545	0,689	0,007	0,022	0,881
EHEC	EHEC/EAEC	0,714	0,352	0,792	0,335	0,071	0,500	0,250	0,942
EHEC	EIEC	0,286	1,000	0,762	0,180	0,036	0,548	0,421	0,160
EHEC	EPEC	0,262	0,126	0,610	0,019	0,036	0,019	0,571	0,082
EHEC	K12	0,024	0,429	0,352	0,151	0,036	0,714	0,393	0,383
EHEC	Kommensale	0,024	0,548	1,000	0,437	0,036	0,714	0,250	0,817
EHEC	STEC	0,776	0,030	0,682	0,305	0,438	0,013	0,513	0,323
EHEC/EAEC	EIEC	0,200	0,762	0,032	0,589	0,100	0,600	0,250	0,056
EHEC/EAEC	EPEC	0,100	0,190	0,286	0,132	0,700	0,057	1,000	0,056
EHEC/EAEC	K12	0,100	0,229	0,016	0,699	0,100	0,200	0,400	0,222
EHEC/EAEC	Kommensale	0,100	1,000	0,413	0,818	0,100	1,000	0,100	1,000
EHEC/EAEC	STEC	0,727	0,032	1,000	0,923	0,036	0,113	0,371	0,168
EIEC	EPEC	0,100	0,126	0,029	0,558	0,100	0,229	0,393	0,841
EIEC	K12	0,400	1,000	0,686	0,937	0,700	0,700	0,786	0,841
EIEC	Kommensale	0,700	0,595	0,686	0,818	0,700	0,700	1,000	0,151
EIEC	STEC	0,600	0,781	0,599	0,590	0,064	0,533	0,859	0,553
EPEC	K12	0,100	0,250	0,029	0,619	0,100	0,057	0,300	0,421
EPEC	Kommensale	0,100	0,250	0,343	0,394	0,100	0,057	0,200	0,222
EPEC	STEC	0,209	0,046	0,790	0,140	0,009	0,097	0,371	0,119
K12	Kommensale	0,400	0,400	0,486	0,699	0,200	0,200	0,700	0,421
K12	STEC	0,036	0,250	0,379	0,537	0,064	0,082	0,469	0,553
Kommensale	STEC	0,64	0,057	0,599	0,871	0,209	0,115	0,811	0,445

Tabelle 19: Statistik zur Quantifizierung der Adhäsion im Gentamicin-Protektions-Test nach *E coli*-Wirtspezies (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3h				6 h			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,066	0,889	0,016	0,103	0,005	0,128	0,003	0,037
Kontrolle	Rind	0,469	0,945	0,343	0,673	0,145	0,727	0,076	0,349
Kontrolle	Schwein	0,400	0,400	0,629	0,132	0,400	0,700	0,229	0,310
Mensch	Rind	0,201	0,471	0,233	0,033	0,003	0,334	0,020	0,131
Mensch	Schwein	0,354	0,391	0,106	0,573	0,012	0,311	0,052	0,449
Rind	Schwein	1,000	0,633	0,456	0,137	0,600	0,864	0,371	0,933

Tabelle 20: Statistik zur Quantifizierung der Adhäsion im Gentamicin-Protektions-Test nach Pathotypen (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3h				6 h			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EAEC	EHEC	0,093	0,699	0,818	1,000	0,818	0,589	0,818	0,771
EAEC	EHEC/EAEC	0,381	0,762	0,352	0,151	0,714	0,905	0,381	0,099
EAEC	EIEC	0,905	0,352	0,537	0,003	0,286	0,095	0,052	0,075
EAEC	EPEC	0,714	0,177	0,610	0,000	0,714	0,114	0,262	0,001
EAEC	K12	0,167	0,714	0,038	0,003	0,024	0,714	0,010	0,003
EAEC	Kommensale	0,905	1,000	0,167	0,125	0,048	0,905	0,048	0,129
EAEC	STEC	0,635	0,820	0,350	0,001	0,026	0,955	0,031	0,023
EHEC	EHEC/EAEC	1,000	0,352	0,352	0,125	1,000	0,381	1,000	0,328
EHEC	EIEC	0,167	0,352	0,792	0,018	0,429	0,714	0,126	0,279
EHEC	EPEC	0,548	0,082	1,000	0,000	1,000	0,476	1,000	0,001
EHEC	K12	0,095	1,000	0,257	0,010	0,048	0,262	0,010	0,027
EHEC	Kommensale	0,167	0,381	0,381	0,250	0,095	0,381	0,095	0,383
EHEC	STEC	0,147	0,892	0,660	0,007	0,066	0,607	0,147	0,152
EHEC/EAEC	EIEC	0,400	0,343	0,190	0,015	0,200	0,200	0,036	0,032
EHEC/EAEC	EPEC	1,000	0,063	0,343	0,002	1,000	0,114	1,000	0,008
EHEC/EAEC	K12	0,200	0,629	0,057	0,009	0,100	0,700	0,057	0,008
EHEC/EAEC	Kommensale	0,400	0,857	0,114	0,015	0,100	1,000	0,100	0,016
EHEC/EAEC	STEC	0,371	0,599	0,138	0,000	0,018	0,864	0,014	0,008
EIEC	EPEC	0,700	0,905	1,000	0,009	0,200	1,000	0,036	0,095
EIEC	K12	0,400	0,629	0,063	0,818	0,400	0,100	0,413	0,548
EIEC	Kommensale	1,000	0,400	0,250	0,240	0,400	0,200	1,000	0,841
EIEC	STEC	0,811	0,212	0,743	0,974	0,909	0,145	0,768	0,933
EPEC	K12	0,400	0,250	0,114	0,002	0,100	0,057	0,057	0,222
EPEC	Kommensale	0,700	0,071	0,400	0,002	0,100	0,114	0,100	0,016
EPEC	STEC	0,573	0,064	0,571	0,000	0,018	0,148	0,014	0,042
K12	Kommensale	0,400	0,400	0,629	0,132	0,400	0,700	0,229	0,310
K12	STEC	0,469	0,945	0,343	0,673	0,145	0,727	0,076	0,349
Kommensale	STEC	1,000	0,633	0,456	0,137	0,600	0,864	0,371	0,933

Tabelle 21: Statistik zur wirtsinduzierten Virulenzgenexpression (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Stämmen		untersuchtes Virulenzgen	Exakte Signifikanz (2-seitig)			
			INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EDL933	LB226692	<i>stx2</i>	0,400	0,400	0,200	0,700
EDL933	12E0114	<i>stx1</i>	0,700	1,000	0,200	0,100
EDL933	LB226692	<i>iha</i>	0,400	0,700	0,100	0,100
EDL933	55989	<i>iha</i>	0,400	0,100	1,000	0,200
EDL933	12E0114	<i>iha</i>	0,700	0,100	0,100	0,400
LB226692	55989	<i>iha</i>	1,000	0,200	0,100	0,100
LB226692	12E0114	<i>iha</i>	0,400	0,200	0,100	0,200
55989	12E0114	<i>iha</i>	0,200	0,100	0,100	0,100
LB226692	55989	<i>aggR</i>	0,400	0,100	0,100	0,100
LB226692	55989	<i>pic</i>	1,000	0,400	1,000	0,100

Tabelle 22: Statistik zur absoluten Stx-Freisetzung nach *E. coli*-Stämmen (ELISA, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Stämmen		HEp-2	Exakte Signifikanz (2-seitig)			
			INT 407	FKD-R 971	CaCo-2	PC
12E0111	12E0114	0,029	0,008	0,002	0,008	0,167
12E0111	2403	0,029	0,008	0,002	0,008	0,008
12E0111	86-24	0,029	0,008	0,002	0,048	0,167
12E0111	C600	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
12E0111	EDL933	0,016	0,008	0,002	0,008	0,008
12E0111	LB226692	1,000	0,167	0,002	1,000	1,000
12E0114	2403	0,229	0,421	0,151	0,690	0,087
12E0114	86-24	0,057	0,008	0,004	0,310	0,825
12E0114	C600	0,018	0,008	0,002	0,008	0,167
12E0114	EDL933	0,143	0,151	0,329	0,222	0,087
12E0114	LB226692	0,029	0,008	0,008	0,008	0,405
2403	86-24	0,029	0,008	0,009	0,222	0,032
2403	C600	0,008	0,008	0,002	0,008	0,008
2403	EDL933	0,730	0,841	0,329	0,024	0,643
2403	LB226692	0,029	0,008	0,008	0,008	0,024
86-24	C600	0,008	0,008	0,002	0,048	0,167
86-24	EDL933	0,016	0,008	0,002	0,008	0,016
86-24	LB226692	0,029	0,143	0,177	0,048	0,524
C600	EDL933	0,008	0,008	0,002	0,008	0,008
C600	LB226692	1,000	0,167	0,002	1,000	1,000
EDL933	LB226692	0,016	0,008	0,004	0,008	0,032

Tabelle 23: Statistik zur absoluten Stx-Freisetzung nach Pathotypen (ELISA, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		HEp-2	Exakte Signifikanz (2-seitig)			
			INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EHEC	EHEC/EAEC	0,003	0,012	0,003	0,014	0,108
EHEC	STEC	0,810	0,764	0,123	0,756	0,441
EHEC/EAEC	STEC	0,078	0,134	0,027	0,427	0,264
EHEC	K12	0,001	0,001	0,003	0,000	0,012
EHEC/EAEC	K12	1,000	0,167	1,000	0,002	1,000
K12	STEC	0,048	0,027	0,027	0,021	0,085

Tabelle 24: Statistik zur absoluten Stx-Freisetzung nach *E. coli*-Wirtspezies (ELISA, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Wirten		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		HEp-2	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,025	0,003	0,000	0,050	0,048
Kontrolle	Rind	0,048	0,027	0,021	0,027	0,085
Mensch	Rind	0,313	0,342	0,922	0,909	0,957

Tabelle 25: Statistik zur quantitativen Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx nach *E. coli*-Stämmen (Vero-ZT, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Stämmen		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		HEp-2	INT 407	FKD-R 971	CaCo-2	PC
12E0111	12E0114	0,057	0,008	0,008	0,016	0,032
12E0111	2403	0,029	0,008	0,008	0,008	0,008
12E0111	86-24	0,229	0,841	0,686	0,532	0,659
12E0111	C600	0,029	0,008	0,008	0,167	0,048
12E0111	EDL933	0,029	0,008	0,002	0,016	0,008
12E0111	LB226692	0,343	0,095	0,587	0,892	0,802
12E0114	2403	0,057	0,008	0,151	0,032	0,222
12E0114	86-24	0,057	0,008	0,004	0,016	0,008
12E0114	C600	0,029	0,008	0,008	0,008	0,008
12E0114	EDL933	0,057	0,008	0,019	0,310	0,841
12E0114	LB226692	0,057	0,008	0,008	0,004	0,032
2403	86-24	0,029	0,008	0,004	0,016	0,008
2403	C600	0,029	0,008	0,008	0,008	0,008
2403	EDL933	0,686	0,222	0,045	0,548	0,056
2403	LB226692	0,029	0,008	0,008	0,004	0,008
86-24	C600	0,029	0,008	0,004	0,048	0,008
86-24	EDL933	0,029	0,008	0,001	0,016	0,008
86-24	LB226692	0,886	0,056	0,690	0,771	0,540
C600	EDL933	0,029	0,008	0,002	0,008	0,008
C600	LB226692	0,029	0,008	0,008	0,061	0,008
EDL933	LB226692	0,029	0,008	0,002	0,004	0,008

Tabelle 26: Statistik zur quantitativen Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx nach Pathotypen (Vero-ZT, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		HEp2	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EHEC	EHEC/EAEC	0,283	0,768	0,111	0,047	0,308
EHEC	K12	0,004	0,001	0,000	0,005	0,001
EHEC	STEC	0,455	0,103	0,103	0,849	0,159
EHEC/EAEC	K12	0,029	0,008	0,008	0,061	0,008
EHEC/EAEC	STEC	0,226	0,168	0,054	0,022	0,065
K12	STEC	0,001	0,000	0,000	0,003	0,001

Tabelle 27: Statistik zur quantitativen Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx nach *E. coli*-Wirtspezies (Vero-ZT, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Wirten		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		HEp2	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,001	0,000	0,006	0,000	0,000
Kontrolle	Rind	0,001	0,000	0,003	0,000	0,001
Mensch	Rind	0,241	0,056	0,182	0,039	0,050

