

Zelluläre Funktionsstudien zum Wirkungsmechanismus von Shiga Toxinen bei mikro- und makrovaskulären Endothelzelllinien

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Biotech. Andreas Bauwens

2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. Johannes Müthing

2. Prof. Dr. Dr. h.c. Helge Karch

3. Prof. Dr. Thomas Noll

Bearbeitungszeitraum:

03/2006 - 03/2010

Auch aus einem Wolkenbruch kann man etwas lernen. Um nicht nass zu werden, mag man bei einem plötzlichen Schauer versuchen, die Straße entlang zu eilen. Doch selbst wenn man versucht, von einem Dachvorsprung zum nächsten zu laufen, wird man dennoch nass. Wenn man es aber einmal als natürlich hinnimmt, im Regen nass zu werden, kann man mit unbewegtem Geist bis auf die Haut durchnässt werden. Diese Erkenntnis gilt für alle Dinge.

Yamamoto Tsunetomo

Hagakure - Der Weg des Samurai

1 VORBEMERKUNGEN

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine externe Doktorarbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld. Sie wurde in dem Zeitraum vom 01. März 2006 bis zum 17. März 2010 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Müthing und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Karch am Institut für Hygiene (Leitung: Herr Prof. Dr. Dr. h. c. H. Karch) der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster angefertigt. Die Finanzierung der Arbeit erfolgte durch das Deutsche Forschungsgemeinschaft-Schwerpunktprogramm 1130 "Infektionen des Endothels" (Projekt: KA 717/4-3) sowie durch das interdisziplinäre Zentrum für klinische Forschung Münster (Projekte: Ka2/061/04 und Me2/023/08). Im Zeitraum vom 01. Juni 2007 bis zum 31. Dezember 2009 wurde die Arbeit assoziiert zur internationalen Graduiertenschule der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (GRK 1409/1) "Molecular Interactions of Pathogens with Biotic and Abiotic Surfaces" bearbeitet.

Danksagung

Im Folgenden möchte ich herzlich allen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich im Einzelnen bei folgenden Personen:

Zunächst möchte ich meinem Erstbetreuer Prof. Dr. Dr. h.c. Helge Karch danken, der mir neben der Betreuung dieser Arbeit auch Einblicke in die Entscheidungsfindung in der Forschungslandschaft und die Gestaltung von wissenschaftlichen Präsentationen gewährte. Nicht vergessen werde ich auch die nichtwissenschaftlichen Lehren, die er mir vermittelte.

Meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Johannes Müthing möchte ich für die kritische Begutachtung meiner Forschungsergebnisse sowie der Kreativität danken, mit der er den Forschungsansatz vorangetrieben hat. Außerdem möchte ich für die Durchsicht aller veröffentlichten Forschungsergebnisse danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Noll möchte ich für die Übernahme des Drittgutachtens bedanken.

Frau Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinić danke ich für die Etablierung von Kooperationen innerhalb des Nano2Life-Forschungsverbundes, die mir erlaubten, meine Fragestellung mit *state of the art*-Techniken zu bearbeiten.

Für die Möglichkeit, an dem digital holographischen Mikroskop zu messen, die Technik zu erlernen und das entgegengebrachte Vertrauen möchte ich der Gruppe um Prof. Gert von Bally vom Center of Biomedical Optics and Photonics danken. Insbesondere Dr. Björn Kemper und Dr. Patrik Langehanenberg sind hier hervorzuheben, die mit mir über die ganze Dauer der Promotion viele Lösungen zu Problemen gefunden haben und immer ein offenes Ohr hatten. Aber auch Frau Heike Vollmer und Stefanie Ketelhut, die mir bei der Auswertung der Daten und der Betreuung der Langzeitmessungen sehr behilflich waren gilt mein Dank.

Prof. Dr. Rudolf Reichelt und Frau Christiane Rasch danke ich für die Möglichkeit das Rasterelektronenmikroskop nutzen zu können und die investierte Arbeit in die Aufnahme der Bilder und deren Bearbeitung.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Peters, insbesondere Dr. Jana Hüve und Dr. Martin Kahms, danke ich für die Einführung in die konfokale Laser Scanning Mikroskopie und die 4 Pi-Mikroskopie. Sie brachten mir all mein Wissen über die Funktionsweise der Mikroskope bei, waren stets hilfsbereit und hatten immer Messzeit für mich.

Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf und Herrn Dipl. Biol. Henning Harrer am Institut für Lebensmittelchemie haben mir die Messung am FACS-Gerät ermöglicht, wobei Herr Harrer mir die Funktionweise des Gerätes näher brachte und mir wertvolle Hinweise für die Präparation der Zellen gab. Auch dafür möchte ich danken.

Herrn PD. Dr. Joachim Wegener (ehemals am Institut für Biochemie) möchte ich für die Möglichkeit zur Messung am ECIS-System danken, die mich auf die richtige Fährte gelenkt haben.

Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinić danke ich für die Zeit, die ich in ihrem Institut verbringen durfte.

Herr Thomas Fröhlig danke ich herzlich für die Unterstützung mit Geräten, die erfolgreich in den Laboralltag integriert werden konnten und die Produktion des Rasputins.

Die Vollblut-Forscherin Frau Dr. Martina Bielaszewska war stets offen für wissenschaftliche Diskussionen, die mich häufig inspirierten. Außerdem danke ich ihr für die großzügige Bereitstellung von Shiga Toxinen und die Unterstützung bei der Erstellung englischsprachiger Dokumente.

Mein Dank gilt auch den direkten Mitstreitern am Institut für Hygiene, namentlich Dr. Anne Müsken, Dr. Thomas Aldick und Dr. Jens Brockmeyer, die zeitgleich mit mir an ihrer Promotion arbeiteten. Sie ermöglichten ein harmonisches Arbeitsklima und entwickelten einen prima Teamgeist.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Institute bedanken, denen ich zugehörig war und deren Namen und einzelne Verdienste hier den Rahmen sprengen würden. Nur soviel: Ohne sie wären sicherlich viele Fragen offen geblieben und ich hätte

kaum einen Bruchteil des Spaßes gehabt, den mir die Zeit in Münster bereitet hat. Ihr wart toll!

Ich danke allen, die meine Arbeit Korrektur-gelesen und mich während der letzten zwei Monate der Anfertigung dieser Arbeit ausgehalten haben. Besonders hervorzuheben sind Julia "Ju" Usbeck, Referenz-Lisa Kunsmann und Lieblings-Anne Müsken, die für mich und diese Arbeit zu unmenschlichen Zeiten da waren und mich nicht nur moralisch sehr unterstützt haben. Der "Damencrew der letzten Nachtschicht", die mich bis zur letzten Sekunde auf der Suche nach Fehlern begleitet haben, danke ich ganz besonders herzlich!

Natürlich gehört meine Dankbarkeit für immer meinen Eltern und meiner Familie, die mir den Weg geebnet haben zu dem, was ich heute bin und die immer unterstützend hinter mir standen. Ohne Euch wäre ich nicht(s)!

Publikationsliste

Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt vorab publiziert beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht:

Bauwens, A., Bielaszewska, M., Kemper, B., Langehanenberg, P., von Bally, G., Reichelt, R., Friedrich, A.W., Kim, K.S., Karch, H., Müthing, J. (2010) Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thromb Haemost (in press)*.

Kemper*, B., Bauwens*, A., Vollmer, A., Ketelhut, S., Langehanenberg, P., Müthing, J., Karch, H., von Bally, G. (2010) Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt* **15**: 036009.

* geteilte Erstautorenschaft

Bielaszewska*, M., Bauwens*, A., Greune, L., Kemper, B., Dobrindt, U., Geelen, J.M., Kim, K.S., Schmidt, M.A., Karch, H. (2009) Vacuolisation of human microvascular endothelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Thromb Haemost* **102**: 1080-1092.

* geteilte Erstautorenschaft

Bauwens, A., Bielaszewska, M., Reichelt, R., Kemper, B., Langehanenberg, P., von Bally, G., Peter-Katalinić, J., Müthing, J., Karch, H. (2008) A comparative study of Shiga toxin action on endothelial cells. *Int J Med Microbiol* **298S2**: 26.

Kosmeier, S., Kemper, B., Langehanenberg, P., Bredebusch, I., Schnekenburger, J., Bauwens, A., von Bally, G. (2008) Determination of the integral refractive index of cells in suspension by digital holographic phase contrast microscopy. *Proc SPIE* **6991**: 699110.

Bauwens, A., Bielaszewska, M., Karch, H., Schweppe, C.H., Reichelt, R., Kemper, B., Langehanenberg, P., von Bally, G., Peter-Katalinić, J., Müthing, J. (2007) Investigation of Shiga-toxin 1 induced cellular damage. *Int J Med Microbiol* **297S1**: 57-58.

Kosmeier, S., Kemper, B., Langehanenberg, P., Bredebusch, I., Schnekenburger, J., Bauwens, A., von Bally, G. (2007) Digitalholographische Refraktometrie lebender Zellen in Suspension. *Proc DGaO* 2007.

Kongressbeiträge

- 09/08 60. Jahrestagung: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Dresden
Poster: A Comparative Study of Shiga Toxin Action on Endothelial Cells.
- 06/08 Summerschool des Graduiertenkollegs 1409 "Pathogen - Host Interactions at Cellular Barriers", Münster
Poster: Investigation of Shiga Toxin induced Endothelial Cell Damage.
- 03/08 Joint meeting des GRK1409/1 mit dem Graduiertenkolleg 685 "Human and Plant Pathogenic Bacteria and Fungi", Kleinwalsertal
Vortrag: How Shiga Toxins Act on the Endothelium: Insights by Scanning Electron Microscopy and Digital Holographic Microscopy.
- 10/07 59. Jahrestagung: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen
Poster: Investigation of Shiga Toxin 1 Induced Cellular Damage.
- 12/06 3rd Münster Conference on Single Cell and Molecule Technologies, Münster
Poster: Application of Nanotechnologies for Analyzing Virulence Factors of Pathogenic Bacteria: Shiga Toxin 1-caused Damage of Human Brain Microvascular Endothelial Cells.
- 09/06 Nano2Life Scientific Meeting, Cork, Irland
Poster: Functional Analysis of Shiga Toxin 1 Interactions with Human Brain Microvascular Endothelial Cells.

03/06 Nano2Life Annual Meeting, Sitges, Spanien
Poster: Towards Functional Analysis of Toxin Interactions with Mammalian Cells.

2 INHALTSVERZEICHNIS

1	VORBEMERKUNGEN	I
	Danksagung	II
	Publikationsliste	V
	Kongressbeiträge	VII
2	INHALTSVERZEICHNIS	1
3	THEORETISCHER HINTERGRUND.....	5
3.1	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	5
3.1.1	Historie und Nomenklatur	5
3.1.2	Serotypen	7
3.1.3	Reservoir und Transmission von EHEC	8
3.1.4	Pathogenese und Pathomechanismen der EHEC-Infektion	9
3.2	Shiga Toxin-unabhängige EHEC-Virulenzfaktoren.....	12
3.2.1	EHEC-Adhäsine	13
3.2.2	EHEC-Toxine	14
3.2.2.1	Das <i>cytolethal distending toxin</i>	14
3.2.2.2	Das EHEC-Hämolysin.....	15
3.2.2.3	Das Subtilase Zytotoxin	16
3.2.2.4	Das EHEC vakuolisierende Toxin.....	17
3.2.3	EHEC-Serinproteasen.....	17
3.3	Shiga Toxine	18
3.3.1	Aufbau und Struktur	19
3.3.2	Der zelluläre Rezeptor Globotriaosylceramid	21
3.3.3	Internalisierung und Prozessierung.....	23
3.3.4	Wirkungsmechanismen von Shiga Toxinen.....	24
3.4	Endothelzellen	27
3.5	Zielsetzung.....	29
4	MATERIAL UND METHODEN.....	31
4.1	Chemikalien	31

4.2 Geräte	31
4.3 Toxine.....	33
4.3.1 Produktion und Aufreinigung der Toxine	33
4.4 Zellkultivierung.....	35
4.4.1 Verwendete Zelllinien	35
4.4.1.1 Humane mikrovaskuläre Gehirndothel-Zellen	35
4.4.1.2 Die Fusionszelllinie EA.hy 926.....	35
4.4.2 Verwendete Kultur- und Experimentalsysteme	36
4.4.2.1 Kultursystem Gewebekulturflasche.....	36
4.4.2.2 Kultursystem Superspinner.....	37
4.4.2.3 Experimentalsystem Multititer-Platte	38
4.4.2.4 Experimentalsystem <i>chamber slide</i>	38
4.4.2.5 Experimentalsystem μ -dish.....	38
4.4.2.6 Microcarrier: Cytodex 3™	39
4.5 Handhabung der Zellen.....	40
4.5.1 Kalzium- und magnesiumfreie, phosphatgepufferte Salinelösung	40
4.5.2 Kulturmedien	41
4.5.2.1 Medium für mikrovaskuläre Endothelzellen	41
4.5.2.2 Medium für makrovaskuläre Endothelzellen	42
4.5.3 Passagierung von Zellen.....	42
4.5.4 Kryokonservierung von Zellen	43
4.6 offline-Analytik von Kultivierungsprozessen	44
4.6.1 Zelldichtebestimmung	44
4.7 Zellbasierte Assays.....	45
4.7.1 Proliferationsassay WST-1	45
4.7.2 Zytotoxizitätsassay nach dem Vorbild des <i>vero cell assays</i>	45
4.7.3 DNA-Fragmentierungsassay.....	46
4.8 Mikroskopische Techniken.....	47
4.8.1 Lichtmikroskopie.....	47
4.8.2 Fluoreszenzmikroskopie	47
4.8.2.1 Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie.....	48
4.8.2.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine	49

4.8.2.3	Vorbereitung des Zellpräparates für die Fluoreszenzmikroskopie	50
4.8.2.4	Das Fluoreszenzmikroskop	51
4.8.3	Digital holographische Mikroskopie	52
4.8.3.1	Präparation der Probe für die digital holographische Mikroskopie	53
4.8.3.2	Das digital holographische Mikroskop	54
4.8.3.3	Datenverarbeitung nach den Messungen	56
4.8.4	Rasterelektronenmikroskopie	56
4.8.4.1	Vorbereitung des Präparats für die Rasterelektronenmikroskopie	56
4.8.4.2	Das Rasterelektronenmikroskop	57
4.9	Durchflusszytometrie.....	58
4.9.1	Vorbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung von Zellzyklus und Stx-Rezeptordichte	58
4.9.2	Das Durchflusszytometer	60
4.9.3	Datenverarbeitung nach der Durchflusszytometrie-Messung.....	60
4.10	Elektrische Zell-Substrat Impedanz Messung	63
4.11	Statistische Auswertung	64
5	ERGEBNISSE	65
5.1	Unterschiedliche Wirkungsweisen von Stx1 und Stx2 auf mikro- und makrovaskuläre Endothelzelllinien	65
5.1.1	Toxin-bedingte Wachstumsinhibition von Endothelzellen	65
5.1.2	Unterschiedliche Zytotoxizitäten von Stx gegenüber Endothelzelllinien	69
5.1.3	Morphologische Änderungen von Endothelzelllinien durch Stx.....	71
5.1.4	Untersuchungen des Toxin-bedingten Zelltods mittels Einzelzellanalyse	76
5.1.5	Zellzyklusuntersuchungen von Endothelzellen nach Toxinbehandlung	79
5.1.6	Der Unterschied von Stx1 und Stx2 in ihren nekrotischen und apoptotischen Wirkungen	80
5.2	Inhomogenität der endothelialen Zellkulturen bezüglich der Wirkung von Stx	84
5.2.1	Variierende Todeszeitpunkte von Einzelzellen	84
5.2.2	Unterschiedliche Gb3Cer-Expression in der Zellkultur	86
5.2.3	Zellzyklus-abhängige Stx-Rezeptorexpression auf Endothelzellen	89
5.3	Charakterisierung des vakuolisierenden Toxins EHEC-Vac.....	92
5.3.1	Identifizierung des Ursprungs der Vakuolen	92

5.3.2	Bestimmung der Art des Zelltodes durch EHEC-Vac.....	94
5.3.3	Zellteilungsüberwachung von HBMECs mittels digital holographischer Mikroskopie	95
6	DISKUSSION UND AUSBLICK	100
6.1	Zelluläre Schädigungen von humanen Endothelzellen durch Shiga Toxine	100
6.1.1	Unterschiedliche Pathomechanismen von Stx1 und Stx2 bei humanen Endothelzelllinien	101
6.1.2	Differentielle Sensitivitäten von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen....	101
6.2	Vakuolisierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch EHEC-Vac.....	104
6.3	Etablierung eines Verfahrens zur dynamischen Überwachung der Zellteilung mittels DHM	105
7	ZUSAMMENFASSUNG	106
8	LITERATURVERZEICHNIS	109
9	ANHANG.....	128
9.1	Abkürzungsverzeichnis	128
9.2	Abbildungsverzeichnis	132
9.3	Lebenslauf	134
9.4	Erklärung	135

3 THEORETISCHER HINTERGRUND

Escherichia coli (*E. coli*) gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und sind eine genetisch heterogene Spezies von Bakterien. Typischerweise sind sie apathogen und Teil der physiologischen Flora des Gastrointestinaltraktes bei Mensch und Tier. *E. coli* kolonisiert diesen beim Menschen innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. Im Normalfall koexistieren kommensale *E. coli* und der Wirt symbiotisch und verursachen nur in immunsupprimierten Wirten oder bei Läsionen des Darmepithels Erkrankungen. Sie konkurrieren mit fakultativen Anaerobiern um die Besiedlung der Mukosaschicht des Kolons von Säugetieren. Einige Stämme von *E. coli*-Klonen erlangten über horizontalen Gentransfer neue genetische Elemente, die beispielsweise zu einer verbesserten Anpassung an neue biologische Nischen führten. Die sogenannten Virulenzfaktoren können auf mobilen genetischen Elementen kodiert sein, die auch an andere Stämme weitergegeben werden können, oder sie liegen stabil im Genom integriert vor. Durch die Kombination verschiedener Virulenzmerkmale entstehen neue *E. coli*-Pathotypen, die beim Menschen zu intestinalen oder extraintestinalen Erkrankungen führen können.

3.1 Enterohämorrhagische *Escherichia coli*

3.1.1 Historie und Nomenklatur

Die humanpathogenen *E. coli* wurden bezüglich ihrer Virulenzfaktoren und Pathomechanismen klassifiziert (Nataro and Kaper, 1998). Zur Entdeckung der *enterohämorrhagischen E. coli* (EHEC) führten zwei epidemiologische Beobachtungen im Jahr 1983: Zum einen wurde von Karmali *et al.* ein Stamm in Stuhlproben von Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) entdeckt, der ein Zytotoxin mit einem hohen toxischen Potential gegen Verozellen (Zelllinie aus Nierenepithelzellen von grünen Meerkatzen) sezerniert (Karmali *et al.*, 1983a). Zum anderen beschrieben Riley *et al.* die Untersuchung zweier Ausbrüche gastrointestinaler Erkrankungen, die mit nicht durchgegarten Hamburgerfrikadellen in einem Fastfood-Restaurant in Verbindung gebracht werden konnten (Riley *et al.*, 1983). Aus den Stuhlproben der an

hämorrhagischer Kolitis (engl.: *hemorrhagic colitis*, HC) erkrankten Patienten konnte ebenfalls ein Serotyp von *E. coli* nachgewiesen werden, welcher ein Zytotoxin sezerniert.

Der von Karmali *et al.* (1983a) durchgeführte Zytotoxizitätstest auf Verozellen wurde ursprünglich von Konowalchuk *et al.* (1977) publiziert. Da sich der Effekt der toxischen Kultur-Filtrate deutlich von dem der bekannten enterotoxischen *E. coli* unterschied, wurde das Toxin zunächst Vero Toxin und die produzierenden Stämme Vero Toxin-produzierende *E. coli* (VTEC) genannt. Etwa zeitgleich konnte von O'Brien *et al.* gezeigt werden, dass Überstände von diesen *E. coli*-Stämmen zytotoxische Effekte auf HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinom-Zelllinie) haben und diese durch Antikörper gegen das Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* Serotyp 1 neutralisiert werden können (O'Brien *et al.*, 1977 und 1980). Diese wurden folglich Shiga-like Toxine (SLT) und die Stämme SLT-produzierende *E. coli* (STEC) genannt. Es wurde anschließend gezeigt, dass SLT und Vero Toxin identisch sind und auch der von Riley isolierte *E. coli*-Stamm des Serotyps O157:H7 dieses Toxin sezerniert (O'Brien *et al.*, 1983). Schließlich stellten Karmali *et al.* die These auf, dass SLT bzw. Vero Toxin der gemeinsame Virulenzfaktor bei HC und HUS ist (Karmali *et al.*, 1983b). Aufgrund dieser historisch begründet verwirrenden Nomenklatur und deren Gebrauch auch in der aktuellen Literatur, wird in dieser Arbeit mit Shiga Toxin (Stx) immer das Toxin der EHEC bezeichnet.

Die Bezeichnung des Pathotyps "enterohämorrhagische *E. coli*" wurde zunächst von Levine *et al.* (1987) mit der Definition eingeführt, dass diese mit der CVD419-Sonde hybridisieren. Inzwischen ist diese Definition erweitert worden, sodass heute alle *E. coli*-Stämme zu den EHEC gezählt werden, die humanpathogen sind und beim Menschen Durchfälle, HC oder HUS verursachen, Stx exprimieren, eine *attaching and effacing* (A/E)-Läsion an Epithelzellen ausbilden und über das 60 MDa große Virulenzplasmid verfügen (Paton and Paton, 1998; Nataro and Kaper, 1998).

3.1.2 Serotypen

Die verschiedenen Pathotypen der *E. coli* sind häufig klonale Gruppen, die durch gemeinsame O- (Ohne Hauch, basiert auf Lipopolysacchariden, LPS) und H- (Hauch, basiert auf Geißeln) Antigene charakterisiert werden können (Kauffmann, 1944). Dabei unterscheidet man zwischen Serogruppen (nur O-Antigene) und Serotypen (O- und H-Antigene). Synonym zum Begriff des Serotypen wird auch die Bezeichnung Serovar (kurz für *Serovarietas*) verwendet. Zudem können *E. coli* anhand ihrer unterschiedlichen Kapselantigene (K-Antigene) differenziert werden (Ørskov *et al.*, 1977; Ørskov and Ørskov, 1992). Seit Einführung dieser Klassifizierungsmethode wurden bereits mehr als 180 verschiedene O-Antigene, ~ 60 H-Antigene und ~ 80 K-Antigene beschrieben (Whitfield and Roberts, 1999; Robins-Browne and Hartland, 2002; Gyles, 2007). Weltweit wurden bisher über 500 EHEC-Stämme serotypisiert (Bettelheim, 2007). Vielfach sind EHEC-Stämme auch unbeweglich (engl.: *nonmotile*, NM). So findet man neben dem häufigsten Vertreter der HUS-assoziierten EHEC-Stämme, dem Serotyp O157:H7, auch den Sorbitol-fermentierenden (SF) EHEC O157:NM als häufige Ursache für HUS-Erkrankungen in Europa (Karch *et al.*, 1990, 1993; Bielaszewska *et al.*, 1998; Eklund *et al.*, 2006). In Deutschland stellt dieser Serotyp die zweithäufigste Ursache von HUS-Fällen dar (Friedrich *et al.*, 2002; Karch *et al.*, 2005). Die Assoziation von Serogruppen mit unterschiedlich schweren Krankheitsverläufen beim Menschen führte zu einer Klassifizierung in fünf Seropathotypen (Karmali *et al.*, 2003). Der Seropathotyp A beinhaltet die hoch-virulenten Serotypen O157:H7 und O157:NM. Zu Seropathotyp B zählen O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 und O145:NM, die ebenfalls schwere Krankheitsverläufe und Ausbrüche verursachen können, allerdings seltener gefunden werden. Der Sero-pathotyp C besteht aus Serotypen, die zwar sporadisch das HUS verursachen, aber nicht mit Ausbrüchen in Verbindung gebracht wurden, wie beispielsweise O91:H21 und O113:H21. Serotypen der Pathotypen D und E sind solche Stämme, die nur selten zu Diarrhö führen oder nicht als relevante humanpathogene Erreger gelten.

Aufgrund der enormen genetischen Diversität von EHEC, die auf Insertionen und Deletionen sowie Bakteriophagen zurückzuführen ist (Kudva *et al.*, 2002; Shaikh and Tarr, 2003; Nielsen *et al.*, 2006), müssen diese über die Serotypisierung hinaus subtypisiert

werden, um epidemiologische Untersuchungen durchzuführen sowie ein Frühwarnsystem bei geographisch zerstreuten Nahrungsmittel-bedingten Ausbrüchen zu etablieren. Weit verbreitete Methoden hierzu stellen die Pulsfeld-Gelelektrophorese, die Multilokus-Sequenz-Typisierung oder die direkte Hybridisierung der pathogenitätsrelevanten Gene mit Hilfe der Chiptechnologie (sog. Pathoarrays) dar. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika von EHEC-Stämmen eines Serotyps werden mit dem Voranschreiten der Genom-Sequenzierungstechnologie zukünftig Klassifizierungen, die auf Gesamtgenomanalysen beruhen, Verwendung finden.

3.1.3 Reservoir und Transmission von EHEC

Mit mehr als 514 isolierten EHEC-Serotypen aus Rinderfäzes stellen Rinder das Hauptreservoir der EHEC dar (Beutin *et al.*, 1993; Bettelheim, 2003; Blanco *et al.*, 2004b). Von den über 470 beim Menschen isolierten EHEC-Serotypen konnten die meisten ebenfalls aus Rindern und/oder Rindfleisch isoliert werden (Beutin *et al.*, 1993; Bettelheim, 2003; Blanco *et al.*, 2004a). Obwohl Rinder als das Hauptreservoir von EHEC gelten, ergaben epidemiologische Studien, dass EHEC auch im Gastrointestinaltrakt anderer domestizierter Tiere (Schweine, Schafe und Ziegen) und Haustieren (Katze und Hund) sowie in Vögeln vorkommen (Karmali, 1989; Beutin *et al.*, 1993; Caprioli *et al.*, 1993; Wray *et al.*, 1994; Kudva *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2000). In den meisten Fällen sind diese Tiere asymptomatische Ausscheider; allerdings führen einige der EHEC-Stämme zu intestinalen Läsionen.

Zur Bestimmung der Prävalenz von EHEC in Rindern wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die sich allerdings in der Methodik des Nachweises unterschieden und so zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen (Gyles, 2007 und zitierte Referenzen). Zudem gibt es Unterschiede bezüglich der Ausscheidung von EHEC: Meist finden sich in Fäzes von Rindern weniger als 100 Kolonie-bildende Einheiten (Kbe) pro Gramm (LeJune *et al.*, 2006), wohingegen in sog. Superausscheidern bis zu 4×10^7 Kbe/g Fäzes nachgewiesen wurden (Fegan *et al.*, 2004; Widiasih *et al.*, 2004).

Die Infektion des Menschen ist zumeist Lebensmittel-bedingt; die häufigste Ursache ist die Aufnahme von Lebensmitteln oder Wasser, welche durch Fäzes oder Darminhalt beim Schlachtvorgang kontaminiert wurden. Zu den Infektionsquellen, welche zu sporadischen Krankheitsfällen oder Ausbrüchen mit mehreren tausend Infizierten führten, zählen Fleisch und Wurstprodukte, Rohmilch, Rohmilchkäse, unpasteurisierter Apfelsaft, Blattsalat, Rettichsprossen sowie Trink- und Badewasser (Erickson and Doyle, 2007; Gyles, 2007). Neben dem direkten Kontakt von Mensch zu Tier, beispielsweise in Streichelzoos oder in der Landwirtschaft, ist auch die Transmission von EHEC von Mensch zu Mensch durch Schmierinfektionen dokumentiert worden (Griffin *et al.*, 1991; Reida *et al.*, 1994). Als Ursachen für die bisher größten Ausbrüche wurden unvollständig durchgegarnte Hamburgerfrikadellen (1993, USA, 50 HUS-Fälle; Griffin *et al.*, 1994) und Rettichsprossen (1996, Japan, über 100 HUS-Fälle; Fukushima *et al.*, 1997) identifiziert. Aufgrund der langen Persistenz von EHEC in der Umwelt (Varma *et al.*, 2003) und der geringen Infektionsdosis von 50-100 Bakterien, die auf die hohe Säuretoleranz der EHEC zurückgeführt wird (Tilden *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1994), kann eine Infektion auch zeitverzögert erfolgen. Seit 1998 sind gemäß §6 und §7 des deutschen Infektionsschutzgesetzes das enteropathische HUS und der Nachweis von EHEC meldepflichtig. Im Jahr 2008 sind in Deutschland 835 EHEC-Infektionen gemeldet worden (Inzidenz = 1 Fall/100.000 Einwohner); davon 58 HUS-Fälle (Inzidenz = 0,1 Fälle/100.000 Einwohner) (Infektions-epidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008, Robert Koch-Institut).

3.1.4 Pathogenese und Pathomechanismen der EHEC-Infektion

Die klinischen Manifestationen von EHEC-Infektionen sind am besten für Krankheiten, die von EHEC O157:H7 ausgelöst wurden, charakterisiert (Abbildung 1). Nach einer typischen Inkubationszeit von 3-4 Tagen (Bell *et al.*, 1994) entwickeln die Patienten wässrige Diarrhö begleitet von Unterleibskrämpfen. Innerhalb der nächsten Tage verändert sich in 90 % der Fälle die wässrige in eine blutige Diarrhö (Karch *et al.*, 2005). Während etwa 85 % aller Erkrankten 8-12 Tage nach der Infektion spontan genesen, entwickeln bis zu 15 % ein HUS (Bell *et al.*, 1997; Tarr *et al.*, 2005), welches in etwa 3 % der Fälle tödlich

verläuft. Als besondere Risikofaktoren gelten hierbei niedriges oder hohes Alter sowie die Blutgruppe P1.

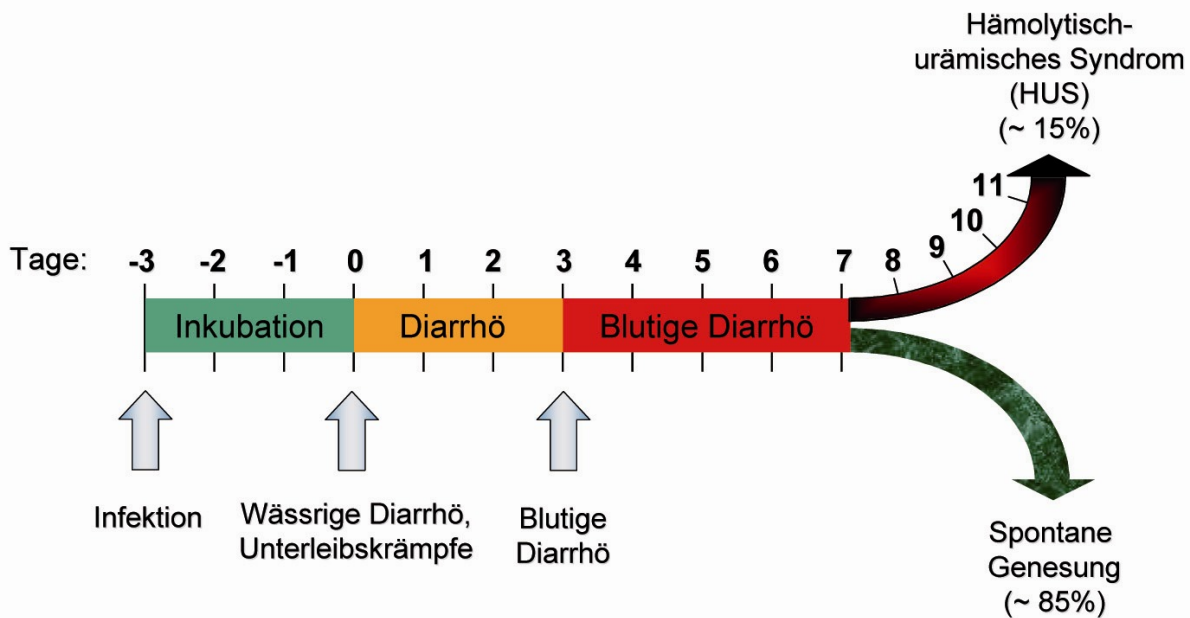


Abbildung 1: Graphische Darstellung des typischen Verlaufs einer EHEC-Infektion (modifiziert nach Tarr *et al.*, 2005).

Als Kriterien für die Diagnose eines HUS können folgende Parameter herangezogen werden: Ein Hämatokrit-Wert von unter 30 % zusammen mit einem lichtmikroskopischen Nachweis von Erythrozyten-Schädigungen (hämolytische Anämie), weniger als $1,5 \times 10^5$ Thrombozyten pro μl Blut (Thrombozytopenie) und einer erhöhten Konzentration von Kreatinin im Serum (Lockitch *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2002). Patienten, die ein HUS entwickeln, leiden an wässriger Diarrhö (87 %), blutiger Diarrhö (60 %), Fieber über $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ zu Beginn der Beschwerden (45 %), neurologischen Symptomen (24 %) wie Reizbarkeit, Lethargie, Krämpfen, Koma und Hirnschlag, Anurie (65 %) und Hypertonie (33 %) (Siegler, 1995; Gerber *et al.*, 2002). In etwa 60 % der Fälle kommt es während der akuten Erkrankungsphase zu einem Nierenversagen, das eine Dialyse erfordert. Zudem entwickelt jedes zehnte Kind mit einem HUS Herzfunktionsstörungen (Brandt *et al.*, 1994). Während die meisten Patienten nach einem HUS vollständig genesen, kommt es bei > 25 % der Patienten zu einer chronischen renalen Insuffizienz (Brandt *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2003). Weitere Spätfolgen eines HUS können Diabetes mellitus, neurologische Funktionsstörungen, Bluthochdruck, Verengung des

Kolons, Gallensteine und Proteinurie oder Hämaturie sein (Karmali, 1989; Siegler, 1995; Brandt *et al.*, 1998).

Von einer Behandlung EHEC-infizierter Patienten mit Antibiotika oder Anti-Motilitäts-Agentien sollte abgeraten werden, da deren Applikation mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines HUS assoziiert werden konnte (Wong *et al.*, 2000; Cimolai *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1997). Stattdessen sollten die Patienten hospitalisiert und mit hypervolämischer Hämodilution behandelt werden (Tarr and Neill, 2001). Etwa 80 % der Patienten, die ein HUS entwickeln, benötigen Erythrozytentransfusionen (Brandt *et al.*, 1994; Tarr *et al.*, 1989). Als Therapieansatz wurde versucht, die Stx mit Rezeptoranaloga oder Anti-Stx-Antikörpern zu neutralisieren sowie probiotische Bakterien mit hochaffinen Stx-Rezeptoren zu bestücken. Jedoch gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Therapie für eine EHEC-Infektion, sondern nur unterstützende Maßnahmen (Andreoli *et al.*, 2002).

Der Pathomechanismus der EHEC-Bakterien im Menschen ist bis jetzt nur teilweise aufgeklärt. Nach der Passage durch das saure Milieu des Magens erfolgt die Besiedelung des Kolons durch Adhäsion an intestinale Epithelzellen. Der am besten charakterisierte EHEC-Adhärenz-Mechanismus ist der Intimin-vermittelte bzw. die *attaching and effacing* (A/E) Adhärenz (Paton and Paton, 1998 und zitierte Referenzen). Nach Kolonisierung werden EHEC-Virulenzfaktoren, insbesondere Stx, produziert. Da die intestinalen Epithelzellen nicht den spezifischen Rezeptor für Stx, das Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77), exprimieren, werden diese Zellen nicht direkt geschädigt. Es kommt zu einer Translokation der Toxine vom Lumen des Kolons in den Blutkreislauf. Die Prozesse, die dieser Translokation zugrunde liegen, sind nicht bekannt. Als mögliche Routen kommen Läsionen der mukosalen Barriere, die durch Stx oder andere EHEC-Virulenzfaktoren verursacht werden, oder Lücken zwischen benachbarten Epithelzellen in Frage. Eine andere Möglichkeit ist der aktive Transport der Stx durch die intakten Epithelzellen (Acheson *et al.*, 1996). Der Transport von Stx in der Blutbahn ist umstritten; einige Studien nennen polymorphokernige Leukozyten als Carrier (Brigotti *et al.*, 2006, 2008), andere widersprechen dieser These (Geelen *et al.*, 2007). Die Stx binden an die Rezeptor-exprimierenden Zielzellen, bei denen es sich hauptsächlich um mikrovaskuläre Endothelzellen handelt und schädigen diese (siehe auch Kapitel 3.3). Durch die Verletzung des Endothels und/oder direkte Stx-vermittelte Vernetzung von Gb3Cer-exprimierenden

Thrombozyten kommt es zur Thrombozytenaggregation und Thrombozytenadhäsion an das Subendothel. Die nicht-adhärenzten Thrombozytenaggregate werden durch das retikuloendotheliale System phagozytiert (Tarr *et al.*, 2005), was zu einer Thrombozytopenie führen kann (Zoja *et al.*, 1992; Karpman *et al.*, 2001). Weiterhin können durch diese Aggregation gebildete Thromben die Kapillaren, besonders von Gehirn und Niere, verstopfen und somit zu schwerwiegenden Organschäden führen. Die der hämolytischen Anämie zugrunde liegenden Hämolyse wird einer mechanischen Fragmentierung der Erythrozyten im geschädigten vaskulären System oder oxidativem Stress zugeschrieben (Zoja *et al.*, 1992).

3.2 Shiga Toxin-unabhängige EHEC-Virulenzfaktoren

Neben den Stx, die als Hauptvirulenzfaktoren der EHEC angesehen werden, ist eine große Anzahl potentieller Virulenzfaktoren identifiziert und teilweise charakterisiert worden. Dazu zählen im Wesentlichen Adhäsine, Toxine und Serinproteasen. Nicht jeder EHEC-Stamm weist eine hohe Virulenz auf (Karmali *et al.*, 2003) und HUS kann auch von Stämmen verursacht werden, die kein Stx exprimieren (Schmidt *et al.*, 1999). Daher werden diese Stx-unabhängigen Faktoren, welche die Pathogenese durch Eingriff in zelluläre oder systemische Vorgänge potentiell beeinflussen können, kurz vorgestellt. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren wird im Folgenden nur auf die Wichtigsten eingegangen. Eine gute Übersicht über die potentiellen Virulenzfaktoren der EHEC liefert Gyles (Gyles, 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Produktion verschiedener Stx-unabhängiger Virulenzfaktoren mit Endothel-schädigenden Eigenschaften von EHEC-Stämmen, die mit schweren Krankheitsverläufen wie HC und HUS assoziiert sind, eine Neubewertung der Gefahrenpotentiale der Nicht-Stx-Determinanten zur Folge haben sollte. Die Wechselwirkungen der Toxine und deren Effekte auf den Wirt sind wenig untersucht und es ist fraglich, ob nicht ein Zusammenspiel der Virulenz-determinanten die Schwere eines Infektionsverlaufes beeinflusst.

3.2.1 EHEC-Adhäsine

Adhäsine sind essentielle Faktoren für die Persistenz der EHEC im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier. Durch die Fähigkeit, an eine Vielzahl von biotischen und abiotischen Oberflächen zu adhären, kann der Erreger eine Nische, die ihrerseits durch verschiedene wirtsspezifische Rezeptoren bzw. Oberflächen definiert wird, erfolgreich besiedeln (Gerlach and Hensel, 2007). Zudem stellt die Kolonisierung den initialen Schritt des Infektionsprozesses dar, da sich nur diejenigen EHEC der Darmperistaltik widersetzen können, die am Darmepithel adhären. Die Bindung der Bakterien kann wirtsseitig zur Aktivierung von Signalkaskaden in Darmepithelzellen führen, die beispielsweise eine Immunantwort oder eine Umorganisation des Zytoskelettes initiieren. Diese wiederum beeinflussen die Genexpression der Bakterien, die pathorelevant ist (Soto and Hultgren, 1999). Um der Immunantwort zu entgehen, ohne dabei jedoch die Adhäsivität zu verlieren, können die Bakterien die Expression ihrer eigenen Oberflächenstrukturen variieren (antigenische Variation) und/oder modulieren (Phasenvariabilität). Dies gilt insbesondere für nicht-fimbrielle und fimbrielle EHEC-Adhäsine.

Die Bindung der EHEC an das intestinale Epithel erfolgt nach bisherigem Kenntnisstand Intimin-vermittelt (Tzipori *et al.*, 1995; Nataro and Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Dabei geht der Bürstensaum des Darmepithels verloren und es kommt zellseitig zur typischen Ausbildung von podestartigen Ausstülpungen (A/E-Läsion), die durch Veränderungen im Aktin-Zytoskelett zu erklären sind. Dieser Phänotyp ist genetisch auf eine Pathogenitätsinsel, die als *locus of enterocyte effacement* (LEE) bezeichnet wird, zurückzuführen (Nataro and Kaper, 1998). Dieser etwa 43,4 kb umfassende chromosomale Bereich enthält die Gene *eae* (engl.: *E. coli attaching and effacing*), welches für das Protein Intimin kodiert, ein Typ III-Sekretionssystem, den Intimin-Rezeptor *tir* (engl.: *translocated intimin receptor*) und das Sekretionssystem *esp* (engl.: *E. coli secreted proteins*) (McDaniel *et al.*, 1995; Jarvis and Kaper, 1996; Perna *et al.*, 1998). Nicht alle EHEC besitzen das *eae*-Gen, doch konnten *eae*-positive Stämme mit einer erhöhten Gefahr für die Entwicklung eines HUS assoziiert werden (Ethelberg *et al.*, 2004). Zu den nicht-fimbriellen Adhäsinen zählen zudem der EHEC-Adhärenzfaktor EfaI (engl.: *EHEC factor for adherence*) (Nicholls *et al.*, 2000; Janka *et al.*, 2002), das chromosomale Iha (engl.: *IrgA homologue adhesin*) (Tarr *et al.*, 2000), OmpA (engl.: *outer membrane protein A*) (Torres and Kaper, 2003), Saa (engl.:

STEC autoagglutinating adhesin) (Paton *et al.*, 2001) und das plasmidkodierte Toxin B (Tatsuno *et al.*, 2001). Die Funktion dieser im Adhäsionsprozess ist nur teilweise charakterisiert (Gyles, 2007).

