

Mikrobiologie

**Etablierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen und vergleichende
molekulare Analyse der LEE-Pathogenitätsinsel atypischer
enteropathogener *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Julia Gärtner
aus Münster
-2002-

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. M. A. Schmidt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. J. Brosius
Tag der mündlichen Prüfungen:	11. Dezember 2002
Tag der Promotion:	11. Dezember 2002

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes	3
2.1.1 Das Darm-assoziierte Immunsystem	4
2.1.2 Die Peyer'schen Plaques des Dünndarms.....	4
2.1.3 Das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) der Peyer'schen Plaques	5
2.1.4 M-Zellen.....	6
2.1.5 Der Ursprung von M-Zellen.....	8
2.2 Besiedlung des Gastrointestinaltraktes mit Mikroorganismen	9
2.2.1 Interaktionen von pathogenen Mikroorganismen mit M-Zellen	9
2.2.2 Besiedlung und Infektionen des Gastrointestinaltrakts	10
2.2.3 „Besiedlung und Infektion“ mit <i>Escherichia coli</i> -Stämmen.....	12
2.2.4 Darmpathogene <i>E. coli</i> Stämme.....	13
2.2.4.1 Enteropathogene <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	14
2.2.4.1.1 Virulenzeigenschaften der EPEC	14
2.2.4.2 Diffus-adhärierende <i>Escherichia coli</i> (DAEC)	20
2.3 Zielsetzung.....	21
3 Material.....	22
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	22
3.2 Chemikalien	23
3.3 Reagentiensysteme	24
3.4 Enzyme	24
3.5 Größenstandards.....	25
3.6 Kulturmedien für Bakterien	26
3.7 Zellkulturmedien	26
3.8 Lösungen.....	28

3.9	Verwendete Antibiotika.....	28
3.10	Puffer	28
3.11	Versuchstiere.....	29
3.12	Verwendete Zelllinien	29
3.13	Bakterienstämme.....	29
3.14	Plasmide, Oligonukleotide und Sonden.....	30
3.15	Antikörper und Antiseren	32
4	Methoden.....	34
4.1	Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	34
4.2	Bestimmung der optischen Dichte	34
4.3	Bestimmung der Bakterienzellzahl	34
4.4	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	35
4.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	35
4.4.2	Bestimmung des Zelltiters	35
4.4.3	Stammhaltung eukaryotischer Zellen	36
4.4.4	Vitalitätstest mit Trypanblau.....	36
4.4.5	Mycoplasmentest.....	36
4.4.6	Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen.....	38
4.4.6.1	Isolierung von Epithelzellen aus dem Dünndarm neonataler Mäuse.....	38
4.4.6.2	Beschichtung von Wachstumsflächen.....	39
4.4.7	Transfektion der Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen.....	40
4.4.7.1	Chemische Transfektion eukaryotischer Zellen.....	40
4.4.7.2	Elektroporation eukaryotischer Zellen.....	41
4.4.8	Etablierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen	41
4.4.8.1	Kultivierung von Caco-2-Zellen	41
4.4.8.2	Messung der transepithelialen Widerstandes von Zellmonolayern	42
4.4.8.3	Isolierung von Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques der Maus	42
4.4.8.4	Isolierung humaner Lymphozyten	43

4.4.8.5	Co-Kultivierung von Epithelzellen und Lymphozyten im Transwell-Filter-System	44
4.4.8.6	Untersuchung M-Zell-typischer Eigenschaften	45
4.4.8.7	Infektion der Co-Kultur	45
4.4.9	Infektion von eukaryotischen Zellen mit Bakterien	46
4.4.10	Herstellung von Zytospinpräparaten.....	46
4.4.11	Immunfluoreszenzen.....	47
4.4.12	Fluoreszenz-Markierung von filamentösem Aktin (FAS-Test)	48
4.4.13	Mikroskopische Methoden.....	48
4.4.13.1	Elektronenmikroskopie	48
4.4.13.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen des M-Zell-Modells	48
4.5	Präparation und Analyse von DNA.....	49
4.5.1	Isolierung von Gesamtzell-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	49
4.5.2	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien.....	49
4.5.3	Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> durch alkalische Denaturierung.....	50
4.5.4	Plasmid-Mini-Präparation.....	51
4.5.5	Plasmid-Midi-Präparation.....	51
4.5.6	Reinigung und Konzentrierung von DNA in wässrigen Lösungen.....	51
4.5.6.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	51
4.5.6.2	Präzipitation mit Ethanol	52
4.5.6.3	Präzipitation mit Isopropanol	52
4.5.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53
4.5.7.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	53
4.5.7.2	Konzentrationsbestimmung im Agarosegel	53
4.5.8	Restriktionen	53
4.5.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	54
4.5.10	Ligation von DNA-Fragmenten	54
4.5.11	Einführung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	55
4.5.11.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode	55
4.5.11.2	Transformation CaCl ₂ -kompetenter Zellen	55

4.5.11.3	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	56
4.5.11.4	Elektroporation von <i>E. coli</i>	56
4.5.12	Elektrophoretische Methoden	57
4.5.12.1	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	57
4.5.13	Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	58
4.5.14	Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, „Polymerase chain reaction“)	58
4.5.15	„Multi-Well-PCR“	60
4.5.16	Analyse von DNA durch Blotten und Hybridisierung mit komplementären Sonden.....	60
4.5.17	Nukleinsäuretransfer auf Nylonmembranen im Southern Blot-Verfahren (Southern, 1975).....	61
4.5.18	Hybridisierung.....	62
4.5.19	Nachweis hybridisierter Sonden (ECL)	62
4.6	Herstellung von Cosmidbibliotheken	63
4.6.1	Vervielfältigung von Cosmidbibliotheken.....	66
4.6.2	Koloniehybridisierung	66
4.6.3	Analyse der Cosmid-Klone	67
4.7	Sequenzierungen	67
4.8	Gewinnung und Analyse von Proteinen	67
4.8.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	67
4.8.2	Gewinnung bakterieller Überstände	68
4.8.3	Trichloressigsäure-Fällung.....	68
4.8.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	68
4.8.5	Western Blot Analyse	70
4.8.6	Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	71
5	Ergebnisse	73
5.1	Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen der Maus	73
5.1.1	Isolierung und Kultivierung primärer, intestinaler Epithelzellen der Maus	73

5.1.2	Charakterisierung der isolierten Zellen.....	74
5.1.3	Charakterisierung der Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen	76
5.1.4	Etablierung einer Zelllinie aus intestinalen Epithelzellen.....	77
5.1.4.1	Konstruktion von pEGFP-T	77
5.1.4.2	Transfektion der Primärkultur mit dem Vektor pEGFP-T	77
5.1.5	Infektionen der intestinalen Primärkultur mit dem EPEC-Stamm E2348/69	80
5.2	Etablierung und Charakterisierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen.....	80
5.2.1	Etablierung eines Zellkultursystems für M-Zellen.....	80
5.2.1.1	Kultivierung von Caco-2-Zellen auf Transwell-Filtern	81
5.2.1.2	Isolierung von Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques der Maus	81
5.2.1.3	Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus murinen Peyer'schen Plaques	82
5.2.1.4	Isolierung von Lymphozyten aus humanem, venösem Blut	86
5.2.1.5	Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus humanem Blut	87
5.2.1.6	Reverse Co-Kultur	89
5.2.1.7	Kontrolle des Zellwachstums auf Filtern durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)	90
5.2.2	Charakterisierung der M-Zell-Kultur	90
5.2.3	Unterschiede im Expressionsmuster von Caco-2-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit von humanen Blutlymphozyten.....	95
5.2.4	Untersuchung M-Zell-typischer Eigenschaften.....	95
5.2.4.1	Transport von Latex-Partikeln durch M-Zell-ähnliche Zellen	95
5.2.4.2	Infektionen	97
5.2.4.2.1	Infektionen mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	97
5.2.4.2.2	Infektionen mit pathogenen <i>E. coli</i>	97
5.2.4.2.3	Infektionen mit dem probiotischen Bakterium <i>E. coli</i> Nissle 1917	98
5.3	Sequenz- und Funktionsanalyse der LEE-Pathogenitätsinsel der DA-EPEC.....	101
5.3.1	Sequenzanalyse.....	101
5.3.1.1	Konstruktion von Cosmidbanken für die DA-EPEC- Stämme 0181 und 3431..	101
5.3.1.2	Identifizierung und Isolierung LEE-positiver Klone	102
5.3.1.3	Sequenzierung	103

5.3.1.4	Sequenzvergleich des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und 0181	104
5.3.2	Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC 0181	113
5.3.2.1	Adhärenzverhalten der untersuchten Cosmidklone	113
5.3.2.2	Akkumulation von filamentösem Aktin (Fas-Test)	115
5.3.2.3	Sekretion von Virulenzproteinen	115
5.3.2.4	Akkumulation Tyrosin-phosphorylierter Proteine	117
5.3.2.5	Nachweis von Tir (Translocated Intimin Receptor) in der Zellmembran von HeLa-Zellen	120
5.3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC 0181.....	120
6	Diskussion	121
6.1	Etablierung eines M-Zell-Modells	121
6.1.1	Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen der Maus.....	121
6.1.2	Etablierung einer Zelllinie aus intestinalen Epithelzellen.....	124
6.1.3	Etablierung eines M-Zell-Modells durch Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus murinen Peyer'schen Plaques.....	125
6.1.4	Etablierung eines M-Zell-Modells durch Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit humanen Lymphozyten.....	126
6.1.4.1	Identifizierung eines spezifischen Markers für M-Zellen	127
6.1.4.2	Untersuchung des Expressionsmusters von Caco-2-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von humanen Lymphozyten	129
6.1.4.3	Transport von Partikeln durch M-Zell-ähnliche Zellen	129
6.1.4.4	Infektionen der M-Zell-ähnlichen Zellen mit enteropathogenen Bakterien	130
6.1.5	Entscheidende Faktoren für die Entstehung von M-Zellen.....	132
6.1.6	Ausblick M-Zell-Modell.....	135
6.2	Sequenz- und Funktionsanalyse des „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) der DA-EPEC-Stämme 3431 und DA-EPEC-Stamm O181	136
6.2.1	Sequenzvergleich des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 mit dem LEE des EPEC-Prototyp-Stammes E2348/69.....	136
6.2.2	Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC-Stammes O181.....	144

6.3	Ausblick der Sequenz- und Funktionsanalyse des LEE der DA-EPEC- Stämme O181 und 3431	147
7	Literaturverzeichnis	149
8	Anhang	166

A	Ampere
AA	aggregative Adhärenz
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
A/E	"attaching & effacing"
AFA	Afimbrielle Adhäsine
AIDA-I	"adhesine involved in diffuse adherence" I
AK	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
BFP	"bundle forming pili"
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	"cluster of differentiation"
CFSM	Confokales Laserscanning Mikroskop
°C	Grad Celsius
d	Tage
DA	diffuse Adhärenz
DAEC	diffus adhärierende <i>E. coli</i>
DA-EPEC	diffus adhärierende enteropathogene <i>E. coli</i>
dest.	destilliert
D-MALT	Diffuses Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe („diffuse-mucosa-associated lymphoid tissue“)
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Tri-phosphat
D-PBS	"Dulbecco's phosphate buffered saline"
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EM	Elektronenmikroskop
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
Esp	"EPEC secreted protein"
<i>et al.</i>	und andere
ETEC	enterotoxigene <i>E. coli</i>
F	Farad
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
F-Aktin	filamentöses Aktin
FAS	"fluorescence actin staining"
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
g	Gramm
Gal	Galaktose

GalNAc	N-Acetyl-Galaktose
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe („gut associated lymphoid tissue“)
GI	Gastrointestinaltrakt
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukose
h	Stunde
HBSS	Hanks Salzlösung („Hank’s balanced salt solution“)
H ₂ O	Wasser
Ig	Immunglobulin
IP	Inositolphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
l	Liter
LA	Lokale Adhärenz
LEE	"Locus of Enterocyte Effacement"
LPS	Lipopolysaccharide
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple Klonierungsstelle („multi cloning site“)
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht („molecular weight“)
n	nano (10 ⁻⁹)
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
O-MALT	organisiertes Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe („organized mucosa associated lymphoid tissue“)
ORF	"open reading frame"
ori	"origin of replication"
p	Piko (10 ⁻¹²)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer („phosphate buffered saline“)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PP	Peyer’scher Plaque
R	Widerstand
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden

sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBS	"tris buffered saline"
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	4-Nitroblau-Tetrazolium Ethylendiamin
Tir	"translocated intimin receptor"
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
u.a.	unter anderem
U	Einheit(en) („Unit(s)“)
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Zusammenfassung

Die Passage von Antigenen und Mikroorganismen durch die als M-Zellen bezeichneten spezialisierten Epithelzellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques, ist nicht nur ein essentieller Schritt für die Entwicklung mukosaler Immunantworten, sondern auch für die Pathogenese einer Reihe von Infektionskrankheiten. Aufgrund eines fehlenden Zellkultursystem ist die Charakterisierung von M-Zellen sowie ihrer Interaktionen mit Mikroorganismen bislang auf morphologische Studien beschränkt. Da die geringe Zahl an M-Zellen im Epithel des Dünndarms die direkte Isolierung erschwert, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen durch die Co-Kultivierung differenzierter, humaner Epithelzellen mit humanen Blutlymphozyten *in vitro* induziert und ein Zell-Kultur-Modell für M-Zellen entwickelt. Die induzierten Zellen ähneln in ihrer Morphologie M-Zellen und zeigen deren typische Eigenschaften, wie z.B. den Transport von Partikeln. Entsprechend der *in vivo*-Situation wird das Verdauungsenzym Sukrase-Isomaltase in M-Zell-ähnlichen Zellen nur reduziert exprimiert. Auch *Y. enterocolitica*, die *in vivo* spezifisch an M-Zellen adhären und diese Zellen als Invasionsweg in die Mukosa nutzen, infiziert die M-Zell-ähnlichen Zellen, nicht aber differenzierte Epithelzellen. Der EPEC-Stamm E2348/69 sowie die DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 zeigen ebenfalls eine bevorzugte Adhärenz an M-Zell-ähnliche Zellen, die aber interessanterweise und vermutlich aufgrund antiphagozytotischer Faktoren der EPEC/DA-EPEC nicht zu einer Aufnahme der Bakterien führt. Als mögliches Markerprotein humaner M-Zellen konnte darüberhinaus Galektin-9 identifiziert werden.

Nachdem in einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit mit dem M-Zell-Modell die Möglichkeit geschaffen wurde, Interaktionen enteropathogener Bakterien mit Epithelzellen und zu M-Zell-ähnlichen Zellen differenzierten Epithelzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden im zweiten Teil die für die Pathogenese atypischer enteropathogener *E. coli* bestimmenden genetischen Faktoren charakterisiert. Wie epidemiologische Studien zeigen, gewinnen atypische EPEC-Stämme als Erreger persistierender Diarrhöen zunehmend an Bedeutung. Diesen Stämmen fehlt mit den „bundle forming pili“ (BFP) zwar ein wichtiger Virulenzfaktor der klassischen EPEC, sie induzieren aber die für die EPEC-Pathogenese charakteristischen morphologischen Veränderungen der Wirtszelle, die auch als „Attaching & Effacing“ (A/E)-Läsionen bezeichnet werden. Alle Faktoren, die für die Induktion des A/E-Phänotyps notwendig sind, werden von Genen einer als „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE)

bezeichneten Pathogenitätsinsel kodiert. Da diese Pathogenitätsinsel neben dem EPEC-Prototyp-Stamm E2348/69 auch in einer Reihe von A/E-Läsionen hervorrufenden *Enterobacteriaceae*, wie den DAEC, EHEC, dem kaninchenpathogenen RDEC-1, *Citrobacter rodentium* und Diarrhö-verursachenden *Hafnia alvei*-Stämmen identifiziert werden konnte, scheint sie ein wichtiges Pathogenitätsmodul Diarrhö-assoziierter Bakterien zu sein. Zur weiteren Charakterisierung des LEE wurde der LEE der klinischen, atypischen EPEC-Isolate O181 und 3431, die aufgrund ihres diffusen Adhärenzphänotyps auch als DA-EPEC bezeichnet werden, kloniert, sequenziert und analysiert. Diese Sequenzanalyse zeigte, daß der LEE der DA-EPEC im Vergleich zum EPEC-Prototyp-Stamm E2348/69 und in Bezug auf den Aufbau, die kodierten Gene, ihre Reihenfolge und Organisation stark konserviert ist. Vor allem die Proteine, die am Aufbau des LEE-kodierten Typ III-Sekretionsapparates beteiligt sind, sind weitgehend identisch, was für den Erhalt der Funktion notwendig zu sein scheint. Größere Unterschiede konnten dagegen bei den LEE-kodierten Virulenzproteinen festgestellt werden, die direkt an Interaktionen mit dem Wirt beteiligt sind.

Die Sequenzanalyse demonstrierte darüberhinaus, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 auch aufgrund desselben Insertionsortes in das bakterielle Chromosom und einer hohen Identität gerade in den Effektorproteinen vermutlich phylogenetisch nah verwandt sind. Der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 zeigt dagegen in Bezug auf die Identität der kodierten Proteine und den Insertionsort deutliche Abweichungen vom LEE der beiden anderen Stämme.

Eine im Anschluß an die Sequenzanalyse durchgeführte Funktionsanalyse konnte darüberhinaus zeigen, daß der klonierte LEE des DA-EPEC-Stammes O181 alle notwendigen Informationen für die Induktion des A/E-Phänotyps in infizierten Wirtszellen enthält.

2 Einleitung

2.1 Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes

Die Mukosa des Darms steht mit einer Vielzahl von Makromolekülen und Organismen in Kontakt. Dazu zählen neben Nährstoffen und residenten Bakterien auch pathogene Mikroorganismen (Sanderson & Walker, 1993). Eine wichtige Funktion der Mukosa (Schleimhaut) des Darms ist es daher, neben der Verdauung und Resorption von Nährstoffen, eine wirkungsvolle physikalische und immunologische Barriere gegen die nicht-residente Mikroflora und pathogene Mikroorganismen zu bilden.

Zur Vergrößerung ihrer Oberfläche ist die Mukosa in große, makroskopisch sichtbare Falten gelegt, die darüber hinaus zu Krypten und Zotten (Villi) gefaltet sind, und umfaßt so eine Fläche von 200 m² (Pabst *et al.*, 1987). Zum Darmlumen ist sie durch ein einschichtiges, hochprismatisches Epithel begrenzt, das hauptsächlich aus Enterozyten besteht. Die Hauptaufgabe dieser säulenförmigen Zellen, die über einen apikalen Mikrovillisaum verfügen und daher ihrerseits zusätzlich zu einer Oberflächenvergrößerung beitragen, ist die Absorption von Nährstoffen. Bedeckt werden die Enterozyten von einer Glykokalix aus Polysacchariden und Glykoproteinen (Schiebler *et al.*, 1997), die Proteine für die Verdauung und Absorption von Nährstoffen enthält (Kato & Owen, 1994), darüberhinaus aber auch die Bindung von Mikroorganismen an das Epithel erschweren soll (Frey *et al.*, 1996). Da die Epithelzellen mit benachbarten Zellen über „tight junctions“ (*Zonula occludens*) verbunden sind, stellt das Epithel eine Barriere dar, die eine unkontrollierte Diffusion von Substanzen aus dem Darmlumen effizient verhindert (Schulzke & Riecken, 1989).

Neben den Enterozyten treten im Dünndarmepithel auch Becher-, Paneth- und enteroendokrine Zellen auf. Bei den Becherzellen handelt es sich um Drüsenzellen, die ein als Mukus bezeichnetes gelartiges Sekret in das Darmlumen sezernieren, das als Schutzfilm für das Epithel dient. Die Panethzellen, die vor allem in den Krypten von Jejunum und Ileum lokalisiert sind, sezernieren dagegen ein antibakterielles Sekret, das Einfluß auf die Zusammensetzung der Darmflora hat (Qu *et al.*, 1996), während die hormonbildenden enteroendokrinen Zellen eine Rolle bei der Regulierung der Darmmotilität und der Enzymsekretion spielen (Schiebler *et al.*, 1997).

Die Epithelzellen der Darmmukosa werden alle 3-5 Tage erneuert (Hattori & Arizono, 1988). Die Zellteilung ist dabei auf eine Zahl von undifferenzierten Stammzellen beschränkt, die an

der Basis der Villi in den Krypten lokalisiert sind (Babyatsky & Podolsky, 1991). Von dort aus findet eine gerichtete Wanderung der differenzierten und nicht mehr proliferationsfähigen Zellen in Richtung Villusspitze statt, die schließlich mit der Apoptose der Zellen und ihrer Abstoßung ins Darmlumen endet (Altman *et al.*, 1982; Potten & Loeffler, 1990).

2.1.1 Das Darm-assoziierte Immunsystem

Das intestinale Epithel muß neben seiner Barriere- und Absorptionsfunktion auch für eine effektive lokale Immunität gegen Pathogene und ihre Toxine sorgen, gleichzeitig aber die normale Darmflora tolerieren. Diese Fähigkeit wird durch das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT, „gut associated lymphoid tissue“) vermittelt, zu dem diffus in der Mukosa verteilte Immunzellen, aber auch Ansammlungen von Zellen des Immunsystems zählen. Bei den diffus-verteilten Zellen handelt sich um dendritische Zellen, Makrophagen und Lymphozyten, die sich unterhalb des einschichtigen Epithels im Bereich der *Lamina propria* befinden. In Bezug auf alle Schleimhäute bezeichnet man diese zerstreuten Zellen des Immunsystems auch als diffuses Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (D-MALT, „diffuse mucosa associated lymphoid tissue“). Darüberhinaus kommt es im GALT zu lokalen Ansammlungen von Zellen des Immunsystems und zur Ausbildung lymphatischer Follikel. Man spricht in diesen Fällen vom organisierten Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (O-MALT, „organized mucosa associated lymphoid tissue“). Die Follikel sind z.T. zu übergeordneten Strukturen zusammengeschlossen, so z.B. in den Peyer'schen Plaques des Dünndarms oder im Wurmfortsatz des Blinddarms.

2.1.2 Die Peyer'schen Plaques des Dünndarms

Die Peyer'schen Plaques (PP), die vor allem im Ileum vorkommen (s. Abb. 2.1), zählen wie die Milz und die Lymphknoten zu den sekundären lymphatischen Organen, in denen es zum Kontakt zwischen reifen Lymphozyten und Antigenen kommt. Die Peyer'schen Plaques liegen fast immer anti-mesenterial und sind in ihrer Größe und Lage, die genetisch determiniert zu sein scheint, sehr variabel (Rothkotter & Pabst, 1989).

Die Lymphfollikel, die vom Darmlumen durch die *Lamina propria* bis in die Bindegewebsschicht der Darmwand reichen, lassen sich in drei Zonen einteilen (s. Abb. 2.1): Das Keimzentrum reicht von der Darmwand bis zur Follikelmitte und enthält hauptsächlich große, proliferierende B-Lymphozyten (McGhee, 1992). Umgeben wird das Keimzentrum

von der Korona (Mantelzone), die aus kleineren B-Lymphozyten und vereinzelt T-Lymphozyten besteht. An die Korona schließt sich der Dombereich an, der auch als gemischte Zellzone bezeichnet wird, da er neben B- und T-Lymphozyten Makrophagen und dendritische Zellen enthält (Ermak & Owen, 1986). Dieser stellt den apikalen Bereich des Follikels dar und ist gegen das Darmlumen durch das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) begrenzt (Bockman & Cooper, 1973).

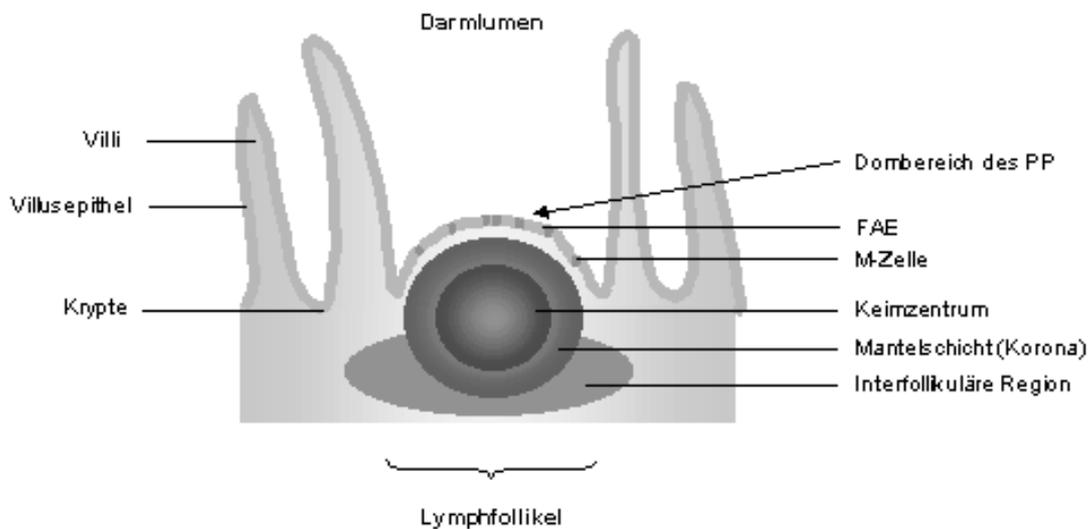


Abb. 2.1 Schematische Darstellung eines Peyer'schen Plaques.

Die zwischen den Follikeln liegenden interfollikulären Regionen sind von lymphatischen Gefäßen und kleinen Venen mit hohem Endothel (HEV, „high endothelial venules“) durchzogen, über die Lymphozyten den Blutkreislauf verlassen und direkt in das Follikel einwandern (Gowans, 1959; Anderson *et al.*, 1976).

2.1.3 Das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) der Peyer'schen Plaques

Um einen effektiven Immunschutz gegen potentielle Pathogene und Antigene aus dem Darmlumen zu gewährleisten, ist es erforderlich, daß Mikroorganismen und Antigene durch das intestinale Epithel transportiert und den Zellen des mukosalen Immunsystems zugeführt werden. Das Risiko, daß dieser Transport zu einer mukosalen und systemischen Infektion

führt, wird dadurch reduziert, daß er auf den für diese Aufgabe spezialisierten Bereich des Epithels, das FAE, beschränkt ist (Neutra *et al.*, 1996).

Das FAE wird von einer einschichtigen Lage von Enterozyten gebildet, die im Vergleich zu den langgestreckten, absorptiven Zellen der Darmzotten kubisch erscheinen. Dieser spezielle Bereich des Epithels zeichnet sich durch Eigenschaften aus, die die Aufnahme von Antigenen erleichtern soll (Gebert *et al.*, 1996). Zum einen enthält das FAE im Vergleich zum Villusepithel in der Regel keine Mukus-sezernierenden Becherzellen, so daß die physikalische Mukusbarriere im Bereich der Follikel deutlich reduziert ist (Bhalla & Owen, 1982). Darüberhinaus findet man in den Zellen des FAE eine reduzierte Expression von Genen, die für den Verdau und den Transport von Nährstoffen erforderlich sind, sowie eine reduzierte Expression von Verdauungsenzymen auf ihrer apikalen Seite (Smith, 1995). Die Enterozyten des FAE sind außerdem nicht in der Lage, Antikörper in das Lumen des Darms zu sezernieren, so daß im Bereich des FAE nur eine eingeschränkte immunologische Barriere vorhanden ist, und Pathogene ungehindert bis zur Glykokalix vordringen können (Bjerke & Braendzaeg, 1988). Die Antigenaufnahme selbst erfolgt schließlich durch hoch spezialisierte Epithelzellen, die M-Zellen (Owen & Jones, 1974), deren Anteil im FAE je nach Spezies zwischen 10 % (Mensch, Ratte, Maus) und 50 % (Kaninchen) variiert (Gebert *et al.*, 1996).

2.1.4 M-Zellen

M-Zellen (s. Abb. 2.2) unterscheiden sich morphologisch von normalen Enterozyten durch das Fehlen eines Mikrovillisaums. Auf ihrer apikalen Oberfläche besitzen diese Zellen stattdessen unregelmäßige und vereinzelt Einfaltungen („microfolds“, daher der Namen M-Zellen), die von einer dünnen Glykokalix überzogen sind. Darüberhinaus ist ihre basolaterale Membran charakteristischerweise eingestülpt, so daß das Zytoplasma einen zentralen Raum umschließt, in dem sich B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen befinden (Trier, 1991; Kato & Owen, 1994; Gebert *et al.*, 1996).

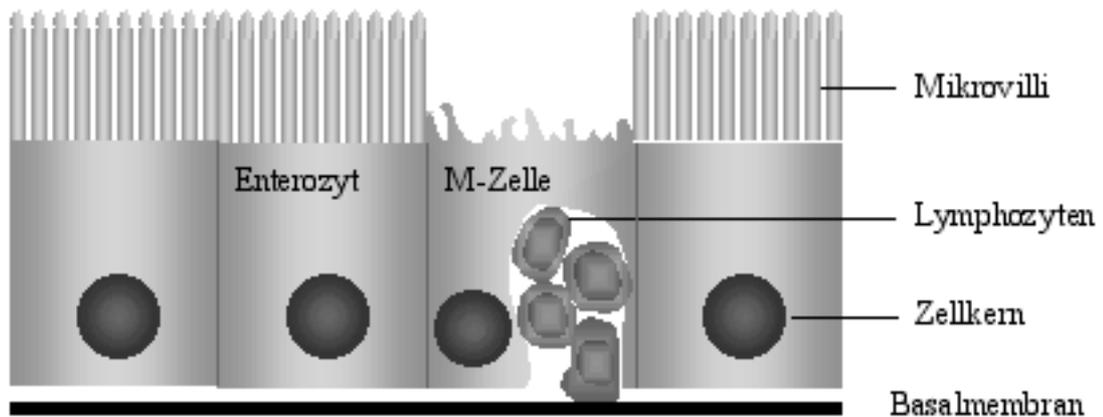


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des FAE mit M-Zelle.

Die zentrale Funktion von M-Zellen besteht im Transport von Antigenen aus dem Darmlumen, der sich in die folgenden drei Schritte unterteilen läßt (Neutra *et al.*, 1987): Zunächst nehmen M-Zellen Makromoleküle, Partikel und Mikroorganismen aus dem Darmlumen durch Endozytose an ihrer apikalen Seite auf. Dabei benutzen sie sowohl spezifische als auch unspezifische Mechanismen, um das große Spektrum der im Darmlumen vorhandenen Mikroorganismen und Partikel zu binden (Sansonetti *et al.*, 1999). Es ist zu vermuten, daß bekannte Erkennungsmechanismen, wie Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen, es den M-Zellen erlaubt, eine große Vielfalt potentieller Pathogene aufzunehmen. Diese Erkennungsmechanismen könnten entweder auf der Bindung bakterieller Lektine oder Adhesine durch M-Zell-Glykokonjugate oder auf der Interaktion von zellulären Lektinen mit bakteriellen Oligosacchariden bestehen (Neutra *et al.*, 1996).

Auch die Endozytose erfolgt über mehrere unterschiedliche Mechanismen. So werden Makromoleküle, und auch Viren, durch „Clathrin-coated Pits“ und Vesikel aufgenommen (Neutra *et al.*, 1982). Bei nicht-adhärentem Material findet dagegen eine Flüssigphasen-Endozytose in „coated“ oder „non-coated“ Vesikeln statt (Bockman & Cooper, 1973; Owen, 1977), während größere, adhäre Partikel und Bakterien ihre Phagozytose einschließlich der dazu notwendigen Membran-Umgestaltungen durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts induzieren.

In einem zweiten Schritt werden die Partikel durch Tranzytose über ein tubulovesikuläres System, das endosomale Kompartiment, innerhalb kurzer Zeit zur intraepithelialen Tasche transportiert. Interessanterweise umgehen die Endosomen in M-Zellen eine Fusion mit Lysosomen, so daß in M-Zellen keine Prozessierung oder Abbau von Antigenen stattfindet

(Owen *et al.*, 1986b). An der basolateralen Membran erfolgt schließlich in einem dritten Schritt die Exozytose der vollständigen Antigene in die intraepitheliale Tasche der M-Zelle (Neutra *et al.*, 1987).

Der gesamte Prozeß des Antigentransportes dauert etwa 10 bis 15 Minuten. In der intraepithelialen Tasche der M-Zellen treten die Antigene schließlich mit B- und T-Lymphozyten sowie mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt, wodurch es zur Induktion einer humoralen Immunantwort kommt (Owen *et al.*, 1986; Neutra *et al.*, 1987; Trier, 1991; Neutra *et al.*, 1996).

Ein spezielles Markermolekül für humane M-Zellen konnte bislang noch nicht gefunden werden. Dagegen konnten für andere Spezies bereits M-Zell-Marker identifiziert werden, die sich aber nicht als speziesübergreifend erwiesen. Während Vimentin in Kaninchen (Gebert *et al.*, 1992) und Cytokeratin 18 in Schweinen (Gebert *et al.*, 1994) als spezielle M-Zell-Marker dienen, färbt das Lektin UEA-1 ausschließlich murine M-Zellen von Balb/c-Mäusen (Giannasca *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1995).

2.1.5 Der Ursprung von M-Zellen

Die Faktoren und Mechanismen, die für die Entstehung von M-Zellen verantwortlich sind, sind noch nicht aufgeklärt. Die Tatsache aber, daß M-Zellen ausschließlich im Epithel oberhalb von Lymphgewebe auftreten, läßt vermuten, daß die Zellen des Lymphsystems und/oder von ihnen sezernierte Faktoren, wie z.B. Zytokine, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von M-Zellen spielen (Förster *et al.*, 1996; Savidge *et al.*, 1996; Kerneis *et al.*, 1997). So konnte gezeigt werden, daß die Injektion von Lymphozyten aus murinen Peyer'schen Plaques in die Mukosa von Mäusen eine *de novo*-Bildung von Lymphfollikeln bedeckt mit FAE und M-Zellen induziert (Savidge *et al.*, 1995; Kerneis *et al.*, 1997).

Über den Ursprung und die Entstehung von M-Zellen gibt es zwei Theorien. Die erste geht davon aus, daß M-Zellen eine separate Zelllinie im FAE darstellen (Bye *et al.*, 1984; Pabst, 1987; Gebert *et al.*, 1999). Nach dieser Theorie entstehen M-Zellen als eigener Zelltyp ausschließlich aus Stammzellen, die in bestimmten, Dom-assoziierten Krypten des FAE lokalisiert sind, und wandern aus den Krypten in Richtung Domspitze. In gewöhnlichen Krypten findet die Bildung von M-Zellen nicht statt, noch kommt es im Bereich des Doms zur Entstehung neuer M-Zellen. Diese Beobachtungen werden von Gebert *et al.* (1999) so interpretiert, daß die Lymphozyten der Peyer'schen Plaques keine Rolle bei der Induktion von M-Zellen spielen.

Die zweite Theorie besagt, daß M-Zellen keinen eigenen Zelltyp darstellen, sondern sich durch den Kontakt mit Zellen des mukosalen Immunsystems aus differenzierten Enterozyten entwickeln (Smith & Peacock, 1980; Smith *et al.*, 1988; Kerneis *et al.*, 1997). Die Abnahme von M-Zellen im Zentrum des Doms (Bye *et al.*, 1984; Clark *et al.*, 1993; Gebert *et al.*, 1999) zeigt, daß M-Zellen absterben oder/und abgestoßen werden, bevor sie die Spitze des Domes erreichen. Alternativ könnte diese Beobachtung aber auch bedeuten, daß M-Zellen wieder zurück zu Enterozyten konvertieren, und M-Zellen einen transienten Zelltyp im FAE darstellen. Diese Vorstellung beruht darauf, daß eine große Zahl an M-Zellen am Ausgang der Krypten gefunden wurde, im Schulterbereich des Doms aber keine Anzeichen für Apoptose detektiert werden konnten (Sierro *et al.*, 2000).

Unterstützt wird die zweite These über den Ursprung von M-Zellen auch dadurch, daß die Anzahl von M-Zellen im FAE durch eine mikrobielle Infektion erhöht wird. So führt bereits das Umsetzen von Mäusen aus einer keimfreien Umgebung in einen normalen Tierstall zu einer erhöhten Zahl an M-Zellen im Darm. Darüberhinaus demonstrierten Savidge *et al.* (1991), daß die orale Inokulation von Mäusen mit *Salmonella typhimurium aroA⁻* das GALT stimuliert, was ebenfalls zu einer erhöhten Zahl von M-Zellen im FAE führt. Auch die *in vivo*-Infektion von Kaninchen Peyer'schen Plaques mit *Streptococcus pneumoniae* R36a, einem Gram-positiven Bakterium, das normalerweise nicht im Darm vorkommt, steigert bereits wenige Stunden nach Zugabe der Bakterien deutlich die Zahl der M-Zellen im FAE (Borghesi *et al.*, 1999). Diese Zeit ist aber zu kurz, als daß neu gebildete M-Zellen aus den Krypten in den Bereich der Peyer'schen Plaques gewandert sein könnten (Smith *et al.*, 1980). Diese Beobachtung deutet daher an, daß M-Zellen spontan in diesem Bereich gebildet wurden (Borghesi *et al.*, 1999).

2.2 Besiedlung des Gastrointestinaltraktes mit Mikroorganismen

2.2.1 Interaktionen von pathogenen Mikroorganismen mit M-Zellen

Einige pathogene Mikroorganismen untergraben die Funktion der M-Zellen als Antigen-sammelnde Zellen und nutzen die Transzytose-Eigenschaften dieser Zellen zur Invasion (s. Tab. 2.1). Somit können die für das mukosale Immunsystem essentiellen M-Zellen auch zur „Achillesferse“ des Organismus werden, da sie es diesen Krankheitserregern erleichtern, die epitheliale Barriere des Darms zu überwinden und in den Organismus einzudringen (Siebers & Finlay, 1996).

Zu den Bakterien, die spezifisch über M-Zellen in den Körper eindringen, zählt unter anderem *Yersinia enterocolitica*. Die Interaktion von *Y. enterocolitica* mit den M-Zellen wird durch das bakterielle, äußere Membranprotein Invasin vermittelt, das spezifisch mit β 1-Integrinen auf der M-Zell-Oberfläche interagiert. Das Invasin ist nicht nur für die Adhärenz der Yersinien an die Zellen verantwortlich, sondern induziert darüberhinaus auch die Phagozytose der Bakterien. Die dadurch ausgelöste Infektion führt zu Mikroabszessen im Dombereich der Peyer'schen Plaques und zu ihrer Zerstörung (Hanski *et al.*, 1989; Grützkau *et al.*, 1990; Autenrieth & Firsching, 1996).

Auch die enteropathogenen *E. coli* (EPEC)-Stämme O124 und RDEC-1 adhäreren in ihrem Wirt, dem Kaninchen, spezifisch an M-Zellen (Neutra *et al.*, 1996 b) und induzieren die für EPEC-Infektionen charakteristischen „Attaching & Effacing“ (A/E)-Läsionen (s. Kap. 2.2.4.1.1). Interessanterweise widerstehen diese Bakterien aber der Internalisierung durch M-Zellen. Der Vorteil dieser Strategie liegt darin, daß die Bakterien die intestinale Mukosa besiedeln können, ohne daß mukosales Immunsystem direkt zu stimulieren (Siebers & Finlay, 1996).

2.2.2 Besiedlung und Infektionen des Gastrointestinaltrakts

Mehr als 400 verschiedene aerobe und anaerobe Bakterienarten besiedeln als residente Mikroflora den humanen Gastrointestinaltrakt. Diese Bakterien unterstützen Verdauungsprozesse und die Immunabwehr und haben somit eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung der intestinalen Physiologie. Die unterschiedlichen Arten der Darmflora leben in spezifischen ökologischen Nischen über den gesamten Darm verteilt. Während man im oberen Bereich des Dünndarms aufgrund seines sauren pH-Wertes kaum Bakterien finden, nimmt ihre Zahl mit steigendem pH-Wert in Richtung Dickdarm zu. Hier findet man mit etwa 10^{12} Bakterien pro Gramm Faeces die höchste Dichte (Simon & Gorbach, 1995).

Tab. 2.1 Aufnahme von Mikroorganismen durch M-Zellen im FAE der Peyer'schen Plaques in unterschiedlichen Tierspezies.

Organismus	Wirt	Referenz
Bakterien		
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Kaninchen	Fujimura, 1986
<i>Brucella abortus</i>	Rind	Ackermann <i>et al.</i> , 1988
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kaninchen	Walker <i>et al.</i> , 1988
RDEC-1	Kaninchen	Inman & Cantey, 1983
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Rind	Momotani <i>et al.</i> , 1988
<i>Salmonella typhi</i>	Maus	Kohbata <i>et al.</i> , 1986
<i>Salmonella typhimurium</i>	Maus	Clark <i>et al.</i> , 1994
<i>Shigella flexneri</i>	Kaninchen	Wassef <i>et al.</i> , 1989
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kaninchen	Regoli <i>et al.</i> , 1995
<i>Vibrio cholerae</i>	Kaninchen, Mensch	Owen <i>et al.</i> , 1986a
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Maus	Hanski <i>et al.</i> , 1989
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Kaninchen	Fujimura <i>et al.</i> , 1989
Viren		
HIV	Maus	Amerongen <i>et al.</i> , 1991
Mouse Mammary Tumour Virus	Maus	Neutra & Kraehenbuhl, 1992
Poliovirus	Mensch	Sicinski <i>et al.</i> , 1991
Reovirus	Maus	Wolf <i>et al.</i> , 1981
Andere Mikroorganismen		
Bäckerhefe	Schwein	Gebert <i>et al.</i> , 1994
<i>Cryptosporidium</i>	Meerschweinchen	Marcial & Madara, 1986
<i>Gardia muris</i>	Maus	Owen <i>et al.</i> , 1977
Prionprotein	Humanes M-Zell-Modell	Heppner <i>et al.</i> , 2001

Infektionen des Gastrointestinaltraktes, die weltweit zu den häufigsten Infektionserkrankungen bei Kindern unter fünf Jahren zählen, werden durch ein breites Erregerspektrum, das Viren, Bakterien, Protozoen und Würmer umfaßt, ausgelöst. Die Erreger werden über kontaminierte Nahrungsmittel, kontaminiertes Wasser oder durch Schmierinfektionen oral aufgenommen (Heesemann & Hacker, 2000). Wie in Abb. 2.3 dargestellt, haben sich die Durchfallerreger auf bestimmte Bereiche des Darms spezialisiert.

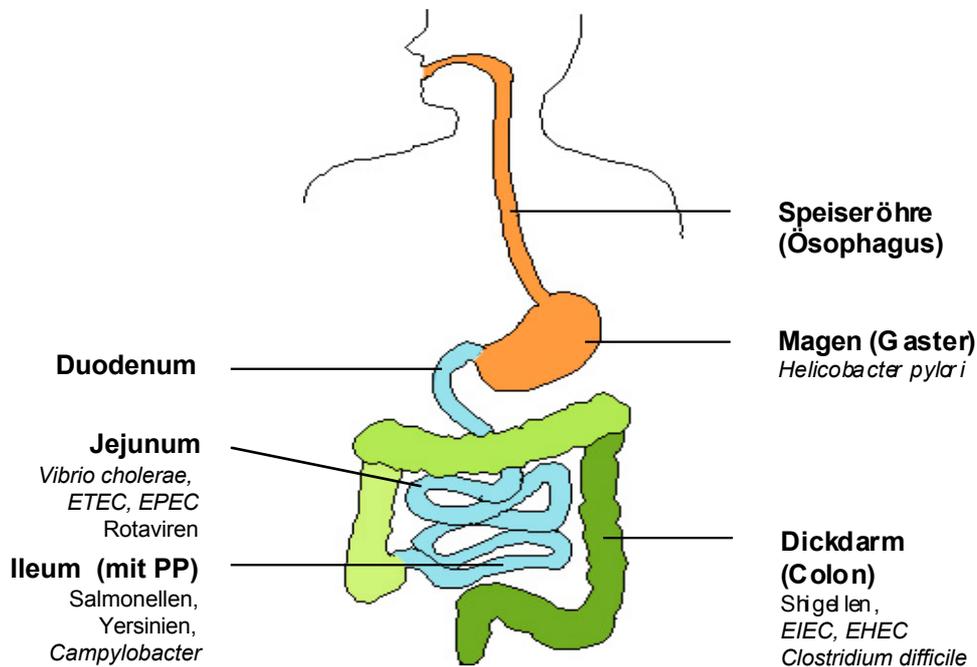


Abb. 2.3 Hauptwirkungsorte von Infektionserregern des Gastrointestinaltraktes.
Peyer'sche Plaques (PP) findet man besonders häufig im unteren Dünndarmabschnitt (Ileum).

Der erste und entscheidende Schritt in der Pathogenese der meisten Infektionen des Gastrointestinaltraktes ist die Adhärenz der Bakterien an die Mukosa des Wirtes (Finlay & Caparon, 2000). Die Anheftung an die Epithelzellen des Darms erlaubt den Bakterien, sich gegen die Ausscheidung zu widersetzen und sich zudem gegenüber den residenten Mikroorganismen durchzusetzen (Finlay & Falkow, 1989; Finlay & Caparon, 2000). Eine erfolgreiche Kolonisierung des Darmepithels kann anschließend zur Infektion führen, bei der es unter anderem durch die Sekretion spezieller Virulenzproteine, Invasion oder Ausschüttung von Toxinen zur Induktion der typischen Symptome einer Infektionskrankheit kommt (Mann & Petri, 1995; Klemm & Schembri, 2000).

2.2.3 „Besiedlung und Infektion“ mit *Escherichia coli*-Stämmen

Escherichia coli stellt etwa 1 % der typischen Darmflora des Menschen. Dieses Gram-negative, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Bakterium, das durch seine peritriche Begeißelung sehr beweglich ist (Claus & Berkeley, 1986), besiedelt bereits wenige Stunden

nach der Geburt den menschlichen Darm (Drasar und Hill, 1974; Levine, 1985). *E. coli* tritt in einer großen Anzahl unterschiedlicher Stammvarianten auf. So gibt es neben apathogenen Darmbewohnern auch eine große Zahl pathogener *E. coli*-Stämme, die Infektionen hervorrufen können. Die durch pathogene *E. coli* ausgelösten Infektionen können dabei auf mukosale Oberflächen beschränkt sein oder sich im gesamten Körper ausbreiten. So können durch *E. coli* neben Darm- und Durchfallserkrankungen auch Harnwegsinfektionen, Sepsis und Meningitis hervorgerufen werden (Nataro & Kaper, 1998).

Zur Typisierung darmpathogener *Escherichia coli* verwendet man bis heute eine modifizierte Form des von Kauffmann entwickelten Schemas zur serologischen Klassifizierung (Kauffmann, 1947). Bakterienstämme können aufgrund ihrer Oberflächenantigene (O-Antigene; Polysaccharid-Seitenketten der spezifischen Lipopolysaccharide der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien), ihrer Geißel-Antigene (H-Antigene; Proteine), ihrer Kapsel-Antigene (K-Antigene; polymere Kohlenhydratstrukturen auf der bakteriellen Oberfläche) sowie ihrer fimbriellen Antigen (F-Antigene; Proteine) serotypisiert werden (Edwards & Ewing, 1972; Lior, 1976; Ørskov *et al.*, 1982). Während das O-Antigen die Serogruppe eines Isolates bestimmt, wird der Serotyp durch eine bestimmte Kombination von O- und H-Antigenen festgelegt.

2.2.4 Darmpathogene *E. coli* Stämme

Da die Serotypisierung nur begrenzt spezifisch ist, konzentriert sich die Bestimmung darmpathogener *E. coli*-Stämme auch zunehmend auf die Identifizierung von Virulenzfaktoren, wie den Adhärenzphänotyp, die Mechanismen zur Produktion von Toxinen, die Fähigkeit zur Invasion und nachfolgende Prozesse in der Wirtszelle. So werden die darmpathogenen *E. coli* basierend auf dieser Virotypisierung in die sechs Kategorien der enterotoxigenen (ETEC), enteroinvasiven (EIEC), enteropathogenen (EPEC), enteroaggregativen (EAEC), enterohämorrhagischen (EHEC) und diffus-adhärierenden *E. coli* (DAEC) eingeteilt (Nataro & Kaper, 1998).

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung einer Gruppe von atypischen EPEC-Stämmen, den DA-EPEC (diffus-adhärierende EPEC), die sowohl Eigenschaften der EPEC als auch der DAEC aufweisen. Aus diesem Grund wird im Folgenden ausschließlich näher auf die beiden Kategorien der EPEC und DAEC eingegangen.

2.2.4.1 Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC)

EPEC treten als Hauptursache für persistierende Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern vor allem in Entwicklungsländern auf (Donnenberg, 1995). Wie Studien in Mittel- und Südamerika zeigten, sind etwa 30-40 % der Durchfallerkrankungen von Kleinkindern mit EPEC assoziiert (Cravioto *et al.*, 1988; Cravioto *et al.*, 1990; Toledo *et al.*, 1983; Gomes *et al.*, 1991). Auch Darmerkrankungen von Kaninchen und jungen Hunden werden mit dem Auftreten von EPEC in Verbindung gebracht (Beutin *et al.*, 1999; Milon, 1999).

Charakteristisch für die Gruppe der EPEC ist das Fehlen von Enterotoxinen (ST, LT Stx), die Induktion der „Attaching & Effacing“ (A/E)-Läsionen sowie der Besitz des EAF-Plasmids („EPEC adherence factor“) und die Expression der darauf kodierten „bundle forming pili“ (BFP).

2.2.4.1.1 Virulenzeigenschaften der EPEC

„Attaching & Effacing“ (A/E)-Histopathologie

Wie in intestinale Biopsiematerial von Patienten, in infizierten Tieren und in Zellkultursystemen beobachtet werden konnte, induzieren Infektion mit EPEC die Bildung von „Attaching & Effacing“-Läsionen in der Wirtszelle. Dieser A/E-Phänotyp läßt sich durch den Verlust von Mikrovilli auf den infizierten Epithelzellen und durch einen sehr engen Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle charakterisieren (Finlay *et al.*, 1992; Goosney *et al.*, 2000). Der enge Kontakt führt zu umfangreichen Veränderungen des Zytoskeletts, die unter anderem durch die Akkumulation von filamentösem Aktin direkt unterhalb adhätierender Bakterien gekennzeichnet sind (Knutton *et al.*, 1989). Darüberhinaus verursachen die Bakterien die Bildung von bis zu 10 µm langen, sockelförmigen Ausstülpungen der Zytoplasmamembran der Epithelzelle, die als „Pedestals“ bezeichnet werden (Moon *et al.*, 1983; Rosenshine *et al.*, 1996). In den „Pedestals“ werden neben F-Aktin auch noch weitere Zytoskelettkomponenten, wie z.B. □-Actinin, Talin, Ezrin, Plastin, die leichte Kette des Myosins akkumuliert (Finlay *et al.*, 1992; Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1992; Sanger *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, daß an der Spitze der „Pedestals“ unterhalb der Zytoplasmamembran Proteine lokalisiert sind, die spezifisch Tyrosin-phosphoryliert sind (Rosenshine *et al.*, 1992; Kenny & Finlay, 1997).

Das „Drei-Stufen-Modell“ der EPEC-Infektion

Die Ausbildung der A/E-Histopathologie erfolgt in drei Schritten: (I) der initialen Adhärenz, (II) der Induktion von Signaltransduktion in der Wirtszelle und (III) der Ausbildung eines sehr engen Kontaktes („intimate attachment“) zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle (s. Abb. 2.5) (Donnenberg & Kaper, 1997; DeVinney *et al.*, 1999).

(I) Initiale Adhärenz: Im ersten Schritt adhären die EPEC vermittelt durch ihre „bundle forming pili“ (BFP) lokal und in Mikrokolonien an die Zielzellen (Baldini *et al.*, 1983). Die von dem 60 MDa großen EAF-Plasmid kodierte BFP sind im Durchmesser 7 nm große, flexible Fimbrien, die unter speziellen Kulturbedingungen gebildet werden und bündelartig miteinander aggregieren (Giron *et al.*, 1991). Die Bedeutung des EAF-Plasmids für die EPEC-induzierte Diarrhöe liegt in der Ausbildung der vollen Virulenz, die nur bei Vorhandensein dieses Plasmids zu beobachten ist.

Die vierzehn Gene, die für die BFP kodieren, sind in einem Operon organisiert und unterliegen der Kontrolle des ebenfalls EAF-kodierten Regulators PerA („plasmid encoded regulator“), der auch als BfpT bezeichnet wird (Gómez-Duarte & Kaper, 1995; Kenny & Finlay, 1995; Tobe *et al.*, 1996). PerA zählt zu den transkriptionellen Regulatoren der AraC-Familie, die eine Rolle bei der Regulation metabolischer Prozesse sowie bei der Expression von Virulenzproteinen in verschiedenen Gram-negativen Bakterien spielen (Gallegos *et al.*, 1993).

(II) Induktion von Signaltransduktionswegen: Die Adhärenz der Bakterien an die Wirtszelle induziert in der eukaryotischen Zelle eine Reihe von Signaltransduktionswegen. So führt die Aktivierung der Phospholipase C_q1 in den Epithelzellen zur Freisetzung von Inositolphosphaten und damit zum Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (Baldwin *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1993; Kenny & Finlay, 1997). Aufgrund der veränderten Kalziumkonzentration kommt es anschließend vermutlich über Ca²⁺-abhängige Regulatorproteine zu einer Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts sowie zum Verlust der Mikrovilli der Epithelzellen (Baldwin *et al.*, 1991).

Die Bindung von EPEC an die Wirtszelle induziert außerdem eine Phosphorylierung von Tyrosin- und Serinresten von Proteinen (Rosenshine *et al.*, 1992; Kenny & Finlay, 1997). Unter anderem wird der Typ III-sezernierte und in die Wirtszellmembran translozierte Intimin-Rezeptor Tir („translocated intimin receptor“), der eine entscheidende Rolle bei der Herstellung eines engen Kontaktes zwischen Bakterium und Wirtszelle spielt, spezifisch Tyrosin-phosphoryliert (Kenny *et al.*, 1997). Darüberhinaus werden die Proteinkinase C (PKC) sowie die MLCK (Myosin Light Chain Kinase) aktiviert (Baldwin *et al.*, 1991;

Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996; Crane & Oh, 1997). Während die Aktivierung der PKC *in vivo* und *in vitro* zu einer Veränderung der intestinalen Sekretion von Wasser und Elektrolyten führt (Rao *et al.*, 1990), erhöht die aktivierte MLCK die Durchlässigkeit der „tight junctions“ der infizierten Zellen (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996).