Tabelle 28: Statistik zur Zellvitalität im Adhäsionsversuch nach *E. coli*-Stämmen (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Stämmen		Exakte Signifikanz (2-seitig)			
		INT 407	FKD-R 971	CaCo-2	PC
123	12E0111	0,100	1,000	0,100	0,400
123	12E0114	0,100	1,000	0,100	0,100
123	17-2	0,100	1,000	0,200	0,100
123	2403	0,100	1,000	0,400	1,000
123	55989	0,600	1,000	1,000	0,300
123	86-24	0,100	1,000	0,100	0,300
123	C600	1,000	1,000	1,000	1,000
123	E2348/69	0,100	1,000	0,100	0,100
123	EDL933	0,600	1,000	0,300	0,200
123	LB226692	0,600	1,000	0,400	0,300
12E0111	12E0114	0,400	1,000	0,700	0,300
12E0111	17-2	0,400	1,000	0,300	0,100
12E0111	2403	0,400	1,000	0,500	0,700
12E0111	55989	1,000	1,000	0,200	0,900
12E0111	86-24	1,000	1,000	0,700	0,900
12E0111	C600	0,100	1,000	0,100	0,700
12E0111	E2348/69	0,100	1,000	0,100	1,000
12E0111	EDL933	0,400	1,000	0,200	1,000
12E0111	LB226692	1,000	1,000	0,800	1,000
12E0114	17-2	1,000	1,000	0,200	0,100
12E0114	2403	1,000	1,000	1,000	0,200
12E0114	55989	0,700	1,000	0,100	0,300
12E0114	86-24	1,000	1,000	1,000	0,200
12E0114	C600	0,100	1,000	0,100	0,200
12E0114	E2348/69	0,100	1,000	0,100	0,400
12E0114	EDL933	0,300	1,000	0,300	0,400
12E0114	LB226692	0,700	1,000	1,000	0,300
17-2	2403	0,800	1,000	0,200	0,100
17-2	55989	0,500	1,000	0,333	0,100
17-2	86-24	0,700	0,400	0,200	0,100
17-2	C600	0,100	1,000	0,100	0,100
17-2	E2348/69	0,200	1,000	0,400	0,100
17-2	EDL933	0,300	1,000	0,200	0,100
17-2	LB226692	0,500	1,000	0,300	0,100
2403	55989	1,000	1,000	0,500	0,600
2403	86-24	1,000	0,400	1,000	0,600
2403	C600	0,200	1,000	0,400	1,000
2403	E2348/69	0,200	1,000	0,100	0,400
2403	EDL933	0,667	1,000	0,900	0,400
2403	LB226692	1,000	1,000	1,000	0,300
55989	86-24	1,000	1,000	0,100	1,000
55989	C600	0,300	1,000	0,400	0,600
55989	E2348/69	0,200	1,000	0,100	0,400
55989	EDL933	1,000	1,000	0,600	1,000
55989	LB226692	1,000	1,000	0,500	1,000
86-24	C600	0,100	1,000	0,100	0,600
86-24	E2348/69	0,100	1,000	0,100	0,400
86-24	EDL933	0,600	1,000	0,300	0,400
86-24	LB226692	1,000	0,400	1,000	0,700
C600	E2348/69	0,100	1,000	0,100	0,400
C600	EDL933	0,300	1,000	0,100	0,400
C600	LB226692	0,300	1,000	0,400	0,300
E2348/69	EDL933	0,200	1,000	0,100	1,000
E2348/69	LB226692	0,200	1,000	0,100	1,000
EDL933	LB226692	1,000	1,000	0,900	1,000

Tabelle 29: Statistik zur Zellvitalität im Adhäsionsversuch nach Pathotypen (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EAEC	EHEC	0,429	0,545	0,929	0,238
EAEC	EHEC/EAEC	0,762	1,000	0,771	0,381
EAEC	EPEC	0,071	0,750	0,143	0,411
EAEC	K12	0,054	1,000	0,143	0,071
EAEC	Kommensale	0,071	1,000	0,286	0,054
EAEC	STEC	0,662	1,000	0,913	0,126
EHEC	EHEC/EAEC	1,000	0,464	1,000	1,000
EHEC	EPEC	0,018	1,000	0,012	0,464
EHEC	K12	0,036	1,000	0,012	0,214
EHEC	Kommensale	0,107	0,524	0,071	0,071
EHEC	STEC	0,391	0,580	0,269	0,741
EHEC/EAEC	EPEC	0,200	1,000	0,100	1,000
EHEC/EAEC	K12	0,300	1,000	0,400	0,300
EHEC/EAEC	Kommensale	0,600	1,000	0,400	0,300
EHEC/EAEC	STEC	1,000	1,000	0,836	0,945
EPEC	K12	0,100	1,000	0,100	0,400
EPEC	Kommensale	0,100	1,000	0,100	0,100
EPEC	STEC	0,006	0,673	0,005	1,000
K12	Kommensale	1,000	1,000	1,000	1,000
K12	STEC	0,012	1,000	0,032	0,364
Kommensale	STEC	0,012	1,000	0,032	0,177

Tabelle 30: Statistik zur Zellvitalität im Adhäsionsversuch nach Wirtspezies (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Wirten		Exakte Signifikanz (2-seitig)			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,007	1,000	0,014	0,069
Kontrolle	Rind	0,012	1,000	0,032	0,364
Kontrolle	Schwein	1,000	1,000	1,000	1,000
Mensch	Rind	0,586	0,876	0,858	0,584
Mensch	Schwein	0,017	1,000	0,045	0,011
Rind	Schwein	0,012	1,000	0,032	0,177

Tabelle 31: Statistik zur Quantifizierung der Adhäsion und Invasion im Gentamicin-Protektions-Test (Wilcoxon-Test)

3 h und 6 h	Exakte Signifikanz (2-seitig)																								
	INT 407						CaCo-2						FKD-R 971						PC						
	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge
Zellassoziierte <i>E. coli</i>	20	270,53	0,890	Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	160,76	0,442	Negativ Ränge	Positiv Ränge	0	0,00	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	43	220,00	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	11	170,82	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge
Invasive <i>E. coli</i>	27	21,39		Negativ Ränge	Positiv Ränge	19	240,63		Negativ Ränge	Positiv Ränge	1	20,00	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	35	180,97		Negativ Ränge	Positiv Ränge	16	20,88	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge
Adhärente <i>E. coli</i>	2	60,00	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	1	120,00	0,550	Negativ Ränge	Positiv Ränge	2	30,50	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	2	30,50	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	10	150,10	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge
	21	120,57		Negativ Ränge	Positiv Ränge	38	20,21		Negativ Ränge	Positiv Ränge	34	190,38		Negativ Ränge	Positiv Ränge	46	350,20		Negativ Ränge	Positiv Ränge	52	340,65		Negativ Ränge	Positiv Ränge
	11	150,27	0,895	Negativ Ränge	Positiv Ränge	20	140,70		Negativ Ränge	Positiv Ränge	16	230,25		Negativ Ränge	Positiv Ränge				Negativ Ränge	Positiv Ränge				Negativ Ränge	Positiv Ränge
	14	11,21		Negativ Ränge	Positiv Ränge				Negativ Ränge	Positiv Ränge				Negativ Ränge	Positiv Ränge				Negativ Ränge	Positiv Ränge				Negativ Ränge	Positiv Ränge

Tabelle 32: Statistik zum Zelluntergang bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay (Wilcoxon-Test)

3 h und 6 h	Exakte Signifikanz (2-seitig)																								
	INT 407						CaCo-2						FKD-R 971						PC						
	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge	n	Mittlerer Rang	p-Value	Negativ Ränge	Positiv Ränge
LDH (x-fach C600)	20	190,35	0,427	Negativ Ränge	Positiv Ränge	22	270,05	0,530	Negativ Ränge	Positiv Ränge	4	30,25	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	38	230,42	0,000	Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	170,19	0,263	Negativ Ränge	Positiv Ränge
	22	230,45		Negativ Ränge	Positiv Ränge	29	250,21		Negativ Ränge	Positiv Ränge	19	180,84	0,664	Negativ Ränge	Positiv Ränge	20	21,10	0,664	Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	250,81	0,503	Negativ Ränge	Positiv Ränge
LDH (% Poko)	18	170,94	0,357	Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	230,38	0,325	Negativ Ränge	Positiv Ränge	20	21,10		Negativ Ränge	Positiv Ränge	18	180,94		Negativ Ränge	Positiv Ränge	18	180,94		Negativ Ränge	Positiv Ränge
	21	21,76		Negativ Ränge	Positiv Ränge	27	250,37		Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	21,76		Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	20,90		Negativ Ränge	Positiv Ränge	21	20,90		Negativ Ränge	Positiv Ränge

Tabelle 33: Statistik zum Zelluntergang, bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay nach Serotypen (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Serotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3 h				6 h			
		INT 407	CaCo- 2	FKD- R 971	PC	INT 407	CaCo- 2	FKD- R 971	PC
O104:H4	O127:H6	0,381	0,461	0,381	0,095	0,366	0,573	0,914	0,171
O104:H4	O143:H _{nd}	0,714	1,000	1,000	0,381	0,548	0,133	1,000	0,905
O104:H4	O156:H25	0,548	0,461	0,714	0,381	0,905	0,630	0,548	0,905
O104:H4	O157:H7	0,008	0,851	0,607	0,864	1,000	0,904	0,864	0,776
O104:H4	O3:H2	0,905	0,808	0,381	0,262	0,095	0,016	1,000	0,548
O104:H4	O43:H28	0,714	0,461	0,381	0,714	0,262	0,368	0,905	0,905
O104:H4	O _{rough} :H-	0,548	0,933	0,262	0,167	0,167	0,776	1,000	1,000
O127:H6	O143:H _{nd}	0,700	0,486	0,200	0,200	1,000	0,364	0,067	0,833
O127:H6	O156:H25	0,700	0,686	0,400	0,200	0,383	0,937	0,667	0,667
O127:H6	O157:H7	0,600	0,521	0,727	0,100	0,536	0,426	0,042	0,408
O127:H6	O3:H2	0,700	0,486	0,200	0,100	833	1,000	0,267	0,833
O127:H6	O43:H28	0,700	1,000	1,000	0,100	0,383	0,454	0,183	0,833
O127:H6	O _{rough} :H-	0,400	0,486	1,000	0,400	0,183	0,469	0,117	1,000
O143:H _{nd}	O156:H25	1,000	0,343	1,000	0,400	0,700	0,400	0,200	1,000
O143:H _{nd}	O157:H7	0,064	0,862	0,482	0,300	0,864	0,923	0,727	0,864
O143:H _{nd}	O3:H2	1,000	0,886	0,700	0,200	1,000	0,533	1,000	0,200
O143:H _{nd}	O43:H28	1,000	0,486	0,200	0,200	0,700	1,000	0,700	1,000
O143:H _{nd}	O _{rough} :H-	0,700	0,686	0,400	0,400	0,400	0,800	0,700	1,000
O156:H25	O157:H7	0,145	0,379	0,282	0,373	0,755	0,456	0,100	0,864
O156:H25	O3:H2	0,700	0,343	0,700	0,700	0,100	0,629	0,200	0,700
O156:H25	O43:H28	1,000	0,686	0,200	0,700	0,100	0,229	0,200	1,000
O156:H25	O _{rough} :H-	0,700	0,886	0,200	0,200	0,100	0,700	0,200	1,000
O157:H7	O3:H2	0,145	0,684	0,209	0,282	0,209	0,226	1,000	0,036
O157:H7	O43:H28	0,100	0,379	0,482	0,727	0,600	0,138	1,000	0,864
O157:H7	O _{rough} :H-	1,000	0,953	0,282	0,145	0,282	0,769	1,000	1,000
O3:H2	O43:H28	1,000	0,343	0,200	0,700	0,100	0,114	1,000	0,100
O3:H2	O _{rough} :H-	0,700	0,886	0,200	0,200	0,100	1,000	1,000	0,200
O43:H28	O _{rough} :H-	0,700	0,343	1,000	0,100	0,700	0,629	1,000	0,700
O104:H4	Triton X-100	0,024	0,004	0,024	0,024	0,048	0,004	0,024	0,024
O127:H6	Triton X-100	0,100	0,029	0,100	0,100	0,100	0,029	0,100	0,100
O143:H _{nd}	Triton X-100	0,100	0,029	0,100	0,100	0,700	0,133	0,100	0,100
O156:H25	Triton X-100	0,100	0,029	0,100	0,100	0,100	0,057	0,100	0,100
O157:H7	Triton X-100	0,009	0,001	0,009	0,009	0,100	0,001	0,009	0,009
O3:H2	Triton X-100	0,100	0,029	0,100	0,100	0,400	0,029	0,100	0,100
O43:H28	Triton X-100	0,100	0,029	0,100	0,100	0,100	0,029	0,100	0,100
O _{rough} :H-	Triton X-100	0,100	0,029	0,100	0,100	0,100	0,057	0,100	0,100