Insgesamt enthält das Genom von EHEC O157:H7 16 Gencluster, die fimbrielle Adhäsine kodieren (Low *et al.*, 2006); wobei allerdings bislang nur die Expression einiger davon beobachtet wurde. Zu den fimbriellen Adhäsinen gehören die langen, polaren Fimbrien (engl.: *long polar fimbriae*, Lfp) (Doughy *et al.*, 2002), Sfa (engl.: *S fimbriae major subunit*) (Spears *et al.*, 2006) und Sfp (engl.: *sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded*) (Brunder *et al.*, 2001). Sfp-Fimbrien sind auf dem großen Virulenzplasmid der (SF) EHEC O157:NM kodiert (Friedrich *et al.*, 2004) und wurden kürzlich in einigen EHEC O165:H25/NM-Stämmen gefunden (Bielaszewska *et al.*, 2009a). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Sfp-Fimbrien durch ein mikroaerophiles Milieu induziert wird (Müsken *et al.*, 2008).

3.2.2 EHEC-Toxine

3.2.2.1 Das *cytolethal distending toxin*

Das *cytolethal distending toxin* (CDT) wurde von Janka *et al.* im Isolat 493/89 SF EHEC O157:NM entdeckt (Janka *et al.*, 2003) und als neues Mitglied der CDT-Familie CDT-V benannt. Weitere Arbeiten ergaben, dass CDT-V von der Mehrzahl der SF EHEC O157:NM (Janka *et al.*, 2005), einigen EHEC O157:H7 (speziell von Stämmen, die bestimmten Phagentypen zugeordnet sind) (Friedrich *et al.*, 2006) und einzelnen Nicht-O157 EHEC produziert wird (Bielaszewska *et al.*, 2004). CDT-V wird durch ein Gencluster kodiert, das die drei Untereinheiten des Toxins, *cdt-A*, *cdt-B* und *cdt-C*, beinhaltet (Janka *et al.*, 2003). Wie andere Mitglieder der CDT-Toxinfamilie (Thelestam und Frisan, 2004; Smith and Bayles, 2006) ist CDT-V ebenfalls primär ein Genotoxin. Die B-Untereinheit des CDT-V, die eine DNAase-I-ähnliche Aktivität besitzt, verursacht Doppelstrangbrüche in der DNA von Säugerzellen (Bielaszewska *et al.*, 2005). Mit den DNA-Reparaturmechanismen einhergehend wird der Zellzyklus in der G₂-Phase arretiert, was nachfolgend zu apoptotischem

oder nicht-apoptotischem Zelltod führt (Bielaszewska *et al.*, 2005). Der genotoxische und Zellzyklus-modulierende Effekt wurde für humane mikrovaskuläre Endothelzellen, welche die Primärziele während des HUS darstellen, gezeigt (Bielaszewska *et al.*, 2005). Daher kann davon ausgegangen werden, dass CDT-V zur Pathogenese der Krankheit beiträgt.

3.2.2.2 Das EHEC-Hämolysin

Das EHEC-Hämolysin wurde von Schmidt *et al.* als ein neues Hämolysin von *E. coli*, das auf dem großen Plasmid von EHEC O157:H7 (pO157) kodiert ist, entdeckt (Schmidt *et al.*, 1994, 1995, 1996a). Das pO157 besitzt ein Operon mit den Genen EHEC-*hlyC*, EHEC-*hlyA*, EHEC-*hlyB* und EHEC-*hlyD*, die 61-69 %ige Nukleotid-Sequenzhomologien zu den Genen des *hlyCABD*-Operons aufweisen, welches für *E. coli* α -Hämolysin kodiert (Welch, 2001). EHEC-*hlyA* kodiert für das 107 kDa große Protein EHEC-Hly, das für den typischen enterohämolytischen Phänotyp (eine begrenzte Hämolyse, welche sich von der vollständigen Hämolyse durch α -Hämolysin unterscheidet) von Erythrozyten auf Blutagar verantwortlich ist (Schmidt *et al.*, 1995). Es mehren sich Hinweise, dass EHEC-*hlyB* und EHEC-*hlyD*, analog zu α -Hämolysin, den Transport von EHEC-HlyA aus der Bakterienzelle vermitteln und EHEC-*hlyC* für die posttranslationale Aktivierung von EHEC-Hly benötigt wird (Schmidt *et al.*, 1995, 1996a).

Bezüglich seiner Aktivität ist EHEC-Hly ein porenformendes Toxin, das der Gruppe der RTX (engl.: *repeat-in-toxin*)-Toxine zugeordnet wird (Schmidt *et al.*, 1996b). Zusätzlich zu der Fähigkeit Erythrozyten verschiedener Spezies und bovine Lymphozyten zu lysieren (Bauer and Welch, 1996), wirkt EHEC-Hly auch zeit- und dosisabhängig zytolytisch auf humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Aldick *et al.* 2007) und ist damit potentiell an deren Schädigung während eines HUS mitverantwortlich. Neben der direkten Zytotoxizität ist EHEC-Hly in der Lage, die Abgabe des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β) von Monozyten auszulösen (Taneike *et al.* 2002). Da IL-1 β zu den Zytokinen gehört, die den Stx-Rezeptor Gb3Cer auf Endothelzellen hochregulieren (Ramegowda *et al.*, 1999), kann EHEC-Hly den Effekt von Stx auf das Endothel verstärken und so indirekt zur Endothelschädigung beitragen. Die Beteiligung von EHEC-Hly an der HUS-Pathogenese wird zum einen durch den Nachweis spezifischer Antikörper gegen EHEC-Hly in 19 von 20 Patientenseren nach einem HUS unterstützt (Schmidt *et al.*, 1995). Zum

anderen zeigten epidemiologische Untersuchungen, dass EHEC-Hly von einem Großteil der Stämme produziert wird, die zu den HUS-auslösenden Serogruppen gehören (O26, O103, O111, O145, O157) (Schmidt *et al.*, 1996b, 1999; Mellmann *et al.*, 2005; Bielaszewska *et al.*, 2007).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass EHEC-Hly nicht nur in freier Form, sondern auch Membranvesikel (MV)-assoziiert während des Wachstums von EHEC-Stämmen sezerniert wird (Aldick *et al.*, 2009). Die dadurch bis zu 80-fach erhöhte Stabilität und verlängerte hämolytische Aktivität verstärkt das biologische Schädigungspotential gegenüber den Erythrozyten (Aldick *et al.*, 2009), wobei die Konsequenzen für die Pathogenese von HUS bislang unbekannt sind. Die hämolytische Anämie ist eine der definierenden klinischen Charakteristika von HUS, allerdings konnte die Beteiligung von EHEC-Hly an diesem Prozess noch nicht bewiesen werden.

3.2.2.3 Das Subtilase Zytotoxin

Das Subtilase Zytotoxin (SubAB) (Paton *et al.*, 2004) ist ein AB₅-Toxin, welches auf dem großen Plasmid von EHEC O113:H21 kodiert ist. Es ist zusammengesetzt aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit, die Sequenz-Gemeinsamkeiten zu einer Subtilase-ähnlichen Serinprotease von *Bacillus anthracis* aufweist und fünf identischen B-Untereinheiten, die mit einem von *Yersinia pestis* exportierten Protein verwandt sind (Paton *et al.*, 2004). Die zytotoxische Aktivität von SubAB beruht auf der Fähigkeit, in die Zellen einzudringen und spezifisch das essentielle Chaperon BiP (GRP78) des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zu spalten (Paton *et al.*, 2006), was zu einer Stressantwort des ERs führt (Wolfson *et al.*, 2008). Eine intraperitoneale Injektion von gereinigtem Subtilase Zytotoxin in Mäuse führt zu extensiven mikrovaskulären Thrombosen und Nekrosen in Nieren, Gehirn und Leber (Paton *et al.*, 2004), die den Läsionen in Organen von Patienten mit HUS ähneln (Richardson *et al.*, 1988). Diese Befunde lassen vermuten, dass SubAB auch zur Pathogenese von EHEC im Menschen beitragen könnte. Allerdings bindet die B-Untereinheit mit hoher Präferenz Glykane mit der terminalen Sialinsäure N-Glykolylnneuraminsäure, die in Menschen zwar nicht synthetisiert wird, aber mit der Nahrung aufgenommen und inkorporiert werden kann (Byres *et al.*, 2008). Obwohl die genaue

Mitwirkung des Toxins bei durch EHEC ausgelösten Erkrankungen unbekannt ist, konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von BiP durch SubAB den Stx-Transport beeinflussen kann (Yu and Haslam, 2005).

3.2.2.4 Das EHEC vakuolisierende Toxin

Das EHEC vakuolisierende Toxin (EHEC-Vac) ist im Rahmen der Arbeiten für die vorliegende Dissertation als EHEC-Toxin, das primäre humane glomeruläre Endothelzellen (engl.: *glomerular microvascular endothelial cells*, GMVECs) und humane mikrovaskuläre Gehirndothelzellen (HBMECs) vakuolisiert und zur Nekrose führt, identifiziert worden (Bielaszewska *et al.*, 2009b). EHEC-Vac bindet schnell und irreversibel an HBMECs, woraufhin eine Vakuolenbildung innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe zu beobachten ist. Nach 48 Stunden sind die Zellen maximal vakuolisiert, bevor sie final nekrotisch sterben. Es konnte gezeigt werden, dass die Vakuolen lysosomalen Ursprungs sind (Bielaszewska *et al.*, 2009b). Wie bei dem vakuolisierenden Zytotoxin von *Helicobacter pylori* (VacA) kann auch die durch EHEC-Vac verursachte Vakuolisierung durch den Vakuolen-assoziierten Protonenpumpen-Inhibitor Bafilomycin A1 nicht nur verhindert, sondern auch rückgängig gemacht werden. Dies lässt einen ähnlichen zugrunde liegenden Mechanismus der Vakuolenbildung vermuten. Zusätzlich zu dieser Wirkungsweise stimuliert EHEC-Vac die Ausschüttung von Interleukin-6 bei HBMECs. Obwohl Vakuolenbildung und Nekrose-Induktion von EHEC-Vac bei mikrovaskulären Endothelzellen zur Pathogenese von HUS beitragen könnten, ist dies fraglich, da es in den EHEC-Serogruppen, welche hauptsächlich mit HUS assoziiert werden, nicht vorkommt.

3.2.3 EHEC-Serinproteasen

Bakterielle Proteasen tragen während einer EHEC-Infektion durch mannigfaltige Effekte zur Pathogenese bei. So sind die direkte Degradation von Zytoskelett-Proteinen, die Spaltung von Immunglobulinen, die Einflussnahme auf das Komplementsystem und die Aktivierung der Hämostase dokumentiert (Pohlner *et al.*, 1987; Molla *et al.*, 1989; Kaminishi *et al.*, 1994; Canizalez-Roman and Navarro-Garcia, 2003; Lathem *et al.*, 2004).

Die plasmidkodierte Serinprotease EspP (engl.: *extracellular serine protease, plasmid-encoded*) gehört zu den Serinprotease-Autotransportern der *Enterobacteriaceae* und zählt zu den vorrangig sekretierten Proteinen von EHEC (Henderson and Nataro, 2001). EspP zeigt proteolytische Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten. Unter anderem interagiert es mit der Blutgerinnungskaskade durch die Spaltung des Faktors V (Brunner *et al.*, 1997), dessen Inaktivierung eine Hemmung der Blutkoagulation und damit eine verstärkte Blutung des Darmepithels bedingen könnte, wie sie bei der HC beobachtet wird (Brunner *et al.*, 1997). Allerdings fehlen bislang experimentelle Daten aus dem Tiermodell, die diese Hypothese stützen würden. Bisher wurden vier EspP-Subtypen identifiziert (α , β , γ und δ), die sich in ihrer proteolytischen Aktivität und dem Transportmechanismus unterscheiden. Der proteolytisch aktive EspP α -Subtyp wird von EHEC, welche mit schweren Krankheitsverläufen und HUS assoziiert sind, produziert (Brockmeyer *et al.*, 2007).

3.3 Shiga Toxine

Im Jahr 1898 identifizierte der japanische Arzt und Bakteriologe Kiyoshi Shiga den Erreger der Bakterienruhr, der später nach ihm *Shigella dysenteriae* benannt wurde. Das für die Pathogenese dieses Erregers verantwortliche Enterotoxin des Serotyps I konnte 1972 von Keusch *et al.* isoliert und in weiteren Untersuchungen charakterisiert werden (Keusch and Jacewicz, 1975). Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurde Anfang der 80er Jahre auch das Shiga Toxin der EHEC entdeckt (O'Brien *et al.*, 1983). Im Gegensatz zu *S. dysenteriae* sind die *stx*-Gene in EHEC nicht chromosomal kodiert, sondern auf temperenten, lambdoiden Phagen lokalisiert, die im Chromosom inseriert sind (O'Brien *et al.*, 1984; Newland *et al.*, 1985). Shiga Toxin 1 (Stx1) und Shiga Toxin 2 (Stx2) stellen die beiden Hauptgruppen der Stx-Familie der EHEC dar und werden durch zwei unterschiedliche Phagen kodiert (O'Brien *et al.*, 1984; Strockbine *et al.*, 1986). Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer antigenen Eigenschaften und in Zellkultur-Toxinneutralisations-Assays (Sandvig, 2001). Während der Stx1-Prototyp (Bakteriophage H19B) eine 98 %ige Sequenzhomologie zum Stx aus *S. dysenteriae* aufweist (eine Aminosäure Unterschied), ist Stx1 zu Stx2 (Bakteriophage 933W) in der A- und B-Untereinheit nur zu 53 % respektive 64 % homolog (Johannes and Römer, 2009). Inzwischen wurden neben diesen beiden Hauptgruppen der Stx weitere Subtypen identifiziert. Dazu zählen Stx1c (Zhang *et al.*, 2002), Stx1d (Bürk *et*

al., 2003; Kuczius *et al.*, 2004), Stx2c (Schmitt *et al.*, 1991), Stx2c2 (Jelacic *et al.*, 2003), Stx2d (Pierard *et al.*, 1998), Mukus-aktivierbares Stx2d_{aktivierbar} (Melton-Celsa *et al.*, 1996; Bielaszewska *et al.*, 2006), Stx2e (Sonntag *et al.*, 2005a), Stx2f (Sonntag *et al.*, 2005b) und Stx2g (Leung *et al.*, 2003). Die Toxinvarianten unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrer Sequenz, sondern auch im bevorzugten Reservoir (Müthing *et al.*, 2009). Nach Müthing *et al.* gibt es eine Assoziation zwischen dem Toxin-Genotyp und der Pathogenese im Menschen (Müthing *et al.*, 2009 und zitierte Referenzen). So können *stx*₂-tragende Stämme wesentlich häufiger mit der Ausbildung eines HUS in Zusammenhang gebracht werden als solche, die ausschließlich *stx*₁ produzieren.

3.3.1 Aufbau und Struktur

Alle Mitglieder der Stx-Familie sind AB₅-Holotoxine, bestehend aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit (~ 32 kDa, 293 Aminosäuren), die nichtkovalent mit fünf identischen B-Untereinheiten (je ~ 7,7 kDa, 69 Aminosäuren) verbunden ist (Abbildung 2A). Letztere bilden eine pentamere Struktur, welche die Bindung an den zellulären Glykosphingolipid-Rezeptor Gb3Cer ermöglicht (O'Brien *et al.*, 1992). Die Sekundärstruktur der einzelnen B-Untereinheiten besteht aus antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix. Die Spalten, die durch die Interaktion benachbarter β -Faltblätter entstehen, fungieren als Bindestellen (Abbildung 2B). Insgesamt ergeben sich pro Holotoxin 15 potentielle Bindungstaschen zu den Rezeptoren (Ling *et al.*, 1998). Allerdings unterscheiden sich die drei pro B-Untereinheit gebildeten Bindestellen in der Art und Stärke der Wechselwirkung mit dem Rezeptor (Bast *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2004).

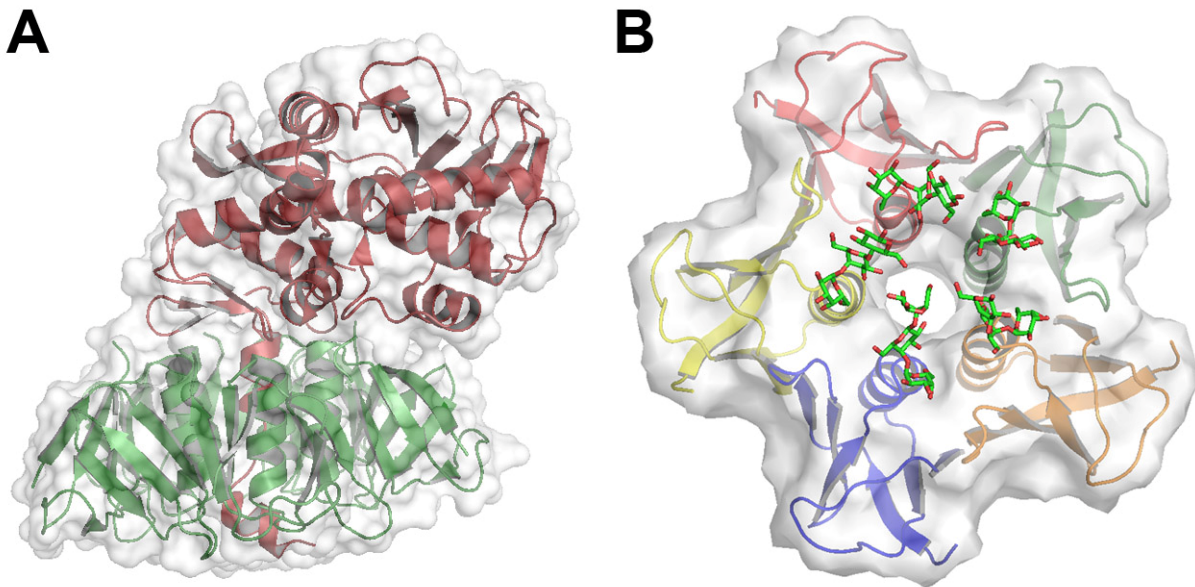


Abbildung 2: Darstellung einer berechneten Struktur des Stx1 basierend auf den Röntgenstruktur-Analysedaten von Ling *et al.* (1998). A: Holotoxin bestehend aus der A-Untereinheit (rot) und dem Pentamer aus B-Untereinheiten (grün). B: Pentamere (Donut-förmige) Struktur der B-Untereinheiten mit gebundenen Gb3-Analoga.

Die A-Untereinheit besteht aus zwei Fragmenten, A₁ und A₂, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Dadurch kommt es zur Ausprägung einer Schleife in der Tertiärstruktur der Proteine, welche eine Konsensussequenz -R-X-X-R- (R = Arginin, X = beliebige Aminosäure) für die membranverankerte Protease Furin besitzt. Allerdings sind die umgebenden Aminosäuren ebenfalls essentiell für die Spaltung. Furin spaltet nach Internalisierung des Toxins die A-Untereinheit C-terminal nach Arginin 249 (Stx1) bzw. 250 (Stx2) in eine ca. 27,5 kDa große katalytisch aktive A₁- und eine ca. 4,5 kDa große A₂-Untereinheit (Garred *et al.*, 1995; Lea *et al.*, 1999; Kurmanova *et al.*, 2007). Diese Spaltung ist für die Retro-Translokation des enzymatisch aktiven A₁-Fragments zum Wirkungsort des Toxins, dem Zytosol, unabdingbar. Das A₂-Fragment ist essentiell für die Bildung des Holotoxins, da Austin *et al.* 1994 zeigen konnten, dass sich zwar A- und B-Untereinheiten spontan *in vitro* zusammenlagern, das A₁-Fragment dazu jedoch nicht in der Lage ist. Weitere Arbeiten ergaben, dass eine neun Aminosäuren lange α -Helix des A₂-Fragments die Pore der pentameren B-Untereinheit penetriert und so die nichtkovalente Assoziation von A- und B-Untereinheit ermöglicht (Stein *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 2004). Mit Ausnahme von Stx2e (Bindung an

Globotetraosylceramid) binden die B-Untereinheiten von Stx1 und Stx2 mit unterschiedlichen Affinitäten (Head *et al.*, 1991) an die gleiche Rezeptorstruktur (Lingwood *et al.*, 1987; Waddell *et al.*, 1988; Müthing *et al.*, 2009). Die A-Untereinheiten zeigen identische enzymatische Aktivität (Head *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 2006).

3.3.2 Der zelluläre Rezeptor Globotriaosylceramid

Overlay-Assays mit radioaktiv markiertem Stx ergaben, dass das Toxin an die Glykosphingolipide (GSL) Gb3Cer, Globotetraosylceramid (Gb4Cer) und an das P₁-Blutgruppenantigen bindet (Lindberg *et al.*, 1987). In weiteren Untersuchungen konnte eine Inhibition der Toxin-Bindung durch Rezeptor-Analoga, Anti-Gb3Cer-Antikörper oder Verdau der membranständigen Glykosphingolipide durch α -Galaktosidase gezeigt werden (Jacewicz *et al.*, 1986; Lingwood *et al.*, 1987; Mobassaleh *et al.*, 1989). Somit konnte der dominante zelluläre Rezeptor von Stx eindeutig als Gb3Cer identifiziert werden.

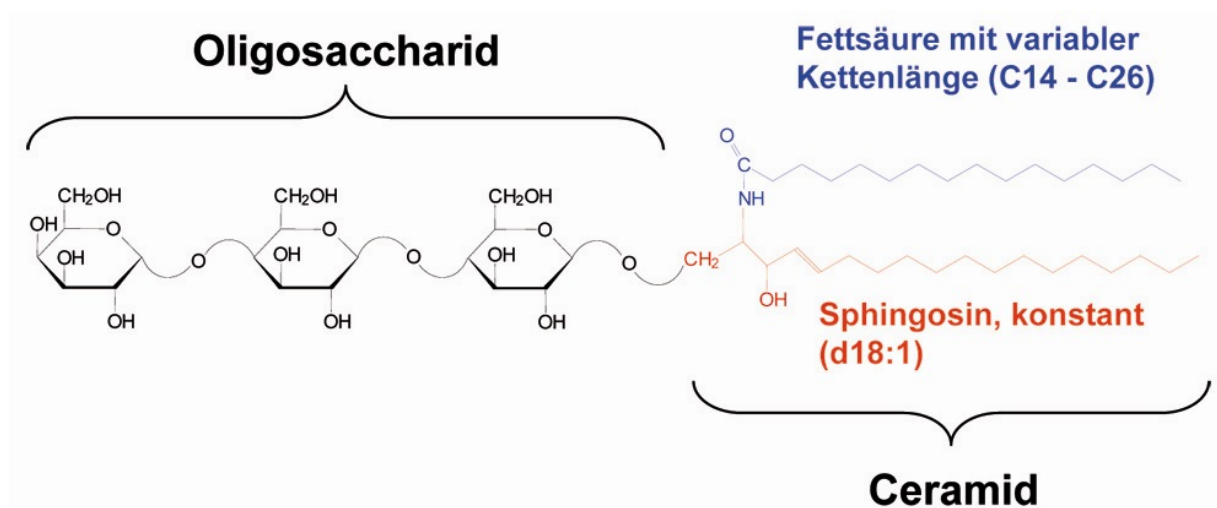


Abbildung 3: Struktur des Stx-Rezeptors Gb3Cer. Er besteht aus einem hydrophilen Oligosaccharidanteil und einem hydrophoben Ceramidanteil, der eine Fettsäure mit variabler Kettenlänge enthalten kann.

Das Globotriaosylceramid ist ein neutrales, amphipathisches Molekül, das - wie alle GSL - aus einem hydrophilen Saccharidanteil und einer hydrophoben Kohlenwasserstoff-Komponente besteht (Abbildung 3). Der hydrophobe Bereich (Ceramid) ist seinerseits aus

dem Aminoalkohol Sphingosin (2-Amino-4-octadecen-1,3-diol) und einer Fettsäure, deren Kettenlänge zwischen 14 und 26 Kohlenstoff-Atomen variieren kann, zusammengesetzt. Der Oligosaccharidanteil ist glykosidisch an das Ceramid gebunden. Die Biosynthese von Gb3Cer beginnt im ER mit dem Aufbau des Ceramids, dessen Glykosylierung im Anschluss über die Zwischenschritte Glukosylceramid und Laktosylceramid im Golgi-Apparat (GA) erfolgt.

Verschiedene Zelltypen exprimieren unterschiedliche Mengen an Gb3Cer und auch der Anteil der an die Zelloberfläche transportierten Rezeptoren im Verhältnis zu den Intrazellulären variiert. Untersuchungen ergaben, dass eine Inkubation der Zellen mit proinflammatorischen Substanzen wie Tumor Nekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL- β), LPS oder Natriumbutyrat zu erhöhten Rezeptordichten auf den Zelloberflächen führt (Louise *et al.*, 1991, 1992, 1995; Tesh *et al.*, 1991; van de Kar *et al.*, 1992; Kaye *et al.*, 1993). Zudem ist die Variabilität der Rezeptorexpression von der Konfluenz der Zellkultur und der Zellzyklusphase abhängig (Obrig *et al.*, 1988; van Setten *et al.*, 1997). Alle diese Faktoren können zu einer veränderten Sensitivität der Zellen gegenüber Stx führen.

Neben der Oberflächen-Rezeptordichte können Heterogenität, Hydroxylierung (Binnington *et al.*, 2002) sowie Kettenlänge und Sättigung der Fettsäuren die laterale Mobilität der GSL in der Plasmamembran und die Präsentation der Trisaccharid-Kopfgruppe beeinflussen. Dies wirkt sich sowohl auf die intrazellulären Transportprozesse (Sandvig *et al.*, 1996) als auch auf die Bindungseigenschaften von Toxin und Rezeptor aus. So konnte gezeigt werden, dass Stx1 optimal an Gb3Cer mit einer Fettsäurenlänge von 20-22 C-Atomen bindet, Stx2 jedoch bevorzugt an Gb3Cer mit nur 18 Kohlenstoffatomen (Pellizzari *et al.*, 1992; Kiarash *et al.*, 1994; Lingwood, 1996). Beide Toxine binden besser an Rezeptoren, die ungesättigte Fettsäuren enthalten. Ein weiterer Faktor, der die Bindung und spätere Internalisierung des Toxins beeinflusst, ist die Organisation der Rezeptoren in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran. GSL sind meist mit *lipid rafts* (LR) assoziiert, bei denen es sich um Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen der Zellmembran handelt (Simons and Ikonen, 1997). Durch den asymmetrischen Aufbau und die überwiegend gesättigten Fettsäurereste der Sphingolipide in den LR sind diese stärker geordnet und dichter gepackt als die umgebende Membran.

3.3.3 Internalisierung und Prozessierung

Nach Bindung der Stx an die Rezeptormoleküle auf der Plasmamembran werden die Toxine in die Zielzellen durch Endozytose internalisiert. Der genaue Verlauf der Endozytose ist komplex und bislang nur unvollständig für verschiedene Zelltypen aufgeklärt worden. Es konnten drei Endozytosemechanismen aufgezeigt werden, durch die Stx in die Zelle gelangen kann.

Zunächst wurde Stx in *clathrin-coated pits* gefunden (Sandvig *et al.*, 1989, HeLa-Zellen). Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist von der Aktivierung der Kinase Syk durch Stx abhängig (Lauvrak *et al.*, 2006, HeLa-Zellen). Dieser Komplex wird dann mit Clathrinmolekülen umlagert und internalisiert (Sandvig *et al.*, 1996; Ramegowda *et al.*, 1999; HBMECs). In der Zelle lösen sich die Clathrinmoleküle, die entstehenden Vesikel fusionieren und bilden schließlich das frühe Endosom. Wenn die Clathrin-abhängige Endozytose inhibiert ist, kann Stx immer noch effizient über die Caveolae-Endozytose aufgenommen werden (Schapiro *et al.*, 1998, Vero-Zellen; Lauvrak *et al.*, 2004, HeLa-Zellen und *baby hamster kidney*-Zellen). Caveolae sind Mikrodomänen der Plasmamembran, die häufig mit GSL assoziiert sind und eine typische Zusammensetzung von Proteinen und Lipiden, darunter auch Gb3Cer, besitzen. Das Protein Caveolin stellt dabei das wichtigste Strukturelement dar. Zudem ist 2007 von Römer *et al.* (HeLa-Zellen) mit Hilfe von Stx ein neuer Endozytosemechanismus aufgezeigt worden. Dabei induzieren die Toxine selbst Invaginationen durch Bindung von vielen Rezeptormolekülen, ohne die zytosolische Maschinerie zu benutzen. In diesem Fall resultiert die Membranbeugung von der Toxin-getriebenen Clusterbildung der GSL-Rezeptormoleküle. Die Toxin-induzierten Invaginationen werden dann mit Hilfe von zelleigenen Mechanismen (Dynamamin-vermittelt) prozessiert. Diese Eigenschaft von Stx, seine eigene Aufnahme zu induzieren, soll allerdings nur eine untergeordnete Rolle bei der zellulären Aufnahme von Stx einnehmen (Hansen *et al.*, 2009, HeLa-Zellen).

Nach der Endozytose kann das Toxin mehreren möglichen intrazellulären Transportwegen folgen. In resistenten Zellen wird das internalisierte Stx schnell zu den Lysosomen transportiert und dort degradiert (Sandvig *et al.*, 1992, humane epidermoide Karzinomzelllinie A431). Im anderen Fall folgt das Toxin einem retrograden Transport durch den sekretorischen Pfad. Es konnte gezeigt werden, dass der späte endozytotische Weg dabei

umgangen wird und Stx direkt von den frühen und Recycling-Endosomen zum *trans*-Golgi-Netzwerk, zum ER und final zur Zellkernmembran gelangt (Mallard *et al.*, 1998, HeLa-Zellen). Die zugrunde liegenden Signale und Transportwege zwischen den Organellen sind mannigfaltig und größtenteils unaufgeklärt (Sandvig *et al.*, 2009). Dabei sind sowohl beide Untereinheiten des Stx als auch die Lipidkomposition der Rezeptorregion an der intrazellulären Prozessierung beteiligt (Falguières *et al.*, 2001; Walchli *et al.*, 2008). Die Aktivierung der A-Untereinheit durch Spaltung mittels Furin geschieht höchstwahrscheinlich schon in den frühen Endosomen; allerdings erfolgt die Dissoziation von A₁- und A₂-Untereinheit erst im Lumen des ER (Johannes and Römer, 2009). Es wird nur ein kleiner Teil des aufgenommenen Stx derart prozessiert, sodass nur 4 % des internalisierten Toxins final als aktivierte A₁-Untereinheit in das Zytosol freigesetzt werden (Tam and Lingwood, 2007, Vero-Zellen) und dort ihre zytotoxische Wirkung entfalten.

3.3.4 Wirkungsmechanismen von Shiga Toxinen

Das A₁-Fragment der Stx weist eine hochspezifische RNA *N*-Glykosidase-Aktivität auf, die das Adenin an Position 4.324 der α -Sarcin-Schleife von Domäne VI der 28S ribosomalen RNA von eukaryotischen Ribosomen modifiziert (Endo *et al.*, 1988; Saxena *et al.*, 1989). Dadurch wird die *elongation factor*-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA inhibiert und es findet keine Verlängerung der Aminosäurekette statt (Hale and Formal, 1980). Auch bakterielle Ribosomen können Substrat für die A-Untereinheit des Stx sein, wobei die Inkubation von Bakterien mit Stx1 eine verminderte Proliferation dieser bedingt (Suh *et al.*, 1998). Das führte zu der Annahme, dass Stx das Überleben der EHEC im Gastrointestinaltrakt durch Wachstumsinhibierung potentieller Konkurrenten unterstützt. Obwohl lange Zeit vermutet wurde, dass die Funktion der Stx in der HUS-Pathogenese auf ihre Rolle als Proteinbiosynthese-Inhibitoren beschränkt ist, weiß man heute, dass diese Toxine auch viele Signalkaskaden auslösen, welche beispielsweise Einfluss auf ihren eigenen Transport oder auf andere zelluläre Funktionen wie die Zytokin-Sekretion oder die Induktion von Apoptose in den Zielzellen haben. Im Folgenden soll auf diese

zusätzlichen Wirkungsmechanismen eingegangen werden, auch wenn diese oft nicht detailliert aufgeklärt sind.

In der eukaryotischen Zelle bewirkt die Modifikation der rRNA nicht nur die Inhibition der Proteinbiosynthese, sondern löst Signalkaskaden aus, die als ribotoxischer Stress bezeichnet werden (Iordanov *et al.*, 1997). Das 3'-Ende der rRNA übernimmt Funktionen in der Aminoacyl tRNA-Bindung, der ribosomalen Translation und als Peptidyltransferase. Werden diese Funktionen beeinträchtigt, z. B. durch Toxineinwirkung, werden die JUN N-terminale Kinase (Jnk) und die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) p38 aktiviert. Dies führt zu einer Veränderung der Signalweiterleitung der extrazellulären Signalregulierten Kinase 1 (ERK1) und ERK2 (Ikeda *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Jandhyala *et al.*, 2008). Wie dadurch die nachgeschalteten Signalwege beeinflusst werden, ist bislang ungeklärt.

Es mehren sich Hinweise darauf, dass Stx - analog zu anderen Ribosomen-inaktivierenden Proteinen - neben der Abspaltung von ribosomalem Adenin auch effizient DNA depuriniert. Die direkte DNA-Schädigung und/oder die Inhibition der DNA-Reparaturmechanismen führt letztendlich durch apoptotische Vorgänge zum Zelltod (Barbieri *et al.*, 1998; Brigotti *et al.*, 2001, 2004; Sestili *et al.*, 2005).

Bereits die Bindung von Stx an die Rezeptoren in der Plasmamembran induziert die Rekrutierung und Aktivierung von Gb3Cer-enthaltenden, GSL-angereicherten Membranfraktionen von verschiedenen, zelltypspezifischen Tyrosinkinase (Katagiri *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2000; Lauvrak *et al.*, 2006). Die Aktivierung dieser Kinasen führt zur schnellen Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen, darunter auch der schweren Kette von Clathrin, die einen Einfluss auf die Toxinaufnahme hat (Lauvrak *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Anlagerung von Stx an die Rezeptoren in der Plasmamembran eine Neu- bzw. Umorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelettes bewirkt (Takenouchi *et al.*, 2004; Hehnly *et al.*, 2006). Dieser Prozess wird von der Umverteilung verschiedener Proteine (Ezrin, CD44, Vimentin, Zytokeratine, Paxillin und fokaler Adhäsions-Kinasen) begleitet. Sowohl die Bindung von Stx als auch die von spezifischen Anti-Gb3Cer-Antikörpern an den zellulären Rezeptor induziert die Phosphorylierung des Ezrin-Proteins, welches das Aktin-Zytoskelett mit der Plasmamembran verbindet.

Der gegenwärtige Kenntnisstand legt nahe, dass Stx den programmierten Zelltod - die Apoptose - mittels verschiedener Mechanismen in unterschiedlichen Zelltypen auslösen kann. Die Stx1-induzierte Apoptose in THP-1-Zellen (humane monozytische Leukämie-Zelllinie) ist durch den retrograden Transport des Toxins zum ER und die Aktivierung von Caspase 3 bedingt (Kojio *et al.*, 2000). Eine Stx1-Behandlung aktiviert die ER-Membran-assoziierten Stresssensoren und erhöht die Expression des C/EBP homologen Proteins (CHOP) und des *death receptor 5* auf mRNA- und Proteinebene (Fujii *et al.*, 2008, HBMECs). Dieser Mechanismus wird normalerweise durch ungefaltete oder missgefaltete Proteine im ER-Lumen induziert und ist bekannt als ER-Stressantwort. Nachfolgend führt diese Antwort zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus den ER-Speichern und der Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Cystein-Protease Calpain, die ihrerseits zur Aktivierung von Caspase 8 führt (Lee *et al.*, 2008, THP-1-Zellen). Die sequentielle Aktivierung einer Kaskade von Caspasen ist eine Schlüsselkomponente der zellulären Apoptose-Maschinerie. Ähnliche, jedoch nicht identische, Apoptose-Signalwege werden also von Stx in den verschiedenen untersuchten Zelllinien initiiert. In HBMECs, die in dieser Arbeit verwendet wurden, induziert Stx2 eine Fragmentierung der DNA. Durch die Expressionserhöhung von CHOP wird die Aktivierung (durch Spaltung) der Caspasen 3, 6, 8 und 9 vermittelt. Eine zusätzliche Stimulation von Caspase 8 erfolgt durch Toxin-bedingte Degradation des anti-apoptotischen Proteins FLIP (Fujii *et al.*, 2008) und durch Inhibition der Expression von MCL1 (Erwert *et al.*, 2003).

Neben den Wirkungsmechanismen von Stx auf sensitive Zielzellen sind zusätzliche Effekte auf Stx-resistente Zellen (THP-1-Zellen) beschrieben worden. Diese exprimieren zwar Gb3Cer und internalisieren das Toxin, reagieren aber nicht letal, sondern durch Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. So werden Interleukin-8 im Darmepithel und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), TNF sowie Thromboplastin im Blutkreislauf über verschiedene Signalwege sezerniert (Johannes and Römer, 2009 und zitierte Referenzen). Es wird vermutet, dass diese Reaktionen ebenfalls zur Endothelzellschädigung durch Stx beitragen.

3.4 Endothelzellen

Alle Blut- und Lymphgefäße im Körper sind auf der Gefäßinnenwand mit Endothelzellen ausgekleidet. Das Endothel, die Gesamtheit aller Endothelzellen (EC), bildet eine 1.000 m² große Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum im adulten menschlichen Organismus. Da es die Kontaktfläche zwischen dem Gewebe bzw. den Organen und dem Blut bzw. der Lymphe darstellt, hat das Endothel eine Vielzahl von physiologischen Aufgaben. Die Wichtigste davon ist die Regulation des beiderseitigen Stofftransportes. Das Endothel wirkt hierbei als selektive Barriere. Dabei wird mit steigender Permeabilität kontinuierliches Endothel, fenestriertes Endothel und diskontinuierliches Endothel unterschieden. Außerdem werden vom Endothel für die Regulation des Blutdrucks wichtige Substanzen (z. B. Stickstoffmonoxid) produziert und die Fließfähigkeit des Blutes, u. a. durch Hemmung und Aktivierung von Gerinnungsprozessen, beeinflusst. Das gesunde Endothel besitzt eine antithrombotische und antikoagulierende Oberfläche. Auch bei der Neuformung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) übernimmt das Endothel wichtige Aufgaben.

Mikroorganismen haben zahllose Mechanismen entwickelt, um in Wirtsgewebe eindringen zu können. Das vaskuläre Endothel stellt einen zentralen Angriffspunkt für pathogene Mikroorganismen und deren Virulenzfaktoren dar (Lemichez *et al.*, 2010). Pathogene attackieren das Endothel mit einer Vielzahl von Strategien, die zur Dysfunktion der Barriereeigenschaft und endovaskulären Krankheiten führen können (Hippenstiel *et al.*, 2003).

Die Adhäsion, Invasion und/oder sezernierte Produkte von Pathogenen können das Endothel direkt oder indirekt beeinflussen. Eine indirekte Manipulation kann über verschiedene Mediatoren, beispielsweise aktivierte Leukozyten, humorale Faktoren oder während der Wirtsantwort freigesetzte Substanzen, erfolgen. Diese Faktoren wirken in komplexen, dynamischen Prozessen aufeinander ein. Diese unspezifische Stimulation durch Produkte der Wirtsantwort nimmt eine wesentliche Rolle für das entzündliche Geschehen ein. In Bezug auf hämorrhagische Fieber oder akuten Phasen der systemischen, proinflammatorischen Wirtsantwort (z.B. Sepsis) wird postuliert, dass diese indirekte Stimulation des Endothels entscheidend für den Verlauf der Erkrankung sein kann (Peters

and Zaki, 2002). Zusätzlich trägt das Endothel durch Freisetzung proinflammatorischer Substanzen, Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, prokoagulatorischer Aktivität und endothelialer Hyperpermeabilität wesentlich zur Verstärkung der Entzündungsreaktion bei.

Eine große Anzahl unterschiedlicher Pathogene und deren Virulenzfaktoren können über verschiedene Pathomechanismen auf das Endothel einwirken. Beispielsweise ist es ein primäres Ziel von Poren-bildenden bakteriellen Toxinen wie dem *S. aureus* α -Toxin oder EHEC-Hly, die ebenfalls zum Kollaps der Barrierefunktion führen können. Zudem wird das Endothel durch diese so stimuliert, dass vasoaktive Mediatoren freigesetzt und die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen induziert werden, die ihrerseits zur Rekrutierung von polymorphokernigen Granulozyten führen (Krüll *et al.*, 1996). Neben porenbildenden Exotoxinen sind Endothelzellen zudem Ziel von bakteriellen Toxinen wie den Stx, die durch Bindung an zelluläre Rezeptoren ihre Translokation in das Zytoplasma der EC induzieren. Auch Bestandteile von Pathogenen, beispielsweise LPS, steigern die proinflammatorische Antwort und können bei langer Einwirkdauer zu schwerwiegenden, teilweise chronischen Schäden führen.

Das durch inflammatorische Vorgänge aktivierte Endothel produziert Selektine und Integrine, welche die Bindung von Leukozyten über einen dreiphasigen Prozess ermöglichen. Durch reversible, niedrigaffine Bindungen an diese Oberflächenantigene rollen die Leukozyten entlang des Endothels ("*rolling*"-Mechanismus), gefolgt von der Adhäsion. Die dritte Phase ist die Transmigration der Leukozyten in das subendotheliale Gewebe.

Die in dieser Arbeit verwendeten Endothelzelllinien werden in Kapitel 4.4.1 genauer vorgestellt.

3.5 Zielsetzung

Die Expression der Shiga Toxine als Hauptvirulenzfaktoren der EHEC gilt als entscheidender Schritt in der Pathogenese der EHEC-Infektion und Auslöser schwerer Krankheitsverläufe. Die Stx sind seit ihrer Entdeckung ausgiebig untersucht worden; die Mechanismen der zellulären Schädigung wurden dabei allerdings nur teilweise aufgeklärt. Auch die Frage nach der Ursache der stärkeren Assoziation von Stx2 mit HUS konnte bislang nicht beantwortet werden. In den bisher durchgeführten Untersuchungen zur Wirkungsweise von Stx wurden zudem meist nicht-endotheliale Zellen und Zelllinien eingesetzt. Demgegenüber wurden Untersuchungen mit den für die Infektion im Menschen relevanten Endothelzellen durchgeführt, die sich zumeist auf nur ein Toxin bzw. einen Wirkungsmechanismus beschränkten. Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen sich aufgrund der Vielfalt der verschiedenen Parameter und Methoden nur schwer vergleichen und interpretieren.

Ziel dieser Arbeit war es folglich, einen direkten, systematischen und umfassenden Vergleich der biologischen Effekte von Stx1 und Stx2 auf humane mikrovaskuläre und makrovaskuläre Endothelzellen anzustellen, die *in vivo* mit dem Krankheitsbild HUS in Verbindung stehen, sodass medizinisch relevante Aussagen getroffen werden können.