(III) „Intimate Attachment“: Der enge Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle („Intimate Attachment“) wird durch das auf dem LEE-kodierte 94-97 kDa große äußere Membranprotein Intimin (*eaeA*, *E. coli* attaching and effacing) vermittelt (Jerse *et al.*, 1990). Es wurde gezeigt, daß *eaeA*-Mutanten, die keinen engen Kontakt zur Zielzelle ausbilden können, dennoch in der Lage sind, Signaltransduktionswege in der Zielzelle zu induzieren (Rosenshine *et al.*, 1992; Savcovic *et al.*, 1996). Für die Ausbildung der vollen Virulenz der EPEC ist das Intimin sowie der enge Kontakt zur Zielzelle jedoch notwendig (Donnenberg *et al.*, 1993).

Der Rezeptor für Intimin ist Tir, ein bakterielles und ebenfalls LEE-kodiertes Protein. Nach der initialen Adhärenz der Bakterien wird Tir in die Membran der Wirtszelle integriert, wo es nach einer Tyrosin-spezifischen Phosphorylierung den Rezeptor für Intimin bildet (s. Abb. 2.6) (Kenny *et al.*, 1997). Der Mechanismus der Tir-Integration ist bislang ungeklärt, man vermutet aber eine Beteiligung weiterer sezernierter Effektorproteine der EPEC (Esp) (Kenny *et al.*, 1997).

Tir weist vermutlich eine haarnadelartige Struktur auf und ist so in die Membran inseriert, daß beide Enden des Proteins ins Zytosol der Wirtszelle ragen (s. Abb. 2.6) (DeVinney *et al.*, 1999; Hartland *et al.*, 1999; Donnenberg & Whittam, 2001). Die Bindung von Intimin an das in die Wirtszellmembran integrierte Tir induziert schließlich die Akkumulation von F-Aktin und damit die Bildung der „Pedestals“.

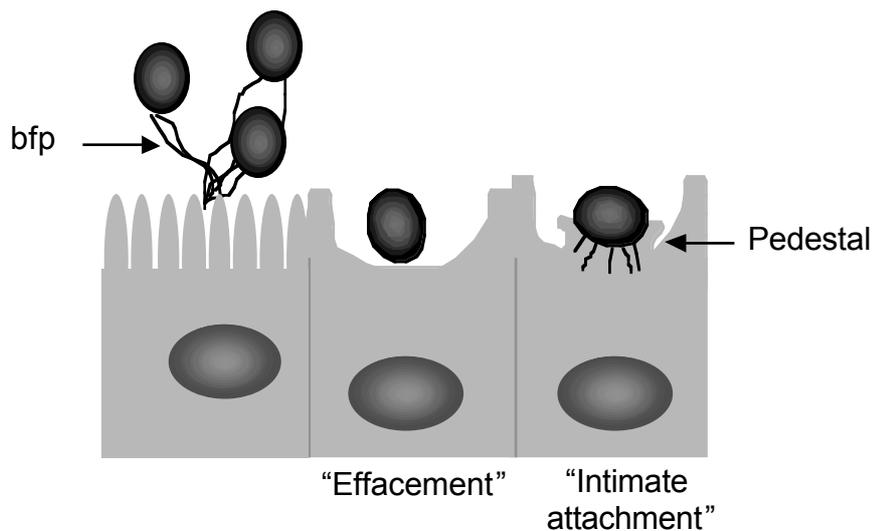


Abb. 2.5 Das „Drei-Stufen-Modell“ der EPEC-Pathogenese

Sezernierte Proteine

EPEC besitzen ein als Typ III bezeichnetes Sekretionssystem, das Homologien zu den Sekretionssystemen einer Reihe von human-, tier und auch pflanzenpathogenen Bakterienarten aufweist (Van Gijsegem *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1995). Die Typ III-Sekretionssysteme sind für die Sekretion und Translokation von Virulenzfaktoren, wie der Yop-Proteine aus *Yersinia* (Straley *et al.*, 1993), der Ipa-Proteine aus *Shigella* (Menard *et al.*, 1996) und der Sip-Proteine aus *Salmonella* (Galan, 1996; Mecsas & Strauss, 1996) verantwortlich.

EPEC sezernieren während einer Infektion und auch bei Wachstum in Zellkulturmedium als Esp („*E. coli* secreted proteins“) bezeichnete Virulenzproteine in den Kulturüberstand (Jarvis *et al.*, 1995; Kenny & Finlay, 1995). Bisher wurden die sechs Typ III sezernierten Proteine EspA, EspB, EspD, EspF, Orf19 (Map) und Tir identifiziert (Kenny *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1998; Deibel *et al.*, 1998; McNamara & Donnenberg, 1998; Wolff *et al.*, 1998; Kenny & Jepson, 2000). Kodiert wird das Typ III-Sekretionssystem der EPEC von den auf der LEE-Pathogenitätsinsel lokalisierten *sep*- („secretion of EPEC proteins“) und *esc*-Genen („EPEC secretion“).

Es wird postuliert, daß die translozierten Proteine EspB und EspD aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den porenbildenden Proteinen YopB und YopD des Typ III-Sekretionssystems von *Yersinia* an der Bildung einer Translokationspore in der Wirtszellmembran beteiligt sind (s. Abb. 2.6). Beide Proteine konnten nach einer EPEC-Infektion in der Wirtszellmembran

detektiert werden (Wolff *et al.*, 1998; Wachter *et al.*, 1999; Kresse *et al.*, 1999). EspB findet sich darüber hinaus auch im Zytosol der Wirtszelle (Wolff *et al.*, 1998), wo es möglicherweise unter anderem eine Rolle bei der Induktion von Signaltransduktionsprozessen spielt. Neben EspB und EspD ist auch EspA an der Bildung der Translokationspore beteiligt und formt einen filamentartigen Translokationskanal zwischen der Bakterien- und der Wirtszellmembran (Knutton *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2001).

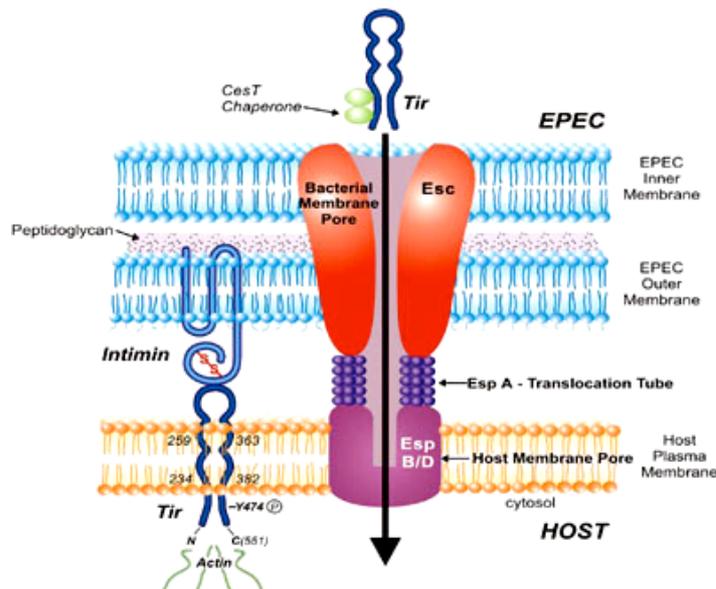


Abb. 2.6 Modell des Typ III-Translokationsapparates des EPEC-Stammes E2348/69.

Die LEE-kodierte Esc-Komponente durchspannt beide Membranen des Bakteriums. Sezerniertes EspA bildet einen Kanal, durch den Effektorproteine in die eukaryotische Zelle transloziert werden. Die translozierten Proteine EspB und EspD sind vermutlich am Aufbau einer Pore in der Wirtszellmembran beteiligt. Das sezernierte Tir wird in die Membran der Zielzelle inseriert, wo es nach einer Phosphorylierung das bakterielle, äußere Membranprotein Intimin bindet (ASM News, 2002).

Der „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE)

Der „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) ist eine Pathogenitätsinsel, die zum ersten Mal im EPEC Stamm E2348/69 beschrieben wurde (s. Abb. 2.7)(McDaniel *et al.*, 1995). DNA-Sequenzen mit Homologien zum LEE wurden auch in anderen A/E-Läsionen hervorrufenden *Enterobacteriaceae* gefunden, dazu zählen EHEC, der kaninchenpathogene RDEC-1, *Citrobacter rodentium* und Diarrhö-verursachende *Hafnia alvei*-Stämme (Donnenberg, *et al.*, 1997). Der LEE kommt weder in der physiologischen Darmflora noch im *E. coli* K12-Stamm vor.

Durch Transfer dieser Pathogenitätsinsel auf einen *E. coli* K12-Stamm läßt sich die Fähigkeit zur Induktion des A/E-Phänotyps übertragen (McDaniel & Kaper, 1997). Darüberhinaus verhindern Mutationen in einem der LEE-kodierten Gene (mit Ausnahme von *espF*) die Ausbildung von A/E-Läsionen (McNamara & Donnenberg, 1998; Nataro & Kaper, 1998). Im Gegensatz dazu ist der *E. coli* K12-Stamm nach Übertragung des LEE des EHEC-Stammes O157:H7, der die gleichen Gene in identischer Reihenfolge und Orientierung enthält wie der LEE des EPEC-Stammes E2348/69, nicht in der Lage, bei Infektion von Wirtszellen A/E-Läsionen auszulösen (Elliott *et al.*, 1999).

2.2.4.2 Diffus-adhärierende *Escherichia coli* (DAEC)

Die Kategorie der DAEC wurde ursprünglich noch als Klasse II-EPEC bezeichnet. Mittlerweile gelten die DAEC als unabhängige Kategorie darmpathogener *E. coli*, die sich aufgrund ihres deutlich unterscheidbaren diffusen Adhärenzverhaltens (DA, diffuse Adhärenz) deutlich von den lokal adhärierenden, sog. Klasse I-EPEC unterscheiden lassen (Levine, 1987, Nataro & Kaper, 1998). Die Pathogenität der DAEC war lange umstritten. Ein Grund dafür ist vermutlich die altersbedingte Anfälligkeit für DAEC-Infektionen und die große Heterogenität der die diffuse Adhärenz zeigenden *E. coli*-Stämme. So zeigte eine Untersuchung in Chile, daß das Risiko einer durch DAEC hervorgerufenen Durchfallerkrankung bei Kindern im Alter von 1-5 Jahren erhöht ist (Levine *et al.*, 1993).

Die DAEC stellen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Serotypen und ihres Plasmidgehaltes eine sehr heterogene Gruppe dar, die vermutlich sowohl pathogene aber auch apathogene Bacterienstämme umfaßt. Die pathogenen Eigenschaften der DAEC sind nur wenig untersucht. Bislang sind vier Adhäsine beschrieben, die die diffuse Adhärenz von DAEC an Wirtszellen vermitteln. Aus dem DAEC-Stamm 2787 wurde AIDA-I („adhesin involved in diffuse adherence“ I) isoliert, ein plasmid-kodiertes, afimbrielles Adhäsins mit einer molaren Masse von 100 kDa, das in der äußeren Membran lokalisiert ist (Benz & Schmidt, 1989, 1992a, 1992b) und zur Proteinfamilie der Autotransporter gezählt wird (Jose *et al.*, 1995). Ein weiteres afimbrielles Adhäsins, das F1845, wurde aus dem DAEC-Stamm C1845 isoliert (Bilge *et al.*, 1989). F1845 gehört zur Familie der Dr-Adhäsine und bindet an einen als „decay-accelerating factor“ (DAF, CD55) bezeichneten zellulären Rezeptor (Nowicki *et al.*, 1990; Bernet-Camard *et al.*, 1996). Zur Detektion von DAEC dienen zum einen die *aida-I*-DNA-Sonde als auch die auf dem Nachweis des F1845 Adhäsins basierende *daaC*-DNA-Sonde (Benz & Schmidt, 1989; Bilge *et al.*, 1993). *daaC* kodiert für ein Protein, das für die

Expression der F1845 Fimbrien notwendig ist. Etwa 75 % der weltweit getesteten DAEC-Stämme reagieren auf diese Sonde positiv (Nataro & Kaper, 1998).

Bei den zwei weiteren mit diffuser Adhärenz assoziierten Adhäsinen handelt es sich um CF16K, ein 16 kDa großes Protein, sowie um ein aus einem F1845-negativen Stamm isoliertes, 57 kDa großes Adhäsins, das neben dem diffusen Adhärenzphänotyp auch eine Hämagglutination vermittelt (Yamamoto *et al.*, 1996).

Einige diffus-adhärierende *E. coli*-Stämme induzieren wie auch die EPEC-Stämme A/E-Läsionen in Wirtszellen. Es konnte gezeigt werden, daß diese Stämme ebenfalls den LEE als Pathogenitätsinsel besitzen und darüberhinaus die Proteine EspA, EspB, EspD und Tir Typ III-abhängig sezernieren. Aufgrund ihres diffusen Adhärenzphänotyps, des Fehlens des EAF-Plasmids und der BFP werden diese LEE-positiven und A/E-Läsionen verursachenden Bakterienstämme auch als atypische EPEC oder DA-EPEC (diffus-adhärierende enteropathogene *E. coli*) bezeichnet (Beinke *et al.*, 1998).

2.3 Zielsetzung

Aufgrund eines fehlenden *in vitro*-Modells ist die genaue Untersuchung und Charakterisierung von M-Zellen bislang auf morphologische Studien beschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher ein M-Zell-Modell etabliert werden, daß eine Analyse des Aufbaus und der Funktion dieser speziellen Epithelzellen sowie ihrer Interaktion mit enteropathogenen Bakterien, wie Yersinien, EPEC und DA-EPEC ermöglicht.

In einem zweiten Projekt soll der für die Pathogenität der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 essentielle „Locus of Enterocyte Effacement“ durch eine Sequenz- und Funktionsanalyse detailliert beschrieben und charakterisiert werden. Vergleiche der Sequenzen des LEE der DA-EPEC-Stämme mit den bereits für andere Diarrhö-assoziierte enteropathogene Bakterien beschriebenen LEE-Pathogenitätsinseln sollen weitere Erkenntnisse über die Homologie der LEE in Bezug auf den Aufbau, die Organisation, kodierte Virulenzfaktoren und den Insertionsort in das bakterielle Chromosom liefern.

3 Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Autoklav	Vaculab S 3000, MMM GmbH (München, BRD)
Blottingkammer	Eigenbau, ZMBH (Heidelberg, BRD)
Brutschränke	Biocenter 2001, Integra Biosciences (Fernwald, BRD)
Einmalspritzen	Braun Diessel Biotech (Melsungen, BRD)
Elektrophoresekammern	
Agarosegele	Eigenbau, ZMBH (Heidelberg, BRD)
SDS-PAGE	Hofer Scientific Instruments über Pharmacia (Freiburg, BRD)
Elektroporator Equibio	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, BRD)
Filterpapier	Schleicher und Schuell (Dassel, BRD)
Gelgießkammer	Multiple Gel Caster, Hofer Scientific Instr. über Pharmacia (Freiburg, BRD)
Küvetten	Sarstedt (Nürnbrecht, BRD)
Kippschüttler Duomax 1030	Heidolph (Nürnberg, BRD)
Kryoröhrchen	Nunc Inc. Naperville (Wiesbaden, BRD)
Luftschüttler Certomat R	Braun Diessel Biotech (Melsungen, BRD)
Magnetrührer	Bender und Hobein (Heidelberg, BRD)
Mikroskope	Confokales Laserscanning Mikroskop, Leica Inversmikroskop Axiovert 100 Carl Zeiss (Oberkochen, BRD) Elektronenmikroskop TEM 401, Phillips (Eindhoven, NL) Photomikroskop Axiophot Carl Zeiss (Oberkochen, BRD)
Netzgeräte	Pharmacia (Freiburg, BRD)
Nitrozellulosemembran	Porengröße 0,2 μ m, Schleicher und Schuell (Dassel, BRD)
PCR-Block	PCR Sprint, Hybaid (UK)
pH-Meter	Beckman (München, BRD)
Röntgenfilm	Hyperfilm TM ECL TM , Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD)
SemiDry Blotgerät	BioRad (München, BRD)
Spektralphotometer DU 600	Beckman (München, BRD)
Sterilbänke	Integra Biosciences, Tecnoflow (Fernwald, BRD)
Sterilfilter	Schleicher und Schuell (Dassel, BRD)
UV-Stratalinker	Modell 2400, Stratagene (Heidelberg, BRD)
UV-Transilluminator	Modell TFX 20M, 312 nm, Intas (Göttingen, BRD)

Vakuumkonzentrator	Bachhofer (Reutlingen, BRD)
Zentrifugen	Beckman J2-MI mit Rotoren JA 10, JA 14, JA 20 (München, BRD) Eppendorf Kühlzentrifuge Modell 5403 Eppendorf (Hamburg, BRD) Heraeus Sepatech Varifuge 3.OR mit Ausschwingrotor (Hanau, BRD)

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in analytischen Reinheitsgraden bezogen. Die Bezugsquelle ergibt sich aus der zugehörigen Nummer des Herstellers.

Herstellernachweis:

(1) Baker (Deventer, NL), (2) Biochrom (Berlin, BRD), (3) Biomol (Hamburg, BRD), (4) Bio-Rad (München, BRD), (5) Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD), (6) Difco (Augsburg, BRD), (7) Fluka (Neu-Ulm, BRD), (8) Glücksklee (München, BRD), (9) Merck (Darmstadt, BRD), (10) PAA Laboratories GmbH (Linz, A), (11) Pharmacia LKB (Freiburg, BRD), (12) Riedel de Haën (Hannover, BRD), (13) Roth GmbH & Co. (Karlsruhe, BRD), (14) Serva (Heidelberg, BRD), (15) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD).

Aceton (13)	Hefe-Extrakt (6)
Acrylamid (11)	HEPES (Hydroxyethylperazinethansulfonsäure) (7)
Agarose (15)	Isopropanol (7)
Ampicillin (15)	Kaliumacetat (9)
APS (Ammoniumpersulfat) (4)	Kaliumchlorid (9)
Bacto-Agar (6)	Kaliumdihydrogenphosphat (15)
BCIP (5-Bromo,4,chloro,3,indolylphosphat Dinatriumsalz (3)	Leupeptin
Bisacrylamid (11)	Magermilchpulver (8)
Bromphenolblau (15)	Magnesiumchlorid (9)
BSA (14)	Maleinsäure (9)
Calciumchlorid (9)	Natriumchlorid (13)
Chloroform (13)	Natriumfluorid (15)
Dikaliumhydrogenphosphat (15)	Natriumhydrogenphosphat-Monophosphat (9)
DMF (Dimethylformamid) (7)	

DTT (Dithiothreitol) (15)	Natriumhydroxid (9)
DMSO (Dimethylsulfoxid) (13)	NBT (4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) (13)
EDTA Dinatriumsalz (Ethylendiamin-tetraacetat) (13)	N-Laurosylsarkosin (7)
Eponharz (15)	Osmiumtetroxid (15)
Essigsäure (13)	Paraformaldehyd (9)
Ethanol, absolut (1)	PefablocSC [□] (5)
Ethidiumbromid (15)	Phenol (13)
Glukose (9)	Salzsäure (13)
Glutaraldehyd (25%) (15)	SDS (15)
Glycerin (13)	Standard I (9)
Harnstoff (13)	TEMED (N,N,N',N'-
Methyl- α -D-Mannosid (15)	Tetramethylethylendiamin) (4)
2-Mercaptoethanol (13)	Trichloressigsäure (7)
Methanol (12)	Triton X-100 (15)
N,N, Methylenebisacrylamid (11)	Trypton (6)
Natriumacetat (14)	Tween-20 (10)
Natriumcarbonat (2)	X- Gal (3)

3.3 Reagentiensysteme

Reagentiensystem	Hersteller
ECL Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD)
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Biochemicals (Mannheim, BRD)
Large Construct Kit	QIAGEN (Hilden, BRD)
Plasmid Mini Kit	QIAGEN (Hilden, BRD)
Plasmid Mini Kit SPIN	QIAGEN (Hilden, BRD)
Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden, BRD)
QIAquick DNA Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, BRD)

3.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	New England Biolabs (Schwalbach, BRD)

Collagenase XI (aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
Dispase I (aus <i>Bacillus ppolymyxa</i>)	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD)
Lysozym	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD)
Pronase	10 mg/ ml in <i>Aqua bidest.</i> , Lagerung bei -20°C ; vor Gebrauch 1 h bei 37°C vorverdauen
Proteinase K	20 μg / ml in <i>Aqua bidest.</i> , Lagerung bei -20°C , Arbeitskonzentration: 2 μg /ml; Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD)
Restriktionsendonukleasen	MBI (St. Leon-Roth, BRD); New England Biolabs (Schwalbach, BRD)
RNase A	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD)
T4 DNA-Ligase	MBI (St. Leon-Roth, BRD)
Taq DNA-Polymerase	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD)

3.5 Größenstandards

Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel durch Vergleich mit folgenden DNA-Längenstandards.

Tab. 3.1 Verwendete DNA-Längenstandards

Bezeichnung	Hersteller	Fragmentgrößen (bp)
Mass Ruler TM High Range	MBI (St. Leon-Roth, BRD)	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500,
Mass Ruler TM Low Range	MBI (St. Leon-Roth, BRD)	1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80
pUC Mix Marker 8	MBI (St. Leon-Roth, BRD)	1.116, 883, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34 (2x), 26, 19
λ -DNA StyI- verdaut	MBI (St. Leon-Roth, BRD)	23.583, 19.329, 7.743, 6.223, 4.254, 3.472, 2.690, 1.822, 1.489, 925, 421, 74
Gene Ruler TM 1 kb ladder	MBI (St. Leon-Roth, BRD)	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250

Caco-2-Kulturmedium

Fötale Kälberserum (Hyclone)	50 ml (10 %)
Penicillin/ Streptomycin (100 x)	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	10 ml (4 mM)
Humanes Transferrin (1 mg/ ml)	0,5 ml (10 µg/ ml)
Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot (high glucose: 4,5 g Glucose/ ml)	ad 500 ml

HeLa-Kulturmedium

FCS (PAA)	50 ml (10 %)
Penicillin/ Streptomycin (100 x)	5 ml
L-Glutamin	2,5 ml (1 mM)
Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot (low Glucose: 1 g Glucose/ ml)	ad 500 ml

HeLa-Infektionsmedium

FCS	2 ml (2 %)
L-Glutamin	0,5 ml (1 mM)
Methyl- α -D-Mannosid	1 ml (1 %)
HEPES	10 mM

Mediumzusätze und Lösungen für die Zellkultur

Accutase	Gebrauchsfertige Lösung (PAA)
Collagen (aus Rattenschwanz)	100 µl Collagen ad 10 ml essigsaurem Puffer (Sigma)
Dexamethason	20 µg/ ml Stammlösung in <i>Aqua bidest.</i> (Sigma)
ECM	Gemisch aus Proteinen der extrazellulären Matrix (TEBU, BRD)
FCS	Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert und mykoplasmenfrei; Lagerung bei -20°C (PAA)
FCS	Definiertes Fötale Kälberserum, mit Eisen supplementiert, hitzeinaktiviert und mykoplasmenfrei; Lagerung bei -20°C (HyClone, #SH30070.03)
Fibronectin	50 µg/ ml Stammlösung in <i>Aqua bidest.</i> (Sigma)
Glukose-Lösung	20 g Glukose ad 100 ml PBS; sterilfiltriert
ITS-Premix	Mediumzusatz mit 5 mg/ ml Insulin, 5 mg/ml Transferrin und 5 µg/ml Selensäure (Sigma)
Laminin	Stammlösung 50 µg/ml in <i>Aqua bidest.</i>
L-Glutamin	200 mM (29,3mg/ml in PBS), Lagerung bei -20 °C (PAA)
Transferrin (human)	10 mg/ml in DMEM (Sigma)
Triiodothyronin	1 mg in 1 ml 1M NaOH lösen; ad 50 ml DMEM (Sigma)
Trypsin/EDTA- Lösung (10x)	0,5/0,2 % (w/v) in 10-fach PBS (PAA)
Trypsininhibitor (Sojabohne)	10 mg/ml in <i>Aqua bidest.</i> (Sigma)

Dem gebrauchsfertigen DMEM wurden die sterilfiltrierten (Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße) Zusätze zugegeben. Die Hälfte der ursprünglich zugesetzten Menge an L-Glutamin wurde alle 14 Tage erneut zugesetzt, um die Konzentration an dem schnell zerfallenden Glutamin aufrecht zu erhalten.

3.8 Lösungen

Ammoniumchlorid- Lösung	670 µl NH ₃ (25 % ig) ad 100 ml PBS, pH 7,3
BCIP	50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid, Lagerung bei -20 °C
BSA	5 mg/ ml in PBS, Lagerung bei -20°C
EDTA- Lösung	0,5 M in <i>Aqua dest.</i> , pH 8,0
Ethidiumbromid	10 mg/ ml in <i>Aqua dest.</i> , Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
Glutaraldehyd	25 % (w/v); für Elektronenmikroskopie geeignet, Lagerung bei 4°C
Natriumacetat (NaOAc)	3M
Probenpuffer für	0,25 % Bromphenolblau
Agarosegele	40 % Saccharose
SDS (10 %)	10 g Natriumdodecylsulfat ad 100 ml <i>Aqua dest.</i>
Sorbitol (10 %)	10 g Sorbitol auf 100 ml <i>Aqua bidest.</i>
Triton X-100	10 % (v/v) in <i>Aqua dest.</i> , Lagerung bei 4°C
Trypanblau-Lösung	0,2 g Trypanblau ad 100 ml <i>Aqua bidest.</i> , filtrieren; für Färbung 4: 1 mit NaCl-Lösung verdünnen

3.9 Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Amphotericin B	250 µg/ml in <i>Aqua dest.</i>	25 µg/ml (100 µl/ml)
Ampicillin	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	100 µg/ml (5 µl/ml)
Gentamycin	10 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	100 µg/ml (10 µl/ml)
Kanamycin	10 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	30 µg/ml (3 µl/ml)
Nalidixinsäure	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	100 µg/ml (1 µl/ml)
Neomycin	10 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	5 µg/ml (0,5 µl/ml)
Penicillin/Streptomycin	100-fache Lösung mit 10.000 units/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin	1x konzentriert

3.10 Puffer

D-PBS (10 fach)	80 g NaCl 2g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
D-PBS mit Mg ²⁺ , Ca ²⁺	D-PBS (einfach) 0,9 mM MgCl ₂ 0,5 mM CaCl ₂ ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
Essigsaurer Puffer	60 µl Essigsäure ad 50 ml <i>Aqua dest.</i>
HEPES	100 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 0,05 % NaN ₃ , 0,1 mM CaCl ₂ ad 100 ml <i>Aqua dest.</i>

TBS (10-fach), pH 7,4	121,14 g Tris-Base 90 g NaCl ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
TAE (50-fach)	242 g Tris-Base, 51,1 ml Essigsäure, 37,2g Na ₂ -EDTA ad 1 l <i>Aqua dest.</i> , pH 8,3
TBE (10-fach)	109g Tris- Base (0,9 M), 55,65 g Borsäure (0,9 M), 40 µl 0,5 M EDTA-Lösung (0,02 M) ad 1 l <i>Aqua dest.</i> , pH 8,3
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
Tris-HCl (1M)	157,6 g Tris-Base ad 100 ml <i>Aqua dest.</i> ; mit HCl auf gewünschten pH einstellen

Weitere Puffer sind unter den jeweiligen Kapiteln im Methodenteil aufgeführt.

3.11 Versuchstiere

Für die Isolierung intestinaler Epithelzellen wurden Balb/c Mäuse verwendet. Die neonatelen Mäuse (4-8 Tage alt) wurden mit Amme geliefert und von dieser gesäugt. Für die Isolierung von Lymphozyten aus Peyerschen Plaques wurden adulte Mäuse verwendet. Die Mäuse erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Alle Tiere wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, BRD) geliefert. Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für Dermatologie des Universitätsklinikums Münster gehalten.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Betäubung mit Methofan durch cervikale Dislokation.

3.12 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Merkmale und Herkunft
Caco-2	Humane Epithelzelllinie isoliert aus einem Adenokarzinom des Kolon; die Zellen besitzen die Fähigkeit, sich in Kultur zur Enterozyten zu differenzieren; Subklon BBe2; ATCC Verwendte Passagen 39-50
HeLa	Humane epithelzellartige Zelllinie isoliert aus einem Cervixkarzinom (Gey, 1952); (ATCC CCL-2) Verwendete Passage 12-24

3.13 Bakterienstämme

Tab. 3.4 Verwendete pathogene und probiotische Bakterien

Stamm	Serotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Nissle 1917	O6:K5:H1	Mutaflor [®] , Ardeypharm GmbH, Herdecke, BRD

EPEC E2348/69	O127:H6	Levine <i>et al.</i> , 1978
DA-EPEC 3431	O8:H ⁻	Dr. L.R. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, São Paulo
DA-EPEC 0181	O119:H9:K61	Dr. L.R. Trabulsi; Escola Paulista de Medicina, São Paulo
<i>Yersinia enterocolitica</i> JB580c	O8	Dr. Gerd Heusipp, Institut für Infektiologie, ZMBE, Münster

^a Die DA-EPEC Stämme wurden aus an Durchfall erkrankten Patienten in Deutschland (DA-EPEC B6; Institut für Medizinische Mikrobiologie, Münster) bzw. Brasilien (DA-EPEC 3431; Escola Paulista de Medicina, São Paulo) isoliert.

Tab. 3.3 *E.coli* Laborstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> C600	F ⁻ , thi-1, tri-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44	Appleyard, 1954
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , endA1, hsdR17 (r _K -m _K ⁺), deoR, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, α (lacZYA-argF) U169 (α 80dlacZ α M15)	Hanahan, 1991
<i>E. coli</i> XL1 blue MR	α (mcrA)183 α (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac	Stratagene

3.14 Plasmide, Oligonukleotide und Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, BRD) bezogen.

Tab. 3.5 Verwendete Primer

Primer	Primersequenz [5'—3']	Produkt	T _A
		[bp]	[°C]
EspB3431(+) ^T	TCC CCC GGG ATG AAT ACT ATT GAT AAT AAT	EspB [924]	56
EspB 3431 (-) ^T	TCC CCC GGG TTA CCC GGC TAA GCG ACC CGA		
EspD3431(+) ^T	AAT CTG TTC ACG CTA GGC GGA TCC GCG ATG CTT AAT	espD [1200]	60
EspD3431(-) ^T	TAA ACC AAT TCC CCC GGG GGA TTA AAT TCG ACC ACT		
K 260 ^A	GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT	orf394/ selC [527]	60
K 261 ^A	CCT GCA AAT AAA CAC GGG GCA T		
JG 31	CGTCTGGGCGGGAGATGTTGATAACCATCTT	3431eaeA- espD [3 kb]	64
JG32	CATCTGAAGTAGCCGAAGCAGCATTAGCCC		

K295 ^A	CGC CGA TTT TTC TTA GCC CA	orf394/ <i>LEE</i> [405]	60
K296 ^A	CAT CTC GAA ACA AAC TGG TC		
C6 ^C	GAT ATA TAA GGG ATT AGA AGG GG	<i>LEE/ selC</i>	50
K 260 ^A	GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT	[381]	
C14 ^C	CGA ACT GTT AAC CAC ACT G	<i>LEE/ pheU</i>	53
C23 ^C	CCT ATG AGC AAT CGA AGA AAG G	[2006]	
Ler R1 ^S	GTT AAA TAT TTT TCA GCG GTA	<i>ler</i>	52
Ler F1 ^S	CAT GCG GAG ATT ATT TAT TAT	[390]	
SK1	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	<i>eaeA</i>	52
SK2	CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	[863]	
Tir 19R ^S	CGG AAT TCT TAA ACG AAA CGT ACT GGT	<i>tir</i>	58
Tir 19F ^S	AAG GAT CCA TGC CTA TTG GTA ACC TTG G	[1650]	

^A McDaniel *et al.*, 1995, ^C Christina Beinke, Dissertation, 1999. ^S Silke Michgehl, 2001, ^T Tina Ide, Dissertation, 2002

Tab. 3.6 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Größe	Referenz
SuperCos 1	Cosmid-Vektor	7,9 kb	Stratagene
pEGFP-N3	Klonierungsvektor; EGFP	4,7 kb	Clontech
pSV-7	pBR322; SV 40T-Ag	8,4 kb	Colby & Shenk, 1982

3.15 Antikörper und Antiseren

Tab. 3.7 Primärreagentien (Primärantikörper, Antiseren)

Bezeichnung	Beschreibung	Konzentration	Quelle
□-CD79a	m □ h	1:200	Dako
□-Galektin 9	polyklonal, aus rb	1:50	Dr. Hirashima, Kagawa, Japan
□-EspB	Rb □ m, pk	1:5000 (WB)	Beinke <i>et al.</i> , 1998
□-EspE/□-Tir	mk, aus m Hybridomüberstand der Klone B51 und B348, Immunogen: EspE des STEC Stammes 413/89	1:50-100 (WB) 1:2 (IF)	Dr. Frank Ebel, Universität Giessen (Deibel <i>et al.</i> , 1998)
□-Occludin	mk, rb □ Occludin	1:400	Zymed
□-pan-Keratin	pk, aus Kaninchen	1:200	Dako
□-Phosphotyrosin	mk, aus Maus	1:200	Upstate Biotechnology
□-Sucrase-Isomaltase	mk, aus Maus	1:250	A. Quaroni
□-Vimentin	mk, aus Maus	1:400	Sigma
□-Vinculin	mk, aus Maus	1:200	Dako
□-ZO1	mk, aus Kaninchen	1:400	Dako
Hoechst 33 258		1:1000	Hoechst
Phalloidin-TR		1:100	Molecular Probes

g goat Ziege
h human Mensch
m mouse Maus
rb rabbit Kaninchen

mk Monoklonaler Antikörper
pk Polyklonaler Antikörper
□ anti

Tab. 3.8 Sekundäre Antikörper und Sekundärreagentien

Antikörper	Konjugat	Typ	Konzentration	Quelle
Streptavidin	TRITC		1:400	Sigma
Ziege-□-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	IgG	1:7500 (WB)	Dianova
Ziege-□-Kaninchen	Cy2	IgG	1:800	Dianova
Ziege-□-Maus	Alkalische Phosphatase	IgG	1:7500 (WB)	Dianova
Ziege-□-Maus	Cy2	IgG	1:800 (IF)	Dianova
Ziege-□-Maus	Cy3	IgG	1:800 (IF)	Dianova
Kaninchen-□-Ziege	Alkalische Phosphatase	IgG & IgM	1:7500 (WB)	Sigma

Tab. 3.9 Verwendete Lektine

Bezeichnung	Bindungsspezifität	Konzentration	Quelle
ECA (<i>Erythrina cristagalli</i>)	Gal/GalNAc	20 µg/ml	Molecular Probes
PNA (<i>Arachis hypogaea</i>)	Gal	70 µg/ml	Molecular Probes
SJA	komplex	20 µg/ml	Molecular Probes
UEA-I (<i>Ulex europeaus</i>)	Fuc	20 µg/ml	Molecular Probes
WGA (<i>Triticum vulgare</i>)	GlcNAc, NANA	40 µg/ml	Molecular Probes

Gal= Galaktose; Glc= Glukose; GalNAc= N- Acetylgalaktose; GlcNAc= N- Acetylglukose; Man= Mannose; NANA= N- Acetyl- Neuraminsäure bzw. Sialinsäure

4 Methoden

4.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in Standard I Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einem Aliquot einer Glycerin-Stammkultur angelegt und in einem Haubenschüttler bei 180 rpm über Nacht inkubiert. Für *E. coli*-Kulturen erfolgte die Anzucht bei 37°C, für *Yersinia enterocolitica*-Kulturen bei 26°C. Um in den Plasmid-haltigen Stämmen ein Segregation der Plasmide zu verhindern, wurde dem Medium die zur Selektion notwendige Konzentration des entsprechenden Antibiotikums zugefügt.

Zur kurzfristigen Stammhaltung wurden die Bakterienstämme auf Antibiotikum-haltigen Standard I-Agarplatten ausplattiert, über Nacht im Brutschrank bei 37°C bzw. 26°C inkubiert und anschließend für bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert. Für eine langfristige Stammhaltung wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden 800 µl einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Flüssigkultur mit 400 µl 50 % igem Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert.

4.2 Bestimmung der optischen Dichte

Das Wachstum der Bakterien in Flüssigkultur wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Beckman DU640 Spektralphotometer verfolgt. Für die Messung wurden Einmal-Halbmikroküvetten einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Proben wurden gegen einen Nullwert aus unbeimpftem Medium gemessen.

4.3 Bestimmung der Bakterienzellzahl

Der Bakterientiter einer Flüssigkultur wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 0,02 mm; Fläche des kleinsten Quadrates: 0,0025 mm²) bestimmt. Dazu wurde die Zahl an Bakterien innerhalb von 4 Gruppenquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt und die Bakterienzellzahl nach folgender Formel (VF= Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor = 1,25 x 10⁶) berechnet:

$$\text{Gezählte Bakterien} \times \text{VF} \times 1,25 \times 10^6 / 4 = \text{Bakterien/ ml}$$

Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen an Bakterienkultur wurde zentrifugiert und das Sediment in der zur Einstellung des Titers erforderlichen Menge an Medium resuspendiert.

4.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

4.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Kulturmedien und Waschpuffer wurden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in unterschiedlich großen Kulturschalen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % bzw. 10 % CO₂-Atmosphäre in Zellkultur- Brutschränken. Adhärente Zellen wurden passagiert, wenn die Platten zu 90% bewachsen waren (etwa alle 4 Tage). Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase versetzt. Nach einer einminütigen Inkubation bei RT wurde etwa die Hälfte der Accutase abgesaugt und die Zellen für weitere 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen von der Kulturschale ablösen ließen. Die Zellen wurden mit frischem Medium abgeschwemmt und in gewünschter Dichte neu ausgesät.

4.4.2 Bestimmung des Zelltiters

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Dazu wurden die Zellen aus 5 von 25 Gruppenquadraten mit je 25 Kleinstquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt und mit folgender Formel berechnet (VF: Verdünnungsfaktor; Fläche eines Gruppenquadrates: 0,04 mm²; Kammertiefe: 0,1 mm □ Volumen: 0,004 □l):

$$\text{Ausgezählte Zellen} \times 5 \times \text{VF} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen an Zellen wurde zentrifugiert, und das Sediment in der zur Einstellung des Titers erforderlichen Menge an Medium resuspendiert.

4.4.3 Stammhaltung eukaryotischer Zellen

Zelllinien sollten nicht häufiger als 25 mal umgesetzt werden, da bei einer längerfristigen Kultivierung morphologische und genetische Veränderungen auftreten können. Zur langfristigen Lagerung werden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu werden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, bis sie subkonfluent gewachsen sind. Nach Accutase-Behandlung werden die Zellen mit Einfriermedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt und in speziellen Kryoröhrchen zunächst für 24 h bei -70 °C gelagert, bevor sie langfristig in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden können.

Medium A		Einfriermedium	
DMEM	49 ml	Medium A	37 ml
L-Glutamin	1 ml	FCS	9,25 ml
Transferrin (nur für Caco-2)	50 µl	DMSO	3,75 ml

4.4.4 Vitalitätstest mit Trypanblau

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe einer Färbung mit Trypanblau überprüft, das aufgrund der gestörten Membranintegrität nur von toten Zellen aufgenommen wird. Dazu wurde die Zellsuspension mit der Färbelösung im Verhältnis 1:1 gemischt und unter dem Lichtmikroskop analysiert.

Lösung 1		Lösung 2	
Trypanblau	0,2 g	NaCl	4,25 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 100 ml	<i>Aqua dest.</i>	ad 100 ml

Färbelösung

Für die Färbelösung werden Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 4:1 gemischt

4.4.5 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryoten, die im Zellplasma eukaryotischer Zellen parasitieren. Sie sind eine häufige Kontamination in der Zellkultur. Um eine solche Kontamination mit Mycoplasmen auszuschließen, wurde ein Mycoplasmentest auf PCR- Basis durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen, mit Accutase abgelöst und durch Zentrifugation bei 800 rpm sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl PCR- Puffer aufgenommen, und die Zellen durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation bei 60°C für 1 h aufgeschlossen. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 10 min bei 95°C denaturiert.

Der PCR- Ansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

10 µl	Primermix
2 µl	dNTPs
1 µl	Taq- Polymerase
37 µl	1 x PCR- Puffer
50 µl	Zellaufschluß
<hr/>	
100 µl	Gesamtvolumen

Als Positivkontrolle wurde Mycoplasmen-DNA in der PCR eingesetzt.

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Segment	Temperatur	Dauer	Zyklen
I	90°C	3 min	
II	94°C	0,5 min	30
	T _{Annealing}	0,5 min	
	72°C	1 min	
III	72°C	10 min	

Anschließend wurden 10 µl des PCR- Ansatzes auf einem 1,2 % Agarosegel analysiert. Ein positiver Mycoplasmetest liegt vor, wenn eine Bande mit einem Molekulargewicht von 500-520 bp auftritt.

4.4.6 Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen

4.4.6.1 Isolierung von Epithelzellen aus dem Dünndarm neonataler Mäuse

Für jeden Ansatz der Primärkultur wurden die Dünndärme aus sechs etwa 4-8 Tage alten Mäusen präpariert. Dazu wurden die neonatalen Mäuse zunächst mit Methofan betäubt und durch eine cervikale Dislokation getötet. Nach der Präparation wurden die Dünndärme längs aufgeschnitten und in Waschlösung auf Eis gespült. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Skalpell in etwa 1 mm² große Fragmente geschnitten und nach Zugabe von 20 ml Enzym- Lösung für 10 min bei 22°C auf einem Schüttler verdaut. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde das Gewebe zudem mechanisch dissoziiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Sedimentationsmedium auf 50 ml aufgefüllt und 1 min inkubiert. Der Überstand, der die abgelösten Epithelien enthält, wurde abgenommen und die Sedimentation nach erneutem Auffüllen mit Sedimentationsmedium wiederholt. Der Überstand wurde anschließend bei 300 rpm und 4°C für 3 min zentrifugiert, und das Sediment in 50 ml Zentrifugationsmedium aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 20-30 ml Kulturmedium aufgenommen und auf ECM-beschichteten Kulturschalen ausgesät.

Waschpuffer

10 % ige Glukose-Lösung	20 ml
Amphotericin B (0,25 µg/ml)	10 µl
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 ml
HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	ad 100 ml

Verdau-Lösung

Collagenase XI (2 mg/ml)	0,5 ml
Dispase I (1 mg/ml)	0,4 ml
Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohne; 10 mg/ml)	0,4 ml
BSA-Stammlösung (10 %)	4 ml
HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	ad 20 ml

Sedimentationsmedium

10 % ige Sorbitol-Lösung	20 ml
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 ml
Fötale Kälberserum	5 ml
DMEM (4,5g Glukose/ml)	ad 100 ml

Zentrifugationsmedium

10 % ige Sorbitol-Lösung	20 ml
Penicillin/ Streptomycin (100 x)	1 ml
DMEM (4,5g Glukose/ml)	ad 100 ml

Kulturmedium

Glutamin (200 mM)	1 ml
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 ml
10 % ige Glukose-Lösung	2 ml
Fötale Kälberserum	2 ml
ITS Premix	1 ml
Dexamethason	100 µl
Triiodothyronin	165µl
EGF	50 µl
HEPES	4 ml
DMEM (4,5g Glukose/ml)	ad 100 ml

4.4.6.2 Beschichtung von Wachstumsflächen

Um die Adhärenz der Zellen an die Kulturplatten zu verbessern, wurde die Oberfläche der Platten mit unterschiedlichen Proteinen beschichtet. Als Beschichtungsmaterial wurde Fibronectin, Laminin, Rattenschwanzkollagen sowie ein Gemisch aus extrazellulären Matrixproteinen (ECM; BioHarbor über TEBU, Frankfurt, BRD) verwendet. Diese ECM wurde aus Engelbreth-Holm-Swarm-Tumoren extrahiert und setzt sich laut Herstellerangaben aus Laminin (55 %), Collagen IV (30 %), Ectactin (10 %) und Heparinsulfat-Proteoglykan (5 %) zusammen. Darüberhinaus enthält sie Wachstumsfaktoren wie EGF (0,5-1,3 ng/ml), bFGF (0,1-0,2 pg/ml), NGF (0,2 ng/ml), PGDF (5-48 pg/ml), IGF-1 (11- 24 ng/ml) und TGF (1,7-4,7 ng/ml).

ECM Ein 1 ml-Aliquot ECM wurde auf Eis aufgetaut, kurz abzentrifugiert und mit eiskaltem PBS 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 150 µl/cm² der Lösung in die Kulturplatte pipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Platten vor der Aussaat der Zellen getrocknet.

- Fibronectin** Die Wachstumsflächen wurden mit $125 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer Fibronectin-Lösung ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) benetzt und für 1h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Platte getrocknet.
Die Fibronectin-Lösung kann dreimal verwendet werden.
- Laminin** Die Beschichtung der Wachstumsflächen erfolgte mit $125 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer Laminin-Lösung ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$ in *Aqua dest.*) für 1h bei RT. Der Überstand wurde abgenommen und die Platte getrocknet.
- Kollagen** Das Rattenschwanzkollagen (Collaborative Biomedical Products) wurde 1:10 in Essigsauem Puffer verdünnt. $150 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ der Lösung wurden anschließend auf die Kulturplatten gegeben und für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die Platten einmal mit *Aqua dest.* gewaschen und getrocknet.

4.4.7 Transfektion der Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen

4.4.7.1 Chemische Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur chemischen Transfektion wurden zwei unterschiedliche Systeme, verwendet. Das Prinzip der chemischen Transfektion beruht darauf, daß die DNA durch Bindung an eine chemische Substanz von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden kann und anschließend in der Zelle stabil bleibt. Das zunächst eingesetzte "SuperFect Transfection Reagent" (QIAGEN, Hilden, BRD) besteht aus Dendrimer-Molekülen, die zur Steigerung der effektiven Aufnahme von DNA durch eukaryotische Zellen chemisch aktiviert worden sind. Dieses Reagenz faltet die DNA in eine kompakte Struktur und optimiert auf diese Weise die Aufnahme der DNA. In der Zelle puffert das "SuperFect Transfection Reagent" den pH- Wert der Lysosomen nach Verschmelzung mit den Endosomen, so dass es zu einer Inaktivierung lysosomaler Proteasen kommt. Das sichert die Stabilität des "SuperFect- DNA- Komplexes" und damit auch den Transport von intakter DNA in den Zellkern (Tang *et al.*, 1996).

Das zweite Transfektionsreagenz, das zur Transfektion der Primärkultur eingesetzt wurde, ist Effectene (QIAGEN, Hilden, BRD). Hierbei handelt es sich um ein Drei-Komponenten-System auf Lipid-Basis, das aufgrund seiner geringen Toxizität besonders für die Transfektion primärer Zellen geeignet ist. Durch einen „Enhancer“ wird die DNA zunächst

kondensiert und anschließend durch die Zugabe des Effectene Reagenz mit einem kationischen Lipid ummantelt. Dieser Komplex wird anschließend von den Zellen aufgenommen.

Die Transfektionen wurden bei beiden Reagenzien nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.7.2 Elektroporation eukaryotischer Zellen

Eine weitere Methode zur Transfektion eukaryotischer Zellen stellt die Elektroporation dar. Bei dieser Methode nutzt man, daß biologische Membranen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes durchlässig gemacht werden können. Durch einen kurzen elektrischen Puls mit einer Dauer von nur wenigen Millisekunden wird ein Membranpotential induziert. Erreicht dieses Membranpotential einen kritischen Wert, so kommt es zum partiellen, elektrischen Zusammenbruch der Zellmembran und darüberhinaus zur Bildung von Poren in der Membran, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann.

Im Vergleich zu chemischen Transfektionsmethoden liegt der Vorteil der Elektroporation darin, dass bei dieser nicht-invasiven Methode die biologische Struktur und Funktion unverändert bleibt.

4.4.8 Etablierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen

4.4.8.1 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Die Caco-2-Zellen wurden passagiert (s Kap. 1.4.1) und auf einen Zelltiter von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die verwendeten Transwell-Filter aus Polykarbonat mit einer Fläche von $0,33 \text{ cm}^2$ und einer Porengröße von $0,4$ bzw. $3 \text{ }\mu\text{m}$ (Corning Costar, Bodenheim, BRD; Kat.# 3409 & 3415) wurden umgedreht in eine sterile feuchte Kammer gestellt und $100 \text{ }\mu\text{l}$ Caco-2- Zellen (3×10^5 Zellen) auf die obere Seite der Filter pipettiert. Nach Inkubation über Nacht (max. 12 h) im Brutschrank wurden die Filter am nächsten Tag umgedreht und zurück in die mit 1 ml Medium gefüllten unteren Kavitäten des Transwell-Filter-Systems gehängt. Die Caco-2-Zellen wurden für 14-17 Tage kultiviert, bis sie sich differenziert haben und einen polarisierten Monolayer mit apikalem Mikrovillisaum ausbilden. In diesem Zeitraum wurde das Medium in der unteren und der oberen Kammer des Filter-Systems alle 2 Tage erneuert. Da die Filter blickdicht sind, und somit der Zustand des epithelialen Monolayers aus Caco-2-

Zellen nicht im Durchlichtmikroskop kontrolliert werden kann, wurde die Integrität der Zellschicht mit Hilfe der Messung des transepithelialen Widerstandes überprüft.

4.4.8.2 Messung des transepithelialen Widerstandes von Zellmonolayern

Ein wesentlicher physikalischer Parameter zur Charakterisierung von Zellmonolayern ist der transepitheliale bzw. transendotheliale Widerstand (TER).

Die Messung des TER erfolgte unter Verwendung der Endohm-Kammer, eines Meßsystems der Firma World Precision Instruments (Berlin, BRD). Für die Messung müssen die Zellen auf Filtern kultiviert werden. Die Messkammer, die eine Elektrode enthält, wurde mit auf 37°C erwärmtem Kulturmedium aufgefüllt, und der Filter in die Kammer gehängt. Anschließend wird ein Deckel, der die zweite Elektrode enthält auf die Kammer aufgesetzt, und der Widerstand über den Filter gemessen. Der Eigenwiderstand der Filter pro Filterfläche von 0,33 cm² wurde von dem gemessenen Widerstand pro mit Zellen bewachsener Filterfläche von 0,33 cm² subtrahiert.

4.4.8.3 Isolierung von Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques der Maus

Die Dünndärme wurden aus adulten Mäusen präpariert, längs aufgeschnitten und in 1 x D-PBS auf Eis gespült. Anschließend wurden die Peyer'schen Plaques, die man deutlich als kleine weiße Erhebungen auf der Innenseite der Därme erkennen kann, mit einem Skalpell herausgeschnitten. Im Dünndarm einer Maus findet man etwa 8 Peyer'sche Plaques. Die isolierten Peyer'schen Plaques wurden im nächsten Schritt zwischen zwei Objektträgern homogenisiert und schließlich in RPMI-Medium (etwa 100µl pro Peyer'schen Plaques) resuspendiert. Nach einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm wurde der Überstand, der die Lymphozyten enthält, abgenommen, und die Zellen ausgezählt. Im Durchschnitt erhält man pro Peyer'schen Plaques etwa 1×10^6 Lymphozyten.

Die Zusammensetzung der isolierten Zellsuspension wurde mit Hilfe einer FACScan-Analyse überprüft (mit freundlicher Unterstützung von Fr. Dr. Kerstin Lühn, Institut für Zellbiologie, ZMBE, Münster).

Schließlich wurden 1×10^6 Lymphozyten in 100µl RPMI-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin in das obere Kompartiment des Transwell-Filter-Systems ausgesät.

4.4.8.4 Isolierung humaner Lymphozyten

Lymphozyten- Separationsmedium	Percoll- Lösung, pH 7	
Ficoll	Percoll	10 ml
	10 x HBSS	1,65 ml
	1M HCl	100 μ l
	Dichte 1,088	

Humane Lymphozyten wurden aus venösem Blut gesunder Spender (erhalten vom DRK, Münster) isoliert. Zunächst wurden 2 x 25 ml des Blutes auf je 20 ml Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll, Dichte 1,077) geschichtet. Durch eine Zentrifugation bei 1500 rpm und 22°C für 30 min erfolgte eine Dichtegradiententrennung der Blutbestandteile (s. Abb.4.1). Die mononuklearen Zellen (MNC), zu denen Lymphozyten und Monozyten gehören, sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll-Schicht an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen.

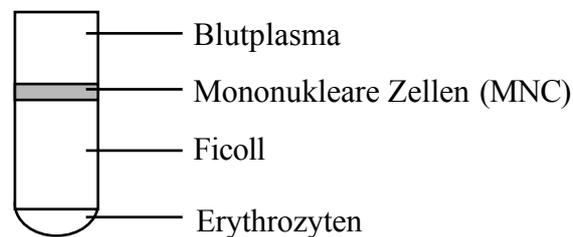


Abb.4.1 Ficoll-Gradient

Das Plasma wurde abgesaugt, und die aus mononuklearen Zellen (MNC) bestehende Schicht aus beiden Ficoll-Gradienten wurde in einem neuen Gefäß vereinigt. Es folgten zwei Waschschrte, bei denen die Zellen in 50 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgenommen und bei 1300 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml PBS resuspendiert, auf 8 ml Percoll-Lösung pipettiert und gemischt. Bei der anschließenden Zentrifugation in 15 ml-Corex-Röhrchen in einem vorgewärmten Rotor erfolgte im sich selbst einstellenden Gradienten eine Temperatur- und pH-abhängige Trennung der Blutzellen nach ihrer Dichte (s. Abb.4.2).

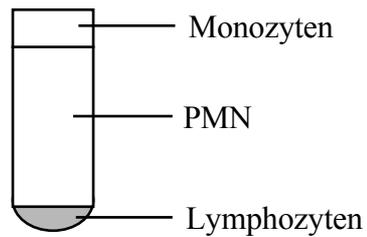


Abb. 4.2 Percoll-Gradient

Die Lymphozyten, die sich nach dem Zentrifugieren als Pellet im Corex-Röhrchen befinden (s. Abb.4.2), wurden zweimal mit D-PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, für die Co-Kultivierung mit Caco-2-Zellen in Kulturmedium aufgenommen und auf einen Titer von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Für die Co-Kultur mit humanen Epithelzellen wurden $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit 1×10^6 Lymphozyten in das obere Kompartiment des Transwell-Filter-Systems ausgesät (s. Abb. 4.3).