Tabelle 34: Statistik zum Zelluntergang, bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay nach *E. coli*-Wirtspezies (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> -Wirtsursprung		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3 h				6 h			
		INT 407	CaCo- 2	FKD- R 971	PC	INT 407	CaCo- 2	FKD- R 971	PC
Kontrolle	Mensch	0,018	0,039	0,754	0,254	0,001	0,100	0,000	0,000
Kontrolle	Rind	0,058	0,201	0,507	0,277	0,003	0,050	0,000	0,005
Kontrolle	Schwein	0,321	0,872	0,736	0,237	0,012	0,821	0,206	0,085
Mensch	Rind	0,422	0,850	0,449	0,498	0,199	0,816	0,765	0,298
Mensch	Schwein	0,742	0,361	0,172	0,613	0,219	0,248	0,673	0,433
Rind	Schwein	0,373	0,316	0,600	0,864	0,455	0,148	0,727	1,000

Tabelle 35: Statistik zum Zelluntergang, bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay nach Pathotypen (Mann-Whitney-U-Test)

<i>E. coli</i> Pathotypen		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		3 h				6 h			
		INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC	INT 407	CaCo-2	FKD-R 971	PC
EAEC	EHEC	0,026	0,798	0,065	0,310	0,699	0,422	0,818	0,589
EAEC	EHEC/EAEC	0,714	0,808	0,024	0,381	0,714	0,386	0,048	0,714
EAEC	EIEC	0,714	1,000	0,381	0,262	0,714	0,400	0,905	0,714
EAEC	EPEC	0,381	0,368	0,095	0,048	0,628	0,829	0,035	0,945
EAEC	K12	0,024	0,194	0,024	0,155	0,012	0,114	0,012	0,005
EAEC	Kommensale	0,714	0,283	0,095	0,548	0,262	0,214	0,905	0,381
EAEC	STEC	0,088	0,624	0,181	0,529	0,372	1,000	0,093	0,456
EHEC	EHEC/EAEC	0,262	0,933	0,548	0,548	0,548	0,808	0,167	0,262
EHEC	EIEC	0,095	0,933	0,548	0,762	0,714	1,000	0,905	0,714
EHEC	EPEC	0,714	0,683	0,548	0,262	0,445	0,408	0,051	0,628
EHEC	K12	0,024	0,547	0,155	1,000	0,029	0,811	0,079	0,012
EHEC	Kommensale	0,167	0,461	0,262	0,714	0,714	0,214	1,000	0,714
EHEC	STEC	0,864	1,000	0,689	0,529	0,932	0,370	0,328	0,689
EHEC/EAEC	EIEC	1,000	0,886	0,400	0,400	1,000	0,800	0,200	0,200
EHEC/EAEC	EPEC	0,700	0,686	1,000	0,200	0,833	0,374	0,667	0,833
EHEC/EAEC	K12	0,100	1,000	0,700	0,700	0,012	0,433	0,012	0,012
EHEC/EAEC	Kommensale	1,000	0,686	1,000	1,000	0,100	0,686	0,400	0,100
EHEC/EAEC	STEC	0,373	0,770	1,000	1,000	0,086	0,604	0,282	0,100
EIEC	EPEC	0,700	0,486	0,200	0,200	1,000	0,364	0,067	0,833
EIEC	K12	0,100	0,314	0,100	0,700	0,206	0,227	0,206	0,085
EIEC	Kommensale	1,000	0,486	0,200	0,200	0,700	1,000	0,700	1,000
EIEC	STEC	0,373	0,599	0,600	0,482	0,582	0,727	0,282	1,000
EPEC	K12	0,100	0,314	0,700	0,700	0,014	0,084	0,001	0,029
EPEC	Kommensale	0,700	1,000	1,000	0,100	0,383	0,454	0,183	0,833
EPEC	STEC	0,373	0,379	0,864	0,064	0,241	0,549	0,114	0,470
K12	Kommensale	0,100	0,314	0,700	0,100	0,012	0,821	0,206	0,085
K12	STEC	0,009	1,000	0,859	0,486	0,003	0,050	0,000	0,005
Kommensale	STEC	0,373	0,316	0,600	0,864	0,455	0,148	0,727	1,000

Tabelle 36: Statistik zum Einfluss der experimentellen Infektion mit dem Hybridstamm auf das Immunsystem des Rindes für CD4⁺ und CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen (T_M) (Kruskal-Wallis-Test, post hoc Dunn's Test)

Tiergruppe		Exakte Signifikanz (2-seitig)							
		CD4 ⁺ T _M				CD8 α ⁺ T _M			
		ConA	GZL1	GZL2	GZL3	ConA	GZL1	GZL2	GZL3
Gruppe 1	Gruppe 2	0,156	1,000	1,000	0,599	0,326	1,000	1,000	1,000
Gruppe 1	Gruppe 3	0,679	1,000	1,000	0,771	1,000	0,246	0,124	0,103
Gruppe 2	Gruppe 3	1,000	1,000	1,000	1,000	0,494	0,351	0,042	0,510

Tabelle 37: Statistik zum Einfluss der experimentellen Infektion mit dem Hybridstamm auf das Immunsystem des Rindes für CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen (T_M) bei Stimulation mit GZL 2 (86-24) nach Tagen (Mann-Whitney-U-Test)

Tiergruppe		Exakte Signifikanz (2-seitig)				
		Aktivierung der CD8 α ⁺ T _M -Zellen stimuliert mit GZL 2 (86-24)				
		d0	d7	d14	d21	d28
Gruppe 1	Gruppe 2	0,841	n.a.	0,841	0,421	0,016
Gruppe 1	Gruppe 3	0,310	0,841	0,421	1,000	0,016
Gruppe 2	Gruppe 3	0,032	n.a.	0,222	0,548	0,032

Tabelle 38: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokine der FKD-R 971, 3 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	FKD-R 971 3 h										
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1
C600 LB226692	0,621	0,509	0,454	0,173	0,607	0,177	0,048	0,430	0,496	0,996	0,903
C600 55989	0,220	0,444	0,232	0,613	0,460	0,308	0,296	0,693	0,361	0,805	0,547
C600 17-2	0,012	0,979	0,484	0,818	0,438	0,241	0,379	0,985	0,215	0,242	0,987
C600 EDL933	0,001	0,014	0,040	0,324	0,108	0,350	0,024	0,016	0,065	0,057	0,359
C600 86-24	0,015	0,056	0,112	0,694	0,117	0,084	0,199	0,157	0,128	0,264	0,605
C600 12E0114	0,583	0,691	0,604	0,956	0,673	0,244	0,232	0,642	0,527	0,960	0,685
C600 2403	0,868	0,526	0,839	0,966	0,968	0,667	0,386	0,711	0,464	0,502	0,740
C600 12E0111	0,046	0,219	0,714	0,521	0,325	0,326	0,873	0,260	0,431	0,582	0,754
C600 E2348/69	0,002	0,002	0,392	0,002	0,206	0,725	0,445	0,002	0,012	0,496	0,112
C600 123	0,842	0,371	0,246	0,373	0,929	0,130	0,105	0,691	0,574	0,729	0,653
C600 Medium	0,006	0,001	0,818	0,029	0,060	0,110	0,438	0,001	0,001	0,010	0,003
C600 LPS	0,501	0,005	0,578	0,998	0,951	0,162	0,500	0,010	0,077	0,578	0,633
C600 TotLB226692	0,620	0,041	0,384	0,757	0,979	0,175	0,120	0,062	0,263	0,296	0,543

Tabelle 39: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokine der FKD-R 971, 6 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	FKD-R 971 6 h										
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1
C600 LB226692	0,752	0,001	0,126	0,043	0,886	0,041	0,001	0,068	0,742	0,591	0,835
C600 55989	0,877	0,004	0,232	0,398	0,646	0,450	0,014	0,083	0,154	0,665	0,417
C600 17-2	0,045	0,002	0,554	0,705	0,002	0,294	0,006	0,001	0,142	0,471	0,412
C600 EDL933	0,001	0,483	0,022	0,015	0,002	0,068	0,002	0,014	0,002	0,032	0,001
C600 86-24	0,051	0,362	0,055	0,161	0,302	0,697	0,003	0,359	0,033	0,596	0,377
C600 12E0114	0,157	0,132	0,444	0,683	0,661	0,341	0,173	0,281	0,066	0,554	0,272
C600 2403	0,428	0,921	0,117	0,985	0,441	0,441	0,826	0,834	0,399	0,503	0,113
C600 12E0111	0,005	0,001	0,888	0,491	0,002	0,864	0,826	0,021	0,031	0,411	0,109
C600 E2348/69	0,002	0,001	0,073	0,012	0,006	0,009	0,001	0,002	0,001	0,057	0,001
C600 123	0,645	0,587	0,070	0,390	0,408	0,247	0,687	0,687	0,288	0,950	0,726
C600 Medium	0,002	0,001	0,033	0,577	0,048	0,033	0,815	0,001	0,001	0,001	0,003
C600 LPS	0,064	0,001	0,207	0,618	0,171	0,008	0,466	0,074	0,002	0,284	0,985
C600 TotLB226692	0,260	0,094	0,032	0,927	0,010	0,001	0,001	0,108	0,006	0,139	0,299

Tabelle 40: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der PC, 3 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	Kolonkryptenzellen 3 h										
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1
C600	0,012	0,469	0,051	0,080	0,014	0,001	0,001	0,616	0,389	0,941	0,294
C600	0,002	0,010	0,056	0,056	0,002	0,001	0,087	0,693	0,454	0,430	0,546
C600	0,001	0,211	0,167	0,354	0,614	0,092	0,191	0,751	0,097	0,173	0,306
C600	EDL933	0,000	0,479	0,888	0,779	0,746	0,777	0,249	0,563	0,814	0,689
C600	86-24	0,410	0,447	0,823	0,823	0,669	0,697	0,300	0,961	0,298	0,832
C600	12E0114	0,056	0,384	0,098	0,329	0,189	0,202	0,094	0,009	0,135	0,068
C600	2403	0,001	0,183	0,056	0,067	0,001	0,002	0,027	0,181	0,117	0,092
C600	12E0111	0,014	0,236	0,120	0,242	0,557	0,100	0,256	0,440	0,174	0,782
C600	E2348/69	0,746	0,631	0,745	0,621	0,409	0,538	0,838	0,774	0,545	0,986
C600	123	0,751	0,753	0,696	0,791	0,107	0,819	0,395	0,927	0,981	0,428
C600	Medium	0,001	0,001	0,122	0,192	0,002	0,421	0,256	0,023	0,230	0,003
C600	LPS	0,534	0,278	0,885	0,799	0,843	0,897	0,736	0,569	0,669	0,185
C600	TotLB226692	0,821	0,768	0,603	0,641	0,153	0,587	0,659	0,535	0,407	0,711

Tabelle 41: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der PC, 6 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	Kolonkryptenzellen 6 h										
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1
C600	0,031	0,030	0,020	0,623	0,070	0,861	0,001	0,485	0,413	0,030	0,034
C600	0,031	0,775	0,006	0,167	0,645	0,394	0,001	0,072	0,440	0,014	0,432
C600	17-2	0,002	0,547	0,002	0,944	0,558	0,003	0,137	0,776	0,001	0,987
C600	EDL933	0,003	0,351	0,070	0,557	0,371	0,010	0,677	0,985	0,006	0,162
C600	86-24	0,008	0,941	0,985	0,632	0,852	0,335	0,034	0,675	0,978	0,002
C600	12E0114	0,475	0,260	0,002	0,791	0,700	0,240	0,454	0,871	0,033	0,576
C600	2403	0,026	0,646	0,146	0,674	0,018	0,029	0,049	0,843	0,425	0,497
C600	12E0111	0,017	0,145	0,010	0,995	0,191	0,165	0,056	0,225	0,019	0,049
C600	E2348/69	0,098	0,025	0,461	0,882	0,148	0,074	0,018	0,022	0,035	0,002
C600	123	0,458	0,388	0,872	0,728	0,849	0,979	0,059	0,177	0,494	0,479
C600	Medium	0,001	0,001	0,875	0,248	0,004	0,317	0,001	0,125	0,168	0,001
C600	LPS	0,449	0,017	0,418	0,814	0,256	0,042	0,733	0,946	0,468	0,731
C600	TotLB226692	0,139	0,324	0,910	0,555	0,139	0,004	0,076	0,152	0,588	0,159