Zunächst sollten die verschiedenen Effekte von Stx1 und Stx2 auf die beiden unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden, um das Wirkungsspektrum der Toxine vergleichen zu können. Der Fokus sollte dabei auf Charakterisierung der morphologischen Änderungen und der Bestimmung des induzierten Zelltodes gelegt werden. Darüber hinaus sollten Unterschiede in der Reaktion der Endothelzelllinien unterschiedlichen Ursprungs auf beide Toxine untersucht werden. Dazu sollte das Verhalten dieser bezüglich Proliferation und Viabilität unter Toxineinfluss bestimmt werden und die Ursachen der in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Sensitivität aufgeklärt werden.

Zusätzlich zu den üblichen Methoden zur Charakterisierung der Stx-Wirkung auf Endothelzellen sollten neue Ansätze mittels bildgebender Verfahren etabliert werden, um einen neuen Betrachtungswinkel zu schaffen und so weitere Teile zum Verständnis der Komplexität der Toxin-bedingten Endothelzellschädigung beizutragen. Dazu sollte die

morphologische Schädigung von Mini-Monolayern unter Verwendung von MC-Kulturen in Kombination mit SEM untersucht werden sowie die Einzelzellanalyse mittels DHM für diese Fragestellung angepasst werden.

Die zu etablierenden Methoden sollten final zur Charakterisierung von anderen EHEC-Virulenzfaktoren wie dem EHEC-Vac angewendet werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Analysen-Qualität von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen worden. Zusätzliche Chemikalien werden in den entsprechenden Kapiteln des Material und Methoden-Teils gesondert erwähnt.

4.2 Geräte

Nachfolgend werden die zur Standardausrüstung gehörenden Laborgeräte alphabetisch aufgelistet. Weitere benutzte Geräte werden separat in den entsprechenden Kapiteln angeführt.

Tabelle 1: Für die Experimente verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Ort	Modell
Autoklav	H+P Labortechnik	München	Varioklav E500
Blot-Kammer	Carl Roth	Karlsruhe	Semidry Blotter V20-SBD
CO ₂ -Inkubatoren	Kendro	Hanau	Hera Cell
	Sanyo	München	MCO-20 AIC
	Heraeus	Hanau	B50/61 EC/CO ₂
Elektrische Pipettierhilfen	Integra Biosciences	Fernwald	Pipetboy acu
Elektrophorese-Kammern	Bio-Rad	München	Verschiedene Modelle
Elektrophorese-Netzteile	Bio-Rad	München	3000Xi

Heizrührer	Stuart	Staffordshire, U.K.	SB162
Mehrkanalpipette	Brand	Wertheim	Transferpipette
Mikrotiterplatten- Lesegerät	Dynex	Berlin	Opsys MR
Mikroskope (invers)	Zeiss	Jena	Axiovert 25 & 40
Mikroskop (Fluoreszenz)	Zeiss	Jena	AxioImager A1
pH-Meter	Mettler Toledo	Gießen	Seven Easy
Photo-Imager	Bio-Rad	München	ChemiDoc XRS
Pipetten	Eppendorf	Hamburg	Research, Reference
Schrittmotor-Rührer	H+P Labortechnik	München	Variomag Biomodul 40B, Biosystem
Schüttelinkubator	Sartorius BBI Systems	Melsungen	Certomat R/H
Sicherheitswerkbank	Baker Company	Sanford, Maine, U.S.A.	SterilGuard Class II Type A/B3
Tischzentrifugen	Eppendorf Hettich	Hamburg Tuttlingen	Mini Spin Plus Biofuge A
Vortexer	IKA	Staufen	Vortex Genius 3
Waagen	OHAUS	Pine Brook, NJ, U.S.A.	Scout 2, Explorer
Wasserbad	GFL	Burgwedel	Typ 1063
Zentrifugen	Hettich	Tuttlingen	Universal 320 R Rotana 480 RS

4.3 Toxine

4.3.1 Produktion und Aufreinigung der Toxine

Die Produktion und Aufreinigung von Stx1 und Stx2 verläuft sehr ähnlich, sodass beide Protokolle in einem Kapitel behandelt werden können. Zunächst wird die Aufreinigung von Stx1 beschrieben und anschließend werden die Änderungen dieses Protokolls für die Stx2-Aufarbeitung genannt.

Stx1 wird mit Hilfe des Stammes C600 (H19J) produziert, der einem mit dem Bakteriophagen H19J (Smith and Linggood, 1971) transduzierten Laborstamm *E. coli* K-12 600 entspricht. Der Bakteriophage H19J trägt das *stx₁*-Gen des *E. coli* Isolates H19 vom Serotyp O26:H11. Der Stamm C600 (H19J) wird in 3 l Luria-Bertani (LB)-Medium für 24 h bei 37 °C und 180 UPM kultiviert. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 9.000 g für 20 min bei 20 °C geerntet und die Sedimente über Nacht (ü. N.) bei -20 °C gelagert. Anschließend werden die Sedimente in 100 ml CMF-PBS (engl.: *calcium and magnesium free – phosphate buffered saline*, siehe 4.5.1) resuspendiert und die Bakterien nach Zugabe von 0,3 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid durch Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonopuls, Berlin, Germany) aufgeschlossen (dreimal 1 min bei höchster Energie auf Eis). Durch die Zugabe von 3.000 U/ml des Antibiotikums Polymyxin B (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Inkubation für 1 h bei 37 °C werden verbleibende Zellmembranen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden bei 9.000 g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird mittels Ultrafiltration (Vivaflow 200, 10 kDa cut-off, Sartorius Stedim Biotech, Melsungen) konzentriert und das Retentat gegen 4 l 10 mM Kaliumphosphat ü. N. bei 4 °C dialysiert. Anschließend wird das Protein auf eine Hydroxylapatitsäule geladen, welche zuvor mit zwei Säulenvolumen Kaliumphosphat äquilibriert worden ist. Eluiert wird mit zwei Säulenvolumen 200 mM Kaliumphosphat-Lösung; dabei wird das Eluat fraktioniert. Durch eine optische Kontrolle (gelbe Fraktion) oder einen UV-Detektor am Gerät können die Protein-enthaltenden Fraktionen bestimmt und vereint werden. Anschließend wird das Protein durch eine Dialyse in 25 mM Imidazol-HCl (pH = 7,4) ü. N. für das *chromatofocusing* vorbereitet (Petric *et al.*, 1987; Head *et al.*, 1988). Mit dieser Lösung wird auch die *chromatofocusing*-Säule (PolyBufferExchanger 94, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) ü. N. äquilibriert. Nach Beladung der Säule mit den

vereinten Stx1-Fractionen werden 400 ml Polybuffer 74-HCl (pH = 5; GE Healthcare) zur Elution des Proteins injiziert. Es werden Fraktionen gesammelt bis der pH-Wert des Eluats einen Wert von 5,95 unterschreitet. Die proteinhaltigen Fraktionen werden durch Messung bei 280 nm im Spektralphotometer bestimmt und vereint. Abschließend wird das Protein in gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung bei 4 °C für 24 h gefällt. Das Präzipitat wird in einem Zentrifugationsschritt (11.000 g, 30 min, 4 °C) gesammelt und in 10 ml PBS aufgenommen. Es folgen zwei Dialyseschritte gegen PBS. Die Reinheit des Proteins wird mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl.: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) bestimmt. Die strukturelle Integrität des Toxins wurde mittels *peptide-mapping* massenspektrometrisch überprüft (Müthing *et al.*, 2009). Die biologische Aktivität wurde mit einem Verzell-Zytotoxizitätsassay überprüft (Bielaszewska *et al.*, 2006). Die eingesetzten Konzentrationen des Toxins (bis 1 µg/ml) enthalten geringere LPS-Konzentrationen als mittels eines Limulusassays nachgewiesen werden können (Bactimm, Nijmegen, Niederlande; Detektionslimit 0.006 ng/ml).

Für die Produktion und Aufreinigung von Stx2 wird der *E. coli*-Stamm C600 (933W) verwendet. Dieser exprimiert das *stx₂*-Gen des Bakteriophagen 933W (Strockbine *et al.*, 1986) aus dem Trägerstamm EDL933 des Serotyps EHEC O157:H7. Während die Produktion identisch verläuft, muss das *chromatofocusing* aufgrund des von Stx1 abweichenden isoelektrischen Punktes angepasst werden: Die Toxin-enhaltenden Eluatfraktionen werden nach der Hydroxylapatitsäule vereint und gegen 25 mM Histidin-HCl-Lösung (pH = 5,5) dialysiert, welche auch für die Äquilibration der Säule benutzt wird. Die Elution erfolgt anschließend mit Polybuffer 74-HCl, der auf pH 4 eingestellt ist.

4.4 Zellkultivierung

4.4.1 Verwendete Zelllinien

4.4.1.1 Humane mikrovaskuläre Gehirnendothel-Zellen

Als Modellzelllinie für mikrovaskuläre Endothelzellen dienen in dieser Arbeit HBMECs, (engl.: *human brain microvascular endothelial cells*) die erstmals 1997 von Stins *et al.* Beschrieben wurden. HBMECs wurden insoweit charakterisiert, als dass sie die typischen Gehirnzell- und endothelialen Marker aufweisen (Faktor VIII-abhängiges Antigen, Anhydrase IV, Ulex Europeus Agglutinin I). Zudem wurden sie auf die Regulation der Adhäsionsmoleküle VCAM (engl.: *vascular cell adhesion molecule*), ICAM (engl.: *intercellular adhesion molecule*) und E-Selektin nach TNF- α Stimulation untersucht (Stins *et al.*, 1997) und zeigten ähnliche Reaktionen wie humane Nabelschnurendothelzellen (engl.: *human umbilical cord vein endothelial cells*, HUVECs). HBMECs werden weltweit als Modell für Zellen der Blut-Hirn-Schranke eingesetzt. Die Zellen wurden dem Institut für Hygiene mit freundlicher Genehmigung von K. S. Kim (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden die Zellen in den Passagen 12 bis 45 verwendet.

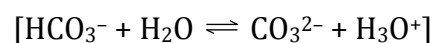
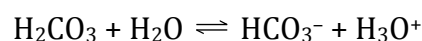
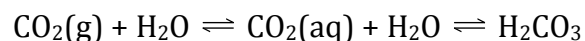
4.4.1.2 Die Fusionszelllinie EA.hy 926

Als Modellzelllinie für makrovaskuläre Endothelzellen wurde die Zelllinie EA.hy 926 eingesetzt. Sie wurde durch Fusion einer HUVEC und einer Zelle der Lungenkarzinomzelllinie A549 generiert und anschließend auf einen Marker von makrovaskulären Endothelzellen untersucht (Edgell *et al.*, 1983). Dabei wurde festgestellt, dass die Zelllinie stabil über 100 Generationen das Faktor VIII-abhängige Antigen exprimiert. Im Gegensatz zu primären HUVECs, die sich je nach Quelle in ihren Eigenschaften unterscheiden können, bietet diese Zelllinie eine stabile Grundlage für die Untersuchung des Einflusses von Stx auf das makrovaskuläre Endothel. EA.hy 926 Zellen wurden in den Passagen 9 bis 45 eingesetzt.

4.4.2 Verwendete Kultur- und Experimentalsysteme

4.4.2.1 Kultursystem Gewebekulturflasche

Die Vermehrung und Passagierung der Zellen *in vitro* wird hauptsächlich in Gewebekulturflaschen (engl.: *tissue flask*, T-Flasche) durchgeführt. T-Flaschen (Greiner Bio-One, Essen, Deutschland; Corning, Wiesbaden, Deutschland) bestehen aus Polystyrol und haben eine durch Gasionisation hydrophilisierte Oberfläche, die eine Adhäsion der Zellen ermöglicht. Eingesetzt werden Gewebekulturflaschen mit einer Wachstumsoberfläche von 25, 75 oder 175 cm², welche mit 10, 20 bzw. 50 ml Medienvolumen betrieben werden. Die T-Flasche ist ein Kultursystem, das in Brutschränken Verwendung findet, da in diesen sowohl die Temperatur auf 37 °C gehalten werden kann als auch eine Luftfeuchtigkeit von 95 % durch ein integriertes Wasserbad gewährleistet ist. Damit wird die Verdunstung des Kulturmediums aus den T-Flaschen minimiert. Um einen Gasaustausch zwischen der im Brutschrank herrschenden 5 %igen CO₂-Atmosphäre und der T-Flaschen zu gewährleisten, müssen diese leicht geöffnet sein. Alternativ können Gewebekulturflaschen mit sogenannten *filtercaps*, Deckel mit einem gaspermeablen, hydrophoben Filter, verwendet werden. Mit diesen können die Flaschen fest verschlossen werden, wodurch das Kontaminationsrisiko gesenkt wird. Über ein Natriumhydrogenkarbonat-Puffersystem wird das Kulturmedium auf einen physiologischen pH-Wert reguliert:



Der pH-Wert des Mediums hängt somit direkt von der eingesetzten Natriumhydrogenkarbonat-Konzentration im Medium sowie der CO₂-Konzentration im Brutschrank ab. Des Weiteren wird dieser durch von den Zellen ins Medium sekretierte, meist saure Metabolite, wie beispielsweise Laktat, beeinflusst.

4.4.2.2 Kultursystem Superspinner

Der Superspinner ist ein Bioreaktor, der in einem CO₂-Inkubator betrieben werden kann (Heidemann *et al.*, 1994). Der große Vorteil des Superspinner-Systems ist die Submersbegasung, durch die eine Versorgung auch hoher Zelldichten im Reaktor mit den benötigten Gasen erzielt werden kann. Der Superspinner besteht aus einer modifizierten 1 l Duranglasflasche (Schott, Mainz, Deutschland), die mit zwei Glasansätzen versehen wurde. Durch diese Ansätze können sowohl die Befüllung/Entleerung des Systems als auch die Probenahme erfolgen. Am Deckel ist ein Taumelrührer aus Teflon befestigt, der am unteren Ende mit einem Magneten versehen ist. Am Rührer wiederum sind Halterungen für eine gaspermeable Accurel-Membran angebracht. Die Membran muss vor der Benutzung mit einem eigens dafür hergestellten Rollensystem vorsichtig gewalzt werden. Auf diese Weise werden Rissbildungen in der Membran bei der Montage auf die Halterungen am Taumelrührer verhindert. Es werden etwa 3 m Membran pro Rührer verwendet. Die freien Enden werden mit inertem Silikonkleber an Silikonschläuche geklebt, die an den Deckeldurchführungen befestigt sind. Mittels einer Aquarium-Membranpumpe kann so Umgebungs-Gasgemisch durch die Accurel-Membran gepumpt werden. Nach Passage durch den Reaktor wird das Gas durch eine mit 0,5 M Natronlauge gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Der Superspinner wird auf einem Drehfeldrührer (Sartorius BBI Systems, Melsungen) betrieben. Die so herbeigeführte Taumelbewegung verhindert eine Aggregation von Zellen oder Microcarriern (MC) (siehe 4.4.2.6) an der Membran und ermöglicht eine scherkraftarme Durchmischung. Der Superspinner wird im Batch-Verfahren betrieben. Allerdings ist es durch die schnelle Sedimentation der MC möglich, nach kurzem Pausieren der Rührbewegung Kulturüberstand abzusaugen und diesen durch frisches Medium zu substituieren. Damit können durch Substratmangel oder hohe Metabolitkonzentrationen verursachte Wachstumslimitierungen verhindert werden. Nach Prozessende wird das Superspinnersystem für 30 min mit 0,5 M Natronlauge inkubiert und anschließend mit H₂O_{dest} gründlich gereinigt. Nach dem Autoklavieren ist das System wieder betriebsbereit. Nach maximal vier Autoklavierschritten muss die Accurel-Membran erneuert werden, was durch einen Membrantest mit H₂O vor der Kultivierung überprüft wird.

4.4.2.3 Experimentalsystem Multititer-Platte

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Flachboden Multititer-Platten (MTP) mit 6, 12, 24 oder 96 Kavitäten benutzt (Corning Inc., Corning, NY, USA). Dies entspricht einer Wachstumsfläche von 9,6; 3,9; 1,9 beziehungsweise 0,5 cm² pro Kavität. Die MTPs stellen ein gutes Experimentalsystem für Parallelexperimente dar, da die Kulturen in den Kavitäten aufgrund der kleinen Volumina bzw. Kulturen derselben Vorkultur entnommen werden können und die Kultivierungsbedingungen sehr ähnlich sind. Der Gasaustausch erfolgt durch einen Spalt zwischen der Bodenplatte und dem Deckel. Daher sind besonders bei geringen Volumina pro *well* mögliche Verdunstungseffekte in den äußeren Kavitäten zu beachten. Die Platten bestehen aus Polystyrol und sind für die Zellkultur mittels Gasionisation hydrophilisiert worden.

4.4.2.4 Experimentalsystem *chamber slide*

Für die mikroskopische Betrachtung der Zellen müssen diese üblicherweise auf Objektträgern kultiviert oder nach Kultivierung auf diese überführt werden. Eine Alternative zu den aus Glas bestehenden Objektträgern, welche zuvor für viele Zelltypen noch beschichtet werden müssen (z. B. mit Fibronectin, Matrigel oder Poly-L-Lysin), sind Permanox Lab-Tek™ *chamber slides* (Nunc, Langenselbold, Deutschland). In ihren Abmessungen dem Objektträger identisch, sind diese aus Permanox™-Kunststoff mit guten optischen Eigenschaften gefertigt und ebenso wie T-Flaschen hydrophilisiert. Auf dem Boden des *chamber slide's* ist über eine biokompatible Silikondichtung ein Kammersystem aus 4 oder 8 Kammern mit je 1,8 bzw. 0,8 cm² Wachstumsfläche aufgebracht. Dieses lässt sich für die Mikroskopie der Zellen entfernen. Ein Spalt zwischen dem Deckel und dem *chamber slide* ermöglicht den Gasaustausch zur Zellkultivierung.

4.4.2.5 Experimentalsystem μ -dish

Für die digitale holographische Mikroskopie ist aufgrund des eingesetzten Lasers eine besondere Art der Petrischale erforderlich. Das μ -dish System (ibidi) ähnelt einer kleinen Petrischale, ist allerdings partiell mit einem speziellen Boden versehen, der denselben

refraktiven Index wie Glas ($n = 1,5$) und eine geringe Stärke ($180 \mu\text{m}$) aufweist. Ebenso wie bei den μ -slides ist der Deckel fest verschließbar und der erforderliche Gasaustausch findet über den Boden statt. Bei hohen Zellzahlen innerhalb des Systems kann der Deckel auch in einer Stellung arretiert werden, die einen kleinen Spalt zum Gasaustausch ermöglicht. Eine weitere Option, die zu Beginn der Arbeiten genutzt wurde, ist die Substitution eines Großteils des Bodens einer Petrischale durch ein mit inertem Silikonkleber befestigtes rundes Deckgläschen. Da diese modifizierte Petrischale aufgrund des Schmelzpunktes von Polystyrol nicht thermisch sterilisiert werden kann, wurden im weiteren Verlauf die μ -dishes präferiert.

4.4.2.6 Microcarrier: Cytodex 3™

Microcarrier werden in *upscale*-Prozessen von obligat adhärent wachsenden Zelllinien eingesetzt und ermöglichen so die Massenzellkultur in Bioreaktor-Systemen. Durch die Adhäsion der Zellen auf den MC wird eine quasi-Suspensionskultur erzeugt, die in einem herkömmlichen, allerdings silanisierten, Bioreaktor für Suspensionszellen kultiviert werden kann. Ein weiterer Vorteil des Wachstums von Zellen auf den MC ist, dass konfluente MC leicht anderen Experimenten, beispielsweise der Elektronenmikroskopie, zugeführt werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten MC Cytodex 3 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bestehen aus einer mikroporösen, quervernetzten Dextran-Matrix. Eine Beschichtung mit säuredenaturiertem porcinem Kollagen erlaubt das Ablösen von viablen Zellen durch Proteasen. In gequollenem Zustand liegen 90 % der MC in einem Durchmesser-Bereich von $141\text{-}211 \mu\text{m}$, weisen eine spezifische Dichte von $1,04 \text{ g/ml}$ und eine Wachstumsfläche von $\sim 2.700 \text{ cm}^2/\text{g}$ auf. Es werden pro Liter Kulturvolumen 3 g MC eingesetzt, was einer Anzahl von $\sim 9 \times 10^6 \text{ MC}$ und einer Wachstumsfläche von $> 100 \text{ T-75-Flaschen}$ entspricht. Die Vorbereitung der MC wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Um eine Adhäsion zu verhindern, muss auch die Vorbereitung in silanisierten Glasgefäßen durchgeführt werden. Die autoklavierten MC sind bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Jahre stabil.

Durchführung: Vorbereitung der MC für die Kultivierung nach Herstellerangaben.

- 1 Quellen in 50 - 100 ml CMF-PBS pro g MC für 3 h bei RT
- 2 Überstand gegen 30 - 50 ml neues CMF-PBS pro g MC ersetzen
- 3 Autoklavieren der MC
- 4 Überstand durch 20 - 50 ml Kulturmedium ersetzen
- 5 Überstand verwerfen

4.5 Handhabung der Zellen

4.5.1 Kalzium- und magnesiumfreie, phosphatgepufferte Salinelösung

Kalzium- und magnesiumfreie, phosphatgepufferte Salinelösung wird sowohl bei der Passagierung von Zellen in T-Flaschen als auch als üblicher Puffer eingesetzt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2 angegeben. Die Lösung wird nach dem Ansetzen auf pH 7,2 eingestellt und anschließend thermisch oder durch Filtration sterilisiert.

Tabelle 2: Komposition von einem Liter CMF-PBS.

Bestandteil	Einwaage [g]
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,2

4.5.2 Kulturmedien

4.5.2.1 Medium für mikrovaskuläre Endothelzellen

Die Komposition des HBMEC-Mediums ist in Tabelle 3 aufgelistet. Um die Chargenvarianz des fötalen bovinen Serums (engl.: *fetal calf serum*, FCS) abzumildern, wird FCS-Gold der Firma PAA (Pasching, Österreich) eingesetzt. Dieses Serum ist insofern definiert, als dass die 20 Hauptbestandteile chargenunabhängig in gleichen Konzentrationen vorliegen. Zwar sind die Komponenten, wie beispielsweise Wachstumshormone, in geringeren Konzentrationen von entscheidender Bedeutung, aber es wurde kein FCS-bedingter Unterschied im Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet. Von dem benötigten Nu-Serum wurde stets dieselbe Charge verwendet. Die Supplemente wurden in Aliquots zu 5 ml bei -20 °C gelagert. Zunächst wurde RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute) von der Firma PAA eingesetzt, welches GlutaMAX™, ein thermostabiles Glutamin-Dipeptid, beinhaltet. Dieses Medium ist durch ein anderes Produkt ersetzt und das Glutamin beim Zusammenfügen des Mediums supplementiert worden. Das fertig komponierte Medium wird aufgrund von photosensitiven Inhaltsstoffen und zum Schutz vor thermischer Degradation bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zur optischen Kontrolle des pH-Wertes wurde für diese Arbeit ausschließlich mit Medien gearbeitet, die Neutralrot als pH-Indikator enthalten.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kulturmediums für HBMECs.

Bestandteil	Volumen [ml]	Firma
RPMI 1640	500	PAA & Lonza (Köln)
FCS-Gold	50	PAA
Nu-Serum	50	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA, USA
L-Glutamin, 200 mM	5	Lonza
Natrium Pyruvat, 100 mM	5	Lonza

Bestandteil	Volumen [ml]	Firma
Vitamin Mix, 100 U/ml	5	Lonza
Nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml	5	Lonza

4.5.2.2 Medium für makrovaskuläre Endothelzellen

Das Medium für EA.hy 926 Zellen aus einer 50:50 Mischung aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und der Nährstofflösung Ham's F12 wurde als Fertiglösung bezogen. Diese wurde mit 10 % (v/v) FCS-Gold supplementiert. Das komponierte Medium wird aufgrund von photosensitiven Inhaltsstoffen und zum Schutz vor thermischer Degradation bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

4.5.3 Passagierung von Zellen

Die verwendeten adhärennten Zelllinien wachsen in Monolayern, unterliegen also bei Konfluenz der Kontaktinhibition, bei der sie die Proliferation weitestgehend einstellen. Wenn keine Wachstumsoberfläche mehr zur Verfügung steht, müssen die Zellen dissoziiert und anschließend in geringerer Dichte wieder eingesät werden. Dazu wird das Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen mit ~ 0,2 ml/cm² CMF-PBS gewaschen, wodurch die im Serum enthaltenen Trypsin-Inhibitoren entfernt werden. Gleichzeitig wird auch die Konzentration bivalenter Kationen gesenkt, welche für Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen benötigt werden. Anschließend werden ~ 50 µl/cm² Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt und die Zellen für 5 - 10 min bei 37 °C inkubiert. Während die Protease Trypsin die Adhäsionsproteine der Zellen spaltet, fungiert EDTA als Chelatbildner und komplexiert zweiwertige Ionen, insbesondere Ca²⁺ und Mg²⁺, welche die proteolytische Aktivität von Trypsin inhibieren. Durch leichtes Klopfen des Kulturgefäßes auf den Boden der Reinraumwerkbank kann der Anteil der insgesamt abgelösten Zellen weiterhin erhöht werden. Das Trypsin wird durch das Hinzufügen eines äquivalenten Volumens

serumhaltigen Mediums inhibiert und durch Dekantieren des Überstands nach einem Zentrifugationsschritt (200 g, 5 min) entfernt. Die Zellen werden nun gezählt oder anhand von bekannten Splitverhältnissen (HBMECs 1:10, EA.hy 926 Zellen 1:6,5) in einer definierten Zelldichte in neue Kulturgefäße eingesät.

4.5.4 Kryokonservierung von Zellen

Der Kryokonservierungsprozess beginnt mit der Ernte der Zellen durch Trypsinierung. Nach einer Zelldichtebestimmung und einem Zentrifugationsschritt wird die gewünschte Zelldichte (üblicherweise 10^6 Zellen/ml) eingestellt. Das Zellsediment wird in kaltem Kryokonservierungsmedium resuspendiert. Schließlich werden je 1 ml Zellsuspension in vorgekühlte 1,8 ml-Kryoröhrchen (Cryo.S, Greiner) aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden in einer mit 70 %igem Ethanol befüllten Einfrierkammer in einen -70 °C Gefrierschrank gegeben, die eine konstante Abkühlrate der Zellsuspension von ~ 1 °C/min gewährleisten soll. Im Tiefgefrierschrank können die Zellen für einige Monate aufbewahrt werden. Für eine dauerhafte Lagerung werden sie allerdings in die Gasphase eines Stickstofftanks (German Cryo, Jüchen, Deutschland) bei -190 °C überführt. Dort können Aliquots eines Zelltyps für mehrere Jahre stabil gelagert werden. Das Kryokonservierungsmedium besteht aus dem jeweiligen Kulturmedium, enthält allerdings 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma), das die Bildung von membranschädigenden Eiskristallen beim Einfriervorgang verhindert. Da DMSO zytotoxisch wirkt, müssen alle Arbeitsschritte nach Zugabe des Kryokonservierungsmediums beim Einfrieren sowie Auftauen der Zellen zügig geschehen.

4.6 *offline*-Analytik von Kultivierungsprozessen

4.6.1 Zelldichtebestimmung

Die Zelldichtebestimmung erfolgt mit zwei unterschiedlichen Methoden. Die Zellzählung im Hämozytometer nach Trypanblaufärbung erlaubt die parallele Zelldichtebestimmung von lebenden und toten Zellen, da Trypanblau nur die Zellmembranen toter Zellen durchdringen kann und das Zytosol dieser blau anfärbt. Somit kann über ein Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl die Viabilität der Zellpopulation bestimmt werden. Für die Zelldichtebestimmung werden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung (0,4 %; Sigma) vermischt und anschließend in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Diese ist ein Objektträger mit einer eingeschliffenen Netzeinteilung, die es erlaubt, in einem definierten Volumen die Zellen zu zählen und so die Zelldichte nach folgender Formel zu bestimmen:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}} \times 10^4 = \text{Zelldichte [Z/ml]}$$

Bei einer Kultivierung von Zellen auf MC müssen diese zunächst abgelöst und vereinzelt werden. Dazu wird ein Aliquot der MC-Suspension mit CMF-PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die so abgelösten Zellen können wie oben beschrieben im Hämozytometer gezählt werden. Aufgrund von Problemen bei der Zelldichtebestimmung von MC-Kulturen mit der oben genannten Methode wurde die Zelldichte zusätzlich mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Die Kristallviolettlösung (0,09 % Kristallviolett (w/v); 0,1 % Triton X-100 (v/v); 0,1 M Zitronensäure; in H₂O_{dest}) ist hypotonisch; unterstützt von Triton X-100 bewirkt dies die Lyse der Zellen. Die durch die Zitronensäure stabilisierten Zellkerne werden mit Kristallviolett angefärbt. Hierzu werden dem Kultivierungssystem 1 ml Carriersuspension entnommen. Nach Sedimentation der MC werden 800 µl Überstand abgenommen und gegen 800 µl Kristallviolettlösung ausgetauscht. Anschließend werden die Zellen 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach können die Zellkerne im Hämozytometer gezählt und die Gesamtzelldichte nach obiger Formel berechnet werden. Allerdings kann mit dieser Methode nicht zwischen lebenden und toten Zellen diskriminiert werden.

4.7 Zellbasierte Assays

4.7.1 Proliferationsassay WST-1

Mit dem WST (engl.: *water soluble tetrazolium*)-1 Assay-Kit (Roche Applied Science, Mannheim) kann die metabolische Aktivität von viablen Zellen in MTP quantifiziert werden. Es basiert auf der enzymatischen Reduktion des roten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in ein wasserlösliches, blaues Formazansalz durch zelluläre mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenasen. Das Produkt kann photometrisch bei 450 nm quantifiziert werden. Die Intensität der Färbung korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Es werden 5×10^3 HBMECs oder $7,5 \times 10^3$ EA.hy 926 Zellen pro *well* in einer 96-*well* Platte, also subkonfluent, ausgesät und nach 20 h die Stx appliziert. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wird ein Zehntel des Volumens (hier 20 μ l/*well*) WST-1-Reagenz zugesetzt. Da das gefärbte Produkt kontinuierlich generiert wird, kann zwischen 0,5 und 4 h nach Zugabe die OD₄₅₀ (optische Dichte) bestimmt werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Ergebnisse im linearen Bereich des MTP-*readers* (OpsysMR absorbance reader, DYNEX Technologies, Worthing, West Sussex, UK; Software-Version 4.21) liegen. Es ist weiterhin zu beachten, dass die Kultur während des Versuchs nicht das konfluente Stadium erreicht, da die Zellen in diesem Fall ihren Metabolismus vom Wachstumsstoffwechsel auf den Erhaltungsstoffwechsel umstellen. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität der zellulären Atmungskette und verfälscht so das Ergebnis. Die halb-maximale inhibitorische Konzentration (engl.: *inhibitory concentration 50*, IC₅₀) ist die Konzentration der Testsubstanzen, welche die metabolische Aktivität auf 50 % von der der Kontrollzellen reduziert.

4.7.2 Zytotoxizitätsassay nach dem Vorbild des *vero cell assays*

Der Zytotoxizitätsassay oder *cell detachment assay* wurde aus dem etablierten *vero cell assay* (Konowalchuk *et al.*, 1977) entwickelt und dient zur Bestimmung des zytotoxischen Titers, bei dem 50 % der Zellen in Kultur tot sind und sich abgelöst haben (engl.: *cytotoxicity dose 50*, CD₅₀). Es werden 1×10^4 HBMECs oder $1,5 \times 10^4$ EA.hy 926 Zellen in

100 μl Kulturmedium pro Kavität in eine MTP eingesät und für 24 h in einem CO_2 -Brutschrank inkubiert. Nach optischer Kontrolle des Bewuchses kann die zu testende Substanz gelöst in 100 μl Zellkulturmedium zugesetzt werden. Nach der Inkubation über den gewünschten Zeitraum im Brutschrank wird die MTP zur Ablösung von toten Zellen von Hand geschüttelt und der Überstand verworfen. Danach folgt eine Fixierung der verbliebenen Zellen mit 70 μl 2 %iger Formalin-Lösung in CMF-PBS pro well für mindestens 5 min bei RT. Anschließend wird die Fixierungslösung gegen 70 $\mu\text{l}/\text{well}$ einer Zellfärbelösung (0,13 % Kristallviolett, 5 % Ethanol, 2 % Formalin in CMF-PBS) ersetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Färbelösung wird durch wiederholtes, vorsichtiges Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ entfernt, bis kein Kristallviolett in der Waschlösung verbleibt. Abschließend wird die MTP an der Luft getrocknet. Die Bestimmung der CD_{50} kann mikroskopisch erfolgen, allerdings ist eine spektralphotometrische Quantifizierung vorzuziehen. Dazu wird das Kristallviolett vollständig mittels 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 50 %igem Ethanol in CMF-PBS gelöst. Anschließend wird die MTP an einem MTP-Photometer bei 570 nm Wellenlänge vermessen. Die niedrigste eingesetzte Konzentration von Stx, bei der 50 % der Absorption der Negativkontrolle vorliegt, wird als CD_{50} definiert.

4.7.3 DNA-Fragmentierungsassay

Mit dem DNA-Fragmentierungsassay *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche Applied Science, Penzberg) können Histon-komplexierte DNA-Fragmente, also Mono- und Oligosomen, gegen eine Negativkontrolle quantifiziert werden. Somit können die Arten des Zelltodes, Nekrose und Apoptose, mit diesem Kit untersucht werden, da die DNA-Fragmente bei der Apoptose innerhalb der Zellen verbleiben, während sie bei nekrotischen Zellen ins Kulturmedium abgegeben werden. Der Test basiert auf einem Ein-Schritt-Sandwich-Immunoassay zur Detektion von Nukleosomen. In eine mit Streptavidin vorbeschichtete MTP wird Nukleosomen-enthaltende Testsubstanz pipettiert. Die Nukleosomen werden durch einen Biotin-gelabelten Anti-Histon-Antikörper an das Streptavidin gebunden. Ein weiterer Antikörper, welcher Peroxidase-markiert ist, bindet spezifisch die fixierte DNA. Mit der Peroxidase wird schließlich das Substrat, 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), zu einem stabilen, grünen Radikalion

umgesetzt, das photometrisch bei 405 nm quantifiziert wird. Der Fragmentierungsassay wurde mit konfluenten HBMECs bzw. EA.hy 926 Zellen und Stx1/Stx2 jeweils vierfach nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Bestimmung von Nekrose und Apoptose in der Kultur wurden dem Assay Proben des gleichen Ansatzes zugeführt. Nach Abzug des Hintergrundsignals (Inkubationspuffer) wurden die OD-Werte der behandelten Zellen gegen die Kontrolle normalisiert und so ein Anreicherungsfaktor bestimmt.

4.8 Mikroskopische Techniken

4.8.1 Lichtmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie wurde für die praktischen Arbeiten vielfältig angewendet. Zur optischen Kontrolle der Zellproliferation bzw. zellbasierten Experimenten wurde das inverse Mikroskop Axiovert 40 (Zeiss, Göttingen) eingesetzt. Aber auch in Mikroskopen mit teilweise anderem Einsatzzweck wurde die Phasenkontrastmikroskopie angewandt. So kann bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung von Zellen die Morphologie dieser aufgezeichnet werden; bei der digital holographischen Mikroskopie (DHM) liefert das Phasenkontrastbild bereits während der Messung wichtige Hinweise über den Zustand der Zellen.

4.8.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Methode der Markierung von molekularen Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen bietet zahlreiche Möglichkeiten. Durch die selektive Anregung verschiedener Fluorochrome bei unterschiedlichen Wellenlängen und deren definierte Spektren an emittierten Wellenlängen eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie hervorragend für Lokalisations- und Koloalisationsexperimente. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) wurden Lokalisation und Expression des Stx-Rezeptors auf und in den Zellen untersucht.

4.8.2.1 Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie

Ein wesentlicher Aspekt für die Durchführbarkeit von fluoreszenzmikroskopischen Experimenten ist die selektive Detektion von Zielstrukturen, bei denen es sich in dieser Arbeit meist um ein Protein oder das Glykosphingolipid Gb3Cer handelt. Hierbei spielen Antikörper (AK), insbesondere monoklonale AK, eine entscheidende Rolle. Dabei muss zwischen primären AK und sekundären AK unterschieden werden. Die primären AK dienen der Erkennung der Zielstruktur über die hochvariable Region, die sich durch Kombination von H- und L-Kette zweimal pro AK-Molekül ergibt. Im zweiten Schritt werden die sekundären AK eingesetzt, welche wiederum spezifisch gegen die primären Immunglobulin-Spezies gerichtet sind. An die sekundären AK sind Fluorochrome gekoppelt, welche üblicherweise aus der Gruppe der Rhodamine oder Cyanine stammen. Bei dem Design der Experimente muss folgendes Sachverhalten besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden: Zum einen müssen die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe kompatibel zu den benutzenden Filtersätzen des Mikroskops sein, zum anderen darf es keine Kreuzreaktionen der verwendeten AK geben, was durch eine vorhergehende Kreuzadsorption der AK minimiert werden kann. Der wichtigste Schritt der Versuchsplanung ist allerdings, dass bei Mehrfachimmunfluoreszenz, also Färbungen mit mehr als einer Zielstruktur, die verwendeten primären und sekundären AK-Paare aus verschiedenen Spezies stammen, sodass es zu keinen Kreuzreaktionen kommen kann. Eine Negativkontrolle mit sekundärem AK ohne primären AK ist besonders wichtig, um eine unspezifische Bindung und damit ein falsch positives Signal zu vermeiden. Eine Liste der eingesetzten Antikörper findet sich in nachfolgender Tabelle 4:

Tabelle 4: Eingesetzte Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie.

Zielstruktur	Spezies	Farbstoff	Firma	Kat.-Nr
Stx1 (Klon 109/4-E9b)	Maus	-	Sifin (Berlin)	-
Stx2 (Klon 135/6-B9)	Maus	-	Sifin	-
LAMP1 (Lysosomen)	Kaninchen	-	Sigma	L1418
PDI (ER)	Kaninchen	-	Sigma	P7496
GM130 (GA)	Kaninchen	-	Sigma	G7295

Rab11 (recycling Endosomen)	Kaninchen	-	Sigma	R5903
Transferrin	Ziege	-	Calbiochem	616423
Maus-IgG	Ziege	Alexa488	Invitrogen	A-11029
Maus-IgG	Ziege	Alexa647	Invitrogen	A-21236
Kaninchen-IgG	Ziege	Alexa647	Invitrogen	A-21245
Kaninchen-IgG	Ziege	Cy5	Invitrogen	A-10523

4.8.2.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise die Verfolgung eines Zielproteins, kann es dienlich sein, dieses Protein nicht über AK innerhalb der Zelle nachzuweisen, sondern das Protein direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Dies kann über eine Koexpression mit einem fluoreszierenden Protein - beispielsweise GFP (engl.: *green fluorescent protein*) - erfolgen, wenn das Protein in der Zelle exprimiert wird. Für Proteine, die als Marker verwendet werden sollen, bietet sich eine chemische Kopplung von Fluorochromen an das Protein an. Vorteilhaft ist auch eine Kopplung an primäre AK, da hierdurch Engpässe im Spezies-System vermieden werden können und die Präparation der Proben vereinfacht wird. Allerdings ist zu beachten, dass die Markierung auch Nachteile gegenüber dem AK-Nachweis mit sich bringt: Zum einen ist nicht genau steuerbar an welche Position des Proteins das Farbstoffmolekül bindet, was zu einem Verlust einer Bindungsstelle oder des aktiven Zentrums führen kann. Zum anderen fehlt der Verstärkungseffekt des Signals durch primäre- und sekundäre-AK. Dies kann allerdings durch eine stärkere Markierung des Proteins, angegeben in Farbstoffmolekülen pro Proteinmolekül, ausgeglichen werden. Es wurden verschiedene Arten der AK-Markierung verwendet: Die Fluoresceinisothiocyanat-(FITC) bzw. Tetramethyl-Rhodamineisothiocyanate (TRITC)-Kopplung von AK und die Markierung von Stx und AK mit Oyster-Farbstoffen (Luminartis, Münster, Deutschland). Erstere Reaktion wird nach folgendem Schema durchgeführt:

Durchführung: FITC-/TRITC-Kopplung an Proteine.

- 1 Umpufferung des Proteins (mindestens 2 mg/ml) in 0,1 M Natriumkarbonat (pH = 9,0) in Micro Bio-Spin Chromatographiesäulen (Bio-Rad Laboratories, München) nach Herstellerangabe
- 2 Zugabe von 50 µl FITC-/TRITC-Lösung in 1 mg/ml Dimethylsulfoxid (DMSO_{reinst}) pro ml Protein in 5 µl-Schritten
- 3 Inkubation für 8 h bei 4 °C
- 4 Zugabe von Ammoniumchlorid auf eine Endkonzentration von 50 mM
- 5 Inkubation für 2 h bei RT
- 6 Zugabe von Xylencyanol (0,1 %, w/v) und Glycerol (5 %, v/v)
- 7 Separieren des ungebundenen Farbstoffes durch einen weiteren Gelfiltrationsschritt in Micro Bio-Spin Säulen (Bio-Rad , Hercules, CA, USA)
- 8 Zugabe von Natriumazid (0,02 %, w/v)

Die Kopplung von den wasserlöslichen Oyster-Farbstoffen geschieht nach Herstellerangaben. Hierbei wird der kristalline Farbstoff direkt in die umgepufferte Proteinlösung gegeben, eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend der ungebundene Farbstoff mittels Mikroultrafiltrationsröhrchen (Pall nanosep, 30 kDa Membran, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) separiert.