4.4.8.5 Co-Kultivierung von Epithelzellen und Lymphozyten im Transwell-Filter-System

Direkt nach der Isolierung wurden $100 \mu\text{l}$ mit 1×10^6 Lymphozyten in die obere Kavität des Transwell-Filter-Systems gegeben, in denen die Caco-2-Zellen seit 14-17 Tagen kultiviert wurden (s. Abb. 4.3). Die Lymphozyten befinden sich so an der basolateralen Seite der differenzierten Epithelzellen. Die Zellen wurden für 4 Tage gemeinsam kultiviert. Nach 2 Tagen wurde im unteren Kompartement $350 \mu\text{l}$ Kulturmedium gegen frisches Medium ausgetauscht. Außerdem wurde in diesem Zeitraum täglich der transepitheliale Widerstand des epithelialen Monolayers gemessen, um Veränderungen in der Kultur aufzuzeigen.

Alle Versuche zur Charakterisierung der Co-Kultur wurden am vierten Tag der Co-Kultivierung durchgeführt.

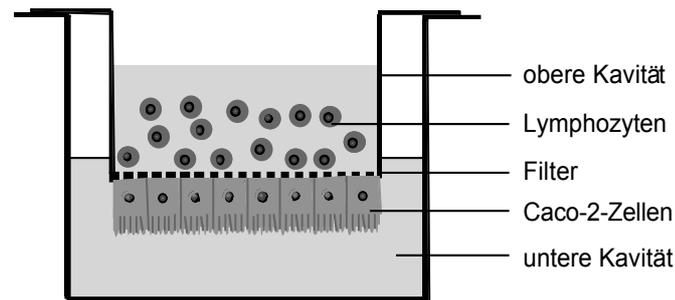


Abb. 4.3 Schematische Abbildung des Co-Kultur-Modells

4.4.8.6 Untersuchung M-Zell-typischer Eigenschaften

Eine typische Eigenschaft von M- Zellen ist der Transport von Partikeln und Bakterien. Um die Fähigkeit der Zellen der Co-Kultur hinsichtlich ihrer Transport-Eigenschaften zu untersuchen, wurden die Zellen mit Latexpartikeln mit einem Durchmesser von 20 bzw. 200 nm inkubiert. Die Partikel wurden dafür auf die apikale Seite der Epithelzellen gegeben. Dazu wurden die Filter aus den unteren Kavitäten herausgenommen und umgedreht in eine sterile feuchte Kammer gestellt. Anschließend wurden je 100 μl der Partikelsuspension mit Konzentrationen von 1×10^6 bis 1×10^8 auf die Filter pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 für 1, 2, 3 oder 4 h. Es erfolgten drei Waschschriffe in D-PBS für je 5 min, bevor die Zellen beschrieben für Immunfluoreszenzen präpariert wurden.

4.4.8.7 Infektionen der Co-Kultur

Um die Interaktion der Zellen der Co-Kultur mit unterschiedlichen Bakterienstämmen zu untersuchen, wurden die Zellen von der apikalen Seite mit Bakteriensuspensionen infiziert. Die Bakterien wurden wie in Kap. 1.4.9 angezogen und wie bereits für den Partikeltransport beschrieben (Kap. 1.4.8.6) auf die Zellen gegeben.

4.4.9 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Bakterien

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen mit antibiotikumfreiem Kulturmedium gefüttert. Die Bakterien wurden aus einer in Standard I-Medium gewachsenen Übernachtskultur 1:20 in Infektionsmedium verdünnt. Die für die Infektionen eingesetzten DA-EPEC-Stämme sowie der EPEC-Stamm E2348/69 wurden zur Aktivierung der Expression der Esp-Proteine als Standkultur 3 h bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert, während die für Infektionen eingesetzten Yersinien bei 26°C als Schüttelkultur angezogen wurden.

Die Bakterienzellzahl wurde bestimmt und die Bakteriensuspension mit Infektionsmedium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die Infektionen wurden bei 37°C in 10 % (HeLa) bzw. 5 % CO₂ (Caco-2) für 1 bis 6 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit D-PBS mit Mg²⁺ und Ca²⁺ gewaschen.

Die Infektion von HeLa-Zellen erfolgte in 24-Lochkulturplatten auf Glas-Deckgläschen und mit Zellen, die zu ca. 70 – 80 % (□ 1 x 10⁵ Zellen/ Loch) konfluent gewachsen waren.

Pro Loch einer Kulturplatte wurden die Zellen mit 1 ml einer Bakteriensuspension mit 5 x 10⁶ Zellen/ml, entsprechend einem MOI von 50, infiziert.

Für die Infektion der auf Filtern kultivierten Caco-2 Zellen wurden zunächst die Filter umgedreht in eine sterile, feuchte Kammer gestellt. Dann wurde pro Filter (etwa 3 x 10⁴ Zellen) 100 µl der Bakteriensuspension mit 1,5 x 10⁶ Bakterien (MOI = 50) ausgesät.

4.4.10 Herstellung von Zytospinpräparaten

Die Durchführung von Immunfluoreszenz-Färbungen mit frisch isolierten oder nicht adhärent wachsenden Zellen erfordert die vorherige Fixierung dieser Zellen auf Objektträgern. Die Zellsuspension wurde dafür bei 350 x g für 2 min zentrifugiert und das Pellet in 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurden etwa 100-200 µl der Zellen in einer Zytospinzentrifuge bei 150 x g für 3 min auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte in eiskaltem Aceton für 10 min. Nach der Trocknung an der Luft konnten diese Präparate entweder direkt für eine Immunfluoreszenz eingesetzt oder zunächst bei -70°C gelagert werden.

4.4.11 Immunfluoreszenzen

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzen können Zellstrukturen mikroskopisch sichtbar gemacht werden, indem sie von fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder anderen Nachweisreagentien, wie z. B. Lektinen, gebunden werden.

Die auf Deckgläschen oder Filtern gewachsenen Zellen wurden dazu zunächst mit D-PBS gewaschen und für 20 min in 4 % ige Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem Waschen mit D-PBS für 5 min wurden die Zellen für 15 min in Ammoniumchlorid inkubiert. Es folgte eine Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,1 % Triton X-100 für 5 min. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen anschließend in 1 % BSA in D-PBS für 20 min inkubiert.

Die Inkubation mit dem Primärreagenz wurde für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in D-PBS folgte die Inkubation mit dem Sekundärreagenz für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nicht gebundenes Sekundärreagenz wurde anschließend durch drei Waschschritte in D-PBS für je 5 min entfernt, und die Präparate in Fluorescence Mounting Medium der Firma DAKO eingebettet. Nach Antrocknen des Einbettmediums konnten die Objekte am Fluoreszenzmikroskop oder CFMS analysiert und mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert werden.

4 % ige Paraformaldehyd-Lösung

4 g Paraformaldehyd in 60 ml 1 x PBS bei 60-70°C unter Rühren lösen; Zugabe von 1M NaOH bis die Lösung klar wird; abgekühlte Lösung auf pH 7,2-7,4 einstellen und mit PBS auf 100 ml auffüllen

0,1% Triton X-100

Triton X-100 100 µl
1 x PBS 9,9 ml

NH₄Cl-PBS

Ammoniak (25%ige Lösung) 670 µl
1 x PBS ad 100 ml
pH-Wert 7,3

BSA

BSA 1 g
1 x PBS ad 100 ml

Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Hamburg, #S3023)

4.4.12 Fluoreszenz-Markierung von filamentösem Aktin (FAS-Test)

Beim “Fluorescence Actin Staining” (FAS)-Test wird über die Bindung von Fluoreszenz-markiertem Phalloidin an filamentöses (F)-Aktin dessen Lokalisation und Anordnung sichtbar gemacht (Knutton *et al.*, 1989). Die Zellen wurden für diese Färbung auf Deckgläschen in 24-Loch-Kulturplatten kultiviert.

Die infizierten, fixierten und gewaschenen HeLa-Zellen (Kap.1.4.9) wurden für 5 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und anschließend dreimal mit D-PBS gewaschen. Die Markierung mit Texas-Red-konjugiertem Phalloidin erfolgte lichtgeschützt in einer feuchten Kammer für 30 min bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit D-PBS wurden die Deckgläschen in DAKO Mounting Medium eingedeckt. Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen jeweils desselben Bildausschnittes wurden aufgenommen und die Zahl der adhärenenten sowie der Anteil der FAS-positiven Bakterien bestimmt.

4.4.13 Mikroskopische Methoden

4.4.13.1 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 x 5 min mit D-PBS gewaschen, bevor sie für 1h in 1,3 % iger Osmiumtetroxidlösung inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe bestehend aus je 10 minütigen Inkubationsschritten in 30 %, 50 %, 70 % 90 % und 96 % iger-Ethanol-Lösung gefolgt von zwei abschließenden Inkubationen der Präparate in 99,8 % igem Ethanol entwässert.

Für eine kontrastreiche Ultrastruktur-Darstellung wurden die Zellen in Epon eingebettet. Dazu wurden die Zellen zunächst in Epon:Propylenoxid (1:1) für 1h oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Polymerisierung des Eponharzes erfolgte anschließend für 48h bei 56°C.

Die fertigen Präparate wurden getrimmt und Schnitte mit einer Dicke von 60-70 nm angefertigt.

4.4.13.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen des M-Zell-Modells

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Co-Kultur mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops analysiert. Nach der üblichen Inkubationsphase in Co-Kultur mit

Lymphozyten wurden die Filter mit den Caco-2-Zellen dreimal mit D-PBS gewaschen und über Nacht mit 2 % Glutaraldehyd in D-PBS (pH 7,2-7,4) fixiert. Am nächsten Tag erfolgten zwei weitere Waschschrte mit D-PBS zweimal für je 10 min. Anschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Ethanolreihe bestehend aus je 15 minütiger Inkubation in 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 96 % iger-Ethanol-Lösung gefolgt von zwei abschließenden Inkubationen der Präparate in 99,8 % igem Ethanol für jeweils 30 min dehydriert.

Die weitere Aufbereitung der Proben (Kritisch-Punkt-Trocknung bei Filtern erforderlich) und die Analyse der Zellen wurden durch die Firma NanoAnalytics GmbH (Münster, BRD) durchgeführt.

4.5 Präparation und Analyse von DNA

4.5.1 Isolierung von Gesamtzell-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Gesamtzell-DNA erfolgte unter Verwendung des “High Pure PCR Template Preparation Kit” der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, BRD). Bei dieser Methode werden spezifisch Nukleinsäuren in Gegenwart eines chaotropen Salzes an die aus Glasfasern bestehende Matrix einer Säule gebunden (Vogelstein & Gillespie, 1979). Nach einem Waschschrte kann die DNA frei von Salzen, Proteinen oder zellulären Verunreinigungen eluiert werden.

Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers und unter Verwendung der vom Hersteller gelieferten Puffer. In der Regel wurde DNA aus 1 ml Baketriensuspension isoliert und abschließend mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

4.5.2 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Die Isolierung genomischer DNA ist der kritischste Schrit bei der Etablierung von Cosmidbänken, da die Qualität der verwendeten genomischen DNA entscheidend für die Qualität der Bänke ist. Da für die Konstruktion von Cosmidbänken große DNA-Fragmente von 32-50 kb eingesetzt werden, ist eine sehr schonende Methode zur Isolierung der genomischen DNA notwendig. Dabei sollte die isolierte, unverdaute DNA eine Länge von 150 kb besitzen.

Resuspensions-Puffer		Pronase-Lösung	
Tris-HCl, pH 8	50 mM	Pronase	10 mg/ ml
EDTA, pH 8	50 mM	vor Gebrauch eine Stunde bei 37°C verdauen	
Phenol, äquilibriert mit Tris-HCl auf pH 8		Natriumacetat-Lösung, 3M	
Mikropipetten aus Glas		96 % iger Ethanol, eiskalt	

Für die Präparation werden 2 ml einer Bakterien-ü.N.-Kultur durch eine Zentrifugation bei 13000 x g und RT für 2 min sedimentiert und das Pellet in 300 bis 400 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl 10 % iger SDS-Lösung und 100 µl Pronase-Lösung erfolgt unter gelegentlichem Mischen eine Inkubation für 1 h bei 42°C, bis die Lösung klar wird. Anschließend werden 150 µl Phenol auf den Ansatz pipettiert und erneut für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend werden in das Reaktionsgefäß 600 µl Chloroform gegeben und gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 x g und RT für 15 min wird die obere Phase mitsamt des im Ansatz befindlichen weißen Niederschlages abgenommen. Um die DNA zu fällen wurden 60 µl Natriumacetat (3M) dazugegeben, das Reaktionsgefäß mit eiskaltem 96 % igem Ethanol aufgefüllt und durch Umdrehen vorsichtig gemischt. Die DNA wurde anschließend auf eine Mikropipette aus Glas aufgerollt, diese mit Ethanol abgespült und in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Um die RNA in der Präparation zu verdauen, wurden 400 µl TE- Puffer sowie 20 µl RNaseA dazugegeben und das Reaktionsgefäß mit der Mikropipette für 1 h bei 37°C inkubiert. Bei diesem Schritt wird die DNA wieder von dem Glasstäbchen gelöst. Es schließt sich eine zweite Fällung der DNA durch Zugabe von 40 µl Natriumacetat und Auffüllen des Gefäßes mit Ethanol an, gefolgt von einem erneuten Aufspulen der DNA an einer Mikropipette. Durch vorsichtiges Abspülen mit Ethanol wird die DNA noch einmal gewaschen und schließlich in 100 -200 µl TE-Puffer gelöst.

Um ein Scheren der genomischen DNA zu vermeiden, sollte die DNA nur äußerst vorsichtig oder mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert werden.

4.5.3 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *Escherichia coli* durch alkalische Denaturierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA und Cosmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse. Diese Methode beruht darauf, daß überspiralisierte Plasmid-DNA im Gegensatz zu

chromosomaler DNA durch eine alkalische Behandlung nur zu einem Teil denaturiert wird und nach einer Neutralisation wieder in ihre Ausgangskonformation zurückkehrt. Da chromosomale DNA hingegen auch nach Renaturierung denaturiert bleibt, kann sie mit den übrigen Bestandteilen des Zellextraktes durch Zentrifugation von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA getrennt werden. Die Reinigung der DNA erfolgt schließlich über eine Silicagel-Matrix.

4.5.4 Plasmid-Mini-Präparation

Plasmid-Präparationen im analytischen Maßstab wurden mit dem “QIAprep Spin Miniprep Kit” der Firma QIAGEN durchgeführt. Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und unter Verwendung der vom Hersteller gelieferten Puffer.

Für die Isolierung von Vektor-DNA wurden 1,5 ml einer Bakterien-ü.N.-Kultur eingesetzt, und die DNA nach der Isolierung mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Für der Isolierung von Cosmid-DNA, die in niedriger Kopienzahl in der Bakterienzelle vorliegt, wurden 5 ml Bakterienkultur eingesetzt und zudem ein zusätzlicher Waschschritt mit 500 µl Bindungspuffer PB durchgeführt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte abschließend mit 50 µl des zuvor auf 70°C erwärmten Elutionspuffers.

4.5.5 Plasmid-Midi-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA im präparativen Maßstab wurde der “QIAprep Midiprep Kit” der Firma QIAGEN verwendet.

Bei Plasmid-Isolierungen wurden 30 ml, bei Cosmiden dagegen 50-100 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers sowie unter Verwendung der vom Hersteller gelieferten Puffer verfahren. Abschließend wurde das trockene DNA-Pellet in 10 mM Tris- HCl oder *Aqua dest.* resuspendiert.

4.5.6 Reinigung und Konzentrierung von DNA in wässrigen Lösungen

4.5.6.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Proteine können aus Zellextrakten oder wässrigen DNA-Lösungen durch die Zugabe eines gleichen Volumens eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (v/v/v) entfernt werden. Diese organischen Lösungsmittel bewirken, daß

Proteine denaturiert werden, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase in Lösung bleiben. Durch eine Zentrifugation wird die organische von der wässrigen Phase getrennt. Die gefällten Proteine werden dabei in der Interphase angereichert. Anschließend wird die wässrige (obere) Phase abgenommen und durch eine Extraktion mit einem gleichen Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1 (v/v)) von Phenolresten befreit. Schließlich wird die DNA durch eine Alkohol-Präzipitation konzentriert.

4.5.6.2 Präzipitation mit Ethanol

Die Präzipitation mit Ethanol dient zur Reinigung und Konzentrierung von DNA-Lösungen. In Gegenwart von Salzen, wie Natriumacetat oder Kaliumacetat, und Temperaturen von unter -20°C fällt Ethanol DNA sehr wirksam aus. Ein Vorteil dieser Reinigung ist, daß sehr kurze DNA-Fragmente bei der Ethanolfällung in Lösung bleiben und durch Zentrifugation entfernt werden können.

Im Gegensatz zur Präzipitation mit Isopropanol wird die DNA bei der Ethanol-Fällung wirksamer von Salzen, die in späteren Enzymreaktionen störend wirken können, gereinigt.

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt, durch mehrfaches Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt, für 20 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei $15000 \times g$ und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit $500 \mu\text{l}$ 70 % igem Ethanol überschichtet und erneut für 15 min zentrifugiert. Nach der Lufttrocknung wird die DNA in 10 mM Tris-HCl (pH 8) oder in *Aqua bidest.* resuspendiert.

4.5.6.3 Präzipitation mit Isopropanol

Die Isopropanolpräzipitation zur Reinigung und Konzentrierung von DNA eignet sich für die Fällung von DNA in größeren Volumina. In Gegenwart von Salzen, wie Natriumacetat oder Kaliumacetat, und Temperaturen von unter -20°C fällt Isopropanol DNA sehr wirksam aus.

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, gründlich durch mehrfaches Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt, für 20 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei $15000 \times g$ und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit $500 \mu\text{l}$ 70% igem Ethanol überschichtet und erneut für 15 min zentrifugiert. Nach der Lufttrocknung wird die DNA in 10 mM Tris-HCl (pH 8) oder in *Aqua bidest.* resuspendiert.

4.5.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.5.7.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Lösungen kann mit Hilfe der Ultraviolett-Absorptionsspektrometrie sehr genau bestimmt werden, da die Absorption von ultravioletter Strahlung in der DNA-Lösung proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist. Bei Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Lösung. Darüber hinaus läßt sich mit dieser Methode die Reinheit der DNA ermitteln, indem zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen wird. Bei einer reinen DNA- Lösung erwartet man ein Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,8 und 2. Liegt der Wert unter 1, so ist die DNA mit Proteinen oder Phenol verunreinigt.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die DNA 1:50 bis 1:500 mit Wasser verdünnt. Nach der photometrischen Bestimmung der Absorptionen erfolgte die Berechnung der DNA-Konzentration mit dem Programm "Nucleic acid analysis" (Beckman), das auf den von Warburg und Christian (1942) errechneten Gleichungen basiert.

$$\text{Nukleinsäuren } (\mu\text{g/ml}) = (-36 \times A_{280}) + (62,9 \times A_{260})$$

4.5.7.2 Konzentrationsbestimmung im Agarosegel

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wird eine DNA-Lösung neben einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration in einem Agarosegel getrennt. Nach Färbung in Ethidiumbromid wird die DNA-Menge durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten unter UV-Bestrahlung (312 nm) geschätzt.

4.5.8 Restriktionen

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II eingesetzt. Diese Enzyme erkennen eine meist palindromische Erkennungssequenz, an der sie den DNA-Doppelstrang spezifisch spalten. Um eine optimale Enzymaktivität zu erhalten, sind geeignete Salzkonzentrationen sowie ein spezifischer pH-Wert erforderlich. Diese Bedingungen wurden durch den Zusatz der Reaktionspuffer gemäß den Herstellerangaben zur zu restringierenden DNA erreicht. Die Restriktionen erfolgten üblicherweise in 20 µl Ansätzen bei 37°C für 1-12

Stunden. Die DNA wurde mit dem entsprechenden Puffer sowie 1 U Enzym pro μg DNA versetzt und mit *Aqua dest.* auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Eine Unit ist dabei als die Menge einer Restriktionsendonuklease definiert, die 1 μg einer Standard-DNA bei optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde vollständig spaltet.

4.5.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation von DNA-Fragmenten nach ihrer Linearisierung zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Enden der restringierten DNA mit alkalischer Phosphatase (CIAP, „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“) durchgeführt. Da dieses Enzym in fast allen Puffersystemen aktiv ist, konnte die Dephosphorylierung direkt im Anschluß an die Restriktion durchgeführt werden. In den Restriktionsansatz wurden 10 U CIAP gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die CIAP für 15 min bei 65°C denaturiert.

4.5.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von ATP die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung zwischen der OH-Gruppe des 3'-Endes und PO_4 -Gruppe des 5'-Endes von Nukleinsäuren.

Für eine gute Effizienz der Ligation werden Vektor und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Berechnung der benötigten Insert-DNA-Menge berechnet sich wie folgt:

$$\text{Insertmenge (ng)} = 3 \times [\text{Vektormenge (ng)} \times \text{Insertgröße (kb)} / \text{Vektorgröße (kb)}]$$

Die benötigte Vektor-DNA-Menge beträgt zwischen 50 und 500 ng. Zudem wird in der Regel dephosphorylierte Insert-DNA verwendet, um eine Religation der Insert-DNA-Fragmente zu verhindern. Die Ligation erfolgt in 10-20 μl -Ansätzen. Dazu wurde die zu ligierende DNA mit 1/10 Volumen eines vom Hersteller gelieferten 10 x Ligasepuffer sowie 3 U der T4-DNA-Ligase versetzt und mit *Aqua dest.* auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 bis 12 Stunden bei 16°C inkubiert.

4.5.11 Einführung von Plasmid-DNA in *E. coli*

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung gereinigter DNA auf eine hierfür kompetente Empfängerzelle (Winnacker, 1990). Um Bakterien in einen aufnahmefähigen Zustand zu versetzen, werden sie einer chemischen und/oder physikalischen Behandlung unterzogen. Man bezeichnet Bakterien, die nach einer solchen Behandlung in der Lage sind, Fremd-DNA aufzunehmen, als „kompetent“.

4.5.11.1 Herstellung kompetenter *E. coli* nach der CaCl₂-Methode

Die Standardmethode zur Herstellung kompetenter Zellen ist die Behandlung mit eiskaltem CaCl₂ (Mandel & Higa, 1970), die die Bindung freier DNA an die Zellen beeinflusst. Die Aufnahme der DNA erfolgt anschließend durch einen kurzen Hitzeschock bei 42°C, der die Membranfluidität der Bakterienzellen erhöht und so die Aufnahme des CaCl₂-DNA-Komplexes ermöglicht (Rodriguez & Tait, 1983).

50 ml Standard I-Medium wurden 1:50 mit einer ü.N.-Kultur angeimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in vorgekühlten Zentrifugationsbechern für 10 min auf Eis abgekühlt und bei 2000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (pH 7,5) resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C für 10 min wurden die Zellen in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Zur Lagerung wurden die Zellen in 100 µl-Aliquots aufgeteilt. Kompetente Zellen können in dieser Form für 48 h bei 4°C oder nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 15 %) langfristig bei -70°C gelagert werden.

4.5.11.2 Transformation CaCl₂-kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl kompetenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 5 µl 0,5 M 2-Mercaptoethanol versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 ng Vektor-DNA oder 0,3-0,5 µg DNA eines Ligationsansatzes wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 45 sek. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 900 µl Standard I-Medium versetzt und bei 37°C und 150 rpm für 1 h inkubiert. 100 und 900 µl dieser Kultur wurden schließlich auf Antibiotikum-haltigen Standard I-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5.11.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Eine weitere Methode zu Transformation von Bakterien ist die Elektroporation. Diese Form der Transformation beruht darauf, daß Bakterienmembranen durch elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle, wie z.B. DNA, durchlässig gemacht werden.

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 250 ml Standard I-Medium 1:100 mit einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis abgekühlt und in vorgekühlten Zentrifugationsbechern bei 2000 x g und 2°C für 20 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml eiskaltem, sterilem *Aqua dest.* resuspendiert, mit eiskaltem, sterilem *Aqua dest.* auf 250 ml aufgefüllt und erneut bei 2000 x g und 2°C für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Pellet vorsichtig in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und die Zellsuspension mit 40 ml 10% igem Glycerin versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 2000 x g und 2°C für 10 min wurde der Überstand abgegossen, das Volumen der Zellsuspension bestimmt und mit einem Volumen 10 % igem Glycerin versetzt. Die Zellsuspension wurde schließlich in 50-100 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert.

4.5.11.4 Elektroporation von *E. coli*

50 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1-3 µl einer gereinigten DNA-Lösung (z.B. Ligationsansatz) versetzt. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und diese in das Elektroporationsgerät (Equibio) eingesetzt. Die Zellen wurden anschließend einem Strompuls von 2500 V, einer Kapazität von 25 MF sowie einem Widerstand von 200 Ω ausgesetzt und direkt danach in 1 ml vorgewärmtes Standard I-Medium gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 150 rpm wurden 100 und 900 µl der Bakteriensuspension auf Antibiotikum-haltigen Standard I-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5.12 Elektrophoretische Methoden

4.5.12.1 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Nukleinsäuren liegen unter physiologischen Bedingungen als polyanionische Moleküle vor. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern sie im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols (Anode). Führt man eine solche Elektrophorese in einem Gel bestehend aus Agarose, Polyacrylamid oder einer Mischung dieser beider Substanzen durch, so erfolgt eine Trennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei vom Molekulargewicht der Fragmente und der Porengröße des Gels bestimmt. Je größer die Konzentration des Trägermaterials ist, desto kleiner sind die Poren des Gels. Durch die Wahl einer entsprechenden Agarosekonzentration (0,5-2 %) können Fragmente einer Größe zwischen 0,1 und 20 kb getrennt werden.

TAE-Puffer (50x)		Gel-Lade-Puffer	
Tris	242 g	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Eisessig	57,1 ml	Saccharose	40 % (w/v)
Na ₂ EDTA x H ₂ O	37,2 g	EDTA	20 mM
<i>Aqua dest.</i>	ad 1 l		
pH-Wert 8,3			

Ethidiumbromid-Lösung	
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	200 µl
1 x TAE-Puffer	1 l

Die benötigte Menge Agarose wurde durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in 1 x TAE gelöst und nach Abkühlung in eine Gelkammer gegossen, wobei durch aufgesetzte Gelkämme Taschen für die aufzutragenden Proben ausgespart wurden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen zur Erhöhung der Dichte und zur Markierung der Lauffront mit 1/5 Volumen Gel-Lade-Puffer versetzt. Die Trennung der Fragmente erfolgte schließlich in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur in 1 x TAE bei 50-220 V für 0,5-2 h.

Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel anschließend mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt. Dabei interkaliert der Phenanthridin-Ring des Ethidiumbromids zwischen die Basenpaaren der doppelsträngigen DNA. Bei Bestrahlung dieses Ethidiumbromid-DNA-Komplexes mit UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) auf einem UV-Transilluminator emittiert das Ethidiumbromid Licht im sichtbaren Bereich (Wellenlänge 590 nm). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente werden auf dem Gel parallel DNA-Längenstandards getrennt.

4.5.13 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente können nach einer elektrophoretischen Auftrennung unter Verwendung des "QIAquick DNA Gel Extraction Kit" wieder aus dem Gel isoliert und gereinigt werden. Diese Methode basiert auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren in Gegenwart von chaotropen Salzen an die Oberfläche von Glas- oder Silikagel-Partikeln zu binden. (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Das DNA-Fragment wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und in Bindungspuffer bei 50°C für 10 min gelöst. Nach vollständiger Auflösung der Agarose wird der Ansatz mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5) sowie 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gelstück versetzt, gemischt und auf die Säule gegeben. Nach einigen Waschschritten zur Entfernung von Agaroseresten, Proteinen und Salzen wird die DNA mit 10 mM Tris-HCl (pH 8) oder H₂O eluiert.

Puffer QX1 (Bindungspuffer)		Puffer PE (Waschpuffer)	
NaJ	3 M	NaCl	0,1 M
NaClO ₄	4 M	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
Tris-HCl, pH 7,5	5 mM	Ethanol	70%
Na ₂ SO ₃	0,1%		

4.5.14 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, „Polymerase chain reaction“)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung selbst kleiner Mengen eines beliebigen DNA-Abschnittes ("template"-DNA), von dem die Nukleotidsequenzen beider Enden bekannt sein müssen (Saiki *et al.*, 1998). Das Prinzip der PCR besteht darauf, daß zwei kurze Oligonukleotide ("Primer") mit den ihnen komplementären Bereichen eines zuvor denaturierten und somit als Einzelstränge vorliegenden DNA-Abschnittes hybridisieren. Durch die DNA-Polymerase werden diese Oligonukleotide vom 3' OH-Ende ausgehend verlängert, so daß schließlich ein neuer, dem Ausgangsbereich identischer DNA-Doppelstrang amplifiziert wird.

Die PCR besteht aus meist dreißig aufeinanderfolgenden Zyklen aus Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrizen-DNA („annealing“) und Verlängerung der angelagerten Oligonukleotide zu einem neuen DNA-Doppelstrang („extension“). Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die Doppelstrang-DNA auf 94°C

erhitzt und liegt nun als Einzelstränge vor. Im zweiten Schritt, der Hybridisierung, lagern sich die Primer an die denaturierten DNA-Stränge an. Im dritten Schritt, der Kettenverlängerung, heftet die DNA-Polymerase vom 3' OH-Ende ausgehend an die Primer die Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) an. Dies führt schließlich zu einem DNA-Doppelstrang, der der Ausgangssequenz genau gleicht.

Die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase ermöglicht mehrere Zyklen nacheinander durchzuführen, ohne daß nach der Denaturierung neue Polymerase zugegeben werden muß. Je nach Anwendung wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Die *Taq*-Polymerase weist im Vergleich zur *Pfu*-Polymerase eine etwa fünffach höhere Polymerisationsrate auf. Dagegen ist die Fehlerrate der *Pfu* ($1,6 \times 10^{-6}$ Fehler/bp) aber aufgrund ihrer 3' \rightarrow 5' Exonukleaseaktivität geringer als die der *Taq* (2×10^{-5} Fehler/bp), der diese Exonuklease-Aktivität fehlt (Lundberg *et al.*, 1991).

Die eingesetzten Oligonukleotide sind in der Regel 18 bis 25 bp lang. Sie weisen einen GC-Gehalt von etwa 40 % auf und haben einen T_m -Wert zwischen 55 und 65°C.

Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit etwa 200 ng Matrizen-DNA, 20 pmol pro Oligonukleotid, 400 μ mol je dNTP, 2,5 U DNA-Polymerase und entsprechendem Volumen an Reaktionspuffer (2,5 mM $MgCl_2$) in einem Heizblock mit Deckelheizung durchgeführt.

Programm zur Durchführung einer PCR

Segment	Temperatur	Dauer	Zyklen
I	94°C	5 min	
II	94°C	1 min	30
	$T_{\text{Annealing}}$	1 min	
	72°C	1 min/ kb PCR-Produkt	
III	72°C	7 min	

Die Hybridisierungstemperatur ($T_{\text{Annealing}}$) ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide und wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$T_{\text{Annealing}} = (T_M [\text{Primer 1}] + T_M [\text{Primer 2}])/2 - 5^\circ\text{C}$$

Tab. 4.1 Annealing-Temperaturen ($T_{\text{Annealing}}$) und PCR-Produkte der eingesetzten Oligonukleotidpaare

Oligonukleotidpaar	$T_{\text{Annealing}}$ [°C]	PCR- Produkt
K261 ^b / K260 ^b	60	orf394/ <i>selC</i> - Region, 527 bp
C8 ^a / C14 ^a	55	<i>cadC</i> / <i>pheU</i> - Region, 2279 bp
K295 ^b / K296 ^b	60	orf394/ LEE ("linker Übergang"), 405 bp
K255 ^b / K260 ^b	60	LEE/ <i>selC</i> - Region ("rechter Übergang"), 418 bp
C6 ^a / K260 ^b	50	LEE/ <i>selC</i> - Region ("rechter Übergang"), 381 bp
C23 ^a / C14 ^a	53	LEE/ <i>pheU</i> - Region, 2006 bp
Ler R1 ^d / F1 ^d	52	<i>ler</i> , 390 bp
Tir19R ^d / 19F ^d	56	<i>tir</i> , 1650 bp
EspD(+)/ (-) ^c	60	<i>espD</i> , 1200 bp
EspB(+)/ (-) ^c	60	<i>espB</i> , 924 bp
SK1 ^e / SK2 ^e	52	<i>eeA</i> , 881 bp

^a Christina Beinke, 1999; ^b McDaniel *et al.*, 1995; ^c Tina Ide, 2002; ^d Silke Michgehl, 2000

4.5.15 „Multi-Well-PCR“

Um möglichst viele Cosmidklone gleichzeitig testen zu können, wurden bis zu 96 PCR-Ansätze parallel auf einer 96-well-Platte angesetzt. Dazu wurde ein Mastermix mit je 25 µl pro PCR pipettiert und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette auf die Löcher der Platte verteilt. Als „Template“ wurde anschließend pro Ansatz 1 µl einer ü.N.-Bakteriensuspension hinzugegeben.

4.5.16 Analyse von DNA durch Blotten und Hybridisierung mit komplementären Sonden

Die Nukleinsäurehybridisierung stellt ein Verfahren zur Detektion homologer DNA-Moleküle dar. Zwei einzelsträngige DNA-Moleküle besitzen die Fähigkeit, Basenpaare miteinander auszubilden, wenn komplementäre Bereiche vorhanden sind. Je umfangreicher diese Homologien sind, desto stabiler ist der gebildete Doppelstrang. Nach Markierung eines DNA-Fragmentes, das komplementär zu dem gesuchten DNA-Molekül ist, läßt sich dieses als Sonde einsetzen. Nach der Hybridisierung der Sonde mit den zu untersuchenden DNA-Fragmenten wird diese abhängig von der gewählten Markierung nachgewiesen.

Bevor die Hybridisierung stattfinden kann, müssen die zuvor gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran aus Nitrozellulose oder Nylon übertragen werden (Southern, 1975). Man erhält auf diese Weise eine genaue Kopie des im Gel dokumentierten DNA-Bandenmusters.

4.5.17 Nukleinsäuretransfer auf Nylonmembranen im Southern Blot-Verfahren (Southern, 1975)

0,25 M HCl-Lösung		Denaturierungslösung	
HCl		NaCl	1,5 M
<i>Aqua dest.</i>		NaOH	0,5 M
Neutralisierungslösung		20 x SSC-Lösung	
NaCl	1,5 M	NaCl	3,0 M
Tris-HCl, pH 7	0,5 M	Natriumcitrat	0,3 M
		pH 7	

Die zu untersuchende DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach Anfärben in Ethidiumbromid wurde das Gel photographiert und in *Aqua dest.* gespült. Anschließend wurde das Gel für 30 min zunächst in HCl-Lösung und für je 20 min erst in Denaturierungslösung und dann in Neutralisierungslösung inkubiert. Alle Inkubationsschritte fanden unter leichtem Schwenken bei RT statt.

Für den DNA-Transfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran wurde das Gel auf zwei in 20 x SSC getränkte Whatman-Papiere aufgelegt. Darauf wurde die zuvor mit *Aqua dest.* befeuchtete Nylonmembran luftblasenfrei plaziert. Um einen Kapilarstrom in Richtung Nylonmembran zu erzeugen, wurden drei weitere Lagen Whatman-Papier sowie ein Stapel saugfähiger Papiertücher auf die Membran gelegt. Die Blotanordnung wurde außerdem durch ein Gewicht von 0,5 – 1 kg belastet.

Für einen „Doppelblot“ wurde die DNA aus einem Gel gleichzeitig auf zwei Nylonmembranen übertragen. Dazu wurde das Gel zwischen zwei Nylonmembranen plaziert, die wiederum von 2 Lagen in 20 x SSC getränkten Whatman-Papieren bedeckt waren. Für beide Verfahren wurde der DNA-Transfer für 1 h oder über Nacht durchgeführt. Um die DNA an der Nylonmembran zu fixieren, wurde diese im Anschluß an das Blotten mit UV-

Licht der Wellenlänge 302 nm in einem „Crosslinker“ (Stratagene) bestrahlt und schließlich für die Hybridisierung eingesetzt.

4.5.18 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte mit ECL-markierten Sonden unter Verwendung des „ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Kit“ der Firma Amersham.

Hybridisierungslösung		Waschpuffer	
Blocking-Reagenz	1 g	Harnstoff	350 g
NaCl	0,58 g	SDS	4 g
Blocking-Lösung	20 ml	20 x SSC	25 ml
1 h bei RT plus 1 h bei 42°C unter Rühren lösen		ad 1l <i>A.dest.</i>	

Die Nylonmembran wurde zunächst mit 10 ml Hybridisierungslösung für 1 h bei 42°C prähybridisiert. Währenddessen wurden 100 ng DNA-Sonde, ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragmentes in 10 µl *Aqua dest.* für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und durch Zugabe von 10 µl Labelling-Reagenz und 10 µl Glutaraldehyd markiert. Die DNA-Sonde wurde anschließend in die Hybridisierungslösung überführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C in einem Hybridisierungsofen. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 20 min in vorgewärmtem Waschpuffer bei 42°C gewaschen und anschließend für 10 min in 2 x SSC bei RT inkubiert.

4.5.19 Nachweis hybridisierter Sonden (ECL)

Für den Nachweis der ECL-Sonde wurde die Membran für 1 min in einem Gemisch aus je 2,5 ml der Entwicklungslösungen A und B (Amersham) inkubiert und anschließend zwischen zwei Folien in eine Filmkammer plaziert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm für 5-10 min sowie bei Bedarf ein zweiter Film für 1- 6 Stunden aufgelegt und anschließend entwickelt.

4.6 Herstellung von Cosmidbänken

Die strukturelle und funktionelle Analyse von komplexen Genomen erfordert die Isolierung und Kartierung großer DNA-Regionen. Für eine solche Analyse stellen Cosmidvektoren ein geeignetes Werkzeug dar, da sie genomische DNA-Fragmente mit einer Größe von 30 bis 42 kb aufnehmen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Verwendung des Cosmidvektors SuperCos 1 (Stratagene, s. Anhang, Abb. 8.2) Cosmidbänke für die DA-EPEC-Stämme 3431 und 0181 konstruiert (s. Abb. 4.4). Der erste Schritt bei der Konstruktion von Cosmidbänken ist die Isolierung genomischer DNA aus den Bakterien, die sehr schonend durchgeführt werden muß, um ein Scheren der DNA zu verhindern. Da der verwendete Cosmidvektor Fragmente mit einer Länge von 30 bis 42 kb aufnehmen kann, wird die genomische DNA anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Sau3AI* partiell in Fragmente dieser Länge verdaut. Eine Testverdau-Reihe zur Ermittlung der optimalen Verdau-Dauer ergab Verdauzeiten von etwa 20 min. Eine im Anschluß an den Verdau durchgeführte Dephosphorylierung verhindert eine Religation der DNA-Fragmente.

Der SuperCos 1-Vektor wird zunächst mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* verdaut und liegt nun als lineares Fragment mit je einer *cos site* an beiden Enden vor (s. Abb. 4.4). Um auch bei der Vektor-DNA eine Religation zu verhindern, wurde anschließend eine Dephosphorylierung durchgeführt. Da die genomischen DNA-Fragmente in die multiple Klonierungsstelle (MCS, „multiple cloning site“) des Vektors ligiert werden sollen, wird in einem nächsten Schritt der lineare Vektor mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* erneut verdaut, der nun in zwei Fragmenten von 1,1 und 6,8 kb vorliegt. *BamHI* und *Sau3AI* sind Isoschizomere, so daß die genomischen DNA-Fragmente und die beiden Teile des Vektors nach dem Verdau kompatible Enden aufweisen und miteinander ligiert werden können. Für die Ligation werden 1 µg Vektor-DNA und 2,5 µg Insert-DNA eingesetzt.

Im Anschluß an die Ligation wird die DNA gereinigt und in λ -Phagen (Gigapack III XL packaging extract, Stratagene) verpackt. In diesem Schritt findet eine Selektionierung statt: Es werden nur DNA-Fragmente verpackt, die 38-50 kb lang sind (entspricht dem genomischem DNA-Fragment von 30-42 kb plus den zwei Vektor-DNA-Fragmenten von insgesamt 7,9 kb), linear vorliegen und an beiden Enden *cos site* besitzen. Da der SuperCos1-Vektor an beiden Enden *cos sites* besitzt, müssen bei Verwendung dieses Cosmidvektors keine Concatemere ligiert werden. Es genügt ein Fragment, das aus dem Insert plus beiden Vektorfragmenten besteht. In den λ -Phagen werden die *cos sites* durch die *ter* Funktion des GenA-Proteins des

Bakteriophagen geschnitten, und die DNA zwischen zwei *cos sites* wird anschließend in Bakteriophagen verpackt.

Bei der sich anschließenden Infektion wird die lineare DNA aus dem Phagen in die Bakterienzellen des Laborstammes *E. coli* XL1 blue MR injiziert, wo sie über die kohäsiven Enden der *cos sites* zirkularisiert wird. In der Bakterienzelle befindet sich somit ein zirkuläres DNA-Molekül, das eine vollständige Kopie des Cosmidvektors mit einem genomischen DNA-Insert enthält. Dieser Cosmidvektor kann sich nun wie ein Plasmid vervielfältigen und überträgt zudem eine Kanamycin-Resistenz auf die Wirtszelle. Bakterien, die ein rekombinantes Cosmid enthalten, lassen sich somit in einem nächsten Schritt durch die Ausplattierung auf Kanamycin-haltigen Standard I-Agarplatten selektionieren.

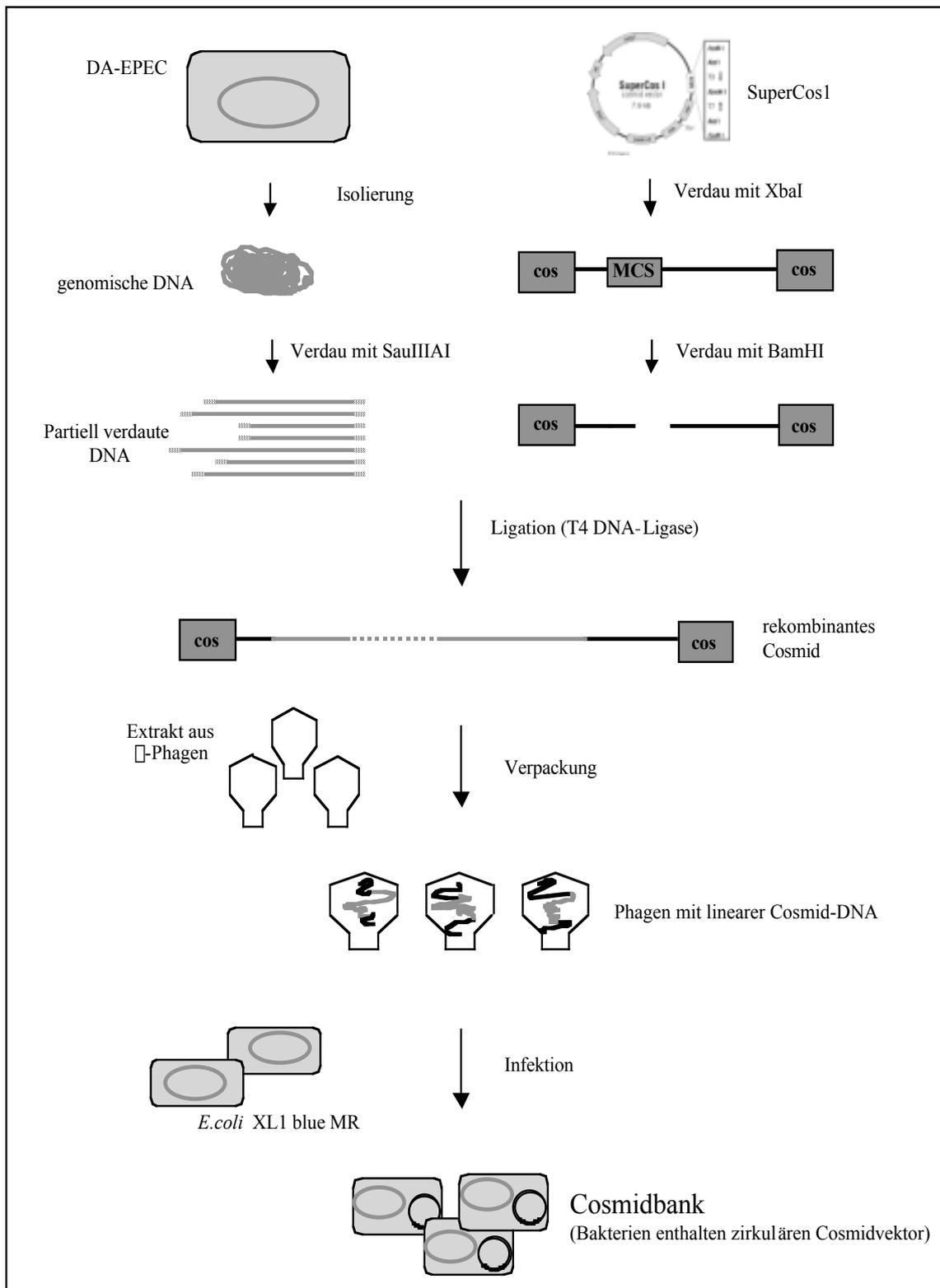


Abb. 4.4 Konstruktion einer Cosmidbank. Partiell verdaute, genomische DNA-Fragmente werden in den linearisierten Cosmidvektor SuperCos1 ligiert. Nach der Verpackung der ligierten und linearen DNA in λ -Phagen werden diese zur Infektion von *E. coli* XL1 blue MR eingesetzt. Dabei wird die lineare Cosmid-DNA auf die Bakterien übertragen, in denen die DNA wieder zirkularisiert wird.

4.6.1 Vervielfältigung von Cosmidbänken

In 15 ml-Reaktionsgefäßen wird jeweils das Volumen an Phagenübestand, das 50000 cfu entspricht, mit dem entsprechenden Volumen an kompetenten *E. coli* XL1 blue MR gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml Standard I-Medium folgt eine weitere Inkubation bei 37°C für 1 h auf einem Schüttler. Im Anschluß daran werden die Bakterien durch eine 10-minütige Zentrifugation sedimentiert, in je 500 µl Medium resuspendiert und auf großen Agarplatten (Durchmesser 135 mm) ausplattiert. Über Nacht werden die Bakterien bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Bakterienkolonien mit 2 mal 3 ml Kanamycin-haltigem Standard I-Medium von den Platten abgespült. Die Bakteriensuspensionen aller Platten werden vereinigt und mit 50 % igem Glycerin auf eine Endkonzentration von 20% eingestellt. Die Bakterien werden schließlich auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und bei -70°C eingefroren.

Um die Anzahl von cfu pro ml eingefrorener Cosmidbank zu bestimmen, wurde die Bakteriensuspension 1:10², 1:10⁴, 1:10⁶ verdünnt und auf Standard I-Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro ml Bakteriensuspension bestimmt.

4.6.2 Koloniehybridisierung

Zur Identifizierung der Cosmide, die den gesamten oder Teile des „Locus of Enterocyte Effacement“ enthalten, werden Koloniehybridisierungen durchgeführt. Dazu wurden 500 µl einer 1:10⁵-Verdünnung der Cosmidbänke auf großen (135 mm im Durchmesser), Kanamycin-haltigen Standard I-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Platten, auf denen etwa 1mm große Kolonien gewachsen sind, für 30 min bei 4°C gekühlt. Anschließend wird eine Nylonmembran mit einem Durchmesser von 132 mm für 1 min auf die Agarplatte gelegt. Um später positive Klone eindeutig zuordnen zu können, wird die Orientierung der Membran auf der Agarplatte durch Einstiche mit einer in Tusche getauchten Nadel markiert. Die Nylonmembran wird von der Platte abgezogen und mit den Kolonien nach oben auf in Denaturierungspuffer getränktes Whatman-Papier mit einer Dicke von 3 mm gelegt. Nach einer 15-minütigen Inkubation wird die Membran zunächst für 15 min auf in Neutralisierungspuffer getränktes Filterpapier gelegt und abschließend für 10 min auf in 2x SSC getränktes Filterpapier plaziert. Durch eine

Bestrahlung der Nylonmembran mit UV-Licht in einem Crosslinker (Stratagene) wird die DNA auf der Membran fixiert.

Um Zellrückstände von der Membran zu entfernen, wird die Membran nach Zugabe von 1 ml Proteinase K-Lösung für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Hilfe von zwei mit Wasser befeuchtete Filterpapiere gereinigt. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte wie in Kap. 4.5.16 beschrieben.

Zur Detektion des LEE in den Cosmiden wurden die Kap. 4.5.14 beschriebenen Sonden verwendet.

4.6.3 Analyse der Cosmid-Klone

Um die genaue Größe der LEE-Fragmente in den Inserts der Cosmid-Klone, die in der Kolonie-Hybridisierung als LEE-positiv detektiert wurden, genauer zu untersuchen, wurden „Multi-Well-PCR“-Analysen durchgeführt (s. Kap. 4.5.15). Dafür wurden Primerpaare verwendet, die LEE-Gene amplifizieren (s. Kap. 4.5.14).

Die Isolierung der Cosmid-DNA erfolgte in einer Plasmid-Mini- bzw. Midi-DNA-Präparation (s. Kap. 4.5.4 und 4.5.5).

4.7 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA (Berlin, BRD) durchgeführt.

Bevor die Cosmidklone sequenziert wurden, wurde mit Hilfe einer Ansequenzierung von 500 bp mit den Standardprimern T3 cos1 und T7 cos1 (s. Tab 4.2) überprüft, ob die Klone die erwarteten LEE-Sequenzen enthalten.

Tab. 4.2 Für die Ansequenzierung verwendete Primer (5' → 3')

T3cos1	GCAATTAACCCTCACTAAAG
T7cos1	GCATAATACGACTCACTATAGG

4.8 Gewinnung und Analyse von Proteinen

4.8.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zum Nachweis der in *E. coli* exprimierten Proteine wurden Gesamtzell-Extrakte hergestellt. Für diese Präparation wurde 1 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 12000 x g und RT für 5 min sedimentiert. Das Sediment wurde in 100-200 µl SDS-Probenpuffer

resuspendiert und zur Denaturierung der Proteine im Wasserbad bei 100°C für 10 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 12000 x g und RT für 5 min wurden 170 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Analyse erfolgte in der SDS-PAGE (s. Kap. 4.8.4).

4.8.2 Gewinnung bakterieller Überstände

Zur Gewinnung bakterieller Überstände von EPEC und DA-EPEC-Stämmen wurden Bakterien aus einer statisch angezogenen Übernachtskultur 1:20 in 30 ml DMEM überimpft und für 3 h bei 37 °C unter 10 % CO₂-Atmosphäre statisch inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C für 15 min gefolgt von zwei weiteren Zentrifugationen bei 17.000 g und 4 °C für 15 min wurde der Überstand von den Bakterien getrennt. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Um Kontaminationen mit Bakterien auszuschließen, wurden zudem 2 ml Überstand über dem Sediment belassen.

4.8.3 Trichloressigsäure-Fällung

Nach Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) zu einer Proteinlösung wurde diese für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 10 min. Das Sediment wurde mit eiskaltem Aceton überschichtet, nochmals 5 min zentrifugiert und nach dem Trocknen zur Analyse mit Hilfe der SDS-PAGE (s. Kap. 4.8.4) in einer entsprechenden Menge Probenpuffer aufgenommen.

4.8.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Trennung von Proteingemischen sowie der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Dabei hängt die Wandergeschwindigkeit der Proteine von ihrem Molekulargewicht, ihrer Ladung und ihrer Konformation ab. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine im Polyacrylamidgel hauptsächlich aufgrund ihrer Masse trennen, wobei die Auflösung durch die Molekularsieb-Eigenschaften des Geles zusätzlich verbessert wird.

Vor der Elektrophorese werden die Proteine durch eine Hitzedenaturierung der Probe entfaltet. Darüberhinaus werden die Proben mit Probenpuffer versetzt, der 2-Mercaptoethanol und Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) enthält. Während das 2-Mercaptoethanol bestehende

Disulfidbrücken reduziert, zerstört das SDS nicht-kovalente Wechselwirkungen im nativen Protein. Außerdem lagert sich das SDS an eine Polypeptidkette an (mit etwa einem SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) und verleiht dieser eine negative Ladung, die proportional zu ihrer Masse ist. Die Eigenladung der Proteine wird dadurch überdeckt. Die Komplexe aus SDS und denaturierten Proteinen wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entsprechend ihrer negativen Ladung und so auch ihrer Masse durch das Gel in Richtung der Anode. Durch das Mitführen von Proteinen bekannter Größe lassen sich Eichkurven erstellen, anhand derer die Molekulargewichte unbekannter Proteine bestimmt werden können (Weber und Osborn, 1975).

Es wurden gleichzeitig fünf Minigele mit den Abmessungen 10 x 8 x 0,075 cm in einer Gelgießkammer der Firma Hoefer Scientific Instruments nach einem in "Current Protocols in Molecular Biology" beschriebenen Verfahren hergestellt (Ausubel *et al.*, 1994). Hierzu wurden Glas- und Keramikplatten gereinigt und entfettet. In einem ersten Schritt wurde das Trenngel (5,5 cm) gegossen (s. Tab. 4.3) und zur Gewährleistung einer ebenen Grenzfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und die Sammelgel-Lösung (s. Tab. 4.3) pipettiert. Die Polymerisierung der Gele erfolgte innerhalb von 30-45 min bei RT. Die Gele können in feuchtem Papier bei 4 °C für 2-4 Wochen aufbewahrt werden.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 1/4 Endvolumen Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Um unlösliche Bestandteile, die die Elektrophorese stören könnten, abzutrennen, wurden die Proben zudem bei 10000 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Die Elektrophorese in den Minigelen erfolgte bei 25 mA für 1h.