Tabelle 42: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der INT 407, 3 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	INT 407 3 h										MCP-1
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	
C600 LB226692	0,768	0,473	0,475	0,857	0,064	0,186	0,527	0,191	0,082	0,993	0,233
C600 55989	0,778	0,417	0,565	0,679	0,037	0,572	0,524	0,143	0,022	0,911	0,206
C600 17-2	0,184	0,932	0,466	0,975	0,212	0,236	0,496	0,857	0,908	0,522	0,036
C600 EDL933	0,843	0,629	0,009	0,786	0,010	0,394	0,262	0,663	0,080	0,813	0,426
C600 86-24	0,648	0,676	0,193	0,815	0,017	0,151	0,755	0,241	0,046	0,683	0,072
C600 12E0114	0,919	0,813	0,118	0,792	0,929	0,452	0,557	0,482	0,196	0,648	0,364
C600 2403	0,670	0,535	0,337	0,840	0,058	0,004	0,533	0,014	0,010	0,733	0,605
C600 12E0111	0,071	0,725	0,129	0,755	0,228	0,415	0,749	0,574	0,491	0,818	0,063
C600 E2348/69	0,051	0,381	0,440	0,727	0,001	0,500	0,781	0,016	0,001	0,804	0,001
C600 123	0,268	0,393	0,273	0,811	0,003	0,596	0,690	0,116	0,008	0,945	0,083
C600 Medium	0,027	0,515	0,117	0,327	0,001	0,517	0,550	0,401	0,001	0,749	0,050
C600 LPS	0,032	0,182	0,393	0,837	0,001	0,748	0,815	0,016	0,001	0,824	0,007
C600 TotLB226692	0,380	0,424	0,085	0,750	0,001	0,518	0,329	0,092	0,001	0,957	0,001

Tabelle 43: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der INT 407, 6 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	INT 407 6 h										MCP-1
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	
C600 LB226692	0,075	0,584	0,252	0,235	0,022	0,149	0,487	0,294	0,001	0,148	0,750
C600 55989	0,001	0,088	0,343	0,225	0,181	0,174	0,794	0,296	0,001	0,107	0,080
C600 17-2	0,001	0,108	0,262	0,896	0,001	0,531	0,423	0,013	0,001	0,772	0,001
C600 EDL933	0,001	0,873	0,486	0,295	0,921	0,189	0,396	0,039	0,001	0,052	0,268
C600 86-24	0,425	0,745	0,729	0,476	0,233	0,489	0,658	0,111	0,001	0,035	0,042
C600 12E0114	0,001	0,120	0,863	0,162	0,001	0,254	0,126	0,084	0,001	0,028	0,539
C600 2403	0,001	0,054	0,117	0,558	0,001	0,103	0,454	0,218	0,001	0,006	0,066
C600 12E0111	0,342	0,633	0,487	0,902	0,001	0,157	0,528	0,078	0,148	0,001	0,002
C600 E2348/69	0,329	0,620	0,567	0,992	0,005	0,960	0,405	0,692	0,211	0,117	0,001
C600 123	0,933	0,538	0,910	0,500	0,642	0,774	0,747	0,829	0,401	0,172	0,019
C600 Medium	0,146	0,384	0,912	0,971	0,948	0,892	0,086	0,980	0,158	0,972	0,832
C600 LPS	0,599	0,501	0,690	0,325	0,589	0,518	0,574	0,900	0,734	0,717	0,809
C600 TotLB226692	0,170	0,051	0,868	0,150	0,822	0,841	0,947	0,146	0,041	0,189	0,124

Tabelle 44: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der CaCo-2, 3 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	CaCo-2 3 h										
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1
C600	0,165	0,521	0,209	0,519	0,008	0,278	0,027	0,618	0,002	0,112	0,368
C600	0,025	0,476	0,935	0,983	0,001	0,580	0,187	0,105	0,001	0,818	0,775
C600	0,019	0,534	0,376	0,991	0,001	0,351	0,387	0,160	0,001	0,590	0,641
C600	0,057	0,904	0,350	0,886	0,001	0,499	0,015	0,129	0,001	0,407	0,561
C600	0,055	0,910	0,171	0,916	0,001	0,453	0,015	0,389	0,001	0,361	0,706
C600	0,025	0,660	0,861	0,875	0,006	0,975	0,123	0,678	0,449	0,460	0,044
C600	0,133	0,841	0,994	0,572	0,549	0,313	0,419	0,209	0,187	0,718	0,503
C600	0,020	0,921	0,541	0,782	0,004	0,994	0,401	0,424	0,023	0,799	0,106
C600	0,097	0,693	0,564	0,970	0,039	0,827	0,058	0,211	0,006	0,511	0,460
C600	0,153	0,914	0,542	0,580	0,001	0,318	0,010	0,348	0,001	0,428	0,560
C600	0,035	0,645	0,834	0,179	0,001	0,938	0,001	0,691	0,001	0,144	0,458
C600	0,634	0,910	0,596	0,575	0,258	0,504	0,007	0,911	0,131	0,213	0,150
C600	0,715	0,622	0,373	0,908	0,001	0,642	0,141	0,784	0,001	0,088	0,438

Tabelle 45: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der CaCo-2, 6 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	CaCo-2 6 h										
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1
C600	0,077	0,783	0,244	0,682	0,053	0,366	0,317	0,995	0,349	0,396	0,895
C600	0,003	0,264	0,743	0,621	0,041	0,934	0,949	0,494	0,004	0,870	0,005
C600	0,067	0,490	0,154	0,377	0,368	0,933	0,860	0,474	0,823	0,639	0,664
C600	0,001	0,482	0,945	0,505	0,003	0,995	0,743	0,222	0,652	0,728	0,057
C600	0,001	0,299	0,984	0,707	0,335	0,601	0,947	0,190	0,157	0,747	0,019
C600	0,044	0,399	0,878	0,492	0,001	0,857	0,355	0,273	0,001	0,551	0,068
C600	0,017	0,985	0,321	0,764	0,001	0,811	0,619	0,536	0,094	0,594	0,358
C600	0,356	0,976	0,122	0,895	0,046	0,203	0,495	0,865	0,382	0,273	0,951
C600	0,158	0,793	0,861	0,566	0,788	0,521	0,521	0,991	0,412	0,981	0,621
C600	0,017	0,155	0,505	0,584	0,036	0,865	0,256	0,181	0,005	0,574	0,009
C600	0,001	0,187	0,156	0,533	0,001	0,822	0,965	0,051	0,001	0,518	0,001
C600	0,008	0,285	0,124	0,633	0,001	0,131	0,380	0,437	0,001	0,641	0,002
C600	0,262	0,136	0,944	0,835	0,239	0,309	0,237	0,966	0,314	0,968	0,638

Tabelle 46: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der Makrophagen nach Stimulation mit konditionierten FKD-R 971-Überständen, 3 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	Makrophagen – FKD-R 971, 3 h											
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1	INOS
C600 LB226692	0,013	0,047	0,942	0,417	0,149	0,030	0,440	0,269	0,461	0,419	0,152	0,168
C600 55989	0,038	0,271	0,568	0,834	0,005	0,050	0,901	0,549	0,140	0,530	0,349	0,398
C600 17-2	0,068	0,244	0,527	0,334	0,283	0,075	0,498	0,380	0,276	0,803	0,610	0,248
C600 EDL933	0,045	0,345	0,538	0,360	0,009	0,071	0,914	0,557	0,326	0,793	0,752	0,948
C600 12E0114	0,378	0,345	0,108	0,457	0,603	0,186	0,467	0,952	0,560	0,157	0,543	0,109
C600 2403	0,172	0,337	0,248	0,761	0,172	0,255	0,626	0,583	0,836	0,823	0,562	0,155
C600 12E0111	0,001	0,006	0,614	0,487	0,319	0,002	0,217	0,029	0,005	0,415	0,119	0,018
C600 123	0,258	0,469	0,536	0,640	0,547	0,327	0,453	0,306	0,277	0,435	0,698	0,988
C600 Medium	0,001	0,001	0,016	0,227	0,002	0,001	0,338	0,072	0,002	0,006	0,778	0,001
C600 LPS	0,014	0,308	0,019	0,640	0,001	0,380	0,113	0,139	0,865	0,189	0,092	0,415

Tabelle 47: Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der Makrophagen nach Stimulation mit konditionierten PC-Überständen, 3 h (Randomisierungstest)

<i>E. coli</i> Stämme	Makrophagen – PC, 3 h											
	IL-1 β	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β	GRO- α	IL-8	RANTES	MCP-1	INOS
C600 LB226692	0,150	0,136	0,086	0,105	0,546	0,883	0,497	0,629	0,413	0,379	0,007	0,023
C600 55989	0,178	0,001	0,178	0,001	0,001	0,001	0,325	0,647	0,001	0,001	0,001	0,001
C600 17-2	0,647	0,001	0,001	0,001	0,502	0,647	0,500	0,001	0,001	0,647	0,178	0,647
C600 EDL933	0,898	0,695	0,001	0,515	0,294	0,197	0,093	0,695	0,294	0,001	0,898	0,288
C600 12E0114	0,001	0,647	0,824	0,001	0,001	0,001	0,178	0,001	0,178	0,178	0,001	0,178
C600 2403	0,001	0,001	0,001	0,647	0,001	0,001	0,824	0,001	0,178	0,001	0,178	0,647
C600 12E0111	0,824	0,001	0,001	0,178	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,178	0,001	0,824
C600 123	0,001	0,178	0,178	0,178	0,178	0,178	0,325	0,178	0,001	0,178	0,001	0,824
C600 Medium	0,028	0,026	0,016	0,016	0,030	0,001	0,562	0,016	0,051	0,001	0,001	0,499
C600 LPS	0,391	0,019	0,760	0,187	0,125	0,960	0,157	0,016	0,439	0,296	0,383	0,443

9.2 Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

9.2.1 Verwendete Geräte

Geräte/ Modell	Firma
1-Kanal-Stepper	Fa. Eppendorf, Hamburg
7500 Fast Real Time PCR System, ABIPrism™ 7500	Fa. Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Warrington, UK
Abzug	Fa. W. H. Mahl, Trendelburg
Analysewaage LA230S	Fa. Sartorius AG, Göttingen
Analysewaage Typ L610-D2	Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Brutschrank Heraeus HERA cell 1, Typ HSP 18, CO ₂ -Inkubator	Fa. Kendro Laboratory Products, Hanau
Brutschrank MCO-19AIC CO ₂ -Inkubator	Fa. Panasonic (ehem. Sanyo) Biomedical Sales, Etten Leur, NL
Brutschrank WTB Binder	Fa. WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II	Fa. Becton-Dickison, Heidelberg
Elektrophoresegerät für Auftrennung, BIORAD Mini-Protean III	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresegerät für Blotting, BIORAD TRANS-BLOT SD semi-dry transfer cell	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer für Agarosegele, Model 41-1325	Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Scanner (Epson Scanner V700/Photo)	Fa. Epson Deutschland GmbH, Meerbusch
EVOM-Gerät (epithelial volttohmmeter) mit STX2-Elektrode	Fa. World Precision Instruments (WPI), USA
Geldokumentationssystem G:BOX EF	Fa. Syngene, Cambridge, UK
Hochvakuum-Bedampfungsanlage (Bal-Tec Med 020, Baltec)	Fa. Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein
Magnetrührer (Variomag Monotherm)	Fa. H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Mehrkanalpipette Xplorer®, 5-100 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Ampival	Fa. Carl Zeiss, Jena
Mikroskopkamera Leica DFC450C	Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowellengerät 8018	Fa. Privileg, Stuttgart
Multipette® plus	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers	Fa. ThermoFisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot
Neubauer-Zählkammer	Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PCR-Cooler, 96-well	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Photometer Ultrospec™ 10 Zelldichte-Messgerät	Fa. VWR International Ltd, Lutterworth, England
Pipetboy acu 2	Fa. Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetten, Reference® o. Research® plus, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg

9.2.1 Verwendete Geräte (Fortsetzung)

Geräte/ Modell	Firma
Plattenphotometer Model Sunrise™ mit Auswertung Software Magellan™	Fa. Tecan Austria GmbH, Grödig/ Salzburg, Austria
Plattformschüttler Duomax 1030	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Reagenzglasschüttler lab dancer	Fa. IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Schüttelwasserbad (Julabo Shake Temp SW 23)	Fa. Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Schüttelwasserbad GFL 1092	Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HSP 18	Fa. Kendro Laboratory Products, Hanau
Sicherheitswerkbank BioVanguard 6	Fa. Telstar, JA Woerden, NL
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot
Sicherheitswerkbank, HERA Safe, Typ KS18	Fa. Thermo Electron corporatino, Langenselbold
Spannungsgerät 1000/500 Power	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Systemmikroskop Olympus BX41	Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Thermoblock (AccuBlock™)	FA. Labnet International Inc., Woodbridge USA
Thermoblock, Typ DB3	Fa. Techne, Staffordshire, UK
Thermocycler Biometra T-Personal combi	Fa. Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Mini Spin Plus	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge MiniSpin	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge ROTINA 380R, Typ 1706	Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge Universal 320 R	Fa. Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Transmissionselektronenmikroskop (TECNAI 12, FEI)	Fa. FEI Munich, Gräfelfing (jetzt Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
Ultramikrotom, Ultracut UCT-GA-DE 1/00	Fa. Leica Camera AG, Wetzlar
Vortex 2 Genie, Model G-560E	Fa. Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge Centrifuge 5415 D	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Labofuge 400	Fa. Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Fa. Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Universal 30 RF	Fa. Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

9.2.2 Verwendete Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
2-Mercaptoethanol	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	28625
Agar-Agar	Fa. SIFIN GmbH, Berlin	TN 1400
Amphotericin B, lyophilisiert, 250 µg/ml	Fa. Biochrom, zugehörig zu Fa. Merck Millipore GmbH, Berlin	A 2612
APS (Ammonimpersulfatlösung)	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	13375
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Salz), Roche Diagnostics	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	11383221001
Blut-Agar (Basis)	Fa. SIFIN GmbH, Berlin	TN 1106
bovine CD21, Maus-IgG1	Fa. VMRD, Inc., Pullman Washington, USA	GB25A
bovine CD25 (Bovine Interleukin-2 receptor α), Maus-IgG1	Fa. VMRD, Inc., Pullman Washington, USA	CACT116A
bovine CD4, Maus-IgG2a	Fa. VMRD, Inc., Pullman Washington, USA	IL-A 11
bovine CD45RO, Maus- IgG3	Fa. VMRD, Inc., Pullman Washington, USA	IL-A116
bovine CD8-Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 647	Fa. AbD Serote, Puchheim	MCA837A64
bovine Pituitary Extract (BPE) (Gibco $\text{\textcircled{R}}$)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	13028-014
bovine $\gamma\delta$ / TCR1-N-24	Fa. VMRD, Inc., Pullman Washington, USA	GB21A
BSA (bovines Serum Albumin), microbiological grade, 100 g	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	11925
Butanol, 4 L	Fa. VWR International GmbH, Dresden	200004-352
CD77, Clone 38-13, Isotype: Rat IgM	Fa. AbD Serotech, Düsseldorf	MCA579
CFSE Proliferation Dye	Fa. eBioscience, Frankfurt am Main	65-0850-84
Collagen R solution 0.2 %, sterile, 20 ml	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	47254.01
Collagenase Typ I, CLS I, 100 mg	Fa. Biochrom zugehörig zu Fa. Merck Millipore GmbH, Berlin	C 1-28
Concanavalin A (ConA)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	L7647-25MG
D(+)-Mannose BioChemica	Fa. Neolab, Heidelberg	3587,0050
DAPCO-Eindeckmedium	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	D-2522
DAPI	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	D9542-5MG
Dextrose, D(+)-Glucose Monohydrat	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	6887.1
DMF (Dimethylfumarsäure), 1 L	Fa. VWR International GmbH, Dresden	BDH1115-1L
DMSO-haltiges Einfriermedium (Cell-Freezing Medium DMSO 1x)	Fa. Th. Geyer Hamburg GmbH, Hamburg	C6164-50ML
DEPC-Wasser (DNase-freies Wasser) ROTIPURAN $\text{\textcircled{R}}$	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	HN57.1
dNTP Master-Mix (25 mM)	Fa. PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	PAN739028

9.2.2 Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
D-Sorbitol, BioReagent, cell culture tested, plant cell culture tested,	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	S3889-500G
EGF – human epidermal growth factor (recombinant),	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen über Altmann Analytik	E9644
Ethanol 100 %, 1x 2,5 L	Fa. VWR International GmbH, Dresden	PROOSO-9063-B025
FITC (Fluoreszein-Iso-Thiozyanat) konjugiertes Phalloidin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P5282-.1MG
Fötales Kälberserum (FKS)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	10664083
Gassner-Agar	FA. SIFIN GmbH, Berlin	TN 1194
GeneRuler Low Range DNA Ladder 25 to 700 bp, ready-to-use	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM1191
GeneRuler® 100bp DNA Ladder Plus	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0321
Gentamycinsulfat, ≥ 590 I.U./mg	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	0233.4
Gibco® DMEM (4,5 g/l high glucose)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	41965-039
Gibco® DMEM (4,5 g/l high glucose, no glutamine, no phenol red)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	31053-028
Gibco® Ham's F-12 Nutrient Mixture	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	21765-029
Gibco® Iscove's DMEM (IMDM)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	21980-032
Gibco® MEM	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	31095-029
Gibco® MEM (no glutamine, no phenol red)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	51200-046
Giemsa-Stammlösung	Fa. Neolab Migge Laborbedarf Vertrieb GmbH, Heidelberg	28800250
Glycerin	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	23591.02
Glyzerol 87%	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt	17-1325-01
HBSS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , ohne Phenolrot)	Fa. Biochrom zugehörig zu Fa. Merck Millipore GmbH, Berlin	L 2045
HBSS-Puffer (ohne Ca ²⁺ und, Mg ²⁺ , mit Phenolrot)	Fa. Biochrom, zugehörig zu Fa. Merck Millipore GmbH, Berlin	L 2055
HCl	Fa. VWR International GmbH, Dresden	64-19-7
Hefe-Extrakt	Fa. SIFIN GmbH, Berlin	TN 1404
Hydrocortisone, BioReagent, suitable for cell culture	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	H0888-1G
IgG AP (Anti-Maus IgG, AP-konjugiert)	Fa. Boehringer Mannheim GmbH	1198661
IgG1-405 (Ziege anti-Maus, Fc _γ Subklasse 1 spezifisch)	Fa. Jackson Immuno Research Europe Ltd., Suffolk, UK	115-475-205
IgG1-PE (Ziege anti-Maus)	Fa. Southern Biotech, Birmingham, AL, USA	1070-09S
IgG2- Alexa Fluor® 594 (Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂)	Fa. Cell Signaling Technology Europe, B.V., Leiden, Niederlande	8889
IgG2a-APC/ Cy7 (Ziege anti-Maus)	Fa. Southern Biotech, Birmingham, AL, USA	1080-19

9.2.2 Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
IgG2b-PerCp (Ziege anti-Maus)	Fa. Jackson Immuno Research Europe Ltd., Suffolk, UK	115-125-207
IgG3-FITC (Ziege anti-Maus)	Fa. Southern Biotech, Birmingham, AL, USA	1100-02
IgG-AP (Ziege anti-Kaninchen IgG H&L, Alkaline Phosphatase)	Fa. Abcam plc, Cambridge, UK	Ab6722-1
IgM-FITC (Ziege anti Ratte)	Fa. Jackson Immuno Research Laboratories, PA, USA	112-096-075
Insulin, human, rekombinant,	Fa. Biochrom zugehörig zu Fa. Merck Millipore GmbH, Berlin	K 3620
Isopropanol	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	563935-1L-D
LDH-Zytotoxizitäts-Assay Kit (Cayman-Biomol)	Fa. Biomol GmbH, HAMBURG	Cay10008882-480
L-Glutamine	Fa. Fisher Scientific, Schwerte	25030-024
LPS, Lipopolysaccharide von E.coli O26:B6 (eae-, stx1/2-)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	L2762
Lymphozytentrennmedium (Pancoll Animal)	Fa. PAN Biotech, Aidenbach	P04-63500
Methanol	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	34860
MgCl ₂	Fa. Merck, Darmstadt	5833.0250
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, 10 plates	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	N8010560
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	4360954
Milchpulver	Fa. Saliter GmbH & Co. KG, Lauben/Allgäu	S51091
MTT	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	M5655-1G
Multiplex PCR 5X Master Mix Kit	Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M	M0284S
NaCl, 1 kg	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P029.2
Na-Citrat (Sodium Citrate Dihydrat)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	W302600-1KG-K
Nährbouillon	Fa. SIFIN GmbH, Berlin	TN 1172
NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride, solution), Roche Diagnostics GmbH	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	11383213001
Non-essential Amino acids (100x) (NEAS)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	10415205
NP-40 Puffer	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	74388
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	NP0002
Omniscript Reverse Transkription-Kits	Fa. Qiagen, Hilden	205111

9.2.2 Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
PANScript DNA-Polymerase™ 5 U/μl mit NH4Mix und MgCl2 geliefert	Fa. PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	MB-1100500
Parafomaldehyd (PFA)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P6148
Penicillin-Streptomycin (10.000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)	Fa. PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P06-07100
peqGOLD Universal Agarose, 500 g	Fa. Peqlab, Erlangen	35-1020
Phosphorwolframsäure	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	2635.1
Polymyxin-B-Sulfat BioChemica	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt	A0890,0001
Propidiumiodid BioChemica	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	3395.0000050
PVDF-Membran	Fa. Merck Millipore GmbH, Berlin	P-15552
QIAshredder-Säule	Fa. Qiagen, Hilden	79656
Random Hexamers, 100 μM (5'-NNN NNN-wobbles-3')	Fa. Jena Bioscience, Jena	PM-301L
RIDASCREEN® Verotoxin ELISA	Fa. R-Biopharm AG, Darmstadt	C2201
RNase Away 1 Liter	Fa. VWR International GmbH, Dresden	732-2271
RNase-Free DNase Set	Fa. Qiagen, Hilden	79254
RNase-Inhibitor (RNasin RNA-Inhibitor 10000U)	Fa. Promega High Tech Park, Mannheim	N2515
RNeasy® Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden	74104
Roti®-Mount-Eindeckmedium	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	HP68.1
Rotiphorese® 10x TBE-Puffer	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3061.2
Rotiphorese® Gel; Fertiglösung (Acylamid-/Bisacrylamidlösung 30 %)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3029.3
RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin	Fa. PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P04-16500
SDS, Natriumlaurylphosphat,	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	43601.2
Standard (Westernblot), Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladders	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	26634
Steriles defibriniertes Blut (Rind)	Fa. Fiebig, Idstein-Niederauoff	40000100
SYBR Green I (SYBR® Green PCR Master Mix)	Fa. Applied Biosystems über Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	4312704
TEMED	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	35925
Tris	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	37190.02
Triton X-100 (Octylphenol-polyethyleneglycoether)	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	37240
Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%)	Fa. Th. Geyer Hamburg GmbH, Hamburg	93535-50ML
Trypsin (10x)	Fa. DIFCO, gehört zu Becton Dickinson, Sparks, MD, USA	0152-15-9
Tryptone	Fa. SIFIN GmbH, Berlin	TN 1403

9.2.2 Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Tween 20	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg	37470
Vimentin	Fa. DAKO Denmark A/S, Glostrup, Denmark	M7020
ZO-2	Fa. Cell Signaling Technology Europe, B.V., Leiden, Niederlande	2847
Zytokeratin/ pan-FITC	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	F3418

9.2.3 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
24-well-Mikrotiterplatten, Corning® Costar®	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	CLS3527- 100EA
24-well-Suspensionsplatte, Cellstar®	Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	662102
6-well Mikrotiterplatte Corning® Costar®, flat bottom	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	CLS3516- 50EA
96-well Mikrotiterplatte, Corning® Costar®, Flachboden (<i>flat bottom</i>)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	CLS3596- 50EA
96-well Mikrotiterplatte, Nunc® MicroWell™ 96 well round bottom	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P6991
96-well Mikrotiterplatte, Nunc® MicroWell™ 96 well V-bottom	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	P7241
Deckgläser (Ø12 mm), rund	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	1-6283
Einmal-Impföfen 10 µl	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	E-1722
Einmalkanüle (18G, 1,2 x 40 mm)	Fa. WDT, Garbsen	90278
Einmalkanüle (23G, 0,6 x 25 mm)	Fa. KS Medizintechnik, Felsberg,	115133
Einmalküvette, 1,5 ml - 3 ml, PLASTIBRAND®	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	Y195.1
Einmalspritzen, 20 ml, Luer Lock	Fa. Hartenstein Gesellschaft für Labor- & Medizintechnik mbH, Würzburg	SE23
Einmalspritzen, 5 ml/10 ml	Fa. WDT Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH, Garbsen	09798/ 093155
FACS-Röhrchen, Flow Cytometry, 5 ml	Fa. Sartstedt AG & Co., Nümbrecht	55.1579
Falcon® Cell Scraper (18 cm Stiel, 1,8 cm Blatt, steril)	Fa. Corning B.V. Life Science, Amsterdam	353085
Filtereinsätzen (Ø 12 mm), Porengröße 0,4 µm, für 24 well Platte	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	10421761
Filterspitzen, 10 µl, steril	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	S1181-3810
Filterspitzen, 100 µl, steril	Fa. Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	780102
Filterspitzen, 1000 µl, steril	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	S1126-7810
Filterspitzen, 200 µl, steril	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	S1120-8810
Glas-Pasteurpipetten, ungestopft, 230 mm lang	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	E-1097