4.8.2.3 Vorbereitung des Zellpräparates für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Vorbereitung des Zellpräparates für die Fluoreszenzmikroskopie folgt einem Schema, ist allerdings dem Experiment anzupassen. Die generellen Schritte bestehen aus der Einsaat von Zellen in ein geeignetes Experimentalsystem, hauptsächlich *chamber slides*. Je nach gewünschtem Konfluenz-Stadium werden zwischen 1 und 5 x 10⁴ Zellen pro *well* eingesät. Nach Abschluss des Versuchs und optischer Kontrolle werden die Zellen mit CMF-PBS gewaschen und anschließend mit frischem 3,7 %igen Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden die noch freien Aminotermini mit 0,2 M Glycin-Lösung (pH 7,2) gequencht. Einem CMF-PBS-Waschschrift folgend können die Zellen dann permeabilisiert werden, wenn eine intrazelluläre Färbung erwünscht ist. Dazu hat sich eine Inkubation mit 0,25 % Triton X-100 in CMF-PBS für

1 min bei 4 °C bewahrt. Nach mehrfachem Waschen folgt ein Blockierungsschritt mit 5 % BSA, 0,2 % Fischhaut-Gelatine und einer geringen Menge (20 µg/ml) an unspezifischem AK in CMF-PBS. Der unspezifische AK blockt dabei die auf der Zelloberfläche vorhandenen F_c-Rezeptoren, welche zu einem Hintergrund bei der Färbung führen würden. Der Blockierungsschritt kann 120 min bei RT oder bei 4 °C ü. N. durchgeführt werden. Das Blockierungsreagenz wird anschließend gegen den primären AK in 1 % BSA in CMF-PBS ausgetauscht. Die Konzentration von diesem ist schwierig zu prognostizieren und muss durch Vorexperimente festgestellt werden. Dieser Schritt kann von 1 h bei RT bis zu 20 h bei 4 °C dauern - je nach zu färbender Struktur. Das folgende, wiederholte Waschen ist essentiell, um den primären AK, der nicht gebunden hat, vollständig zu entfernen. Anschließend wird mit sekundär-AK in 1 % BSA in CMF-PBS, typischerweise in 1:1.000 Verdünnung, inkubiert. Nach weiteren Waschschritten kann eine DNA-Färbung mit 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI, 1:4.000, 10 min) erfolgen. Schließlich werden die Reaktionskammern vom Objektträger entfernt und die Proben mit 35 µl Antifade-Mounting Medium (Dianova, Hamburg, Deutschland) und einem Deckgläschen eingedeckt. Dieses Mounting-Medium härtet nur langsam aus. Daher muss das Deckgläschen mittels Nagellack am Rand fixiert werden, um ein Verrutschen des Deckgläschens, was zur Beschädigung der Oberflächenstrukturen der Zellen führen kann, zu verhindern. Die so vorbereiteten Proben sind dunkel und trocken gelagert für einige Wochen stabil. Zusätzlich zu diesem "Grundrezept" können zahlreiche Modifikationen hinsichtlich der Konzentrationen, Inkubationszeiten und -temperaturen vorgenommen werden. Auf eine Modifikation sollte allerdings eingegangen werden, da diese bei der Durchführung sehr oft angewendet wurde: Noch vor der Inkubation mit primärem AK wurde das Stx an den zellulären Rezeptor gekoppelt, sodass nicht der Gb3Cer-AK als primär-AK verwendet werden musste, sondern der Anti-Stx-AK eingesetzt werden konnte, welcher spezifischer ist.

4.8.2.4 Das Fluoreszenzmikroskop

Zur Visualisierung der vorbereiteten Präparate wurde das Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Axio Imager A1 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) benutzt. Dieses ist mit Bandpass-Fluoreszenzfiltern für die gängigsten Fluorophore (DAPI, Alexa488/GFP, Cy3, Cy5)

bestückt. Als Objektive stehen ein 40-fach Objektiv und ein hochwertiges 100-fach Fluoreszenz-optimiertes Öl-Objektiv zur Verfügung. Letzteres ist zu bevorzugen, da das Mounting-Medium denselben refraktiven Index wie das Immersionsöl besitzt und so der Lichtstrahl nicht gebeugt wird. Zudem besitzt das 100-fach Objektiv eine hohe numerische Apertur, bietet also ein hohes Auflösungsvermögen, sodass auch schwache Signale aufgenommen werden können. Als Auflichtquelle wird eine Quecksilberdampfampe eingesetzt, die über das FluoArc-Zusatzmodul in der Intensität variiert werden kann. Als Detektionssystem wird eine hochauflösende schwarz/weiß-Kamera verwendet. Die Einfärbung der Kanalbilder sowie deren Überlagerung werden softwareseitig (Zeiss Axiovision 4.7) durchgeführt. Zusätzlich zu den so gewonnenen Informationen kann auch ein Phasenkontrastbild aufgenommen werden, in dem die Morphologie der Zelle sichtbar ist. Dazu wird eine Glühlampe als Durchlichtquelle eingesetzt. Das Sichern der Bilder erfolgt im Zeiss-eigenen ZVI-Format, welches später bearbeitet und ergänzt werden kann, z. B. mit Skalierungen, Messungen und Kommentaren.

4.8.3 Digital holographische Mikroskopie

Durch eine Kooperation mit dem Centrum für Biomedizinische Optik und Photonik (CeBOP) der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Leitung von Prof. von Bally konnte die digital holographische Mikroskopie zur Untersuchung von Zellpräparaten eingesetzt werden. Die DHM ermöglicht eine quantitative Phasenkontrastmikroskopie, die sich für die Messung transparenter Proben eignet. Zellpräparate können mit Hilfe der DHM marker- und zerstörungsfrei untersucht werden und bleiben so morphologisch unbeeinflusst. Dazu wird eine kohärente Lichtquelle in Objekt- und Referenzwelle geteilt. Beide legen dieselbe Strecke zurück, allerdings wird die Objektwelle durch die Probe gestreut und gebeugt. Vor dem Detektor wird die Referenzwelle eingekoppelt und es kommt zu einer kohärenten Überlagerung. In diesem entstehenden Interferogramm sind sowohl die Amplituden- als auch die Phaseninformationen der überlagerten Wellen als Intensitätsverteilung gespeichert. Durch den Einsatz von intensitätssensitiven Aufzeichnungsmedien wie digitalen Rasterbildsensoren, z. B. CCD-Kameras, können die Informationen aufgezeichnet werden. Eine

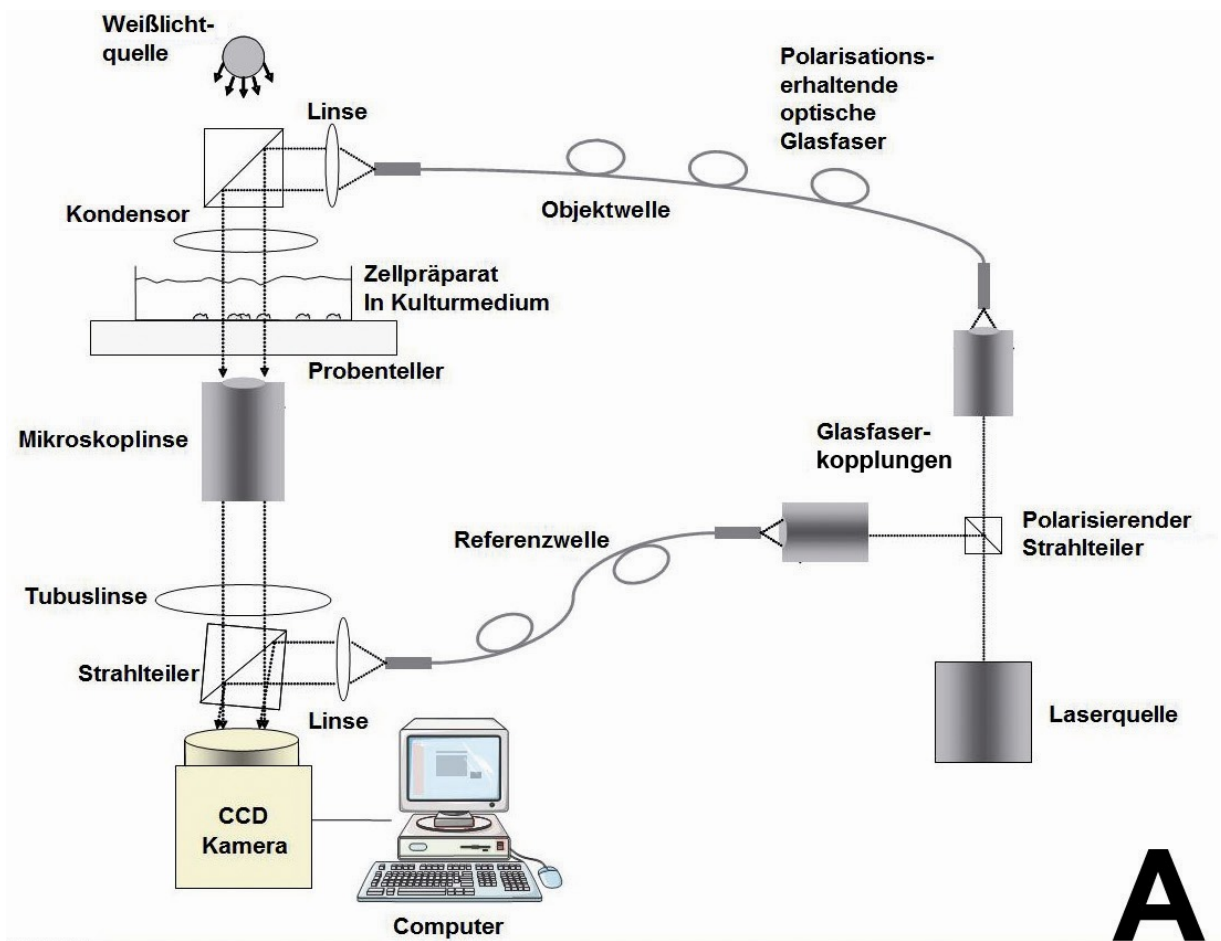
Auswertung der Bilder geschieht softwareseitig durch das Anwenden verschiedener Algorithmen. Die erhaltenen Daten beinhalten quantifizierbare Informationen über die Zellen, wie beispielsweise die Zelldicke oder den Brechungsindex.

4.8.3.1 Präparation der Probe für die digital holographische Mikroskopie

Die Präparation der Zellen für die DHM wurde optimiert, wobei sich folgende Methode letztendlich als die geeignetste erwiesen hat: Zunächst werden 800 μl einer Zellsuspension mit der Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml in die Vertiefung des $\mu\text{-dishes}$ ausgesät. Nach einer Adhäsionsphase, die mindestens 4 h betragen sollte, kann das zu testende Toxin, in dieser Arbeit verschiedene Konzentrationen von Stx oder EHEC-Vac, zugesetzt werden. Anschließend wird das $\mu\text{-dish}$ auf dem Probenhalter des Mikroskops fixiert. Zu beachten ist, dass das $\mu\text{-dish}$ nicht in den Inkubator gestellt wird, da sich der spezielle Plastikboden, der besonders gute optische Eigenschaften aufweist, mit CO_2 sättigt. Dieses diffundiert während der Messung langsam aus dem Boden, was eine Änderung der Fokusebene verursacht und so die Messung kontinuierlich über Tage aus dem Fokus läuft und aufwendig softwareseitig nachfokussiert werden muss. Die zusätzlich generierten Weißlichtaufnahmen hingegen können nicht nachfokussiert werden. Da das Präparat während der Messung zwar temperiert wird, aber keine CO_2 -Begasung erfolgt und die $\mu\text{-dishes}$ einen Gastransport erlauben, muss für eine Langzeitmessung anderes Medium verwendet werden. Dieses sollte nicht auf Natriumbikarbonat-Pufferung, das übliche System zur pH-Regulierung, sondern auf einer 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Pufferung basieren. Damit wird einer starken Änderung des pH-Wertes und den damit zusammenhängenden morphologischen Änderungen der Zellen vorgebeugt. Für EA.hy 926 Zellen sowie für HBMECs wurde dazu Leibowitz L15 Medium (PAA) benutzt, das sowohl von den Osmolaritäten als auch von den Inhaltsstoffen einen guten Kompromiss darstellt und, je nach Zelltyp unterschiedlich supplementiert, genügend Substrat enthält.

4.8.3.2 Das digital holographische Mikroskop

Das verwendete Mikroskop (siehe Abbildung 4) ist ein iMIC-Mikroskop der Firma TILL Photonics (Gräfeling, Deutschland), welches ursprünglich ein Fluoreszenzmikroskop ist und ebenfalls Weißlichtaufnahmen ermöglicht. Allerdings wurde dieses so modifiziert, dass auch digitale Hologramme erzeugt und detektiert werden können (Kemper *et al.*, 2006a). Dazu wurde ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser, Coherent Compass 315M-100, Lübeck) mit der Wellenlänge von 532 nm in einer separaten Laserbox verwendet. Die Objektwelle wird durch ein Glasfaserkabel über einen Stahlteilerwürfel in den Kondensor des Mikroskops eingekoppelt, während die Referenzwelle über ein Glasfaserkabel unter dem Mikroskopobjektiv eingekoppelt wird. Seitlich am Mikroskop ist die CCD-Kamera (DMK 41BF02, ImagingSource, Bremen) angebracht, welche die durch die Überlagerung entstandene Intensitätsverteilung in ein 8 bit Graustufenbild wandelt, das an einen Computer gesendet wird. Das gesamte Mikroskop befindet sich in einem Inkubator (Solent Scientific, Segensworth, England) und kann so temperiert werden. Die Steuerung von Objektisch, Fokustrieb und Weißlichtbeleuchtung erfolgt über die Software TILLvisION der Firma TILL Photonics. Die Aufnahmen der Weißlichtbilder und der Hologramme werden mit dem am CeBOP entwickelten Programm Fireview in Intervallen von drei oder fünf Minuten durchgeführt.



A



B

Abbildung 4: A: Schematische Darstellung des Lichtweges in der DHM. B: Messaufbau des DHM am Centrum für Biomedizinische Optik und Photonik in Münster.

4.8.3.3 Datenverarbeitung nach den Messungen

Die Rekonstruktion der aufgezeichneten Hologramme und die Auswertung der resultierenden Phasenkontrastbilder erfolgten mit den Programmen dcHolo und PhaseIllustrator, welche am CeBOP entwickelt wurden (Carl *et al.*, 2004, Kemper *et al.*, 2006b). Zunächst müssen die Bilder fokussiert und entfaltet werden. Dabei kann es zu Entfaltungsfehlern kommen, die im Nachhinein die Quantifizierung der Zellhöhe stören. Diese Bilder werden mit Hilfe eines Programms aussortiert und die verbleibenden werden dem Phaseillustrator zugeführt. Hier können aus den rekonstruierten Phasenkontrastaufnahmen die Phasenänderungen, welche durch die Zelle verursacht wurden und Phasendifferenzen ermittelt werden. Über einen Mikroskop-spezifischen Umrechnungsfaktor werden diese in eine μm -Skala transferiert. Zudem sind in dieser Software weitere Darstellungs- und Auswertungswerkzeuge implementiert, wie beispielsweise eine Funktion, welche die Zellbewegungen verfolgt oder den jeweils höchsten Punkt der Zelle bestimmen kann.

4.8.4 Rasterelektronenmikroskopie

4.8.4.1 Vorbereitung des Präparats für die Rasterelektronenmikroskopie

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich mit Toxin-behandelten Endothelzellen bewachsene Cytodex 3 MC (GE Healthcare) rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die besiedelten MC stammen entweder aus dem Superspinner-Kultivierungssystem oder sind speziell für die Elektronenmikroskopie in 6 *well* Platten vorbereitet worden. Bei dem Bewuchs im nicht-gerührten System ist darauf zu achten, dass die MC regelmäßig durchmischt werden, damit die Zellen die ganze Fläche der Carrier besiedeln. Nach Abschluss der Experimente werden die MC zunächst dreimal in 0,1 M PBS-Puffer nach Sörensen (2,024 g KH_2PO_4 und 9,228 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ *ad* 1.000 ml Reinstwasser, pH = 7,3) gewaschen. Anschließend erfolgt eine Fixierung mit 2,5 %iger Glutardialdehyd-Lösung, die aus 25 %iger Lösung speziell für die Elektronenmikroskopie 1:10 mit Sörensen-PBS hergestellt wird. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 1 h werden die MC dreimal gewaschen und anschließend

mit 1 %igem Osmiumtetroxid für 60 min inkubiert. Die Entwässerung der MC wird mit einer aufsteigenden Alkoholreihe realisiert. Dazu werden die MC je 15 min in 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und zweimal in 99,9 %igem Ethanol gegeben. Das Ethanol wird in einer Kritische-Punkt-Trocknungsanlage bei 31 °C und 80 bar gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht, das sich bei niedrigeren Drücken verflüchtigt. Die trockenen Proben werden auf einen mit Schmelzkleber präparierten Probenträger geblasen und anschließend in einem Kathodenzerstäuber mit zwei 15 nm dicken Schichten Gold versehen (Reichelt, 2007). Die so vorbereiteten MC können in einem Exsikkator über längere Zeit gelagert werden.

4.8.4.2 Das Rasterelektronenmikroskop

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reichelt am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster wurden Präparate für das Rasterelektronenmikroskop (engl.: *scanning electron microscope*, SEM) vorbereitet und anschließend gemessen. Dazu wurde ein Hitachi S-450 SEM eingesetzt. Die Theorie und die Bedienung des Instruments sollen hier nicht erläutert werden. Es wurden zwei relevante Änderungen während dieser Arbeit durchgeführt: Zum einen wurde das Detektionssystem von analog auf digital aufgerüstet (Nikon, Tokyo, Japan); die digitalen Bilder wurden in einer Auflösung von 3872 x 2592 Pixeln aufgenommen, was sicherstellt, dass jegliche Bildinformation ohne Verlust aufgezeichnet werden konnte. Zum anderen wurde das Gerät generalüberholt, wodurch die maximale Auflösung von 5.000-fach auf 10.000-fach verdoppelt werden konnte.

4.9 Durchflusszytometrie

4.9.1 Vorbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung von Zellzyklus und Stx-Rezeptordichte

Im Folgenden sind alle Arbeitsschritte für die Durchflusszytometrie aufgelistet. Dieses Protokoll ermöglicht eine Doppelfärbung der verwendeten Endothelzellen, um den Zellzyklus und die Dichte des Stx-Rezeptors Gb3Cer zu bestimmen. Vor der Verwendung von Propidiumiodid (PI) zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen wurden Protokolle mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD, Beckman Coulter, Krefeld), welches besser zu den im Gerät verbauten Lichtquellen passt, getestet. Diese erwiesen sich jedoch als nicht ziel führend. Eine Glykosphingolipid-schonende Fixierung mit Paraformaldehyd stellte sich für die Zellzyklusbestimmung als unbrauchbar heraus und wurde durch eine Fixierung der Zellen mit 70 %igem Ethanol in PBS ersetzt. Im folgenden Protokoll werden alle Waschschritte durch Resuspension der Zellen in 1 %iger BSA-Lösung in CMF-PBS realisiert. In dieser Waschlösung wurden auch alle AK-Inkubationsschritte durchgeführt. Die Propidiumiodid-Färbelösung besteht aus 49 ml Nicoletti-Puffer (0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) Natriumacetat ad 1.000 ml H₂O_{dest}) (Nicoletti *et al.*, 1991) mit 1 ml der Propidiumiodid-Stammlösung (25 mg Propidiumiodid ad 10 ml H₂O_{dest}).

Durchführung: Vorbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse und Gb3Cer-Rezeptordichte-Bestimmung in Endothelzellen.

- 1 Vorbereitung von Zellen in T-75 Flaschen, 50 % Konfluenz
- 2 Kulturmedium absaugen und verwerfen
- 3 Zellablösung durch Inkubation mit 20 ml 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in serumfreiem Medium für 30 min bei 37 °C; Zellen mehrfach resuspendieren
- 4 Zentrifugation (400 g, 5 min), Überstand verwerfen
- 5 Waschen der Zellen
- 6 Zentrifugation (400 g, 5 min), Überstand verwerfen
- 7 Fixierung der Zellen durch tropfenweise Zugabe von 70 % Ethanol in CMF-PBS (-20 °C) bei vorsichtiger Durchmischung, um Aggregatbildung zu verhindern;

- Inkubation 120 min auf Eis
- 8 Zentrifugation (600 g, 5 min), Überstand verwerfen
 - 9 Waschen der Zellen
 - 10 Zentrifugation (600 g, 5 min)
 - 11 Zugabe von 5 mg/ml RNase A (Roche) in je 50 µl in Blockierungspuffer (5 % (w/v) BSA; 0,2 % (v/v) Fischhaut-Gelatine in PBS) für 60 min bei RT
 - 12 Zentrifugation (600 g, 5 min), Überstand verwerfen
 - 13 Waschen der Zellen
 - 14 Zugabe von 1,25 µg/ml Stx1 für 60 min bei 4 °C
 - 15 Zentrifugation (600 g, 5 min), Überstand verwerfen
 - 16 Waschen der Zellen
 - 17 Zentrifugation (600 g, 5 min)
 - 18 Zugabe von 4 µl/ml Anti-Stx1 Antikörper für 60 min bei 4°C
 - 19 Zentrifugation (600 g, 5 min), Überstand verwerfen
 - 20 Waschen der Zellen
 - 21 Zentrifugation (600 g, 5 min)
 - 22 Zugabe des sekundären Antikörpers (Anti-Maus-IgG, Alexa 488 gelabelt) 1:500 für 60 min bei 4 °C, im Dunkeln
 - 23 Zentrifugation (600 g, 5 min)
 - 24 Waschen der Zellen
 - 25 Zentrifugation (600 g, 5 min)
 - 26 Zugabe von 3-5 ml Propidiumiodid-Färbelösung (4 °C, 30 min)

Die so vorbereiteten Proben wurden dem Durchflusszytometer zugeführt und enthielten genügend Zellen für die Messung von 10^6 Nuklei.

4.9.2 Das Durchflusszytometer

In dieser Arbeit wurden verschiedene Durchflusszytometer (Akronym: FACS, engl.: *fluorescence activated cell sorting*) benutzt, allerdings wurden alle präsentierten Daten mit einem Beckman Coulter Cytomics FC500 generiert, das im Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Leitung von Prof. Humpf zur Verfügung stand. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Streuung von Licht durch Zellen. Diese werden in einer Kapillare hydrodynamisch durch eine Mantelflüssigkeit (Isoflow™ Epics Sheath Fluid, Beckman Coulter) fokussiert und an Lasern vorbeigeleitet. Dadurch kommt es zur Lichtstreuung, die über Photomultiplier als Detektoren nachgewiesen wird. Man unterscheidet zwischen dem Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter*, FS), das direkt mit dem Volumen der Zelle korreliert und dem Seitwärtsstreulicht (engl.: *sideward scatter*, SS) im rechten Winkel, das ein Maß für die Granularität der Zelle ist. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, über die eingebauten Laser (Argon-Laser, 488 nm, FL3 ; Helium-Neon-Laser, 633 nm, FL1) die Menge der an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zu vermessen und so eine Aussage über beispielsweise DNA-Menge oder andere fluoreszenzmarkierte Antigene zu erhalten. Durch Kompensation können dabei Streueffekte zwischen den einzelnen Detektionskanälen unterdrückt werden. Zur Bedienung und Auswertung wurde die Software CXP von Beckman Coulter eingesetzt.

4.9.3 Datenverarbeitung nach der Durchflusszytometrie-Messung

Nach der Messung müssen die Daten computergestützt ausgewertet werden. Die Selektion der gewünschten Zellen erfolgt durch Filter, die als *gates* und der Vorgang als *gating* bezeichnet wird. Zunächst müssen Zelldebris und intakte Zellen getrennt werden. Dazu ist eine Auftragung der Messwerte nach FS und SS sinnvoll (Abbildung 5A). Um die Zellzyklusphase korrekt bestimmen zu können, müssen Einzelzellen mit doppeltem DNA-Inhalt von Zell-Dubletten getrennt werden. Dies geschieht über die am Detektor ermittelte Relation von Fluoreszenz-Peakfläche zu Fluoreszenz-Peakhöhe, die bei Einzelzellen linear sein muss (Abbildung 5B). Durch Auftragung des PI-Signals (FL3-Kanal) gegen die Anzahl der Ereignisse entsteht die typische graphische Darstellung der Zellzyklusstadien, die

erneut durch *gates* in G1-, S- und G2-Phase getrennt werden kann (Abbildung 5C). Da nach dem verwendeten Protokoll zeitgleich auch eine Gb3Cer-Anfärbung im FL1-Kanal erfolgte, können Zellzyklus- und Rezeptordichte-Daten gegeneinander aufgetragen werden. Durch Farbgebung bestehen verschiedene Möglichkeiten, den Informationsgehalt zu erhöhen, beispielsweise durch einen sog. *density plot*, der gleichzeitig die Anzahl der Ereignisse in einem 2D- oder 3D-Plot farblich darstellt (Abbildung 5D). Außerdem können die vorher definierten *Zellzyklus-gates* auf diese Darstellung angewendet werden, sodass anschließend das sog. *backgating* erfolgen kann, d. h. eine rückwirkende Filterung der Messdaten nach Zellzyklusphase und Rezeptordichte (Abbildung 5E und F). Die Auswertung der Daten für die Zellzyklusanalyse erfolge nicht über manuell eingestellte *gates*, sondern mit dem Programm MultiCycle AV. Somit wird der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusstadien genauer berechnet (vgl. Abbildung 14).

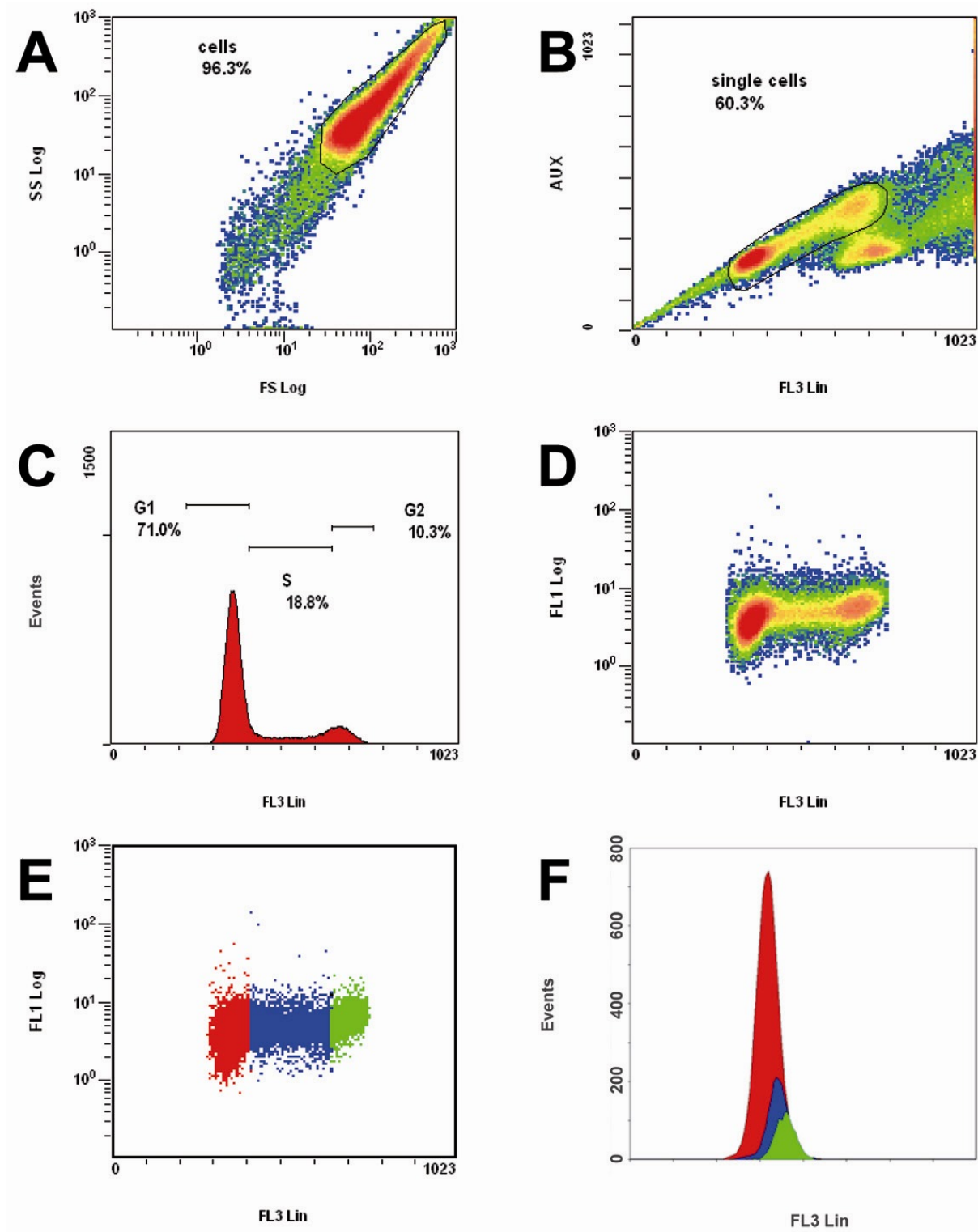


Abbildung 5: Auswertung der mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Daten. Die Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text (4.9.3). A: Trennen von Zellen und Zell-Debris durch *gating*. B: Trennung von Einzelzellen und Dubletten durch *gating*. C: Festlegung der *gates* für die Zellzyklusstadien. D: *Density plot* des DNA-Inhalts gegen das Gb3Cer-Signal. E: *Backgating* der Zellzyklusstadien auf das Gb3Cer-Signal. F: Überlagerung der einzelnen Zellzyklusstadien-Gb3Cer-Signale durch *backgating*.

4.10 Elektrische Zell-Substrat Impedanz Messung

Die elektrische Zell-Substrat Impedanz Messung (engl.: *electric cell-substrate impedance sensing*, ECIS) wurde 1991 zum ersten Mal beschrieben (Giaever and Keese, 1991) und ist eine markerfreie, kontinuierliche und nicht-invasive *real-time* Methode, um das Zellverhalten zu messen. Dazu werden die Zellen in speziellen 8-well slides ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Die verwendeten 8W2x1E (Medusa)-slides (ibidi) verfügen je well über zwei runde, transparente, sehr dünne Goldelektroden mit einem Durchmesser von 250 μm und einer 300-fach größeren Gegenelektrode, die das Zellkulturmedium als Elektrolyt nutzt. Dadurch wird die Messelektrode zum Nadelöhr für den Stromfluss und der gemessene Wechselstromwiderstand (Impedanz) ist fast ausschließlich abhängig von der Zellschicht auf der Messelektrode, die sich wie ein Isolator verhält. Die nun auftretenden Schwankungen der Impedanz sind ein Zeichen der vertikalen Bewegungen (*micromotions*) der Zellen. Die *micromotions* sind ein Maß für die zelluläre Morphologie und Vitalität (Wegener *et al.*, 1996). In Abhängigkeit der Frequenz des angelegten elektrischen Feldes kann ein Teil des Stromes durch die Zellen, also Basalmembran, Zytoplasma und die apikale Plasmamembran (transzellulär) oder um die Zellkörper herum durch den Interzellularspalt und die *tight junctions* (parazellulär) fließen. Die Menge des transzellulär fließenden Stromes ist abhängig von der Kapazität der Plasmamembran, während der parazellulär fließende Strom abhängig vom Abstand zwischen Zelle und Substrat sowie vom Widerstand des interzellulären Spaltes ist. Es wurde bei Frequenzen von 40 kHz gemessen und sowohl die Kapazität als auch die Impedanz bestimmt. Die bei 40 kHz gemessene Kapazität ist bei einer unvollständig bedeckten Elektrode hoch und sinkt linear mit fortschreitender Zellspreitung (Wegener *et al.*, 1996). Die Kapazität kann daher bei dieser Frequenz als direktes Maß der Zellproliferation und -spreitung auf der Elektrodenoberfläche angenommen werden.

In dieser Arbeit wurde das ECIS-System eingesetzt, um einen Wundheilungsprozess zu simulieren. Dabei wird auf einer der beiden pro well vorhandenen Messelektroden impulsartig eine höhere Spannung angelegt, die für die darauf wachsenden Zellen letal ist; die zweite Messelektrode dient als Referenzelektrode. Nachfolgend kann der Prozess der Wundheilung, also die Proliferation der benachbarten Zellen in diese nun vorhandene Lücke, gemessen werden. Die Inokulationszellichten sowie Volumina wurden von

chamber slides adaptiert. Die ECIS-Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Joachim Wegener am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Prof. Galla durchgeführt.

4.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels *t*-Tests nach Student durchgeführt. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

5 ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Kapitel gegliedert, die sich thematisch an den Publikationen orientieren. Zunächst wird auf den Hauptaspekt - die unterschiedlichen Wirkungsweisen von Stx1 und Stx2 auf mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen - eingegangen. Die für diese Untersuchungen etablierten Methoden konnten zusätzlich zur Aufklärung der Wirkungsweise des vakuolisierenden Toxins eingesetzt werden. Schließlich werden neue Anwendungsmöglichkeiten der DHM vorgestellt.

5.1 Unterschiedliche Wirkungsweisen von Stx1 und Stx2 auf mikro- und makrovaskuläre Endothelzelllinien

In diesem Kapitel werden die unterschiedlichen Wirkungsweisen von Stx1 und Stx2 auf Endothelzellen verschiedener Herkunft beschrieben. Als Modellzelllinien dienten HBMECs als mikrovaskuläre und EA.hy 926 Zellen als makrovaskuläre Endothelzellen. Da beide Zelllinien jeweils mit Stx1 und Stx2 behandelt und zudem oft verschiedene Inkubationszeiten oder Konzentrationen getestet wurden, erfolgt die Beschreibung der generierten Daten nach folgendem Schema: Es werden zunächst die Effekte von Stx1 auf HBMECs und EA.hy 926 Zellen erläutert und danach die von Stx2.

5.1.1 Toxin-bedingte Wachstumsinhibition von Endothelzellen

Einen Hinweis auf die Stx-bedingte Wachstumsinhibition von Endothelzellen lieferten Wundheilungsassays, die mit dem ECIS-Instrument durchgeführt wurden. Dazu wurden die Zellen in *Medusa-slides* bis zur Konfluenz kultiviert und nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Stx (0,5 oder 1 µg/ml) für 48 h ein Stromimpuls ($t = 260$ min) auf jeweils eine der beiden Messelektroden appliziert, der zur Abtötung der darauf befindlichen Zellen führte. Daraufhin stieg die gemessene Kapazität auf etwa 5 nF. Das Absinken der Kapazität, die linear mit dem Bewuchs auf der Messelektrode korreliert, diente als Maß für

die Proliferation der umliegenden Zellen, welche die nun freie Wachstumsfläche wieder besiedelten (exemplarisch für EA.hy 926 Zellen in Abbildung 6). Es konnte für HBMECs und EA.hy 926 Zellen gezeigt werden, dass die Wundheilung und damit die Proliferation der Zellen durch Stx im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst wurde. Dabei verursachte Stx2 einen stärkeren inhibierenden Effekt als Stx1. Die höchste eingesetzte Stx1-Konzentration (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verhinderte die Besiedelung der Elektrode während der Messzeit von 18,5 h nach Impulsgabe vollständig.

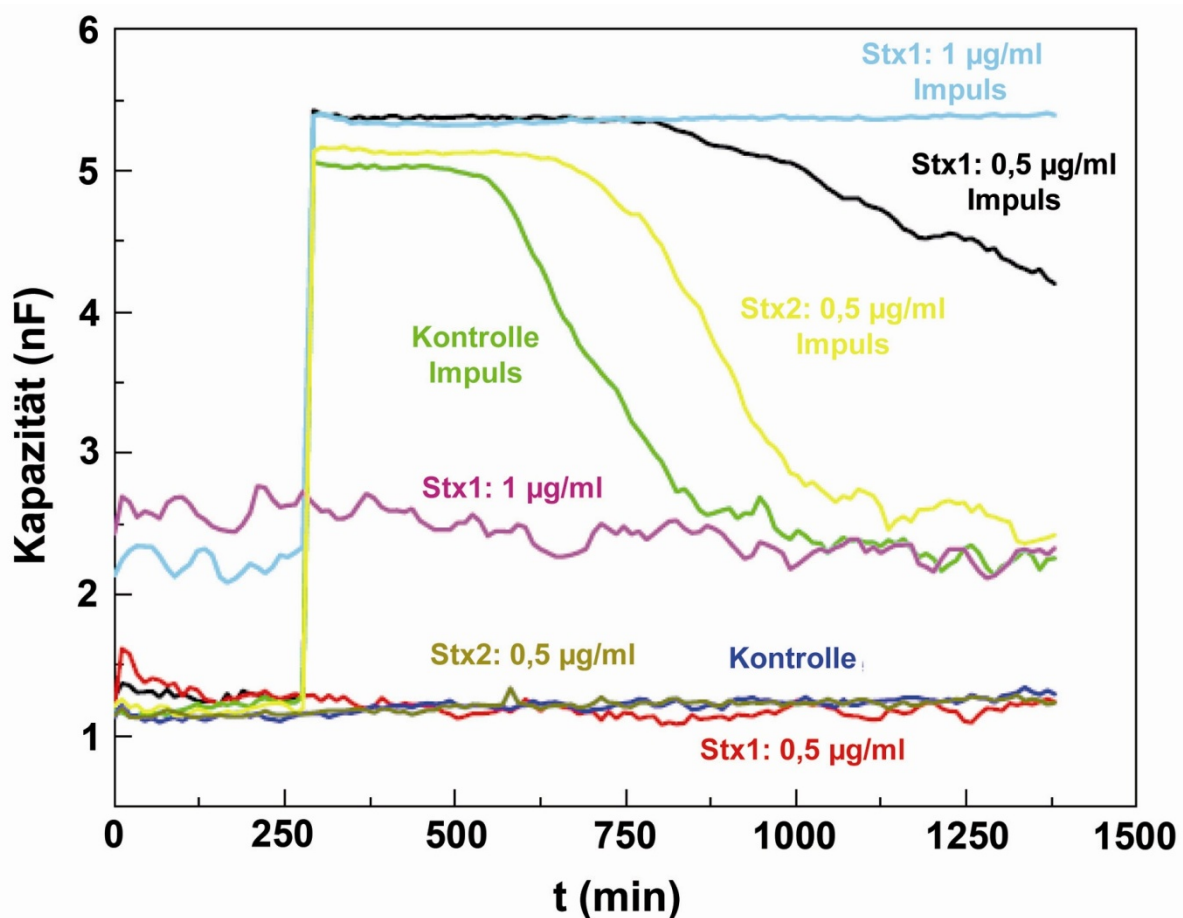


Abbildung 6: Wundheilungsassay von EA.hy 926 Zellen unter dem Einfluss von Stx in indizierten Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Nach Applikation des Stromimpulses wurde die Kapazität als Maß für die Proliferation der die Wunde umgebenden Zellen gemessen. Stx weisen konzentrationsabhängig einen wachstumshinibierenden Effekt auf die Zellen auf.

Für die Quantifizierung der wachstumshinibierenden Effekte von Stx1 und Stx2 auf HBMECs und EA.hy 926 Zellen wurden subkonfluente Monolayer steigenden Konzentrationen (0,1 ng/ml bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beider Toxine ausgesetzt und die metabolische

Aktivität mittels WST-1-Assays bestimmt. Stx1 und Stx2 verursachten konzentrationsabhängig eine Wachstumsinhibition beider endothelialer Zelllinien (Abbildung 7).

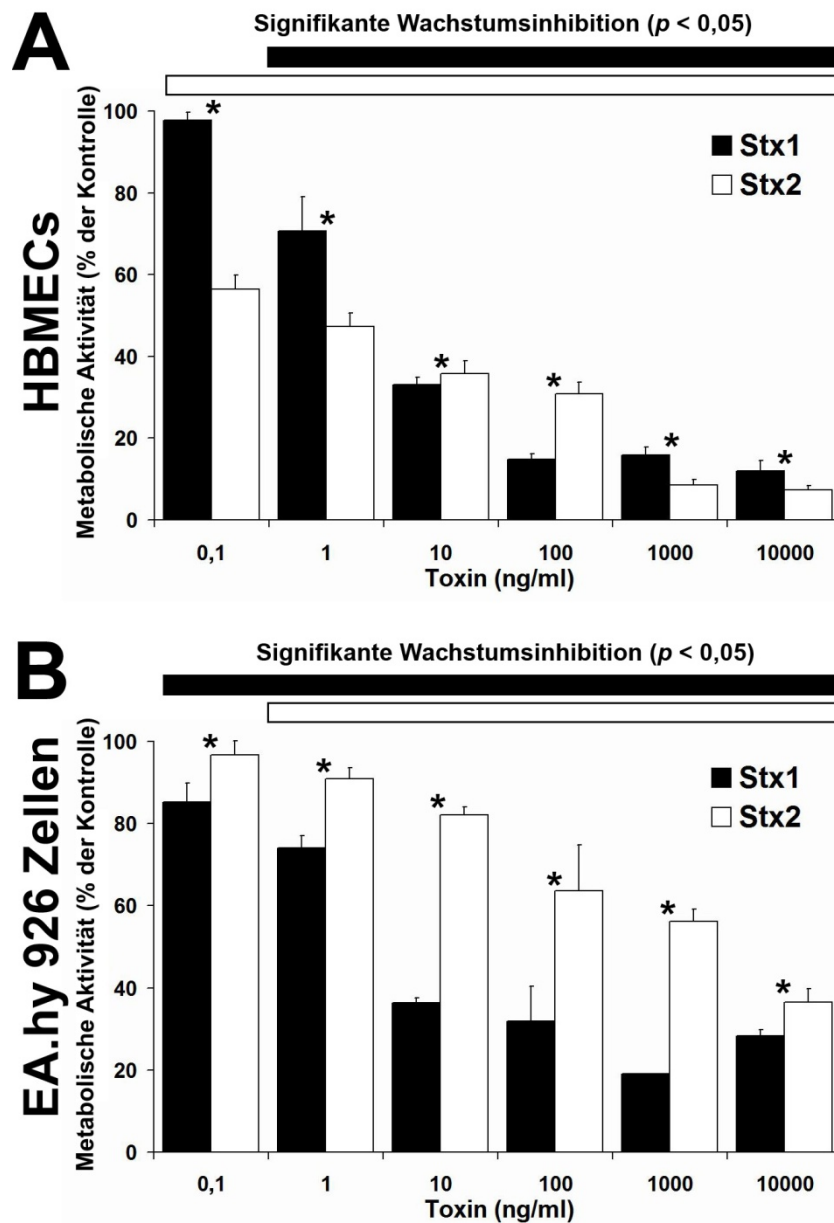


Abbildung 7: Unterschiedliche Stx1- und Stx2-bedingte Wachstumsinhibition von HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B). Die Zellen wurden auf Mikrotiterplatten kultiviert und die subkonfluenten Monolayer wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen von Stx1 oder Stx2 inkubiert. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte (Standardabweichungen) von Vierfach-Bestimmungen und werden als prozentuale Anteile der metabolischen Aktivität von unbehandelten Kontrollzellen angegeben. Die IC_{50} -Werte für HBMECs (Stx1: $\sim 3,5$ ng/ml, Stx2: $\sim 0,5$ ng/ml) und EA.hy 926 Zellen (Stx1: $\sim 4,3$ ng/ml, Stx2: ~ 2 μ g/ml) wurden aus dem Graph bestimmt. Die horizontalen schwarzen und weißen Balken deuten eine signifikante Wachstumsinhibition ($p < 0,05$) durch das jeweilige Stx an. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Stx1- und Stx2-vermittelter Inhibition sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration von Stx1 liegt bei HBMECs (~ 3,5 ng/ml, Abbildung 7A) und EA.hy 926 Zellen (~ 4,3 ng/ml, Abbildung 7B) auf einem ähnlichen Niveau. Die IC₅₀-Werte von Stx2 betragen ~ 0,5 ng/ml (HBMECs) und ~ 2 µg/ml (EA.hy 926 Zellen), also mehr als drei Größenordnungen niedriger für HBMECs (Tabelle 5). Diese Daten verdeutlichen, dass Stx1 einen ähnlichen wachstumsinhibierenden Effekt auf mikro- und makrovaskuläre Zellen aufweist, Stx2 jedoch mehr als 10³-fach stärker auf mikrovaskuläre Zellen wirkt.