Mischung S		Mischung T	
1M Tris-HCl, pH 6,8	750 ml	1M Tris-HCl, pH 8,9	900 ml
0,2 M EDTA	60 ml	0,2 M EDTA	48 ml
10 % SDS (w/v)	60 ml	10 % SDS (w/v)	48 ml
<i>Aqua dest.</i>	130 ml	<i>Aqua dest.</i>	4 ml
Acrylamid-Stammlösung (30 %)			
Acrylamid	30 g		
N,N-Methylenbisacrylamid	0,8 g		
<i>Aqua dest.</i>	ad 100 ml		
filtrieren			

Gel-Lade-Puffer		Laufpuffer für Proteingele (10-fach)	
Glycerin	10 % (v/v)	Tris	30 g
SDS	1,5 % (w/v)	Glycin	140 g
2-Mercaptoethanol	4 % (v/v)	10% SDS (w/v)	100 ml
Tris-HCl, pH 6,8	30 mM	<i>Aqua dest.</i>	ad 1 l
Bromphenolblau	12 % (w/v)		

Tab. 4.3 Volumina der erforderlichen Komponenten für die Herstellung von 5 Minigelen mit den Abmessungen 10 x 8 x 0,075 cm

	Sammelgel	Trenngel			
		5%	9%	10%	13%
Mischung S	3 ml	-	-	-	-
Mischung T	-	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Acrylamid (30%)	3 ml	10,8 ml	12,0 ml	15,6 ml	19,2 ml
Aqua dest.	11,85 ml	17,7 ml	16,5 ml	12,9 ml	9,3 ml
APS (10 %)	180 µl	330 µl	330 µl	330 µl	330 µl
TEMED	9 µl	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl

Tab. 4.4 Trennbereiche von Polyacrylamidgelen für SDS-denaturierte Proteine

Acrylamid- Konzentration	Molekularmasse
5%	60- 200 kDa
10%	30- 70 kDa
15%	12- 45 kDa

4.8.5 Western Blot Analyse

Nach der Trennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel können diese in einem elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (mit einer Porengröße von 0,2 µm und einer Proteinbindungskapazität von 180 µg x cm²) übertragen werden (Burnett, 1981). Diese als „Western-Blotting“ bezeichnete Methode erlaubt eine immunologische Analyse der immobilisierten Proteine, wobei selbst geringe Mengen eines Proteins in einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können.

Transferpuffer (SemiDry)

Tris-Base	48 mM
Glycin	39 mM
pH 9	

Für den elektrophoretischen Transfer nach dem SemiDry-Verfahren werden zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman- Filterpapiere auf die Anodenplatte des SemiDry-Blot-Gerätes gelegt. Darauf wird die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Whatman-Filterpapiere gelegt und der Stapel mit der Kathodenplatte abgedeckt. Der Transfer erfolgt bei einer Spannung von 15 V für 30-45 min.

4.8.6 Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Proteine können nach ihrer elektrophoretischen Trennung und Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgt über den Substratumsatz des an den Zweitantikörper konjugierten Enzyms, in der Regel Alkalische Phosphatase (AP) oder Peroxidase (PO), wobei entweder ein farbiges Produkt präzipitiert oder eine entstehende Chemilumineszenz über die Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird.

TBS (1 x)		AP-Puffer	
NaCl	0,15 M	NaCl	0,15 M
Tris-HCl, pH 7,4	10 mM	MgCl ₂	5 mM
		Tris-HCl, pH 9,5	0,1 M
Blockierungslösung		Verdünnungslösung für Antikörper	
5% Milchpulver in TBS		0,5% Milchpulver in TBS	
NBT-Lösung		BCIP-Lösung	
NBT	500 mg	BCIP	500 mg
DMF	70 % (v/v)	DMF	ad 10 ml
<i>Aqua dest.</i>	ad 10 ml		

Die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wurde zunächst für 1 h bei RT auf einem Wippschüttler in Blockierungslösung geschwenkt, um freie Proteinbindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen Erstantikörper, der mit 0,5% Milchpulver in TBS nach Herstellerangaben verdünnt wurde, für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch drei Waschschriffe mit PBS-T entfernt, bevor die

Membran mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten AP-gekoppelten Zweitantikörper für 1h bei RT inkubiert wurde. Danach wurde überschüssiger Zweitantikörper durch erneutes Waschen in PBS-T entfernt, und die Membran in AP-Puffer äquilibriert.

Die Detektion erfolgte durch die Zugabe von 15 ml AP-Puffer und je 50 µl BCIP- und NBT-Stammlösung. An Stellen auf der Membran, an denen das Antikörperkonjugat gebunden hat, wird das BCIP/NBT-Substrat durch die alkalische Phosphatase des Sekundär-Antikörpers zu einem blavioletten Präzipitat umgesetzt. Die Entwicklung wurde solange durchgeführt, bis deutliche Signale zu erkennen waren, dann wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in Wasser gestoppt.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen der Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die die Kultivierung von Epithelzellen aus dem Dünndarm von Mäusen über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen ermöglicht. Die Etablierung der Primärkultur baute auf den im Rahmen der Diplomarbeit (Julia Gärtner, 1999) durchgeführten Experimenten zur Kultivierung von Darmepithelzellen der Ratte auf. Letztlich soll die Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen als Grundlage für den Aufbau einer epithelialen Zelllinie und darüberhinaus für den Aufbau eines Modellsystems für intestinale M-Zellen eingesetzt werden.

5.1.1 Isolierung und Kultivierung primärer, intestinaler Epithelzellen der Maus

Ein wichtiger Aspekt für den Erfolg der Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen ist die Verwendung neonataler und steril gehaltener Tiere. Nur bei Einsatz der Dünndärme von 4-10 d alten Mäusen können erfolgreich Epithelzellen kultiviert werden, nicht aber bei Verwendung juveniler oder adulter Tiere (Evans *et al.*, 1992; J. Gärtner, 1999). Darüberhinaus ist entscheidend, daß die präparierten Dünndärme stets auf Eis bearbeitet werden, um eine Dissoziation des Gewebes durch gewebeeigene Proteasen zu verhindern. Zudem werden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin supplementiert, um die Bakterien der Darmflora direkt abzutöten und somit eine Kontamination der Primärkultur zu verhindern.

Die Etablierung einer Primärkultur erfordert eine sehr schonende Ablösung der empfindlichen Epithelzellen von den darunterliegenden Bindegewebsschichten. Dafür erwies sich der Verdau des in kleine Fragmente geschnittenen Dünndarmgewebes (s. Abb. 5.1A) mit einem Gemisch der proteolytischen Enzyme Dispase I und Collagenase XI für 10 min bei einer Temperatur von 20°C als beste und schonenste Methode, da sich die Epithelzellen auf diese Weise in intakten Zellverbänden von den darunterbefindlichen Schichten ablösen lassen (J. Gärtner, 1999). Durch vorsichtiges Pipettieren werden die Epithelzellverbände anschließend mechanisch dissoziiert und schließlich durch zwei Sedimentationsschritte für je 1 min bei 1 x g von größeren Gewebefragmente abgetrennt. Der Überstand, der die Epithelzellverbände enthält, wird abgenommen und nach Zugabe von sorbitolreichem Medium zentrifugiert. Bei

dieser Gradienten-Zentrifugation verbleiben Einzelzellen, Zelldebris und nicht-epitheliale Zellen zum größten Teil im Überstand und lassen sich somit von den im Pellet gesammelten, epithelialen Zellverbänden abtrennen (MacCartney *et al.*, 2000). Dieser Waschschrift wird noch einmal wiederholt. Das Zellsediment wird schließlich in Kulturmedium aufgenommen und in 24-Loch-Platten ausgesät.

Da die Zellen in Zellverbänden isoliert werden, ist eine exakte Bestimmung der Zellzahl der Suspension nicht möglich. Stattdessen wird die Zahl der Zellverbände abgeschätzt, von denen etwa 100 pro Kavität einer 24-Loch-Platte ausgesät werden. Um möglichst schnell einen Kontakt zwischen Zellen und Boden der Kulturplatten herzustellen, werden die Zellverbände in einem relativ kleinen Volumen von etwa 400 µl Kulturmedium ausgesät (s. Abb. 5.1 B).

Die Beschichtung der Kulturplatten mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix hat darüberhinaus einen positiven Einfluß auf die Primärkultur: Die Zellen werden auf beschichteten Platten schneller adhärent, wodurch ihre Überlebenschance *in vitro* deutlich verbessert wird. Auf Kulturschalen, die mit einem Gemisch aus Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet sind, werden die Zellen am schnellsten adhärent und wachsen zu Monolayern aus. Auch die Beschichtungen mit Fibronectin und Collagen I hatten im Vergleich zu unbeschichteten Platten einen positiven Effekt auf die Primärkultur. Dagegen verbesserte die Beschichtung mit Laminin die Adhärenz und das Wachstum der Zellen nicht.

Das verwendete Kulturmedium spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Kultivierung primärer Epithelzellen. Die Supplementierung des Mediums mit einem Gemisch aus Insulin, Transferrin und Selensäure, das die Proliferationsfähigkeit und die Überlebensfähigkeit von kultivierten Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt steigert (Moyer & Aust, 1984), sowie mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), der einen mitogenen Effekt auf epitheliale Zellen ausübt und das Auswachsen der Zellen aus adhärennten Zellverbänden fördert (Evans *et al.*, 1992), verbesserte die Überlebensdauer der Zellen deutlich. Darüberhinaus wurde dem Medium die Hormone Dexamethason und Triiodothyronin zugefügt, die ebenfalls einen positiven Effekt auf die primären Epithelzellen zeigten. Neben den Antibiotika Penicillin und Streptomycin wurde das Kulturmedium zudem mit dem Antimykotikum Amphotericin B versetzt, um mikrobielle Kontaminationen zu verhindern.

5.1.2 Charakterisierung der isolierten Zellen

Um den Zustand der Zellen direkt nach der Isolierung zu untersuchen, wurde eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Diese zeigte, daß etwa 98 % der in Zellverbänden vorliegenden Zellen vital, d.h. nicht angefärbt, sind.

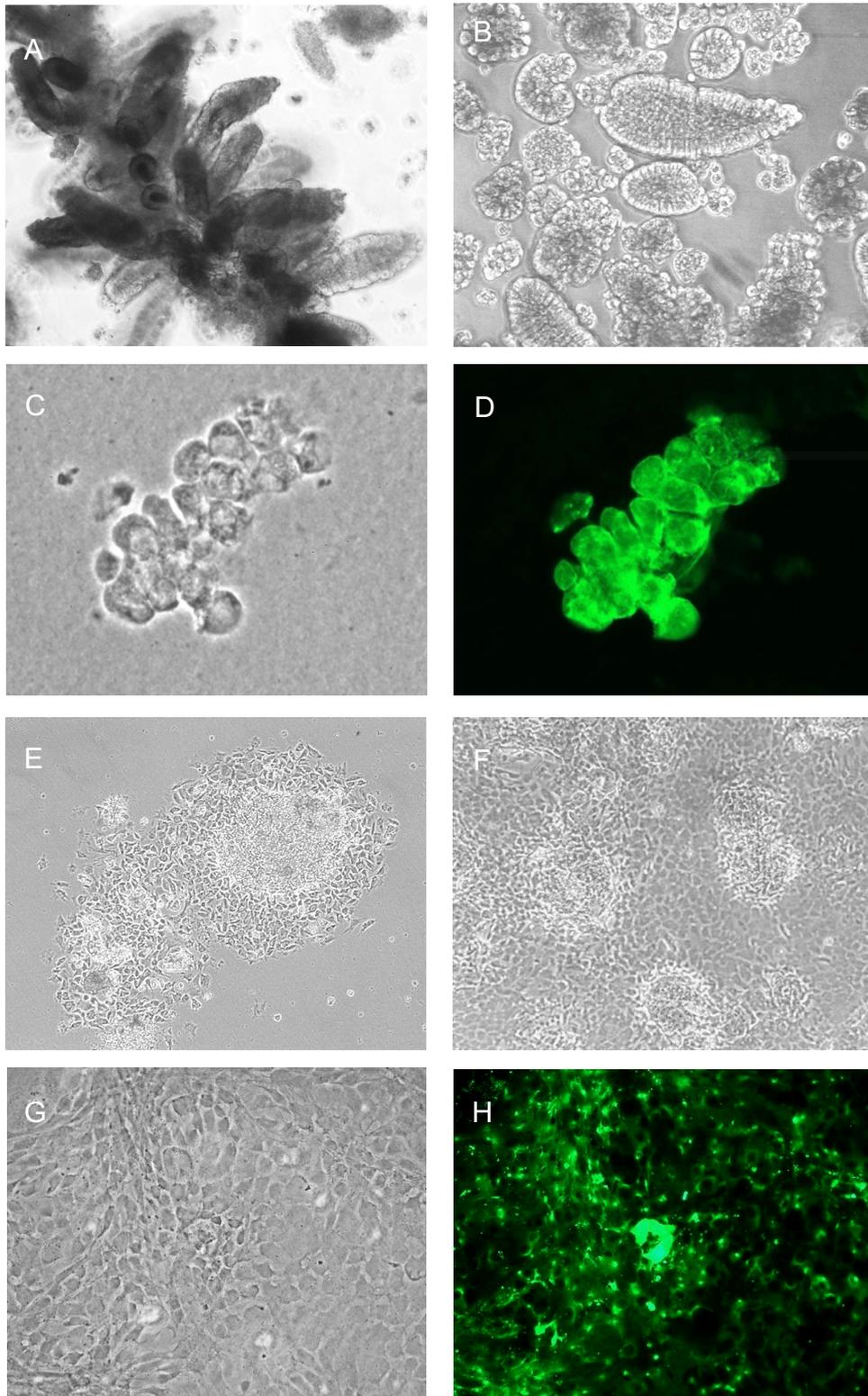


Abb. 5.1 Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen.

(A) Intestinales Darmgewebe vor dem Verdau. (B) Ausgesäte Zellsuspension: Die Epithelzellen liegen zum größten Teil in Zellverbänden vor. (C & D) Zytospin-Präparat der Primärkultur direkt nach Isolierung der Zellen: Im Durchlicht (C) bzw. angefärbt mit einem pan-Keratin-Antikörper (1:400) und einem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper (D). (E) Aus einem adhärenen Zellverband wachsen Epithelzellen aus. (F) Die aus mehreren Zellverbänden ausgewachsenen Epithelzellen bilden einen Monolayer. (G & H) Monolayer aus primären intestinalen Epithelzellen im Durchlicht (G) bzw. nach anti-Keratin-Färbung (H).

Zur Charakterisierung der Zellen wurden zudem mit der frisch isolierten Zellsuspension Zytospin-Präparate (s. Kap.4.4.10) hergestellt und diese für eine Immunfluoreszenz-Analyse mit einem pan-Keratin-Antikörper, einem spezifischer Epithelzellmarker, eingesetzt. Die Färbung mit diesem Marker ergab, daß es sich bei 95 % der isolierten Zellenverbände um Epithelzellen handelt (s. Abb. 5.1 C & D).

5.1.3 Charakterisierung der Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen

Einige Stunden nach Aussaat der Zellen hat sich das Erscheinungsbild der Primärkultur deutlich verändert: Die meisten der isolierten Zellverbände sind in kleinere Zellgruppen dissoziiert, von denen einige schon zu diesem Zeitpunkt adhären sind. Die Zahl der toten Zellen, die meist als Einzelzellen vorliegen, ist angestiegen.

Je nach Zustand der Zellen wird das Kulturmedium 24 bis 48 h nach Aussaat der Zellen zu etwa der Hälfte von den Zellen entfernt und durch frisches Medium ersetzt. In der Kultur befinden sich zu diesem Zeitpunkt kleine Verbände adhärenter Epithelzellen, aber auch sehr viele abgestorbene Zellen, die durch den Austausch des Mediums abgenommen werden. Im Laufe der nächsten Tage wachsen die Epithelzellen aus den adhären Zellverbänden aus (s. Abb. 5.1 E), bis sie im optimalen Fall den gesamten Boden einer Kavität einer 24-Loch-Platten bewachsen (s. Abb. 5.1 F). Die Zellen weisen eine typische epitheliale Zellmorphologie auf und bilden einen kompakten, pflastersteinartigen Monolayer aus. Um nachzuweisen, daß es sich bei den auswachsenden Zellverbänden bzw. den Monolayern um Epithelzellen handelt, wurden neben der morphologischen Bestimmung Immunfluoreszenz-Analysen mit einem anti-pan-Keratin-Antikörper durchgeführt. Dazu wurde die Primärkultur auf ECM beschichteten Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Die Färbung mit diesem Epithelzellmarker bestätigte, daß es sich bei fast allen Monolayern um Epithelzellen handelte (s. Abb. 5.1 G & H).

In der Primärkultur wachsen vereinzelt auch andere Zelltypen. So findet man in wenigen Kavitäten der 24-Loch-Platte Fibroblasten, Muskelzellen oder Endothelzellen, die sich oft an den Rändern der Epithelzellverbände befinden oder in seltenen Fällen auch in kleinen Verbänden wachsen können. Anhand ihrer im Vergleich zu den Epithelzellen länglicheren Morphologie lassen sich diese Zelltypen aber deutlich von den Epithelzellen unterscheiden. Zudem können diese Zellen nicht mit dem Keratin-Antikörper angefärbt werden.

Die Lebensspanne der primären Epithelzellen beträgt etwa 10 bis 14 Tage. Nach etwa 7 bis 10 Tagen beginnen die Zellen abzusterben: Das Zytoplasma wird granulärer, die Zellen bilden Vakuolen aus und beginnen schließlich, sich vom Boden der Kulturschale abzulösen.

5.1.4 Etablierung einer Zelllinie aus intestinalen Epithelzellen

Da die Lebensdauer der primären Epithelzellen aus dem Mäusedünndarm auf 10 bis 14 Tage begrenzt ist, wurden Versuche unternommen, die Zellen mit Hilfe des SV40 largeT-Antigens zu immortalisieren.

5.1.4.1 Konstruktion von pEGFP-T

Zunächst wurde das Plasmid pEGFP-T (s. Anhang Abb. 8.1) konstruiert, das neben dem SV40 large T-Antigen auch für das grünfluoreszierende Protein (EGFP, „enhanced green fluorescence protein“) und eine Neomycin/Kanamycin-Resistenz kodiert. Der Erfolg der Transfektion der Zellen mit diesem Konstrukt läßt sich somit anhand der GFP-Expression und einer Resistenz gegen Neomycin überprüfen.

Die SV 40 large T-Antigen-Gencassette aus dem Plasmid pSV7 wurde mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Primer JG7 und JG8 amplifiziert. Das 3,4 kb große DNA-Fragment wurde anschließend mit *EcoRI* restringiert. Parallel dazu wurde der Vektor pEGFP-N3 ebenfalls mit *EcoRI* verdaut und anschließend, um eine Religation der DNA zu verhindern, dephosphoryliert. Das 3 kb große Fragment des Vektors pEGFP-N3 sowie das 3,4 kb große Fragment der SV 40 large T-Antigen-Gencassette wurde im Anschluß daran ligiert. Mit dem Ligationansatz wurden elektrokompente Bakterien des Laborstammes *E. coli* DH5 α transformiert. Klone, die das Konstrukt pEGFP-T (s. Anhang Abb. 8.1) enthalten, wurden mit Hilfe einer Restriktionsanalyse ermittelt.

5.1.4.2 Transfektion der Primärkultur mit dem Vektor pEGFP-T

Für die Transfektion der Primärkultur mit dem Vektor pEGFP-T wurden die Transfektionsreagentien „Effectene“ (QIAGEN, Hilden, BRD) und „SuperFect Transfection Reagent“ (QIAGEN, Hilden, BRD) verwendet; außerdem wurde versucht, den Vektor durch eine Elektroporation in die Zellen einzubringen. Die eingesetzte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe einer Plasmid-Midipräparation isoliert.

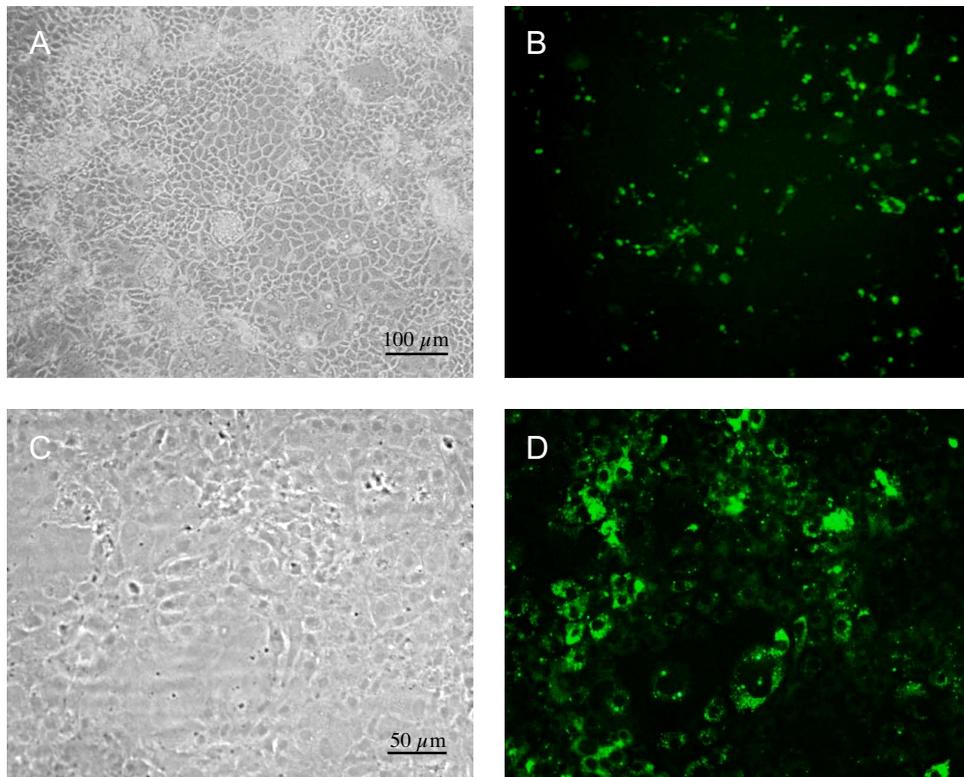


Abb. 5.2 Transfizierte Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen.

Monolayer aus primären intestinalen Epithelzellen nach Transfektion mit dem Vektor pEGFP-T im Durchlicht (**A & C**) bzw. unter dem Fluoreszenzmikroskop (Anregungswellenlänge: 395 nm) (**B & D**).

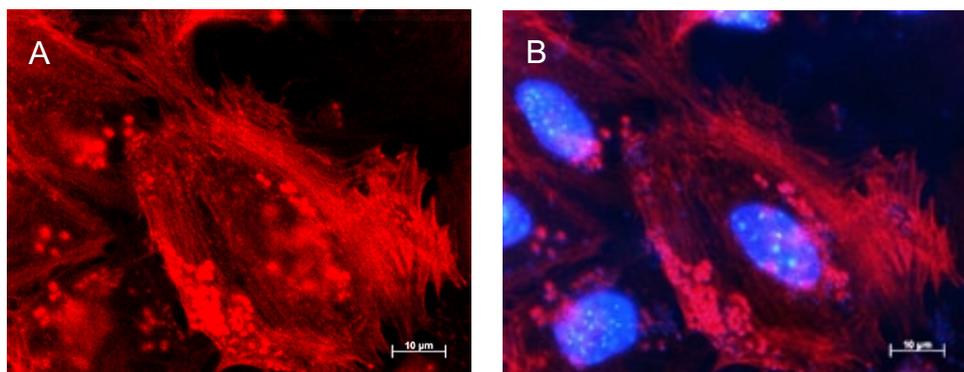


Abb. 5.3 Infektionen der Primärkultur mit EPEC 2348/69.

(**A**) Nach Anfärbung mit Phalloidin-Texas Red, (**B**) nach Anfärbung mit Phalloidin-Texas Red und Hoechst 33258.

Am erfolgreichsten war die Transfektion der primären, adhärent wachsenden Epithelzellen bei Verwendung des Transfektionsreagenz Effectene. Etwa 5-10 % der Zellen exprimierten 24-48 Stunden nach Durchführung der Transfektion GFP (s. Abb. 5.2 A & B); einige Zellen überlebten den Prozeß der Transfektion nicht und starben in Folge der Behandlung ab. Trotz der erfolgreichen Transfektion einiger Zellen und obwohl zum Teil ganze Zellverbände erfolgreich transfiziert werden konnten (s. Abb. 5.2 C & D), konnte die Lebensspanne der Primärkultur nicht verlängert werden: Die transfizierten Zellen starben ebenso wie die nicht-transfizierten Zellen nach maximal 14 d in Kultur ab.

Da die transfizierten Zellen neben GFP auch eine Resistenz gegen Neomycin exprimieren, wurde versucht, die transfizierten Zellen durch Zugabe dieses Antibiotikums zu selektionieren. Die Supplementierung des Mediums mit Neomycin führte aber innerhalb weniger Stunden zum Absterben der gesamten Kultur, was darauf zurückzuführen ist, daß die resistenten Zellen aufgrund des Kontaktverlustes zu ihren benachbarten Zellen ebenfalls absterben.

Versuche, die Primärkultur direkt nach der Isolierung, also noch in Suspension, zu transfizieren, scheiterten: Die Zellen dieser Kulturen wurden nicht adhärent, exprimierten nur ganz vereinzelt GFP und starben innerhalb von 2 Tagen ab.

Die Transfektionsrate der adhären Zellen der Primärkultur bei Verwendung des „SuperFect Transfection Reagent“ fiel deutlich geringer aus als bei Verwendung des Effectene. Etwa 2 % der Zellen exprimierten 1-2 Tage nach der Behandlung GFP. Zwar erwies sich dieses Reagenz ebenfalls als kaum zytotoxisch für die primären Epithelzellen, doch aufgrund der geringen Transfektionsrate konnte auch in diesem Ansatz die Lebensspanne der transfizierten und GFP-exprimierenden Zellen nicht verlängert werden. Eine Transfektion der primären Epithelzellen direkt nach der Isolierung führte beim „SuperFect Transfection Reagent“ genau wie schon für die Transfektion mit Effectene beschrieben dazu, daß die Zellen nicht adhärent wurden, sondern innerhalb der folgenden 2 Tage abstarben.

In einem dritten Ansatz wurde getestet, ob sich die Zellen der Primärkultur elektroporieren und mit dieser Methode transfizieren lassen. Eine Elektroporation eukaryotischer Zellen ist möglich, wenn die Zellen in Suspension kultiviert werden oder, wenn die Zellen auf Filtern wachsen. Da es nicht gelang, die primären Epithelzellen auf Transwell-Filter mit und ohne Beschichtung sowie mit unterschiedlicher Porengröße zu kultivieren, wurde versucht, die Primärkultur direkt nach der Aussaat in Suspension zu elektroporieren. Aufbauend auf den im Rahmen der Transfektion von primären Epithelzellen aus dem Dünndarm von Ratten erzielten Ergebnissen (J. Gärtner, 1999) wurden die Zellen mit einem Einzelpuls von 230 bis 300V bei

einer Kapazität von 1500 μF und einem unendlichen Widerstand elektroporiert. Es zeigte sich, daß trotz einer Reihe von Modifizierungen bei der Durchführung viele Zellen direkt durch die Elektroporation abgetötet wurden, und darüberhinaus die Zahl der transfizierten (und GFP exprimierenden) Zellen 1-2 Tage nach der Transfektion sehr gering war ($< 1\%$). Außerdem waren die überlebenden Zellen nur noch sehr vereinzelt in der Lage, adhärenz zu werden, und konnten nicht mehr zu Monolayern auswachsen.

Versuche, die bereits adhärenz wachsenden Epithelzellen zunächst durch eine Accutase-Behandlung von den Kulturschalen abzulösen und dann zu transfizieren, führten ebenfalls bei allen drei angewandten Methoden nicht zum gewünschten Erfolg.

5.1.5 Infektionen der intestinalen Primärkultur mit dem EPEC-Stamm E2348/69

Die Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen wurde für Infektionsversuche mit dem EPEC-Stamm E2348/69 eingesetzt. Die Bakterien infizieren die Epithelzellen und induzieren die für EPEC-Infektionen charakteristischen A/E-Läsionen. So konnte in einem FAS-Test (Kap. 4.4.12) gezeigt werden, daß es in den Zellen unterhalb adhärenzender Bakterien zu der mit dem A/E-Phänotyp assoziierten Akkumulation von F-Aktin kommt (s. Abb. 5.3 A & B).

5.2 Etablierung und Charakterisierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen

5.2.1 Etablierung eines Zellkultursystems für M-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Zellkulturmodell für M-Zellen etabliert werden, das die Kultivierung dieser speziellen Epithelzellen erlaubt und zudem eine genauere Untersuchung ihrer Funktion *in vitro* ermöglicht. Da eine direkte Isolierung von M-Zellen aufgrund ihrer geringen Anzahl im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) sowie ihrer sehr speziellen und empfindlichen Morphologie nur schwer möglich ist, wurde der Versuch unternommen, die Bildung von M-Zellen *in vitro* zu induzieren. Dazu wurden aufgrund der Beobachtung, daß Zellen des Immunsystems, wie B- oder T-Lymphozyten sowie Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von M-Zellen spielen, und aufbauend auf einem von S. Kerneis *et al.* (1997) etablierten M-Zell-Modell differenzierte Epithelzellen in einem Co-Kultur-System mit Lymphozyten kultiviert.

5.2.1.1 Kultivierung von Caco-2-Zellen auf Transwell-Filtern

In einem ersten Ansatz sollte die Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen für die Induktion von M-Zellen eingesetzt werden. Doch aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer und aufgrund der Tatsache, daß diese Zellen nicht in der Lage sind, auf Transwell-Filtern zu wachsen, wurde schließlich die Caco-2-Zelllinie für die Co-Kultur verwendet.

Die Caco-2-Zelllinie wurde aus einem Colon-Adenocarcinom isoliert und ist aufgrund ihrer Fähigkeit, sich unter normalen Kulturbedingungen spontan zu enterozytenähnlichen Zellen zu differenzieren, für die Induktion von M-Zellen gut geeignet. Der Anteil differenzierter Zellen nimmt mit der Dauer der postkonfluenten Kultivierung zu (Fogh *et al.*, 1977; Pinto *et al.*, 1983). So bilden die Caco-2-Zellen nach 2-3 Wochen in Kultur einen Monolayer aus polarisierten Erythrozyten aus (s. Abb. 5.5 A), der morphologisch und physiologisch dem Dünndarmepithel sehr ähnlich ist. Die Zellen weisen einen dichten Mikrovillisaum mit rudimentärer Glykokalix auf und bilden zu benachbarten Zellen „tight junctions“ sowie „adherence junctions“ aus. Zudem zeichnen sie sich durch eine kolumnäre Morphologie mit Trennung der Plasmamembran in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment aus.

Für die Etablierung eines M-Zell-Modells wurden Caco-2-Zellen und Lymphozyten zusammen in einem Transwell-Filter-System kultiviert (s. Abb. 5.4). 3×10^5 Caco-2-Zellen wurden mit ihrem apikalen Mikrovillisaum in Richtung der unteren Kammer auf der Unterseite der Polykarbonat-Filter mit einer Porengröße von $3 \mu\text{m}$ kultiviert. Dazu wurden die Caco-2-Zellen auf den umgedrehten Filtern ausgesät und über Nacht in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert (s. Abb. 5.4 A). Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, durfte diese Inkubation maximal 12-14 h dauern, dann wurden die Filter in das untere, mit Medium gefüllte Kompartiment gehängt (s. Abb. 5.4 B). Nach einer 14-tägigen Kultivierung haben die Epithelzellen einen differenzierten Monolayer ausgebildet (s. Abb. 5.4 C). Es folgt die Zugabe der Lymphozyten, die in die obere Kammer des Filtersystems ausgesät werden (s. Abb. 5.4 D). Dieser Versuchsaufbau ermöglicht die Kultivierung der Lymphozyten auf der basolateralen Seite der Epithelzellen und ahmt somit die *in vivo*-Bedingungen im FAE des Dünndarms nach.

5.2.1.2 Isolierung von Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques der Maus

Um die Bildung von M-Zellen aus differenzierten Epithelzellen zu induzieren, erschien der Einsatz von Lymphozyten sinnvoll, die aus den Peyer'schen Plaques stammen, also aus dem Gewebe, das auch *in vivo* an der Bildung von M-Zellen beteiligt ist. Aus diesem Grund

wurden Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques von Mäusen isoliert und anschließend zusammen mit differenzierten Epithelzellen kultiviert.

Bei Anwendung der beschriebenen Isolierungsmethode erhält man im Durchschnitt pro Peyer'schen Plaque 1×10^6 Zellen. Die FACScan Analyse („Fluorescent Analyzer Cell Sorter“) ergab, daß es sich bei diesen Zellen zu 56 % um B-Lymphozyten (CD 45R positiv) und zu 31 % um T-Lymphozyten (CD3 positiv) handelt. Die restlichen 13 % der Zellen sind Makrophagen, dendritische Zellen sowie Epithel- und Endothelzellen. Das Ergebnis der FACS Analyse entspricht der erwarteten Zusammensetzung in Peyer'schen Plaques von Balb/c-Mäusen (Kerneis *et al.*, 1997; T.T. MacDonald and P.B. Carter, 1982). Aufgrund der geringen Menge an isolierten Zellen war es nicht möglich, die Zellen, beispielsweise durch Verwendung von Ficoll- und Percollgradienten, anzureichern.

5.2.1.3 Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus murinen Peyer'schen Plaques

100 µl der Zellsuspension mit 1×10^6 Lymphozyten isoliert aus murinen Peyer'schen Plaques wurden in die obere Kavität des Transwell-Filter-System gegeben und für 3-6 Tage in Co-Kultur mit differenzierten Epithelzellen kultiviert.

Wie in EM-Präparationen gezeigt werden konnte, wandern die Lymphozyten durch die Poren der Filter in den epithelialen Monolayer ein (s. Abb. 5.5 B). Dies ist nur bei einer Porengröße von 3 µm, nicht aber bei einer Porengröße von 0,4 µm möglich. Die Lymphozyten wandern durch die Poren (entlang des offenen Pfeils) und lassen sich in der Epithelschicht nieder. Durch das Einwandern der Lymphozyten in die Epithelzellschicht kommt es zu morphologischen Veränderungen einer Subpopulation der Epithelzellen. Einige Zellen des Monolayers der Co-Kultur weisen im Vergleich zur Kontrolle einen deutlich reduzierten und unregelmäßige Mikrovillisaum auf, wie man ihn typischerweise auf M-Zellen findet. Dies wird deutlich in Abb. 5.5 B, in der die linke Zelle einen geordneten Mikrovillisaum besitzt, während die Mikrovilli der benachbarten Zelle ungeordneter und verkürzt erscheinen.

Es konnte beobachtet werden, daß die eingesetzte Zahl an Lymphozyten mit dem ausgelösten Effekt korreliert: Je mehr Lymphozyten verwendet werden, desto mehr Caco-2-Zellen zeigen auch eine morphologische Veränderung. Zu viele Lymphozyten ($> 2 \times 10^6$) führen dagegen zu einer Durchlöcherung des Caco-2-Monolayers, während man bei Einsatz von zu wenigen Lymphozyten ($< 1 \times 10^6$) keinen Effekt sieht.

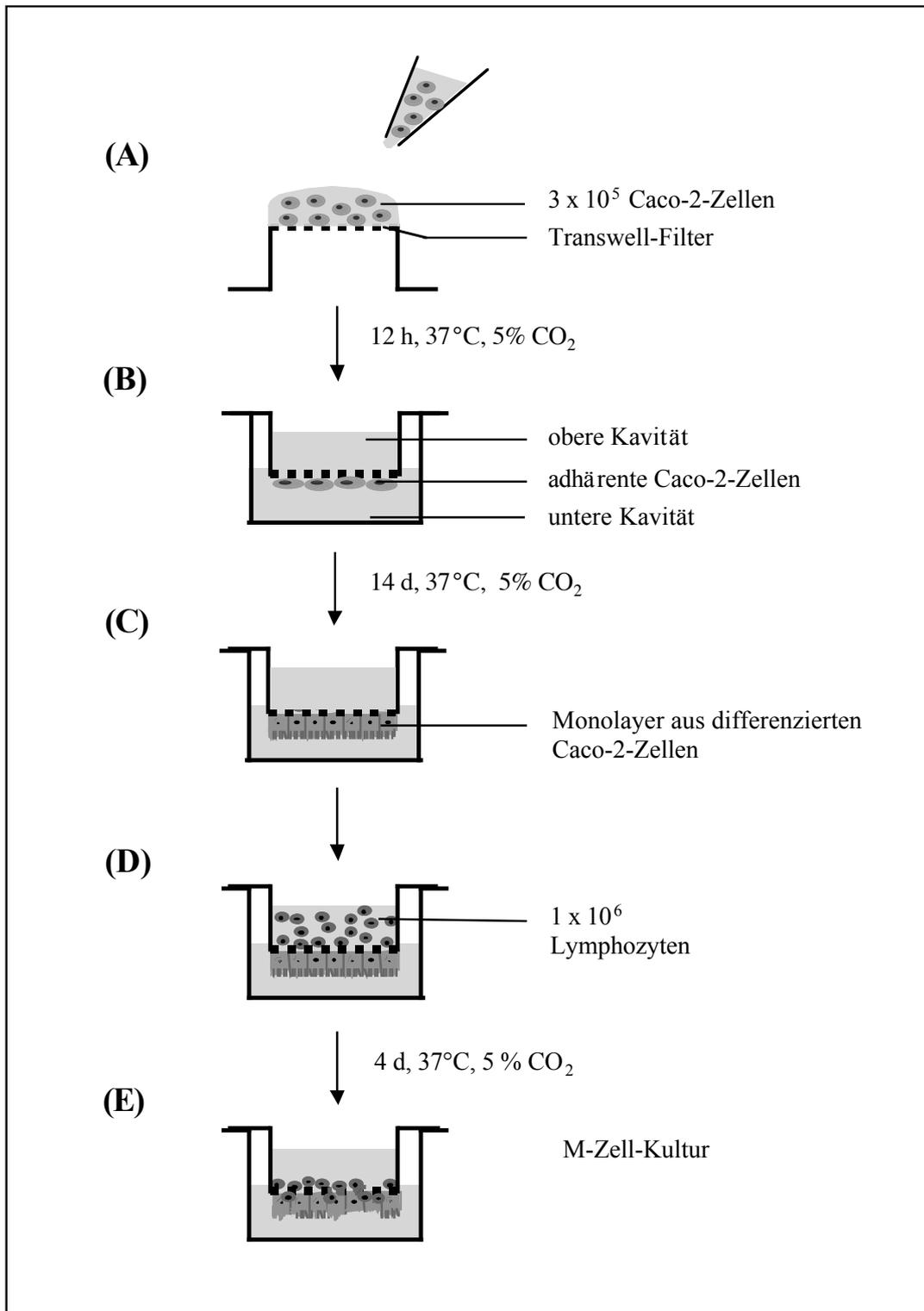


Abb. 5.4 Schematische Darstellung der Etablierung eines Zellkultur-Modells für M-Zellen.

(A) Aussaat der Caco-2-Zellen auf der unteren Filterseite, (B) Adhärenz der Caco-2-Zellen im Transwell-Filter-System, (C) Kultivierung der Caco-2-Zellen bis zur Differenzierung, (D) Aussaat von Lymphozyten in die obere Kammer des Filter-Systems, (E) M-Zell-Modell.

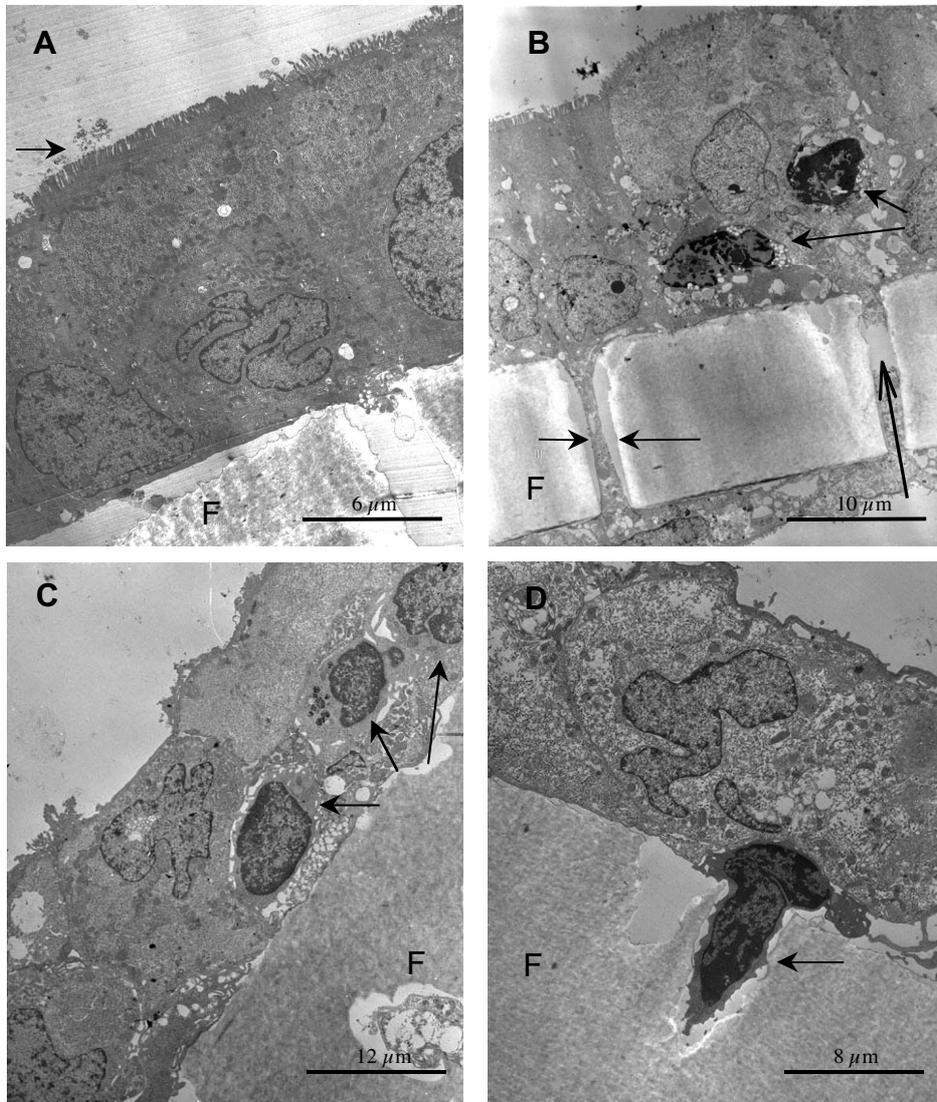


Abb. 5.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Caco-2-Monolayers und des M-Zell-Modells.

(A) Auf Filtern (F) kultivierte Caco-2-Zellen bilden nach 14 d in Kultur einen differenzierten Monolayer mit apikalem Mikrovillisaum aus (Pfeil); (B) M-Zell-Modell: Lymphozyten aus murinen Peyerschen Plaques sind durch die $3\ \mu\text{m}$ Poren (Pfeile) des Filters (F) in den Caco-2-Monolayer eingewandert (in Richtung des offenen Pfeils); (C) M-Zell-Modell: Die Präsenz humaner Lymphozyten (Pfeile) in den Caco-2-Monolayer verändert die Morphologie einer Subpopulation der Epithelzellen; (D) M-Zell-Modell: Ein humaner Lymphozyt (Pfeil) wandert durch die $3\ \mu\text{m}$ Pore des Filters (F) in die Epithelschicht ein.

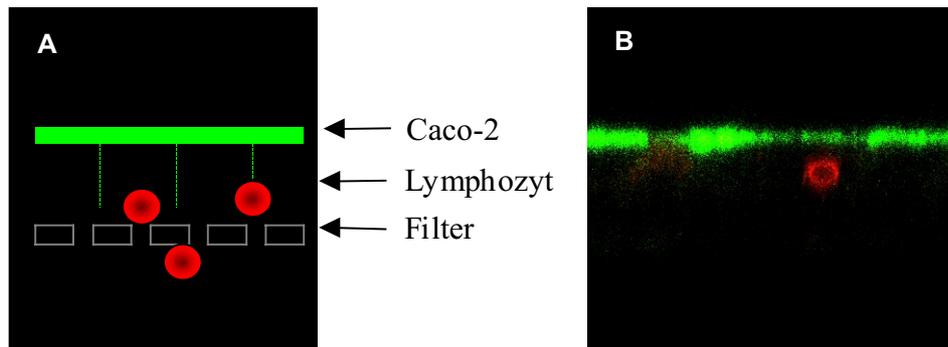


Abb. 5.6 Detektion von Lymphozyten im Co-Kultur-Modell.

(A) Schematischer Querschnitt durch die Co-Kultur aus Caco-2-Zellen (grün) und Lymphozyten (rot) auf einem Filter mit einer Porengröße von 3 μm .

(B) Confokale Aufnahme der Co-Kultur: Die apikale Oberfläche der Caco-2-Zellen ist mit UEA-1-FITC gefärbt, die murinen Lymphozyten sind mit einem spezifischen B-Zell-Antikörper (anti-CD 45R) markiert.

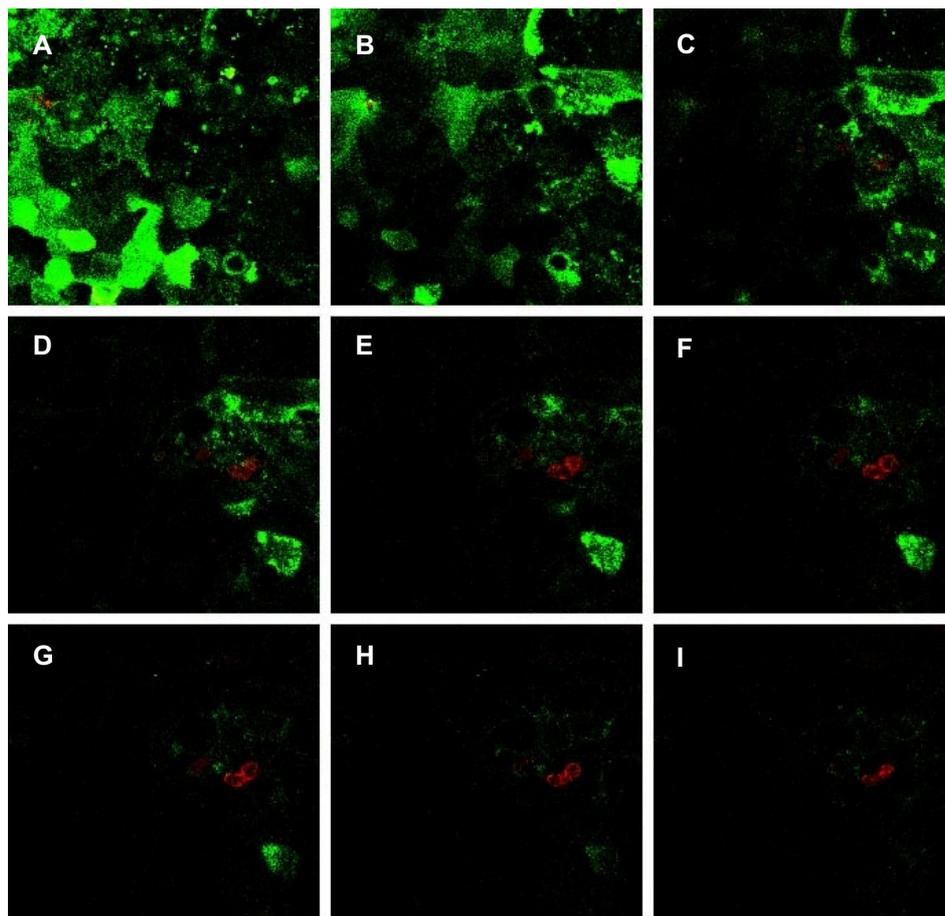


Abb. 5.7 Detektion von Lymphozyten im Co-Kultur-Modell.

Im Confokalen Laserscanning Mikroskop (CFSM) wurde von der apikalen Seite der Zellen (A) in Richtung der basolateralen Seite (I) in 0,6 μm -Schritten durch die Zellschicht gescannt. Die apikale Seite der Caco-2-Zellen ist mit UEA-1-FITC gefärbt, die humanen Lymphozyten sind mit einem Antikörper gegen CD 45R und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper markiert (D) bis (I).

Als optimaler Zeitraum für die Co-Kultivierung erwiesen sich 4 d. Diese Zeitspanne ermöglicht es den Lymphozyten in die Schicht aus Caco-2-Zellen einzuwandern und Veränderungen in diesen Zellen zu induzieren.

Neben der morphologischen Bestimmung konnte zudem durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen CD45R nachgewiesen werden, daß es sich bei den in den Monolayer eingewanderten Zellen um B-Lymphozyten handelt. In Abb. 5.6 sieht man einen Querschnitt durch den Monolayer der Co-Kultur. Die apikale Seite der Caco-2-Zellen ist durch eine Färbung mit dem Lektin UEA-1 markiert. Zwischen dieser die apikale Seite der Zellen markierenden Färbung und dem Filter konnten einige Zellen im Monolayer mit dem anti-CD45R-Antikörper spezifisch markiert werden. In horizontalen Serienschnitten (s. Abb. 5.7), die an der apikalen Seite der Zellen beginnen und in 0,6 µm Schritten Richtung Filter gehen, sieht man, daß sich die Lymphozyten in einer tieferen Ebene befinden als die Mikrovilli der Epithelzellen, aber noch oberhalb des Filters.

Darüberhinaus wurden die Caco-2-Zellen auf Filtern mit einer Porengröße von 0,4 µm gemeinsam mit Lymphozyten kultiviert. Diese geringe Porengröße verhindert ein Einwandern der Lymphozyten in den epithelialen Monolayer. Eine Veränderung in der Morphologie der Caco-2-Zellen war bei Verwendung dieser Filter nicht zu beobachten. Daraus läßt sich schließen, daß der direkte Kontakt von Epithelzellen und Lymphozyten für die Induktion von morphologischen Veränderungen in den Caco-2-Zellen entscheidend ist. Zudem scheinen von den Immunzellen sezernierte Faktoren zumindest in diesem Aufbau des Co-Kultur-Modells für die beobachteten Veränderungen der Caco-2-Zellen nicht ausreichend zu sein.

5.2.1.4 Isolierung von Lymphozyten aus humanem, venösem Blut

In einem weiteren Ansatz wurden untersucht, ob auch Lymphozyten aus humanem Blut für die Induktion von M-Zellen eingesetzt werden können. Humane Lymphozyten stammen zwar aus derselben Spezies wie die verwendeten Caco-2-Epithelzellen, haben aber den möglichen Nachteil auf, daß sie nicht aus dem Gewebe gewonnen wurden, das auch *in vivo* an der Bildung von M-Zellen beteiligt ist.

Mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten werden zunächst mononukleäre Zellen von Blutplasma und Erythrozyten abgetrennt. Anschließend erfolgt durch einen Percoll-Gradienten eine weitere Aufreinigung der Lymphozyten. Mit dieser Methode können aus etwa 45 ml venösem Blut je

nach Spender etwa 2×10^8 Lymphozyten isoliert werden (s. Abb. 5.8). Die Suspension aus Blutlymphozyten besteht in etwa zu 40 % aus B- und zu 60 % aus T-Lymphozyten.

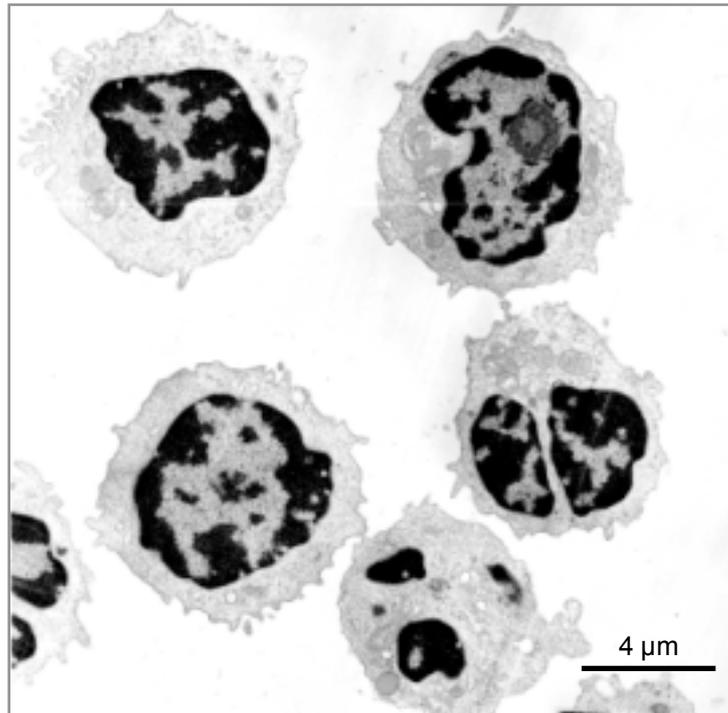


Abb. 5.8 Elektronenmikroskopische Aufnahme humaner Blutlymphozyten.

5.2.1.5 Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus humanem Blut

Im Elektronenmikroskop konnte auch für die Co-Kultur mit humanen Blutlymphozyten gezeigt werden, daß die Lymphozyten durch die Poren des Filters migrieren (s. Abb. 5.5 D) und schließlich in den epithelialen Monolayer einwandern (s. Abb. 5.5 C). Dies führt zu einer Veränderung der Morphologie der Epithelzellen, die nun eine M-Zell-ähnliche Morphologie mit reduzierten und unregelmäßigen Mikrovilli aufweisen.

Diese morphologische Veränderung, die in einer Subpopulation der Caco-2-Zellen durch die Zugabe der Lymphozyten induziert wird, wird auch im Rasterelektronenmikroskop (REM) deutlich (s. Abb. 5.9). Das REM erlaubt im Gegensatz zu den im EM betrachteten Querschnitten eine Aufsicht auf den gesamten Monolayer. So kann man sich einen Überblick über den Zustand des gesamten Zellmonolayers verschaffen: Weisen die Zellen der differenzierten Caco-2-Zellen in der Regel einen Saum mit etwa $0,5\text{-}1 \mu\text{m}$ langen Mikrovilli auf (s. Abb. 5.9 A), so ist dieser bei einer großen Anzahl von Zellen der Co-Kultur deutlich

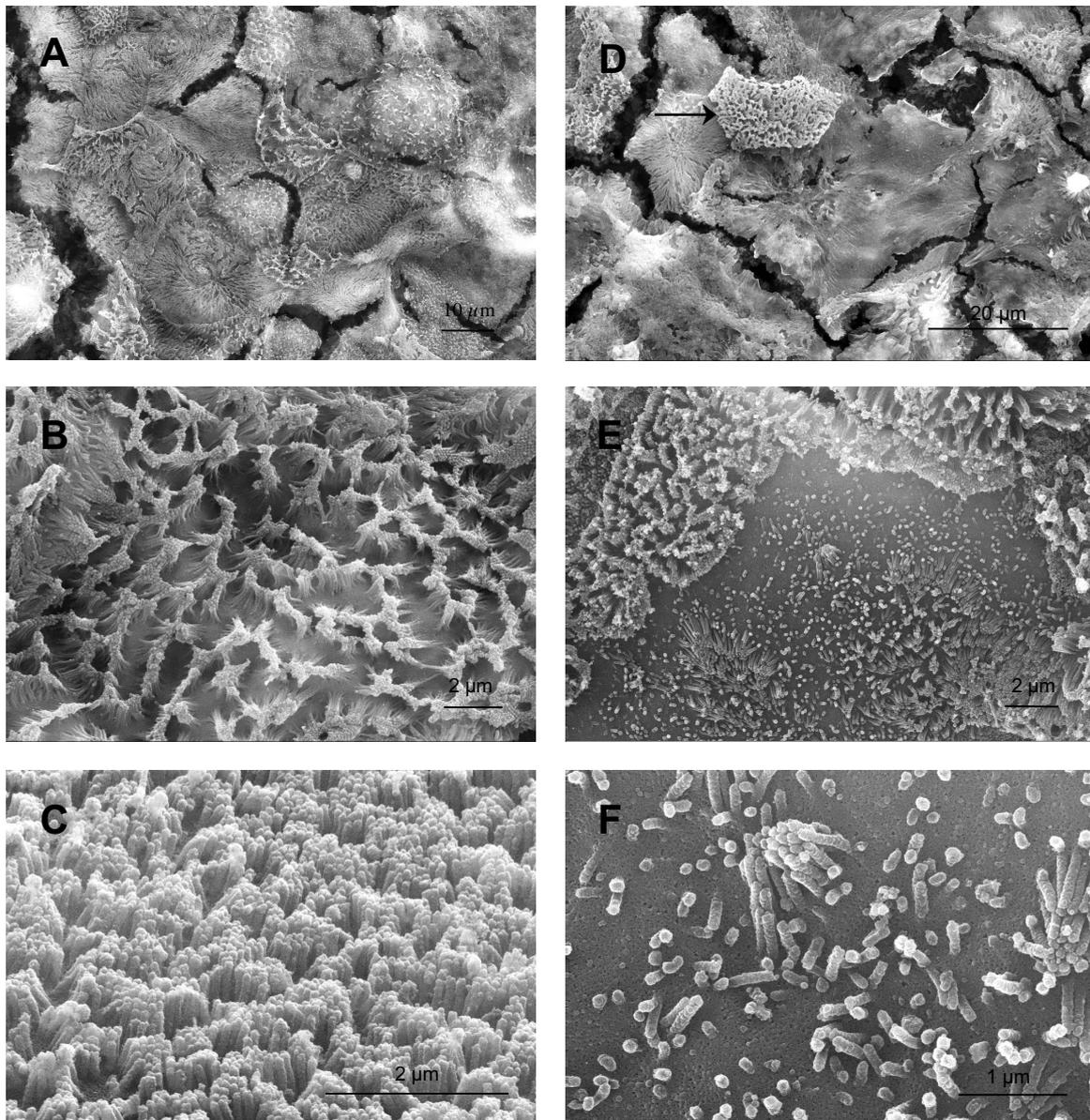


Abb. 5.9 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Caco-2-Monolayers und des M-Zell-Modells.

(A) Caco-2-Monolayer in der Aufsicht: Die Epithelzellen besitzen einen Mikrovillisaum auf ihrer apikalen Oberfläche, (B) & (C) Detailaufnahme des Mikrovillisaumes, (D) M-Zell-Modell in der Aufsicht: Eine differenzierte Epithelzelle (Pfeil) ist umgeben von Zellen, die nur noch wenige und reduzierte Mikrovilli aufweisen, (E) „M-Zelle“ mit vereinzelt und reduzierten Mikrovilli auf der apikalen Oberfläche, (F) Detailaufnahme einer „M-Zelle“ mit stark reduzierten Mikrovilli.

verändert. Dies wird besonders in Abb. 5.9 D deutlich, in der eine differenzierte Epithelzelle (s. Pfeil) von Zellen mit deutlich verkürzten Mikrovilli umgeben ist. In den Detailaufnahmen sind die Mikrovilli der Caco-2-Zellen deutlich zu erkennen (s. Abb. 5.9 B & C). Auf den M-Zell-ähnlichen Zellen findet man dagegen stark verkürzte Mikrovilli oder nahezu keine mehr (s. Abb. 5.9 E & F).

Als optimaler Zeitraum für die Co-Kultivierung erwiesen sich auch bei Verwendung humaner Lymphozyten ein Zeitraum von 4 d.

Wie bereits für die Co-Kultur mit Lymphozyten aus den Peyer'schen Plaques gezeigt werden konnte, kommt es auch in diesem Ansatz nur bei einer Kultivierung auf Filtern mit einer Porengröße von 3 μm , nicht aber auf Filtern mit einer Porengröße von 0,4 μm zum Einwandern der Lymphozyten in die Epithelschicht. Somit scheint auch bei Verwendung humaner Lymphozyten der Kontakt zwischen Epithelzellen und Lymphozyten entscheidend für die Induktion von morphologischen Veränderungen zu sein oder die Konzentration sezernierter Botenstoffe der Immunzellen ist zu gering konzentriert.

5.2.1.6 Reverse Co-Kultur

Um genauer zu untersuchen, ob ein direkter Kontakt von Lymphozyten und Epithelzellen notwendig ist, um die Bildung von M-Zellen zu induzieren, oder ob die von den Zellen des Immunsystems sezernierten Botenstoffe dafür ausreichend sind, wurde die Co-Kultur in umgekehrter Ausrichtung etabliert. Dazu wurden 5×10^4 Caco-2-Zellen auf der oberen Seite der Filter ausgesät und bis zur Differenzierung für 14 d kultiviert. Nach diesem Zeitraum erfolgte die Zugabe von 1 ml Zellsuspension mit unterschiedlichen Konzentrationen an humanen Lymphozyten in die untere Kavität des Transwell-Filter-Systems. Auch in diesem Modell wurden die Zellen für 4-6 d co-kultiviert.

Bei Verwendung von 1×10^7 humanen Blutlymphozyten (dieser Titer entspricht dem Einsatz von 1×10^6 Lymphozyten in 100 μl in der Co-Kultur) konnten keine Veränderungen in der Morphologie der Epithelzellen beobachtet werden. Auch eine Erhöhung des Titers an Lymphozyten bis zu 1×10^8 Zellen blieb ohne Effekt auf die Epithelzellen.

Nach einer Co-Kultivierung über einen Zeitraum von 4 Tagen wurden die Zellen durch Immunfluoreszenzen mit einer Reihe von Antikörpern und Lektinen analysiert. Unterschiede zwischen der „reversen“ Co-Kultur und den Caco-2-Zellen waren anhand der durchgeführten Immunfluoreszenzen nicht zu detektieren.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen, die in der Co-Kultur bei Verwendung von Filtern mit einer Porengröße von 0,4 μm gemacht wurden. Somit scheint der direkte Kontakt zwischen Epithelzellen und Lymphozyten entscheidend für die Induktion von M-Zell-ähnlichen Zellen zu sein, während sezernierte Botenstoffe allein offenbar nicht ausreichend sind, um morphologische Veränderungen auszulösen.

5.2.1.7 Kontrolle des Zellwachstums auf Filtern durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)

Da die Filter aus Polycarbonat und daher nicht im Durchlicht mikroskopierbar sind, wurde das Wachstum der Epithelzellen durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (TER, „transepithelial resistance“), der eine Aussage über den Zustand des epithelialen Monolayers erlaubt, kontrolliert. Der Widerstand der für die Kultivierung der Epithelzellen verwendeten Filter wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen im Abstand von zwei Tagen gemessen. Durch diese Messung wurde gezeigt, daß der Widerstand der Filter ansteigt, bis er etwa bei einem Wert von 5400 Ω/cm^2 stagniert. Wie im Elektronenmikroskop nachgewiesen wurde (s. Abb. 5.5 A), bilden die Zellen zu diesem Zeitpunkt einen dichten Monolayer aus. Nach etwa 4 Wochen fällt der Widerstand wieder ab, da die Zellen beginnen, abzusterben, und der Monolayer durchlässig wird. Aufgrund dieser Messung wurde festgelegt, daß die Caco-2-Zellen etwa bei einem Wert von 5400 Ω/cm^2 einen differenzierten Monolayer ausbilden. In der Regel erreichten die Zellen diesen Wert nach 14-17 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt werden die Lymphozyten dazugegeben und mit der Co-Kultivierung begonnen.

Um zu kontrollieren, ob der Zellmonolayer auch während der Co-Kultivierung intakt bleibt, wurden etwaige Veränderungen durch Messung des transepithelialen Widerstandes verfolgt.

5.2.2 Charakterisierung der M-Zell-Kultur

Zur näheren Charakterisierung der morphologischen Veränderungen, die in den Caco-2-Zellen durch die Co-Kultivierung mit humanen Lymphozyten induziert werden, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit einer Reihe von Antikörpern und Lektinen durchgeführt. Das Lektin UEA-1, ein Agglutinin aus *Ulex europaeus* (Stechginster), ist ein spezifischer Marker von M-Zellen im Darm von Balb/c-Mäusen (Giannasca *et al.*, 1994) und Kaninchen (Jepson *et al.*, 1995), während es im humanem Appendix Epithelzellen, nicht aber M-Zellen färbt (Brinck *et al.*, 1995).

Nach Färbung mit diesem Lektin weisen die humanen Caco-2-Zellen ein heterogenes Färbungsmuster auf (s. Abb. 5.10 A). So findet man im deutlich gefärbten Monolayer aus differenzierten Epithelzellen Inseln mit weniger oder gar nicht gefärbten und daher weniger differenzierten Zellen. UEA-1 färbt die Mikrovilli auf der apikalen Seite der Zellen deutlich an, die lateralen und basolateralen Membranen wie auch das Zytoplasma bleiben dagegen unmarkiert. Im Vergleich dazu ist die Zahl der apikal gefärbten Zellen im M-Zell-Modell deutlich reduziert (s. Abb. 5.10 B), woraus zu schließen ist, daß die Zahl der differenzierten und mit einem Mikrovillisaum ausgestatteten Zellen im M-Zell-Modell deutlich geringer ist als in der Caco-2-Kultur. Die Färbung mit UEA-1 führt sowohl bei der Co-Kultur mit Lymphozyten aus murinen Peyer'schen Plaques als auch bei der Co-Kultur mit humanen Lymphozyten zum gleichen Resultat.

Die Lektine WGA (wheat germ agglutinin) und PNA (peanut agglutinin) können als spezifische M-Zell-Marker im Darm von Kaninchen eingesetzt werden (Jepson *et al.*, 1995), im Darm von Mäusen färben sie dagegen alle Zellen des Epithels (Jepson *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1993). Darüberhinaus ist für beide Lektine eine erhöhte Bindung an M-Zellen in einem humanen M-Zell-Modell beschrieben worden (Gullberg *et al.*, 2000). Färbungen des Caco-2-Monolayers sowie des M-Zell-Modells mit PNA (s. Abb. 5.10 C & D) als auch mit WGA (s. Abb. 5.10 E & F) zeigten keine Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der markierten Zellen oder die Stärke des detektierten Signals und eignen sich daher nicht für die Charakterisierung des im Rahmen dieser Arbeit etablierten M-Zell-Modells. Auch die zur Färbung der Zellen verwendeten Lektine ECA und SJA zeigten kein unterschiedliches Färbungsmuster in der Caco-2-Kontrolle und dem M-Zell-Modell (s. Tab. 5.1).

Sucrase/Isomaltase (SI) ist eine Hydrolase, die von differenzierten Enterozyten auf ihrer apikalen Oberfläche exprimiert wird (Semenza *et al.*, 1986; Vachon und Beaulieu, 1992). Wie Abb. 5.11 A zeigt, wird die apikale Membran einer großen Anzahl differenzierter Caco-2-Zellen mit einem Antikörper gegen SI gefärbt, dagegen ist die Anzahl der gefärbten Zellen im M-Zell-Modell deutlich reduziert (s. Abb. 5.11 B).

Um die Integrität des Zellmonolayers in der Caco-2-Kultur in Anwesenheit und Abwesenheit der Lymphozyten zu untersuchen, wurden die Zell-Zell-Kontakte der Caco-2-Zellen gefärbt. Dazu wurden Antikörper gegen Occludin und ZO-1 verwendet. Wie Abb. 5.10 H zeigt, färbt Occludin die Zell-Zell-Kontakte des Monolayers, aber auch im M-Zell-Modell sind die Zell-Zell-Kontakte deutlich markiert. Die Färbung mit einem Antikörper gegen ZO-1 resultierte in dem gleichen Ergebnis (s. Tab. 5.1). Darüberhinaus konnte Vinculin in den Zell-Zell-

Kontakten der Caco-2-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit in gleichem Maße angefärbt werden.

Um zu untersuchen, ob die Zellen des M-Zell-Modells Veränderungen im Zytoskelett aufweisen, wurde eine Färbung mit Phalloidin, einem Marker für Aktin, durchgeführt. Diese zeigte, daß die Caco-2-Zellen auf ihrer apikalen Seite stark gefärbt sind und auf den meisten Zellen die Mikrovilli deutlich zu erkennen sind (s. Abb. 5.11 C). Daneben findet man auch wie schon zuvor beschrieben Inseln mit weniger differenzierten Zellen im Caco-2-Monolayer. Im M-Zell-Modell sind dagegen nur wenige Zellen auf der apikalen Seite gefärbt. In Bezug auf das Zytoskelett der Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit der Lymphozyten konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Tab. 5.1 Charakterisierung des M-Zell-Modells durch Färbung mit verschiedene Lektinen und Primärantikörpern

Primärreagenz	Caco-2-Monolayer	M-Zell-Modell	Abbildungen
ECA	+++	+++	Abb. 5.12 G
PNA	+++	++	Abb. 5.11 C & D
SJA	++	++	n.g.
UEA-1	+++	+	Abb. 5.11 A & B
WGA	++	++	Abb. 5.11 E & F
□-Galektin 9	+	+++	Abb. 5.12 D & E
□-Occludin	++	++	Abb. 5.11 H
Phalloidin	+++	++	Abb. 5.12 C & D
□-Sucrase-Isomaltase	+++	+	Abb. 5.12 A & B
□-Vinculin	+	+	n.g.
□-ZO-1	++	++	n.g.

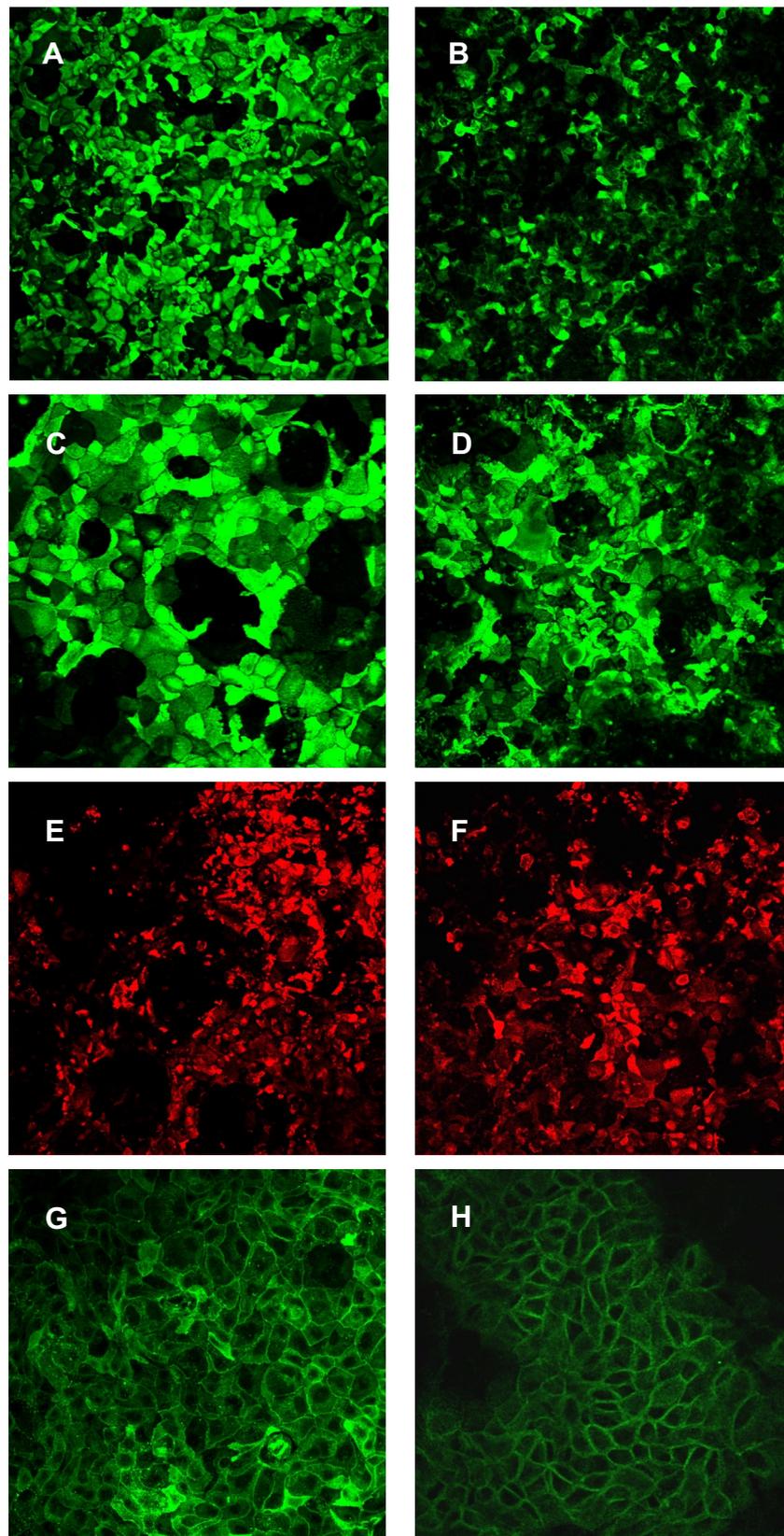


Abb. 5.10 Charakterisierung des M-Zell-Modells.

(A) Die Färbung des Caco-2-Monolayers mit UEA-1 zeigt ein heterogenes Muster: Im Monolayer treten Inseln mit weniger oder nicht gefärbten Zellen auf. (B) Im M-Zell-Modell ist die Zahl der UEA-1-markierten Zellen deutlich reduziert. (C & D) PNA färbt die Zellen des Caco-2-Monolayers (C) und des M-Zell-Modells (D) mit gleicher Intensität an. (E & F) Die Färbung mit WGA zeigt keine Unterschiede zwischen dem Caco-2-Monolayer (E) und der M-Zell-Kultur (F). (G) ECA-Färbung des Caco-2-Monolayer. (H) Markierung von Occludin in den Zell-Zell-Kontakten des M-Zell-Modells.

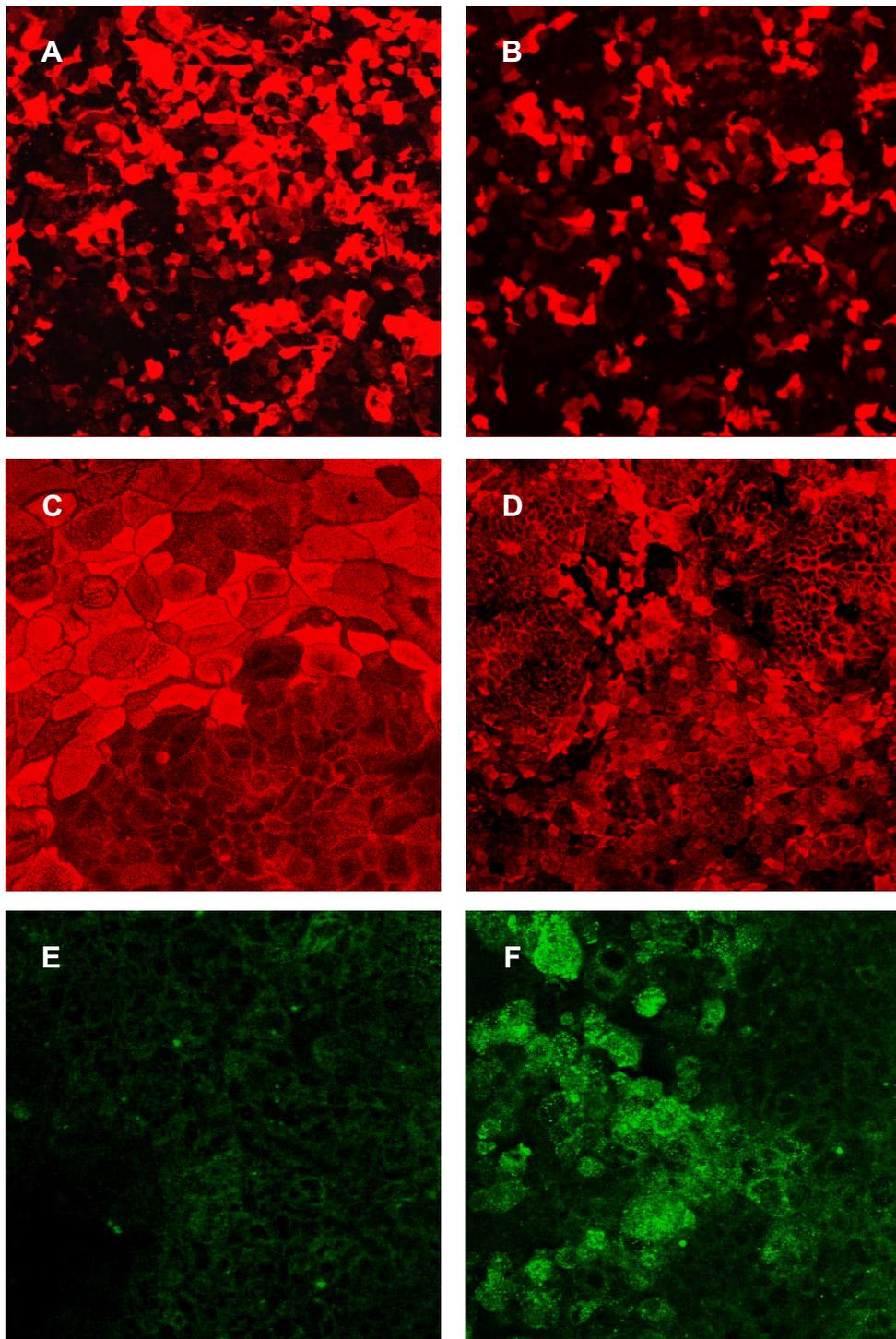


Abb. 5.11 Charakterisierung des M-Zell-Modells.

(A) Die Anzahl der markierten Zellen ist nach Färbung mit einem Antikörper gegen Sucrase-Isomaltase (SI) und einem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper im Caco-2-Monolayer (A) deutlich größer als im M-Zell-Modell (B). (C & D) Die Färbung der Zellen mit Phalloidin zeigt, dass die Zahl an differenzierten und mit einem Mukrovillisaum ausgestatteten Zellen im Caco-2-Monolayer (C) höher ist als im M-Zell-Modell (D). (E & F) Die Färbung mit einem Antiserum gegen Galectin-9 zeigt, dass die Galectin-9-Expression in der M-Zell-Kultur (F) deutlich stärker ist als im Caco-2-Monolayer (E).

5.2.3 Unterschiede im Expressionsmuster von Caco-2-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit von humanen Blutlymphozyten

In einem weiteren Ansatz wurde mit Hilfe von DNA-Micro-Arrays untersucht, ob sich das Expressionsmuster der Caco-2-Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit der humanen Lymphozyten unterscheidet. Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Cichon durchgeführt. Es konnten 68 unterschiedlich exprimierte Gene detektiert werden. Unter anderem konnte für das Lektin Galektin-9 eine um den Faktor 25 gesteigerte Expression in den Caco-2-Zellen der Co-Kultur gemessen werden.

Färbungen der Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Galektin-9 konnten dieses Ergebnis bestätigen (s. Abb. 5.11 E & F): In den Zellen des Caco-2-Monolayers sind die Zell-Zell-Kontakte leicht angefärbt, dagegen sind in der M-Zell-Kultur zusätzlich die apikalen Oberflächen einiger Zellen deutlich markiert. Dies deutet darauf hin, daß die Expression von Galektin-9 in den M-Zell-ähnlichen Zellen gesteigert ist.

5.2.4 Untersuchung M-Zell-typischer Eigenschaften

5.2.4.1 Transport von Latex-Partikeln durch M-Zell-ähnliche Zellen

Eine typische Eigenschaft von M-Zellen ist die Aufnahme und der Transport von Partikeln von der apikalen zur basolateralen Zellseite. Um zu untersuchen, ob die Zellen des M-Zell-Modells ebenfalls diese Eigenschaft aufweisen, wurde Medium mit 1×10^7 Fluoreszenzgekoppelten Latex-Partikel, die einen Durchmesser von 20 bzw. 200 nm haben, auf die apikale Seite der Zellen gegeben und für 2 Stunden inkubiert.

Wie die am Confokalen Laserscanning Mikroskop (CFSM) aufgenommenen Querschnitte durch die Caco-2-Zellen zeigen, können die 200 nm-Partikel auf der apikalen Seite der Zellen, nicht aber in den Zellen detektiert werden (s. Abb. 5.12 A & B). Im Gegensatz dazu konnten im M-Zell-Modell auch Partikel innerhalb des Monolayers detektiert werden (s. Abb. 5.12 C & D).

Nach Inkubation der Zellen mit 20 nm großen Latex-Partikeln konnten diese auf und in dem Kontrollmonolayer aus Caco-2-Zellen als auch auf und in den Zellen der Co-Kultur detektiert werden (s. Abb. 5.13).

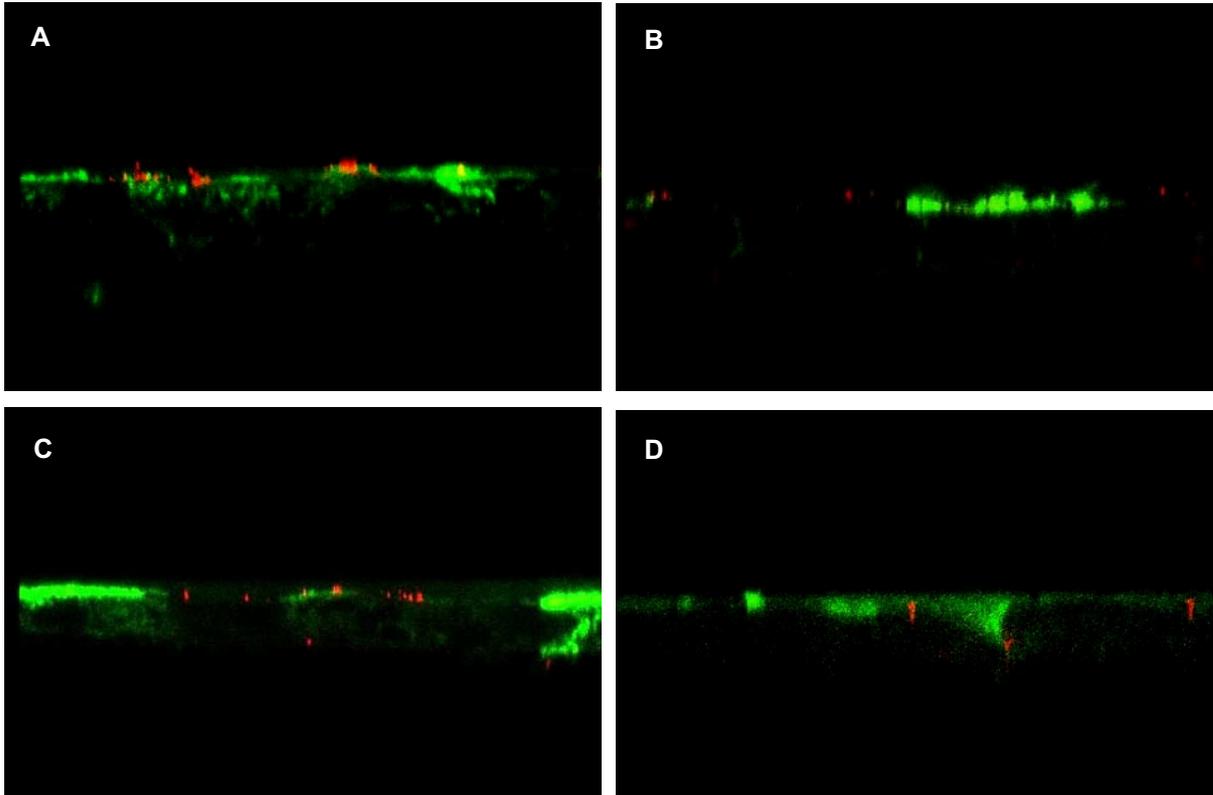


Abb. 5.12 Transport von 200 nm-Latex-Partikeln durch die Zellen des M-Zell-Modells.

Gezeigt sind CFSM-Querschnitte des Caco-2-Monolayers (A & B) und des M-Zell-Modells. Die Caco-2-Zellen sind apikal durch das mit FITC-gekoppelte Lektin UEA-I gefärbt. Die verwendeten Latex-Partikel sind 200 nm groß und mit einem roten Fluorophor markiert (A) & (B) Caco-2-Zellen können keine Latex-Partikel aufnehmen und transportieren. (C) & (D) Im Monolayer des M-Zell-Modells können Latex-Partikel detektiert werden.

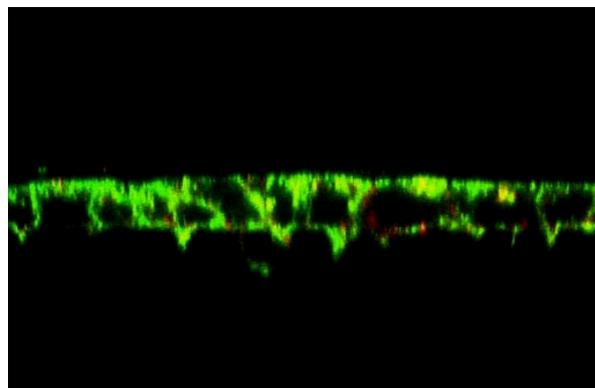


Abb. 5.13 Transport von 20 nm-Latex-Partikeln durch die Zellen des M-Zell-Modells.

Gezeigt ist ein CFSM-Querschnitt durch das M-Zell-Modell. Die Caco-2-Zellen sind apikal durch das mit FITC-gekoppelte Lektin ECA gefärbt. Die verwendeten Latex-Partikel sind 20 nm groß und mit einem roten Fluorophor markiert. Im Monolayer des M-Zell-Modells können eine große Anzahl an 20 nm-Latex-Partikel detektiert werden.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß in den Zellen der Co-Kultur eine morphologische Veränderung stattgefunden hat, die ihnen den für M-Zell-charakteristischen Transport von Partikeln ermöglicht. Da die 20 nm Partikeln sowohl im Caco-2- als auch im Co-Kultur-Monolayer detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, daß der Transport von Latexpartikel dieser Größe offenbar nicht spezifisch ist.

5.2.4.2 Infektionen

5.2.4.2.1 Infektionen mit *Yersinia enterocolitica*

Wie in Infektionsversuchen demonstriert werden konnte, infiziert *Yersinia enterocolitica in vivo* selektiv M-Zellen nicht aber differenzierte Epithelzellen (Hanski *et al.*, 1989; Grützkau *et al.*, 1990; Autenrieth & Firsching, 1996). Darüberhinaus zeigten Infektionen von differenzierten Caco-2-Zellen mit *Y. enterocolitica*, daß der Mikrovillisaum der differenzierten Epithelzellen auch *in vitro* eine Barriere für die Bakterien darstellt (Schulte *et al.*, 2000).

Diese Ergebnisse konnten in Infektionen mit den auf Filtern kultivierten, differenzierten Caco-2-Zellen bestätigt werden, die zeigten, daß *Y. enterocolitica* nicht in der Lage ist, an die Epithelzellen zu adhären und sie zu infizieren (s. Abb. 5.14 A). Dagegen konnten die Bakterien an die Zellen der M-Zell-Kultur adhären, diese infizieren und in sie eindringen (s. Abb. 5.14 B). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 5.14 C & D) zeigen detailliert die Interaktion der Yersinien mit den Zellen der Co-Kultur.

Da Yersinien *in vivo* nur spezifisch an M-Zellen adhären, läßt sich aus diesem Ergebnis folgern, daß sich aus den differenzierten Epithelzellen durch die Co-Kultivierung mit Lymphozyten M-Zell-ähnliche Zellen entwickelt haben.

5.2.4.2.2 Infektionen mit pathogenen *E. coli*

Caco-2-Zellen und die M-Zell-Kultur wurden darüberhinaus mit dem enteropathogenen *E. coli* Stamm EPEC E2348/69 infiziert. Der Mikrovillisaum der differenzierten Caco-2-Zellen scheint die Adhärenz der Bakterien an die Zellen und damit eine Infektion zu erschweren, verhindert sie aber nicht (s. Abb. 5.15 A). Auf den M-Zellen können die EPEC leichter adhären, und es kommt zur Bildung von als „Pedestal“ bezeichneten Ausstülpungen der Wirtszellemembran unterhalb der bakteriellen Mikrokolonien (s. Abb. 5.15 B). Nur ganz

vereinzelt sieht man intrazelluläre Bakterien. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 5.15 C & D) zeigen detailliert die Interaktion der EPEC E2348/69 mit den Zellen der Co-Kultur.

Somit scheinen die Bakterien des EPEC-Stammes E2348/69 eine Präferenz für die M-Zell-ähnliche Zellen zu haben, die sie aufgrund des reduzierten Mikrovillisaums leichter infizieren können. Zu einer Aufnahme der Bakterien kommt es aber auch bei Infektion der M-Zell-ähnlichen Zellen nicht, stattdessen scheinen die Bakterien ihrer Aufnahme durch die Zellen durch die Bildung von „Pedestals“ entgegenzuwirken.

5.2.4.2.3 Infektionen mit dem probiotischen Bakterium *E. coli* Nissle 1917

Der probiotische Bakterienstamm *E. coli* Nissle 1917 soll die Symptome bei entzündlichen Darmerkrankungen lindern, zudem konnte in *in vitro*-Versuchen gezeigt werden, daß das probiotische Arzneimittel Mutaflor®, das den *E. coli*-Stamm Nissle 1917 enthält, Darmepithelzellen vor der Invasion mit Salmonellen bewahren kann (Ardeypharm, Herdecke). Darüberhinaus wird gegenwärtig im Labor untersucht, ob *E. coli* Nissle 1917 Verwendung als Trägerstamm für orale Vakzinierungsstudien finden kann.

In einem weiteren Infektionsexperiment wurden die Interaktion von *E. coli* Nissle 1917 mit den M-Zell-ähnlichen Zellen sowie den Caco-2-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die als gute Besiedler des Darmes beschriebenen Bakterien nur in sehr seltenen Fällen an die Epithelzellen oder an die M-Zell-ähnlichen Zellen der Co-Kultur adhäreren. Darüberhinaus konnte keine Transzytose der Bakterien durch die M-Zellen beobachtet werden. Weder bei den Caco-2-Zellen noch bei der Co-Kultur konnte eine durch die Infektion mit *E. coli* Nissle 1917 ausgelöste Veränderung beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bedeuten, daß durch die Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit humanen Lymphozyten die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen induziert werden konnte, deren Verhalten in Infektionsexperimenten weitgehend dem aus *in vivo*-Untersuchungen beschriebenen Verhalten entspricht.

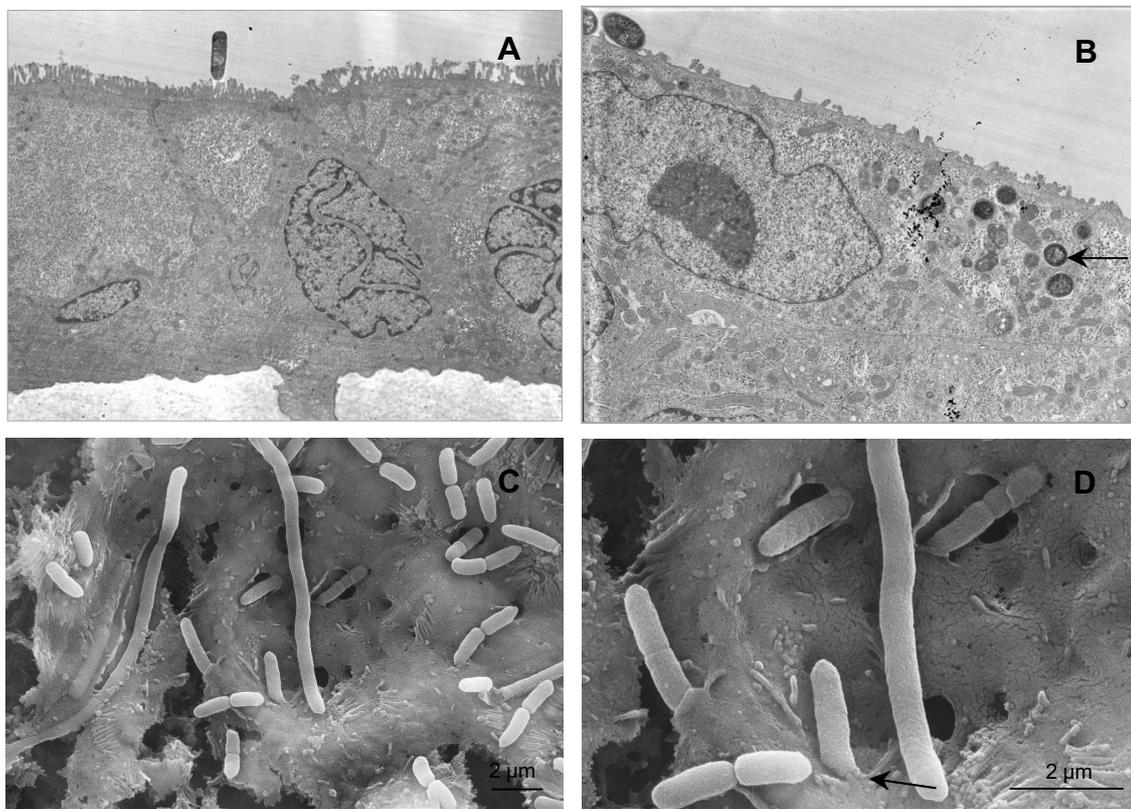


Abb. 5.14 Infektionen des M-Zell-Modells mit *Yersinia enterocolitica*.

(A) EM-Aufnahme des Caco-2-Monolayers mit *Y. enterocolitica* JB 580c: Die Bakterien können nicht an die differenzierten Zellen adhären und diese nicht infizieren. (B) EM-Aufnahme des M-Zell-Modells mit *Y. enterocolitica* JB 580c: Die Bakterien können an die Zellen des M-Zell-Modells adhären und sie infizieren. Einige Bakterien sind intrazellulär (Pfeil). (C) & (D) REM-Aufnahme des M-Zell-Modells mit *Y. enterocolitica* JB 580c: Die Yersinien infizieren die Zellen des M-Zell-Modells und dringen in sie ein (Pfeil).

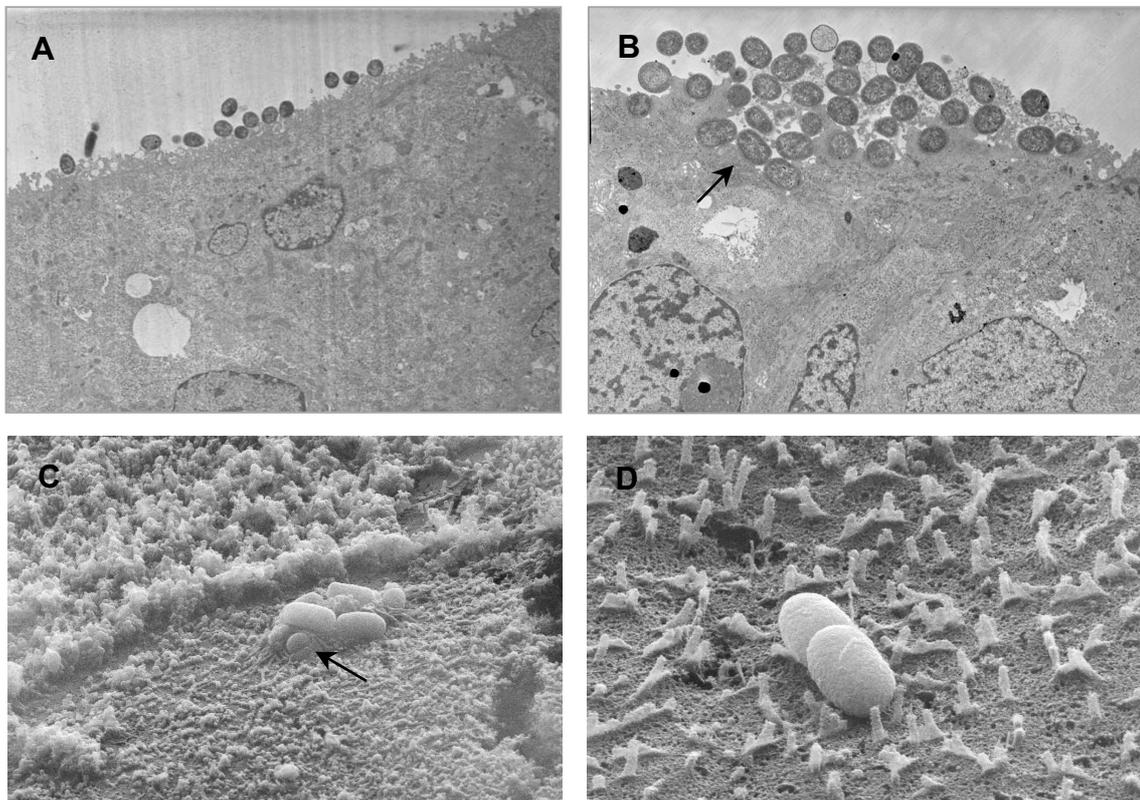


Abb. 5.15 Infektionen des M-Zell-Modells mit dem EPEC-Stamm E2348/69.

(A) EM-Aufnahme des Caco-2-Monolayers infiziert mit EPEC E2348/69: Die Bakterien können an die differenzierten Zellen adhären. (B) EM-Aufnahme des M-Zell-Modells mit EPEC E2348/69: Die Bakterien adhären in Mikrokolonien an die Zellen des M-Zell-Modells und induzieren A/E-Läsionen („Pedestal“ durch Pfeil markiert). (C) & (D) REM-Aufnahme des M-Zell-Modells mit EPEC E2348/69: EPEC infizieren die Zellen des M-Zell-Modells und induzieren A/E-Läsionen (Pedestal durch Pfeil markiert).

5.3 Sequenz- und Funktionsanalyse der LEE-Pathogenitätsinsel der DA-EPEC

Nachdem in einem ersten Teil dieser Arbeit mit dem M-Zell-Modell die Möglichkeit geschaffen wurde, Interaktionen gastrointestinal-pathogener Bakterien mit Epithelzellen und zu M-Zell-ähnlichen Zellen differenzierten Epithelzellen *in vitro* zu untersuchen, sollten nun im zweiten Teil die für die Pathogenese atypischer enteropathogener *E. coli* bestimmenden genetischen Faktoren charakterisiert werden.

Der „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) ist eine Pathogenitätsinsel, die neben dem EPEC-Prototyp-Stamm E2348/69 auch in anderen A/E-Läsionen hervorrufenden *Enterobacteriaceae* gefunden wurde. Dazu zählen neben EHEC, die kaninchenpathogenen RDEC-1, *Citrobacter rodentium* und Diarrhö-verursachenden *Hafnia alvei*-Stämmen (Donnenberg *et al.*, 1997). Epidemiologische Studien zeigten, daß in den letzten Jahren vermehrt atypische EPEC, die keine „bundle forming pili“ ausbilden, mit persistierenden Diarrhöen assoziiert sind. Aufgrund ihres diffusen Adhärenzphänotyps werden diese klinischen Isolate atypischer EPEC auch als DA-EPEC bezeichnet.

Zur genauen Charakterisierung des LEE der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 wurde diese Pathogenitätsinsel für beide Stämme im Rahmen dieser Arbeit kloniert, sequenziert, analysiert und zusätzlich einer Funktionsanalyse unterzogen.

5.3.1 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der LEE-Pathogenitätsinseln der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 soll zum einen Aufschluß über den Aufbau, die exakte Größe, die auf dem LEE-kodierten Gene sowie über die genauen Insertionsorte in das bakterielle Genom dieser zwei Stämme geben. Darüberhinaus soll der Vergleich der Sequenzen dieser zwei LEE untereinander sowie mit LEE-Sequenzen aus dem EPEC-Stamm E2348, dem EHEC-Stamm EDL 933, dem RDEC-1-Stamm sowie aus *Citrobacter rodentium* klären, in welchem Maße diese Pathogenitätsinsel identisch zueinander sowie zu bereits bekannten LEE-Sequenzen sind.

5.3.1.1 Konstruktion von Cosmidbanken für die DA-EPEC-Stämme O181 und 3431

Die strukturelle und funktionelle Analyse von komplexen Genomen erfordert die Isolierung und Kartierung großer DNA-Regionen. Für eine solche Analyse stellen Cosmidvektoren ein geeignetes Werkzeug dar, da sie genomische DNA-Fragmente mit einer Größe von 30 bis 42 kb aufnehmen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Verwendung des Cosmidvektors SuperCos 1 (Stratagene, s. Anhang, Abb. 8.2) Cosmidbanken für die DA-EPEC-Stämme 3431 und 0181 konstruiert (s. Abb. 4.4).

Nach erfolgreicher Ligation der partiell verdauten, genomischen DNA-Fragmente in den Cosmidvektor SuperCos 1, der Verpackung der Konstrukte in λ -Phagen und der Infektion des *E. coli* Stammes XL1 blue MR mit den rekombinanten Phagen wurde die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (cfu, „colony forming units“) pro ml Bakterienkultur bestimmt. Zudem wurde anhand einer Restriktionsanalyse von zehn zufällig ausgewählten Klonen die Qualität der Cosmidbank überprüft. Beide Banken enthalten unterschiedliche Klone mit der erwarteten Größe von bis zu 50 kb.

5.3.1.2 Identifizierung und Isolierung LEE-positiver Klone

Durch Koloniehybridisierung wurden LEE-positive Klone detektiert und anschließend mittels PCR sowie Southern Blot-Analyse mit LEE-spezifischen Primer bzw. Sonden (s. Tab. 3..) untersucht. Zur exakten Bestimmung des Inserts wurden die Enden des Inserts mit den Primern T3cos1 und T7cos1 (s. Tab. 3.5) durchgeführt (Agowa, Berlin).

LEE-positive Cosmidklone wurden anschließend für die Sequenzierung des LEE der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 sowie für die Funktionsanalyse eingesetzt (s. Tab 5.2; s. Abb. 5.16).

Tab. 5.2 LEE-positive Cosmidklone

Klon #	Im Insert enthaltener Bereich des LEE
0181 #38	Gesamter LEE des 0181 (35624 bp)
0181 #46	rorf3 bis 3'-Übergang (26238 bp)
0181 #57	sepQ bis 3'-Übergang (17093bp)
0181 #73	5'-Übergang bis tir (12428 bp)
3431 #180	5'-Übergang bis eaeA (28 251bp)

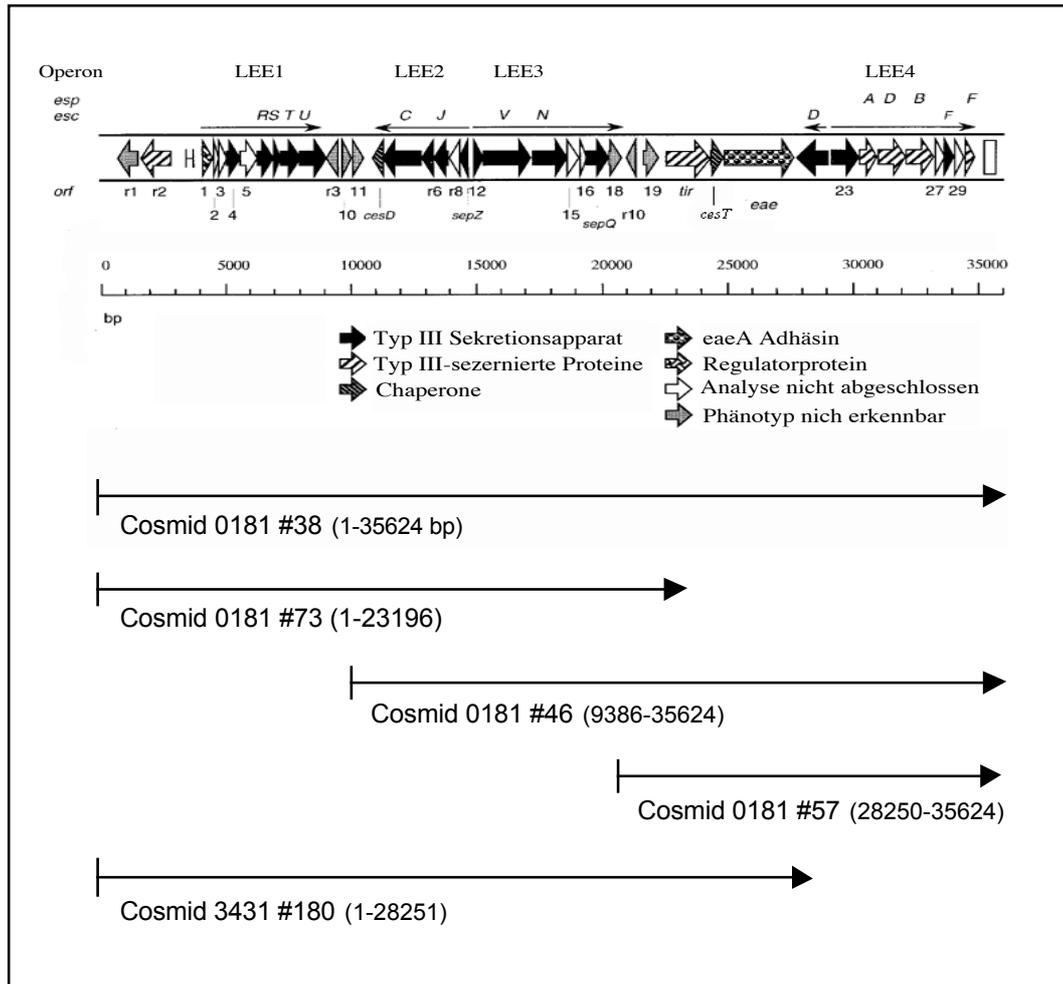


Abb. 5.16 Karte der LEE-positiven Klone

5.3.1.3 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Cosmide wurde von der Firma Agowa (Berlin, BRD) durchgeführt. Dazu wurden der Cosmidklon O181 #38 (s. Abb. 5.16, s. Tab. 5.2), der für den gesamten LEE kodiert, sowie der Cosmidklon 3431 #180 (s. Abb. 5.16, s. Tab. 5.2), der die ersten 28251 bp des LEE enthält, verwendet. Zusätzlich wurde das 3 kb große PCR-Produkt des Primerpaares JG31/ JG32 (s. Tab. 3.5) sequenziert, das den Bereich zwischen dem *eaeA*- und dem *espD*-Gen des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 enthält (s. Abb. 5.16, LEE). Die Sequenz des 5'-Endes des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 von *espD*-Gen bis zum 3'-Ende ist schon bekannt (C. Beinke, 1999).

Die Sequenzdatendaten können im Institut für Infektiologie, ZMBE, Münster eingesehen werden.

5.3.1.4 Sequenzvergleich des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181

Die Sequenzen des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 wurden auf Nukleotidebene miteinander sowie mit der Sequenz des LEE des EPEC-Prototyp-Stammes E2348/69 (O127:H6) verglichen (Elliott *et al.*, 1998). Auf Proteinebene wurde darüberhinaus bei einigen Proteinen auch ein Vergleich mit den entsprechenden Proteinen der LEE des EHEC-Stammes EDL 933 (O157:H7), des kaninchenpathogenen RDEC-1 (O15:H-) und *Citrobacter rodentium* durchgeführt (Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001).

Da sich die Randbereiche der untersuchten LEE unterscheiden, und es daher schwierig ist, die genauen Grenzen des LEE festzulegen, wurde zum Vergleich der Sequenzen die Kernregion des LEE verwendet. Diese Kernregion wurde definiert als der Bereich zwischen dem ersten Gen des LEE, *orf1*, und dem letzten Gen des LEE, *espF*.

Im EPEC-Prototyp-Stamm E2348/69 umfaßt der Kernbereich 34066 bp. Im Vergleich dazu ist der Kernbereich des LEE des DA-EPEC O181 mit 34228 bp um 162 bp größer. Wodurch dieser Unterschied zustande kommt, und wo er sich im Bereich des LEE befindet, konnte noch nicht geklärt werden. Der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 ist mit 35478 bp um 1412 bp größer. Dieser Unterschied beruht auf der Insertion des Transposons Tn5 am 3'-Ende des *ler*-Gens.

Der Vergleich der Kernregionen des LEE auf Nukleotidebene zeigt, daß 57 % der Sequenz des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 zu 99,5 % identisch zum LEE des EPEC-Stammes E2348/69 ist. 91 % der Sequenz weisen zudem eine Homologie von mehr als 97 % auf, während die restlichen Bereich zwischen 78-83 % Identität besitzen. Nur sehr kurze Bereiche des LEE (insgesamt etwa 1 kb) sind dagegen nicht identisch mit der LEE-Sequenz des EPEC-Stammes E2348/69. Dieser Vergleich zeigt, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 sehr homolog zur LEE-Sequenz des EPEC-Stammes E2348/69 ist.

Der Kernbereich des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 weist dagegen eine deutlich geringere Identität von etwa 87-90 % zum LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 auf. Besonders deutliche Unterschiede treten im 5'-Bereich des LEE auf, die u.a. auf der Insertion des Transposon Tn5 in das *ler*-Gen beruhen.

Anhand der Sequenzen des Kernbereichs des LEEs wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, der zeigt, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 phylogenetisch nah verwandt sind (s. Abb. 5.17). Der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 befindet sich dagegen auf einem zweiten Ast des Stammbaums und ist mit den beiden anderen Stämmen phylogenetisch nicht eng verwandt.

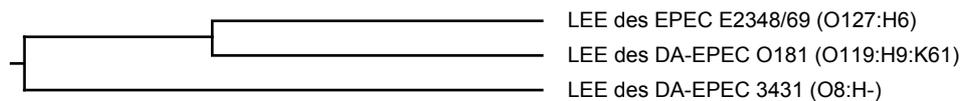


Abb. 5.17 Phylogenetischer Stammbaum der LEE-Sequenzen der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 sowie des EPEC-Stammes E2348/69.

Ähnlich hohe Identitäten von 89,3 % weisen auch der LEE des RDEC-1-Stammes mit dem LEE des EPEC-Stammes E2348/69 bzw. des EHEC-Stammes EDL933 auf, wie auch die Nukleotidsequenz des Lee des EPEC-Stammes E2348/69 bzw. des EHEC-Stammes EDL933 mit 92,2 %. Daher scheinen die bislang bekannten LEE-Pathogenitätsinsel stark konserviert zu sein.

Übersicht über den Aufbau des LEE der DA-EPEC-Stämme

Der Vergleich der Nukleotidsequenzen des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 sowie des EPEC-Stammes E2348/69 ergab, daß diese Pathogenitätsinsel in allen drei Stämmen sehr konserviert ist. Wie auch der LEE des EPEC-Stammes E2348/69 enthält der LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 41 Orfs, die in den fünf polycistronischen Operons LEE 1, LEE 2, LEE 3, dem Tir-Intimin-Operon und LEE 4 organisiert sind. Die Gene des LEE der beiden DA-EPEC-Stämme sind in der gleichen Reihenfolge und Orientierung auf dem LEE angeordnet wie beim EPEC-Stamm E2348/69.

Vergleich der LEE-kodierten Proteine

Beim Vergleich der LEE kodierten Proteine fiel auf, daß einige Proteine hohe Identitäten aufweisen, während sich andere deutlich voneinander unterscheiden. Diese Unterschiede lassen sich aber aufgrund der postulierten Funktion dieser Proteine erklären. So zeigte sich, daß die Esc- und Sep-Proteine, die das Typ III-Sekretions-System bilden, eine große Identität zueinander aufweisen oder in einigen Fällen zu 100 % identisch sind. Diese Proteine werden von Genen kodiert, die über den gesamten LEE verteilt und in den Operons LEE1, LEE2, LEE3 und LEE4 organisiert sind. Wie die in Tab. 5.2 aufgelisteten Werte zeigen, sind besonders die Esc- und Sep-Proteine des DA-EPEC-Stammes O181 zu über 99 % oder sogar völlig identisch zu den entsprechenden Genen des EPEC-Stammes E2348/69. Die Esc- und

Sep-Proteine des DA-EPEC-Stamm 3431 sind zwar nicht identisch zu den Proteinen des EPEC-Stammes E2348/69 oder DA-EPEC-Stammes O181, weisen aber mit 87,9 bis 97,9 % eine hohe Identität zu den entsprechenden Proteinen auf.

Da auch die Esc- und Sep-Proteine der LEE des EHEC-Stammes EDL 933, des RDEC-1-Stammes und von *C. rodentium* ähnlich hohe Identitäten aufweisen (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001), läßt sich folgern, daß die starke Konservierung der Esc- und Sep-Proteine für den Erhalt der Funktion des Typ III-Sekretionssystems notwendig ist.

Das einzige Protein, das an der Ausbildung des Typ III-Sekretionssystems beteiligt ist (Elliott *et al.*, 1998), aber in den unterschiedlichen A/E-Bakterien eine starke Abweichung in der Aminosäuresequenz zeigt, ist SepZ. Im EPEC-Stamm E2348/69 und im DA-EPEC-Stamm O181 ist SepZ zwar mit 96,9 % fast identisch, dagegen ist die Proteinsequenz des SepZ des DA-EPEC-Stammes 3431 zu diesen beiden Stämmen nur um 59,2 % gleich. Auch das SepZ des EHEC-Stammes EDL933, des RDEC-1-Stammes und von *Citrobacter rodentium* besitzt nur eine Identität von 61, 67 bzw. 69 % zum SepZ des EPEC-Stammes E2348/69 (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001). Diese Unterschiede deuteten darauf hin, daß SepZ möglicherweise zur Spezifität der Typ III-abhängigen Sekretion in den unterschiedlichen A/E-Bakterienstämme beiträgt.

Das Operon LEE 2 enthält außerdem noch das Gen *cesD*, das für das Chaperon der sezernierten Proteine EspD und EspB kodiert. Mit einer Identität von 100 bzw. 96,7 % ist dieses Protein in allen drei LEE stark konserviert. Auch das zweite Chaperon, das von *cesT* auf dem LEE kodiert wird, weist ebenfalls hohe Identitäten auf (Elliott *et al.*, 1999). So ist CesT, das Chaperon für Tir, des DA-EPEC-Stammes O181 zu 100 % identisch mit CesT des EPEC-Stammes E2348/69 und zu 96,8 % homolog zum entsprechenden Protein des DA-EPEC-Stammes 3431. CesF, das dritte bislang auf dem LEE identifizierte Chaperon, ist im LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und EPEC-Stammes E2348/69 zu 98,3 % identisch, dagegen beträgt die Identität des CesF des DA-EPEC-Stammes 3431 zum CesF des EPEC-Stammes E2348/69 nur 78,3 % und zum DA-EPEC-Stammes O181 ebenfalls nur 77,5 %.

Auch die drei Chaperone vom EHEC-Stamm EDL 933 und von *C. rodentium* sind zu den entsprechenden Proteinen des EPEC-Stammes E2348/69 zu über 95 % identisch (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2001). Es ist daraus zu folgern, daß die starke Identität dieser Proteine den Erhalt der Funktion der für die Stabilisierung und Sezernierung von Effektorproteinen wie EspD und Tir essentiellen Chaperone gewährleistet.

Tab.5.3 Vergleich der Orfs des LEE des EPEC-Stammes E2348/69 und der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181

ORFs des LEE (Produktlänge in AS)				Name des Gens	Funktion des Proteins	Vergleich der Proteinsequenzen		
ORF	EPEC E2348/69	DA- EPEC 3431	DA- EPEC O181			3431 vs. E2348/69	O181 vs. E2348/69	3431 vs O181
<i>rorf1</i>	272	272	272		unbekannt	81,2	98,9	81,6
<i>rorf2</i>	398	*	398	<i>espG</i>	Sezerniertes Protein	-	99,7	-
<i>orf1</i>	129	120 *	129	<i>ler</i>	LEE Regulator	-	99,2	-
<i>orf2</i>	72				Typ III Sekretion ?			
<i>orf3</i>	107				Typ III Sekretion ?			
<i>orf4</i>	199				Typ III Sekretion ?			
<i>orf5</i>	231				Typ III Sekretion ?			
<i>orf6</i>	217	217	217	<i>escR</i>	Typ III Sekretion	95,9	99,5	96,3
<i>orf7</i>	89	89	89	<i>escS</i>	Typ III Sekretion	95,5	100	95,5
<i>orf8</i>	258	258	258	<i>escT</i>	Typ III Sekretion	93,8	99,6	93,4
<i>orf9</i>	345	345	345	<i>escU</i>	Typ III Sekretion	95,1	100	95,1
<i>rorf3</i>	152				unbekannt			
<i>orf10</i>	123				unbekannt			
<i>orf11</i>	137				unbekannt			
<i>rorf4</i>	151	151	151	<i>cesD</i>	Chaperon für EspD	96,7	100	96,7
<i>rorf5</i>	512	512	512	<i>escC</i>	Typ III Sekretion	97,5	99,6	97,9
<i>rorf6</i>	151	151	151	<i>sepD</i>	Typ III Sekretion	95,4	99,3	96,0
<i>rorf7</i>	190	190	190	<i>escJ</i>	Typ III Sekretion	97,9	99,5	97,4
<i>rorf8</i>	142				Typ III Sekretion ?			
<i>rorf9</i>	98	99	98	<i>sepZ</i>	Typ III Sekretion	59,2	96,9	59,2
<i>orf12</i>	117				Typ III Sekretion ?			
<i>orf13</i>	675	675	675	<i>escV</i>	Typ III Sekretion	96	99,7	96,1
<i>orf14</i>	446	446	446	<i>escN</i>	Typ III Sekretion	95,7	99,6	96,0
<i>orf15</i>	125				Typ III Sekretion ?			
<i>orf16</i>	138				Typ III Sekretion ?			
<i>orf17</i>	305	305	305	<i>sepQ</i>	Typ III Sekretion	87,9	100	87,9
<i>orf18</i>	176				Typ III Sekretion ?			
<i>rorf10</i>	120	120	120	<i>cesF</i>	Chaperon für EspF	78,3	98,3	77,5
<i>orf19</i>	203	203	203	<i>map</i>	Sezerniertes Protein	74,9	88,7	75,4
<i>orf20</i>	550	550	550	<i>tir</i>	Intimin Rezeptor	56,5	95,8	56,8
<i>orf21</i>	156	156	156	<i>cesT</i>	Chaperon für Tir	96,8	100	96,8
<i>orf22</i>	939	937	948	<i>eaeA</i>	Intimin	79,5	83,2	79,8
<i>rorf11</i>	406	406	406	<i>escD</i>	Typ III Sekretion	92,9	97,8	94,1
<i>orf23</i>	351	351	351	<i>sepL</i>	Typ III Sekretion	94,6	97,7	94,3
<i>orf24</i>	192	192	190	<i>espA</i>	Sezerniertes Protein	81,2	74,2	73,7
<i>orf25</i>	380	380	379	<i>espD</i>	Sezerniertes Protein	75,8	85,5	71,1
<i>orf26</i>	321	307	321	<i>espB</i>	Sezerniertes Protein	61,9	100	61,9
<i>orf27</i>	135				unbekannt			
<i>orf28</i>	73	73	73	<i>escF</i>	Typ III Sekretion	97,3	100	97,3
<i>orf29</i>	92				unbekannt			
<i>orf30</i>	206	207	204	<i>espF</i>	Sezerniertes Protein	75,7	85,8	73,0

Die LEE-kodierten Effektorproteine

Bei den Proteinen, die sich im Gegensatz zu den hoch konservierten Esc- und Sep-Proteinen deutlich in den untersuchten Bakterienstämmen voneinander unterscheiden, handelt es sich um die auf dem LEE-kodierten Effektorproteine (s. Tab. 5.2).

Der Proteinvergleich zeigte, daß das Typ III-abhängig sezernierte Protein EspA des EPEC-Stammes E2348/69 nur zu 81,2 % identisch mit EspA des DA-EPEC-Stammes 3431 und zu 74,2 % identisch mit EspA des DA-EPEC-Stammes O181 ist. Ähnlich starke Abweichungen zwischen 61,9 und 85,8 % sind bei den Proteinen EspD und EspF der drei Stämme festzustellen (s. Tab. 5.2). Interessanterweise zeigt aber das EspB-Protein des DA-EPEC-Stammes O181 eine 100 % ige Identität mit dem EspB des EPEC-Stammes E2348/69, das im Vergleich dazu aber nur 61,9 % identisch zum entsprechenden Protein des DA-EPEC-Stammes 3431 ist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Esp-Proteine deutliche Unterschiede aufweisen. Diese sind vermutlich die Folge des größeren evolutionären Drucks, unter dem diejenigen Proteine stehen, die direkt an den Interaktionen mit der Wirtszelle beteiligt sind. Darüberhinaus verdeutlichen die Unterschiede in den Effektorproteinen auch eine Anpassung an die Virulenzeigenschaften der unterschiedlichen A/E-Bakterien-Stämme.

Die Expression eines identischen EspB bestätigt darüberhinaus die enge Verwandtschaft des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69.

Neben den Genen für die Esp-Proteine ist auf dem LEE auch noch das Gen *eaeA*, das für das äußere Membranadhäsion Intimin (EaeA) kodiert, sowie der Rezeptor für Intimin, Tir, lokalisiert. Die Interaktion von Intimin und Tir spielt eine entscheidende Rolle für die Virulenz von enteropathogenen *E. coli*, da sie eine enge Verbindung („intimate attachment“) zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle vermittelt (Nataro & Kaper, 1998). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß Intimin essentiell für die Virulenz von EPEC ist (Donnenberg & Kaper, 1992).

Der Vergleich der Aminosäuresequenz des Intimins zeigte, daß sich die Intimin-Proteine schon in ihrer Länge unterscheiden. So ist das Intimin des DA-EPEC-Stammes O181 948 Aminosäuren groß, während die entsprechenden Proteine des EPEC-Stammes E2348/69 und des DA-EPEC-Stammes 3431 nur 939 bzw. 937 Aminosäuren umfassen. Darüberhinaus ergab der Vergleich, daß das Protein des EPEC-Stammes E2348/69 nur zu 79,5 bzw. 83,2 % identisch ist zum Intimin des DA-EPEC-Stammes 3431 bzw. DA-EPEC-Stammes O181. Die beiden Proteine der DA-EPEC sind zu 79,8 % gleich.

Man unterscheidet darüberhinaus unterschiedliche Intimintypen (□ bis □), die zur phylogenetischen Einordnung der A/E-Bakterien eingesetzt werden (Adu-Bobie *et al.*, 1998; Agin *et al.*, 1997; Pelayo *et al.*, 1999). So ergab der Vergleich der Intimine mit den bereits beschriebenen Intimintypen, daß das Intimin des EPEC-Stammes E2348/69 zu 94,4 % identisch mit Intimin alpha2 und das Intimin des DA-EPEC-Stammes 3431 zu 99,8 % identisch zum Intimin jota2 ist, während das Intimin des DA-EPEC-Stammes O181 als Intimin epsilon2 identifiziert werden konnte. Der EHEC-Stamm EDL 933 exprimiert den Intimin-Typ lambda, *C. rodentium* den Intimin-Typ und die beiden Stämme RDEC-1 und STEC419/89-1 (O26:H-) dagegen zu 100 bzw. 99,9 % Intimin beta.

Anhand der Intimin-Typen wurde ein phylogenetischer Stammbaum aufgestellt (s. Abb. 5.18).

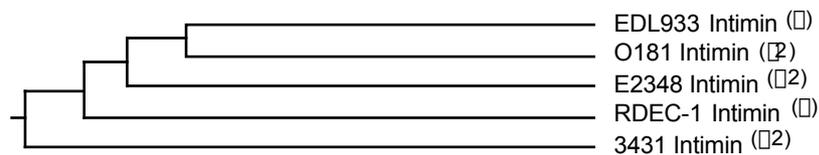


Abb. 5.18 Phylogenetischer Stammbaum der Intimine

Der Intimin-Rezeptor Tir, der von den Bakterien sezerniert und in die Membran der Wirtszelle transloziert wird, ist im EPEC-Stamm E2348/69 und DA-EPEC-Stamm O181 zu 95,8 % identisch. Ganz im Gegensatz dazu ähnelt dieses Protein im DA-EPEC-Stamm 3431 nur zu 56,5 bzw. 56,8 % dem Tir des EPEC-Stammes E2348/69 bzw. des DA-EPEC-Stammes O181. Sequenzvergleiche des Tir des EPEC-Stammes E2348/69 mit dem Tir des EHEC EDL 933 bzw. *C. rodentium* weisen ebenfalls nur Homologien von 60 bzw. 79 % auf. Während gezeigt werden konnte, daß die Proteine, die an der Bildung des Typ III-Sekretionssystem beteiligt sind, sehr konserviert sind, weichen die LEE-kodierten Effektorproteine in ihrer Proteinsequenz teilweise stark voneinander ab. Dies zeigt, daß die Virulenzproteine, die in die Wirtszelle transloziert werden und an den Interaktionen mit der Wirtszelle beteiligt sind, möglicherweise als Resultat einer Anpassung der pathogenen Bakterien auf den Wirt, deutliche Veränderungen erfahren haben. Somit besitzen diese Bakterien eine für ein nahezu identisches Typ III-Sekretionssystem, aber unterschiedliche Effektorproteine kodierende Pathogenitätsinsel.

Auch die auf dem LEE kodierten Chaperone CesD, CesF und CesT sind in hohem Maße identisch (s. Tab. 5.3). Die starke Konservierung dieser Proteine, die an der Stabilisierung der Effektorproteine und ihrer Interaktion mit dem Typ III-Sekretionssystem beteiligt sind, scheint ebenfalls für den Erhalt der Funktion von entscheidender Bedeutung zu sein.

Da zwei dieser Virulenzproteine, Tir und EspB, in den beiden Stämmen EPEC E2348/69 und DA-EPEC O181 mit 95,8 bzw. 100 % eine hohe Identität aufweisen, deutet darüberhinaus auf eine enge Verwandtschaft dieser beiden Stämme im Vergleich zum DA-EPEC-Stamm 3431 hin. Auch in Bezug auf die anderen Effektorproteine sowie die Esc- und Sep-Proteine weist der DA-EPEC-Stamm O181 eine größere Identität zum EPEC-Stamm E2348/69 als der DA-EPEC-Stamm 3431.

Insertionsorte des LEE im bakteriellen Chromosom

Die sequenzierten Regionen des DA-EPEC-Stammes O181 und der DA-EPEC-Stammes 3431 enthalten neben der LEE-Sequenz auch die chromosomalen DNA-Bereiche, die den LEE flankieren. Daher ist es durch einen Vergleich mit dem *E. coli* K12-Genom möglich, den genauen Insertionsort des LEE im Chromosom zu bestimmen (Blattner *et al.*, 1997). Das 5'-Ende des LEE DA-EPEC-Stammes O181 beginnt im *yicK*-Gen des *E. coli*-Genoms etwa 250 bp 3' vom Stopcodon entfernt (s. Abb. 5.19). Am 3'-Übergang des LEE findet sich zunächst direkt im Anschluß an *espF* ein 789 bp großes DNA-Fragment, das keine Homologie zu bekannten DNA-Bereichen zeigt. Proximal des LEEs schließt sich das Insertionselement IS600 (93 bp) sowie weitere 16 bp entfernt das *selC*-Gen des *E. coli*-Genoms (95 bp) an. Somit ist der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 im Bereich des *selC*-tRNA-Gens, genauer im *yicK*-Gen, in das bakterielle Genom integriert. Durch die Integration wurde das *yicK*-Gen sowie die Region zwischen diesem Gen und dem *selC*-Gen deletiert.

Dieser Integrationsort im Bereich des *selC*-Gens ist identisch mit den Integrationsorten des LEE im EPEC-Stamm E2348/69 und im EHEC-Stamm EDL933, was durch einen Vergleich der flankierenden Regionen gezeigt werden konnte. Das Insertionselement IS600 ist ebenfalls am 3'-Übergang des LEE des EPEC-Stammes E2348/69 vorhanden, nicht aber im EHEC-Stamm EDL 933 (Elliott *et al.*, 1998; Perna *et al.*, 1998). Der LEE des EHEC-Stammes EDL933 unterscheidet sich vom LEE des EPEC-Stammes E2348/69 und DA-EPEC-Stammes O181 durch die Integration des Prophagen 933L (7,5 kb) an seinem 5'-Ende (Perna *et al.*, 1998).

Der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 ist dagegen im Bereich des *pheU*-tRNA-Gens in das bakterielle Genom integriert (s. Abb. 5.19). Distal des 5'-Überganges des LEE des DA-

EPEC-Stammes 3431 konnte in einem Sequenzvergleich mit dem *E. coli* K12-Genom das *jidH*-, *jidI*- und *jidJ*-Gen sowie ein Fragment des *jidK*-Gens identifiziert werden. Am 3'-Übergang des Kernbereiches des LEE (proximal vom Stopcodon des *espF*-Gens) folgt ein 240 bp langer Bereich, der identisch mit dem gleichen Bereich des LEE des EPEC-Stammes E2348/69 ist. Es schließt sich ein etwa 1260 bp langes DNA-Fragment, zu dem keine homologen Sequenzen gefunden werden konnten, sowie eine 134 bp große „repeat region“, die identisch ist mit einem Bereich am rechten Übergang des LEE des STEC-Stammes 413/89-1 (O26:H-). Etwa 1617 bp vom 3'-Ende des Kernbereiches des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 entfernt befindet sich schließlich das *pheU*-tRNA-Gen gefolgt vom *yjdC*-Gen des *E. coli*-Genoms. Der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 ist demnach stromaufwärts des *pheU*-tRNA-Gens in das Chromosom integriert, was zu der Deletion eines etwa 10 kb großen, chromosomalen Bereiches von *yjidK* bis *cadC* geführt zu haben scheint, da diese Gene in der vorliegenden Sequenz nicht mehr identifiziert werden konnten.

Der etwa 1,5 kb große 5'-Übergangsbereich ist darüberhinaus partiell identisch zu dem nicht näher definierten 3'-Übergang des LEE des STEC-Stammes RW1374 (O103:H2) und zum 5'-Übergang des LEE des RPEC-1-Stammes. Somit ist der LEE in diesen drei Stämmen im Bereich des *pheU*-Gens in das Chromosom integriert.

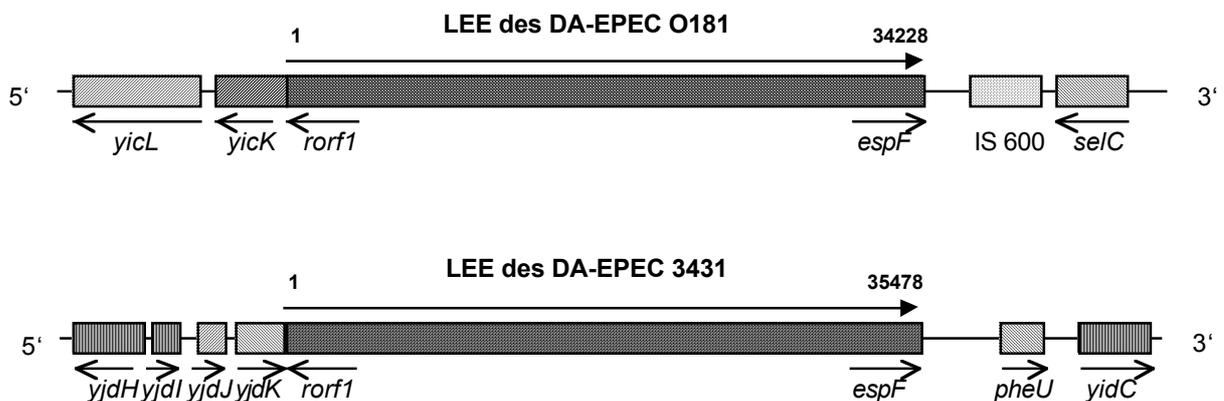


Abb. 5.19 Schematische Darstellung der Übergänge des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des DA-EPEC-Stammes 3431 in das bakterielle Chromosom.

Der GC-Gehalt des LEE der DA-EPEC-Stämme

Bakterielle Pathogenitätsinseln zeichnen sich in der Regel durch einen im Vergleich zum Chromosom veränderten GC-Gehalt aus, der darauf schließen läßt, daß diese genetischen Elemente von einem anderen Organismus auf das Bakterium übertragen wurden (Hacker & Kaper, 2000). Mit etwa 38-40 % liegt der GC-Gehalt der bislang beschriebenen LEE des EPEC-Stammes E2348/69 (38,4 %), des EHEC-Stammes EDL 933 (39,6 %), des RDEC-1 (41,3 %) und von *Citrobacter rodentium* (38,1 %) deutlich unter dem GC-Gehalt des *E. coli*-Genoms von 50,8 % (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001; Blattner *et al.*, 1997). So zeigte auch Sequenzanalyse, daß der LEE der beiden DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 mit 38,3 % bzw. 39,5 % ebenfalls einen niedrigen GC-Gehalt aufweist. Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß vermutlich auch der LEE durch horizontalen Gentransfer von einem bislang nicht identifizierten Organismus auf die bekannten A/E-Pathogene übertragen wurde.

Der Regulator Ler

Der *orf1* des LEE kodiert einen als Ler („LEE encoded regulator“) bezeichneten Regulator. Für den EPEC-Stamm E2348/69 wurde beschrieben, daß Ler ein Bestandteil der Signalkaskade des übergeordneten Regulator Per ist und eine entscheidende Rolle für die Expression der LEE-kodierten Gene spielt (Elliott *et al.*, 2000).

Die Sequenzanalyse des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 zeigte, daß im Bereich des *ler*-Gens das 1,4 kb lange Transposon Tn5 in das Gen integriert ist. Da das offene Leseraster davon nicht betroffen zu sein scheint, sondern das Stopcodon im Bereich des Transposon liegt, ist die Funktion dieses Gens möglicherweise nicht ganz zerstört. Darüberhinaus ist die Bedeutung von Ler in den DA-EPEC-Stämmen bislang nicht geklärt. So fehlt den DA-EPEC das EAF-Plasmid, das unter anderem für den Regulator Per kodiert. Daher muß in den DA-EPEC ein anderer Regulator vorhanden sein. Bislang konnte nicht bestimmt werden, welche Faktoren für die Regulation des LEE in diesen Bakterien verantwortlich sind.

5.3.2 Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC 0181

Durch Transfer der LEE-Pathogenitätsinsel des EPEC-Stammes E2348/69 auf den *E. coli* K12-Stamm läßt sich die Fähigkeit zur Induktion des A/E-Phänotyps übertragen (McDaniel & Kaper, 1997). Darüberhinaus verhindern Mutationen in einem der LEE-kodierten Gene (mit Ausnahme von *espF*) die Ausbildung von A/E-Läsionen (McNamara & Donnenberg, 1998; Nataro & Kaper, 1998).

Im Gegensatz dazu ist der *E. coli* K12-Stamm nach Übertragung des LEE des EHEC-Stammes O157:H7, der die gleichen Gene in identischer Reihenfolge und Orientierung enthält wie der LEE des EPEC-Stammes E2348/69, erstaunlicherweise nicht in der Lage, bei Infektion von Wirtszellen A/E-Läsionen auszulösen (Elliott *et al.*, 1999).

Um zu untersuchen, ob der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 die notwendigen Informationen enthält, um die Bildung von A/E-Läsionen in Wirtszellen zu induzieren, wurde eine Funktionsanalyse mit dem Klon JG-LEE O181 (*E. coli* XL1 blue MR transformiert mit dem Cosmidklon LEE 0181 #38, s. Tab. 5.2) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Funktionsanalyse wurde getestet, ob der Klon JG-LEE 0181 in der Lage ist, an Wirtszellen zu adhären, Virulenzproteine zu sezernieren sowie Signaltransduktionswege in Wirtszellen zu induzieren. Infektionsversuche mit Klonen, die nur Teile des LEE des DA-EPEC O181 enthalten, sollten darüberhinaus zeigen, ob der gesamte LEE notwendig ist, um den A/E Phänotyp zu induzieren.

5.3.2.1 Adhärenzverhalten der untersuchten Cosmidklone

Der EPEC Prototyp-Stamm E2348/69 adhärirt nach 3-stündiger Infektion lokal in Mikrokolonien an HeLa-Zellen (s. Abb. 5.22 A), während die DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 diffus über die gesamte Zelle verteilt an diese anheften (s. Abb. 5.20 A & E).

Wie Abb. 5.20 C zeigt, ist der Klon JG-LEE O181 nach 3-stündiger Infektion ebenfalls in der Lage, an HeLa-Zellen zu adhären. Die Bakterien zeigen dabei einen diffusen Adhärenzphänotyp und sind bei gleicher MOI im Vergleich zum DA-EPEC O181-Wildtypstamm deutlich weniger adhären. Der Laborstamm *E. coli* XL1 blue MR ist dagegen ohne den Cosmidvektor LEE 0181 #38 nicht in der Lage, an HeLa-Zellen zu adhären (s. Abb. 5.20 I).

JG-LEE O181 und der Laborstamm *E. coli* XL1 blue MR weisen eine deutliche Stäbchenform auf, während die klinischen Isolate EPEC E2348/69, DA-EPEC O181 und DA-EPEC 3431 eine eher abgerundete Morphologie aufweisen.

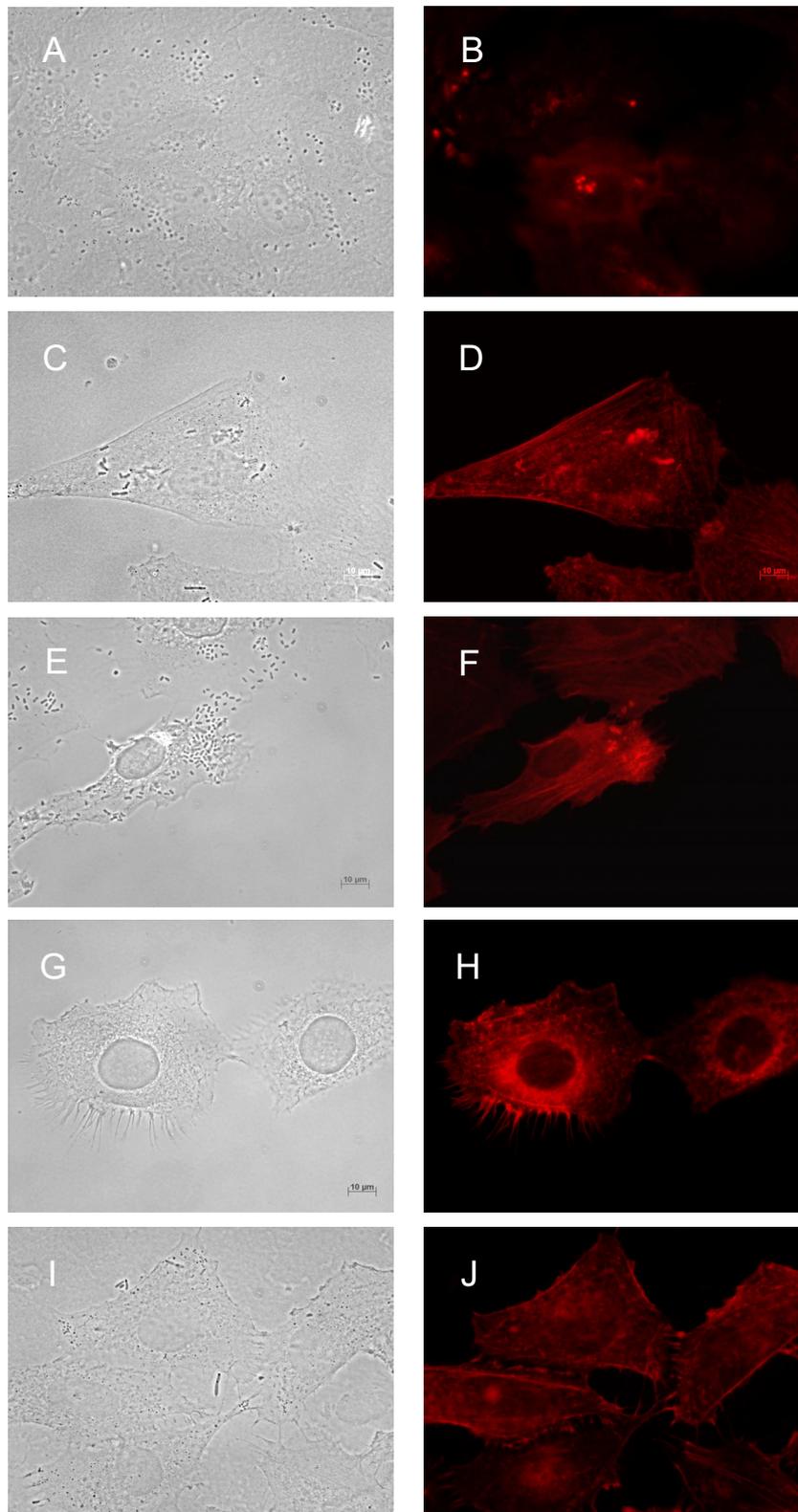


Abb. 5.20 Akkumulation von F-Aktin unterhalb adhärrierender Bakterien. HeLa-Zellen wurden für 3 Stunden mit Bakterien (**A & B**) des DA-EPEC-Stammes O181, (**C & D**) des Klones JG-LEE O181 (enthält den gesamten LEE des O181), (**E & F**) des DA-EPEC-Stammes 3431, (**G & H**) des Klones 3431#180 (enthält ein 28 kb großen Fragment des LEE des 3431), und (**I & J**) des Laborstammes *E. coli* XL1 blue MR infiziert. Gezeigt sind Phasenkontrast- & Fluoreszenzaufnahmen desselben Bildausschnittes.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der gesamte LEE des DA-EPEC 0181 notwendig ist, um dem Laborstamm *E. coli* XL1 blue MR die Fähigkeit zu verleihen, an eukaryotische Zellen zu adhären. Es zeigte sich, daß *E. coli* XL1 blue MR transfiziert mit den Cosmidklonen 0181 #57, 0181 #46, 0181 #73 bzw. 3431 #180 (s. Abb. 5.20 G) nicht in der Lage sind, an HeLa-Zellen zu adhären (s. zum Vgl. Abb. 5.20 I, *E. coli* XL1 blue MR).

5.3.2.2 Akkumulation von filamentösem Aktin (Fas-Test)

Akkumulation von F-Aktin unterhalb adhätierender Bakterien ist ein Prozeß, der mit dem A/E-Phänotyp assoziiert ist. Mit Hilfe des FAS-Testes („Fluorescence Actin Staining“) wurde deshalb untersucht, ob der Klon JG-LEE 0181 in eukaryotischen Zellen eine Akkumulation von F-Aktin induzieren kann.

Eine 3-stündige Infektion mit den lokal adhätierenden EPEC-Stamm E2348/69 (s. Abb. 5.22 A & B) führt zu einer deutlichen Akkumulation von F-Aktin unterhalb der bakteriellen Mikrokolonien. Auch nach Infektion mit dem Klon JG-LEE 0181 weisen HeLa-Zellen deutlich gefärbte Bereiche unterhalb nahezu aller adhätierenden Bakterien auf (s. Abb. 5.20 C & D). Bakterien des Wildtyp-Stammes DA-EPEC O181 adhätieren dagegen zwar in deutlich größer Anzahl als die JG-LEE 0181 an HeLa-Zellen, aber nur etwa 1 % der Bakterien führt zu einer Akkumulation von F-Aktin (s. Abb. 5.20 A & B). Meist tritt diese unterhalb kleiner Gruppen adhätierender Bakterien auf. Das gleiche Ergebnisse wie für die DA-EPEC O181 wurde auch nach Infektion mit den DA-EPEC 3431 beobachtet (s. Abb. 5.20 E & F). Infektionen mit dem Laborstamm *E. coli* XL1 blue MR lösen keine Akkumulation von F-Aktin in den Zellen aus (Abb. 5.20 I & J).

E. coli XL1 blue MR transfiziert mit den Cosmidklonen 0181 #57, 0181 #46, 0181 #73 bzw. 3431 #180 (s. Abb. 5.20 G & H), die nur Teile des LEE enthalten (s. Abb. 5.16), vermögen ebenfalls nicht die Akkumulation von F-Aktin in HeLa-Zellen zu induzieren (s. Abb. 5.20 I & J, *E. coli* XL1 blue MR).

5.3.2.3 Sekretion von Virulenzproteinen

Der erste Schritt bei der Entstehung von A/E-Läsionen durch EPEC ist die Sekretion der LEE-kodierten Virulenzproteine, der Esps (EPEC secreted proteins), durch das *sep* Typ III Sekretionssystem. Sollte der klonierte LEE des DA-EPEC-Stammes O181 für die Bildung

von A/E Läsionen kodieren, so ist zu erwarten, daß er auch für ein funktionierendes Type III-Sekretionssystem kodiert.

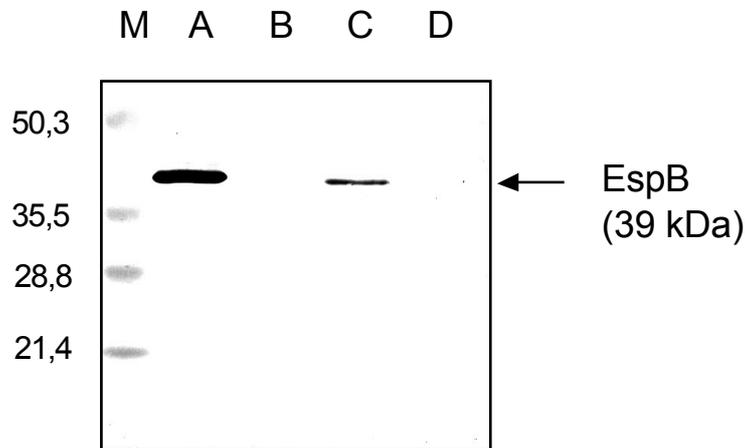


Abb. 5.21 Western Blot Analyse des bakteriellen Überstandes mit einem polyklonalen Antiserum gegen EspB.

Die sezernierten Proteine wurden mit TCA präzipitiert, mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Es wurden die Volumina, die der gleichen Bakterienzahl entsprechen, aufgetragen. (A) EPEC 2348/69, (B) DA-EPEC O181, (C) JG-LEE O181 und (D) *E. coli* XL 1 blue MR.

Es wurde untersucht, ob der Klon JG-LEE O181 in der Lage ist, Virulenzproteine in den Überstand zu sezernieren. Dazu wurden die im Überstand der Bakterienkulturen enthaltenen Proteine mit TCA gefällt, in einem 12 % igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und in einem Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen EspB detektiert.

Wie Abbildung 5.21 zeigt, konnte EspB im Überstand von JG-LEE O181-Kulturen detektiert werden. Das sezernierte Protein hat wie das EspB vom EPEC-Prototyp Stamm E2348/69 eine molekulare Masse von 38 kDa. Interessanterweise sezerniert der DA-EPEC O181 Wildtypstamm dagegen nur sehr geringe und nicht detektierbare Mengen an EspB in den Überstand (C. Beinke, 1999). Der Laborstamm *E. coli* XL1 blue MR sezerniert kein EspB in den Überstand.

5.3.2.4 Akkumulation Tyrosin-phosphorylierter Proteine

Die Interaktion pathogener Bakterien mit eukaryotischen Zellen führt häufig zur Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen in der Wirtszelle. Ein wichtiger Schritt für die Initialisierung von Signaltransduktionswegen ist unter anderem die Phosphorylierung von Proteinen der Wirtszelle, die z.B. zu einer Umlagerung von Bestandteilen des Zytoskeletts führen kann.

In einem weiteren Experiment wurde deshalb untersucht, ob Infektionen mit dem Klon JG-LEE 0181 zu einer spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen der Wirtszelle führen, und der LEE des DA-EPEC-Stammes 0181 somit alle notwendigen Faktoren enthält, um Wirtszell-Signaltransduktionswege zu induzieren.

Nach dreistündiger Infektion von HeLa-Zellen mit JG-LEE 0181 sieht man eine Akkumulation Tyrosin-phosphorylierter Proteine unterhalb adhärenter Bakterien (s. Abb. 5.22 E & F). Wie erwartet führen auch die als Positivkontrolle durchgeführte Infektion mit EPEC E2348/69 zu einer Akkumulation der Tyrosin-phosphorylierten Proteine (s. Abb. 5.22 A & B), dagegen ist dies nur bei einem kleinen Teil der adhärenen DA-EPEC 0181 sowie DA-EPEC 3431 der Fall (s. Abb. 5.20 C & D, G & H). Bei den als Negativkontrolle eingesetzten *E. coli* XL1 blue MR können keine phosphorylierten Proteine in den HeLa-Zellen detektiert werden (Abb. 5.22 I & J).

Die Doppelmarkierung von F-Aktin und spezifisch Tyrosin-phosphorylierten Proteinen zeigt darüberhinaus, daß diese beiden Signale kolokalisiert sind und zwar immer unterhalb adhärenter Bakterien.

Infektionen mit *E. coli* XL1 blue MR transfiziert mit den Cosmidklone 0181 #57, 0181 #73, 0181 #46 bzw. 3431 #180 induzieren keine Akkumulation von spezifisch Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in HeLa-Zellen (s. Abb. 5.22 I & J, *E. coli* XL1 blue MR).

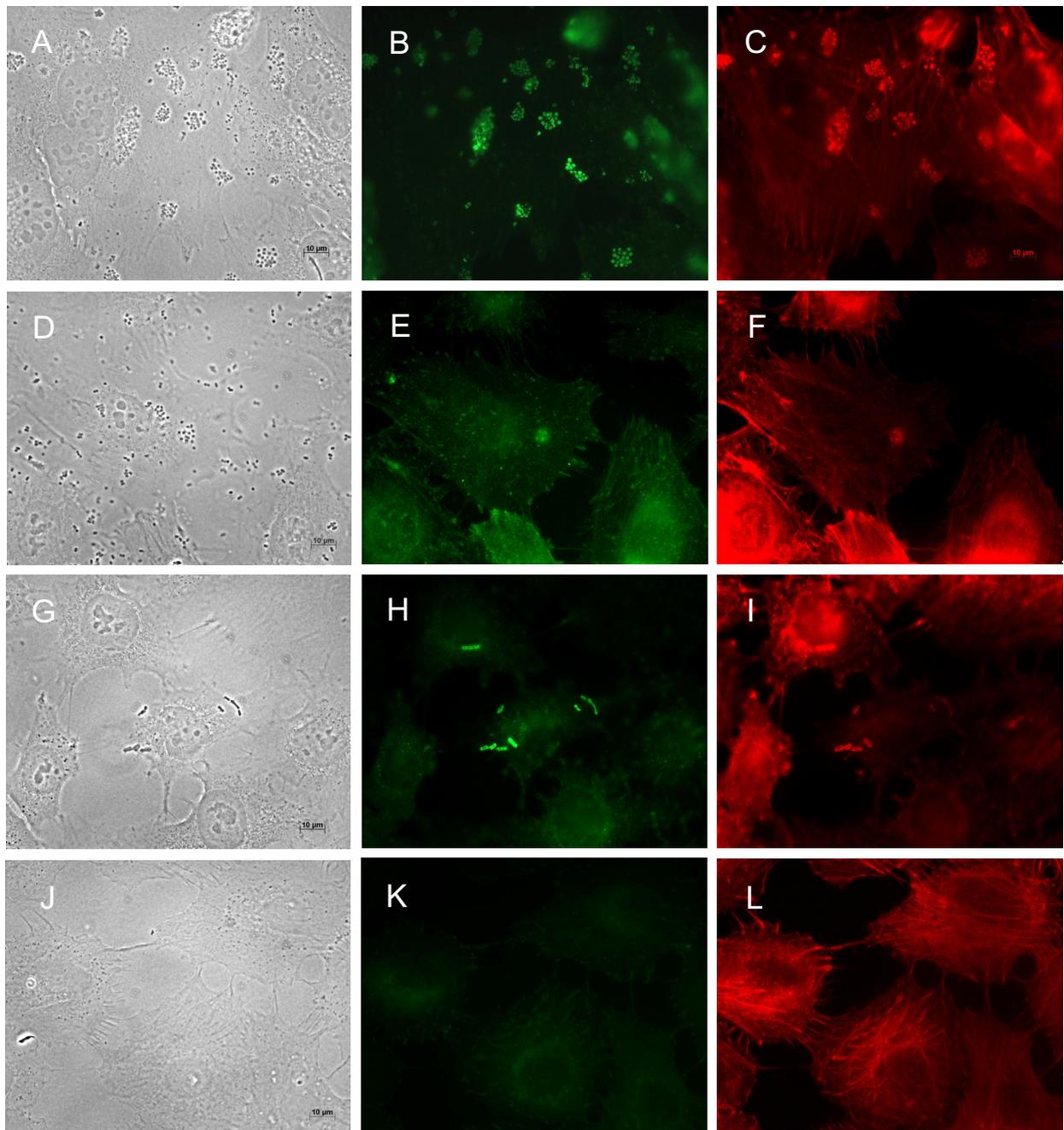


Abb. 5.22 Die Signale zum Nachweis der Akkumulation von spezifisch Tyrosin-phosphorylierten Proteinen (Mitte) und von F-Aktin (rechts) kolokalisieren unterhalb adhätierender Bakterien.
HeLa-Zellen wurden für 3 Stunden mit Bakterien (A,B,C) des EPEC-Stammes E2348/69, (D,E,F) DA-EPEC - Stammes O181, (G,H,I) des Cosmidklones JG-LEE O181 (enthält den gesamten LEE des O181) und (J,K,L) des Laborstammes *E. coli* XL1 blue MR infiziert. Gezeigt sind Phasenkontrast- & Fluoreszenzaufnahmen derselben Bildausschnitte.

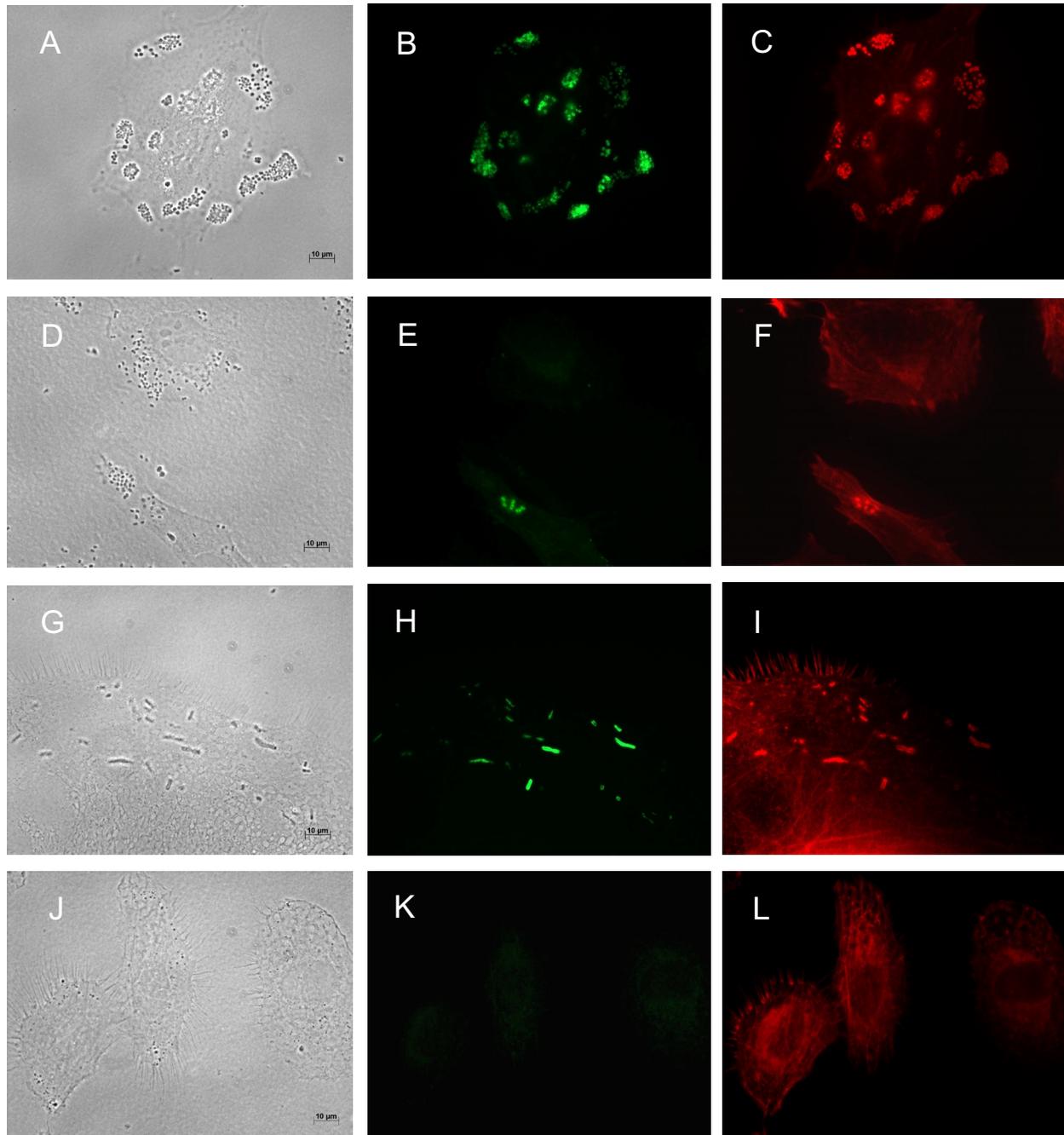


Abb. 5.23 Die Signale zum Nachweis von Tir (Mitte) und der Akkumulation von F-Aktin (rechts) kolokalisieren unterhalb adhätierender Bakterien.

HeLa-Zellen wurden für 3 Stunden mit Bakterien (**A,B,C**) des EPEC-Stammes E2348/69, (**D,E,F**) DA-EPEC-Stammes O181, (**G,H,I**) des Cosmidklones JG-LEE O181 (enthält den gesamten LEE des O181) und (**J,K,L**) des Laborstammes *E. coli* XL1 blue MR. Gezeigt sind Phasenkontrast- & Fluoreszenzaufnahmen derselben Bildausschnitte.

5.3.2.5 Nachweis von Tir (Translocated Intimin Receptor) in der Zellmembran von HeLa-Zellen

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Adhärenz des Klones JG-LEE 0181 an HeLa-Zellen über das LEE-kodierte Intimin sowie dessen Rezeptor Tir vermittelt wird.

Nach 3-stündiger Infektion mit dem Klon JG-LEE 0181 sowie mit den Positivkontrollen EPEC-Stamm E2348/69, DA-EPEC-Stamm O181 und DA-EPEC-Stamm 3431 konnte Tir in den Membran der infizierten HeLa-Zellen unterhalb adhärenter Bakterien detektiert werden (s. Abb. 5.23). Die Signale von Tir und akkumuliertem F-Aktin korrelieren unterhalb adhärenter Bakterien, wie in einer Doppelmarkierung gezeigt werden konnte (s. Abb. 5.23).

Bei der als Negativkontrolle durchgeführten Infektion mit dem Laborstamm *E. coli* XL1 blue MR findet man dagegen kein Tir in der Wirtszellmembran. Auch nach Infektionen mit *E. coli* XL1 blue MR transfiziert mit den Cosmidklonen 0181 #57, 0181 #73, 0181 #46 bzw. 3431 #180 konnte kein Tir in der Zellmembran von HeLa-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 5.23, *E. coli* XL1 blue MR).

5.3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC O181

Im Rahmen dieser Funktionsanalyse konnte gezeigt werden, daß die Übertragung des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 auf *E. coli* XL1 MR blue diesen Laborstamm in die Lage versetzt

- an HeLa-Zellen zu adhären,
- das Virulenzprotein EspB in den Überstand zu sezernieren,
- in der Wirtszelle Signaltransduktionswege zu induzieren, was durch die Akkumulation von F-Aktin und die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen unterhalb adhärenter Bakterien gezeigt werden konnte, sowie
- Tir in die Zellmembran der Wirtszelle zu inserieren.

Damit demonstrieren die Ergebnisse der Funktionsanalyse, daß der LEE des DA-EPEC O181 alle pathogen-spezifischen Gene enthält, die notwendig sind, um den A/E-Phänotyp in den Zielzellen zu induzieren. Darüberhinaus konnte durch Infektionsversuche mit Cosmidklonen, die nur Teile des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 enthalten, gezeigt werden, daß der gesamte LEE erforderlich ist, um den A/E-Läsionen auszulösen.

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines M-Zell-Modells

Die Passage von Antigenen und Mikroorganismen durch M-Zellen stellt nicht nur einen essentiellen Schritt für die Entwicklung mukosaler Immunantworten sondern auch für die Pathogenese einer Reihe von Infektionskrankheiten dar. Eine genaue Analyse der Funktionsweise dieser speziellen Epithelzellen würde das Verständnis von Antigenerkennung und Transzytose durch M-Zellen verbessern und darüberhinaus zur Entwicklung oraler Vakzine sowie zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beitragen.

Aufgrund eines fehlenden Zellkultursystem ist sowohl die eigentliche Charakterisierung von M-Zellen als auch die Analyse ihrer Interaktionen mit Mikroorganismen bislang auf morphologische Studien beschränkt. Da aufgrund der geringen Zahl von M-Zellen im Darm die direkte Isolierung nur schwer möglich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bildung von M-Zellen *in vitro* induziert und ein Zellkultur-System für M-Zellen etabliert.

In einem ersten Ansatz sollten Bedingungen etabliert werden, die es erlauben, frisch isolierte Epithelzellen möglichst lange zu kultivieren, um diese Zellen für die Induktion von M-Zellen *in vitro* einsetzen zu können. Der Vorteil der primären Epithelzellen liegt einerseits darin, daß sie aus dem Gewebe stammen, das auch *in vivo* M-Zellen hervorbringt, andererseits ist anzunehmen, daß diese Zellen für die Induktion empfänglicher sind als eine transformierte Zelllinie.

6.1.1 Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen der Maus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich eine Primärkultur aus murinen intestinalen Epithelzellen etabliert und über einen Zeitraum von bis zu vierzehn Tagen kultiviert werden.

Als Grundvoraussetzung für die Etablierung dieser Primärkultur erwies sich die Verwendung von Dünndarmgewebe aus neonatalen Tieren. Die Tatsache, daß der Anteil von Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen im neonatalen Gewebe höher ist, verbessert vermutlich die Überlebenschancen dieser Zellen *in vitro* (Evans *et al.*, 1992; Freshney, 1994; J. Gärtner, 1999). Dazu kommt, daß die proliferationsfähigen Stammzellen im neonatalen Darm, der noch keine ausgeprägten Krypten aufweist, an der Basis der Villi lokalisiert und somit für

eine Isolierung leichter zugänglich sind. Darüberhinaus ist davon auszugehen, daß bei den neonatalen Tieren der Darm noch wenig durch residente Bakterien besiedelt ist und, im Vergleich zu adulten Tieren, die Zahl pathogener Mikroorganismen reduziert ist, so daß Kontaminationen, die einen negativen Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Zellen haben, bei Verwendung neonatalen Gewebes seltener auftreten.

Die Entwicklung einer sehr schonenden Isolierungsmethode ist essentiell für den Erfolg einer Primärkultur. Von besonderer Bedeutung für das Überleben der Zellen *in vitro* ist der Erhalt der Zell-Zell-Kontakte. So konnten nur bei Isolierung von Zellverbänden erfolgreich primäre Epithelzellen kultiviert werden. Der Verdau mit den proteolytischen Enzymen Collagenase/Dispase, die die extrazelluläre Matrix unterhalb der Epithelzellen auflösen ohne zelluläre Strukturen zu beschädigen, erwies sich als sehr gut geeignet für eine schonende Gewebedissoziation (Stenn *et al.*, 1989).

Durch den Kontaktverlust mit der extrazellulären Matrix wird in den isolierten Epithelzellen Apoptose ausgelöst (Rouslahti & Reed, 1994; Grossmann *et al.*, 1998; Rogler *et al.*, 1998). Durch die Beschichtung der verwendeten Kulturplatten mit Proteinen der extrazellulären Matrix versucht man deshalb diesem Effekt entgegenzuwirken. Die Zellen werden auf den beschichteten Platten deutlich schneller adhären als auf unbeschichteten Platten, was sich sehr positiv auf die Überlebensrate der frisch isolierten Epithelzellen auswirkt. Als entscheidend für den Erfolg der Kultivierung stellte sich neben der schnellen Anheftung der Zellen auch heraus, daß die Zellen in ausreichender Zahl adhären werden müssen, so daß sie in Kontakt zu benachbarten Zellen stehen. Nur auf beschichteten Platten wurde eine ausreichende Anzahl an Zellverbänden innerhalb weniger Stunden adhären, die im Laufe der folgenden Tage einen Zellmonolayer ausbilden konnten.

Die Wahl des Beschichtungssubstrates hat zusätzlich auch einen Einfluß auf das Wachstum der unterschiedlichen Zelltypen, die in der Primärkultur enthalten sind. Somit besitzt man mit einer geeigneten Wahl und Zusammensetzung der Beschichtung eine Möglichkeit, das Überleben bestimmter Zelltypen aus einer heterogenen Population gezielt zu induzieren und so zur Anreicherung der gewünschten Zellen beizutragen. Wie bei der Etablierung einer Primärkultur aus intestinalen Epithelzellen der Ratte gezeigt werden konnte, fördert eine Beschichtung mit Fibronectin vor allem die Adhärenz von Fibroblasten (Freshney *et al.*, 1994; J. Gärtner, 1999). Auf einer Beschichtung mit ECM-Proteinen, die sich zu etwa 55 % aus Laminin, 30 % aus Collagen IV, 10 % aus Entactin und zu 5 % aus Heparinsulfat-Proteoglykan zusammensetzt und zudem noch einige Wachstumsfaktoren wie EGF enthält, scheinen dagegen vor allem Epithelzellverbände adhären zu werden.

Eine wichtige Rolle für das Überleben der Zellen *in vitro* spielt darüberhinaus die Zusammensetzung des Kulturmediums. Die Supplementierung des Mediums mit einem Gemisch aus Insulin, Transferrin und Selensäure (ITS-Premix) hat einen positiven Effekt auf die Proliferation und Langzeitkultivierung von Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt (Moyer & Aust, 1984), der auch in der intestinalen Primärkultur beobachtet werden konnte. Diese positiven Auswirkungen des ITS-Premix auf die Primärkultur lassen sich dadurch erklären, daß das Hormon Insulin die Aufnahme von Glukose und Aminosäuren steigert und außerdem einen mitogenen Effekt auf die kultivierten Zellen ausübt (Kelley *et al.*, 1978). Transferrin ist ein Bindungsprotein für Hormone und Nährstoffe, während Selensäure eine Rolle als Co-Faktor im Glutathion-Peroxidase-Weg spielt, der an der Eliminierung freier Radikale, die das isolierte Gewebe schädigen können, beteiligt ist (Freshney, 1994).

Dem Medium wurde überdies noch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, „epidermal growth factor“) zugesetzt, der einen mitogenen Effekt auf eine Reihe von epidermalen und epithelialen Zellen zeigt und das Auswachsen der Zellen aus adhärenen Zellverbänden steigern soll (Evans *et al.*, 1992). Die Supplementierung mit EGF steigert das Überleben der Zellen in Kultur deutlich. Zelluläre metabolische Auswirkungen des EGF beinhalten den Glukosetransport, die Glykolyse sowie die Synthese von DNA, RNA und Proteinen (Barnes *et al.*, 1976, Diamond *et al.*, 1978; Carpenter *et al.*, 1979).

Bei den isolierten Zellverbänden sowie den kultivierten Monolayern handelt es sich, wie durch die Immunfluoreszenzfärbung mit einem spezifischen Marker gezeigt werden konnte, zum überwiegenden Teil um Epithelzellen. Kontaminationen mit anderen Zelltypen lassen sich bei der verwendeten Isolierungsmethode nicht völlig ausschließen, sind aber auch in geringem Maße erwünscht. So konnten Epithelzellen bislang nur in Zellpopulationen, die auch andere Zelltypen enthalten, kultiviert werden (Kedinger *et al.*, 1987; Evans *et al.*, 1992). Eine besondere Bedeutung scheinen in diesem Zusammenhang Muskelzellen zu haben, die die Proliferation von Epithelzellen in Kultur anregen können (Kedinger *et al.*, 1987; Evans *et al.*, 1992).

Der Einsatz der Primärkultur zur Induktion von M-Zellen durch Co-Kultivierung mit Lymphozyten erforderte die Kultivierung der primären Epithelzellen auf Transwell-Filtern. Obwohl primäre Epithelzellen unter den hier entwickelten Bedingungen regelmäßig zwischen 10-14 Tagen in Kultur gehalten werden konnten, gelang es nicht, die Zellen der Primärkultur auch erfolgreich auf Transwell-Filtern zu kultivieren, da die Zellen auf diesem Untergrund trotz Beschichtung nicht adhären wurden und wie oben beschrieben, nach kurzer Zeit abstarben.

Die Primärkultur konnte zwar nicht für die Etablierung eines M-Zell-Modells eingesetzt werden, eignet sich aber als Modellsystem für Infektionsversuche mit enteropathogenen *E. coli*. So führen Infektionen mit dem EPEC-Stamm E2348/69 zur Induktion der charakteristischen A/E-Läsionen in den Wirtszellen.

6.1.2 Etablierung einer Zelllinie aus intestinalen Epithelzellen

Um die begrenzte Lebensdauer der primären Epithelzellen zu verlängern und so den Einsatz dieser Zellen für die Etablierung eines Kultur-Modells zu ermöglichen, wurde deshalb versucht, die Primärkultur durch Transfektion mit dem Vektor pEGFP-T zu immortalisieren. Der Vektor pEGFP-T kodiert neben dem Markerprotein GFP und einer Neomycin-Resistenz auch für das SV40 large T-Antigen, ein virales Onkogen, das schon erfolgreich für die Immortalisierung von Epithelzellen des Ratten- und Mäusedarms eingesetzt wurde (Chastre *et al.*, 1991; Vidal *et al.*, 1993).

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Hilfe von drei unterschiedlichen Methoden. Mit einer Transfektionsrate von 5-10 % war die Transfektion am erfolgreichsten, wenn adhärent wachsende Epithelzellen eingesetzt wurden und das Reagenz „Effectene“ (Qiagen) verwendet wurde. Die Transfektion mit Hilfe des „SuperFect Transfection Reagent“ (Qiagen) wies dagegen nur eine Transfektionsrate von 2 % auf. Somit scheint die Zusammensetzung des „Effectene“ effizienter und auch für die Zellen weniger zytotoxisch zu sein als das „SuperFect Transfection Reagent“.

Die Elektroporation der Suspension aus primären Epithelzellen direkt nach der Isolierung erzielte trotz einer Reihe von Modifizierungen hinsichtlich der Stärke des eingesetzten Pulses das schlechteste Transfektionsergebnis von <1 %. Darüberhinaus war der Anteil der durch die Elektroporation abgetöteten Zellen sehr hoch. Zwar ist ein Anteil von 50 % toter Zellen als Folge einer Elektroporation zu erwarten (Baum *et al.*, 1994), es zeigte sich aber, daß die Zellen in Folge der Behandlung so geschädigt wurden, daß sie nur noch vereinzelt adhärerten und nicht mehr in der Lage waren, einen Monolayer auszubilden. Aus diesem Grund starben die elektroporierten Zellen schneller ab als die nicht-transfizierten Zellen.

Trotz einer Transfektionsrate von bis zu 10 % gelang es nicht, die intestinalen Epithelzellen mit dem Vektor pEGFP-T zu immortalisieren. Die transfizierten Zellen starben wie die nicht-transfizierten Zellen nach einer Gesamtkultivierungsdauer von maximal vierzehn Tagen ab. Da die Zelldichte für das Überleben von Zellen *in vitro* eine entscheidende Rolle spielt, könnte ein Grund für das Absterben der transfizierten Zellen die zu geringe Zelldichte nach

dem Verlust der nicht-transfizierten Zellen sein. Unterschreitet die Zelldichte einen kritischen Wert, sind die Zellen einem zunehmendem oxidativen Stress ausgeliefert, der schließlich zur Apoptose der Zellen führt (Brielmeier *et al.*, 1998).

Möglicherweise ist aber auch der Zeitraum, der zwischen der Transfektion und dem Absterben der Zellen liegt, nicht lang genug, damit das Onkogen seine volle Wirkung entfalten kann. Es ist beschrieben, daß Fibroblasten, die mit dem SV40 large T-Antigen transfiziert wurden, zunächst in eine Krisen-Periode eintreten, in der viele Zellen absterben. Diese Phase hält einige Wochen an, dann steigert sich die Wachstumsrate der transfizierten Kultur wieder deutlich. Die Zellen, die diese Krise überwunden haben, wurden erfolgreich immortalisiert (Saito & Moses, 1991). Möglicherweise sind die hier eingesetzten primären Epithelzellen zu sensitiv und ihre Lebensdauer generell zu kurz, so daß sie diese Krisenphase nicht überleben.

6.1.3 Etablierung eines M-Zell-Modells durch Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus murinen Peyer'schen Plaques

Es konnten zwar erfolgreich primäre Epithelzellen kultiviert werden, doch leider gelang es nicht, ihre unter diesen Bedingungen auf ca. vierzehn Tage begrenzte Lebensdauer entscheidend zu verlängern, um sie anschließend für die Induktion von M-Zellen einsetzen zu können. Aus diesem Grund wurde zur Etablierung des M-Zell-Modells auf Caco-2-Zellen zurückgegriffen. Da sich Caco-2-Zellen in Kultur zu polarisierten und differenzierten Enterozyten entwickeln, ist diese epitheliale Zelllinie ein häufig genutztes Modellsystem, um die intestinale Differenzierung zu untersuchen (Schreider *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Fähigkeit scheinen die Caco-2-Zellen auch für die Induktion einer Differenzierung zu M-Zellen eine geeignete Wahl zu sein.

M-Zellen treten im Dünndarm ausschließlich im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques auf, so daß man diese Zellen nur in Bereichen des Epithels findet, die in direktem Kontakt zu Zellen des Immunsystems stehen. Auch die Analyse von MALT und FAE in immundefizienten Mäusen zeigte, daß die Bildung von M-Zellen durch die Anwesenheit von Immunzellen reguliert wird (Kerneis *et al.*, 1997). Daraus wurde gefolgert, daß Zellen und/oder induktive Faktoren des MALT eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von FAE und M-Zellen spielen.

Für die *in vitro*-Induktion von M-Zellen erschien es naheliegend, Epithelzellen mit Lymphozyten aus den Peyer'schen Plaques zu kultivieren, da diese Immunzellen vermutlich auch *in vivo* an der Ausbildung von M-Zellen beteiligt sind.

Es gelang, durch Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus den Peyer'schen Plaques der Maus die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen *in vitro* zu induzieren. So konnte im Elektronenmikroskop gezeigt werden, daß die Lymphozyten durch die Poren der Filter in den Monolayer aus differenzierten Caco-2-Zelle einwandern, wo sie teilweise akkumulieren, wie es auch für M-Zellen beschrieben wird. Die Anwesenheit der Lymphozyten korrelierte darüberhinaus mit einer Umorganisation der Mikrovilli auf der apikalen Oberfläche einiger Epithelzellen, die nun statt eines geordneten Mikrovillisaums die für M-Zellen charakteristischen Einfaltungen aufweisen. Die Integrität des epithelialen Monolayers wird durch die Lymphozyten nicht zerstört, wie durch die Färbung mit dem Zellpolaritätsmarker UEA-1, der die apikale Oberfläche der Epithelzellen färbt, sowie durch die Messung des transepithelialen Widerstandes gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen und führen die Resultate, die Kerneis *et al.* (1997) in ihrem M-Zell-Modell beschrieben haben, fort.

6.1.4 Etablierung eines M-Zell-Modells durch Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit humanen Lymphozyten

Um zu untersuchen, ob die Bildung von M-Zellen speziell durch Immunzellen aus dem Bereich der Peyer'schen Plaques induziert wird oder generell Zellen des Immunsystems eine solche morphologische Veränderung auslösen können, wurden in einem weiteren Ansatz humane Blutlymphozyten für das M-Zell-Modell eingesetzt. Ein Vorteil dieses modifizierten Ansatzes ist, daß sowohl Epithelzellen als auch Lymphozyten aus der gleichen Spezies, dem Menschen, verwendet werden. Darüberhinaus wird eine Lymphozyten-Suspension eingesetzt, die aufgrund der verwendeten Isolierungsmethode höher aufgereinigt ist und somit weniger Zellen enthält, die keine Lymphozyten sind.

Auch bei Verwendung humaner Lymphozyten kann die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen in gleichem Maße wie bei der Verwendung von Lymphozyten aus den Peyer'schen Plaques induziert werden. So wandern die humanen Lymphozyten, wie bereits für die Co-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit Lymphozyten aus den Peyer'schen Plaques gezeigt werden konnte, in den epithelialen Monolayer ein und akkumulieren dort zum Teil. Die Integrität des Monolayers wird auch in diesem Ansatz durch das Einwandern der

Lymphozyten nicht zerstört. Dies konnte neben elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen durch eine Immunfluoreszenz-Analyse der „tight junction“-Proteine ZO-1 und Occludin, sowie durch die Messung eines im Vergleich zum Kontrollfilter, auf dem nur Caco-2-Zellen kultiviert wurden, kaum reduzierten transepithelialen Widerstandes demonstriert werden.

Neben diesen Beobachtungen verdeutlicht die Markierung des Aktin-Zytoskeletts durch eine Färbung mit Phalloidin, daß die Zahl der differenzierten und mit einem Mikrovillisaum ausgestatteten Zellen im M-Zell-Modell im Vergleich zum Caco-2-Monolayer deutlich reduziert ist. Da die Organisation des Zytoskeletts in Beziehung zum Zelltyp und zur Funktion der Zelle steht (Ingber *et al.*, 1993), wurde darüberhinaus untersucht, ob die M-Zell-ähnlichen Zellen aufgrund ihrer Transportfunktion im Vergleich zu den differenzierten Epithelzellen ein verändertes Zytoskelett aufweisen. Solche Veränderungen, die das Aktin-Zytoskelett der Zellen betreffen, konnten durch Untersuchungen mit Hilfe des Confokalen Laserscanning Mikroskops nicht beobachtet werden.

6.1.4.1 Identifizierung eines spezifischen Markers für M-Zellen

Ein spezifischer Marker für humane M-Zellen konnte bislang nicht identifiziert werden, daher wurden zur Charakterisierung der M-Zell-ähnlichen Zellen Färbungen mit einer Reihe von Antikörpern und Lektinen durchgeführt.

Da die Polysaccharide Membran-gebundener Glykoproteine und Glykolipide eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Epithelzellen spielen (Damjanov, 1987; Falk *et al.*, 1994), werden Lektine, die spezifisch an Zuckerstrukturen binden, häufig eingesetzt, um mögliche Unterschiede im Glykosylierungsmuster von Epithelzellen und M-Zellen zu detektieren. Es besteht die Hoffnung, auf diese Weise einen speziellen Marker für humane M-Zellen zu detektieren. So konnte bereits für Lektine mit einer Spezifität für α -L-Fukose oder N-Acetyl-Galaktosamin gezeigt werden, daß diese selektiv die apikale Membran und die Membran von Vesikeln im apikalen Zytoplasma von M-Zellen im zäkalen lymphatischen Plaque des Kaninchens markieren (Gebert & Hach, 1993; Jepson *et al.*, 1993; Gebert & Posselt, 1997). Dagegen konnten für die Peyer'schen Plaques des Dünndarms bei dieser Spezies keine M-Zell-spezifischen Glykokonjugate identifiziert werden. M-Zellen in den Peyer'schen Plaques von Balb/c-Mäusen exprimieren in der Glykokalix ihrer apikalen Membran große Mengen an Fukoseresten, die durch das Lektin UEA-1 nachgewiesen werden können (Clark *et al.*, 1993).

Die Färbung des Co-Kultur-Modells mit dem Lektin UEA-1 zeigte dagegen deutlich, daß im M-Zell-Modell weniger Zellen angefärbt sind als im Caco-2-Monolayer und sich das Glykosylierungsmuster der humanen Epithelzellen durch die Anwesenheit der Lymphozyten offenbar deutlich verändert hat. UEA-1, das differenzierte Epithelzellen färbt, kann somit als „negativer“ Marker für die Charakterisierung des M-Zell-Modells verwendet werden.

Ein weiteres Lektin, das Unterschiede zwischen den Caco-2-Zellen und den Zellen der M-Zell-Kultur aufweist, konnte bisher nicht detektiert werden. So zeigten Färbungen mit dem Lektin WGA, das spezifisch M-Zellen im Huhn und im Kaninchen markiert (Jepson *et al.*, 1995; Jeurissen *et al.*, 1999) und mit dem Lektin PNA, das als M-Zell-Marker im Kaninchen beschrieben ist (Jepson *et al.*, 1995), keine verstärkte Markierung der M-Zell-ähnlichen Zellen. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gullberg *et al.* (2000), die eine stärkere Markierung von Caco-2-Zellen nach Kultivierung mit Raji-Lymphozyten beschrieben haben. Die Frage, ob diese beiden Lektine auch als Marker für humane M-Zellen eingesetzt werden können, müßte letztlich anhand von Gewebefärbungen geklärt werden. Auch Färbungen mit zwei weiteren Lektinen, ECA und SJA, erwiesen sich nicht als Markierungen für M-Zell-ähnliche Zellen geeignet, da beide die Caco-2-Zellen der Kontrolle sowie der Co-Kultur in gleichem Maße anfärben.

Obwohl sich einige Lektine zur Identifizierung von M-Zellen in einigen Spezies eignen, sind bisher keine Lektine identifiziert worden, die als speziesübergreifende M-Zell-Marker eingesetzt werden können.

Als spezifischer, zytoplasmatischer Marker für M-Zellen in Kaninchen konnte Vimentin identifiziert werden, ein Protein aus den Intermedärfilamenten, das man normalerweise in Zellen mesenchymalen Ursprungs, nicht aber in Epithelzellen findet (Gebert *et al.*, 1992; Jepson *et al.*, 1992; Iwatsuki *et al.*, 2002). Die Zellen des humanen M-Zell-Modells ließen sich wie auch die Kontrolle aus Caco-2-Zellen nicht mit einem Antikörper gegen Vimentin anfärben. Dieses Ergebnis korreliert mit den Beobachtungen, daß auch die M-Zellen von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Schweinen keine Expression von Vimentin aufweisen, und Vimentin somit ausschließlich als Markerprotein für M-Zellen des Kaninchen eingesetzt werden kann (Jepson *et al.*, 1992).

Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, daß die M-ähnlichen Zellen des Co-Kultur-Systems im Vergleich zu den differenzierten Caco-2-Zellen auf ihrer apikalen Oberfläche eine reduzierte Expression von Sukrase-Isomaltase (SI) aufweisen, einer Hydrolase, die von differenzierten

intestinalen Enterozyten produziert wird (Costa de Beauregard *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis steht in gutem Einklang mit der Beobachtung, daß die Expression von Verdauungsenzymen im Bereich des FAE reduziert ist, damit Antigene möglichst unverdaut und vollständig zu den Zellen des Immunsystems transportiert werden können (Smith, 1995). So belegt die reduzierte Expression von SI in den Zellen der M-Zell-Kultur, daß die M-Zell-ähnlichen Zellen nicht nur morphologische, sondern darüberhinaus auch funktionelle Charakteristika der Zellen des FAE aufweisen.

6.1.4.2 Untersuchung des Expressionsmusters von Caco-2-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von humanen Lymphozyten

Der Vergleich des Expressionsmuster der Caco-2-Zellen nach Kultivierung in Abwesenheit und in Anwesenheit von humanen Lymphozyten mit Hilfe von DNA-Micro-Arrays zeigte, daß etwa 68 Gene deutlich unterschiedlich reguliert werden (C. Cichon, persönliche Mitteilung). Eines dieser Gene, das in den M-Zell-ähnlichen Zellen deutlich höher exprimiert wird als in den differenzierten Enterozyten, ist das für Galektin-9 kodierende Gen. In einer Immunfluoreszenz-Analyse mit einem polyklonalen Serum gegen Galektin-9 konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Galektine, die zur Proteinfamilie der Lektine gezählt werden, und ihre Liganden scheinen eine wichtige Rolle in einer Reihe biologischer Prozesse zu spielen. Dazu zählen Zelladhäsion, Zellproliferation, Chemoattraktion aber auch allergische Entzündungsreaktionen sowie Infektionen (Paroutaud *et al.*, 1987; Oda *et al.*, 1991; Barondes *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; John *et al.*, 2002). Aufgrund der erhöhten Expression von Galektin-9 in den M-Zell-ähnlichen Zellen kann man spekulieren, daß dieses Protein möglicherweise bei der Entwicklung von M-Zellen von Bedeutung ist. Um dies abschließend zu bestätigen, müßte mit Hilfe von Immunfluoreszenzen von Gewebeschnitten untersucht werden, ob die Expression von Galektin-9 auch im Bereich des FAE oder in M-Zellen erhöht ist.

6.1.4.3 Transport von Partikeln durch M-Zell-ähnliche Zellen

Die Zellen des M-Zell-Modells können im Gegensatz zu den differenzierten Caco-2-Zellen 200 nm große Latexpartikel transportieren. Somit weisen diese M-Zell-ähnlichen Zellen ein weiteres Charakteristikum von M-Zellen auf. Bei Verwendung von 20 nm großen Partikeln war dagegen aufgrund der kleinen Partikelgröße ein unspezifischer Transport zu beobachten.

Die Konstruktion des Co-Kultur-Modells erlaubt es nicht, auszuwerten, wieviele Partikel von den M-Zell-ähnlichen Zellen auf ihrer apikalen Oberfläche aufgenommen, durch die Zellen transportiert und auf der basolateralen wieder abgegeben werden. Im Confokalen Laserscanning Mikroskop konnten Partikel im Zellmonolayer detektiert werden, die von den M-Zell-ähnlichen Zellen aufgenommen wurden. Teilweise befinden sich diese Partikel auch im Bereich der Zell-Zell-Kontakte, so daß nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, daß einige Partikel zwischen den Zellen durchwandern. Dagegen spricht allerdings, daß elektronenmikroskopische Aufnahmen und die Anfärbung der an den „tight junction“ beteiligten Proteine ZO-1 und Occludin die Integrität des Zellmonolayers nicht in Frage stellen.

6.1.4.4 Infektionen der M-Zell-ähnlichen Zellen mit enteropathogenen Bakterien

Einige pathogene Mikroorganismen nutzen die Eigenschaften von M-Zellen als Eintrittspforte in tiefer gelegene Gewebe des Organismus (Siebers & Finlay, 1996; Jepson & Clark, 1998). So bindet *Y. enterocolitica in vivo* spezifisch an M-Zellen und dringt über diese Zellen in die Submukosa ein. Differenzierte Epithelzellen können dagegen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht von *Y. enterocolitica* infiziert werden (Schulte *et al.*, 2000). Die Beobachtung, daß *Y. enterocolitica* an die Zellen dieses Co-Kultur-Modells adhärieren und in diese Zellen eindringen kann, dagegen die differenzierten Caco-2-Zellen der Kontrollfilter nicht infiziert, unterstützt die bisherigen Ergebnisse, die darauf hindeuten, daß tatsächlich die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen induziert werden konnte.

Daß es sich bei den induzierten Zellen um M-Zell-ähnliche Zellen und nicht um undifferenzierte Epithelzellen handelt, die ebenfalls (noch) keinen Mikrovillisaum ausbilden und daher für eine bakterielle Infektion besser zugänglich sind, wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die Yersinien keine zytotoxische Wirkung auf diese Zellen haben. So wurde bei Infektionen von undifferenzierten HeLa-Zellen eine zytotoxische Wirkung von *Yersinia* beschrieben, die auf der Translokation der toxischen Yops in das Zytosol beruht (Rosqvist *et al.*, 1990; 1991; Iriarte & Cornelis, 1998). Bei einer Infektion von M-Zell-ähnlichen Zellen trat ein solcher Effekt dagegen nicht auf (Schulte *et al.*, 2000). Aus diesen Ergebnissen läßt sich spekulativ ableiten, daß der putative Wirtszellrezeptor, der mit dem Typ III-Sekretionssystem von *Y. enterocolitica* interagiert und die Translokation von Yops in das Zytosol fördert, auf der Oberfläche von M-Zellen nicht exprimiert wird (Schulte *et al.*, 2000).

Aus der Tatsache, daß M-Zellen auch inerte Partikel aus Latex aufnehmen können, läßt sich schließen, daß eine spezifische Bindung der Partikel an die Oberfläche der Zellen nicht notwendig zu sein scheint, um den Transport zu initiieren (Owen *et al.*, 1977; Neutra *et al.*, 1987). Andererseits gibt es Hinweise darauf, daß bestimmte Oberflächenstrukturen von Partikeln oder auch Bakterien den Transzytoseprozeß begünstigen (Gebert *et al.*, 1996; Jepson & Clark, 1998). Aus diesem Grund haben einige Mikroorganismen spezielle Liganden entwickelt, die ihnen die Bindung an M-Zellen und damit auch die Translokation durch diese Zellen erleichtern. So konnte gezeigt werden, daß *Y. enterocolitica* mit seinem Oberflächenprotein Invasin spezifisch an $\beta 1$ Integrine an der apikalen Oberfläche von M-Zellen bindet (Isberg *et al.*, 1987; Leong *et al.*, 1990, Young *et al.*, 1992).

In einem weiteren Ansatz wurde die M-Zell-Kultur mit dem EPEC-Stamm E2348/69 infiziert. Es konnte gezeigt werden, daß dieser EPEC-Stamm bevorzugt an M-Zell-ähnliche Zellen adhärert, und es im Verlauf der Infektion zur Ausbildung charakteristischer A/E-Läsionen unterhalb der in Mikrokolonien adhärierenden Bakterien und zur Bildung von „Pedestals“ kommt. Eine Aufnahme der EPEC, wie sie bei den Yersinien beobachtet werden konnte, findet nicht statt. Der Mikrovillisaum der differenzierten Epithelzellen scheint dagegen die Adhärenz und damit die Infektion der Bakterien zu erschweren, verhindert sie aber nicht. Auch auf den differenzierten Caco-2-Zellen kommt es zur Infektion, die durch die Bildung von A/E-Läsionen sowie von „Pedestals“ deutlich wird. Diese Ergebnisse werden von den Beobachtungen unterstützt, die in Infektionsversuchen mit dem *E. coli*-Stamm RDEC-1, der in Kaninchen spezifisch an M-Zellen adhärert und eine A/E-Diarrhö auslöst, gemacht wurden. Die RDEC-1-Bakterien adhären *in vivo* bevorzugt und bereits 12 h nach der Inokulation an M-Zellen, während die Adhärenz an absorptive Epithelzellen erst drei Tage nach einer Inokulation der Bakterien erfolgt (Inman & Cantey, 1983; Inman & Cantey, 1984; von Moll & Cantey, 1997). Die Infektion der M-Zellen sowie mit entsprechender Verzögerung auch die Infektion der Enterozyten mit den RDEC-1 induziert die für eine EPEC-Infektion charakteristischen A/E-Läsionen (Inman & Cantey, 1983; Knutton *et al.*, 1987), zu einer Aufnahme der Bakterien durch die M-Zellen kommt es nicht.

Infektionen der M-Zell-ähnlichen Zellen mit den DA-EPEC-Stämmen O181 und 3431 bestätigten die Ergebnisse der Infektionsversuche des M-Zell-Modells mit dem EPEC-Stamm E2348/69. Auch die DA-EPEC-Stämme adhären vorrangig an M-Zell-ähnlichen Zellen, induzieren aber im Vergleich zum EPEC-Stamm E2348/69 nur selten A/E-Läsionen.

Differenzierte Caco-2-Zellen können sie dagegen nur vereinzelt infizieren, wie auch schon von S. Laarmann gezeigt werden konnte (1999).

Die beschriebenen EPEC und DA-EPEC-Stämme infizieren bevorzugt M-Zellen und haben darüberhinaus eine Strategie entwickelt, die ihre Aufnahme und damit die Induktion einer Immunantwort verhindert. So konnte gezeigt werden, daß diese Bakterien durch die Inhibierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) die Polymerisierung von F-Aktin in den Wirtszellen und damit ihre Aufnahme verhindern können (Celli *et al.*, 2001; Celli & Finlay, 2002).

In einem weiteren Infektionsexperiment wurde die Interaktion des probiotischen *E. coli*-Stammes Nissle 1917 mit den M-Zell-ähnlichen Zellen untersucht. Diese Interaktionen sind von Interesse, da *E. coli* Nissle 1917 zum einen einen positiven Einfluß auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen hat und zum anderen Verwendung als Vakzinierungsstamm finden soll. Es stellte sich heraus, daß *E. coli* Nissle 1917 nicht an differenzierte Epithelzellen anheftet und auch nur ganz vereinzelt an die Zellen der Co-Kultur adhärirt. Diese Befunde werden durch Untersuchungen der Interaktion mit T84-Zellen unterstützt (T. Hermann, 2002). Auch eine Aufnahme der Bakterien wurde nur äußerst selten beobachtet, so daß in diesem Experiment keine weiteren Erkenntnisse über die Interaktion von *E. coli* Nissle 1917 mit Epithelzellen und im speziellen mit M-Zellen gewonnen werden konnten. Es ist zu vermuten, daß sich *E. coli* Nissle 1917 *in vivo* anders verhält als *in vitro* im M-Zell-Modell. So können diese Bakterien ihren positiven Effekt bei entzündlichen Darmerkrankungen *in vivo* möglicherweise bereits ausüben, wenn sie sich nur im Mukus befinden anstatt direkt an die Epithelzellen zu adhärieren. Denkbar wäre beispielsweise, daß die Sekretion von löslichen Faktoren der *E. coli* Nissle 1917 erst im gastrointestinalen Milieu induziert wird.

6.1.5 Entscheidende Faktoren für die Entstehung von M-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen durch die Co-Kultivierung von differenzierten Epithelzellen mit Lymphozyten *in vitro* induziert werden. Dieses Resultat bestätigt, daß Lymphozyten eine entscheidende Funktion bei der Entstehung von M-Zellen und FAE spielen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit zur Induktion von M-Zellen nicht auf Lymphozyten aus dem Bereich der Peyer'schen Plaques beschränkt ist, sondern, daß auch Lymphozyten aus dem peripheren Blut und/oder von ihnen sezernierte Faktoren diesen Differenzierungsprozeß auslösen können.

Welche Faktoren genau für die Induktion verantwortlich sind, ist noch ungeklärt. Es konnte jedoch demonstriert werden, daß es bei der Kultivierung von Caco-2-Zellen und Lymphozyten in einem Filtersystem mit 0,4 µm großen Poren, in denen die Lymphozyten nicht in den epithelialen Monolayer einwandern können, auch nicht zur Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen kommt. Zum gleichen Ergebnis führte die „reverse“ Co-Kultivierung, bei der Epithelzellen und Lymphozyten durch einen Filter getrennt kultiviert werden. Daraus läßt sich ableiten, daß der direkte Kontakt von Epithelzellen und Lymphozyten entscheidend für die Induktion von M-Zellen ist. Lösliche Faktoren, die von den Lymphozyten sezerniert werden, scheinen alleine nicht ausreichend zu sein, um die Bildung von M-Zellen auszulösen. Da aber auf der anderen Seite auch Epithelzellen von den morphologischen Veränderungen betroffen sind, die nicht in direktem Kontakt zu den in den Monolayer eingewanderten Lymphozyten stehen, ist zu vermuten, daß zusätzlich auch lösliche Faktoren eine Rolle bei der Induktion von M-Zell-ähnlichen Zellen spielen. So ist möglicherweise die Konzentration an sezernierten Zytokinen nur zu gering, um eine kontaktunabhängige Induktion von M-Zellen auszulösen.

Obwohl die zugrundeliegenden molekularen und biochemischen Prozesse noch nicht aufgeklärt sind, scheinen vor allem B-Lymphozyten und in geringerem Maße T-Lymphozyten eine Rolle bei der Induktion von M-Zellen zu spielen (Kerneis *et al.*, 1997; Savidge & Smith, 1995). So konnte auch bei der durch Pneumokokken induzierten Bildung von M-Zellen eine massive Passage von Lymphozyten, bei denen es sich hauptsächlich um B-Zellen handelt, in das FAE beobachtet werden (Regoli *et al.*, 1994; Borghesi *et al.* 1996; Meynell *et al.*, 1999). Die entscheidende Rolle von B-Zellen wird auch durch die Resultate von Gullberg *et al.* (2000), die die Bildung von M-Zellen durch Co-Kultivierung mit Raji-Zellen, einer B-Lymphozyten-Zelllinie, induzieren konnten, bestätigt. Da in diesem M-Zell-Modell kein Kontakt zwischen den Epithelzellen und den Lymphozyten zustandekommt, postulieren Gullberg *et al.* (2000), daß ausschließlich von den B-Zellen sezernierte Faktoren die Bildung von M-Zellen auslösen. Dieses Ergebnis steht somit in klarem Kontrast zu der aufgrund der vorliegenden Ergebnisse formulierten Kontaktabhängigkeit der M-Zell-Induktion. Eine der Erklärungsmöglichkeiten wäre, daß die Konzentration an B-Lymphozyten in der für die Induktion von M-Zellen verwendeten humanen Lymphozyten-Suspension mit einem Anteil von etwa 40 % zu gering war und daher zu wenig Zytokine sezerniert wurden, um eine Induktion zu ermöglichen. Für eine kontaktabhängige Induktion war die B-Lymphozyten-Konzentration dagegen ausreichend. Dies könnte zukünftig durch Etablierung der Co-Kultur

sowie der „reversen“ Co-Kultur unter Verwendung reiner B-Zell- bzw. T-Zell-Suspension überprüft werden.

Welche sezernierten Faktoren die beschriebenen Prozesse vermitteln, konnte bislang noch nicht aufgedeckt werden und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Bildung von M-Zellen aus differenzierten Epithelzellen durch die Co-Kultivierung mit Lymphozyten induziert werden kann. Dieses Ergebnis bestätigt die Theorie über den Ursprung von M-Zellen, die besagt, daß M-Zellen eine phänotypische Adaptation des FAE darstellen und spontan durch den Kontakt mit Zellen des Immunsystems gebildet werden können (Kerneis *et al.*, 1997; Gullberg *et al.*, 2000). Weiter gestützt wurde diese Theorie durch die Beobachtung, daß die Zahl von M-Zellen im FAE der Peyer'schen Plaques zunimmt, wenn Mäuse aus einer keimfreien Umgebung in einen normalen Tierstall umgesetzt werden. Einen analogen Effekt kann man beobachten, wenn man Mäuse mit attenuierten Salmonellen füttert (Smith *et al.*, 1987). Auch die *in vivo*-Infektion von Peyer'schen Plaques des Kaninchens mit *Streptococcus pneumoniae* R36a, einem Gram-positiven Bakterium, das normalerweise nicht im Darm vorkommt, erhöht die Zahl der M-Zellen im FAE bereits eine Stunde nach Zugabe der Bakterien deutlich (Borghesi *et al.*, 1999). Dieser Zeitraum ist deutlich zu kurz, als daß eine Bildung der M-Zellen in der Peripherie der Peyer'schen Plaques durch die Migration neuer M-Zellen aus den Krypten in Frage käme (Smith *et al.*, 1980), und deutet daher eher auf eine spontane Entwicklung neuer M-Zellen hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen dagegen eine zweite Theorie, nach der M-Zellen eine eigene Zelllinie im FAE darstellen und ausschließlich aus bestimmten Stammzellen in den Krypten der Peyer'schen Plaques entstehen, sich aber nicht spontan im Bereich des Domes der Peyer'schen Plaques bilden können (Gebert *et al.*, 1996).

Fasst man diese Beobachtungen zusammen, so ist über den Ursprung von M-Zellen folgende Hypothese denkbar: Einige M-Zellen werden bereits durch induktive Faktoren des MALT, die auf die Stammzellen der Krypten der Peyer'schen Plaques oder auf die aus den Krypten auswandernden Enterozyten wirken, gebildet. Diese Zellen stellen die „Grundausstattung“ an M-Zellen dar, während bei Bedarf, also beispielsweise bei einer Infektion, Enterozyten zu weiteren M-Zellen umgewandelt werden können. Vermutlich ist die Bildung von M-Zellen dabei auf erst teilweise aber noch nicht vollständig differenzierte Epithelzellen beschränkt. Dies läßt sich daraus ableiten, daß sich in der Peripherie der Peyer'schen Plaques sowohl noch nicht-vollständig differenzierte Epithelzellen sowie M-Zellen befinden, während an der

Spitze der Peyer'schen Plaques nur differenzierte, aber keine M-Zellen auftreten (Gebert *et al.*, 1996; Neutra *et al.*, 1996).

6.1.6 Ausblick M-Zell-Modell

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Co-Kultivierung differenzierter, humaner Epithelzellen mit humanen Blutlymphozyten die Bildung von M-Zell-ähnlichen Zellen *in vitro* induziert und somit ein Zell-Kultur-Modell für M-Zellen entwickelt werden. Die induzierten Zellen ähneln in ihrer Morphologie M-Zellen und weisen darüberhinaus typische Eigenschaften dieser spezialisierten Epithelzellen auf.

Ein möglicher Marker für humane M-Zellen könnte das im Rahmen der DNA-Micro-Array-Analysen gefundene Galektin-9 sein. Ob Galektin-9 auch *in vivo* spezifisch stärker in M-Zellen exprimiert wird als in normalen Enterozyten, müßte durch Gewebefärbungen von humanen Peyer'schen Plaques abschließend geklärt werden. Die erhöhte Expression von Galektin-9 wirft darüberhinaus die Frage auf, welche Rolle dieses Lektin in Bezug auf die Entstehung oder die Funktionsweise von M-Zellen spielt.

Interessant wäre darüberhinaus zu untersuchen, ob eine Infektion des M-Zell-Modells mit Bakterien die Zahl der M-Zellen vergrößert. Dafür müßte aber zunächst ein Marker für humane M-Zellen identifiziert werden, der eine quantitative Bestimmung der Zellen erlaubt.

Zusätzlich sollte auch die Analyse der Mikro-Array-Daten weitere Erkenntnisse über spezifische Charakteristika von M-Zellen, wie z.B. über spezifische Oberflächenmarker, über die Transportprozesse in M-Zellen und über ihre Entstehung geben. Das M-Zell-Modell erwies sich auch als geeignet, um die Interaktion von *Y. enterocolitica* sowie von enteropathogenen *E. coli*-Stämmen mit M-Zellen zu untersuchen und kann daher auch in Zukunft für Infektionsexperimente Verwendung finden. Da auch Prionen speziell über M-Zellen in den Organismus eindringen, wäre ein weiterer interessanter Ansatz, die Interaktion von rekombinantem Prionproteinen unter Verwendung des M-Zell-Modells zu untersuchen.

Die durch den Einsatz dieses M-Zell-Modells erhaltenen Informationen könnten schließlich entscheidend zur Entwicklung neuer mukosaler Vakzine sowie zur Diagnose und Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen beitragen.

6.2 Sequenz- und Funktionsanalyse des „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) der DA-EPEC-Stämme 3431 und DA-EPEC-Stamm O181

Eine Reihe von epidemiologischen Studien zeigt seit einigen Jahren die Assoziation von atypischen EPEC-Stämmen mit dem Auftreten von Durchfallerkrankungen. Diese Bakterienstämme zeichnen sich durch den Besitz des „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) als Virulenzfaktor aus, einer Pathogenitätsinsel, die zum ersten Mal im EPEC-Stamm E2348/69 beschrieben wurde und inzwischen auch in anderen A/E-Läsionen hervorrufenden *Enterobacteriaceae* gefunden wurde (s. Abb. 2.7) (McDaniel *et al.*, 1995; Sonnenberg, *et al.*, 1997). Im Vergleich zu den klassischen EPEC besitzen die atypischen EPEC kein EAF-Plasmid und daher auch keine „bundle-forming Pili“ (BFP). Um weitere Erkenntnisse über die Pathogenese der zu den atypischen EPEC zählenden DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der LEE dieser Stämme kloniert und sequenziert sowie einer ersten Sequenz- und Funktionsanalyse unterzogen.

6.2.1 Sequenzvergleich des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 mit dem LEE des EPEC-Prototyp-Stammes E2348/69

Die genetische Variabilität von Prokaryoten ist das Resultat gelegentlich auftretender Punktmutationen, eines hohen Grades an Rekombination sowie des Transfers von genetischem Material zwischen verschiedenen bakteriellen Spezies oder sogar Gattungen. Vor allem der letzte Prozeß, der auch als horizontaler Gentransfer bezeichnet wird, repräsentiert einen entscheidenden Schritt in der Evolution von Bakterien und führt zu drastischen Veränderungen in der Zusammensetzung mikrobieller Genome in einer relativ kurzen Zeitspanne. Deshalb spricht man auch von einer „Evolution in Quantensprüngen“ (Ochmann *et al.*, 2000; Hacker & Carniel, 2001).

Auch der LEE, der in mehreren A/E-induzierenden *Enterobacteriaceae* identifiziert werden konnte (Sonnenberg *et al.*, 1997), weist die typischen Charakteristika einer Pathogenitätsinsel auf. Dazu zählt unter anderem ein im Vergleich zum bakteriellen Chromosom veränderter GC-Gehalt. So demonstrierte auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse, daß der GC-Gehalt des LEE der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 mit 38,3 bzw. 39,5 % deutlich unter dem des *E. coli*-Genoms von 50,8 % liegt. Ähnliche GC-Werte um etwa 39 % wurden auch für andere bisher beschriebene LEE-Pathogenitätsinseln wie des EPEC-Prototyp-Stammes E2348 (38,4 %), des EHEC-Stammes EDL 933 (39,6 %),

des kaninchenpathogenen RDEC-1-Stammes (41,3 %) sowie von *C. rodentium* (38,1 %) ermittelt (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001).

Die Insertion im Bereich eines tRNA-Gens des bakteriellen Chromosoms ist ein weiteres typisches Merkmal von Pathogenitätsinseln. Für den LEE sind bislang drei unterschiedliche Insertionsorte beschrieben worden: das *selC*-tRNA-Gen, der Bereich des *cadC/pheU*-tRNA-Gens sowie ein dritter, noch nicht näher charakterisierter Insertionsort (Hacker & Kaper, 2000). Im Rahmen der hier durchgeführten Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 wie auch der LEE des EPEC-Stammes E2348/69 und des EHEC-Stammes EDL 933 im *selC*-tRNA-Gen inseriert ist (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998). Auch die flankierenden Bereiche des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 sind identisch. So beginnt das 5'-Ende des LEE im *yicK*-Gen des *E. coli* Genoms. Da am 3'-Ende des LEE keine Homologien zum restlichen Bereich dieses Gens gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, daß das *yicK*-Gen durch die Integration des LEE um etwa 200 bp deletiert ist. So befindet sich 16 bp vom 3'-Ende des LEE entfernt das *selC*-Gen, das im *E.coli* K12-Genom neben dem *yicK*-Gen lokalisiert ist (Blattner *et al.*, 1997).

Der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 ist dagegen in den zweiten bereits bekannten Insertionsort, im Bereich des *cadC/pheU*-tRNA-Gens, in das bakterielle Genom inseriert. Am 5'-Ende ist der LEE in das *yjdK*-Gen des *E. coli* Genoms integriert, das dadurch deletiert ist. Da sich im Anschluß an das 3'-Ende des LEE direkt das *pheU*-Gen gefolgt vom *yjdC*-Gen befindet, scheint ein 10 kb großer Bereich des *E. coli* Genoms, der die Gene *lysU*, *yjdL*, *cadA*, *cadB* und *cadC* umfaßt, zu fehlen.

Neben dem geringeren GC-Gehalt und den charakteristischen Insertionsorten weisen die Sequenzen des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 auch die für Pathogenitätsinseln typischen repetitiven Sequenzen und IS-Elemente auf, die sich oft an den Enden des LEE befinden und den Insertionsort definieren. So konnte am 3'-Übergang des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 ein als IS600 bezeichnetes Insertionselement identifiziert werden. Das gleiche Insertionselement befinden sich auch an der entsprechenden Position im LEE des EPEC-Stammes E2348/69. Am 3'-Übergang des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 in das Chromosom befindet sich ebenfalls eine repetitive Sequenz von etwa 150 bp.

Der Vergleich der Kernregionen des LEE der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 mit dem LEE des EPEC-Prototyp-Stammes E2348/69 zeigte, daß diese Pathogenitätsinseln in Bezug auf ihre Größe und ihren Aufbau stark konserviert sind. So enthält der LEE der drei

Bakterienstämme je 41 Orfs, die in den fünf Operons LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 sowie dem Tir-Intimin-Operon organisiert sind. Die Reihenfolge der Gene auf dem LEE und ihre Orientierung ist identisch.

Der Kernbereich des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 ist mit 35478 bp um 1412 bp größer als der LEE des EPEC-Stammes E2348/69. Dieser Größenunterschied beruht auf der Insertion des 1431 bp langen Tn5-Transposons im *ler*-Gen des LEE des DA-EPEC-Stammes 3431. Der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 ist dagegen mit 34228 bp um 162 bp länger als der LEE des EPEC-Stammes E2348/69 (34066 bp). Diese zusätzliche Basenpaare konnten bislang nicht näher identifiziert werden.

Der Vergleich der Nukleotidsequenzen der LEE der drei Bakterienstämme demonstriert darüberhinaus, daß diese zum Teil sehr hohe Identitäten aufweisen oder sogar zu 100 % identisch sind. So ist der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 etwa zu über 95 % identisch zum LEE des EPEC-Stammes E2348/69. In einigen kodierenden Bereichen, so z.B. in Teilen des Operons LEE2 und LEE3, sind die beiden Sequenzen sogar gleich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die LEE dieser beiden Stämme nah miteinander verwandt sind.

Größere Abweichungen zeigt dagegen der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 im Vergleich zum LEE des EPEC-Stammes E2348/69 auf. Diese beiden LEE sind nur zu etwa 82 % homolog. Auch in diesen beiden Sequenzen gibt es kodierende Bereiche mit einer hohen Übereinstimmung von über 95 %, wie z.B. im Operon LEE3. Andere kodierende Bereiche, wie z.B. die *esp*-Gene, sind dagegen nur zu 75 % homolog. Der LEE der beiden DA-EPEC-Stämme weist eine Übereinstimmung von etwa 80 % auf.

So zeigte der anhand der Sequenzen der Kernregion des LEE aufgestellte phylogenetische Stammbaum, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 näher mit dem des EPEC-Stammes E2348/69 verwandt ist als mit dem LEE des DA-EPEC-Stammes 3431.

Die Proteine des LEE-kodierten Typ III-Sekretions-System

Der Vergleich der auf dem LEE kodierten Proteine zeigte, daß vor allem die Esc- und Sep-Proteine, die am Aufbau des Typ III-Sekretionsapparates beteiligt sind, stark konserviert oder sogar identisch sind. Mit Identitäten zwischen 97,7 und 100 % weisen dabei besonders die Esc- und Sep-Proteine des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 große Ähnlichkeit auf, während die entsprechenden Proteine des DA-EPEC-Stammes 3431 zu den Proteinen der zwei anderen Stämme zu 93,4 und 97,9 % identisch sind. Das hohe Maß an Homologie, daß die Esc- und Sep-Proteine der DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 auch im Vergleich mit den Esc- und Sep-Proteinen des EHEC-Stammes EDL 933, des RDEC-1-

Stammes und von *C. rodentium* aufweisen, reflektiert die Notwendigkeit einer starken Konservierung für den Erhalt der Funktion des Typ III-Sekretionssystems (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001). Darüberhinaus scheint auf die zytoplasmatischen Esc- und Sep-Proteine entweder kein starker evolutionärer Druck ausgeübt zu werden, der eine Veränderung dieser Proteine erfordern würde, oder der evolutionäre Druck ist so groß, daß eine Veränderung ohne den Verlust der Funktion nicht möglich ist.

Die einzige Ausnahme in der Gruppe der am Aufbau des Typ III-Sekretionssystems beteiligten Proteinen bildet SepZ (Elliott *et al.*, 1998). So ist SepZ das einzige Protein, das in den unterschiedlichen A/E-Bakterien eine starke Abweichung in der Aminosäuresequenz zeigt. Im EPEC-Stamm E2348/69 und im DA-EPEC-Stamm O181 ist SepZ zwar mit 96,9 % fast identisch, dagegen ist die Proteinsequenz des SepZ des DA-EPEC-Stammes 3431 zu diesen beiden Stämmen nur zu 59,2 % homolog. Auch das SepZ des EHEC-Stammes EDL933, des RDEC-1-Stammes und von *C. rodentium* besitzt nur eine Homologie von 61, 67 bzw. 69 % zum SepZ des EPEC-Stammes E2348/69 (Elliott *et al.* 1998; Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001). Diese Unterschiede deuten darauf hin, daß SepZ möglicherweise zur Spezifität der Typ III-abhängigen Sekretion in den unterschiedlichen A/E-Bakterienstämmen beiträgt.

Die LEE-kodierten Effektorproteine

Im Gegensatz zu den Proteinen, die am Aufbau des Typ III-Sekretionssystems beteiligt sind, konnten bei den LEE-kodierten Proteinen, die sezerniert werden und/oder direkt mit dem Wirt interagieren, große Variationen beobachtet werden. Veränderungen gerade in diesen Proteinen beruhen möglicherweise darauf, daß diese Proteine durch den Kontakt mit dem Immunsystem des Wirtes unter einem größeren evolutionären Druck stehen. Die Ursache könnte daneben aber auch in der Anpassung an unterschiedliche Virulenzeigenschaften der Bakterienstämme liegen.

So zeigte besonders der Vergleich der Typ III-abhängig sezernierten Proteine EspA, EspB, EspD und EspF („*E. coli* secreted proteins“) deutliche Unterschiede zwischen den drei Bakterienstämmen. Es wird postuliert, daß die Proteine EspA, EspB und EspD eine „molekulare Spritze“ bilden, durch die Effektorproteine aus dem Bakterium in die Wirtszelle injiziert werden können. Während EspA vermutlich am Aufbau eines filamentartigen Translokationskanals zwischen Bakterium und eukaryotischer Zelle beteiligt ist, bilden die translozierten Proteine EspB und EspD eine Translokationspore in der Wirtszellmembran (Knutton *et al.*, 1998; Warawa *et al.*, 1999; Ide *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2001). EspB scheint

darüberhinaus auch als zytosolisches Effektorprotein für die Induktion von Signaltransduktionsprozessen, wie der Tyrosinphosphorylierung von Tir und der Akkumulation von F-Aktin, von Bedeutung zu sein (Foubister *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1999).

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl der EPEC-Stamm E2348/69 als auch der DA-EPEC-Stamm 3431 bei Infektion von Erythrozyten zur Hämolyse der Zellen führt. Im Gegensatz zum EPEC-Stamm E2348/69 ist die Hämolyseaktivität des DA-EPEC-Stammes 3431 jedoch nicht von einem Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle abhängig, sondern Esp-haltiger Überstand ist bereits ausreichend, um diesen Effekt auszulösen (Ide *et al.*, 2001; Warawa *et al.*, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse demonstriert deutliche Abweichungen in der Proteinsequenz von EspB und EspD des EPEC-Stammes E2348/69 und des DA-EPEC-Stammes 3431, die eine Erklärung für die kontaktabhängige bzw. kontaktunabhängige Hämolyse-Aktivität der Bakterien sein könnten. So ist das EspB-Protein des DA-EPEC-Stammes 3431 mit 307 statt 321 Aminosäuren deutlich kürzer als das EspB-Protein des EPEC-Stammes E2348/69 und weist zudem nur eine Homologie von 61,9 % auf. Das EspD des DA-EPEC-Stammes 3431 ist bei gleicher Proteingröße mit dem EspD des EPEC-Stammes E2348/69 zu 75,8 % identisch.

Die Sequenzanalyse des zweiten DA-EPEC-Stammes O181 ergab, daß dieser deutlich größere Identitäten zum EPEC-Stamm E2348/69 aufweist als der DA-EPEC-Stamm 3431. So ist das EspB des DA-EPEC-Stammes O181 identisch mit dem EspB des EPEC-Stammes E2348/69, während die EspD-Proteine dieser beiden Stämmen zu 85,5 % homolog sind. Ob die Unterschiede in den Proteinsequenzen von EspB und EspD einen Einfluß auf die Hämolyseaktivität dieser Stämmen hat, oder ob andere Faktoren dafür verantwortlich sind, ließe sich anhand eines Hämolysetestes mit dem DA-EPEC-Stamm O181 zeigen. Sollten die Proteine eine entscheidende Rolle für die Kontaktabhängigkeit der Hämolyseaktivität der Bakterien spielen, so sollte der DA-EPEC-Stamm O181 aufgrund der im Vergleich zum EPEC-Stamm E2348/69 stark konservierten EspB und EspD-Proteine ebenfalls eine kontaktabhängige Hämolyseaktivität zeigen.

Die Zerstörung der Barrierenfunktion der intestinalen Epithelzellen ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der EPEC-induzierten Diarrhö. Eine besondere Rolle spielt bei diesem Prozess das Typ III-abhängig sezernierte Effektorprotein EspF, das die „tight junctions“ der Enterozyten angreift und so die Integrität des intestinalen Epithels zerstört (McNamara *et al.*, 2001). Der Proteinvergleich demonstrierte auch für EspF einen deutlichen

Unterschied zwischen den Proteinen der drei verglichenen Bakterienstämme. So ist das EspF des DA-EPEC-Stammes 3431 nur zu 75,7 % und zu 73 % homolog zum EspF des EPEC-Stammes E2348/69 bzw. des DA-EPEC-Stammes O181. Auch in Bezug auf dieses Protein zeigt sich erneut, daß zwischen dem DA-EPEC-Stamm O181 und dem EPEC-Stamm E2348/69 in Relation zum DA-EPEC-Stamm 3431 eine größere Homologie besteht. So sind die EspF-Proteine dieser beiden Stämme zu 85,8 % identisch zueinander. Aus den demonstrierten Sequenzunterschieden dieses Effektorproteins ist zu vermuten, daß die Spezifität von EspF möglicherweise, wie bereits auch für die Esp-Proteine postuliert, einen Effekt auf die Pathogenese der EPEC und DA-EPEC hat.

Ein ähnliche Schlußfolgerung läßt sich auch aus dem Vergleich der von *orf19* des LEE kodierten Map-Proteine der drei untersuchten Bakterienstämme ziehen. So ist das Map des DA-EPEC-Stammes 3431 zu 74,9 % bzw. zu 75,4 % homolog zum Map des EPEC-Stammes E2348/69 bzw. DA-EPEC-Stammes O181. Wiederum zeigte sich, daß dieses Protein in den Stämmen O181 und E2348 eine höhere Identität von 88,7 % aufweist. Auch Map wird in die Zielzelle transloziert, wo es an Mitochondrien lokalisiert ist. Es wird angenommen, daß dieses Effektorprotein vermutlich in Prozesse wie die Kontrolle der Apoptose oder den Energiestoffwechsel der Zelle eingreift (Kenny & Jepson, 2000).

Generell läßt sich aus dem Vergleich der LEE-kodierten Virulenzproteine schließen, daß die Divergenz dieser Proteine den größeren evolutionären Druck reflektiert, dem sie durch den direkten Kontakt mit dem Wirt ausgesetzt sind. So selektioniert das Immunsystem des Wirtes verstärkt auf Variationen in den Proteinen, die auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert sind bzw. direkt an Interaktionen mit dem Wirt beteiligt sind.

Auch der Vergleich der LEE-kodierten Proteine Intimin und Tir in den untersuchten A/E-Bakterienstämmen zeigt deutliche Abweichungen in Größe und Homologie. Da beide Proteine als äußeres Membranprotein bzw. dessen in die Wirtszellmembran translozierter Rezeptor in direktem Kontakt mit der Wirtszelle steht, ist ein solcher Unterschied in der Proteinsequenz zu erwarten. So zeigte die Analyse der Intimin-Proteine, daß sich diese Effektorproteine nicht nur in ihrer Größe unterscheiden (s. Tab. 5.3), sondern darüberhinaus auch Identitäten von 83,2 % (DA-EPEC-Stamm O181 zum EPEC-Stamm E2348/69), von 79,4 % (DA-EPEC-Stamm 3431 zum EPEC-Stamm E2348/69) sowie 79,8 % (DA-EPEC-Stamm 3431 zum DA-EPEC-Stamm O181) aufweisen. Besonders auffällig sind die Unterschiede in der Proteinsequenz des Tir. So weisen das Tir-Protein des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 eine Ähnlichkeit von 95,8 % auf, während

sich das Tir-Protein des DA-EPEC-Stammes 3431 mit einer Identität von weniger als 57 % deutlich von den anderen beiden Proteinen unterscheidet.

Die Interaktion von Intimin und Tir vermittelt den engen Kontakt („intimate attachment“) zwischen Bakterium und Wirtszelle, der entscheidend für die Ausbildung des A/E-Phänotyps ist. Da in Infektionsversuchen mit HeLa-Zellen gezeigt werden konnte, daß die DA-EPEC-Stämme 3431 und O181 zwar in großer Zahl an die Wirtszellen adhäreren, aber im Vergleich zum EPEC-Prototyp-Stamm nur vereinzelt die Bildung von A/E-Läsionen induzieren, wäre eine mögliche Folgerung, daß die reduzierte Zahl an A/E-Läsionen im Zusammenhang mit den veränderten Intimin- sowie auch Tir-Proteinen steht. Diese Theorie wird aber von der mit dem LEE des DA-EPEC-Stammes O181 durchgeführte Funktionsanalyse widerlegt (s. Kap. 6.2). So konnte im Rahmen dieser Analyse gezeigt werden, daß der mit dem LEE des DA-EPEC-Stammes O181 transfizierte Laborstamm *E. coli* XL1 blue an die Wirtszellen adhärert und A/E-Läsionen induziert. Diese Resultate belegen, daß die in den Proteinen Intimin und Tir identifizierten Veränderungen keine Auswirkungen auf den A/E-Phänotyp haben. Vielmehr scheinen die Veränderungen in den Proteinen als Folge des evolutionären Druckes entstanden zu sein. Eine genauere Analyse der Proteine kann möglicherweise Aufschluß über die Veränderungen der Proteinstruktur und der daraus resultierenden veränderten funktionellen Domänen geben.

Im Vergleich zu den Effektorproteinen weisen die ebenfalls auf dem LEE-kodierten Chaperone dieser Proteine eine hohe Identität auf. So ist sowohl CesD (das Chaperon für EspD und EspB), Ces F (das Chaperon für EspF) als auch CesT (das Chaperon für Tir) in den beiden DA-EPEC-Stämmen sowie im EPEC-Stamm E2348/69 mit Homologien zwischen 96,7 und 100 % stark konserviert. Auch die Chaperone des EHEC EDL 933, des RDEC-1 und von *C. rodentium* weisen ähnliche hohe Identitäten auf (Perna *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2001). Wie bereits für die Esc- und Sep-Proteine beschrieben, zeigen auch diese Ergebnisse, daß die starke Konservierung der Chaperone für den Erhalt der Funktion dieser für die Stabilisierung und Sezernierung von Effektorproteinen essentiellen Proteine notwendig ist. Dagegen treten deutliche Variationen in den Proteinen auf, die durch das stark konservierte Typ III-Sekretionssystem mit Hilfe der ebenfalls stark konservierten Chaperone transportiert werden. Die beim Vergleich des CesF-Proteins des DA-EPEC-Stammes 3431 mit dem des EPEC-Stammes E2348/69 beobachteten Unterschiede betreffen möglicherweise die Interaktion des Chaperons mit dem ebenfalls unterschiedlichen Effektorproteinen. Dies müßte in einer detaillierteren Untersuchung der Proteine und ihrer Struktur geklärt werden.

Phylogenetische Einordnung der LEE der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431

Da das Adhäsin Intimin in einer großen Anzahl genetisch und serologisch unterschiedlicher Typen vorkommt, eignet es sich für die Klassifizierung und phylogenetische Einordnung von A/E-Bakterien sowie von klinischen Isolaten (Adu-Bobie *et al.*, 1998; Agin *et al.*, 1997; Pelayo *et al.*, 1999). Eine Klassifizierung der Bakterien, die einen LEE besitzen, kann so möglicherweise Aufschluß darüber geben, von welchem Bakterium der LEE ursprünglich akquiriert wurde. Der weiterführende Vergleich der Intimine der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 mit Sequenzen bereits bekannter Intimine ermöglichte die Identifizierung der Intimintypen der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431. So entspricht das Intimin des DA-EPEC-Stammes O181 zu 100 % dem Intimin-Typ epsilon-2, während der DA-EPEC-Stamm 3431 ein Intimin exprimiert, das zu 99,8 % homolog zum Intimintyp jota-2 ist. Der EPEC-Stamm E2348/69 kann dagegen aufgrund einer Homologie von 94,4 % dem Intimintyp alpha-2 zugeordnet werden.

Auf der Basis der Intimintypen der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431, des EPEC-Stammes E2348/69 sowie der bereits für die Sequenzanalyse als Vergleich herangezogenen Stämme EHEC-EDL 933 und RDEC-1 wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Dieser phylogenetische Stammbaum zeigt, daß sich der LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 schon früh von den LEE der anderen Stämmen und insbesondere des EPEC-Stammes E2348/69 und O181 abgetrennt hat. Der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 ist nach dieser Einteilung phylogenetisch am nächsten mit dem des EHEC-Stammes EDL 933 verwandt. Die LEE dieser beiden Stämme besitzen aber mit dem LEE des EPEC-Stammes E2348/69 einen gemeinsamen Vorfahren.

So bestätigt dieser auf der Basis der Intimintypen aufgestellte phylogenetische Stammbaum die im Rahmen der Sequenzanalyse aufgestellte Schlußfolgerung, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69 aufgrund des identischen Insertionsortes sowie einer Reihe identischer Proteine, zu denen auch einige sonst sehr variable Effektorproteine zählen, nah miteinander verwandt sind. Der DA-EPEC-Stamm 3431 weist dagegen größere Abweichungen, z.B. in Bezug auf den Insertionsort und den Intimintyp, zu diesen beiden Stämmen auf.

6.2.2 Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC-Stammes O181

Im Anschluß an die Sequenzanalyse wurde mit dem klonierten LEE des DA-EPEC-Stammes O181 eine Funktionsanalyse durchgeführt, die klären sollte, ob der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 alle notwendigen Informationen enthält, um den A/E-Phänotyp in Wirtszellen zu induzieren. Während durch den Transfer des LEE des EPEC-Stammes E2348/69 auf einen *E. coli* K12-Stamm gezeigt werden konnte, daß der LEE für den A/E-Phänotyp verantwortlich ist, ist der LEE des EHEC-Stammes EDL 933 erstaunlicherweise nicht in der Lage, die Bildung von A/E-Läsionen in Wirtszellen zu induzieren (McDaniel & Kaper, 1997; Elliott *et al.*, 1999).

Für den EPEC-Stamm E2348/69 wurde gezeigt, daß die Sekretion von EspA, EspB und EspD für die Induktion der Signaltransduktion, für die Umlagerung von Elementen des Zytoskeletts sowie die damit einhergehenden morphologischen Veränderungen der Wirtszelle notwendig sind (Donnenberg *et al.*, 1993; Foubister *et al.*, 1994; Kenny *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997). So führt die durch EPEC-Bakterien induzierte Signaltransduktion zu einer Tyrosin-spezifischen Phosphorylierung von Proteinen, die mit akkumulierten Zytoskelettelementen, wie beispielsweise F-Aktin, unterhalb adhärierender Bakterien in der Wirtszelle kolokalisiert sind. Die mit dem klonierten LEE des DA-EPEC-Stammes O181 durchgeführte Funktionsanalyse demonstrierte, daß die Übertragung des LEE auf *E. coli* XL1 blue MR diesen Laborstamm in die Lage versetzt, an HeLa-Zellen zu adhären und A/E-Läsionen zu induzieren. So konnten unterhalb der adhärenen Bakterien akkumuliertes F-Aktin sowie spezifisch Tyrosin-phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden. Auch konnte gezeigt werden, daß es zur Sekretion von Tir und Translokation dieses Rezeptormoleküls in die Zellmembran der Wirtszelle kommt. Darüberhinaus sezernieren die Bakterien das Effektorprotein EspB in den Überstand.

Interessanterweise bilden die mit dem LEE des DA-EPEC-Stammes O181 transfizierten *E. coli* XL1 blue MR einen stärkeren Phänotyp aus als der Wildtypstamm DA-EPEC O181. So adhären zwar relativ zum Wildtypstamm, der ein zusätzliches Adhäsins aus der Familie der Dr-Familie aufweist, weniger Bakterien an die Wirtszellen, dafür induzieren aber nahezu alle adhärenen Bakterien A/E-Läsionen, während diese beim Wildtypstamm nur vereinzelt und meist unter Gruppen adhärenen Bakterien zu beobachten sind. Außerdem konnte festgestellt werden, daß der DA-EPEC-Wildtypstamm O181 im Vergleich zum klonierten LEE kaum EspB in den Überstand sezerniert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, daß eine ausreichend hohe Konzentration an sezerniertem EspB aber auch EspA und EspD notwendig ist, um die Signaltransduktionswege in der Zelle zu induzieren. Diese Theorie wird

auch dadurch bestätigt, daß der in fast allen Fällen A/E-Läsionen auslösende EPEC-Prototypstamm E2348/69 ebenfalls deutliche Mengen an EspB in den Überstand sezerniert. Da der mit dem klonierten LEE transfizierte *E. coli*-Laborstamm EspB sezerniert und darüberhinaus auch in der Sequenzanalyse gezeigt werden konnte, daß das EspB des DA-EPEC-Stammes O181 zu 100 % homolog zum EspB des EPEC-Stammes E2348/69 ist, ist zu vermuten, daß im DA-EPEC-Wildtypstamm O181 eine negative Kontrolle der Sekretion oder sogar Expression von EspB vorliegt.

Im Zusammenhang mit der Induktion des A/E-Phänotyps spielt aber auch der Adhärenzphänotyp der Bakterien eine entscheidende Rolle. So ist zu vermuten, daß der lokale Adhärenzphänotyp des EPEC-Stammes E2348/69 im Vergleich zur diffusen Adhärenz des DA-EPEC-Stammes O181 eine bessere Voraussetzung für die Induktion von Signaltransduktionswegen in der Zielzelle darstellt. Dies wird zudem durch die Beobachtung unterstützt, daß bei Infektionen mit dem DA-EPEC-Stamm O181 A/E-Läsionen oftmals unterhalb kleiner Gruppen von Bakterien zu beobachten sind.

Der lokale Adhärenzphänotyp des EPEC-Stammes E2348/69 wird durch die „bundle forming pili“ (BFP) vermittelt. Diese Typ IV-Fimbrien werden auf dem EAF-Plasmid („EPEC adherence factor“) kodiert, das in den DA-EPEC-Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte (Girón *et al.*, 1991; Beinke, Dissertation, 1999). Dagegen weist das Auftreten des mit der Synthese der Adhäsine der Dr-Familie assoziierten *daaC*-Gens im DA-EPEC-Stamm O181 auf die mögliche Expression von F1845 Fimbrien hin, die für die diffuse Adhärenz dieser Bakterien verantwortlich sein könnten (C. Beinke, 1999). Somit wäre ein interessanter Ansatz, um die Rolle des Adhärenzphänotyps auf die Induktion des A/E-Phänotyps zu untersuchen, das EAF-Plasmid auf die DA-EPEC zu übertragen.

Im Rahmen dieser ersten Funktionsanalyse konnte gezeigt werden, daß der LEE des DA-EPEC-Stammes O181 alle pathogen-spezifischen Gene enthält, die für die Induktion des A/E-Phänotyps in Wirtszellen erforderlich sind. Dies bestätigt die in Infektionsversuchen mit dem klonierten LEE des EPEC-Stamm E2348/69 erhaltenen Ergebnisse von McDaniel & Kaper (1997), steht aber im Gegensatz zu den Daten von Elliott *et al.* (1999), die zeigen konnten, daß der LEE des EHEC-Stammes EDL 933 nicht ausreichend ist, um A/E-Läsionen zu induzieren. Obwohl die drei für diese Funktionsanalysen verwendeten LEE in Bezug auf ihren Aufbau und die enthaltenen Informationen sehr homolog zu sein scheinen, deutet dieses Resultat daraufhin, daß auf dem LEE des EHEC-Stammes für die Induktion des A/E-

Phänotypes entscheidende Faktoren fehlen, die im Gegensatz dazu auf dem LEE des EPEC-Stammes E2348/69 und des DA-EPEC-Stammes O181 enthalten sind.

Durch die Funktionsanalyse des LEE des DA-EPEC-Stammes O181 konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß der gesamte LEE für die Auslösung der A/E-Läsionen in Wirtszellen notwendig ist: So waren Bakterien des Stammes *E. coli* XL1 blue, die mit Teilen des LEE transfiziert wurden, nicht in der Lage, an die Epithelzellen zu adhären. Dies ist dadurch zu erklären, daß die Komponenten des Typ III-Sekretionssystems über den LEE verteilt sind und so ein funktionsfähiges System nur gebildet werden kann, wenn alle Elemente vorhanden sind. Der 5'-Bereich des LEE kodiert zudem für den Regulator Ler, der eine essentielle Bedeutung für die Ausbildung des A/E-Phänotyps hat. So werden alle Gene, die für die Ausbildung dieses Phänotyps wichtig sind, von *ler* reguliert oder (im Fall des LEE1-Operon) co-reguliert (Elliott *et al.*, 2000).

Die Regulation der LEE-kodierten Proteine

Wie bereits beschrieben besitzen die DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 kein EAF-Plasmid. Dieses Virulenzplasmid ist für die Pathogenese des EPEC-Stammes E2348/69 von entscheidender Bedeutung, da es neben den BFP auch für den Regulator Per kodiert (Girón *et al.*, 1991; Gómez-Duarte & Kaper, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß Per für die maximale Expression der auf dem LEE kodierten Proteine notwendig ist, und daß Ler, der „LEE encoded regulator“, ein wichtiges Element in der von Per regulierten Signalkaskade ist (Elliott *et al.*, 2000). Ler hat eine essentielle Bedeutung für die Ausbildung des A/E-Phänotyps, da alle Gene, die dafür wichtig sind, von Ler reguliert oder (im Fall des LEE1-Operon) co-reguliert werden (Elliott *et al.*, 2000). So konnte gezeigt werden, daß *ler*-Mutanten des EPEC-Stammes E2348/69 sowie des EHEC-Stammes O157:H7 keine A/E-Läsionen induzieren können. Darüberhinaus können diese Mutanten keine Typ III-abhängig sezernierten Proteine exprimieren, während Mutationen in Genen wie z.B. *escN*, die an der Typ III-Sekretion beteiligt sind, die Sekretion, nicht aber die Expression dieser Proteine verhindern (Jarvis *et al.*, 1995; Jarvis & Kaper, 1996; Elliott *et al.*, 2000).

Da die DA-EPEC-Stämme kein EAF-Plasmid und damit auch kein Per besitzen, ist zu vermuten, daß die Regulation des Ler und damit der Expression der LEE-kodierten Proteine über einen anderen, bislang aber noch nicht identifizierten Regulator vermittelt wird. Dieser könnte auf einem der Plasmide der DA-EPEC oder aber auch im Chromosom der Bakterien integriert sein.

Wie die Sequenzanalyse zeigte, ist im DA-EPEC-Stamm 3431 im Bereich des *ler*-Gens ein Transposon inseriert, was auf eine Funktionsunfähigkeit des Ler in diesem Stamm hindeuten könnte. Da aber demonstriert werden konnte, daß der DA-EPEC-Stamm 3431 in Infektionsexperimenten mit HeLa-Zellen die Bildung von A/E-Läsionen induziert, scheint die Insertion des Transposons in das *ler*-Gen nicht zu einer vollständigen Funktionsunfähigkeit des Gens geführt zu haben. Eine andere spekulative Erklärung ist, daß Ler im Gegensatz zum EPEC-Stamm E2348/69 in den DA-EPEC keine regulatorischen Funktionen besitzt, da der Ler regulierende Faktor Per fehlt. Somit wäre denkbar, daß die Expression der auf dem LEE der DA-EPEC kodierten Proteine über einen anderen Mechanismus abläuft als im EPEC-Stamm E2348/69. Eine detaillierte Analyse des vermutlich verkürzten Ler des DA-EPEC-Stammes 3431 könnte möglicherweise Aufschluß über die Notwendigkeit von Ler für die Regulation des LEE geben.

6.3 Ausblick der Sequenz- und Funktionsanalyse des LEE der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte erste Sequenzanalyse zeigt, daß der LEE der DA-EPEC-Stämme O181 und 3431 sowie des EPEC-Prototyp-Stammes E2348 in Bezug auf ihre Größe, den Aufbau, die kodierten Gene sowie deren Reihenfolge und Orientierung auf dem LEE stark konserviert ist. Auch die Esc- und Sep-Proteine, die am Aufbau des Typ III-Sekretionsapparates beteiligt sind, wiesen ein hohes Maß an Identität auf. Deutliche Unterschiede, vor allem zwischen dem LEE des DA-EPEC-Stammes 3431 sowie dem LEE des DA-EPEC-Stammes O181 und des EPEC-Stammes E2348/69, konnten dagegen bei den LEE-kodierten Effektorproteinen beobachtet werden.

Aufgrund der Fülle der erhaltenen Sequenzdaten war es im Rahmen dieser Dissertation nur möglich, einige Aspekte des LEE anzusprechen, die sich vor allem auf die kodierenden Regionen des LEE beziehen. Eine detaillierte Analyse des LEE soll in zukünftigen Arbeiten zu einer weiteren Aufklärung der Pathogenese der DA-EPEC beitragen. Dabei sind folgende Aspekte, die mit Hilfe einer detaillierteren Sequenzanalyse beantwortet werden sollen, von besonderem Interesse:

Zum einen soll die nähere Charakterisierung der LEE-kodierten Effektorproteine und ihrer funktionellen Domänen Aufschluß über ihre genaue Struktur und Funktionsweise geben. Möglicherweise lassen sich durch eine Analyse der Proteinstruktur der an der Bildung der Translokationspore beteiligten Proteine EspB und EspD Rückschlüsse darauf ziehen, warum

der DA-EPEC-Stamm 3431 im Vergleich zum EPEC-Stamm E2348/69 eine kontaktunabhängige Hämolyse induziert.

Auch der Aufbau des LEE-kodierte Translokationssystems ist ein weiterer interessanter Ansatzpunkt. Eine Analyse der beteiligten Proteine, die in den untersuchten Bakterienstämmen ein starkes Maß an Konservierung aufweisen, trägt eventuell zur Aufklärung der genauen Struktur dieses Sekretionssystems der EPEC- und DA-EPEC-Stämme bei.

Da die DA-EPEC-Stämme kein EAF-Plasmid und daher weder den Regulator Per noch „bundle forming pili“ besitzen, stellt sich zudem die Frage, wie die Expression der von den Genen auf dem LEE kodierten Proteine in den DA-EPEC reguliert wird. In diesem Zusammenhang müßte auch geklärt werden, welche Rolle der vom LEE kodierte und wiederum von Per regulierte Regulator Ler hat. Hilfreich bei dieser Untersuchung könnte sein, daß im *ler*-Gen des DA-EPEC-Stammes 3431 das Transposon Tn5 inseriert ist, das die Funktionsfähigkeit von *ler* wahrscheinlich beeinflußt.

In diesem Zusammenhang ist auch eine genauere Analyse der nicht-kodierenden Regionen des LEE von Interesse, da diese Bereiche oftmals für regulatorische Elemente kodieren.

Außerdem stellt sich die Frage, welche Rolle die BFP und damit verbunden der Adhärenzphänotyp der A/E-Bakterien für die Pathogenese der EPEC spielen. Dies könnte beispielsweise durch die Übertragung des EAF-Plasmids auf die DA-EPEC-Stämme untersucht werden.

Die Sequenzanalyse des LEE von zwei weiteren atypischen EPEC-Stämmen, der DA-EPEC 2129 und B6, soll darüberhinaus dazu beitragen, die molekularen Pathogenitätsmechanismen der typischen und der zunehmend an Bedeutung gewinnenden atypischen EPEC aufzuklären.

7 Literaturverzeichnis

Ackermann, M. R., N. F. Cheville und B. L. Deyoe 1988. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol.* **25**:28-35.

Adu-Bobie, J., G. Frankel, C. Bain, A. G. Goncalves, L. R. Trabulsi, G. Douce, S. Knutton und G. Dougan 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol.* **36**:662-8.

Agin, T. S. und M. K. Wolf 1997. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infect Immun.* **65**:320-6.

Altmann, G. G. und C. P. Leblond 1982. Changes in the size and structure of the nucleolus of columnar cells during their migration from crypt base to villus top in rat jejunum. *J Cell Sci.* **56**:83-99.

Amerongen, H. M., R. Weltzin, C. M. Farnet, P. Michetti, W. A. Haseltine und M. R. Neutra 1991. Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **4**:760-5.

Anderson, N. D., A. O. Anderson und R. G. Wyllie 1976. Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunology.* **31**:455-73.

Appleyard, R. K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics;* **39**: 440-452.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und K. Struhl 1994. *Current protocols in molecular biology* (John Wiley & Sons, Inc.).

Autenrieth, I. B. und R. Firsching 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol.* **44**:285-94.

Babyatsky, M. W. und D. K. Posolsky 1991. *Textbook of Gastroenterology*. Yamada, T., Alpers, D. H., Owyang, C., Powell, D. W. an Silverstein, F . E. (eds.). J. B. Lippincott Co., Philadelphia, pp. 475-501.

Baldini, M. M., J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. Candy und H. W. Moon 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **2**:534-8.

- Baldwin, T. J., M. B. Lee-Delaunay, S. Knutton und P. H. Williams** 1993. Calcium-calmodulin dependence of actin accretion and lethality in cultured HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **61**:760-3.
- Baldwin, T. J., W. Ward, A. Aitken, S. Knutton und P. H. Williams** 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **59**:1599-604.
- Beinke, C.** 1999. Diffus adhärierende enteropathogene *Escherichia coli* (DA-EPEC): Pathogenitätsinsel und molekulare Interaktion sezernierter Proteine mit Epithelzellen. Dissertation, Institut für Infektiologie, Universität Münster.
- Beinke, C., S. Laarmann, C. Wachter, H. Karch, L. Greune und M. A. Schmidt** 1998. Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. *Infect Immun.* **66**:528-39.
- Benz, I. und M. A. Schmidt** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol.* **6**:1539-46.
- Benz, I. und M. A. Schmidt** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **57**:1506-11.
- Benz, I. und M. A. Schmidt** 1992. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun.* **60**:13-8.
- Bernet-Camard, M. F., M. H. Coconnier, S. Hudault und A. L. Servin** 1996. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* **64**:1918-28.
- Beutin, L.** 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res.* **30**:285-98.
- Bhalla, D. K. und R. L. Owen** 1982. Cell renewal and migration in lymphoid follicles of Peyer's patches and cecum--an autoradiographic study in mice. *Gastroenterology.* **82**:232-42.
- Bilge, S. S., J. M. Apostol, Jr., K. J. Fullner und S. L. Moseley** 1993. Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **7**:993-1006.
- Bilge, S. S., C. R. Clausen, W. Lau und S. L. Moseley** 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Bacteriol.* **171**:4281-9.
- Bjerke, K. und P. Brandtzaeg** 1988. Lack of relation between expression of HLA-DR and secretory component (SC) in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches. *Clin Exp Immunol.* **71**:502-7.

- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277**:1453-74.
- Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschape und J. Hacker** 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA- specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun*. **62**:606-14.
- Bockman, D. E. und M. D. Cooper** 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat*. **136**:455-77.
- Borghesi, C., M. J. Taussig und C. Nicoletti** 1999. Rapid appearance of M cells after microbial challenge is restricted at the periphery of the follicle-associated epithelium of Peyer's patch. *Lab Invest*. **79**:1393-401.
- Brinck, U., R. Bosbach, M. Korabiowska, A. Schauer und H. J. Gabius** 1995. Lectin-binding sites in the epithelium of normal human appendix vermiformis and in acute appendicitis. *Histol Histopathol*. **10**:61-70.
- Burnette, W. N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem*. **112**: 195-203.
- Bye, W. A., C. H. Allan und J. S. Trier** 1984. Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology*. **86**:789-801.
- Celli, J., W. Deng und B. B. Finlay** 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol*. **2**:1-9.
- Clark, M. A., M. A. Jepson und B. H. Hirst** 1995. Lectin binding defines and differentiates M-cells in mouse small intestine and caecum. *Histochem Cell Biol*. **104**:161-8.
- Clark, M. A., M. A. Jepson, N. L. Simmons, T. A. Booth und B. H. Hirst** 1993. Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem*. **41**:1679-87.
- Clark, M. A., M. A. Jepson, N. L. Simmons und B. H. Hirst** 1994. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol*. **145**:543-52.
- Claus, D. und R. C. W. Berkeley**, (1986) Genus *Escherichia*. In: Sneath PHA (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkings Co Baltimore **2**: pp. 1105-1139.
- Crane, J. K. und J. S. Oh** 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. **65**:3277-85.

- Cravioto, A., R. E. Reyes, R. Ortega, G. Fernandez, R. Hernandez und D. Lopez** 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol Infect.* **101**:123-34.
- Cravioto, A., R. E. Reyes, F. Trujillo, F. Uribe, A. Navarro, J. M. De La Roca, J. M. Hernandez, G. Perez und V. Vazquez** 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol.* **131**:886-904.
- Deibel, C., S. Kramer, T. Chakraborty und F. Ebel** 1998. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol.* **28**:463-74.
- Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance und B. B. Finlay** 2001. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun.* **69**:6323-35.
- DeVinney, R., A. Gauthier, A. Abe und B. B. Finlay** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci.* **55**:961-76.
- Donnenberg, M. S.** 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli*, p. 709-726. In M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (eds), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, Ltd., New York N.Y.
- Donnenberg, M. S. und J. B. Kaper** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **60**:3953-61.
- Donnenberg, M. S., J. B. Kaper und B. B. Finlay** 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* **5**:109-14.
- Donnenberg, M. S., C. O. Tacket, S. P. James, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, J. B. Kaper und M. M. Levine** 1993a. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest.* **92**:1412-7.
- Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy und J. B. Kaper** 1993b. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest.* **92**:1418-24.
- Donnenberg, M. S. und T. S. Whittam** 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest.* **107**:539-48.
- Donnenberg, M. S., J. Yu und J. B. Kaper** 1993c. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol.* **175**:4670-80.
- Drasar, B. S. und M. J. Hill** 1974. The distribution of bacterial flora in the intestine. *Human intestinal flora* (Academic Press, London) pp. 36-43.

Elliott, S. J., S. W. Hutcheson, M. S. Dubois, J. L. Mellies, L. A. Wainwright, M. Batchelor, G. Frankel, S. Knutton und J. B. Kaper 1999. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **33**:1176-89.

Edwards, P. R., und W. H. Ewing 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co Minneapolis, Minn.

Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel und J. B. Kaper 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **68**:6115-26.

Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg und J. B. Kaper 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol.* **28**:1-4.

Elliott, S. J., J. Yu und J. B. Kaper 1999. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun.* **67**:4260-3.

Ermak, T. H. und R. L. Owen 1986. Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. *Anat Rec.* **215**:144-52.

Evans, G. S., N. Flint, A. S. Somers, B. Eyden und C. S. Potten 1992. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci.* **101**:219-31.

Finlay, B. B. und M. Caparon 2000. Bacterial adherence to cell surfaces and extracellular matrix. ASM Press, Washington.

Finlay, B. B. und S. Falkow 1989a. Common themes in microbial pathogenicity *Microbiol Rev.* **53**:210-30.

Finlay, B. B. und S. Falkow 1989b. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol Microbiol.* **3**:1833-41.

Finlay, B. B., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg und J. B. Kaper 1992. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun.* **60**:2541-3.

Fogh, J., J. M. Fogh und T. Orfeo 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* **59**:221-6.

- Foubister, V., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg und B. B. Finlay** 1994. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun.* **62**:3038-40.
- Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper und S. Knutton** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol.* **30**:911-21.
- Frey, A., K. T. Giannasca, R. Weltzin, P. J. Giannasca, H. Reggio, W. I. Lencer und M. R. Neutra** 1996. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med.* **184**:1045-59.
- Fujimura, Y.** 1986. Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches--phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn.* **21**:325-35.
- Fujimura Y, K. T. und H. Mine** 1992. Membranous cells as a portal of *Yersinia pseudotuberculosis* entry into rabbit ileum. *J. Clin. Electron Microsc.* **25**:35-45.
- Gärtner, J.** 1999. Untersuchungen zum Aufbau eines Zellkulturmodells für intestinale Epithelzellen. Diplomarbeit, Institut für Infektiologie, Universität Münster.
- Galan, J. E.** 1996. Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells. *Mol Microbiol.* **20**:263-71.
- Gallegos, M. T., C. Michan und J. L. Ramos** 1993. The XylS/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Res.* **21**:807-10.
- Gebert, A., S. Fassbender, K. Werner und A. Weissferdt** 1999. The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am J Pathol.* **154**:1573-82.
- Gebert, A. und G. Hach** 1992. Vimentin antibodies stain membranous epithelial cells in the rabbit bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Histochemistry.* **98**:271-3.
- Gebert, A., H. J. Rothkotter und R. Pabst** 1994. Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res.* **276**:213-21.
- Gebert, A., H. J. Rothkotter und R. Pabst** 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol.* **167**:91-159.
- Gey, G. O., Coffman, W. D. und M. D. Kubicek** 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-266.
- Giannasca, P. J., K. T. Giannasca, P. Falk, J. I. Gordon und M. R. Neutra** 1994. Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am J Physiol.* **267**:G1108-21.

- Giron, J. A., A. S. Ho und G. K. Schoolnik** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. **254**:710-3.
- Gomes, T. A., V. Rassi, K. L. MacDonald, S. R. Ramos, L. R. Trabulsi, M. A. Vieira, B. E. Guth, J. A. Candeias, C. Ivey, M. R. Toledo und et al.** 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis*. **164**:331-7.
- Gomez-Duarte, O. G. und J. B. Kaper** 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. **63**:1767-76.
- Goosney, D. L., S. Gruenheid und B.B. Finlay** 2000. Gut Feelings: Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol*. **16**:173-89.
- Gowans, J. L.** 1959. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol*. **14**: pp. 54
- Gullberg, E., M. Leonard, J. Karlsson, A. M. Hopkins, D. Brayden, A. W. Baird und P. Artursson** 2000. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun*. **279**:808-13.
- Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, und E. U. Riecken** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut*. **31**: 1011-1015.
- Hacker, J. und E. Carniel** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep*. **2**:376-81.
- Hacker, J. und J. B. Kaper** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*. **54**:641-79.
- Hanahan, D., J. Jessee und F. R. Bloom** 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*. **204**:63-113.
- Hanski, C., A. Grützku, M. Naumann und E. U. Riecken** 1989. Forschungsforum I: Pathogenitätsmechanismen für Erreger im Magen-Darm-Trakt. *Ergebnisse der Gastroenterologie* **25**: 62-65
- Hanski, C., M. Naumann, H. Hahn und E. O. Riecken** 1989. Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An in vivo study. *Med Microbiol Immunol*. **178**:289-96.
- Hartland, E. L., M. Batchelor, R. M. Delahay, C. Hale, S. Matthews, G. Dougan, S. Knutton, I. Connerton und G. Frankel** 1999. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol*. **32**:151-8.
- Hattori, T. und N. Arizono** 1988. Cell kinetics and secretion of mucus in the gastrointestinal mucosa, and their diurnal rhythm. *J Clin Gastroenterol*. **10**:S1-6.

Heesemann J. und J. Hacker, 2000. Die medizinisch bedeutendsten Krankheitserreger. In J. Hacker, Heesemann, J. (ed.), Molekulare Infektiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl und A. Aguzzi 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med.* **7**:976-7.

Ide, T. 2002. Charakterisierung von Effektorproteinen des Typ III-Sekretionssystems enteropathogener *Escherichia coli* (EPEC/DA-EPEC): Die Bildung von Translokationsporen und der Einfluß von Calcium auf die Sekretion, Dissertation, Institut für Infektiologie, Universität Münster.

Ide, T., S. Laarmann, L. Greune, H. Schillers, H. Oberleithner und M. A. Schmidt 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **3**:669-79.

Inman, L. R. und J. R. Cantey 1983. Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest.* **71**:1-8.

Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Sonnenberg und J. B. Kaper 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:7996-8000.

Jarvis, K. G. und J. B. Kaper 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun.* **64**:4826-9.

Jepson, M. A., C. M. Mason, N. L. Simmons und B. H. Hirst 1995. Enterocytes in the follicle-associated epithelia of rabbit small intestine display distinctive lectin-binding properties. *Histochem Cell Biol.* **103**:131-4.

Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall und J. B. Kaper 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:7839-43.

Jose, J., F. Jahnig und T. F. Meyer 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol.* **18**:378-80.

Kato, T. und R. L. Owen 1994. Absence of EGF receptors and of EGF uptake in Peyer's patch dome epithelium. *Adv Exp Med Biol.* **355**:295-301.

- Kauffmann, F.** 1947 The serology of the *coli* group. J. Immunol. **57**: pp. 71-100.
- Kenny, B. und B. B. Finlay** 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. Infect Immun. **65**:2528-36.
- Kenny, B. und B. B. Finlay** 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. **92**:7991-5.
- Kenny, B. und M. Jepson** 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. Cell Microbiol. **2**:579-90.
- Kenny, B., L. C. Lai, B. B. Finlay und M. S. Donnenberg** 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. Mol Microbiol. **20**:313-23.
- Kerneis, S., A. Bogdanova, J. P. Kraehenbuhl und E. Pringault** 1997. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. Science. **277**:949-52.
- Kinder, S. A., J. L. Badger, G. O. Bryant, J. C. Pepe und V. L. Miller** 1993. Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O8 and construction of a transformable R-M⁺ mutant. Gene. **136**:271-5.
- Klemm, P. und M. A. Schembri** 2000. Bacterial adhesins: function and structure. Int J Med Microbiol. **290**:27-35.
- Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams und A. S. McNeish** 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun. **57**:1290-8.
- Knutton, S., I. Rosenshine, M. J. Pallen, I. Nisan, B. C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan und G. Frankel** 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. Embo J. **17**:2166-76.
- Kohbata, S., H. Yokoyama und E. Yabuuchi** 1986. Cytopathogenic effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. Microbiol Immunol. **30**:1225-37.
- Kresse, A. U., M. Rohde und C. A. Guzman** 1999. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. Infect Immun. **67**:4834-42.
- Lai, L. C., L. A. Wainwright, K. D. Stone und M. S. Donnenberg** 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. Infect Immun. **65**:2211-7.

- Levine, M. M.** 1985. *Escherichia coli* infections. N. Engl. J. Med., **313**: pp. 445-447
- Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and entero-adherent. J. Infect. Dis. **155**: pp. 377-389.
- Levine, M. M., Ferreccio C., Prado V., Cayazzo M., Abrego P., Martinez J., Maggi L., Baldini M. M., Martin W., Maneval D., Kay B., Guers, L., Lior, H., Wassermann, S. S. und J. P. Nataro** 1993. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol. **138**:849-69.
- Levine, M. M., Bergquist E. J., Nalin D. R., Waterman D. H., Hornick R. B., Young C. R., Sotman, S. und B. Rowe** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet. **1**:1119-22.
- Lior, H.** 1996. Classification of *Escherichia coli*. In Gyles (ed), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom. pp.31-72.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. und E. J. Mathur** 1991 High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. Gene 108: pp.1-6
- Macartney, K. K., D. C. Baumgart, S. R. Carding, J. O. Brubaker und P. A. Offit** 2000. Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. J Virol. **74**:5597-603.
- MacDonald, T. T. und P. B. Carter** 1982. Isolation and functional characteristics of adherent phagocytic cells from mouse Peyer's patches. Immunology. **45**:769-74.
- Manjarrez-Hernandez, H. A., T. J. Baldwin, A. Aitken, S. Knutton und P. H. Williams** 1992. Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. Lancet. **339**:521-3.
- Manjarrez-Hernandez, H. A., T. J. Baldwin, P. H. Williams, R. Haigh, S. Knutton und A. Aitken** 1996. Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Infect Immun. **64**:2368-70.
- Mandel, M. und A. Higa** 1970. Calcium-dependent bacteriophages DNA infection. J. Mol. Biol. **53**: 159-163.
- Mann, B J., und W. A. Petri.** 1995. Infections of the gastrointestinal tract. Blaser, M.J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H.B. und Guerrant, R. L. (Raven Press, New York) pp. 99-105

- Marcial, M. A. und J. L. Madara** 1986. Cryptosporidium: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology*. **90**:583-94.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg und J. B. Kaper** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:1664-8.
- McDaniel, T. K. und J. B. Kaper** 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol*. **23**:399-407.
- McGhee, J. R., J. Mestecky, M. T. Dertzbaugh, J. H. Eldridge, M. Hirasawa und H. Kiyono** 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. **10**:75-88.
- McNamara, B. P. und M. S. Sonnenberg** 1998. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett*. **166**:71-8.
- Mecas, J. J. und E. J. Strauss** 1996. Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg Infect Dis*. **2**:270-88.
- Menard, R., C. Dehio und P. J. Sansonetti** 1996a. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of Shigella. *Trends Microbiol*. **4**:220-6.
- Menard, R., M. C. Prevost, P. Gounon, P. Sansonetti und C. Dehio** 1996b. The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**:1254-8.
- Michgehl, S.** 2001 Untersuchungen zur funktionellen Rolle der N-terminalen Domäne des „translocated intimin receptor“ (Tir)-Proteins. Diplomarbeit, Institut für Infektiologie, Universität Münster.
- Milon, A., E. Oswald und J. De Rycke** 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res*. **30**:203-19.
- Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann und N. F. Cheville** 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol*. **25**:131-7.
- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine und R. A. Giannella** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun*. **41**:1340-51.
- Moyer, M. P. und J. B. Aust** 1984. Human colon cells: culture and in vitro transformation. *Science*. **224**:1445-7.

- Nataro, J. P. und J. B. Kaper** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. **11**:142-201.
- Neutra, M. R. und J. P. Kraehenbuhl** 1992. M cell-mediated antigen transport and monoclonal IgA antibodies for mucosal immune protection. Adv Exp Med Biol. **327**:143-50.
- Neutra, M. R., L. J. O'Malley und R. D. Specian** 1982. Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. Am J Physiol. **242**:G380-7.
- Neutra, M. R., T. L. Phillips, E. L. Mayer und D. J. Fishkind** 1987. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. Cell Tissue Res. **247**:537-46.
- Neutra, M. R., E. Pringault und J. P. Kraehenbuhl** 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. Annu Rev Immunol. **14**:275-300.
- Nowicki, B., A. Labigne, S. Moseley, R. Hull, S. Hull und J. Moulds** 1990. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. Infect Immun. **58**:279-81.
- Ochman, H., J. G. Lawrence und E. A. Groisman** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature. **405**:299-304.
- Orskov, I., F. Orskov, A. Birch-Andersen, M. Kanamori und C. Svanborg-Eden** 1982. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis Scand. J Infect Dis Suppl. **33**:18-25.
- Owen, R. L.** 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. Gastroenterology. **72**:440-51.
- Owen, R. L., R. T. Apple und D. K. Bhalla** 1986a. Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. Anat Rec. **216**:521-7.
- Owen, R. L. und A. L. Jones** 1974. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. Gastroenterology. **66**:189-203.
- Owen, R. L., N. F. Pierce, R. T. Apple und W. C. Cray, Jr.** 1986b. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. J Infect Dis. **153**:1108-18.

- Pabst, R.** 1987. The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat Embryol.* **176**:135-44.
- Pelayo, J. S., I. C. Scaletsky, M. Z. Pedroso, V. Sperandio, J. A. Giron, G. Frankel und L. R. Trabulsi** 1999. Virulence properties of atypical EPEC strains. *J Med Microbiol.* **48**:41-9.
- Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Posfai, S. Elliott, M. S. Sonnenberg, J. B. Kaper und F. R. Blattner** 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* **66**:3810-7.
- Pinto, M., Robine.Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. und A. Zweibaum** 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**: 323-330.
- Potten, C. S., und M. Loeffler** 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* **110**:1001-20.
- Qu, X. D., K. C. Lloyd, J. H. Walsh, und R. I. Lehrer** 1996. Secretion of type II phospholipase A2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells. *Infect Immun.* **64**:5161-5.
- Rao, M. C., und H. R. Jonge** 1990. Ca and phospholipid-dependent protein kinases, In E. Lebenthal and M. Duffey (ed), *Textbook of secretory diarrhea.* (Raven Press, New York) pp. 209-232.
- Regoli, M., C. Borghesi, E. Bertelli, und C. Nicoletti** 1995. Uptake of a gram-positive bacterium (*Streptococcus pneumoniae* R36a) by the M cells of rabbit Peyer's patches. *Anat Anz.* **177**:119-24.
- Rodriguez, R. L., und R. C. Tait** 1983. *Recombinant DNA techniques: an introduction.* Addison-Wesley Publishing Company London Amsterdam Don Mills Sydney Tokio.
- Rosenshine, I., M. S. Sonnenberg, J. B. Kaper, und B. B. Finlay** 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *Embo J.* **11**:3551-60.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills, und B. B. Finlay** 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J.* **15**:2613-24.
- Rothkotter, H. J., und R. Pabst** 1989. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology.* **67**:103-8.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und H. A. Ehrlich** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*; **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und T. Maniatis** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York.
- Sanderson, I. R., und W. A. Walker** 1993. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology*. **104**:622-39.
- Sanger, J. M., R. Chang, F. Ashton, J. B. Kaper, und J. W. Sanger** 1996. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. **34**:279-87.
- Sansonetti, P. J. und A. Phalipon** 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol*. **11**:193-203.
- Savidge, T. C.** 1996. The life and times of an intestinal M cell. *Trends Microbiol*. **4**:301-6.
- Savidge, T. C., M. W. Smith und P. S. James** 1995. A confocal microscopical analysis of Peyer's patch membranous (M) cell and lymphocyte interactions in the scid mouse. *Adv Exp Med Biol*:243-5.
- Savidge, T. C., M. W. Smith, P. S. James und P. Aldred** 1991. Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol*. **139**:177-84.
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris und G. Hecht** 1996. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun*. **64**:4480-7.
- Schiebler, T. H., W. Schmidt und K. Ziller** 1997. *Anatomie, Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin-Heidelber-New York. 7., korrigierte Auflage.
- Schulte, R., S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault und I. B. Autenrieth** 2000. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol*. **2**:173-85.
- Schulzke, J. D. und E. O. Riecken** 1989. [Principles of epithelial transport mechanisms: importance for pathophysiologic understanding, differential diagnosis and treatment of diarrheal diseases]. *Z Gastroenterol*. **27**:693-700.
- Semenza, G.** 1986. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annu Rev Cell Biol*. **2**:255-313.
- Shaw, R. K., S. Daniell, F. Ebel, G. Frankel und S. Knutton** 2001. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol*. **3**:213-22.

- Sicinski, P., J. Rowinski, J. B. Warchol, Z. Jarzabek, W. Gut, B. Szczygiel, K. Bielecki und G. Koch** 1990. Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology*. **98**:56-8.
- Siebers, A. und B. B. Finlay** 1996. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* **4**:22-9.
- Sierro, F., E. Pringault, P. S. Assman, J. P. Kraehenbuhl und N. Debard** 2000. Transient expression of M-cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patches. *Gastroenterology*. **119**:734-43.
- Simon, G. L. and Gorbach, S. L.** 1995 Normal alimentary tract flora. In *Infections of the gastrointestinal tract*. Blaser, M.J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H.B. und Guerrant, R. L. (Raven Press, New York) pp. 53-69.
- Smith, M. W., P. S. James, D. R. Tivey und D. Brown** 1988. Automated histochemical analysis of cell populations in the intact follicle-associated epithelium of the mouse Peyer's patch. *Histochem J.* **20**:443-8.
- Smith, M. W. und M. A. Peacock** 1980. "M" cell distribution in follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patch. *Am J Anat.* **159**:167-75.
- Smith, M. W., N. W. Thomas, P. G. Jenkins, N. G. Miller, D. Cremaschi und C. Porta** 1995. Selective transport of microparticles across Peyer's patch follicle-associated M cells from mice and rats. *Exp Physiol.* **80**:735-43.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences of among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Bio* **219**: pp. 37-44.
- Sperandio, V., J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen und J. B. Kaper** 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol.* **38**:781-93.
- Straley, S. C., E. Skrzypek, G. V. Plano und J. B. Bliska** 1993. Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect Immun.* **61**:3105-10.
- Tang, M. X., Redemann, C. T. und F. C. Szoka, Jr.** 1996. In vitro gene delivery by degrades polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chem.* **7**: pp. 703.
- Taylor, K. A., P. W. Luther und M. S. Sonnenberg** 1999. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun.* **67**:120-5.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante und J. L. Puente** 1996. Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **21**:963-75.

Toledo, M. R., C. Alvariza Mdo, J. Murahovschi, S. R. Ramos und L. R. Trabulsi 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun.* **39**:586-9.

Trier, J. S. 1991. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am.* **20**:531-47.

Vachon, P. H. und J. F. Beaulieu 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology.* **103**:414-23.

Van Gijsegem, F., S. Genin und C. Boucher 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* **1**:175-80.

Vogelstein, B. und D. Gillespie 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**:615-9.

Wachter, C., C. Beinke, M. Mattes und M. A. Schmidt 1999. Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **31**:1695-707.

Wachter, C., C. Beinke, M. Mattes und M. A. Schmidt 1999. The tip of a molecular syringe: response. *Trends Microbiol.* **7**:343.

Walker, R. I., E. A. Schmauder-Chock, J. L. Parker und D. Burr 1988. Selective association and transport of *Campylobacter jejuni* through M cells of rabbit Peyer's patches. *Can J Microbiol.* **34**:1142-7.

Warawa, J., B. B. Finlay und B. Kenny 1999. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **67**:5538-40.

Warburg, O. und W. Christian 1942. Isolierung und Kristallisation des Gärferments Enolase. *Biochem. Z.* **310**: 384.

Wassef, J. S., D. F. Keren und J. L. Mailloux 1989. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immun.* **57**:858-63.

Weber, K. und M. Osborn 1975 In: Neurath, H. und Hill, R. L.. *The proteins.* 3. Auflage, London, New York Academic Press Band **1**: pp.179.

Winnacker, E. L. 1990. *Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie.* VCH, Weinheim

Wolf, J. L., D. H. Rubin, R. Finberg, R. S. Kauffman, A. H. Sharpe, J. S. Trier und B. N. Fields 1981. Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science.* **212**:471-2.

Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel und I. Rosenshine 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **28**:143-55.

Yamamoto, T., N. Wakisaka, T. Nakae, T. Kamano, O. Serichantalergs und P. Echeverria 1996. Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun.* **64**:3694-702.

Zhu, C., T. S. Agin, S. J. Elliott, L. A. Johnson, T. E. Thate, J. B. Kaper und E. C. Boedeker 2001. Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte Effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect Immun.* **69**:2107-15.

8 Anhang

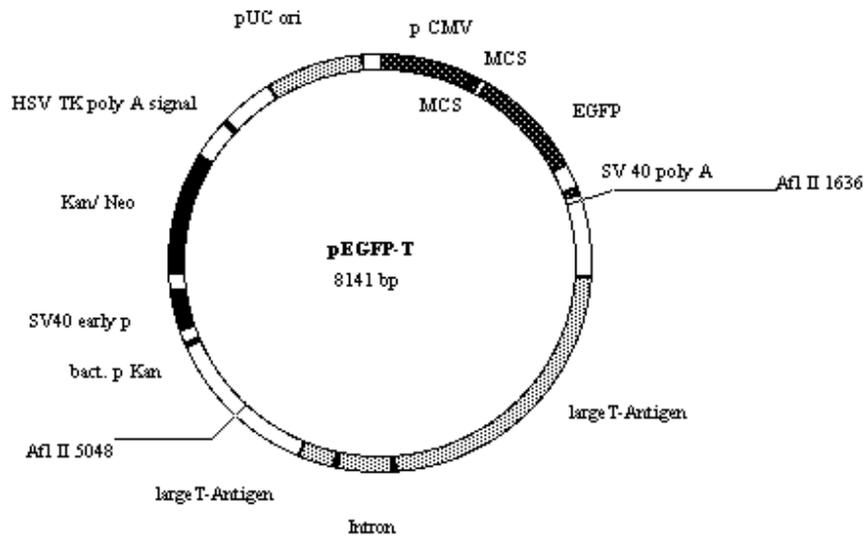


Abb. 8.1 Genetische Karte des Vektors pEGFP-T

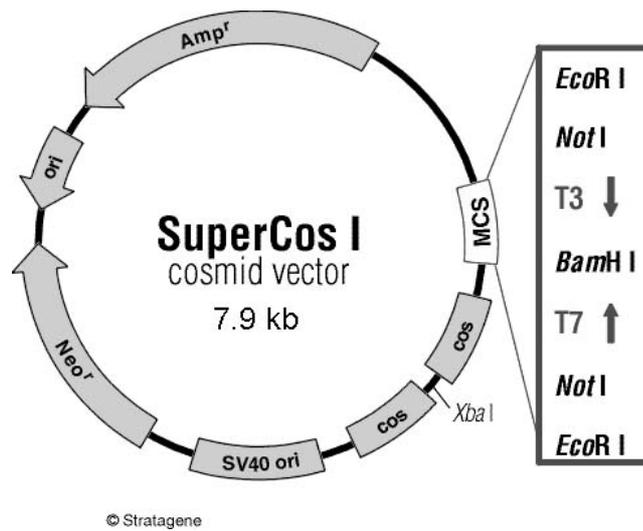


Abb. 8.2 Genetische Karte des Cosmidvektors SuperCos1

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. M. A. Schmidt am Institut für Infektiologie, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE), an der Westfälischen Wilhelms-Universität in der Zeit von Juni 1999 bis Oktober 2002 angefertigt.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Arterioskleroseforschung des Universitätsklinikums Münster (Prof. Dr. H. Robenek) mit freundlicher Unterstützung von Frau Lilo Greune (Institut für Infektiologie, ZMBE) durchgeführt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die gute Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Brosius danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei Christoph Cichon für die gute Zusammenarbeit, bei Lilo Greune für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und bei Verena Humberg für die Hilfe bei der Suche nach positiven Klonen.

Bei allen IfIs bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima.

Ein besonderes Dankeschön geht an Gerd, Tina, Sabine und Silke M. für die Korrekturen und die Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit. Gerd und Silke K. danke ich darüberhinaus für ihre Hilfe und zahlreiche nützliche Anregungen. Besonders Tina und Knappi danke ich für die großartige Unterstützung im Endspurt dieser Arbeit (Danke!). Den „Damen“ danke ich aber auch für gemeinsame Käffchen, Feierabendbiere und ihre Freundschaft.

Jan danke ich für den vorgelebten Zen-Buddhismus.