9.2.3 Verwendetes Verbrauchsmaterial (Forsetzung)

Material	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Glasspritze FORTUNA® OPTIMA®, Luer-Lock-Metallkonus, von 1-100 ml	Fa. Poulten & Graf GmbH, Wertheim	7.140
Glasspritze FORTUNA® OPTIMA®, mit Luerkonus, 1-50 ml	Fa. Poulten & Graf GmbH, Wertheim	7.202
Handschuhe, Latex	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	1-8107
Handschuhe, Nitril	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	1-8102
Kryotubes, 1,8 ml, steril	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	E3090-6222
Laborflasche, 250ml/ 500ml/ 1000ml	Fa. Neolab, Heidelberg	2-3061/ 2-3062/ 2-3063
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	4311971
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	4316813
Multiadapter, Luer	Fa. Sartstedt AG & Co., Nümbrecht	14.1205
Multipetten-Aufsätze 10 ml	Fa. Hartenstein Gesellschaft für Labor- & Medizintechnik mbH, Würzburg	0030 089.677
Objektträger mit Mattrand	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	1-6273
Petrischalen, steril	Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	633102
Reaktionsgefäß, 0,2 ml	Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH	82-0620-B
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030 123.328
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, Safe-Lock	Fa. Hartenstein Gesellschaft für Labor- & Medizintechnik mbH, Würzburg	RSL1
Reaktionsgefäß, 2,0 ml	Fa. Starlab GmbH, Ahrensburg	S1620-2700
Reaktionsgefäß, 2,0 ml, Safe-Lock	Fa. Hartenstein Gesellschaft für Labor- & Medizintechnik mbH, Würzburg	RSL2
Reservoir mit Deckel für Mehrkanalpipetten, ca. 60 ml	Fa. A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg	RE60
Roti-Tape Markierband; 13mm Breite; 12,7m Länge	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	AK65.1
Sekura-Entsorgungsbeutel	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	E706.1
Serologische Pipette, 10 ml, steril	Fa. NeoLab, Heidelberg	7-4031
Serologische Pipette, 25 ml, steril	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030127730
Serologische Pipette, 5 ml, steril	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	7-4027
Serologische Pipette, 50 ml, steril	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030127749
S-Monovette®, Citrat 10 ml	Fa. Sartstedt AG & Co., Nümbrecht	021067.001
Spatel, T-Form	Fa. D&D Laborservice, Henningsdorf	612-2653
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm, Spritzenvorsatzfilter, Einmalfilter)	Fa. Sartorius Stedium Biotech GmbH, Goettingen	7-9000
Tips, ohne Filter, 1000 µl	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	5111-2020
Tips, ohne Filter, 20 µl	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	E-6801
Tips, ohne Filter, 200 µl	Fa. Neolab Migge GmbH, Berlin	E-6802

9.2.3 Verwendetes Verbrauchsmaterial (Forsetzung)

Material	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Zellkulturflasche (T25), Corning® Costar®, 25 cm ² , steril	Fa. Corning B.V. Life Science, Amsterdam	430372
Zellkulturflasche (T75), Corning® Costar®, 75 cm ² , steril	Fa. Corning B.V. Life Science, Amsterdam	430725
Zellkultur-Teflonbeute, VueLife™ Closed Culture System	Fa. AFC American Fluoroseal Corporation über Fa. CellGenix Saint-Gobain Performance Plastics, USA	32-AC
Zellschaber 28 cm lang, steril	Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	541070
Zentrifugationsröhrchen, 15 ml, konisch, 17x120 mm	Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	188271
Zentrifugationsröhrchen, 50 ml, konisch	Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	227261

9.3 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

9.3.1 Puffer und Medien für bakteriologische Methoden

Blutagar (BAP)

Blutagar (Basis)	36,0 g
Steriles defibriniertes Blut (Rind)	7,5 %
A. dest.	ad 1.000 ml

Gassner-Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agar nach Gassner)

Gassner-Agar	47,7 g
A. dest.	1.000 ml

Glutaraldehyd (2,5 %)

25-%iges Glutaraldehyd	1 ml
Kacodylatpuffer	9 ml

LB-Medium mit 1 % D-Mannose

D-Mannose	1 g
Lysogeny Broth	100 ml

LB-Medium (Lysogeny Broth nach Luria Bertani)

Tryptone	10,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
A. dest.	ad 1.000 ml
NaOH 1 N	pH ad 8,2

Kacodylatpuffer (pH mit 1 N HCL auf 7,2 – 7,4 einstellen)

Natriumcacodylat	21,4 g
A. dest.	ad 1000 ml

NaCl-Lösung (0,89%)¹

NaCl	8,90 g
A. dest.	ad 1.000 ml

NB-Medium (Nutrient Bouillon)

Nährbouillon	8,0 g
A. dest.	ad 1.000 ml

Polymyxin-B-Stammlösung (1 mg/ml)

Polymyxin-B.....	10 mg
NaCl	ad 10 ml

9.3.2 Puffer und Medien für Zellkulturmethoden

Bovines Transferrin (steril filtrieren, 0,2 µm Filter, 4°C)

Bo Transferrin.....	10 mg
1x PBS	10 ml

Erstkulturmedium (für Kolonkrypten)²

FKS (10 %).....	50 ml
DMEM (0,1 % Glu, mit Phenolrot)	500 ml
Glukose (f.c. 0,27 %).....	3,778 ml
Penicillin 10000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	5 ml
Gentamycin (Stock: 10 mg/ml, f.c. 2,5 µg/ml)	125 µl
Amphotericin B (Stock: 250 µg/ml, f.c. 2,5 µg/ml)	5 ml
L-Glutamin (Stock: 200 mM, f.c. 4 mM)	10 ml
NEAA (Stock: 100x, f.c. 0,15 mM).....	5 ml
Insulin (Stock: 3,3 mg/ml, f.c. 10 µg/ml).....	1,5 ml
Hydrocortison (Stock: 2 mg/ml, f.c. 1 µg/ml)	250 µl
Long EGF (Stock 10 µg/ml, f.c. 30 ng/ml)	1,5 ml
Bovines Transferrin (Stock 1 mg/ml, f.c. 5 µg/ml).....	2,5 ml
Hypophysenextrakt (f.c. 5 µl/ml).....	500 µl

Erythrozyten-Lyse-Puffer (steril filtrieren)

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

FACS-Puffer

1x PBS	500 ml
FKS (NKS=newborn calf serum)	500 µl
Na-Azid (NaN ₃)	0,25 %

Kulturmedium (für Kolonkrypten)

(wie Erstkulturmedium mit Ausnahme von 10 % FKS)

1 % FKS	5 ml
---------------	------

¹ Lösungen werden vor Verwendung autoklaviert (121 °C, 20 min)

² Lagerung: 4 °C, dunkel, Hypophysenextrakt bei Gebrauch zugeben

Makrophagen-BeutelmEDIUM (Anzuchtmedium)

IMDM ohne Phenolrot	390 ml
Penicillin 10000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	5 ml
Amphotericin B (250 µg/ml)	5 ml
FKS (20 %)	100 ml
2-β-Mercaptoethanol (100 µM)	250 µl

Makrophagen-Kulturmedium

IMDM ohne Phenolrot	480 ml
Penicillin 10000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	5 ml
Amphotericin B (250 µg/ml)	5 ml
FKS (2 %)	10 ml
2-β-Mercaptoethanol (100 µM)	250 µl

Makrophagen-Kulturmedium ohne Antibiotika

IMDM ohne Phenolrot	490 ml
FKS	10 ml
2-β-Mercaptoethanol (100 µM)	10 µl

Na-Citrat-Puffer (3,8 %) (steril filtrieren, AntikoagulanZ)

Na-Citrat x 2 H ₂ O	3,8 g
A. dest.	100 ml

PBMC-Medium (100 ml)

RPMI 1640	89 ml
FKS (10 %)	10 ml
Pen/Strep (1 %)	1 ml
2-β-Mercaptoethanol (Stock 100 µM)	300 µl

PBS-EDTA-Puffer

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,42 g
Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	2 g
A. dest.	ad 1000 ml

PBS-Stammlösung³ (10x, pH 7,4)

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18 g
A. dest.	ad 1.000 ml

1x PBS (Gebrauchslösung, pH 7,4)

PBS-Stammlösung	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

³ Lösungen werden vor Verwendung autoklaviert (121 °C, 20 min)

1x PBS (+)⁴ (pH 7,2- 7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g
CaCl ₂	0,132 g
MgCl ₂	0,0468 g
A. dest.	ad 1.000 ml

Rinder-Hypophysenextrakt (BPE)

Rinder-Hypophysenextrakt-Stocklösung (75 µg/ml in 1x PBS, -20 °C).....	37,5 µl
1x PBS	ad 5 ml

SDS-Lösung (1 %)

Dodezylsulfat Natriumsalz.....	0,5 g
NaCl	ad 50 ml

SDS-Lösung (3 %)

Dodezylsulfat Natriumsalz.....	1,5 g
NaCl	ad 50 ml

SDS-Lösung (10 %)

Dodezylsulfat Natriumsalz	100 g
HCl 1 N	10 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Sorbitol-Gradient (2 %ig in HBSS)⁵

Sorbitol (steril).....	10 g
HBSS (ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ , ohne Phenolrot, steril).....	0,5 l

Testmedium für CaCo-2-Zellen mit 1 % D-Mannose

= DMEM (4,5 g/l Glukose) + 10 % FKS + 1 % NEAS + 1 % D-Mannose

DMEM (4,5 g/l Glukose mit Pyridoxin HCl, ohne Pyruvat).....	100 ml
FKS	10 ml
MEM nicht-essentielle Aminosäuren.....	1 ml
D(+)-Mannose.....	1 g

Testmedium für FKD-R 971-Zellen mit 1 % D-Mannose

= Iscove's DMEM + Ham's F12 (1:1) + 10 % FKS + 1 % NEAS + 1 % D-Mannose

Iscove's DMEM	50 ml
Ham's F12	50 ml
FKS	10 ml
MEM nicht-essentielle Aminosäuren.....	1 ml
D(+)-Mannose.....	1 g

Testmedium für HEp-2-Zellen mit 1 % D-Mannose

= RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % D-Mannose

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin.....	100 ml
FKS	10 ml
D(+)-Mannose.....	1 g

⁴ Lösungen werden vor Verwendung steril filtriert

⁵ steril abwägen, 4 °C

Testmedium für INT 407-Zellen mit 1 % D-Mannose

= MEM (Eagle) + 10 % FKS + 1 % NEAS + 1 % D-Mannose

MEM (Eagle) mit 2,2 mg/l NaHCO ₃	100 ml
FKS	10 ml
MEM nicht-essentielle Aminosäuren.....	1 ml
D(+)-Mannose.....	1 g

Testmedium für Kolonkrypten⁶

FKS (1 %)	50 ml
DMEM (0,1 % Glu, mit Phenolrot)	500 ml
Glukose (f.c. 0,27 %).....	3,778 ml
L-Glutamin (Stock 200 mM, f.c. 4 mM)	10 ml
NEAA (Stock: 100x, f.c. 0,15 mM)	5 ml
Insulin (Stock 3,3 mg/ml, f.c. 10 µg/ml).....	1,5 ml
Hydrocortison (Stock: 2 mg/ml, f.c. 1 µg/ml)	250 µl
Long EGF (Stock 10 µg/ml, f.c. 30 ng/ml)	1,5 ml
Bovines Transferring (Stock 1 mg/ml, f.c. 5 µg/ml).....	2,5 ml
Hypophysenextrakt (f.c. 5 µl/ml)	500 µl
D-Mannose (1 %).....	50 ml

Transportmedium (für Kolonkrypten)⁷

1x PBS	ad 500 ml
Penicillin 10.000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	5 ml
2,5 µg/ml Gentamycin (Stock: 20 mg/ml).....	62,5 µl
2,5 µg/ml Amphotericin B (Stock: 250 µg/ml).....	5 ml
4 mM L-Glutamin (Stock 200 mM).....	10 ml
0,2 % Glukose	1 g

Trypanblau-Lösung

Trypanblau.....	0,2 g
NaCl-Lösung.....	1.000 ml

Trypsin-EDTA-Lösung⁸ (pH 7,2 - 7,3)