Tabelle 5: Übersicht der Stx1- und Stx2-bedingten Effekte auf mikrovaskuläre HBMECs und makrovaskuläre EA.hy 926 Zellen.

Assay	Zelllinie	Shiga Toxin 1	Shiga Toxin 2
IC ₅₀ ^a	HBMECs	~ 3,5 ng/ml	~ 0,5 ng/ml
	EA.hy 926 Zellen	~ 4,3 ng/ml	~ 2 µg/ml
CD ₅₀ ^b	HBMECs	~ 10 ng/ml	~ 0,1 ng/ml
	EA.hy 926 Zellen	~ 1 ng/ml	~ 100 ng/ml
Apoptose ^c	HBMECs	≥ 0,01 ng/ml	≥ 0,1 pg/ml
	EA.hy 926 Zellen	≥ 0,1 ng/ml	≥ 10 ng/ml
Nekrose ^d	HBMECs	≥ 1 ng/ml *	≥ 10 ng/ml
	EA.hy 926 Zellen	≥ 0,1 pg/ml	≥ 1 µg/ml

^a 50 % wachstumsinhibierende Konzentration gemessen mit dem WST-1 Proliferationsassay (Abbildung 7).

^b 50 % zytotoxische Konzentration bestimmt mit dem Zytotoxizitätsassay (Abbildung 8).

^c Geringste im DNA-Fragmentierungsassay eingesetzte Stx-Konzentration, die signifikant ($p < 0,05$) Apoptose in den Zellen auslöst (Abbildung 15).

^d Geringste im DNA-Fragmentierungsassay eingesetzte Stx-Konzentration, die signifikant ($p < 0,05$) Nekrose auslöst (Abbildung 16). * nicht alle niedrigeren Konzentrationen induzierten signifikant Nekrose.

5.1.2 Unterschiedliche Zytotoxizitäten von Stx gegenüber Endothelzelllinien

Aufgrund der zytotoxischen Wirkung der beiden Stx-Subtypen wurde zunächst untersucht, ob die beschriebenen unterschiedlichen inhibitorischen Effekte mit unterschiedlichen Zytotoxizitäten korrelieren. Sowohl Stx1 als auch Stx2 entfalteten eine zytotoxische Wirkung gegenüber beiden Zelllinien in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abbildung 8). Allerdings wies Stx1 mit Ausnahme der höchsten Konzentration (10 µg/ml) eine signifikant höhere Toxizität als Stx2 gegenüber EA.hy 926 Zellen auf (Abbildung 8B). Im Gegensatz dazu verursachte Stx2 im Vergleich zu Stx1 eine größere Zytotoxizität in HBMECs (Abbildung 8A) im Konzentrationsbereich von 0,01 ng/ml bis 10 ng/ml; die Unterschiede der Wirkung beider Toxine auf HBMECs waren allerdings nur im niedrigsten getesteten Konzentrationsbereich signifikant. Die CD_{50} -Werte für Stx1 sind ~ 10 ng/ml bei HBMECs und ~ 1 ng/ml bei EA.hy 926 Zellen (Unterschied Faktor 10); für Stx2 betragen diese Werte ~ 0,1 ng/ml für HBMECs und ~ 100 ng/ml für EA.hy 926 Zellen (Unterschied Faktor 1000) (Tabelle 5). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Zelllinien auf Stx1 in ähnlicher Weise reagieren, bezüglich Stx2 allerdings stark variierende Sensitivitäten aufweisen. Diese Daten lassen vermuten, dass die unterschiedlichen Zytotoxizitäten von Stx1 und Stx2 gegenüber HBMECs und EA.hy 926 Zellen die Ursache für die entsprechenden Unterschiede in der Wachstumsinhibition sind (Abbildung 7).

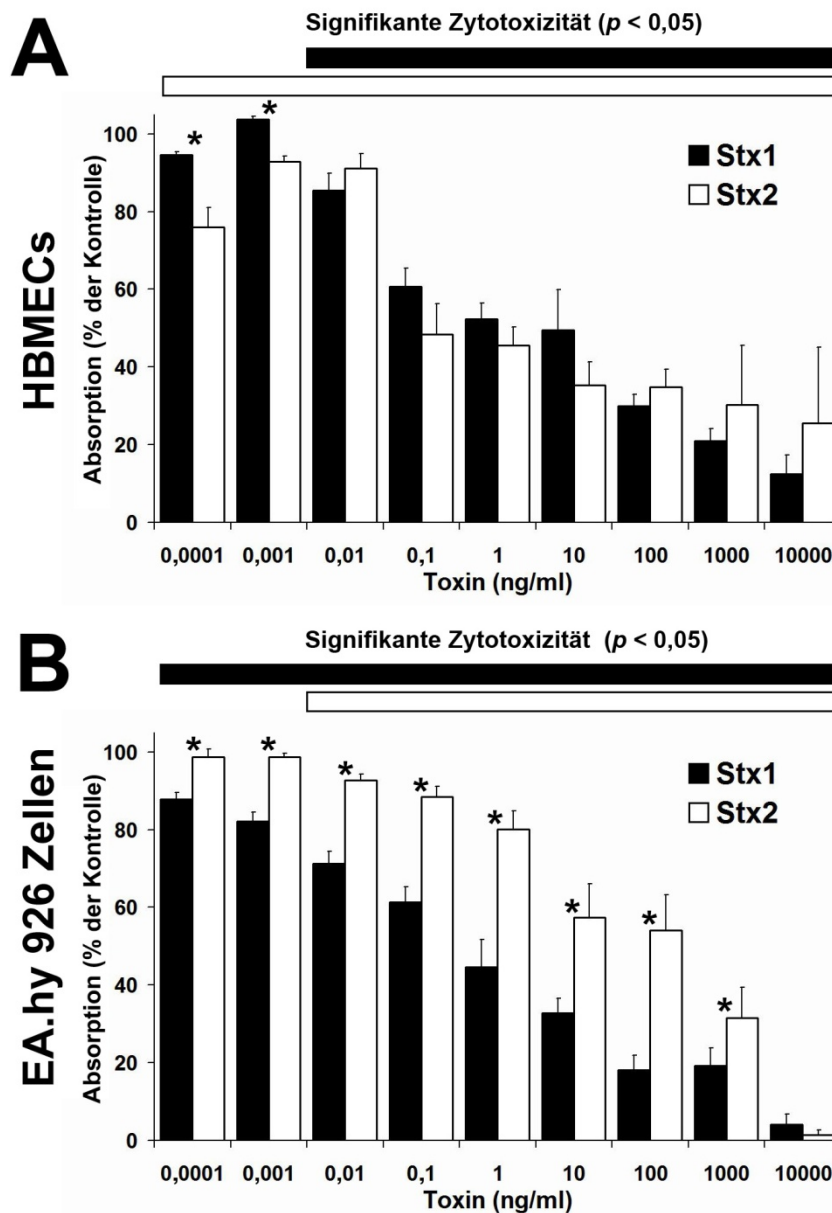


Abbildung 8: Unterschiedliche Zytotoxizität von Stx1 und Stx2 bei HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B). Konfluente Monolayer in 96-well Platten wurden für 48 h mit den indizierten Konzentrationen von Stx1 oder Stx2 inkubiert. Die Zytotoxizität wurde durch Messung der Kristallviolett-Absorption der verbleibenden adhärenen Zellen bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte (Standardabweichungen) von Achtfach-Bestimmungen und werden als prozentualer Anteil der Kristallviolettabsorption von unbehandelten Kontrollzellen angegeben. Die CD_{50} -Werte für HBMECs betragen ~ 10 ng/ml (Stx1) bzw. $\sim 0,1$ ng/ml (Stx2) und für EA.hy 926 Zellen ~ 1 ng/ml (Stx1) bzw. ~ 100 μ g/ml (Stx2). Die horizontalen schwarzen und weißen Balken deuten eine signifikante Zytotoxizität ($p < 0,05$) durch das jeweilige Stx an. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Stx1- und Stx2-vermittelter Inhibition sind mit Sternchen gekennzeichnet.

5.1.3 Morphologische Änderungen von Endothelzelllinien durch Stx

Die zytotoxischen Effekte von Stx1 und Stx2 können auf Toxin-induzierter Apoptose, Nekrose oder einer Kombination beider Prozesse beruhen. Um ein besseres Verständnis der Mechanismen der Zytotoxizität auf Endothelzellen zu erlangen, wurden Änderungen der Zellmorphologie nach Inkubation mit Stx1 oder Stx2 mittels SEM untersucht. Da mittels Proliferations- und Zytotoxizitätsassay nachgewiesen wurde, dass Konzentrationen von 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 bei beiden Zelllinien zu signifikanten Reaktionen führten, wurden die Zelllinien mit diesen Stx-Konzentrationen für 10 oder 48 h inkubiert. Dies stellte sicher, dass mögliche Toxin-bedingte Änderungen der Zellmorphologie elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten.

Die unbehandelten HBMEC-Kontrollzellen waren etwa gleich groß und wiesen das typische "Kopfsteinpflaster-Muster" von konfluenten Zellen mit strikter Kontaktinhibition auf (Abbildung 9A). Nach zehnstündiger Inkubation mit Stx1 (Abbildung 9B) konnten deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie dokumentiert werden: Neben einer Reduktion der Mikrovilli-Strukturen der Zelloberfläche traten irreguläre Zellformen, Läsionen der Plasmamembran, größere Abstände der Zellen zueinander und eine stellenweise Zellablösung auf. Diese auf nekrotische Vorgänge zurückzuführenden Effekte hatten eine schwere Schädigung des Zell-Monolayers zur Folge. Zudem waren auch Membranausstülpungen zu erkennen, die als *blebbing* bezeichnet werden und typische Merkmale eines apoptotischen Zelltodes sind. Nach 48 stündiger Inkubation waren all diese Effekte noch stärker ausgeprägt (Abbildung 9C). Im Gegensatz zu diesen schwerwiegenden Verletzungen des Monolayers verursachte Stx2 in gleichen Konzentrationen ausschließlich *blebbing* (Abbildung 9D und E). Obwohl viele verschiedene MC untersucht wurden, konnten keine Läsionen der Plasmamembran oder Zellablösungen gefunden werden. Allerdings waren die MC teilweise nicht vollständig bewachsen, obwohl die Präparation beider Experimente parallel aus derselben Vorkultur erfolgte und als ein erster Hinweis betrachtet werden konnte, dass Stx2 möglicherweise einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Die Stx-Subtyp-abhängige Änderung der Zellmorphologie ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

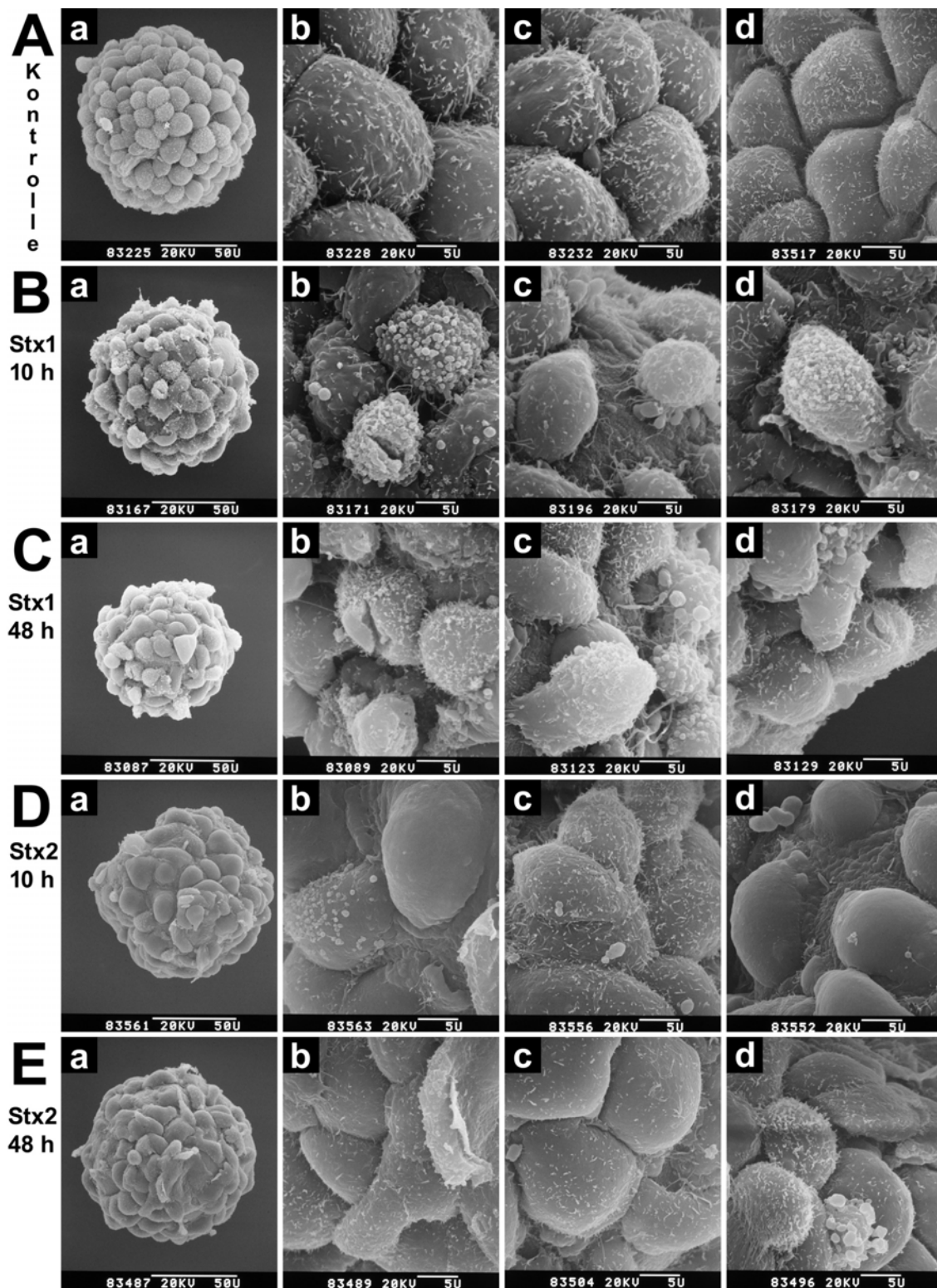


Abbildung 9: Mittels SEM detektierte morphologische Änderungen von HBMECs nach Inkubation mit Stx1 oder Stx2. Die Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten MC kultiviert und die Zellschädigung durch Stx elektronenmikroskopisch untersucht. Konfluente Monolayer (Aa-Ad, Kontrollen) wurden für 10 h oder 48 h mit 500 ng/ml Stx1 (Ba-Bd bzw. Ca-Cd) oder 500 ng/ml Stx2 (Da-Dd bzw. Ea-Ed) inkubiert. Die "a"-Spalte zeigt eine Übersicht des MCs und die "b"-Spalte die dazu passende Teilansicht desselben MCs. Die "c"- und "d"-Spalten zeigen Ausschnittsvergrößerungen anderer MC, die unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 μm (50U) oder 5 μm (5U), wie in den Bildern indiziert.

Tabelle 6: Stx1- und Stx2-verursachte morphologische Veränderungen von HBMECs und EA.hy 926 Zellen.

Morphologische Änderungen in	Zelllinie	Shiga Toxin 1	Shiga Toxin 2
einzelnen Zellen ^b	HBMECs ^a	Verlust der Mikrovilli-Strukturen Membranläsionen <i>blebbing</i>	<i>blebbing</i>
	EA.hy 926 Zellen ^a	Verlust der Mikrovilli-Strukturen Membranläsionen <i>blebbing</i> Abflachung der Zellen	<i>blebbing</i>
Zell-Monolayern ^c	HBMECs ^a	Interzelluläre Lücken Zellablösung	irreguläre Form
	EA.hy 926 Zellen ^a	Interzelluläre Lücken Zellablösung	keine

^a Die veränderte Morphologie einzelner Zellen und die Desintegration von Zell-Monolayern wurden mittels SEM von HBMECs (Abbildung 9) und EA.hy 926 Zellen (Abbildung 10) bestimmt.

^b Der Verlust von Mikrovilli-Strukturen und die Membranläsionen waren in EA.hy 926 Zellen stärker ausgeprägt als in HBMECs; die Abflachung der Zellen war in HBMECs nicht detektierbar. Das durch Stx2 verursachte *blebbing* war dagegen häufiger in HBMECs zu finden.

^c Stx1-bedingte interzelluläre Lücken und Zellablösung waren in EA.hy 926 Zellen ausgeprägter im Vergleich zu HBMEC-Monolayern.

Die für HBMECs nach Inkubation mit Stx1 beobachteten Unterschiede in der Änderung der Zellmorphologie konnten auch bei den EA.hy 926 Zellen festgestellt werden (Abbildung 10B und C). Die Schädigung der Plasmamembran war bei der makrovaskulären EA.hy 926-Zelllinie stärker ausgeprägt, was mit der höheren Sensitivität der Zellen gegenüber Stx1 korreliert (Abbildung 7, Abbildung 8, Tabelle 6). Abgesehen von den Membranausstülpungen konnten keinerlei Stx2-verursachte Effekte auf die Zellmorphologie beider untersuchter Zelllinien detektiert werden (Abbildung 10D und E). Im Vergleich wurde eine deutlichere Ausprägung des *blebbings* bei den EA.hy 926 Zellen beobachtet.

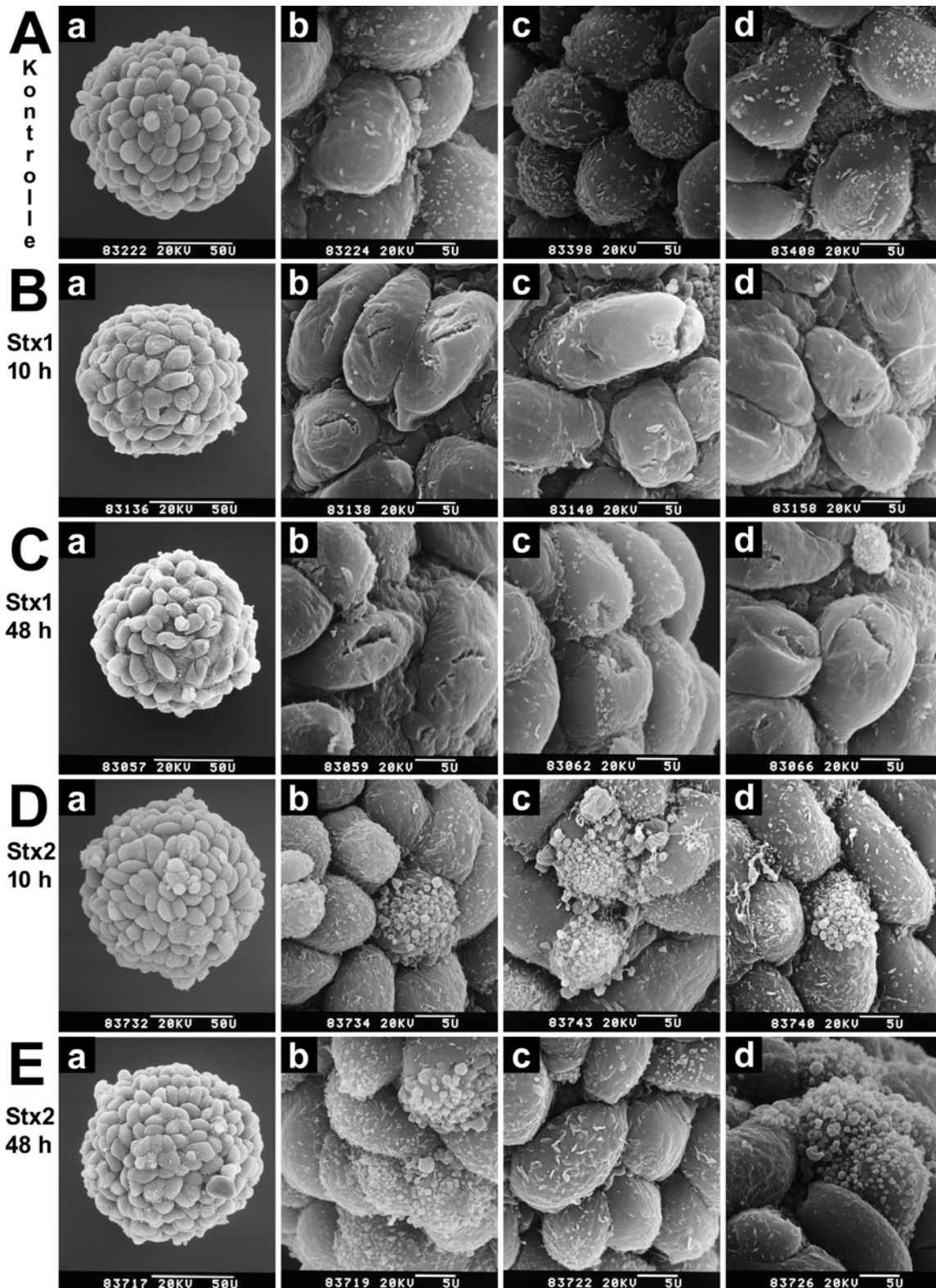


Abbildung 10: Durch Stx1 oder Stx2 verursachte und mittels SEM visualisierte morphologische Änderungen von EA.hy 926 Zellen. Konfluente Monolayer (Aa-Ad, Kontrollen) wurden für 10 h oder 48 h mit 500 ng/ml Stx1 (Ba-Bd bzw. Ca-Cd) oder 500 ng/ml Stx2 (Da-Dd bzw. Ea-Ed) inkubiert. Die "a"-Spalte zeigt eine Übersicht des MCs und die "b"-Spalte den dazu passenden Ausschnitt desselben MCs. Die "c"- und "d"-Spalten zeigen Ausschnittsvergrößerungen anderer MC, die unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm (50U) oder 5 µm (5U), wie in den Bildern indiziert.

Daher wurden Experimente mit einer auf 1 µg/ml verdoppelten Stx2-Konzentration durchgeführt (Abbildung 11). Bei dieser höheren Konzentration konnten weder zusätzliche Wirkungen des Toxins festgestellt werden, noch wurden durch die erhöhte Konzentration die morphologischen Änderungen der Zellen im Vergleich zu 500 ng/ml verstärkt.

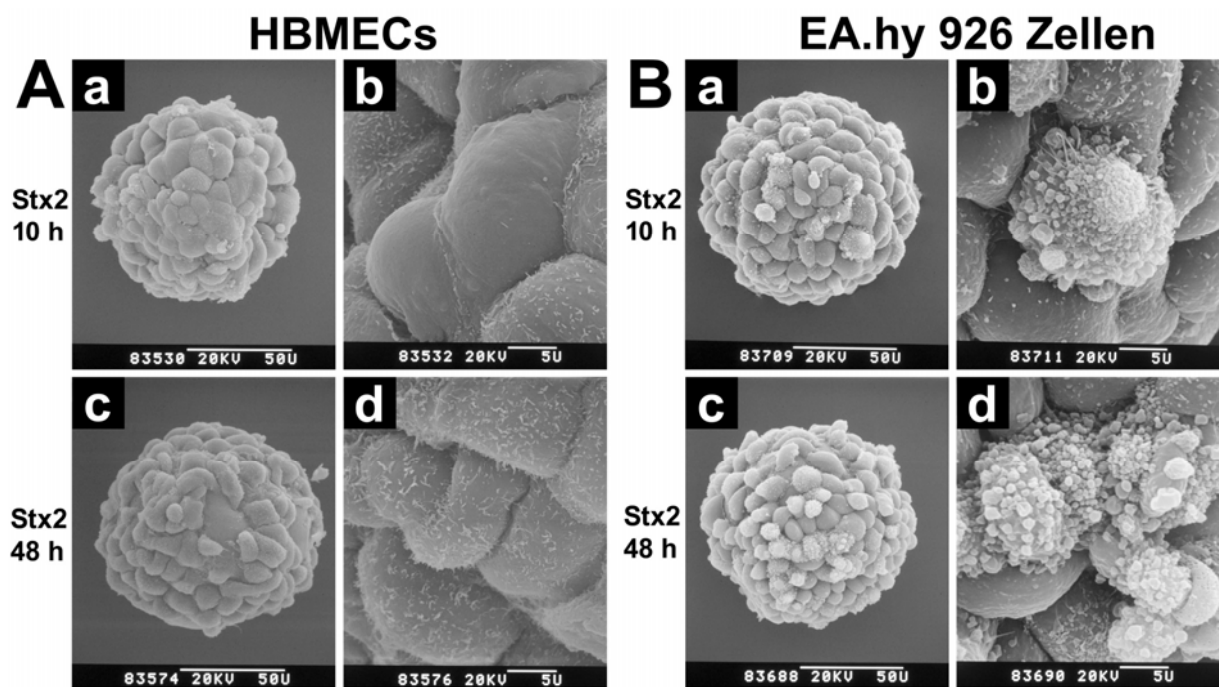


Abbildung 11: Durch Stx2 verursachte und mittels SEM visualisierte morphologische Änderungen von HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B). Konfluente Monolayer wurden für 10 h oder 48 h mit 1 µg/ml Stx2 inkubiert. "a" und "c" zeigen jeweils eine Übersicht des MCs, die Spalten "b" und "d" die dazu gehörende Ausschnittsvergrößerung desselben MCs. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm (50U) oder 5 µm (5U), wie in den Bildern indiziert.

Die Beantwortung der Eingangsfrage, welche Art des Zelltodes die beiden Toxine verursachen, muss also für Stx1 und Stx2 separat erfolgen: Die Stx1-behandelten Zellen wiesen sowohl nekrotische als auch apoptotische Merkmale auf, die Stx2-inkubierten ausschließlich apoptotische. Die Ergebnisse der SEM werden in Tabelle 6 zusammengefasst.

5.1.4 Untersuchungen des Toxin-bedingten Zelltods mittels Einzelzellanalyse

Um die verschiedenen Wirkungsmechanismen der Stx auf Endothelzellen zu verifizieren und Informationen über die Dynamik der Prozesse zu erhalten, wurden einzelne HBMECs und EA.hy 926 Zellen unter Toxineinfluss mittels DHM untersucht. Da die Einzelzelluntersuchung großen Schwankungen unterliegen kann, werden im Folgenden repräsentative Ergebnisse dreier Messungen vorgestellt, bei denen die Zellen kongruent zur SEM mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 inkubiert wurden.

Als erste Reaktion einer HBMEC auf Stx1 (Abbildung 12, linke Bildhälfte) konnte nach 20 h beobachtet werden, dass die Zelle sich abrundete. Dieser Prozess setzte sich fort, bis die fast kugelförmige Zelle nach 35 h Inkubationsdauer etwa die doppelte Zellhöhe (13 μm) im Vergleich zu ihrer normalerweise flachen, adhärennten Morphologie aufwies. Gleichzeitig konnte eine Abnahme der Fluktuationen von intrazellulären Strukturen beobachtet werden. Nach 45 h sank die maximale Zellhöhe aufgrund der eintretenden Zelldesintegration ab. Das Auslaufen der Zelle und damit der nekrotische Zelltod folgte 51 h nach Start des Experiments. Da sich der Brechungsindex des Zytoplasmas von dem des umgebenden Zellkulturmediums unterscheidet, ist dieser Vorgang auf den Phasenkontrast-Bildern sichtbar (Abbildung 12A, t = 51 h). Bei den Experimenten, die mit Stx2 durchgeführt wurden, konnten selbst nach verlängerter Exposition (65 h) weder Anzeichen von Nekrose noch andere morphologische Änderungen der Zelle beobachtet werden (Abbildung 12, rechte Bildhälfte). Allerdings erfolgte auch keine Zellteilung innerhalb dieses Zeitraumes und die untersuchten Zellen bewegten sich weniger als die Kontrollzellen. Die Beobachtung, dass Stx2 die Zellen daran hindert, die Mitose einzuleiten, kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt werden: Entweder verursacht Stx2 einen Zellzyklus-Arrest oder die Zellteilung bleibt aufgrund der eingeleiteten Apoptose aus, die mit der Technik der DHM nicht visualisiert werden kann.

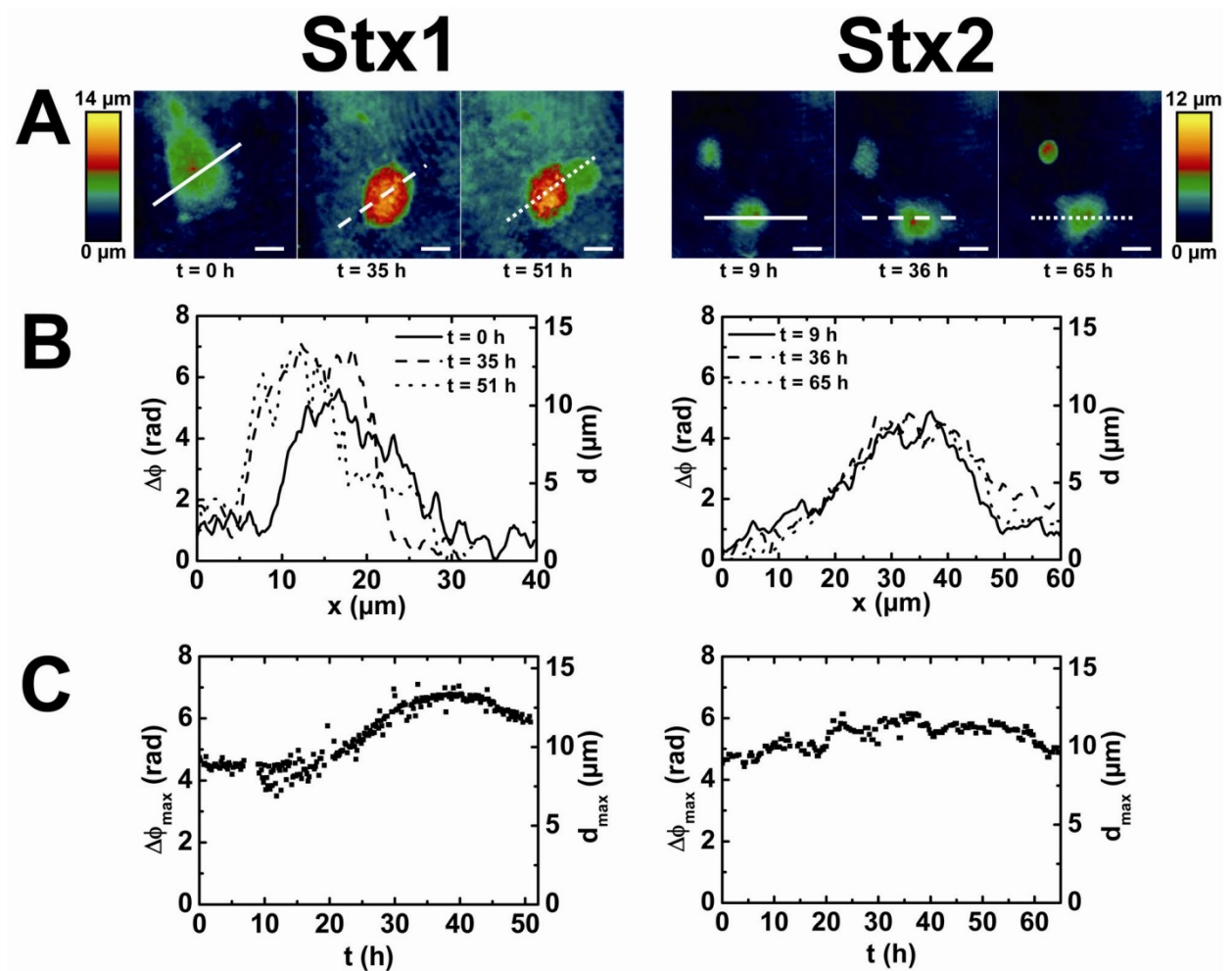


Abbildung 12: Zeitliche Verläufe von Stx1- und Stx2-induzierter Zellschädigung einzelner HBMECs. Nach Inkubation mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 wurden Langzeituntersuchungen der Änderung von Zellform und -höhe mittels DHM durchgeführt. (A) Falschfarben-kodierte digital holographische Phasenkontrastbilder einer Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Toxininkubation. (B) Querschnitt durch die quantitativen digital holographischen Phasenkontrastbilder. Die X-Achse entspricht den jeweiligen Linien in A. Die Parameter $\Delta\phi$ und d kennzeichnen den Phasenkontrast [radian] und die daraus bestimmte Zellhöhe [μm] für einen zellulären Brechungsindex von 1,37. (C) Zeitlicher Verlauf der maximalen optischen Weglänge $\Delta\phi_{\text{max}}$ und der korrespondierenden maximalen Zellhöhe d_{max} .

Die Stx1-vermittelte Abrundung einer EA.hy 926 Zelle erfolgte bereits 3 h nach Toxinzugabe und die Zellschädigung schritt schnell voran (Abbildung 13, linke Bildhälfte). Nach Erreichen einer maximalen Zellhöhe bei $t = 8$ h wurde der nekrotische Zelltod mit dem Austreten des Zytoplasmas nach 20 h festgestellt. Die Inkubation von einzelnen EA.hy 926 Zellen mit Stx2 führte zu marginalen morphologischen Veränderungen wie z. B. einem leichten Anstieg der Zellhöhe. Obwohl bei den untersuchten Zellen keine Zellteilung zu beobachten war, konnte eine benachbarte Zelle dokumentiert werden, die sich unter Stx2-Inkubation teilte (Abbildung 13A, rechte Bildhälfte, $t = 64$ h). Dieses Ergebnis

korreliert mit denen der Proliferations- und Zytotoxizitätsassays, in denen EA.hy 926 Zellen ebenfalls eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Stx2 zeigten. Interessanterweise war die M-Phase der sich teilenden Zelle anormal verlängert (~ 6 h im Vergleich zu $\sim 0,5$ h bei der Kontrolle).

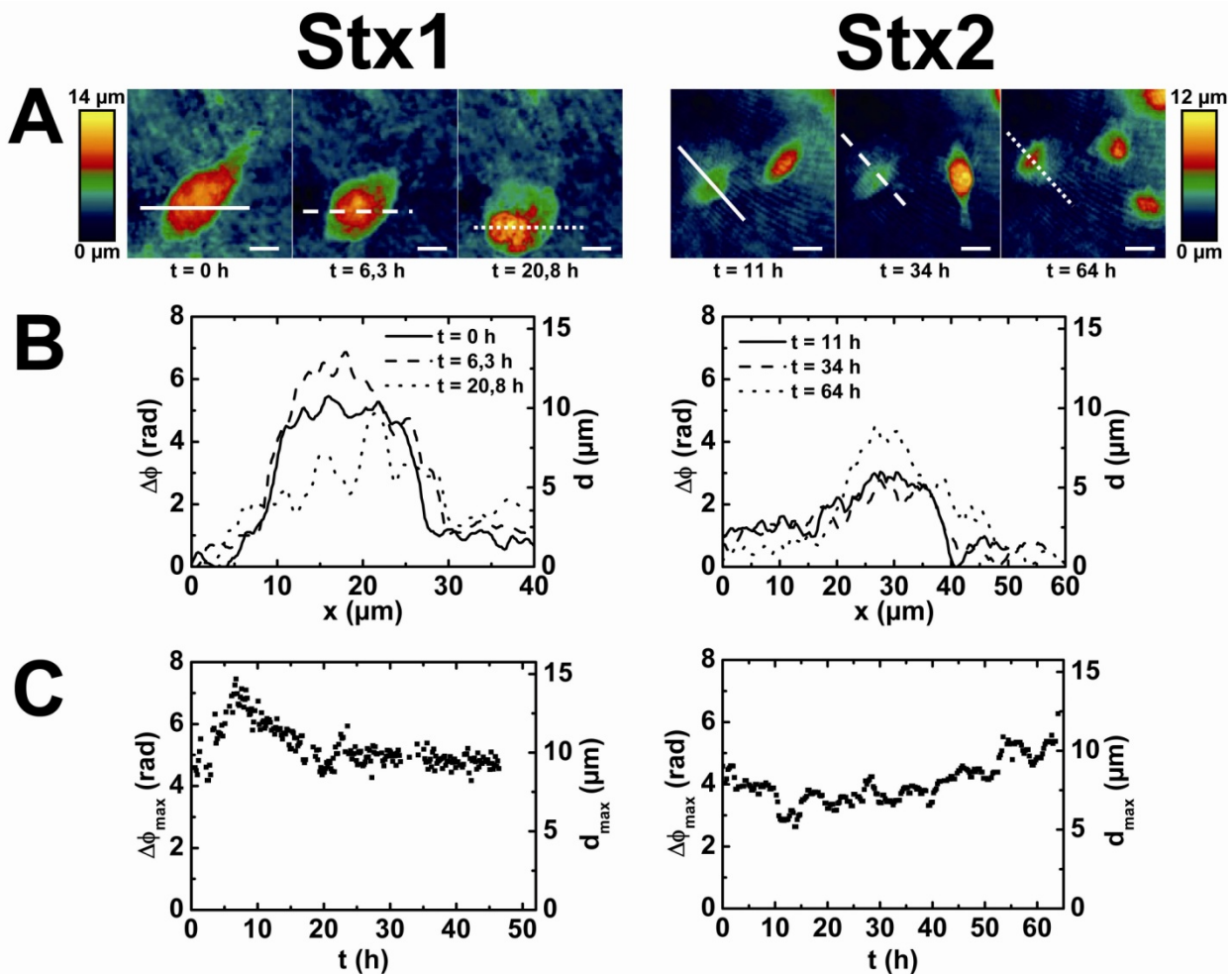


Abbildung 13: Zeitliche Verläufe von Stx1- und Stx2-induzierter Zellschädigung einzelner EA.hy 926 Zellen. Nach Inkubation mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 wurden Langzeituntersuchungen der Änderung von Zellform und -höhe mittels DHM durchgeführt. (A) Falschfarben-kodierte Bilder. (B) Querschnitte der Zellen aus A. (C) Maximale optische Weglänge und Zellhöhe. Detaillierte Beschreibungen von A-C befinden sich in der Legende zu Abbildung 12.

Zusammenfassend induziert Stx1 den nekrotischen Zelltod, der durch ein Anschwellen der Zelle und anschließendes Auslaufen des Zytoplasmas nach Plasmamembran-Desintegration charakterisiert ist. Dieser Effekt erfolgt in makrovaskulären Zellen schneller als in mikrovaskulären. Im Gegensatz dazu verursacht Stx2 keine Nekrose in beiden Endothelzelltypen, hat aber einen Zellteilungs-inaktivierenden Effekt auf die Zellen.

5.1.5 Zellzyklusuntersuchungen von Endothelzellen nach Toxinbehandlung

Um die Frage zu beantworten, ob Stx2 einen Zellzyklus-Arrest oder Apoptose in den getesteten Zellen hervorruft, wurden Zellzyklus-Analysen durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Inhalt von je 100.000 Zellen, die zuvor für 48 h mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 inkubiert wurden, mit dem Durchflusszytometer vermessen (Tabelle in Abbildung 14). Sowohl Kontrollzellen als auch Stx-behandelte Zellen befanden sich hauptsächlich in der G1-Phase des Zellzyklus. Im Vergleich konnte nach Toxin-Exposition eine geringe Verschiebung der Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusstadien von G1- nach S- bzw. G2-Phase festgestellt werden. Die gemessenen Verteilungen der Zellzyklusstadien der Kulturen nach Toxin-Inkubation können aus einem verlangsamten Zellzyklus, wie er bei der DHM beobachtet wurde, resultieren. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass Stx einen Zellzyklus-Arrest in den mikro- oder makrovaskulären Endothelzellen bewirken.

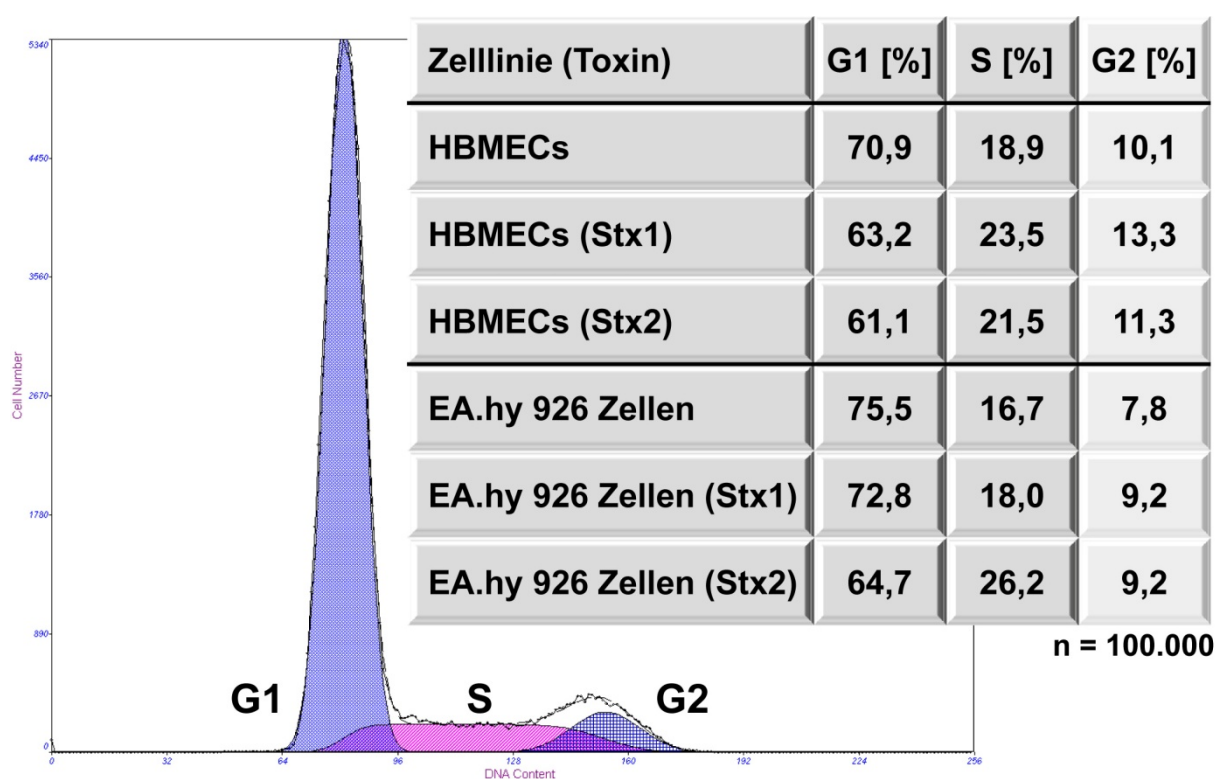


Abbildung 14: Zellzyklus-Analyse von HBMECs und EA.hy 926 Zellen nach 48 stündiger Inkubation mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2. Es wurde der DNA-Inhalt von je 100.000 Zellen gemessen. Die gewonnenen Daten wurden mit einer Zellzyklus-Analysensoftware ausgewertet, die eine genaue Verteilung der Zellzyklusstadien (insbesondere S-Phase) innerhalb der Kultur anhand der Rohdaten errechnet. Diese Verteilung ist beispielhaft für unbehandelte HBMECs graphisch dargestellt.

5.1.6 Der Unterschied von Stx1 und Stx2 in ihren nekrotischen und apoptotischen Wirkungen

Nachdem der Zellzyklus-Arrest als möglicher Wirkungsmechanismus für die nur durch Stx2 verursachte Teilungsaktivität der Zellen ausgeschlossen werden konnte, mussten die mittels DHM beobachteten Effekte auf Apoptose zurückzuführen sein. Zur Quantifizierung der Nekrose- und Apoptose-Induktion von Stx1 und Stx2 wurden DNA-Fragmentierungs-Assays durchgeführt. Dazu wurden konfluente Endothelzell-Monolayer in MTP für 48 h mit Konzentrationen von 0,1 pg/ml bis 1 µg/ml Stx1 oder Stx2 inkubiert. Sowohl die in das Zellkulturmedium freigesetzten Mono- und Oligo-Nukleosomen (Marker für Nekrose) als auch die intrazellulären Nukleosomen (Marker für Apoptose) wurden quantifiziert. Die Akkumulation dieser wird als Anreicherungsfaktor im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen angegeben, um den Einfluss der unterschiedlichen natürlichen Apoptose und Nekrose in HBMEC- und EA.hy 926 Zellkulturen zu normalisieren. Letztere weisen als Fusionszelllinie höhere unstimulierte Apoptose- und Nekroseraten auf.

Wie in Abbildung 15 gezeigt, induzierten Stx1 und Stx2 Apoptose unterschiedlichen Ausmaßes in beiden Zelllinien. Stx1 bewirkte eine signifikant erhöhte Apoptoserate in Konzentrationen $\geq 0,01$ ng/ml (HBMECs, Abbildung 15A) bzw. 0,1 ng/ml (EA.hy 926 Zellen, Abbildung 15B). Im Gegensatz zu diesem ähnlichen Apoptose-induzierenden Potential von Stx1 unterschied sich die Wirkung von Stx2 auf beide Zelllinien erheblich. Stx2 verursachte in den mikrovaskulären Zellen eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate in Konzentrationen $\geq 0,1$ pg/ml, also der niedrigsten getesteten Konzentration. Höhere Konzentrationen als 0,1 ng/ml zeigten die gleiche Apoptose-induzierende Wirkung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen ab dieser Stx2-Konzentration maximal stimuliert sind. Im Gegensatz dazu leiten die makrovaskulären EA.hy 926 Zellen erst in 10^5 -fach höheren Konzentrationen (≥ 10 ng/ml) den programmierten Zelltod ein (Abbildung 15, Tabelle 5). Die apoptotische Wirkung ist konzentrationsabhängig; eine maximale Induktion der Apoptose wurde mit den eingesetzten Konzentrationen nicht erreicht.

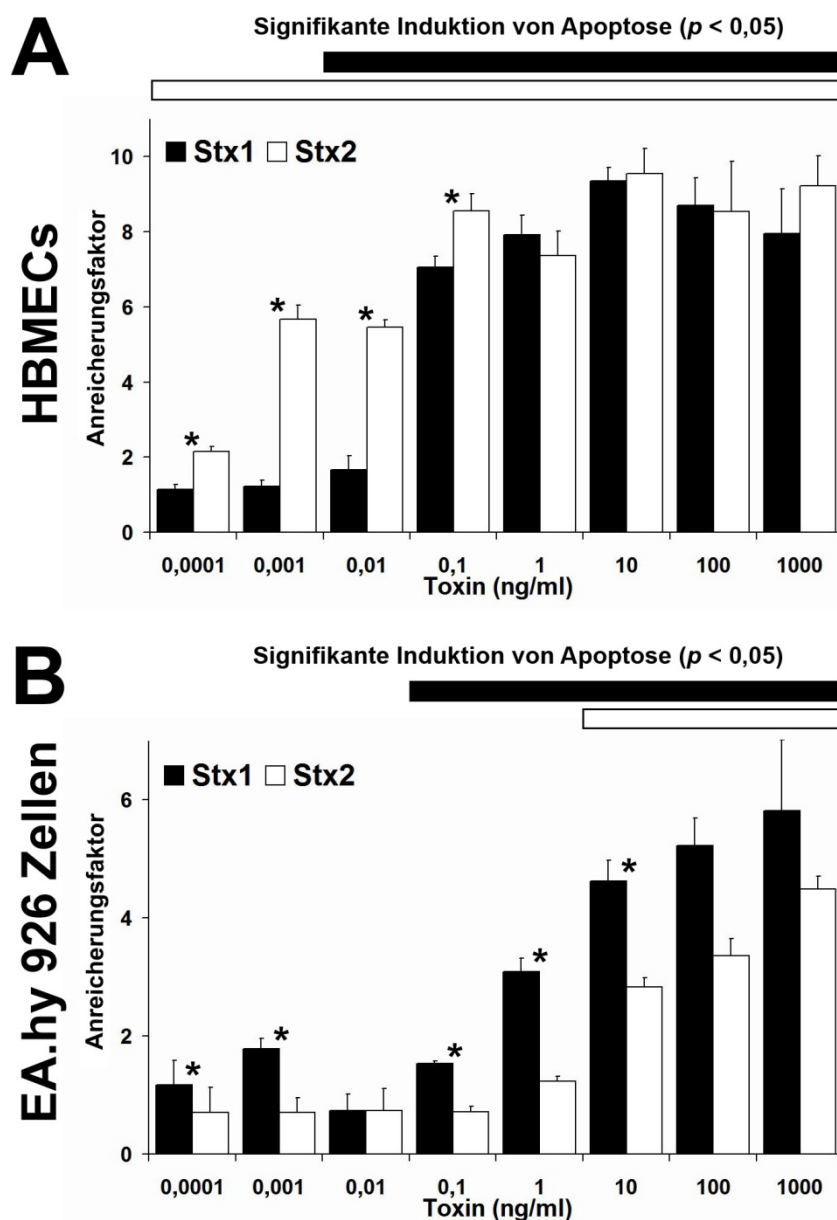


Abbildung 15: Stx1- und Stx2-vermittelte Apoptose-Induktion bei HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B). Konfluente Monolayer in 96-well Platten wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen von Stx1 oder Stx2 inkubiert. Der Nukleosomengehalt im Zytoplasma wurde nach Zellyse spektralphotometrisch bestimmt und diente als Maß für die Apoptose. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte (Standardabweichungen) von Vierfach-Bestimmungen und werden als Anreicherungsfaktor angegeben, der durch Division der Messwerte von Toxin-behandelten Zellen durch die von Kontrollzellen berechnet wurde. Die horizontalen schwarzen und weißen Balken deuten eine signifikante Induktion der Apoptose ($p < 0,05$) durch das jeweilige Stx an. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Stx1- und Stx2-vermittelter Apoptose-Induktion sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Mit Hilfe des Nekroseassays konnte gezeigt werden, dass Stx1 sowohl in HBMECs (Abbildung 16A) als auch in EA.hy 926 Zellen (Abbildung 16B) eine signifikante ($p < 0,05$) Induktion der Nekrose in allen getesteten Konzentrationen bewirkt. In HBMECs kann von

einer linearen Korrelation der eingesetzten Stx1-Konzentration mit dem Grad der Nekrose-Induktion ausgegangen werden. Dabei wurde bei hohen eingesetzten Toxinkonzentrationen eine bis zu 20-fache Erhöhung von nekrotischen Zellen in der Kultur gemessen. Die EA.hy 926 Zellen weisen auch unbehandelt bereits hohe Nekroseraten auf. Daher ist der Anreicherungsfaktor im Vergleich zu HBMECs geringer. Zudem kann bei diesen Zellen kein linearer Zusammenhang zwischen Stx1-Konzentration und Nekrose nachgewiesen werden, was vermutlich in der hohen Sensitivität dieser makrovaskulären Zelllinie gegenüber Stx1 begründet liegt (vgl. Abbildung 8).

Im Kontrast dazu konnte keine signifikante Nekrose-Induktion durch geringe Konzentrationen von Stx2 detektiert werden. Es induzierte nur bei hohen Toxinkonzentrationen (≥ 10 ng/ml bei HBMECs und ≥ 1 μ g/ml bei EA.hy 926 Zellen) geringfügig Nekrose in beiden Zelllinien (Anreicherungsfaktoren < 3).

Zusammenfassend konnte mit den Apoptose-/Nekroseassays gezeigt werden, dass Stx1 sowohl Apoptose als auch Nekrose über einen weiten Konzentrationsbereich auslöste, Stx2 jedoch hauptsächlich Apoptose verursachte und nur hohe Konzentrationen geringfügig Nekrose induzierten (Tabelle 5). Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigen die morphologischen Beobachtungen mittels SEM und DHM (vgl. Kapitel 5.1.3 und 5.1.4, Tabelle 6). Zudem wurde ein auffälliger Unterschied in der Empfindlichkeit von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen bezüglich Stx2 aufgezeigt.

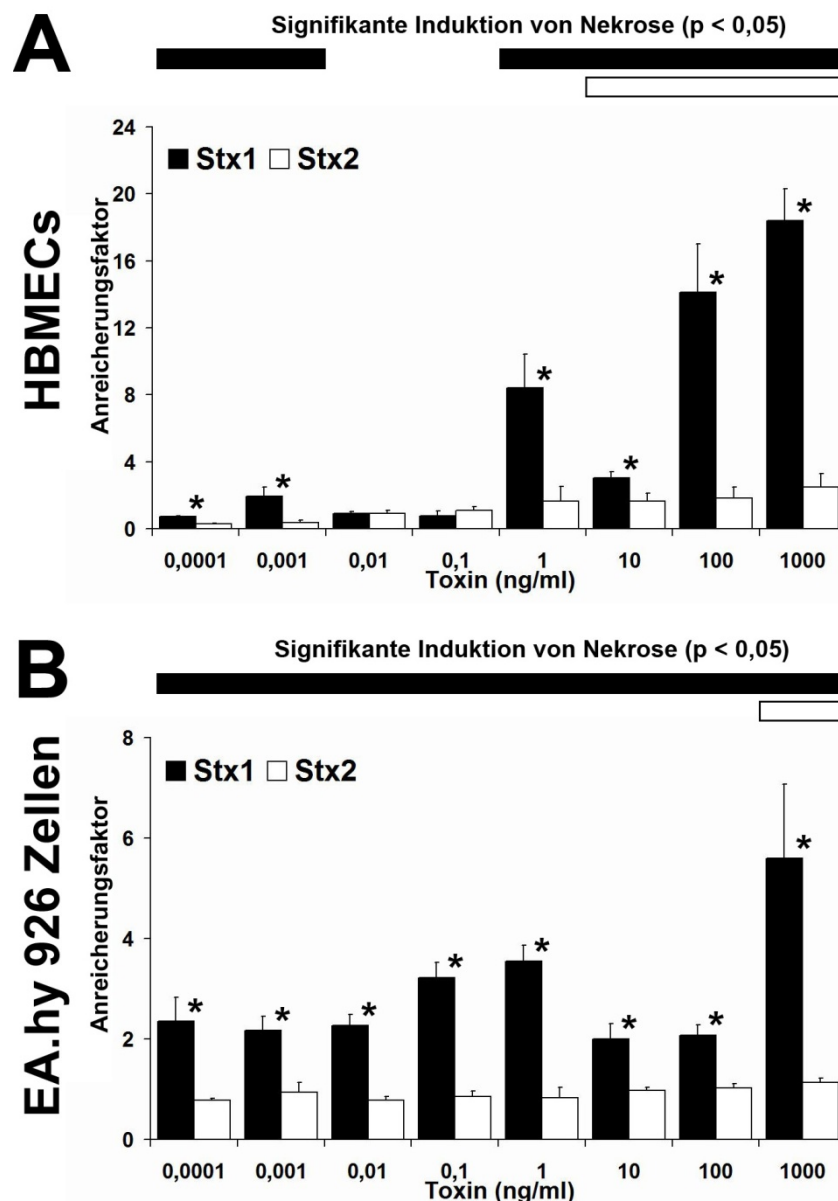


Abbildung 16: Stx1- und Stx2-vermittelte Nekrose-Induktion bei HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B). Konfluente Monolayer in 96-well Platten wurden für 48 h mit den indizierten Konzentrationen von Stx1 oder Stx2 inkubiert. Die in das Kulturmedium freigesetzten Nukleosomen dienen als Maß für die Nekrose. Die Überstände wurden aus denselben Kulturen entnommen, deren Lysate im Apoptoseassay verwendet wurden (vgl. Abbildung 15). Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte (Standardabweichungen) von Vierfach-Bestimmungen und werden als Anreicherungsfaktor angegeben, der durch Division der Messwerte von Toxin-behandelten Zellen durch die von Kontrollzellen berechnet wurde. Die horizontalen schwarzen und weißen Balken deuten eine signifikante Induktion der Nekrose ($p < 0,05$) durch das jeweilige Stx an. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Stx1- und Stx2-vermittelter Nekrose-Induktion sind mit Sternchen gekennzeichnet.

5.2 Inhomogenität der endothelialen Zellkulturen bezüglich der Wirkung von Stx

Die variierenden Ergebnisse der DHM- und SEM-Experimente zeigten, dass nicht alle Zellen in der Kultur identisch auf die Inkubation mit Stx reagierten. Eine weit verbreitete Hypothese besagt, dass die inhomogene Wirkung der Toxine auf Zellen innerhalb einer Kultur durch die unterschiedliche Expression von Stx-Rezeptoren begründet ist. Zudem finden sich Hinweise in der Literatur über die verschiedenen Sensitivitäten von Zellen in unterschiedlichen Konfluenzstadien (Obrig *et al.*, 1988; van Setten *et al.*, 1997). Daher wurden diese Inhomogenitäten der Kulturen mittels DHM, Immunfluoreszenz-Mikroskopie und FACS-Analysen untersucht.

5.2.1 Variierende Todeszeitpunkte von Einzelzellen

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Todeszeitpunkte von Zellen unter Toxineinwirkung mittels DHM wurden die Zellen subkonfluent ausgesät und mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 inkubiert. Für einen Zeitraum von über 60 h wurden im Abstand von fünf Minuten je ein Weißlichtbild und ein digital holographisches Phasenkontrastbild automatisch generiert. Durch die Verwendung eines 20-fach Objektivs konnte dabei ein Ausschnitt aus der subkonfluenten Kultur mit mehreren Zellen über die Zeit dokumentiert werden. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Experimente für die Stx1-Inkubation dargestellt. Die eingetragenen Zahlen stehen für die Todeszeitpunkte der Zellen nach Toxinzugabe, die mit dem Auslaufen der Zellen festgesetzt wurden.

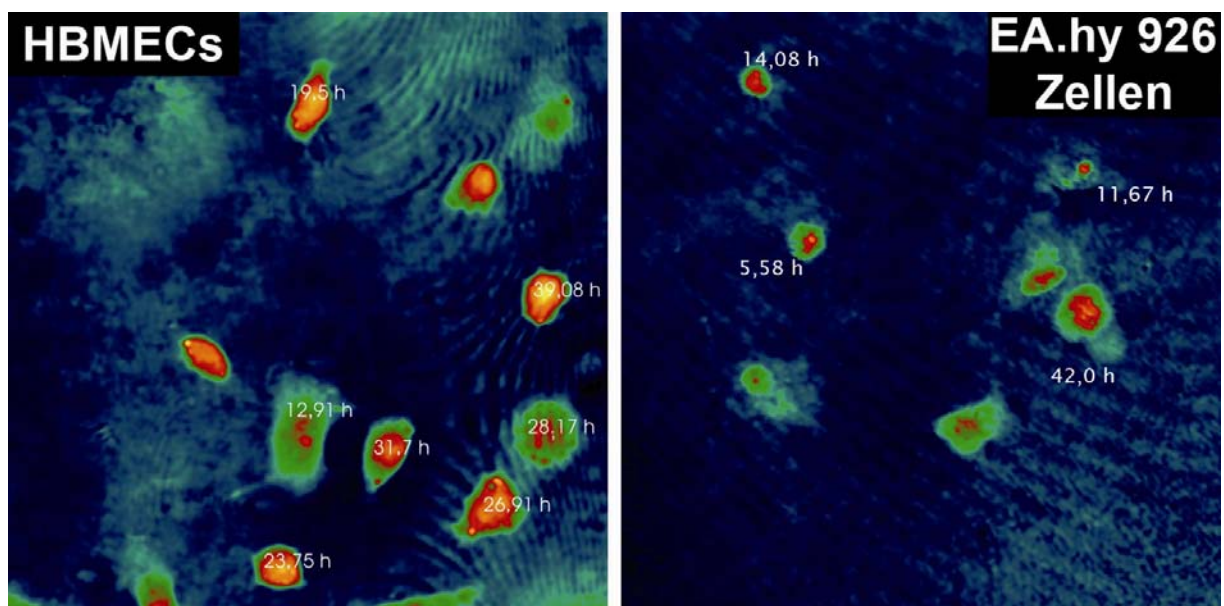


Abbildung 17: Unterschiedliche Todeszeitpunkte von HBMECs (links) und EA.hy 926 Zellen (rechts) nach Inkubation mit 500 ng/ml Stx1. Die eingetragenen Zeiten stehen für den Kollaps der Plasmamembran und der daraus resultierenden Freisetzung des Zytoplasmas.

Die Ergebnisse zeigen bei beiden Zelllinien eine große Inhomogenität innerhalb der Zellkultur bezüglich der Empfindlichkeit gegen Stx1. Zwar verursacht Stx1 bei einem Großteil der analysierten Zellen den nekrotischen Zelltod, aber es sind in beiden Zelllinien resistente Zellen vorhanden, die innerhalb der ersten 60 h nach Toxinzugabe keine Anzeichen von Nekrose zeigten. Die verminderte Motilität dieser Zellen liefert einen Hinweis darauf, dass sie apoptotische Vorgänge eingeleitet haben. Der durch Nekrose bedingte Verlust der Plasmamembran-Integrität variiert zeitlich stark. Der in Kapitel 5.1.4 aufgezeigte Trend, dass die Stx1-bedingte Nekrose für HBMECs später erfolgt als für EA.hy 926 Zellen, konnte mit diesem Experiment bestätigt werden.

Die korrespondierenden Messungen zu Stx2 sind hier nicht dargestellt, da ein apoptotischer Zelltod mit dieser Technik nicht visualisiert werden kann bzw. der Zeitpunkt des Zelltodes nicht dokumentierbar ist. Zwar ist Stx2 in hohen Konzentrationen in der Lage einen nekrotischen Zelltod bei den verwendeten mikro- und makrovaskulären Endothelzellen zu verursachen (5.1.6), allerdings tritt dieses Ereignis selten auf (Daten nicht gezeigt).

5.2.2 Unterschiedliche Gb3Cer-Expression in der Zellkultur

Es finden sich Hinweise in der Literatur über die verschiedenen Sensitivitäten von Zellen in unterschiedlichen Konfluenzstadien (Obrig *et al.*, 1988; van Setten *et al.*, 1997). Zur Überprüfung der Gb3Cer-Expression in den Zellen einer Kultur wurden Versuche mit immungefärbten Zellen durchgeführt. Dazu wurden Zellen in *chamber slides* ausgesät und Gb3Cer mittels Stx1/Anti-Stx1- oder Stx2/Anti-Stx2-Antikörpersystem angefärbt (4.8.2.3). Dabei wurden sowohl subkonfluente als auch konfluente Stadien untersucht (Abbildung 18).

Die Ergebnisse zeigten, dass innerhalb der Kulturen, unabhängig vom Konfluenzstadium, eine differentielle Expression von Gb3Cer vorlag. Dabei konnte eine ungleichmäßige Rezeptorverteilung dokumentiert werden, da etwa 20 % der Zellen eine hohe Rezeptordichte auf der Zelloberfläche besaßen (starkes Signal); andere Zellen hingegen exprimierten wenige oder keine Rezeptoren (schwaches oder kein Signal). Es muss allerdings bezüglich der schwach- oder ungefärbten Zellen bedacht werden, dass die IF-Photographien mit einer automatischen Belichtungszeit-Messung aufgenommen wurden, sodass die maximale Signalintensität durch den hellsten Punkt im Bild bestimmt und dadurch schwache Signale nicht ausreichend belichtet wurden. Mit Überbelichtung der starken Signale konnte jedoch auch bei zuvor schwach- oder ungefärbten Zellen ein Signal gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Verifizierung, dass alle Zellen in den Kulturen Stx-Rezeptoren exprimieren, konnte mittels Durchflusszytometrie erbracht werden (siehe unten). Im Vergleich zu HBMECs wiesen die EA.hy 926 Zellen eine leicht geringere Färbung auf, was darauf hindeutet, dass diese Zellen weniger Stx-Rezeptor auf der Zelloberfläche exponieren.

Die beiden zur Detektion von Stx-Rezeptoren eingesetzten Antikörper-Systeme unterschieden sich bezüglich der resultierenden Signalintensität. Das Stx2/Anti-Stx2-System liefert im direkten Vergleich schwächere Signale, die zu einer verlängerten Belichtungszeit führten. Die Ursachen hierfür können in den unterschiedlichen Bindungskonstanten der Stx gesucht werden. Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass die dokumentierten Unterschiede auf die verwendeten Anti-Stx-AK zurückzuführen sind, da der Anti-Stx1-AK gegen die B-Untereinheiten, der Anti-Stx2-AK gegen die A-Untereinheit gerichtet ist.

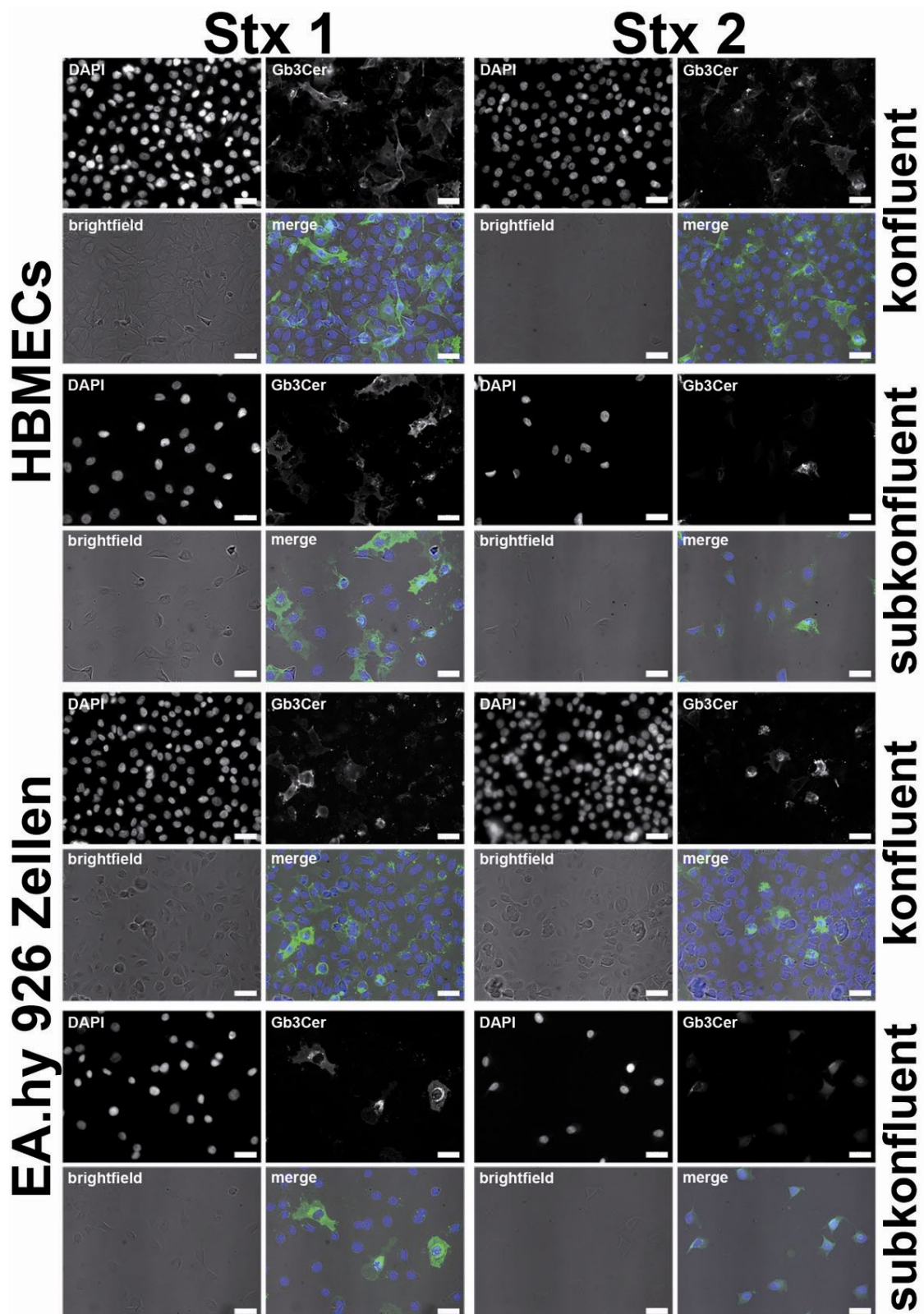


Abbildung 18: Unterschiedliche Gb3Cer-Exposition auf der Zelloberfläche von HBMECs und EA.hy 926 Zellen. Die Zellen wurden in *chamber slides* bis zum Erreichen eines subkonfluenten oder konfluenten Stadiums kultiviert. Nach Immunfärbung von Gb3Cer mittels eines Stx1/Anti-Stx1- oder Stx2/Anti-Stx2-Antikörpersystems und der DAPI-DNA-Färbung wurden mit einem 40-fach Objektiv die Kanäle für DAPI (blau), Gb3Cer (grün) und der Phasenkontrast aufgenommen und anschließend überlagert (merge). Die Maßstabsbalken entsprechen 40 μm .

Aufgrund der Beobachtung in der IF, dass die Färbung mit Stx1/Anti-Stx1 eine höhere Intensität aufwies, wurden alle folgenden Rezeptor-Immunfärbungen mit diesem AK-System durchgeführt.

Mittels FACS-Analysen konnte belegt werden, dass alle Zellen beider Endothelzelllinien den Stx-Rezeptor exprimieren. Dazu wurden Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Rezeptor im Vergleich zu ungefärbten Zellen vermessen (Abbildung 19, Kontrolle nicht gezeigt). Den Hinweisen aus der IF folgend, dass EA.hy 926 Zellen weniger Stx-Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche exponieren als HBMECs, wurden beide Zelltypen daraufhin überprüft (Abbildung 19). Zunächst wurde evaluiert, ob die Fixierungsmethode mit Ethanol, die bei der Durchflusszytometrie angewendet wird, die GSL nicht extrahiert und so zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Ethanolfixierung im Vergleich zur Fixierung mit Paraformaldehyd zwar geringere Intensitäten im Fluoreszenz-Signal lieferte, allerdings das Profil der Messung identisch war. Der Vergleich der Stx-Rezeptoren (Abbildung 19) bestätigte die Ergebnisse der IF. HBMECs zeigen eine ~ 10 -fach höhere Signalintensität als EA.hy 926 Zellen. Sowohl die Fixierung der Zellen mit Ethanol als auch die für die PI-Färbung notwendige Triton X-100-Behandlung dieser, nach abgeschlossener Immunfärbung des Rezeptors, verursachten die Permeabilisierung der Zellen. Somit wurden auch die intrazellulären Reservoirs von Gb3Cer, die bei EA.hy 926 Zellen deutlich ausgeprägter sind, fluoreszenzmarkiert. Da mit diesen Messungen gleichzeitig die Fluoreszenz-Intensitäten von Antikörper-markiertem Stx-Rezeptor (FL1-Kanal) und PI-markierter DNA (FL3-Kanal) bestimmt wurden, konnten Rückschlüsse über die Zellzyklus-assoziierte Expression des Stx-Rezeptors gezogen werden, die im folgenden Kapitel näher erläutert werden. Bei diesen Messungen konnte außerdem eine kleine Subpopulation der EA.hy 926 Zellen identifiziert werden, die sich durch ihre deutlich erhöhte Stx-Rezeptorexpression klar von der Hauptpopulation unterschied (Abbildung 19, EA.hy 926 Zellen, oberer FL1-Bereich).

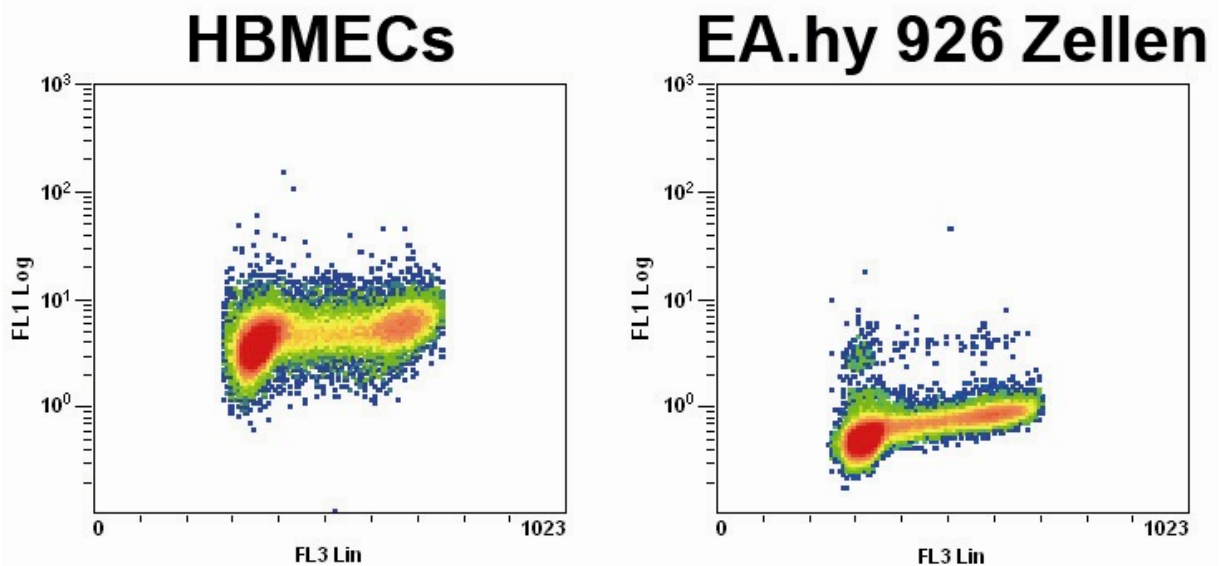


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung von Zell-assoziiertem Stx-Rezeptor. Dieser wurde mit Hilfe eines Stx1/Anti-Stx1-Systems fluoreszenzmarkiert. Anschließend erfolgte eine DNA-Färbung mit PI. Es sind die Fluoreszenz-Intensitäten der Stx-Rezeptorfärbung (FL1, logarithmisch aufgetragen) gegen die von DNA (FL3, 10 Bit-kodiert) in einem *density-plot* aufgetragen. Jeweils 100.000 HBMECs oder EA.hy 926 Zellen wurden analysiert. Im Vergleich zeigte sich eine ~ 10-fach höhere Signalintensität des Stx-Rezeptors auf HBMECs im Vergleich zu EA.hy 926 Zellen. Bei Letzteren ist eine distinkte Subpopulation mit deutlich erhöhter Stx-Rezeptorfärbung erkennbar.

5.2.3 Zellzyklus-abhängige Stx-Rezeptorexpression auf Endothelzellen

Bei den Experimenten, die für die Bestimmung des Zellzyklusses nach Stx-Inkubation durchgeführt wurden (vgl. Abbildung 14), ist zusätzlich Gb3Cer mittels Fluoreszenzmarkierung gemessen worden. Diese Daten ließen zum einen Rückschlüsse auf die Zellzyklus-abhängige Expression von Gb3Cer durch *backgating* zu, zum anderen konnten Aussagen über den Stx-Rezeptorgehalt der Zellen nach 48 h Inkubation mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 getroffen werden. Dabei bleibt zu beachten, dass die Fluoreszenzmarkierung mittels Stx1/Anti-Stx1-System genutzt wurde und daher die Daten nach Inkubation der beiden Zelltypen mit Stx1 durch das von den Zellen internalisierte Stx1 beeinflusst waren.

Die FACS-Analysen ergaben, dass bei beiden Zelllinien mehr Gb3Cer in Zellen der S- und G2-Phase vorhanden war als in Zellen, die sich in der G1-Phase befanden (Abbildung 20). Allerdings waren diese Stx-Rezeptor-vermittelten Fluoreszenzsignale nur im Mittel und nicht absolut höher als die der Zellen in der G1-Phase und lagen im oberen

Intensitätsbereich des G1-Peaks. Da Zellen während der S- bis zur G2-Phase wachsen und somit ein größeres Volumen und mehr Oberfläche aufweisen als Zellen in G1, kann davon ausgegangen werden, dass die Gb3Cer-Menge eher zellgrößenabhängig als zellzyklusabhängig ist. Nach Inkubation der Zellen für 48 h mit Stx1 ließ sich insbesondere bei EA.hy 926 Zellen eine Verschiebung zu höheren Intensitäten feststellen. Wie oben beschrieben waren diese gemessenen Daten allerdings durch das gewählte Markierungssystem beeinflusst. Es konnte daher nicht differenziert werden, ob es sich dabei um eine Stx1-bedingte Erhöhung der Expression von Gb3Cer handelte, oder ob das internalisierte Toxin detektiert wurde. Da diese Verschiebung bei den Zellen, die für 48 h mit 500 ng/ml Stx2 inkubiert wurden, nicht auftrat, handelte es sich also entweder um einen Stx1-spezifischen Gb3Cer-induzierenden Effekt oder, was wahrscheinlicher ist, um die Detektion des internalisierten Stx1. Wenn letztere Hypothese zutrifft, dann internalisierten EA.hy 926 Zellen im Vergleich zu HBMECs wesentlich mehr Stx1, womit sich die größere Verschiebung im Vergleich zu Stx2 zu höheren Intensitäten erklären lässt. Diese Hypothese würde die Diskrepanz zwischen der Menge der exprimierten Stx-Rezeptoren (vgl. Kapitel 5.2.2) und der Unterschiede in der Sensitivität der Zellen gegenüber Stx1 (vgl. Kapitel 5.1.2) erklären.

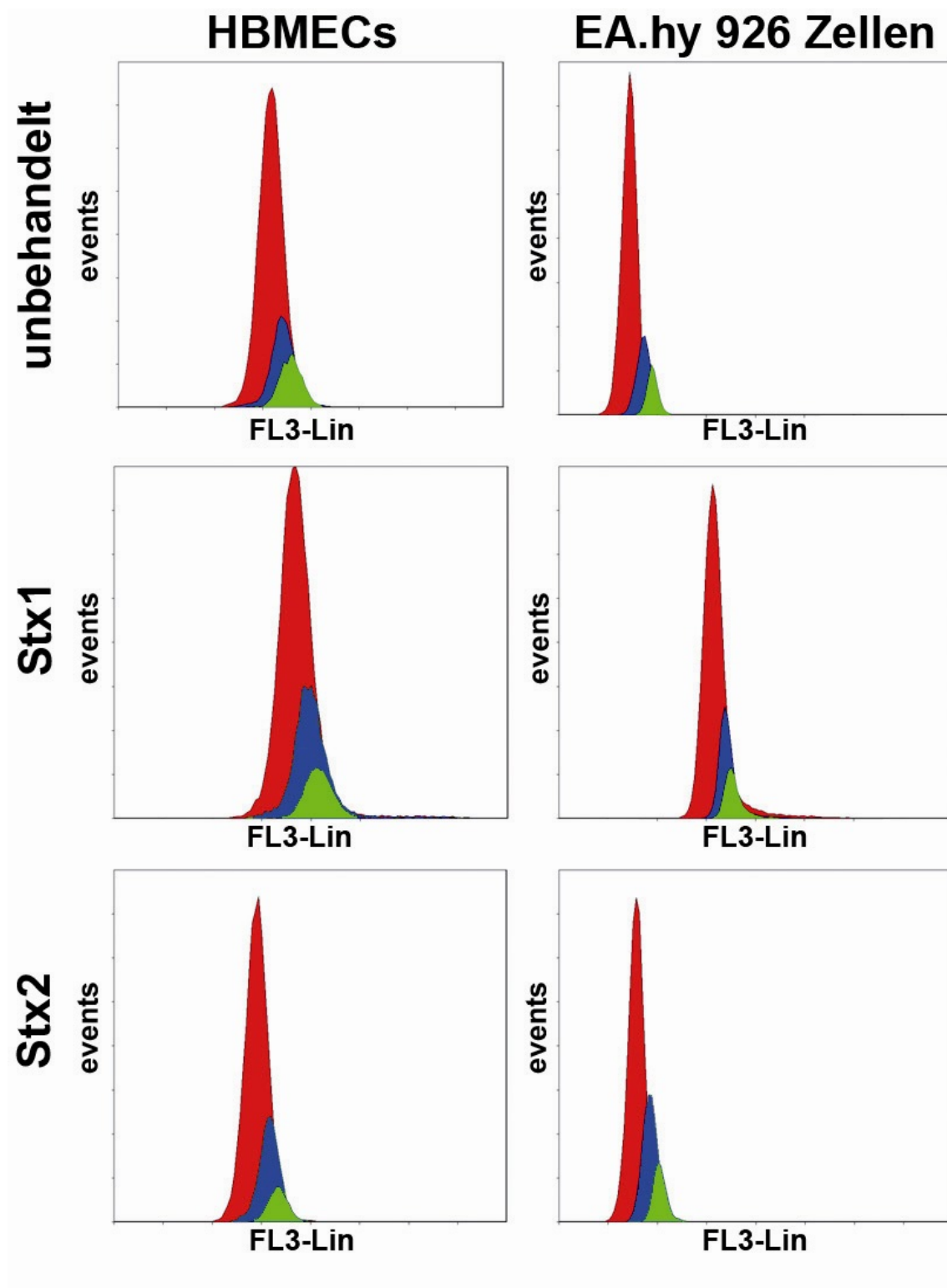


Abbildung 20: Nachweis der zellzyklusabhängigen Gb3Cer-Expression von HBMECs und EA.hy 926 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Es wurden je 100.000 unbehandelte oder für 48 h mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2 inkubierte Zellen vermessen. Durch *backgating* konnten die Signalintensitäten des Stx1/Anti-Stx1-fluoreszenzmarkierten Gb3Cer (FL3, 10 Bit-kodiert) in G1- (rot), S- (blau) und G2-Phase (grün) gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen werden.

5.3 Charakterisierung des vakuolisierenden Toxins EHEC-Vac

Die für diese Arbeit etablierten Methoden konnten nicht nur für die Untersuchung der Wirkungsweisen von Shiga Toxinen, sondern auch zur Charakterisierung des EHEC-Vac eingesetzt werden. Dies führte zusammen mit den von Frau Dr. Bielaszewska vorausgehenden Untersuchungen zu einer Publikation. Die Teile dieser Veröffentlichung, welche auf die in dieser Arbeit entwickelten Methodiken beruhen, werden im Folgenden vorgestellt.

5.3.1 Identifizierung des Ursprungs der Vakuolen

Nachdem mittels Neutralrot-Färbung gezeigt werden konnte, dass die durch EHEC-Vac in den Endothelzellen ausgebildeten Vakuolen eine saure Mikroumgebung hervorrufen (Bielaszewska *et al.*, 2009b), sollte der subzelluläre Ursprung der Vakuolen identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene intrazelluläre Komponenten von HBMECs, die für 24 h mit EHEC-Vac inkubiert wurden, mittels spezifischer Antikörper fluoreszenzmarkiert. Es konnte gezeigt werden, dass frühe, späte oder recycling Endosomen, das ER und der Golgi-Komplex in den vakuolisierten HBMECs dieselbe subzelluläre Verteilung wie in unbehandelten Kontrollzellen aufwiesen. Da keine Anfärbung der Vakuolen durch die Organellen-Marker beobachtet wurde, konnte eine Assoziation der Vakuolen mit diesen Zellstrukturen ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Färbung mit dem Lysosomenmembran-spezifischen Antikörper Anti-LAMP1 ein starkes Signal an den Membranen der EHEC-Vac induzierten zytoplasmatischen Vakuolen (Abbildung 21B, D und F). Die Lysosomen der unbehandelten Kontrollzellen wiesen eine normale Verteilung auf (Abbildung 21H). Auf den korrespondierenden Phasenkontrast-Bildern ist die Morphologie der Zellen mit bzw. ohne Vakuolen zu erkennen (Abbildung 21A, C, E und G). Diese Immunfluoreszenzdaten bestätigen die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Neutralrot-Färbung und der Transmissions-Elektronenmikroskopie, die eine Assoziation der Vakuolen mit Lysosomen andeuteten.