Trypsin.....	0,5 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,8 g
Glukose	1,0 g
NaHCO ₃	0,58 g
EDTA-Na.....	0,2 g
A. dest.	ad 1.000 ml

Verdau-Lösung (für Kolonkrypten)⁹

DMEM (0,1 % Glu, mit Phenolrot)	60 ml
HBSS (ohne Mg ²⁺ Ca ²⁺).....	60 ml
2 mM L-Glutamin (Stock 200 mM).....	1,2 ml
Penicillin 10.000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	1,2 ml
2,5 µg/ml Amphotericin B (Stock: 250 µg/ml).....	1,2 ml
2,5 µg/ml Gentamycin (Stock: 20 mg/ml).....	15 µl
150 U/ml Collagenase I (CLS, 37 °C; Stock: 208 U/mg).....	86,52 mg

⁶ Lagerung: 4 °C, dunkel, Hypophysenextrakt bei Gebrauch zugeben

⁷ steril, Glucose erst kurz vor Gebrauch zugeben

⁸ Lösungen werden vor Verwendung steril filtriert; Lagerung Trypsinvorrat bei – 20 °C

⁹ steril ansetzen, Collagenase bei Gebrauch zugeben, 120 ml Verdau-Lösung für 30 ml Zellpellet

Verozellkulturmedium

= RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	100 ml
FKS	10 ml
Penicillin 10.000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	1 ml

Zellkulturmedium für CaCo-2-Zellen:

= DMEM (4,5 g/l Glukose) + 10 % FKS + 1 % NEAS + 1 % Penicillin/Streptomycin

DMEM (4,5 g/l Glukose mit Pyridoxin HCl, ohne Pyruvat)	100 ml
FKS	10 ml
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	1 ml
Penicillin 10.000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	1 ml

Zellkulturmedium für FKD-R 971-Zellen ohne Antibiotikum:

= Iscove's DMEM + Ham's F12 (1:1) + 10 % FKS + 1 % NEAS

Iscove's DMEM	50 ml
Ham's F12	50 ml
FKS	10 ml
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	1 ml

Zellkulturmedium für HEP-2-Zellen:

= RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/ Streptomycin

RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin	100 ml
FKS	10 ml
Penicillin 10.000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	1 ml

Zellkulturmedium für INT 407-Zellen:

= MEM (Eagle) + 10 % FKS + 1 % NEAS + 1 % Penicillin/ Streptomycin

MEM (Eagle) mit 2,2 mg/l NaHCO ₃	100 ml
FKS	10 ml
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	1 ml
Penicillin 10.000 IE/ ml, Streptomycin 10 mg/ ml	1 ml

9.3.3 Puffer und Lösungen für Infektionsversuche im Zellkulturmodell

Blockpuffer (Immunfluoreszenz)

BSA (bovines Serumalbumin) (1 %)	1 g
1x PBS	100 ml

DAPCO-Eindeckmedium (2 % in Glycerol)

DAPCO	0,2 g
Glycerol	ad 10 g

DAPI-Gebrauchslösung (f.c. 0,5 µg/ml)¹⁰

DAPI-Stammlösung (5 mg/ml)	0,01 µl
1x PBS	99,99 µl

FITC (Fluorescein-Isothiozyanat)-Phalloidin-Gebrauchslösung

FITC-Stocklösung (0,1 mg/ml in MeOH, Lagerung -20 °C)	1 µl
1x PBS	19 µl

¹⁰ Herstellung in 2 Verdünnungsschritte à 1:100

Gentamicin-Stammlösung (100 mg/ml)

Gentamicin	1 g
1x PBS (+)	9,9 ml
FKS	0,1 ml

Giemsa-Gebrauchslösung, filtrieren

Giemsa-Stammlösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung)	5,0 ml
A. dest	45,0 ml

MTT-Lösung (5 mg/ml)

MTT	0,50 g
1x PBS	100 ml

Propidium-Iodide-(PI)-Gebrauchslösung¹¹ (1:30.000, 1 well = 50 µl (0,0003 µg/µl))

PI-Stocklösung (10 mg/ml in PBS-Lösung, 2- 8 °C)	0,5 µl
1x PBS	ad 15 ml

Paraformaldehyd (PFA)-Gebrauchslösung (2 %)

Fixierungsreagenz-Stammlösung	500 µl
1x PBS	500 µl

Paraformaldehyd (PFA)-Stammlösung (4 %)

Paraformaldehyd (PFA)	4,0 g
PBS-Puffer-Gebrauchslösung	ad 100 ml

0,1 % Triton-X 100 (Permeabilisierungsreagenz-Gebrauchslösung)

Triton X-100	0,1 ml
PBS-Puffer Gebrauchslösung	ad 100 ml

0,04 N HCl in Isopropanol

7 N HCl	0,57 ml
Isopropanol	ad 100 ml

1 N HCl (zuerst A. dest vorlegen)

HCl (37 %)	8,3 ml
A. dest	ad 100 ml

9.3.4 Puffer und Lösungen für immunologische Methoden**Alkalischer-Phosphatase-Puffer (pH 9,2 ± 0,2)**

NaCl	100 mM
Tris	100 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM

Anoden-/Kathodenpuffer

NuPAGE MES SDS Running Buffer (20 x)	50 ml
A. dest	ad 1 l

APS (10 %)

Ammoniumsulfatlösung (APS)	0,1 g
A. dest	ad 1 ml

¹¹ Abzug, dunkel arbeiten, Lösungen lichtgeschützt aufbewahren

BCIP-Stammlösung (Lagerung – 15 °C)

BCIP in DMF lösen 5 %

Blockierlösung/Milchpulverlösung¹² (Western Blot)

Magermilchpulver (3 %) 3 g
 PBS-Tween 100 ml

Immunfärbelösung für Westernblot (immer frisch ansetzen)

Alkalischer-Phosphatase-Puffer 10 ml
 BCIP-Stammlösung 33 µl
 NBT-Stammlösung..... 66 µl

NBT-Stammlösung (Lagerung – 15 °C)

DMF70 %
 A. dest 30 %
 NBT (lösen in Gemisch aus 70 % DMF und 30 % A. dest).....5%

NT/NP-40-Puffer (für Proteinisolation)

NaCl 100 mM..... 0,5844 g
 Tris 10 mM..... 0,1211 g
 A. destad 100 ml
 NP-40 Zusatz direkt vor Gebrauch (1:20) 5 µl

PBS-Tween (pH 7,2 ± 0,2; steril filtrieren (0,2 µm Filter))

NaCl8,0 g
 KCl 0,2 g
 KH₂PO₄.....0,2 g
 Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2,9 g
 A. destad 1.000 ml
 Tween 20 (0,05 %)..... 500 µl

Sammelgel (Westernblot)

A. dest 6,1 ml
 Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCl)2,5 ml
 10 % SDS-Lösung 100 µl
 Rotiphorese® Gel (Acylamid-/Bisacrylamidlösung 30 %) 1,3 ml
 APS (10 %)..... 50 µl
 TEMED..... 10 µl

SSB-Probenpuffer (Sample Solution Buffer)

A. dest 4 ml
 Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 1 ml
 Glycerol (87 %)..... 0,92 ml
 SDS (10 %)..... 1,6 ml
 Bromphenolblau (0,05 %)..... 0,2 ml
 2-β-Mercaptoethanol (Zugabe erst direkt vor Gebrauch)..... 0,4 ml

Transferpuffer (pH 8,3; Lagerung bei 5 ± 3 °C, nicht pH Wert einstellen)

Glycin (M=75,1 g/mol; 193 mM) 14,49 g
 Tris (basisch; M=121,1 g/mol; 25 mM)..... 3,03 g
 Methanol (20 %) 200 ml
 A. destad 1.000 ml

¹² immer frisch ansetzen

Trenngel (10 % für Westernblot)

A. dest.	8,0 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl).....	5,0 ml
SDS-Lösung (10 %).....	200 µl
Rotiphorese® Gel (Acylamid-/Bisacrylamidlösung 30 %).....	6,7 ml
Ammonimpersulfatlösung (APS, 10 % ige).....	100 µl
TEMED.....	20 µl

9.3.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (1 mg/ml)

Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml).....	1,0 ml
A. dest.	ad 10,0 ml

TBE-Laufpuffer (1x)

TBE-Puffer (10 x)	100,0 ml
A. dest.	ad 1.000,0 ml

9.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	links: Pathogenese der humanen EHEC-Infektion, modifiziert nach O`Loughlin und Robins-Browne (2001) [128]; rechts: Erreger-Wirt-Interaktionen bei der bovinen EHEC-Infektion, modifiziert nach Menge <i>et al.</i> 1999 [111], 2001 [125], 2004 a,b [109, 110], 2006 [79], 2015 [119], Stamm <i>et al.</i> 2002 [66], Moussay <i>et al.</i> 2006 [17] und Kerner <i>et al.</i> 2015 [129].....	8
Abbildung 2:	Entwicklung von Kulturen primärer, boviner Kolonkryptenzellen	49
Abbildung 3:	Overlay-Darstellung der Gb ₃ /CD77-(FITC)-Markierung von nicht permeabilisierten Zellen	51
Abbildung 4:	Morphologie von FKD-R 971-Zellen	51
Abbildung 5:	Lichtmikroskopische Aufnahme des löchrigen Zellrasens von auf Filtern kultivierten INT 407-Zellen	52
Abbildung 6:	Elektronenmikroskopische Aufnahme der INT 407-Zellen bei Kultivierung auf Plastikoberfläche	53
Abbildung 7:	Lichtmikroskopische Aufnahmen des heterogenen Zellrasens von auf Filtern kultivierten CaCo-2-Zellen.....	54
Abbildung 8:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen polarisierter CaCo-2-Zellen bei Kultivierung auf Plastikoberflächen.....	55
Abbildung 9:	Zytoskelettausstattung intestinaler Epithelzellen.....	56
Abbildung 10:	Nachweis von Zytokeratin und Vimentin in permanenten Epithelzellen mittels Western Blot	57
Abbildung 11:	Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)	57
Abbildung 12:	Pathovar-PCR zum Nachweis von <i>E. coli</i> -Virulenzgenen, modifiziert nach Müller <i>et al.</i> (2007) [243], beispielhafte Darstellung.....	58
Abbildung 13:	Negativkontrastdarstellung vom Hybridstamm LB226692 und EAEC-Stamm 55989 im Elektronenmikroskop	60
Abbildung 14:	Aggregatives Adhäsionsmuster des Hybridstammes	63
Abbildung 15:	Adhäsionsrate verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme 6 h <i>p.i.</i> auf verschiedenen IEC (Giemsa-Färbung).....	65

Abbildung 16:	Quantitative Bestimmung der Adhäsion von <i>E. coli</i> -Stämmen an verschiedene IEC 3 h <i>p.i.</i>	68
Abbildung 17:	Quantitative Bestimmung der Adhäsion von <i>E. coli</i> -Stämmen an verschiedene IEC 6 h <i>p.i.</i>	69
Abbildung 18:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie FKD-R 971 nach Inokulation mit Stamm LB226692 bzw. EDL933, 3 h <i>p.i.</i>	74
Abbildung 19:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von INT 407-Zellen nach Inokulation mit Hybridstamm LB226692, 3 h <i>p.i.</i>	75
Abbildung 20:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von INT 407-Zellen nach Inokulation mit EHEC-Stamm EDL933, 3 h <i>p.i.</i>	77
Abbildung 21:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie CaCo-2 nach Inokulation mit Stamm LB226692 bzw. EDL933, 3,5 h <i>p.i.</i>	79
Abbildung 22:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen FKD-R 971-Zellen nach 3 h Koinkubation	83
Abbildung 23:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen FKD-R 971-Zellen nach 6 h Koinkubation	85
Abbildung 24:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen PC-Zellen nach 3 h Koinkubation	88
Abbildung 25:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in bovinen PC-Zellen nach 6 h Koinkubation	89
Abbildung 26:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in humanen INT 407-Zellen nach 3 h Koinkubation	92
Abbildung 27:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in humanen INT 407-Zellen nach 6 h Koinkubation	93
Abbildung 28:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in humanen CaCo-2-Zellen nach 3 h Koinkubation	95
Abbildung 29:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen in humanen CaCo-2-Zellen nach 6 h Koinkubation	96
Abbildung 30:	Zellvitalität von IEC 6 h <i>p.i.</i> mit verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	98
Abbildung 31:	Umfang zytotoxischer Effekte in mit verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen inokulierten IEC-Kulturen 3 h <i>p.i.</i>	100
Abbildung 32:	Umfang zytotoxischer Effekte in mit verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen inokulierten IEC-Kulturen 6 h <i>p.i.</i>	101
Abbildung 33:	Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) polarisierter CaCo-2-Zellen nach Inokulation mit verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	102
Abbildung 34:	Virulenzgentranskription der <i>E. coli</i> -Stämme bei Adhäsion an IEC	104
Abbildung 35:	Shigatoxin-Freisetzung in den Kulturüberstand von <i>E. coli</i> -Stämmen nach 6 h Koinkubation auf verschiedenen Wirtszellen	106
Abbildung 36:	Quantitative Bestimmung der Shigatoxin-Bildung und -Freisetzung durch <i>E. coli</i> -Stämme nach Inokulation von IEC-Kulturen mittels Verozelltest	109
Abbildung 37:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen boviner Makrophagen nach 3 h Koinkubation mit konditionierten FKD-R 971-Überständen (n=3)	112
Abbildung 38:	Transkription von Zyto- und Chemokingenen boviner Makrophagen nach 3 h Koinkubation mit konditionierten PC-Überständen (n=2-3)	113
Abbildung 39:	Expression von CD25 auf CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen (CD45 ⁺ , T _M)	116
Abbildung 40:	Expression von CD25 auf CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen (CD45 ⁺ , T _M)	117

9.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	<i>Escherichia coli</i> -Referenzstämme und Isolate und deren relevante Eigenschaften	19
Tabelle 2:	Relevante Eigenschaften der verwendeten permanenten Zelllinien	20
Tabelle 3:	Verwendete Oligodesoxyribonukleotide für die konventionelle PCR zum Nachweis des Pathotyps nach Müller <i>et al.</i> [243].....	21
Tabelle 4:	Verwendete Oligodesoxyribonukleotide für qRT-PCR.....	21
Tabelle 5:	Verwendete primäre Antikörper.....	23
Tabelle 6:	Verwendete Farbstoffe, Konjugate und Sekundäantikörper	24
Tabelle 7:	Parameter der Subkultivierung (Angaben je T ₇₅ -Zellkulturflasche).....	30
Tabelle 8:	Übersicht mittlere Zellzahl/Zellrasen/24-well.....	36
Tabelle 9:	Adhäsionsmuster und A/E-Läsionen von <i>E. coli</i> -Stämmen auf IEC.....	62
Tabelle 10:	Adhäsionsintensität je Einzelzelle.....	66
Tabelle 11:	Invasivität verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme in humane und bovine IEC	71
Tabelle 12:	Stx-Induzierbarkeit bei Wirtszellkontakt.....	107
Tabelle 13:	Verhältnis der Quantität der <i>IL-12</i> - und <i>IL-10</i> -spezifischen mRNS bei bovinen Makrophagen nach 3 h Inkubation mit konditionierten Überständen bovine IEC	114
Tabelle 14:	Übersicht der relevanten Eigenschaften der intestinalen Epithelzellen (eigene Untersuchungen und Angaben aus der Literatur)	123
Tabelle 15:	Statistik zur Adhäsionsrate nach Pathotypen (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test)	160
Tabelle 16:	Statistik zur Adhäsionsrate nach <i>E. coli</i> -Wirtspezies (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test).....	160
Tabelle 17:	Statistik zur Invasion (Gentamicin-Protektions-Test) nach <i>E. coli</i> -Wirtspezies (Mann-Whitney-U-Test).....	161
Tabelle 18:	Statistik zur Invasion (Gentamicin-Protektions-Test) nach Pathotypen (Mann-Whitney-U-Test).....	161
Tabelle 19:	Statistik zur Quantifizierung der Adhäsion im Gentamicin-Protektions-Test nach <i>E. coli</i> -Wirtspezies (Mann-Whitney-U-Test).....	162
Tabelle 20:	Statistik zur Quantifizierung der Adhäsion im Gentamicin-Protektions-Test nach Pathotypen (Mann-Whitney-U-Test).....	162
Tabelle 21:	Statistik zur wirtsinduzierten Virulenzgenexpression (Mann-Whitney-U-Test)	163
Tabelle 22:	Statistik zur absoluten Stx-Freisetzung nach <i>E. coli</i> -Stämmen (ELISA, Mann-Whitney-U-Test).....	163
Tabelle 23:	Statistik zur absoluten Stx-Freisetzung nach Pathotypen (ELISA, Mann-Whitney-U-Test).....	163
Tabelle 24:	Statistik zur absoluten Stx-Freisetzung nach <i>E. coli</i> -Wirtspezies (ELISA, Mann-Whitney-U-Test).....	164
Tabelle 25:	Statistik zur quantitativen Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx nach <i>E. coli</i> -Stämmen (Vero-ZT, Mann-Whitney-U-Test).....	164
Tabelle 26:	Statistik zur quantitativen Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx nach Pathotypen (Vero-ZT, Mann-Whitney-U-Test)	164
Tabelle 27:	Statistik zur quantitativen Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Stx nach <i>E. coli</i> -Wirtspezies (Vero-ZT, Mann-Whitney-U-Test)	164

Tabelle 28:	Statistik zur Zellvitalität im Adhäsionsversuch nach <i>E. coli</i> -Stämmen (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test).....	165
Tabelle 29:	Statistik zur Zellvitalität im Adhäsionsversuch nach Pathotypen (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test).....	166
Tabelle 30:	Statistik zur Zellvitalität im Adhäsionsversuch nach Wirtspezies (Giemsa-Färbung, Mann-Whitney-U-Test).....	166
Tabelle 31:	Statistik zur Quantifizierung der Adhäsion und Invasion im Gentamicin-Protektions-Test (Wilcoxon-Test)	167
Tabelle 32:	Statistik zum Zelluntergang bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay (Wilcoxon-Test).....	167
Tabelle 33:	Statistik zum Zelluntergang, bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay nach Serotypen (Mann-Whitney-U-Test).....	168
Tabelle 34:	Statistik zum Zelluntergang, bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay nach <i>E. coli</i> -Wirtspezies (Mann-Whitney-U-Test).....	168
Tabelle 35:	Statistik zum Zelluntergang, bestimmt im LDH-Zytotoxizitäts-Assay nach Pathotypen (Mann-Whitney-U-Test).....	169
Tabelle 36:	Statistik zum Einfluss der experimentellen Infektion mit dem Hybridstamm auf das Immunsystem des Rindes für CD4 ⁺ und CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen (T _M) (Kruskal-Wallis-Test, post hoc Dunn's Test)	169
Tabelle 37:	Statistik zum Einfluss der experimentellen Infektion mit dem Hybridstamm auf das Immunsystem des Rindes für CD8 α ⁺ T-Gedächtniszellen (T _M) bei Stimulation mit GZL 2 (86-24) nach Tagen (Mann-Whitney-U-Test).....	169
Tabelle 38:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der FKD-R 971, 3 h (Randomisierungstest)	170
Tabelle 39:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der FKD-R 971, 6 h (Randomisierungstest).....	170
Tabelle 40:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der PC, 3 h (Randomisierungstest)	171
Tabelle 41:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der PC, 6 h (Randomisierungstest).....	171
Tabelle 42:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der INT 407, 3 h (Randomisierungstest)	172
Tabelle 43:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der INT 407, 6 h (Randomisierungstest).....	172
Tabelle 44:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der CaCo-2, 3 h (Randomisierungstest).....	173
Tabelle 45:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der CaCo-2, 6 h (Randomisierungstest).....	173
Tabelle 46:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der Makrophagen nach Stimulation mit konditionierten FKD-R 971-Überständen, 3 h (Randomisierungstest).....	174
Tabelle 47:	Statistik für die Expression der Zytokin- und Chemokingene der Makrophagen nach Stimulation mit konditionierten PC-Überständen, 3 h (Randomisierungstest).....	174

10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich auf dem langen Weg der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Dabei geht ein großes Dankeschön an alle hier genannten Personen und Mitarbeiter des FLIs für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke Prof. Dr. C. Menge für die Konzeption dieser Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen dieses Thema zu bearbeiten. Im Besonderen danke ich für die wertvollen Hilfestellungen und die konstruktiven Anregungen bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ich schätze sehr sein umfangreiches Wissen, den geschulten Blick auf komplexe Datensätze sowie seine Bereitschaft und Unterstützung, eine Vielzahl an Methoden und Ideen auszuprobieren. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit, dass ich meine Ergebnisse auf vielen Fachtagungen vorstellen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Stefanie Barth, die durch ihre engagierte Betreuung ebenfalls zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich danke insbesondere für die Einarbeitung in die bakteriologischen Labormethoden, die geduldige Beantwortung aller Fragen zur Dissertation, für die großartige Hilfe beim (nächtlicher) Pipettieren, für die ausdauernde Unterstützung bei dem Verfassen dieser Arbeit und für ihr offenes Ohr, wann immer ich sie um etwas gebeten habe. Ich bedanke mich auch bei Dr. Lutz Geue für die gute Zusammenarbeit, die motivierenden Worte und die Beantwortung aller fachlichen Fragen zu unzähligen Erregern und Arbeitsmethoden, was u.a. zur Durchführung der Pathovar-PCR und zur Auswahl der STEC-Stämme geführt hat. Ich danke Frau Prof. Dr. E. Liebler-Tenorio für ihren wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit, u.a. durch die Auswertung der elektronenmikroskopischen Ergebnisse sowie die Unterstützung bei der Interpretation und der Verschriftlichung meiner Arbeit. Ihr Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit war für mich eine zusätzliche Motivation.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. Katharina Sobotta für ihre großzügige Bereitschaft, ihr Wissen zu teilen, und ihre Unterstützung u.a. bei der Durchführung und Auswertung der qRT-PCR und der Gewinnung von Makrophagen und PBMC. Ihr freundschaftlicher Zuspruch und im Besonderen die fachliche Diskussion mit ihr haben mir viele Denkanstöße für diese Arbeit gegeben und besonders zum Gelingen beigetragen. Ein besonderer Dank geht auch an Nadine Schmidt, u.a. für ihre große Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der FACS-Daten, ihren motivierenden Zuspruch und ihre Freundschaft. Ich bedanke mich auch herzlich bei Katharina Bonkowski für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung, v.a. bei den Western Blot-Analysen. Ein besonderer Dank

geht auch an Dr. Katharina Hamm, Sina Fischer, Dr. Annette Prohl und alle weiteren Co-Doktoranden für die vielen gemeinsamen Erlebnisse, die zu der tollen Zeit in Jena beigetragen haben. Für ihre Unterstützung (qPC-RT-Platten wechseln, etc.) sowie für die Einarbeitung in Zellkulturtechniken und die kompetente Beantwortung technischer Fragen bedanke ich mich herzlich bei Anke Hinsching und Anja Müller. Für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen der ELMI-Bilder möchte ich mich auch bei Herrn Wolfram Maginot und Frau Lisa Wirker bedanken. Ich danke Uta Pfeil für ihre wunderbare Unterstützung und Freundschaft. An langen Labortagen hat sie sich stets um meinen Hund Barney gekümmert, dabei gilt mein besonderer Dank auch der ganzen Familie Wackernagel.

Ich bedanke mich bei Dr. Ulrike Blohm, Dr. Tomas Korytar und Stefanie Knöfel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes auf der Insel Riems sowie für die konstruktive Zusammenarbeit und für die fachliche und tatkräftige Unterstützung bei dem FACS-Projekt. Und ich bedanke mich bei Dr. Roland Diller für die kompetente Beratung zur statistischen Auswertung.

Danken möchte ich auch meinen Kolleginnen und Kollegen vom CVUA Stuttgart, namentlich Dr. Reinhard Sting und Dr. Birgitta Polley, die mir sehr geholfen haben, diese Arbeit erfolgreich zu vollenden.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, vor allem meinen Eltern, Dr. Hartmut und Renate Stalb, die meine Entscheidungen stets positiv begleitet haben. Ihr unerschütterliches Vertrauen in mich sowie ihre grenzenlose Unterstützung machen mich zu dem Menschen, der ich bin. Mein großer Dank gilt auch Michael Holtrup, der mir in dieser Zeit eine große seelische Hilfe war. Sein Glaube an mich und seine feste Überzeugung, dass ich dieses Projekt erfolgreich beenden werde, waren eine besondere Motivation. Ich danke Dr. Marita Olbert, Lisa Sedlaczek, Julia Schwab und Denis Windisch für ihren unermüdlichen Zuspruch auf diesem langen Weg sowie Christiane Olbert für die sprachlichen Korrekturen.

11 Selbstständigkeitserklärung

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."

Sarah Annette Stalb

ISBN 978-3-86345-380-0



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvj.de · Internet: www.dvj.de