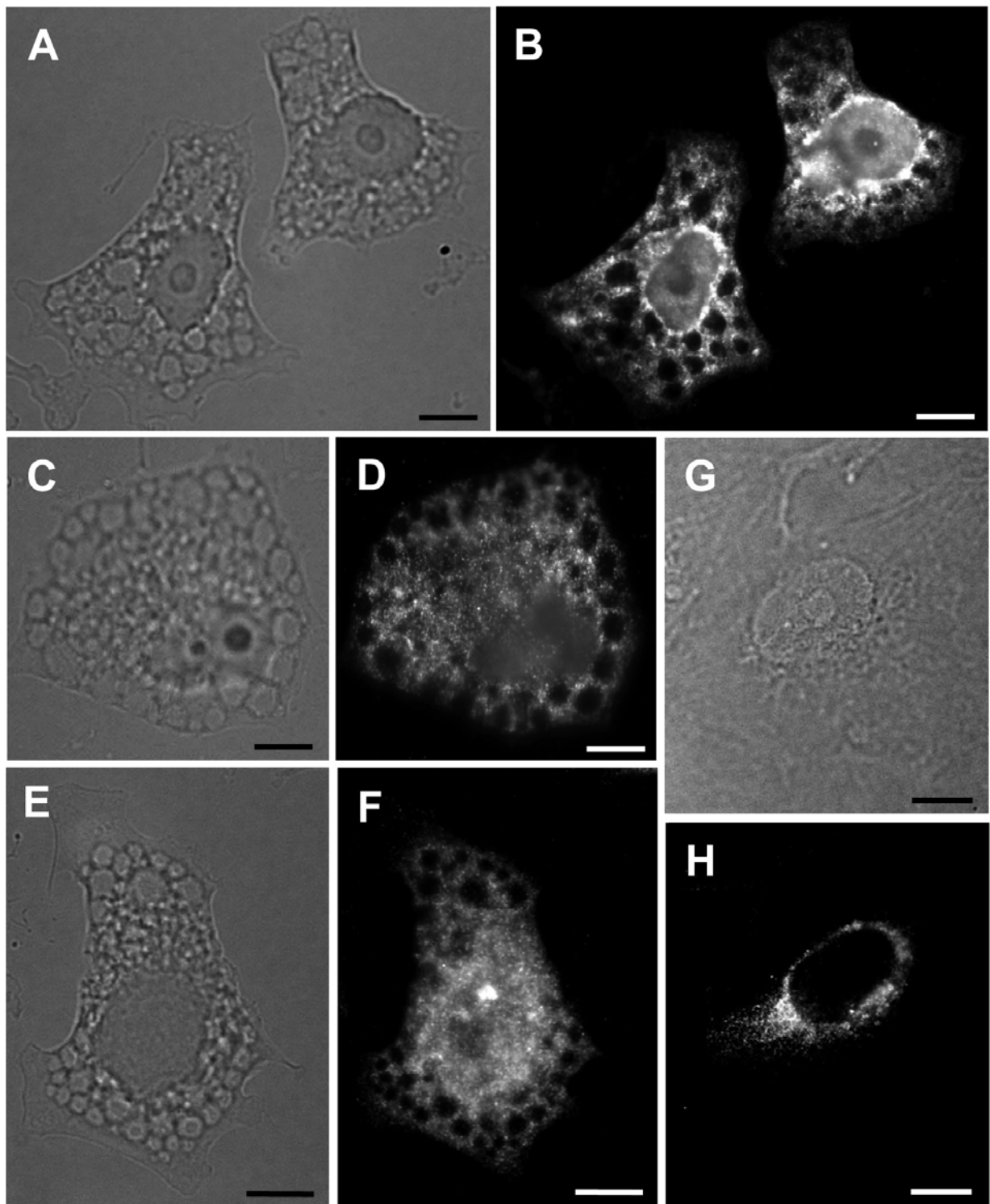


Abbildung 21: Organell-Assoziation von EHEC-Vac-bedingten Vakuolen (A-F). HBMECs wurden für 24 h mit einer Konzentration von EHEC-Vac, die in ≥ 90 % der Zellen nach 24 h eine Vakuolenbildung induzierte (VD_{90}), inkubiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Lysosomen-spezifischem Anti-LAMP1-Antikörper, Alexa488-konjugiertem sekundär-Antikörper und DAPI. Die Phasenkontrastbilder (A, C und E) und die korrespondierenden IF-Mikrophotographien der überlagerten Alexa488- und DAPI-Kanäle (B, D und F) zeigten die Lokalisation des LAMP1-Antikörpers an den Membranen der Vakuolen. Nach gleichem Schema gefärbte Kontrollzellen wiesen eine normale subzelluläre Verteilung der Lysosomen auf (G und H). Die Maßstabsbalken entsprechen $10 \mu\text{m}$.

5.3.2 Bestimmung der Art des Zelltodes durch EHEC-Vac

Mittels WST-1-Assay, lichtmikroskopischen Beobachtungen und Durchflusszytometrie konnte die zytotoxische Wirkung von EHEC-Vac dokumentiert werden. Die durchgeführten FACS-Experimente mit EHEC-Vac-behandelten HBMECs lieferten Hinweise, dass die Zellen keine Apoptose einleiteten. Um zu bestimmen, ob ein nekrotischer Zelltod durch das Toxin verursacht wurde, ist die DHM eingesetzt worden. Dazu wurden die Zellen der VD_{90} -Konzentration (siehe Legende Abbildung 21) von EHEC-Vac ausgesetzt und im fünf Minuten-Intervall sowohl ein Weißlicht-Bild als auch ein digital holographisches Phasenkontrast-Bild aufgenommen (Abbildung 22). Die "a"-Zelle zeigte 21,8 h nach Inkubation mit EHEC-Vac eine starke Ausbildung von Vakuolen (Abbildung 22A und B) und rundete sich in den folgenden 24,5 h ab (46,3 h nach Start des Experiments, Abbildung 22C und D), was zu einer signifikanten Steigerung des Phasenkontrasts führte. Nach weiteren 25,4 h ($t = 71,1$ h, Abbildung 22E und F) konnte eine Verringerung des Phasenkontrastes durch das Austreten des Zytoplasmas nachgewiesen werden. EHEC-Vac bewirkte ebenso bei Zelle "b", die sich während der Messung von unten in den Beobachtungsbereich bewegte, nach dem "vollvakuolisierten" Zustand ($t = 46,3$ h) den nekrotischen Zelltod, allerdings in kürzerer Zeit (25,4 h; $t = 71,7$ h). Des Weiteren konnte durch die DHM-Messungen gezeigt werden, dass die Vakuolen im Gegensatz zu zellulären Kompartimenten hoher Dichte, die im DHM-Phasenkontrast hell erscheinen, als dunkle Stellen sichtbar waren. Dies spiegelte die geringe Dichte der Vakuolen wider, welche einen ähnlichen Brechungsindex wie das umgebende Zellkulturmedium und damit extrem geringe und für Zellen untypische Proteinkonzentrationen aufwiesen.

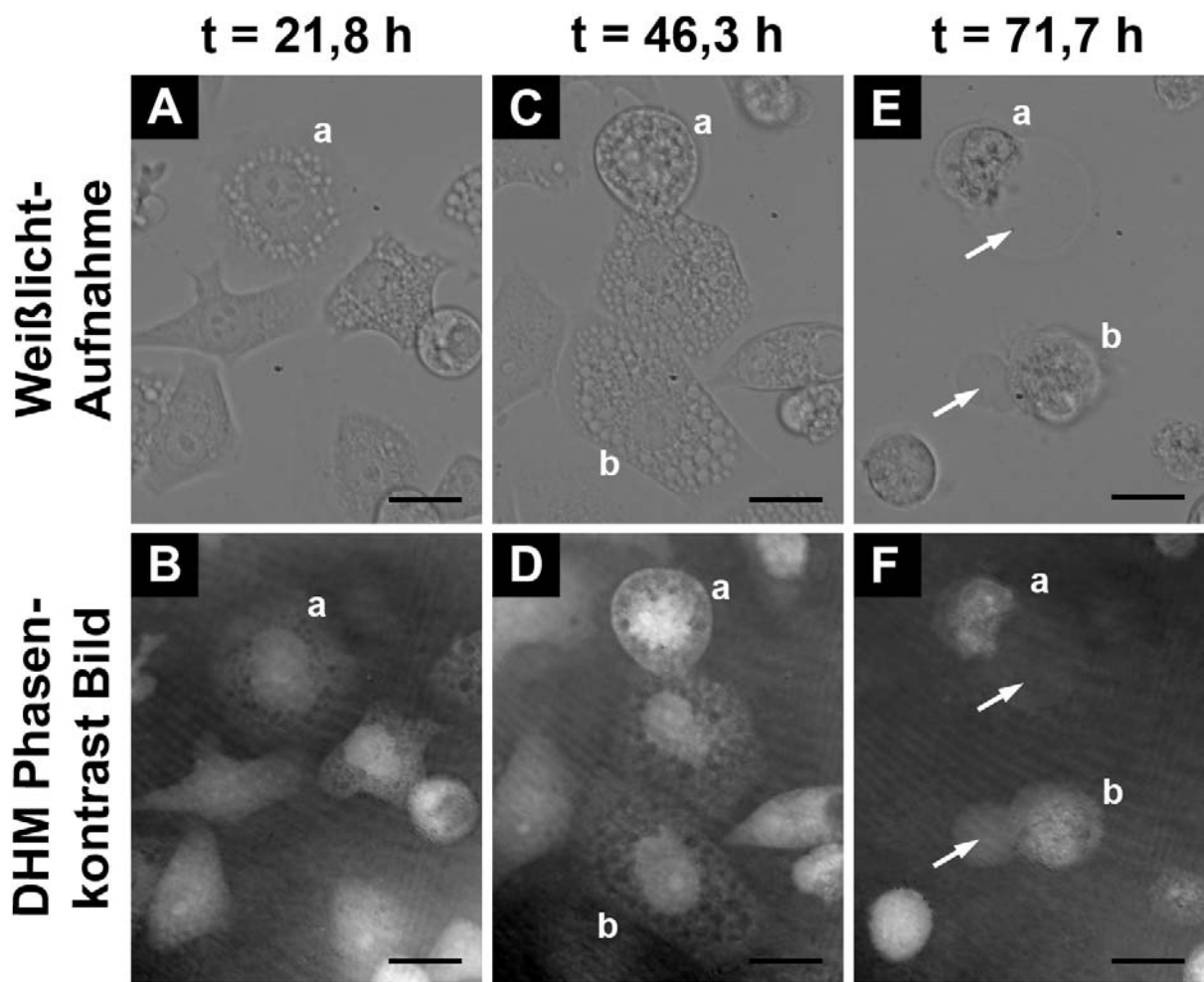


Abbildung 22: Durch EHEC-Vac verursachter nekrotischer Zelltod von HBMECs. Weißlicht-Aufnahmen (A, C und E) und die korrespondierenden DHM Phasenkontrast-Aufnahmen (B, D und E) von HBMECs nach der Exposition mit EHEC-Vac-VD₉₀ zu indizierten Zeitpunkten. Die Vakuolen sind als dunkle Bereiche innerhalb der Zellen in den DHM-Phasenkontrast-Aufnahmen sichtbar. Die mit "a" und "b" beschrifteten Zellen sind Beispiele für "vollvakuolisierte" Zellen, die den nekrotischen Zelltod einleiten. Die Pfeile zeigen die Freisetzung des Zytoplasmas nach Verlust der Plasmamembranintegrität. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m.

5.3.3 Zellteilungsüberwachung von HBMECs mittels digital holographischer Mikroskopie

Die DHM ermöglicht eine quantitative Multi-Fokus Phasenkontrast-Bildgebung für die Lebendzell-Analyse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DHM für verschiedene Fragestellungen eingesetzt und die Methodik verbessert. Diese Weiterentwicklungen führten dazu, dass eine markerfreie Zellteilungsüberwachung und die Zellmigrationsverfolgung als neue Applikation der DHM gezeigt und zur Veröffentlichung eingereicht

wurde. Diese neue Anwendungsmöglichkeit wurde mit Hilfe von einer HBMEC-Messung etabliert. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Die vorliegende Messung wurde ohne Stx-Inkubation durchgeführt, um negative Auswirkungen auf die Zellvitalität durch die Kultivierung der HBMECs im Mikroskop-aufbau (z. B. Weißlicht, Laserlicht, Medienumstellung, μ -dishes) ausschließen zu können. Abbildung 23 zeigt repräsentative Ausschnitte (kodierte in 256 Graustufen) der erhaltenen Phasenkontrast-Aufnahmen während des Experiments. Nach $t = 19,7$ h, $t = 32,5$ und $t = 37,7$ h teilen sich die mit A, B und D gekennzeichneten Zellen in die korrespondierenden Tochterzellen a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , d_1 und d_2 . Bei Zelle C konnte während der 47 stündigen Messung keine Zellteilung beobachtet werden.

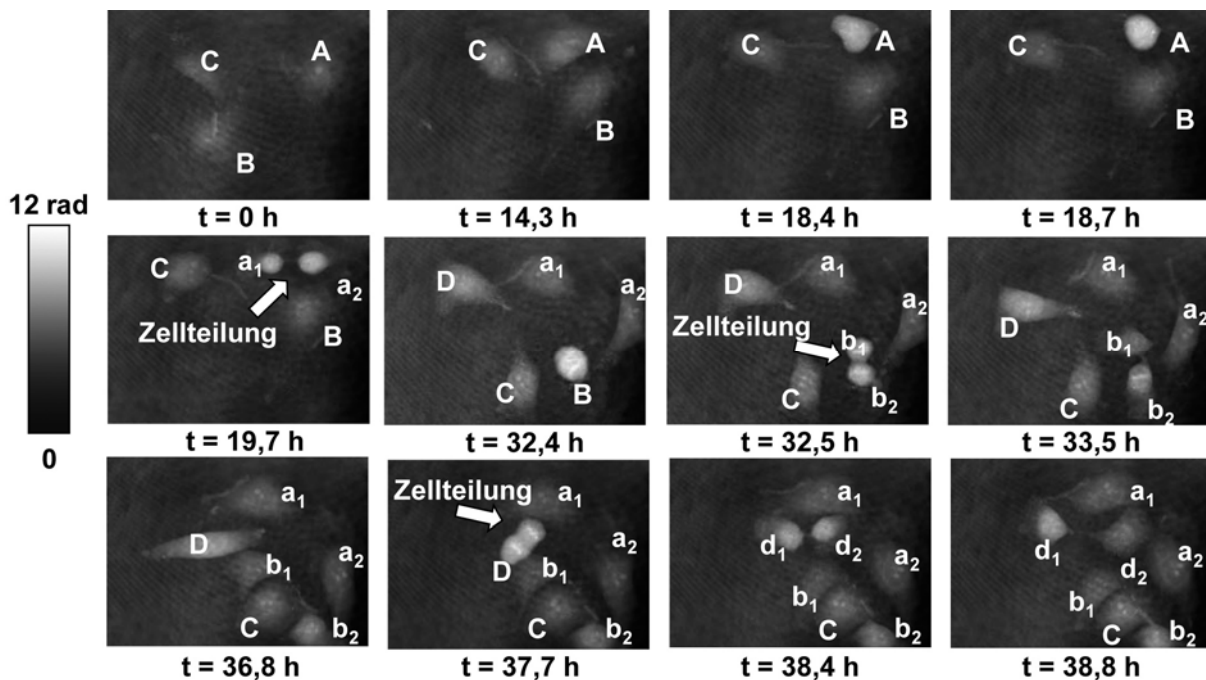


Abbildung 23: Quantitative Phasenkontrast-Aufnahmen (in 8-Bit Graustufen kodiert) von teilungsaktiven HBMECs zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Pfeile weisen auf die Zellteilungen nach 19,7 h (A), 32,5 h (B) und 37,7 h (D) hin. Bei Zelle C konnte während der Messung keine Zellteilung beobachtet werden. Die korrespondierenden Tochterzellen sind als a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , d_1 und d_2 markiert.

Es konnte eine signifikante Erhöhung des Phasenkontrasts vor dem Teilungsprozess festgestellt werden (Zelle A: $t = 18,7$ h; Zelle B: $t = 32,4$ h und Zelle D: $t = 36,8$ h). Während in der adhärennten Wachstumsphase der Zellen subzelluläre Regionen mit, im Vergleich zur Umgebung, hohen Dichten (z. B. Nukleus, Zellkernmembran und Nukleoli) sichtbar waren,

zeigen in Analogie dazu die hellen Areale der Phasenkontrast-Aufnahmen die während der Mitose kondensierten Chromosomen (Abbildung 23, Zelle D bei $t = 37,7$ h).

Zur weiteren Evaluation der DHM-Phasenkontrast-Aufnahmen wurden der maximale Phasenkontrast $\Delta\varphi_{\text{cell, max}}$ bzw. die korrespondierende maximale Zellhöhe $d_{\text{cell, max}}$ und die Zellmigrations-Trajektorien aller Zellen bestimmt (Abbildung 24 und 25). Vor der Teilung der Zellen A, B und D rundeten sich die Zellen ab, was zu einem signifikanten Anstieg des maximalen Phasenkontrastes führte (Abbildung 24). Die daraus resultierenden Peaks in den Plots sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Nach den Zellteilungsprozessen nahmen die maximalen Phasenkontraste und die Zellhöhe ab. Bei Zelle C, die sich im Beobachtungszeitraum nicht teilte, wurden nur Fluktuationen dieser Parameter gemessen.

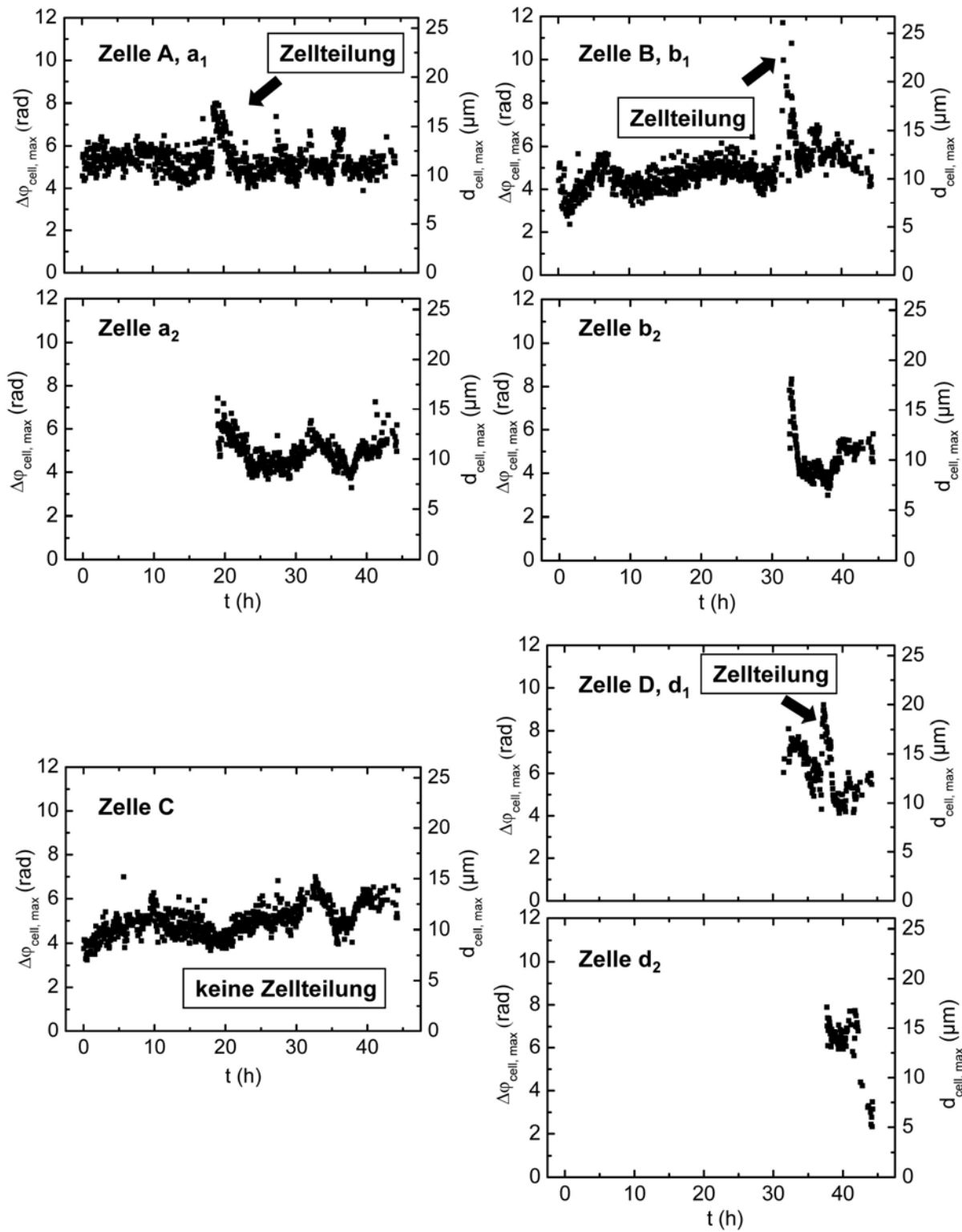


Abbildung 24: Zeitabhängiger Verlauf des maximalen Phasenkontrastes $\Delta\varphi_{\text{cell,max}}$ bzw. der korrespondierenden maximalen Zellhöhe $d_{\text{cell,max}}$, die automatisch aus den quantitativen Phasenkontrast-Aufnahmen in Abbildung 23 generiert wurden.

Die in Abbildung 25 gezeigte, automatisch generierte, zweidimensionale Zellmigrationsverfolgung für alle untersuchten Zellen demonstriert die Verlässlichkeit des verwendeten Algorithmusses.

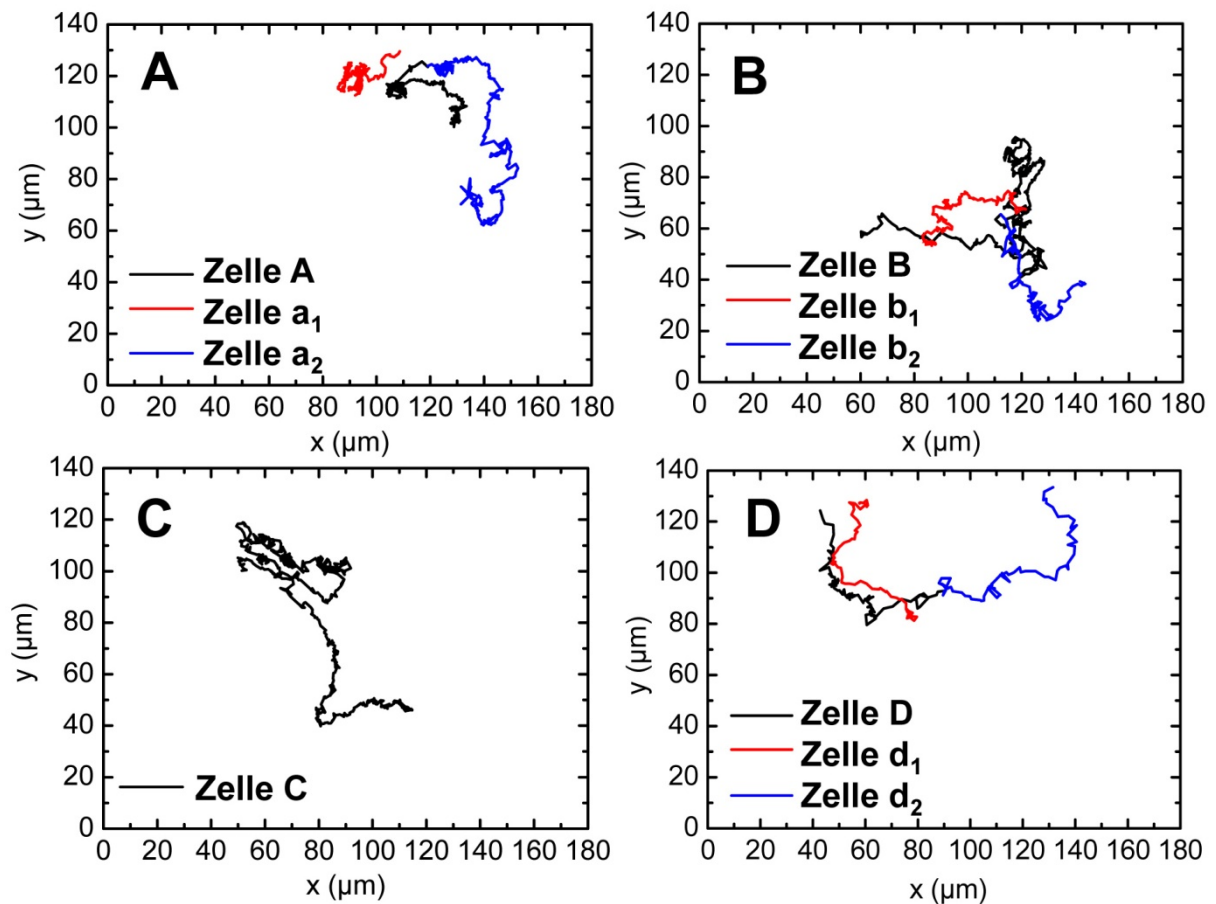


Abbildung 25: Zweidimensionale quantitative Spurverfolgung der Zellen aus den DHM Phasenkontrast-Aufnahmen in Abbildung 23. A-D: Trajektorien der Zellen und den korrespondierenden Tochterzellen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die Möglichkeit auf, mittels DHM eine Zellteilungsüberwachung in Langzeitexperimenten zu etablieren, die auf simultaner Zellhöhen-Messung und zweidimensionaler Zellmigrationsverfolgung basiert.

6 DISKUSSION UND AUSBLICK

6.1 Zelluläre Schädigungen von humanen Endothelzellen durch Shiga Toxine

In dieser Arbeit wurde ein direkter, umfassender und systematischer Vergleich der zellulären Schädigungen durch Stx1 und Stx2 durchgeführt. Mit dem Ziel, die biologische Wirkung der Toxine besser zu verstehen, wurden deren zytotoxische Effekte auf humane mikrovaskuläre (HBMECs) und makrovaskuläre (EA.hy 926 Zellen) Endothelzellen untersucht. Die Kombination klassischer Methoden wie Zellwachstums-, Zytotoxizitäts- und DNA-Fragmentierungsassays mit moderner Bildgebungstechnik stellte einen facettenreichen Ansatz dar, um zum besseren Verständnis der bislang lediglich unvollständig aufgeklärten Komplexität der Schädigung des humanen Endothels durch Stx beizutragen. Insbesondere die mikroskopischen Techniken der SEM von bewachsenen Microcarriern und der DHM, die erstmalig zur Erforschung der Interaktionen von Stx mit endothelialen Zielzellen eingesetzt wurden, ermöglichte einen direkten und detaillierten Einblick in die Wirkungsweise der beiden Toxine auf mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen.

Die Visualisierung der Stx-induzierten Zellschädigung mittels SEM von Microcarrier-basierten Kulturen bietet verschiedene Vorteile: Die Zellen können auf biokompatiblen Kollagen-beschichteten Oberflächen in einer Pseudo-Suspensionskultur unter konstanten Bedingungen (Nährstoffe, pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffpartialdruck) wachsen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Simulation von Bedingungen eines Infektionsherganges durch Applikation verschiedener Scherstress-Intensitäten auf die Mini-Monolayer. Zur Komplementierung und Erweiterung der so gewonnenen Informationen über die Endothel-Monolayer wurde die DHM zur Analyse der Toxineffekte auf lebende Einzelzellen eingesetzt. Diese quantitative, markerfreie und nicht-invasive Bildgebungstechnik erlaubt die zeitliche Verfolgung der morphologischen Veränderungen der Zellen von Toxinzugabe bis hin zum Zelltod und die Bestimmung des zugrunde liegenden Mechanismus' des Zelltodes.

6.1.1 Unterschiedliche Pathomechanismen von Stx1 und Stx2 bei humanen Endothelzelllinien

In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Mechanismen von Stx1 und Stx2, die dem Zelltod zugrunde liegen, charakterisiert. Die Untersuchungen der Zellmorphologie nach Toxininkubation lieferten dabei die entscheidenden Hinweise, welches Toxin Nekrose und/oder Apoptose in den untersuchten Zelllinien auslöste (Tabelle 6). Es konnte gezeigt werden, dass Stx1 eine Kombination von Nekrose und Apoptose, Stx2 hingegen fast ausschließlich Apoptose bei beiden untersuchten Zelllinien auslöste.

Die verschiedenen Stx1- und Stx2-induzierten Signalkaskaden, die zur Apoptose in Zellen verschiedenen Ursprungs führten, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen teilweise aufgeklärt (zusammengefasst in Johannes and Römer, 2010). Eine der Studien wurde mit Zellen endothelialer Herkunft durchgeführt, in der gezeigt werden konnte, dass der apoptotische Mechanismus von Stx2 auf HBMECs auf DNA-Fragmentierung und Spaltung (Aktivierung) der Caspasen 3, 6, 8 und 9 beruht und dieser CHOP-vermittelt ist (Fujii *et al.*, 2008). Die apoptotische Wirkung von Stx1 auf HBMECs ist ebenfalls dokumentiert; die zugrunde liegenden Mechanismen wurden jedoch nicht aufgeklärt (Ergonul *et al.*, 2003). Auch der genaue Mechanismus des in dieser Dissertation aufgezeigten Nekrose-induzierenden Effektes von Stx1 auf mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen bleibt ungeklärt. Weder die Inhibition der Proteinbiosynthese noch die Toxin-induzierte DNA-Schädigung können als Erklärung des schnellen nekrotischen Zelltodes (Abbildung 12, Abbildung 13) dienen. Darüber hinaus kann die heterogene zelluläre Reaktion auf Stx1 und Stx2 nicht durch die bekannten Wirkungsweisen der Stx, wie z. B. die Modifikation der rRNA oder die Induktion der Apoptose über verschiedene Signalkaskaden, erklärt werden. Daher muss ein bisher unbekannter Mechanismus der endothelialen Zellschädigung durch Stx1 postuliert werden, den es zukünftig zu erforschen gilt.

6.1.2 Differentielle Sensitivitäten von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die Charakterisierung der unterschiedlichen Sensitivität von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen gegenüber Stx1 und Stx2. Es

konnte gezeigt werden, dass beide Zelltypen bezüglich der Proliferation und der Zytotoxizität in ähnlicher Weise auf Stx1 reagierten, allerdings große Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Stx2 aufwiesen (Tabelle 5). Der Vergleich der Empfindlichkeit der beiden Zelllinien gegenüber beiden Toxinen zeigte, dass EA.hy 926 Zellen um Faktor 10 empfindlicher für Stx1 sind, wohingegen HBMECs mehr als tausendfach sensitiver auf Stx2 reagieren (Tabelle 5). Dies bedeutet, dass die Endothelzellen makrovaskulären Ursprungs gegen Stx2 relativ resistent sind, die mikrovaskulären Zellen jedoch auf wesentlich niedrigere Konzentrationen reagieren. Dies bestätigten Arbeiten, die mit glomerulären mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt wurden (Louise and Obrig, 1995).

Der Bedeutung des Stx-Rezeptors Gb3Cer wird eine entscheidende Rolle zugewiesen. Es wurde gezeigt, dass EA.hy 926 Zellkulturen mehr Gb3Cer als HBMEC-Kulturen exprimieren und daher postuliert, dass die höhere Toxizität von Stx1 gegenüber EA.hy 926 Zellen auf diesen Sachverhalt zurückgeführt werden kann (Schweppe *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen dieser Hypothese in mehreren Punkten: Zum einen wurde auf der Zelloberfläche insgesamt eine geringere Rezeptordichte in EA.hy 926 Zellen im Vergleich zu HBMECs gefunden (Abbildung 18), zum anderen wurden auch in der durchflusszytometrischen Quantifizierung von Zelloberflächen-assoziiertem und intrazellulär vorliegenden Rezeptoren geringere Mengen nachgewiesen (Abbildung 19). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beiden verwendeten Zelllinien unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Stx1 und Stx2 aufweisen, die jedoch gleiche Rezeptorspezifitäten haben (Lingwood *et al.*, 1987; Waddell *et al.*, 1988). Zudem korreliert die Dichte zugänglicher Rezeptoren auf der Zelloberfläche nicht mit der Internalisierung des Toxins (Falguières *et al.*, 2006). Daher muss die Hypothese, dass die Menge an Stx-Rezeptor der ausschlaggebende Faktor für die Sensitivität der Zellen gegenüber Stx ist, kritisch überdacht werden.

Der kürzlich entdeckte Aufnahmemechanismus von Stx (Römer *et al.*, 2007) lässt vermuten, dass für eine effiziente Internalisierung der Toxine die Konformation des Rezeptors in der Plasmamembran und deren Substrukturen von funktioneller Bedeutung ist, die von molekularen Charakteristiken des Gb3Cer beeinflusst wird (Kiarash *et al.*, 1994; Arab *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 2001; Binnington *et al.*, 2002; Johannes and Römer, 2010). Nicht nur die molekularen Eigenschaften der Rezeptoren, sondern auch die der

Toxine unterscheiden sich: Es konnte gezeigt werden, dass sich Stx1 und Stx2 in der Stabilität beim Endosomen-vermittelten Transport zum Golgi-Komplex unterscheiden (Lord and Roberts, 1998). Zusammengefasst lassen diese Arbeiten vermuten, dass die ausgeprägten Differenzen in der Sensitivität der HBMECs gegenüber Stx1 und Stx2 auf bislang unbekanntem Unterschieden in der Internalisierung und/oder dem intrazellulären Transport der Toxine beruhen (Tam *et al.*, 2008).

Die heterogene Empfindlichkeit von mikro- und makrovaskulären Zellen gegenüber Stx1 und Stx2 kann für die Pathogenese des HUS relevant sein. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten führen zu der Hypothese, dass die dem HUS zugrunde liegende Schädigung des mikrovaskulären Endothels hauptsächlich auf Stx2 beruht. Dies steht im Einklang mit epidemiologischen Studien, die belegen, dass das Risiko der Entwicklung eines HUS während der EHEC-Infektion signifikant mit der Expression von Stx2 des infektiösen Stammes assoziiert ist (Ostroff *et al.*, 1989; Friedrich *et al.*, 2002). Darüber hinaus wird diese Hypothese von einer Studie gestützt, in der erstmals ein Pavian-Tiermodell für HUS etabliert wurde (Siegler *et al.*, 2003). Die intravenöse Gabe von Stx2 löste klinische und histopathologische Anzeichen des HUS aus, während die Gabe der gleichen Dosis Stx1 diese Effekte nicht verursachte. Die Kombination der höheren Empfindlichkeit der mikrovaskulären Zellen auf Stx2 mit den hauptsächlich Apoptose-auslösenden Eigenschaften dieses Toxins lässt vermuten, dass die Apoptose-induzierende Wirkung von Stx2 den hauptsächlich verantwortlichen Mechanismus für die Schädigung des mikrovaskulären Endothels während des HUS darstellt.

Im Falle eines HUS kommt es zur Schädigung der Endothelzellen in den Nieren und dem Gehirn. Diese Zellen weisen eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Stx2 in geringsten Konzentrationen auf, was in dieser Arbeit anhand von HBMECs (Gehirn) und in anderen Untersuchungen für glomeruläre mikrovaskuläre Endothelzellen (Niere) demonstriert werden konnte. Letztere zeichnen sich durch eine im Vergleich zu HBMECs weitaus höhere Empfindlichkeit aus (Louise and Obrig, 1995). Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der bislang ungeklärte Transportmechanismus der Stx an die Zielzellen nicht gerichtet ist, sondern dass im Verlauf der EHEC-Infektion extrem niedrige Konzentrationen der Toxine im Blut zirkulieren. Für die weniger sensitiven Bereiche des Endothels stellen diese niedrigen Konzentrationen keine Bedrohung dar.

6.2 Vakuolisierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch EHEC-Vac

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden konnten für die Charakterisierung eines neu entdeckten, in Endothelzellen Vakuolen auslösenden Toxins der EHEC eingesetzt werden. Aufgrund von Ähnlichkeiten in den induzierten morphologischen Effekten und der Wirkungsweise zu dem vakuolisierenden Toxin von *H. pylori* VacA, wurde dieses Toxin EHEC-Vac genannt. Es sind auch weitere bakterielle Toxine mit ähnlichen phänotypischen Effekten bekannt, die meist zur Gruppe der Autotransporter oder Poren-formenden Toxinen gehören (Bielaszewska *et al.*, 2009b und zitierte Referenzen). Das EHEC-Vac-Protein selbst konnte bisher noch nicht identifiziert werden, da trotz erheblicher Ähnlichkeit zu VacA die genomische DNA von Stamm 6451/98 nicht mit VacA hybridisiert.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die EHEC-Vac-bedingten Vakuolen lysosomalen Ursprungs sind (Abbildung 21) und hohe Konzentrationen von EHEC-Vac zum Zelltod durch Nekrose führen (Abbildung 22). Bei Letzterem musste beachtet werden, dass mit Überständen einer Bakterienkultur gearbeitet wurde und so das Vorkommen von LPS und anderen proinflammatorischen Substanzen als wahrscheinlich anzusehen war. Daher wurden als Kontrollen nicht-EHEC-Vac-beinhaltende Bakterienkultur-Überstände vermessen, die weder zur Vakuolenbildung noch zum nekrotischen Zelltod während der Messdauer führten. Eine interessante zukünftige Fragestellung lautet, ob geringere Konzentrationen von EHEC-Vac zwar eine Vakuolisierung der Zellen auslösen können, aber nicht zum Zelltod führen. Erste Experimente deuten darauf hin. Zudem konnte mittels DHM belegt werden, dass der Inhalt der Vakuolen fast denselben Brechungsindex wie das umgebende Zellkulturmedium aufweist und damit nur geringste Proteinmengen enthält. Die zugrunde liegenden Prozesse und der biologische Nutzen für die Zelle sind unaufgeklärt. In Kombination mit den ersten DHM-Messungen bei geringen Konzentrationen an EHEC-Vac kann vermutet werden, dass es sich bei der Ausbildung der Vakuolen um einen Detoxifizierungsprozess der Zellen handelt.

Der zytopathogene Effekt von EHEC-Vac auf humane mikrovaskuläre Endothelzellen basiert auf extensiver Vakuolisierung und finalem Zelltod. Daher muss dieses Molekül als

potentieller Virulenzfaktor der EHEC angesehen werden, der zu der HUS zugrunde liegenden, mikrovaskulären Schädigung beiträgt. In zukünftigen Studien muss das Protein identifiziert werden und es müssen die Effekte des Toxins auf andere während der EHEC-Infektion beeinträchtigte Zelltypen, beispielsweise intestinale Epithelzellen, untersucht werden. Zudem ist eine Überprüfung der Prävalenz in verschiedenen Serotypen der EHEC sinnvoll.

6.3 Etablierung eines Verfahrens zur dynamischen Überwachung der Zellteilung mittels DHM

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse demonstrieren die Möglichkeit, mittels DHM eine dynamische Zellteilungsüberwachung zu etablieren, die auf der simultanen Messung von Zellhöhe und der zweidimensionalen Zellspurverfolgung beruht. Die Zellteilung konnte in den Phasenkontrast-Aufnahmen (Abbildung 23) detektiert und die zeitliche Abhängigkeit von Phasenkontrast und Zellhöhe gezeigt werden (Abbildung 24). Allerdings könnten die berechneten Werte der Zellhöhe durch die nicht ausgeschlossenen Änderungen des zellulären Brechungsindex während der Zellteilung beeinflusst werden. Die zweidimensionale Zellspurverfolgung (Abbildung 25) beruht auf der Bestimmung der Position der Zelle mit maximalem Phasenkontrast. Dieser entspricht in der adhären Zelle der Position der Nukleoli bzw. des Zellkerns und in der abgerundeten Zelle der Position der kondensierten Chromosomen. Daher kann die Position des maximalen Phasenkontrastes in jeder Zellzyklusphase als Zellmittelpunkt angenommen werden. Allerdings liegt dieser Bestimmung ein Fehler zugrunde, der auf die verwendeten Objektive und Streueffekte (z. B. durch das Kulturmedium) zurückzuführen ist. Die Fehler der Bestimmung der lateralen Zellposition sind spezifisch für den verwendeten Messaufbau und liegen im Bereich von 1 - 2 μm . Dies entspricht in Bezug auf die Zelle einer Größenordnung von etwa 10 %.

Zusammenfassend zeigen die Abbildungen 23 - 25 die Verwendungsmöglichkeit der DHM für die quantitative Überwachung von Zellteilungsprozessen in Langzeituntersuchungen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Enterohämorrhagische *Escherichia coli*, die humanpathogene Subgruppe der Shiga Toxin-produzierenden *E. coli*, verursachen nicht-blutige und blutige Diarrhö, HC und das lebensbedrohliche HUS. HUS resultiert aus der mikrovaskulären Endothelzellschädigung von Nieren, Gehirn und anderen Organen. Stx, die Hauptvirulenzfaktoren der EHEC, sind AB₅-Toxine und bestehen aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf identischen B-Untereinheiten, welche als Ligand das zelluläre Glykosphingolipid Gb3Cer binden. Die Familie der Stx umfasst zwei Hauptgruppen, Stx1 und Stx2, welche 53 % bzw. 64 % Sequenzidentität in ihrer A- bzw. B-Untereinheit aufweisen. Nach der Freisetzung der Stx durch die EHEC im Lumen des Gastrointestinaltraktes gelangen diese nach Translokation in den Blutkreislauf und final zu ihrem Wirkungsort, den kapillaren Endothelzellen. Dort binden die Toxine an die zellulären Rezeptoren, werden internalisiert und intrazellulär retrograd prozessiert. Im Zytosol wirkt das katalytisch aktive A₁-Fragment durch spezifische Depurinierung von Adenosin der hochkonservierten 60S-rRNA toxisch. Dies führt zur Inhibition der Proteinbiosynthese und schließlich zum Zelltod. Neben diesem zytotoxischen Effekt wurden weitere Wirkungen von Stx auf Zellen beschrieben, beispielsweise die Depurinierung von chromosomaler DNA, die Umorganisation des Zytoskelettes und die Induktion von Apoptose.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unterschiedliche zytotoxische Effekte von Stx1 und Stx2 auf humane mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen untersucht. Als Modellsystem dienten HBMECs und EA.hy 926 Zellen makrovaskulären Ursprungs. Mit Hilfe von Zellproliferations- und Zytotoxizitätsassays konnten konzentrationsabhängig unterschiedliche Sensitivitäten der beiden Zelllinien gegenüber den Toxinen festgestellt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mikrovaskuläre im Vergleich zu makrovaskulären Zellen besonders sensitiv auf Stx2 reagieren. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der zerebralen Schädigung im Patienten, da meist solche EHEC-Stämme mit schweren klinischen Verläufen assoziiert werden können, die Stx2 produzieren. Die zytotoxischen Effekte beider Stx konnten sowohl auf Nekrose als auch auf Apoptose oder eine Kombination beider Arten des Zelltodes zurückgeführt werden.

Um einen genaueren Einblick in die Mechanismen der Zytotoxizität zu erlangen, wurden SEM-Aufnahmen von konfluenten Zellmonolayern auf MC vor und nach Toxinbehandlung angefertigt. Auf diesen konnten für beide Zelllinien ähnliche Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie nach Toxininkubation nachgewiesen werden. Während Stx1 eine Verringerung der Anzahl von Mikrovilli-Strukturen auf der Zelloberfläche, irreguläre Zellformen, Läsionen der Plasmamembran, Ausbildung von Membrankörperchen (das sog. *blebbing*) und Lücken im Zellmonolayer durch Zellablösung verursacht, sind nach Inkubation mit Stx2 lediglich eine leicht veränderte Form der Zellen sowie *blebbing* zu beobachten. Diese morphologischen Untersuchungen, insbesondere das Ausbleiben von nekrotischen Effekten wie Membranläsionen oder Zellablösung in Stx2-behandelten Endothelzellen, führten zu der Hypothese, dass Stx1 sowohl Nekrose als auch Apoptose, Stx2 hingegen hauptsächlich Apoptose induziert.

Zur Verifizierung dieser verschiedenen Mechanismen und um einen genaueren Einblick in die Dynamik des Zelltodes nach Toxinbehandlung zu erlangen, wurde eine Methode basierend auf DHM etabliert, um HBMECs und EA.hy 926 Zellen einer Einzelzell-Analyse zu unterziehen. Dieses erlaubt eine zerstörungs- und markerfreie sowie quantitative Langzeitanalyse der Viabilität und Morphologie von *in vitro*-gezüchteten Zellen. Durch das Etablieren einer Zellteilungsüberwachung in Langzeitexperimenten der DHM, die auf simultaner Zellhöhen-Messung und zweidimensionaler Zellmigrationsverfolgung basiert, konnte zudem eine neue Applikation der DHM aufgezeigt werden.

Die Visualisierung der Nekrose nach Inkubation mit Stx1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestätigt die differentielle Sensitivität mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen. Zusätzlich lässt sich der Prozess der Nekrose - das Anschwellen der Zellen sowie die Freisetzung des Zytoplasmas nach Desintegration der Plasmamembran - dreidimensional über einen Zeitraum von ~ 48 h quantifizieren. Bei Experimenten mit Stx2 konnte keine Nekrose beobachtet werden, allerdings auch keine Zellteilung trotz einer auf 80 h verlängerten Experimentaldauer. Um einen durch Stx verursachten Zellzyklus-Arrest auszuschließen, wurden Zellzyklusstudien mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Da kein signifikanter Zellzyklus-Arrest durch Stx verursacht wird, muss die Teilungsinaktivität der Zellen auf einer Induktion der Apoptose durch Stx2 beruhen. Dies konnte mittels DNA-Fragmentierungsassays zur Nekrose- bzw. Apoptosebestimmung

bestätigt und die Effekte konnten konzentrationsabhängig quantifiziert werden. Da die in dieser Arbeit untersuchten differentiellen Effekte von Stx1 und Stx2 nicht auf die bisher beschriebenen Wirkungsweisen von Stx zurückzuführen sind, muss angenommen werden, dass hier ein oder mehrere bisher unbeschriebene Mechanismen zugrunde liegen.

Des Weiteren wurde die Inhomogenität von HBMECs und EA.hy 926 Zellen in Kultur mit DHM, IF und Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnten variierende nekrotische Todeszeitpunkte der Zellen beobachtet und die Frage negiert werden, ob die Menge des Zelloberflächen-assoziierten Rezeptors mit der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Stx in Zusammenhang steht. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression von Gb3Cer nicht Zellzyklus-abhängig ist.

Die in dieser Dissertation entwickelten Methoden wurden zudem eingesetzt, um einen weiteren Virulenzfaktor der EHEC, EHEC-Vac, zu charakterisieren. Die Verwendung der IF zeigte, dass die EHEC-Vac-bedingten Vakuolen lysosomalen Ursprungs sind. Final war die Inkubation der Zellen mit EHEC-Vac letal. Die Art des Zelltodes und Hinweise auf die Dynamik der Vakuolenbildung konnten mit Langzeitmessungen im DHM bestimmt werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Acheson, D.W., Moore, R., De-Breucker, S., Lincicome, L., Jacewicz, M., Skutelsky, E., *et al.* (1996) Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* **64**: 3294-3300.

Aldick, T., Bielaszewska, M., Uhlin, B.E., Humpf, H.U., Wai, S.N., Karch, H. (2009) Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. *Mol Microbiol* **71**: 1496-1508.

Aldick, T., Bielaszewska, M., Zhang, W., Brockmeyer, J., Schmidt, H., Friedrich, A.W., *et al.* (2007) Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microb Infect* **9**: 282-290.

Andreoli, S.P., Trachtman, H., Acheson, D.W.K., Siegler, R.L., Obrig, T.G. (2002) Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol* **17**: 293-298.

Arab S., Lingwood C.A. (1996) Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: comparison of a supported bilayer film and liposomes. *Glycoconj J* **13**: 159-166.

Austin, P.R., Jablonski, P.E., Bohach, G.A., Dunker, A.K., Hovde, C.J. (1994) Evidence that the A2 fragment of 109aemo-like toxin type 1 is required for holotoxin assembly. *Infect Immun* **62**: 1768-1775.

Barbieri, L., Valbonesi, P., 109aemoly, M., Montanaro, L., Stirpe, F., Sperti, S. (1998) Shiga-like toxin I is a polynucleotide:adenosine glycosidase. *Mol Microbiol* **29**: 661-662.

Bast, D.J., Banerjee, L., Clark, C., Read, R.J., Brunton, J.L. (1999) The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. *Mol Microbiol* **32**: 953-960.

Bauer, M.E. and Welch, R.A. (1996) Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**: 167-175.

Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., *et al.* (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *JAMA* **272**: 1349-1353.

Bell, B.P., Griffin, P.M., Lozano, P., Christie, D.L., Kobayashi, J.M., Tarr, P.I. (1997) Predictors of 109haemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* **100**: E12.

Bettelheim, K.A. (2007) The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol* **33**: 67-87.

- Bettelheim, K.A. (2003) Serotypes of VTEC: The VTEC Table. <http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm>
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz, F. (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* **31**: 2483-2488.
- Bielaszewska, M., Bauwens, A., Greune, L., Kemper, B., Dobrindt, U., Geelen, J.M., *et al.* (2009b) Vacuolisation of human microvascular endothelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Thromb Haemost* **102**: 1080-1092.
- Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschäpe, H., *et al.* (2004) Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun* **72**: 1812-1816.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R., Karch, H. (2006) Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* **43** : 1160-1167.
- Bielaszewska, M., Köck, R., Friedrich, A.W., von Eiff, C., Zimmerhackl, L.B., Karch, H., *et al.* (2007) Shiga toxin-mediated h110aemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PloS One* **2**: e1024.
- Bielaszewska, M., Prager, R., Vandivinit, L., Müsken, A., Mellmann, A., Holt, N.J., *et al.* (2009a) Detection and characterization of the fimbrial sfp cluster in 110 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O165:H25/NM isolates from humans and cattle. *Appl Environ Microbiol* **75**: 64-71.
- Bielaszewska, M., Schmidt, H., Karmali, M.A., Khakhria, R., Janda, J., Blahova, K., Karch, H. (1998) Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* **36**: 2135-2137.
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T., Karch, H. (2005) Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun* **73**: 552-562.
- Binnington, B., Lingwood, D., Nutikka, A., Lingwood, C.A. (2002) Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid α -hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2. *Neurochem Res* **27**: 807-813.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P. Gonzalez, E.A., *et al.* (2004b) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *J Clin Microbiol* **42**: 645-651.

Brandt, J.R., Fouser, L.S., Watkins, S.L., Zelikovic, I., Tarr, P.I., Nazar-Stewart, *et al.* (1994) *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *J Pediatr* **125**: 519-526.

Brandt, J.R., Joseph, M.W., Fouser, L.S., Tarr, P.I., Zelikovic, I., McDonald, R.A., *et al.* (1998) Cholelithiasis following *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **12**: 222-225.

111Brigotti, M., Accorsi, P., Carnicelli, D., Rizzi, S., González Vara, A., Montanaro, L., *et al.* (2001) Shiga toxin 1: damage to DNA *in vitro*. *Toxicon* **39**: 341-348.

111Brigotti, M., Caprioli, A., Tozzi, A.E., Tazzari, P.L., Ricci, F., Conte, R., *et al.* (2006) Shiga toxins present in the gut and in the polymorphonuclear leukocytes circulating in the blood of children with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **44**: 313-317.

111Brigotti, M., Carnicelli, D., Ravanelli, E., Barbieri, S., Ricci, F., 111Bontadini, A., *et al.* (2008) Interactions between Shiga toxins and human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* **84**: 1019-1027.

Brigotti, M., Carnicelli, D., Vara, A.G. (2004) Shiga toxin 1 acting on DNA *in vitro* is a heat-stable enzyme not requiring proteolytic activation. *Biochimie* **86**: 305-309.

Brockmeyer, J., Bielaszewska, M., Fruth, A., Bonn, M.L., Mellmann, A., Humpf, H.U., *et al.* (2007) Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6351-6359.

Brunder, W., Khan, A.S., Hacker, J., Karch, H. (2001) Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting 111enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect Immun* **69**: 4447-4457.

Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* **24**: 767-778.

Bürk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M., Märtlbauer, E. (2003) Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* **41**: 2106-2112.

Byres E, Paton AW, Paton JC, Löfling JC, Smith DF, Wilce MC, *et al.* (2008) Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* **456**: 648-652.

Canizalez-Roman, A. and Navarro-García, F. (2003) Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Mol Microbiol* **48**: 947-958.

- Caprioli, A., Nigrelli, A., Gatti, R., Zavanella, M., Blando, A.M., Minelli, F., *et al.* (1993) Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec* **133**: 323-324.
- Carl, D., Kemper, B., Wernicke, G., von Bally, G. (2004) Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis. *Appl Opt* **43**: 6536-6544.
- Cimolai, N., Basalyga, S., Mah, D.G., Morrison, B.J., Carter, J.E. (1994) A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol* **42**: 85-89.
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L. (2002) Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of 112 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**: 6761-6769.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3734-3737.
- Eklund, M., Bielaszewska, M., Nakari, U., Karch, H., Siitonen, A. (2006) Molecular and phenotypic profiling of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- human isolates from Finland. *Clin Microbiol Infect* **12**: 634-641.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA *N*-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* **171**: 45-50.
- Ergonul Z., Hughes A.K., Kohan D.E. (2003) Induction of apoptosis of human brain microvascular endothelial cells by Shiga toxin 1. *J Infect Dis* **187**: 154-158.
- Erwert, R.D., Eiting, K.T., Tupper, J.C., Winn, R.K., Harlan, J.M., Bannerman, D.D. (2003) Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. *Microb Pathog* **35**: 87-93.
- Ethelberg, S., Olsen, K.E., Scheutz, F., Jensen, C., Schiellerup, P., Enberg, J., *et al.* (2004) Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis* **10**: 842-847.
- Erickson, M.C. and Doyle, M.P. (2007) Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot*, **70**: 2426-2449.
- Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., *et al.* (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* **12**: 2453-2468.

Fegan, N., Vanderlinde, P., Higgs, G., Desmarchelier, P. (2004) The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* **97**: 362-370.

Fraser, M.E., Cherney, M.M., Marcato, P., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., James, M.N.G. (2006) Binding of adenine to Stx2, the protein toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**: 627-630.

Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D. *et al.* (2004) Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**: 27511-27517.

Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., *et al.* (2002) *Escherichia coli* 113harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**: 74-84.

Friedrich, A.W., Lu, S., Bielaszewska, M., Prager, R., Bruns, P., Xu, J.G., *et al.* (2006) Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol* **44**: 1844-1846.

Friedrich, A.W., Nierhoff, K.V., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Karch, H. (2004) Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, 113enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* **42**: 4697-4701.

Foster, G.H. and Tesh, V.L. (2002) Shiga toxin 1-induced activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 in the human monocytic cell line THP-1: possible involvement in the production of TNF- α . *J Leukoc Bio.* **71**: 107-114.

Fujii, J., Wood, K., Matsuda, F., Carneiro-Filho, B.A., Schlegel, K.H., Yutsudo, T., *et al.* (2008) Shiga toxin 2 causes apoptosis in human brain microvascular endothelial cells via C/EBP homologous protein. *Infect Immun* **76**: 3679-3689.

Fukushima, H., Hashizume, T., Kitani, T. (1997) The massive outbreak of enterohemorrhagic *E. coli* O157 infections by food poisoning among the elementary school children in Sakai, Japan, in 1996. abstr. V6/VII, p. 111. In 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections.

Garg, A.X., Suri, R.S., Barrowman, N., Rehman, F., Matsell, D., Rosas-Arellano, *et al.* (2003) Long-term renal prognosis of diarrheaassociated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *JAMA* **290**: 1360-1370.

Garred, Ø., van Deurs, B., Sandvig, K. (1995) Furin-induced cleavage and activation of Shigatoxin. *J Biol Chem* **270**: 10817-10821.

Geelen, J.M., van der Velden, T.J., Te Loo, D.M., Boerman, O.C., van den Heuvel, L.P., Monnens, L.A. (2007) Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leucocytes. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 749-755.

- Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H.M., Zimmerhackl, L.B. (2002). 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* **186**: 493-500.
- Gerlach, R.G. and Hensel, M. (2007) Protein secretion systems and 114adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**: 401-415.
- Giaever I. and Keese CR. (1991) Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7896-7900.
- Griffin, P.M., Bell, B.P., Cieslak, P.R., Tuttle, J., Barrett, T.J., Doyle, M.P., *et al.* (1994) Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in the Western United States: the big picture, p. 7–12. In M. A. Karmali and A. G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other 114enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* **13**: 60-98.
- Gyles, C.L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**: E45-62.
- Hale, T.L. and Formal, S.B. (1980) Cytotoxicity of *Shigella dysenteriae* 1 for cultured mammalian cells. *Am J Clin Nutr* **33** 2485-2490.
- Hansen, C.G., Bright, N.A., Howard, G., Nichols, B.J. (2009) SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat Cell Biol* **11**: 807-814.
- Head, S.C., Karmali, M.A., Lingwood, C.A. (1991) Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of a subunit function. *J Biol Chem* **266**: 3617-3621.
- Head, S.C., Karmali, M.A., Roscoe, M.E., Petric, M., Strockbine, N.A., Wachsmuth, I.K. (1988) Serological differences between verocytotoxin 2 and Shiga-like toxin II. *Lancet* **2**: 751.
- Hehnly, H., Sheff, D., Stamnes, M. (2006) Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubule dynamics. *Mol Biol Cell* **17**: 4379-4389.
- Heidemann R., Riese U., Lütkemeyer D., Büntemeyer H., Lehmann J. (1994) The Super-Spinner: a low cost animal cell culture bioreactor for the CO2 incubator. *Cytotechnology* **14**: 1-9.
- Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**: 1231-1243.

Hippenstiel, S. and Suttorp, N. (2003) Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost* **89**: 18-24.

Ikeda, M., Gunji, Y., Yamasaki, S., Takeda, Y. (2000) Shiga toxin activates p38 MAP kinase through cellular Ca²⁺ increase in Vero cells. *FEBS Lett* **485**: 94-98.

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008, Robert-Koch-Institut

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

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

Jackson, M.P., Newland, J.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol Lett* **44**: 109-114.

Jandhyala, D.M., Ahluwalia, A., Obrig, T., Thorpe, C.M. (2008) ZAK: a MAP3Kinase that transduces Shiga toxin- and ricin-induced proinflammatory cytokine expression. *Cell Microbiol* **10**: 1468-1477.

Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M.A., Karch, H. (2003) The cytolethal distending toxin (cdt) gene cluster in 115enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* **71**: 3634-3638.

Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Karch, H. (2002) Identification and distribution of the 115enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (efa1) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: H- *Int J Med Microbiol* **292**: 207-214.

Jarvis, K.G. and Kaper, J.B. (1996) Secretion of extracellular proteins by 115 enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**: 4826-4829.

Jelacic, J.K., Damrow, T., Chen, G.S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., *et al.* (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* **188**: 719-729.

Johannes, L. and Römer, W. (2009) Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**: 105-116.

- Kaminishi, H., Hamatake, H., Cho, T., Tamaki, T., Suenaga, N., Fujii, T., *et al.* (1994) Activation of blood clotting factors by microbial proteinases. *FEMS Microbiol Lett* **121**: 327-332.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Karch, H., Bohm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S., Heesemann, J. (1993) Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* **31**: 1200-1205.
- Karch, H., Tarr, P.I., Bielaszewska, M. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* **295**: 405-418.
- Karch, H., Wiss, R., Gloning, H., Emmrich, P., Aleksic, S., Bockemuhl, J. (1990) Hämolytisch-uramisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*. *Dtsch Med Wochenschr* **115**: 489-495.
- Karmali, M.A. (1989) Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **2**: 15-38.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., *et al.* (2003) 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* **41**: 4930-4940.
- Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Steele, B.T. (1983a) *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet* **ii**: 1299-1300.
- Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., Lim, C. (1983b) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **1**: 619-620.
- Karpman, D., Papadopoulou, D., Nilsson, K., Sjogren, A.C., Mikaelsson, C., Lethagen, S. (2001) Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood* **97**: 3100-3108.
- Katagiri, Y.U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., *et al.* (1999) Activation of Src family kinase Yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergentinsoluble microdomains. *J Biol Chem* **274**: 35278-35282.
- Kaufmann, F. (1944) Zur Serologie der Coli-Gruppe. *Acta Pathol Microbiol Scand* **21**: 20-45.
- Kaye, S.A., Louise, C.B., Boyd, B., Lingwood, C.A., Obrig, T.G. (1993) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* **61**: 3886-3891.

Kemper, B., Carl, D., Höink, A., von Bally, G., Bredebusch, I., Schnekenburger, J. (2006a) Modular digital holographic microscopy system for marker free quantitative phase contrast imaging of living cells. *Proc. SPIE* **6191**: 61910T.

Kemper, B., Carl, D., Schnekenburger, J., Bredebusch, I., Schäfer, M., Domschke, W., *et al.* (2006b) Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy. *J Biomed Opt* **11**: 34005.

Keusch, G.T., Grady, G.F., Mata, L.J., McIver, J. (1972) The pathogenesis of Shigella diarrhea I. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae* I. *J Clin Invest* **51**: 1212-1218.

Keusch, G.T. and Jacewicz, M. (1975) The pathogenesis of Shigella diarrhea. V. Relationship of Shiga enterotoxin, neurotoxin and cytotoxin. *J Infect Dis* **131**: 33-39.

Kiarash, A., Boyd, B., Lingwood, C.A. (1994) Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem* **269**: 11138-11146.

Kojio, S., Zhang, H., Ohmura, M., Gondaira, F., Kobayashi, N., Yamamoto, T. (2000) Caspase-3 activation and apoptosis induction coupled with the retrograde transport of Shiga toxin: inhibition by brefeldin A. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**: 275-281.

Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**: 775-779.

Krüll, M., Dold C., Hippenstiel S, Rosseau S, Lohmeyer J, Suttorp N (1996). *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus* α -toxin potently induce neutrophil adhesion to human endothelial cells. *J Immunol* **157**: 4133-4140..

Kuczus, T., Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Zhang, W. (2004) A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*. *Mol Nutr Food Res* **48**: 515-521.

Kudva, I.T., Evans, P.S., Perna, N.T., Barrett, T.J., Ausubel, F.M., Blattner, F. R., *et al.* (2002) Strains of *Escherichia coli* O157:H7 differ primarily by insertions or deletions, not single-nucleotide polymorphisms. *J Bacteriol* **184**: 1873-1879.

Kudva, I.T., Hatfield, P.G., Hovde, C.J. (1996) *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* **34**: 431-433.

Kurmanova, A., Llorente, A., Polesskaya, A., Garred, Ø., Olsnes, S., Kozlov, J. *Et al.* (2007) Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 144-149.

Lathem, W.W., Bergsbaken, T., Welch, R.A. (2004) Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J Exp Med* **199**: 1077-1087.

- Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Sandvig, K. (2004) Efficient 118aemolyti-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J Cell Sci* **117**: 2321-2331.
- Lauvrak, S.U., Wälchli, S., Iversen, T.G., Slagsvold, H.H., Torgersen, M.L., Spilsberg, B., *et al.* (2006) Shiga toxin regulates its entry in a Syk-dependent manner. *Mol Biol Cell* **17**: 1096-1109.
- Lea, N., Lord, M., Roberts, L.M. (1999) Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* **145**: 999-1004.
- Lee, S.Y., Lee, M.S., Cherla, R.P., Tesh, V.L. (2008) Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell Microbiol* **10**:770-780.
- Lejeune, J.T., Hancock, D.D., Besser, T.E. (2006) Sensitivity of *Escherichia coli* O157 detection in bovine feces assessed by broth enrichment followed by immunomagnetic separation and direct plating methodologies. *J Clin Microbiol* **44**: 872-875.
- Lemichez, E., Lecuit, M., Nassif, X., Bourdoulous, S. (2010) Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**: 93-104.
- Leung, P.H.M., Peiris, J.S.M., Ng, W.W.S., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A., Yam, W.C. (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69** : 7549-7553.
- Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., *et al.* (1987) DNA probe to identify 118 enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* **156** : 175-182.
- Lindberg, A.A., Brown, J.E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E., Karlsson, K.A. (1987) Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem* **262** : 1779-1785.
- Ling, H., Boodhoo, A., Hazes, B., Cummings, M.D., Armstrong, G.D., Brunton, J.L., *et al.* (1998) Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry* **37**: 1777-1788.
- Lingwood, C.A. (1996) Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol* **4**: 147-153.
- Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. *et al.* (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**: 8834-8839.
- Lockitch, G., Halstead, A.C., Albersheim, S., MacCallum, C., Quigley, G. (1988) Age- and sex-specific pediatric reference intervals for biochemistry analytes as measured with the Ektachem-700 analyzer. *Clin Chem* **34**: 1622-1625.

Lord J.M., Roberts L.M. (1998) Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol* **140**: 733-736.

Louise, C.B., Kaye, S.A., Boyd, B., Lingwood, C.A., Obrig, T.G. (1995) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect Immun* **63**: 2766-2769.

Louise, C.B. and Obrig, T.G. (1991) Shiga toxin-associated h119aemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* **59**: 4173-4179.

Louise, C.B. and Obrig, T.G. (1992) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* **60**: 1536-1543.

Louise, C.B. and Obrig, T.G. (1995) Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**: 1397-1401.

Low, A.S., Holden, N., Rosser, T., Roe, A.J., Constantinidou, C., Hobman, J.L. (2006) Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **8**: 1033-1047.

Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B., Johannes, L. (1998) Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* **143**: 973-990.

McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1664-1668.

Mellmann, A., Bielaszewska, M., Zimmerhackl, L.B., Prager, R., Harmsen, D., Tschäpe, H., *et al.* (2005) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: *in vivo* evolution of a bacterial pathogen. *Clin Infect Dis* **41**: 785-792.

Melton-Celsa, A.R., Darnell, S.C., O'Brien, A.D. (1996) Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of 119 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* **64**: 1569-1576.

Mobassaleh, M., Gross, S.K., McCluer, R.H., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G.T. (1989) Quantitation of the rabbit intestinal glycolipid receptor for 119aemo toxin. Further evidence for the developmental regulation of globotriaosylceramide in microvillus membranes. *Gastroenterology* **97**: 384-391.

- Molla, A., Akaike, T., Maeda, H. (1989) Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase from *Serratia marcescens*. *Infect Immun* **57**: 1868-1871.
- Mori, T., Kiyokawa, N., Katagiri, Y.U., Taguchi, T., Suzuki, T., Sekino, T., *et al.* (2000) 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* **28**: 1260-1268.
- Müsken, A., Bielaszewska, M., Greune, L., Schweppe, C.H., Müthing, J., Schmidt, H., *et al.* (2008) Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitolfermenting 120 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1087-1093.
- Müthing, J., Schweppe, C.H., Karch, H., Friedrich, A.W. (2009) Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost* **101**: 252-264.
- Nakajima H., Kiyokawa N., Katagiri Y.U., Taguchi T., Suzuki T., Sekino T., *et al.* (2001) Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **276**: 42915-42922.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Newland, J.W., Strockbine, N.A., Miller, S.F., O'Brien, A.D., Holmes, R.K. (1985) Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science* **230**: 179-181.
- Nicholls, L., Grant, T.H., Robins-Browne, R.M. (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**: 275-288.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**: 271-279.
- Nielsen, E.M., Scheutz, F., Torpdahl, M. (2006) Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Foodborne Pathog Dis* **3**: 81-87.
- O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Griffin, D.E., Thompson, M.R. (1980) Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. *Infect Immun* **30**: 170-179.
- O'Brien, A.D., LaVeck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B. (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**: 763-769.

O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B. (1983) *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* **i**: 702.

O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Williams Smith, H., Formal, S.B. (1984) Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile 121aemolyt. *Science* **226**: 694-696.

O'Brien, A.D., Tesh, V.L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M.P., Olsnes, S., Sandvig, K. *et al.* (1992) Shiga toxin : biochemistry, genetics, mode of action and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **180** : 65-94.

O'Brien, A.D., Thompson, M.R., Cantey, J.R., Formal, S.B. (1977) Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*, abstr. B-103. In Abstracts of the 77th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1977. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Obrig, T.G., Del Vecchio, P.J., Brown, J.E., Moran, T.P., Rowland, B.M., Judge, T.K., *et al.* (1988) Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun* **56**: 2373-2378.

Orskov, F. and Orskov, I. (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* **38**: 699-704.

Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., Jann, K. (1977) Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **41**: 667-710.

Ostroff S.M., Tarr P.I., Neill M.A., Lewis J.H., Hargrett-Bean N., Kobayashi J.M. (1989) Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* **160**: 994-998.

Paton, A.W., Beddoe, T., Thorpe, C.M., Whisstock, J.C., Wilce, M.C., Rossjohn, J., *et al.* (2006) AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* **443**: 548-552.

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

Paton, A.W., Srimanote, P., Talbot, U.M., Wang, H., Paton, J.C. (2004) A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med* **200**: 35-46.

Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., Paton, J.C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating 121aemolyt produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**: 6999-7009.

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

- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., *et al.* (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from 122 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **66**: 3810-3817.
- Peters, C.J. and S. R. Zaki (2002) Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med* **30**: 268-273.
- Petric, M., Karmali, M.A., Arbus, G.S., Roscoe, M., Louie, S., Cheung, R. (1987) Effects of cycloheximide and puromycin on cytotoxic activity of *Escherichia coli* verocytotoxin (Shiga-like toxin). *J Clin Microbiol* **25**: 1265-1268.
- Piérard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S. (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **36**: 3317-3322.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
- Ramegowda, B., Samuel, J.E., Tesh, V.L. (1999) Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents. *J Infect Dis* **180**: 1205-1213.
- Reichelt, R. (2007) Scanning Electron Microscopy., p. 133-272. In Hawkes, P., and Spence, J. (ed.), *Science of Microscopy*. Springer Science+Business Media, New York.
- Reida, P., Wolff, M., Pohls, H.W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksic, S., *et al.* (1994) An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* **281**: 534-543.
- Richardson, J.M., Evans, P.D., Homans, S.W., Donohue-Rolfe, A. (1997) Solution structure of the carbohydrate-binding B subunit homopentamer of verotoxin VT-1 from *E. coli*. *Nat Genet* **4**: 190-193.
- Richardson, S.E., Karmali, M.A., Becker, L.E., Smith, C.R. (1988) The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum Pathol* **19**: 1102-1108.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., *et al.* (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685.
- Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. (2002) *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* **17**: 467-475.

Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegl, B., Tenza, D., *et al.* (2007) Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* **450**: 670-675.

Sandvig, K. (2001) Shiga toxins. *Toxicon* **39**: 1629-1635.

Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A.B., Skotland, T., Torgersen, M.L. (2009) Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* [Epub ahead of print]

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

Sandvig, K., Garred, O., van Holvoort, A., van Meer, G., van Deurs, B. (1996) Importance of glycolipid synthesis for butyric acid induced sensitization to 123aemo toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell* **7**: 1391-1404.

Sandvig, K., Olsnes, S., Brown, J.E., Petersen, O.W., van Deurs, B. (1989) Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol* **108**: 1331-1343.

Sandvig, K. and van Deurs, B. (1996) Endocytosis, intracellular transport and cytotoxic action of 123aemo toxin and ricin. *Physiol Rev* **76**: 949-966.

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

Schapiro, F.B., Lingwood, C., Furuya, W., Grinstein, S. (1998) pH-independent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi complex *Am J Physiol Cell Physiol* **274**: C319-C332.

Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.

Schmidt, H., Karch, H., Beutin, L. (1994) The large-sized plasmids of 123 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* **117**: 189-196.

Schmidt, H., Kernbach, C., Karch, H. (1996a) Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **142**: 907-914.

Schmidt, H., Maier, E., Karch, H., Benz, R. (1996b) Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of 123 enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur J Biochem* **241**: 594-601.

Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M., Karch, H. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H(-) strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic

characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **37**: 3491-3496.

Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., Karch, H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1205-1208.

Schmitt, C.K., McKee, M.L., O'Brien, A.D. (1991) Two copies of Shiga-like toxin II related genes common in 124 enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* **59**: 1065-1073.

Sestili, P., Alfieri, R., Carnicelli, D., Martinelli, C., Barbieri, L., Stirpe, F., *et al.* (2005) Shiga toxin 1 and ricin inhibit the repair of H₂O₂-induced DNA single strand breaks in cultured mammalian cells. *DNA Repair* **4**: 271-277.

Shaikh, N. and Tarr, P. I. (2003) *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: Integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* **185**: 3596-3605.

Siegler, R.L. (1995) The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* **42**: 1505-1529.

Siegler R.L., Obrig T.G., Pyscher T.J., Tesh V.L., Denkers N.D., Taylor F.B. (2003) Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* **18**: 92-96.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.

Smith, H.W. and Lingwood, M.A. (1971) The transmissible nature of enterotoxin production in human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **4**: 301-305.

Smith, J.L. and Bayles, D.O. (2006) The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **32**: 227-248.

Smith, W.E., Kane, A.V., Campbell, S.T., Acheson, D.W., Cochran, B.H., Thorpe, C.M. (2003) Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **71**: 1497-1504.

Sonntag, A.K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L.H., *et al.* (2005a) 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* **71**: 8855-8863.

Sonntag, A.K., Zenner, E., Karch, H., Bielaszewska, M. (2005b) Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **118**: 464-470.

Soto, G.E. and Hultgren, S.J. (1999) Bacterial 125aemolyti: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**: 1059-1071.

Spears, K.J., Roe, A.J., Gally, D.L. (2006) A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 187-202.

Stein, P.E., Boodhoo, A., Tyrrell, G.J., Brunton, J.L., Read, R.J. (1992) Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* **355**: 748-750.

Stins, M.F., Gilles, F., Kim, K.S. (1997) Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* **76**: 81-90.

Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**: 135-140.

Suh, J.K., Hovde, C.J., Robertus, J.D. (1998) Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as 125eucaryotic ribosomes. *Biochemistry* **37**: 9394-9398.

Tam, P.J. and Lingwood, C.A. (2007) Membrane cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells. *Microbiology* **153**: 2700-2710.

Tam P., Mahfoud R., Nutikka A., Khine A.A., Binnington B., Paroutis P., Lingwood C. (2008) Differential intracellular transport and binding of verotoxin 1 and verotoxin 2 to globotriaosylceramide-containing lipid assemblies. *J Cell Physiol* **216**: 750-763.

Takenouchi, H., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Matsui, J., Katagiri, Y.U., Okita, H., *et al.* (2004) Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinomaderived cells. *J Cell Sci* **117**: 3911-3922.

Taneike, I., Zhang, H.M., Wakisaka-Saito, N., Yamamoto, T. (2002) Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett* **524**: 219-224.

Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary, J.C.J., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., *et al.* (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**: 1400-1407.

Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**: 1073-1086.

Tarr, P.I. and Neill, M.A., (2001) *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterol Clin North Am* **30**: 735-751.

Tarr, P.I., Neill, M.A., Allen, J., Siccardi, C.J., Watkins, S.L., Hickman, R.O. (1989) The 125aemolyting incidence of the hemolytic-uremic syndrome in King County, Washington: lack of evidence for ascertainment bias. *Am J Epidemiol* **129**: 582-586.

- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., *et al.* (2001) *toxB* gene on pO157 of 126enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**: 6660-6669.
- Tesh, V.L., Samuel, J.E., Perera, L.P., Sharefkin, J. B., O'Brien, A.D. (1991) Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* **164**: 344-352.
- Thelestam, M. and Frisan, T. (2004) Cytolethal distending toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 111-133.
- Tilden, J.J., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., *et al.* (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**: 1142-1145.
- Torres, A.G. and Kaper, J.B. (2003) Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **71**: 4985-4995.
- Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M.S., de Montigny, L., Kaper, J.B., Donohue-Rolfe, A. (1995) The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of 126 enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **63**: 3621-3627.
- Van de Kar, N.C., Monnens, L.A., Karmali, M.A., van Hinsbergh, V.W. (1992) Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the 126haemolytic uremic syndrome. *Blood* **80**: 2755-2764.
- Van Setten, P.A., van Hinsbergh, V.W., van der Velden, T.J., van de Kar, N.C., Vermeer, M., Mahan, J.D., *et al.* (1997) Effects of TNF α on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int* **51**: 1245-1256.
- Varma, J.K., Greene, K.D., Reller, M.E., DeLong, S.M., Trottier, J., Nowicki, S.F., *et al.* (2003) An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* **290**: 2709-2712.
- Waddell, T., Head, S., Petric, M., Cohen, A., Lingwood, C. (1988) Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2. *Biochem Biophys Res Commun* **152**: 674-679.
- Walchli, S., Skanland, S.S., Gregers, T.F., Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Ying, M., *et al.* (2008) The mitogenactivated protein kinase p38 links Shiga toxin-dependent signaling and trafficking. *Mol Biol Cell* **19**: 95-104.
- Wegener J., Sieber M., Galla H.J., (1996) Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *J Biochem Biophys Methods* **32**: 151-170
- Welch, R.A. (2001) RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 85-111.

Widiasih, D.A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S., Shinagawa, K. (2004) Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* **132**: 67-75.

Whitfield, C. and Roberts, I.S. (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1307-1319.

Wolfson, J.J., May, K.L., Thorpe, C.M., Jandhyala, D.M., Paton, J.C., Paton, A.W. (2008) Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways. *Cell Microbiol* **10**: 1775-1786.

Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., Tarr, P.I. (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* **342**: 1930-1936.

Wray, C., Randall, L.P., McLaren, I.M., Woodward, M.J. (1994) Verocytotoxic *Escherichia coli* from animals, their incidence and detection, p. 69-72. In M.A. Karmali and A. G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Yu, M. and Haslam, D.B. (2005) Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/Erdj3. *Infect Immun* **73**: 2524-2532.

Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T. Karch, H. (2002) Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx(1c)*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **40**: 1441-1446.

Zoja, C., Corna, D., Farina, C., Sacchi, G., Lingwood, C., Doyle, M.P., *et al.* (1992) Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1. *J Lab Clin Med* **120**: 229-238.

9 ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A/E	engl.: <i>attaching and effacing</i>
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AC	engl.: <i>alternating current</i>
AK	Antikörper
CD ₅₀	engl.: <i>cytotoxicity dose 50</i>
CDT	engl.: <i>cytolethal distending toxin</i>
CHOP	C/EBP homologes Protein
CLSM	engl.: <i>confocal laser scanning microscopy</i>
CMF-PBS	engl.: <i>calcium and magnesium free phosphate buffered saline</i>
Dalton	Da
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DHM	Digitale Holographische Mikroskopie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eae	engl.: <i>E. coli attaching and effacing</i>
EC	Endothelzellen
ECIS	engl.: <i>electric cell-substrate impedance sensing</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EfaI	<i>EHEC factor for adherence</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EHEC-Vac	EHEC vakuolisierendes Toxin
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERK1	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1
esp	engl.: <i>E. coli secreted protein</i>
EspP	engl.: <i>extracellular serine protease, plasmid-encoded</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FC	engl.: <i>forward scatter</i>
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	engl.: <i>forward scatter</i>
GA	Golgi-Apparat
Gb3Cer/CD77	Globotriaosylceramid
Gb4Cer	Globotetraosylceramid
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	engl.: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMVECs	engl.: <i>glomerular microvascular endothelial cells</i>
GSL	Glykosphingolipide
HBMEC	engl.: <i>human brain microvascular endothelial cells</i>
HC	engl.: <i>hemorrhagic colitis</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
HUVEC	engl.: <i>human umbilical cord vein endothelial cell</i>
IC ₅₀	engl.: <i>inhibitory concentration 50</i>
ICAM	engl.: <i>inter-cellular adhesion molecule</i>
IF	Immunfluoreszenzmikroskopie
Iha	engl.: <i>IrgA homologue adhesin</i>
IL-β	Interleukin-1β
Jnk	JUN N-terminale Kinase
K-Antigen	Kapselantigen

Kbe	Kolonie-bildende Einheiten
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEE	engl.: <i>locus of enterocyte effacement</i>
Lfp	engl.: <i>long polar fimbriens</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LR	engl.: <i>lipid rafts</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MC	Microcarrier
MTP	Multititer-Platten
MV	Membranvesikel
Na	Natrium
NM	engl.: <i>nonmotile</i>
OD	optische Dichte
OmpA	engl.: <i>outer membrane protein A</i>
PI	Propidiumiodid
RP-HPLC	engl.: <i>reversed phase – high performance liquid chromatography</i>
RTX	engl.: <i>repeat-in-toxin</i>
Saa	engl.: STEC autoagglutinating adhesin
SDS-PAGE	engl.: <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	engl.: <i>scanning electron microscope</i>
SF	Sorbitol-fermentierend
Sfa	engl.: <i>S fimbriae major subunit</i>
Sfp	engl.: <i>sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded</i>
SLT	Shiga-like Toxin
SS	engl.: <i>sideward scatter</i>
STEC	Shiga Toxin produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
SubAB	Subtilase Zytotoxin

T-Flasche	engl.: <i>tissue flask</i>
tir	engl.: <i>translocated intimin receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRITC	Tetramethyl-Rhodamineisothiocyanate
U	engl.: <i>unit</i>
ü. N.	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin von <i>Helicobacter pylori</i>
VCAM	engl.: <i>vascular cell adhesion molecule</i>
VD ₉₀	Konzentration von EHEC-Vac, die in ≥ 90 % der Zellen nach 24 h eine Vakuolenbildung induziert
VTEC	Vero Toxin produzierende <i>E. coli</i>
WST	engl.: <i>water soluble tetrazolium</i>
YSI	Yellow Springs Instruments

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung des typischen Verlaufs einer EHEC-Infektion (modifiziert nach Tarr <i>et al.</i> , 2005).....	10
Abbildung 2: Darstellung einer berechneten Struktur des Stx1 basierend auf den Röntgenstruktur-Analysedaten von Ling <i>et al.</i> (1998).	20
Abbildung 3: Struktur des Stx-Rezeptors Gb3Cer.	21
Abbildung 4: A: Schematische Darstellung des Lichtweges in der DHM. B: Messaufbau des DHM am Centrum für Biomedizinische Optik und Photonik in Münster.	55
Abbildung 5: Auswertung der mittels Durchflusszytometrie erhaltenen Daten.	62
Abbildung 6: Wundheilungsassay von EA.hy 926 Zellen unter dem Einfluss von Stx in indizierten Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.	66
Abbildung 7: Unterschiedliche Stx1- und Stx2-bedingte Wachstumsinhibition von HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B).....	67
Abbildung 8: Unterschiedliche Zytotoxizität von Stx1 und Stx2 bei HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B).....	70
Abbildung 9: Mittels SEM detektierte morphologische Änderungen von HBMECs nach Inkubation mit Stx1 oder Stx2.....	72
Abbildung 10: Durch Stx1 oder Stx2 verursachte und mittels SEM visualisierte morphologische Änderungen von EA.hy 926 Zellen.	74
Abbildung 11: Durch Stx2 verursachte und mittels SEM visualisierte morphologische Änderungen von HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B).....	75
Abbildung 12: Zeitliche Verläufe von Stx1- und Stx2-induzierter Zellschädigung einzelner HBMECs.....	77
Abbildung 13: Zeitliche Verläufe von Stx1- und Stx2-induzierter Zellschädigung einzelner EA.hy 926 Zellen.....	78

Abbildung 14: Zellzyklus-Analyse von HBMECs und EA.hy 926 Zellen nach 48 stündiger Inkubation mit 500 ng/ml Stx1 oder Stx2.....	79
Abbildung 15: Stx1- und Stx2-vermittelte Apoptose-Induktion bei HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B).....	81
Abbildung 16: Stx1- und Stx2-vermittelte Nekrose-Induktion bei HBMECs (A) und EA.hy 926 Zellen (B).....	83
Abbildung 17: Unterschiedliche Todeszeitpunkte von HBMECs (links) und EA.hy 926 Zellen (rechts) nach Inkubation mit 500 ng/ml Stx1.	85
Abbildung 18: Unterschiedliche Gb3Cer-Exposition auf der Zelloberfläche von HBMECs und EA.hy 926 Zellen.	87
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung von Zell-assoziiertem Stx-Rezeptor.	89
Abbildung 20: Nachweis der zellzyklusabhängigen Gb3Cer-Expression von HBMECs und EA.hy 926 Zellen mittels Durchflusszytometrie.	91
Abbildung 21: Organell-Assoziation von EHEC-Vac-bedingten Vakuolen (A-F).	93
Abbildung 22: Durch EHEC-Vac verursachter nekrotischer Zelltod von HBMECs.....	95
Abbildung 23: Quantitative Phasenkontrast-Aufnahmen (in 8-Bit Graustufen kodiert) von teilungsaktiven HBMECs zu verschiedenen Zeitpunkten.	96
Abbildung 24: Zeitabhängiger Verlauf des maximalen Phasenkontrastes $\Delta\varphi_{\text{cell, max}}$ bzw. der korrespondierenden maximalen Zellhöhe $d_{\text{cell, max}}$, die automatisch aus den quantitativen Phasenkontrast-Aufnahmen in Abbildung 23 generiert wurden.....	98
Abbildung 25: Zweidimensionale quantitative Spurverfolgung der Zellen aus den DHM Phasenkontrast-Aufnahmen in Abbildung 23.	99

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburt 23.05.1979 in Stolberg
Familienstand ledig, keine Kinder

Ausbildung

03/06 – heute **Doktorand** am Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster als externe Arbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld

Assoziiertes Mitglied des internationalen Graduiertenkollegs GRK1409/1 "Molecular Interactions of Pathogens with Biotic and Abiotic Surfaces"

Betreuer: Prof. Dr. H. Karch und Prof. Dr. J. Müthing

Thema: Zelluläre Funktionsstudien zum Wirkungsmechanismus von Shiga Toxinen bei mikro- und makrovaskulären Endothelzelllinien

08/04 – 08/05 **Diplomand** an der Universität Bielefeld in der AG Zellkulturtechnik

Kooperation mit dem Institut für rekonstruktive Neurobiologie, Bonn und dem Unternehmen Sartorius-BBI-Systems, Melsungen

Betreuer: Prof. Dr. J. Lehmann und Dr. H. Büntemeyer

Thema: Bioreaktorbasierte Produktion konditionierter Medien für humane embryonale Stammzellen

10/99 – 10/05 **Student** der "Molekularen Biotechnologie" an der Universität Bielefeld

Abschluss: Diplom-Biotechnologe (Dipl.-Biotech.)

09/98 – 06/99 **Grundwehrdienstleistender** (09/98 – 11/98 im Ausland)

08/89 – 07/98 **Schüler** am Franziskus Gymnasium in Vossenack

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

9.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift