

The background of the cover is a fluorescence microscopy image showing numerous cells. The nuclei are stained blue, and the cytoplasm or other cellular components are stained green. A large, central cell is more prominent, showing a dense green cytoplasm and a blue nucleus. The overall appearance is that of a biological sample, likely related to the research topic of macrophages and dendritic cells.

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON SHIGATOXIN AUF MAKROPHAGEN UND DENDRITISCHE ZELLEN DES RINDES

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

DANIELA LOOS

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

1. Auflage 2012

© 2012 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-133-2

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

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

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

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON SHIGATOXIN AUF MAKROPHAGEN UND DENDRITISCHE ZELLEN DES RINDES

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

eingereicht von
Daniela Loos
Tierärztin aus Hanau

Gießen 2012

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. C. Menge

Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der Disputation:

19.11.2012

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

D. Loos*, P.S. Bridger, D. Werling, G. Baljer, C. Menge

Bovine Macrophages (Mø) sense *Escherichia coli* Shigatoxin 1 (Stx1)

Posterpräsentation, 3. European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), 10.-13.09.2009, Berlin

D. Loos, P.S. Bridger, D. Werling, G. Baljer, C. Menge*

Wirkung von *Escherichia (E.) coli* Shigatoxin 1 auf bovine Makrophagen *in vitro*.

Posterpräsentation, III. EHEC-Workshop, 16.-18.06.2010, Wildbad Kreuth

D. Loos*, P.S. Bridger, D. Werling, G. Baljer, C. Menge

Wirkung von *Escherichia (E.) coli* Shigatoxin 1 auf bovine Makrophagen *in vitro*.

Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, 22.-24.06.2010, Jena

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

* präsentierender Autor

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 2.1 | Aufgaben von Mø und DC im Rahmen der Immunantwort | 2 |
| 2.1.1 | Antigenerkennung im unspezifischen Immunsystem..... | 3 |
| 2.1.2 | Pattern recognition receptors (PRR)..... | 3 |
| 2.1.3 | Danger hypothesis | 5 |
| 2.2 | Professionell antigen-präsentierende Zellen: Biologie und Funktion | 6 |
| 2.2.1 | Makrophagen (Mø)..... | 6 |
| 2.2.2 | Dendritische Zellen | 7 |
| 2.3 | Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung | 8 |
| 2.3.1 | T-Zellaktivierung oder Anergie..... | 8 |
| 2.3.2 | Molekulare Mechanismen der T-Zellaktivierung | 9 |
| 2.4 | Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der enteralen Mukosa und bei gastrointestinalen Infektionen | 14 |
| 2.4.1 | Intestinales Immunsystem..... | 14 |
| 2.4.2 | Eigenschaften intestinaler Mø..... | 15 |
| 2.5 | Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i> (STEC) | 17 |
| 2.5.1 | Aufbau und Wirkung des Toxins | 17 |
| 2.5.2 | Typen von Shigatoxinen..... | 18 |
| 2.5.3 | Shigatoxin-Rezeptor Gb ₃ (CD77): Lokalisation, Struktur und Einfluss auf die Zytotoxizität | 18 |
| 2.5.4 | Toxinbindung und TLR4..... | 20 |
| 2.5.5 | MAP-Kinasen und ribotoxic stress response | 21 |
| 2.6 | Wirkung des Stx auf Mø | 23 |
| 2.6.1 | Einfluss von Stx auf humane Mø | 23 |
| 2.6.2 | Stx und Phagozytose | 25 |
| 2.6.3 | Stx und Apoptose..... | 27 |
| 2.7 | Pathogenese der EHEC Infektion des Menschen | 28 |
| 2.8 | Arbeitshypothese | 29 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 30 |
| 3.1 | Tiere und Blutentnahme | 30 |
| 3.2 | Primäre bovine Makrophagen (Mø) | 30 |
| 3.2.1 | Isolation der peripheren mononukleären Zellfraktion (PBMC): Methode A | 30 |
| 3.2.2 | Generierung einer Mø-Kultur aus PBMC..... | 31 |
| 3.2.3 | Inkubation boviner Mø mit Stx1 | 32 |
| 3.2.4 | Ernte der Mø | 32 |
| 3.3 | Primäre bovine dendritische Zellen (DC) | 34 |
| 3.3.1 | Isolation der peripheren mononukleären Zellfraktion (PBMC): Methode B | 34 |
| 3.3.2 | Generierung einer DC-Kultur aus PBMC | 34 |
| 3.3.3 | Inkubation boviner DC mit Stx1 | 35 |
| 3.3.4 | Ernte der DC | 35 |
| 3.4 | Immunfluoreszenzmikroskopie | 36 |
| 3.4.1 | Präparatevorbereitung zur Immunfluoreszenzfärbung | 36 |
| 3.5 | Durchflußzytometrie (DFZM) | 37 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.5.1 | Probenvorbereitung..... | 37 |
| 3.5.2 | Probenmessung und -analyse | 41 |
| 3.5.3 | Makrophagen (Mø)..... | 43 |
| 3.5.4 | Dendritische Zellen (DC)..... | 44 |
| 3.6 | Untersuchungen zum Nachweis boviner Zytokin- und Chemokingene..... | 46 |
| 3.6.1 | Quantitative RNA-Bestimmung im Photometer..... | 48 |
| 3.6.2 | Qualitative Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese | 48 |
| 3.6.3 | Reverse Transkription | 49 |
| 3.6.4 | PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen | 50 |
| 3.6.5 | <i>Real time</i> Taqman® PCR | 53 |
| 3.7 | Nachweis von IL-10 im Überstand primärer Mø-Kulturen mittels ELISA | 56 |
| 3.7.1 | Aufkonzentrierung der Kulturüberstände | 56 |
| 3.7.2 | Durchführung des ELISA | 56 |
| 3.8 | Statistische Auswertung | 58 |
| 4 | ERGEBNISSE | 59 |
| 4.1 | Charakterisierung primärer boviner Makrophagen (Mø) | 59 |
| 4.1.1 | Morphologie | 59 |
| 4.1.2 | Zytoskelettausstattung und Oberflächenantigene | 60 |
| 4.1.3 | Shigatoxin-Rezeptor (CD77)-Expression | 63 |
| 4.1.4 | Kompetitionsstudie mit anti-CD77 Antikörper und rStxB1 | 65 |
| 4.1.5 | Einfluss von Stx1..... | 67 |
| 4.2 | Charakterisierung primärer boviner dendritischer Zellen (DC)..... | 78 |
| 4.2.1 | Morphologie | 78 |
| 4.2.2 | Expression von Oberflächenantigenen inkl. CD77 | 78 |
| 4.2.3 | Bindungsstudie mit rStxB1 | 80 |
| 4.2.4 | Einfluss von Stx1..... | 81 |
| 5 | DISKUSSION | 83 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 98 |
| 7 | SUMMARY | 100 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 101 |
| 9 | ANHANG | 116 |
| 9.1 | Puffer und Lösungen..... | 116 |
| 10 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 120 |
| 10.1 | Abbildungen | 120 |
| 10.2 | Tabellen..... | 120 |
| 11 | DANKSAGUNG..... | 121 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | mikromolar |
| Abb. | Abbildung |
| <i>A. bidest</i> | <i>Aqua bidestillata</i> |
| A/E | <i>attaching/effacing</i> |
| ad | bis zu (auffüllen auf) |
| APC | Allophycocyanin bzw. <i>antigen presenting cell</i> |
| bp | <i>baise pairs</i> , Basenpaare |
| bo | bovin |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CD ₅₀ | zytotoxische Dosis 50 % |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| DC | Dendritische Zelle |
| DEPC-Wasser | Diethyl-Pyrocarbonat-behandeltes Wasser |
| DFZM | Durchflusszytometrie |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| EHEC | enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| Fa. | Firma |
| f.c. | <i>final concentration</i> , Endkonzentration |
| FITC | Fluoreszein-Isothiozyanat |
| FKS | fötales Kälberserum |
| g | Erdbeschleunigung |
| Gb ₃ | Globotriaosylzeramid |
| Gb ₄ | Globotetraosylzeramid |
| GRO-α | <i>growth related oncogene-alpha</i> |
| HC | hämorrhagische Colitis |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure) |
| HUS | hämolytisch-urämisches Syndrom |
| IE | internationale Einheit |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IMDM | <i>Iscoves modified Dulbeccos medium</i> |
| IFN _γ | Interferon γ |
| kB | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LEE | <i>locus of enterocyte effacement</i> |
| log | Logarithmus |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Molarität |
| mA | Milliampere |
| MAPK | Mitogene aktivierte Proteinkinase |
| MCP-1 | <i>macrophage chemotactic protein 1</i> |
| mg | Milligramm |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------|---|
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mm | Millimeter |
| Mø | Makrophagen |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure |
| n | Anzahl unabhängiger Versuche |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NFκB | nuclear factor κB |
| nm | Nanometer |
| NOD | <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> |
| OD | optische Dichte |
| PAMP | <i>pathogen associated molecular pattern</i> |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Propidiumiodid |
| pM | pikomolar |
| pmol | Pikomol |
| PRR | <i>pattern recognition receptor</i> |
| RANTES | <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i> |
| rel | relativ |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| rStxB1 | rekombinante Stx1 B-Untereinheit |
| RT | Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription/Transkriptase |
| RT-PCR | <i>real-time polymerase chain reaction</i> |
| STEC | Shigatoxin-produzierende <i>Escherichia coli</i> |
| Stx | Shigatoxin |
| Stx1A | A-Untereinheit von Stx1 |
| Stx1Ak | Stx1-spezifische, neutralisierende Antikörper |
| Stx1B | B-Untereinheit von Stx1 |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TCR | <i>T-cell receptor</i> |
| TGFβ | transforming growth factor beta |
| TE | Tris EDTA |
| TLR | <i>toll-like receptor</i> |
| TNFα | Tumornekrosefaktor alpha |
| TPP | Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura |
| U | <i>unit</i> , Einheit |
| U/min | Umdrehungen je Minute |
| UE | Untereinheit |

1 EINLEITUNG

Das Immunsystem von Vertebraten besteht aus einem unspezifischen und einem spezifischen (adaptiven) Teil. Der unspezifische Teil des Immunsystems ist phylogenetisch älter und schon bei wirbellosen Tieren vorhanden, während sich das spezifische Immunsystem erst in höher entwickelten Organismen ausgebildet. Ein wichtiges Element des unspezifischen Immunsystems sind Makrophagen (M ϕ) und dendritische Zellen (DC). Neben ihrer Aufgabe eindringende Krankheitserreger frühzeitig zu erkennen und zu bekämpfen, bilden sie das Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr.

Shigatoxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) sind Zoonoseerreger, die leicht über kontaminierte Lebensmittel, Wasser oder durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren auf den Menschen übertragen werden können. Folgen einer Infektion des Menschen können Hämorrhagische Kolitis (HC) oder in schwerwiegenderen Fällen das hämolytisch urämische Syndrom (HUS) (95) oder die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TPP) sein. Bei Rindern verläuft die Infektion meist symptomlos, die Tiere scheiden STEC jedoch über lange Zeiträume intermittierend aus und können sich jederzeit reinfizieren. Die Prävalenz des Erregers in Rinderbeständen ist weltweit daher hoch. Hauptvirulenzfaktoren der STEC sind die Shigatoxine 1 und 2 (Stx1 und Stx2). Stx ist, wie das Cholera- oder Pertussistoxin, ein heteromeres Proteintoxin mit einem A1:B5 Aufbau (147). Die A-Untereinheit ist der eigentlich toxische Teil, der, nach Bindung der B-Untereinheit an die Zelle, in empfänglichen Zellen mittels retrogradem Transport in das endoplasmatische Retikulum transportiert wird und dort die Proteinbiosynthese inhibiert (187), (24), (44). Der Rezeptor für das Toxin ist das Globotriaosylceramid (Gb₃) auch als CD77 bezeichnet (135).

In der Pathogenese der durch STEC ausgelösten Erkrankungen beim Menschen spielen M ϕ eine zentrale Rolle. Nach Einwirkung des Stx stellen sie die Quelle für pro-inflammatorische Zytokine dar (233). Diese eigentlich zum Schutz des Organismus und zur Eliminierung des Erregers gedachte Abwehrreaktion trägt in erheblichem Maß zur Entwicklung der toxinbedingten Krankheitssymptome und der Schädigung der betroffenen Gewebe bei. Die im Vergleich zum Menschen fehlenden oder nur gering ausgeprägten Krankheitserscheinungen bei STEC-Infektionen des Rindes lassen vermuten, dass das bovine Immunsystem auf die Einwirkung von Stx nicht mit einer stark inflammatorischen Antwort reagiert. Stattdessen scheint Stx die Immunantwort im Sinne einer Unterdrückung des Immunsystems zu modulieren. Da Mukosamakrophagen in der Darmschleimhaut des Rindes als potentielle Zielzellen für Stx beschrieben wurden (206), sollte in der vorliegenden Arbeit die Reaktion boviner M ϕ und DCs auf gereinigtes Stx1 untersucht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

Das Immunsystem von Vertebraten besteht aus einem angeborenen (unspezifischen) und einem erworbenen (spezifischen) Teil. Makrophagen (Mø) und dendritische Zellen (DC) sind zentraler Bestandteil der Immunabwehr, da sie am Schnittpunkt zwischen beiden Teilen wichtige Funktionen ausüben. Die Aufgabe dieser Zellen besteht darin, die Anwesenheit von Eindringlingen schnell zu erkennen, die akute Entzündungsreaktion zu initiieren und zu koordinieren sowie schließlich dem spezifischen Immunsystem Informationen über die Art und Herkunft des potentiellen Pathogens zu liefern (47), damit eine angemessene spezifische Abwehrreaktion eingeleitet werden kann.

2.1 Aufgaben von Mø und DC im Rahmen der Immunantwort

Die Aufgaben von Mø und DC im Rahmen der Immunantwort sind vielfältig. Mø fungieren als Sensoren für mikrobielle Besiedlung und sind somit verantwortlich für die erste Verteidigung des Körpers gegen Eindringlinge und die Aktivierung und Unterstützung der spezifischen Immunabwehr (132). Sie tragen jedoch auch nach Beseitigung der Noxe dazu bei, die Immunantwort wieder zu regulieren und somit überschießende Reaktionen zu verhindern. Mø stellen sich als eine sowohl phänotypisch als auch funktionell heterogene Gruppe von Zellen dar (151, 175, 258). Pro-inflammatorisch entwickelte Mø sind in der Lage, sich in Richtung eines anti-inflammatorischen Phänotyps zu entwickeln und umgekehrt. Es gibt Hinweise darauf, dass die verschiedenen Aktivierungsstadien abhängig vom umgebenden Milieu flexibel und voll reversibel sind (175, 211, 258). Mø haben noch eine weitere wichtige Aufgabe unabhängig von ihrer Beteiligung an der Immunantwort. Sie sind unentbehrlich für die Erhaltung der Homöostase, ohne die der Organismus nicht lebensfähig wäre. Diese Aufgabe erledigen sie jedoch weitgehend unabhängig von anderen Immunzellen. Sie exprimieren spezifische Rezeptoren, die beispielsweise die Phagozytose von Zellen steuern, die der Apoptose anheimgefallen sind. Die Bindung von Liganden an Rezeptoren der Mø, wie zum Beispiel *scavenger*-Rezeptoren oder Phosphatidylserin-Rezeptoren (45), führt jedoch entweder zu keiner Signaltransduktion im Hinblick auf immunologische Funktionen oder zu anti-inflammatorischen Reaktionen (103).

Dendritische Zellen zeichnen sich ebenfalls durch eine große Anzahl von verschiedenen Phänotypen mit unterschiedlichsten Funktionen aus. Sie sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind, naiven T-Zellen Antigen zu präsentieren und sie dadurch zu stimulieren, und sind damit verantwortlich dafür, dass überhaupt eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden kann (80). Sie sind ebenfalls sehr effizient bei der Stimulierung ruhender Gedächtnis-T-Zellen (81). Außerdem haben sie eine Bedeutung bei der Ausbildung einer immunologischen Toleranz (209).

2.1.1 Antigenerkennung im unspezifischen Immunsystem

Die Antigenerkennung erfolgt nicht spezifisch für jeden Erreger, sondern über *pattern recognition receptors* (PRR) auf den antigen-präsentierenden Zellen (APC), die für die Pathogene lebenswichtige hochkonservierte molekulare Strukturen, sogenannte *pathogen associated molecular pattern* (PAMP), (91) erkennen. Diese werden zunehmend auch als *microbial associated molecular pattern* (MAMP) bezeichnet, da sie auch auf nicht-pathogenen und kommensalen Mikroorganismen vorkommen. Diese Strukturen kommen im Wirtsorganismus nicht oder nur sehr selten vor, sind aber typisch für ganze Gruppen von Mikroorganismen. Beispiele hierfür sind das Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien oder doppelsträngige RNA als Merkmal verschiedener RNA-Viren. Dieser Mechanismus befähigt die unspezifische Abwehr zur Unterscheidung zwischen nicht-infektiösem Selbst und infektiösem Fremdantigenen.

2.1.2 Pattern recognition receptors (PRR)

Es existieren verschiedene Ausprägungen von PRRs. Sie können löslich im Blut oder Körperflüssigkeiten vorkommen (z.B. Akute-Phase-Proteine wie Mannose-bindendes-Lektin (MBL) oder Serumamyloid-Protein (SAP)). Sie können auf der Zelloberfläche (z.B. *toll-like receptors* (TLR)), oder aber in intrazellulären Kompartimenten (*nucleotide-binding and oligomerization domain like receptor* (NLR)) exprimiert werden.

TLR werden auf der Oberfläche verschiedenster Zellen und in verschiedenen Geweben exprimiert. Neben Immunzellen wie M ϕ und DC kommen sie zum Beispiel auf Darmepithelzellen vor. Beim Menschen wurden bisher 11 verschiedene, bei der Maus 13 verschiedene TLR mit Spezifitäten für unterschiedliche Liganden entdeckt (258).

Die TLR 1-10 wurden bei Rindern und Schafen nachgewiesen. Die Homologie zwischen bovinen bzw. ovinen und humanen TLRs beträgt 84 – 97 % auf Ebene der Aminosäuresequenz (146).

Im Falle einer Infektion binden APC wie M ϕ oder DCs mittels der PRR PAMP. Dies induziert die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten, führt jedoch gleichzeitig zur Reifung mit Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, zur Migration von DC in die regionären Lymphknoten und zur Produktion von Zytokinen. PRR sind somit nicht nur essentiell für die unmittelbare Reaktion auf ein Pathogen, sondern verbinden auch angeborenes und adaptives Immunsystem (241).

Die intrazelluläre Domäne der TLR ähnelt dem IL-1 Rezeptor und wird deswegen als *Toll/IL-1-receptor* (TIR) Domäne bezeichnet. Der extrazelluläre Anteil besteht jedoch nicht wie beim IL-1-Rezeptor aus Immunglobulin-ähnlichen Domänen, sondern aus leuzinreichen

Abschnitten, sogenannten *leucin rich repeats* (LRR) (7), einer Strukturfamilie von Proteinen, der besondere Bedeutung in Protein-Protein Interaktionen zukommt (240).

Die ersten beim Menschen entdeckten *Toll* Homologe waren TLR 1 und 4 (139). TLR 4 erkennt LPS und wird unter anderem auf M ϕ exprimiert (173). Die Stimulation von TLR führt zu einer Signalkaskade, die in der Aktivierung von NF- κ B mündet. Dies soll am Beispiel von TLR 4 dargestellt werden. CD14, ein Oberflächenprotein auf mononukleären Phagozyten bindet LPS (247), besitzt jedoch keine intrazelluläre Domäne. Die Signaltransduktion erfolgt über einen Komplex mit TLR 4. Neben den beiden schon erwähnten Komponenten ist für die Bindung von LPS das Protein MD-2 nötig (6). Nach der Bindung von LPS kommt es zur Aktivierung der TLR-TIR Domäne und zur Bildung eines Komplexes mit dem Adapterprotein MyD88 und der Serin-Threonin-Kinase *IL1-receptor-associated kinase* (IRAK). Diese phosphoryliert sich selbst, dissoziiert vom Signalkomplex und bindet das Adapterprotein Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6 (TRAF 6). Dies führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen und dem IKK Komplex. Der Komplex induziert die Phosphorylierung von I κ B, woraufhin letzteres ubiquitiniert und degradiert wird. Nach der Degradierung von I κ B wird NF- κ B freigesetzt und kann in den Nukleus transloziert werden. Die MAP-Kinasen können über die JNK (*c-jun N-terminal kinase*) AP-1 (*activation protein 1*) aktivieren (7). Weiterhin könnten sie möglicherweise auch über posttranskriptionale Mechanismen die Zytokinproduktion beeinflussen, indem sie Einfluss auf die mRNA-Stabilität und die Translation nehmen. Dies wurde zum Beispiel für TNF α gezeigt (38). Das Ergebnis der TLR-Signalkaskade ist die Freisetzung von NF- κ B und die Transkription pro-inflammatorischer Zytokingene. Zusätzlich existiert ein MyD88 unabhängiger Signaltransduktionsweg, der über die Phosphorylierung und Translokation von IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) in den Zellkern ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B und zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle führt (216).

Beispiele für Vertreter der zytosolischen PRR sind die NLR. Diese Proteine bestehen aus drei Elementen (85). Strukturelemente dieser Proteinfamilie sind, analog zu den TLR, LRR (*leucin rich repeats*), die entscheidend für die Bindung des Liganden sind. Weiterhin besitzen sie eine NALP/NACHT-Domäne (*neuronal apoptosis inhibitory protein/MHC class II transcription activator/incompatibility locus protein form Podospora anserina/telomerase-associated protein*) (105). Die Oligomerisation dieser Domäne ist nötig, damit die Effektordomäne des Moleküls Signale transduzieren kann. Die Art der Effektordomäne ist entscheidend für die Einteilung dieser Familie in drei Subfamilien: (i) PYRIN Domäne, (ii) *caspase recruitment* Domäne (CARD) oder (iii) *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat* (BIR) Domäne. NOD1 und NOD2 waren die ersten Mitglieder der NLR-Familie, die als intrazelluläre Erkennungsmoleküle für mikrobielle Strukturen entdeckt wurden (84). Sie erkennen verschiedene Strukturen des Peptidoglykans (74), eines Bausteins bakterieller

Zellwände. Sie induzieren die Aktivierung von NF- κ B über eine Serin/Threoninkinase (RICK/Rip2) (101). NOD1 wird in vielen Geweben exprimiert, beispielsweise in intestinalen Epithelzellen und hat hier eine Bedeutung bei der intrazellulären Erkennung von mikrobiellen Produkten, die die Erkennung durch TLR auf der Oberfläche umgehen konnten (99). NOD2 kommt vorwiegend auf Monozyten/Makrophagen vor (162).

2.1.3 Danger hypothesis

Matzinger (137) postulierte einen weiteren Mechanismus zur Aktivierung des unspezifischen Immunsystems, die sogenannte *danger hypothesis*. Darin wird davon ausgegangen, dass das Immunsystem nicht ausschließlich zwischen Selbst und Nichtselbst unterscheidet, sondern auf bestimmte Substanzen reagiert, die bei einem nicht-physiologischen Zelltod, zum Beispiel durch Zellschädigung oder Stress und daraus folgender Nekrose, aus der sterbenden Zelle freigesetzt werden und als universelle Gefahrensignale vom unspezifischen Immunsystem erkannt werden. In Anlehnung an die Nomenklatur der PAMPs wurden sie als DAMP (*damage associated molecular pattern*) bezeichnet. Beispiele für solche Moleküle sind Harnsäure (196), doppelsträngige genomische DNA (88) oder HMGB1 (*high mobility box 1 protein*) (168). Ein Teil dieser endogenen Stresssignale wurde unter dem Begriff der „Alarmine“ zusammengefasst (164). Bianchi (17) definierte Eigenschaften von Alarminen:

(i) Ausschüttung direkt nach dem nicht programmierten Zelltod, aber nicht nach Zelltod durch Apoptose, (ii) mögliche Sekretion von Alarminen durch gesunde Immunzellen über spezielle Sekretionssysteme, (iii) Rekrutierung und Aktivierung von M ϕ oder DC zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort und (iv) die Wiederherstellung der Homöostase des durch die Verletzung oder die Entzündungsreaktion beschädigten Gewebes. Manche dieser Alarmine binden an TLR oder den IL-1-Rezeptor. Ein weiterer, in diesem Zusammenhang wichtiger Rezeptor ist RAGE (*receptor for advanced glycation end products*). Die Bindung dieser Rezeptoren führt immer zur Aktivierung von NF- κ B, was vermuten lässt, dass sowohl die Rezeptorbindung als auch die Signaltransduktion ähnliche Reaktionen auslösen, gleichgültig ob die Zellen von PAMP oder Alarminen stimuliert wurden. Möglicherweise ergeben sich sogar synergistische Effekte bei der Rezeptorbindung und/oder der Aktivierung transkriptioneller Prozesse (17).

2.2 Professionell antigen-präsentierende Zellen: Biologie und Funktion

2.2.1 Makrophagen (Mø)

Die charakteristische Eigenschaft von Mø ist ihre Vielfaltigkeit. Sie verändern ihren Phänotyp und ihr Repertoire von Signalmolekülen angepasst an ihre Umweltbedingungen (211). Diese Veränderungen äußern sich nicht in jedem Fall in einer Steigerung der Abwehrleistung, sondern können sowohl durch äußere Einflüsse als auch durch Reaktionen des unspezifischen und/oder spezifischen Immunsystems zu einer höheren Infektionsanfälligkeit oder einer geringeren antimikrobiellen Aktivität führen (151). Manche Erreger, wie zum Beispiel *Francisella tularensis* oder *Mycobacterium tuberculosis*, nutzen dies aus, um ihr Überleben in den Mø zu sichern (198, 225).

In früheren Publikationen wurden Mø lediglich in zwei funktionelle Gruppen unterteilt: die klassisch aktivierten Mø (M1) und die alternativ aktivierten Mø (M2) (64). In neueren Studien stellte sich die Gruppe der M2 Mø aber sehr heterogen dar. Mosser *et al.* benannten daher noch einen weiteren Typus, den sogenannten Typ II aktivierten Mø. Diese Art von Mø besitzt Charakteristika klassisch aktivierter Mø, induziert jedoch eine durch Th2-Zellen geprägte Immunantwort (150).

Klassisch aktivierte Mø sind typische Effektorzellen, die während einer durch Th1-Zellen geprägten Immunantwort angeregt durch IFN γ und TNF α , große Mengen an Stickstoffmonoxid (NO) und reaktiven Sauerstoffmetaboliten produzieren und damit hocheffektiv zur Eliminierung von Mikroben beitragen. Typischerweise bilden diese Mø die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ und TNF α . Von diesem Zelltyp stimulierte T-Zellen bilden große Mengen von IFN γ (8).

Nach Einwirkung von IL-4 entwickeln sich Mø zu den sogenannten alternativ aktivierten Mø (63). Typische Zytokine sind IL-10 und IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA). Dieser Zelltyp zeichnet sich durch eine fehlende NO-Produktion und daraus folgend durch eine reduzierte Fähigkeit intrazelluläre Mikroben zu töten, sowie eine Hochregulation von MHC II Molekülen, aus. Trotzdem zeigen alternativ aktivierte Mø eine reduzierte Antigenpräsentation und wirken eher hemmend auf die T-Zellproliferation, selbst wenn es sich um durch Mitogene aktivierte T-Zellen handelt (189). Untersuchungen von Gratchev *et al.* zeigten, dass alternativ aktivierte Mø extrazelluläre Matrixproteine (ECM), wie zum Beispiel Fibronectin, überexprimieren, die Verteilung von Fibroblasten und die Angiogenese beeinflussen und damit vermutlich eine große Rolle bei der postinflammatorischen Wundheilung spielen (66).

Der Phänotyp der Typ-II aktivierten Mø, neuerdings als regulatorische Mø bezeichnet (151), benötigt zur Aktivierung ähnlich wie die klassisch aktivierten Mø zwei Signale. Das erste

Signal ist die Bindung eines Liganden an einen Fc-Rezeptor, die zur Einstellung der Synthese von IL-12 führt (214). Zusätzlich ist ein stimulatorisches Signal nötig, wie zum Beispiel das Signal eines TLR oder die Bindung von CD40 oder CD44 (150). Diese Population von M ϕ sezerniert in Reaktion auf LPS kein IL-12, dafür jedoch größere Mengen an IL-10. Gleichzeitig produziert sie pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α (62). Typ II aktivierte M ϕ induzieren T-Zellen, die hohe Mengen an IL-4 produzieren (8). Die Tatsache, dass IL-10 sowohl die Aktivität als auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine negativ beeinflussen kann, macht regulatorische M ϕ zu potenten Inhibitoren einer Entzündung, obwohl sie weiter in der Lage sind, pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren (151).

2.2.2 Dendritische Zellen

DC zeigen, ähnlich wie M ϕ , eine große Heterogenität bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Funktionen. Ihre wichtigste Fähigkeit ist es, naiven T-Zellen Antigenen zu präsentieren und sie dadurch zu stimulieren. Sie sind daher essentiell für die Induktion einer adaptiven Immunantwort. Außerdem stimulieren sie hocheffektiv T-Gedächtniszellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von immunologischer Toleranz.

Es werden zwei Arten von DC unterschieden, myeloide (mDC) und plasmacytoide DC (pDC). mDC leiten sich von Monozyten aus dem Blut ab, pDC dagegen von lymphoiden Vorläuferzellen. Die generelle Funktion von DC ist in allen Haustierspezies gleich. Im Detail jedoch unterscheiden sich die DC verschiedener Spezies, wie etwa in ihrer Reaktion auf verschiedene Antigene oder in der Ausprägung verschiedener Subpopulationen (81), welche sich wiederum in der Ausstattung mit Oberflächenmarkern, in ihrer Gewebelokalisation, ihrer Zytokinsekretion und in ihren Funktionen unterscheiden.

2.3 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung

2.3.1 T-Zellaktivierung oder Anergie

Die Aktivierung von T-Zellen durch APC ist ein entscheidender Vorgang im Verlauf der Immunantwort. Naive T-Zellen können nur durch DC aktiviert werden (80). Am Ort der Entzündung ist es die Aufgabe der Mø, die aktivierten T-Zellen immer wieder zu restimulieren, um die Immunantwort aufrecht zu erhalten.

Mø präsentieren über das MHC II Molekül Antigene an T-Zellen. Trifft eine T-Zelle auf ein Antigen, kommt es über den T-Zellrezeptor (TCR) und den Korezeptor CD4 zur Bindung mit der APC.

Nach diesem Ereignis gibt es vier mögliche funktionelle Reaktionen: Keine Reaktion (Ignoranz), eine produktive T-Zellantwort, aktivierungsinduzierter Zelltod (periphere Deletion) oder Anergie, die Unempfindlichkeit für weitere Stimulation durch Antigen. Der Ausgang ist abhängig von der Affinität des TCR für den MHC-Peptid-Komplex. Jedoch sind weitere Faktoren, wie der Aktivierungszustand der T-Zelle (naiv, Gedächtniszelle oder anerge Zelle), Interaktion zwischen akzessorischen Molekülen auf T-Zellen und APC, sowie lösliche Faktoren (Zytokine oder Chemokine) und das umgebende Milieu (z.B. Peripherie oder Thymus) entscheidend (10).

Ist die Affinität zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplex groß genug, wird ein TCR-Signal ausgelöst. Dieses allein reicht nicht aus, um die T-Zelle zu aktivieren. Es ist ein zweites Signal durch kostimulatorische Moleküle nötig (192). Nach Ausbleiben dieses zweiten Signals verfällt die T-Zelle in Anergie (193, 232). In diesem Zustand ist keine Proliferation, Differenzierung oder Zytokinausschüttung möglich. Kündig *et al.* (108) konnten zeigen, dass im Falle einer anhaltend starken Stimulation, z.B. durch die Infektion mit einem hochvirulenten Erreger oder häufige Restimulierung mit dem Antigen, auch in Abwesenheit kostimulatorischer Moleküle eine T-Zellantwort ausgelöst werden kann.

Kostimulatorische Signale lösen keine Ja/Nein-Antwort aus, sondern steuern ein komplexes Netzwerk von Rezeptor-Liganden-Interaktionen, die Immunzellen und damit die Immunantwort qualitativ und quantitativ beeinflussen (20). Es gibt verschiedene kostimulatorische Signalwege. Zwei Familien von Domänen sind für diese Signalwege verantwortlich. Die Immunglobulinsuperfamilie (Ig), zu der die B7/CD28, CD2 und die T-Zell-Ig- und Muzin-(TIM) Domänen gehören, und die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)/Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (TNFR), mit CD40 und CD40-Ligand (CD40L). Der bisher am besten charakterisierte kostimulatorische Signalweg ist der der B7/CD28 Domäne. Einige der hier beteiligten Moleküle sind CD28 und zytotoxisches Lymphozyten-assoziiertes Antigen-4 (CTLA-4) auf T-Zellen und ihre Liganden B7.1 (CD80) (21) und B7.2 (CD86) (153) auf Mø

oder B-Zellen. B7-1 und B7-2 binden an CD28 und induzieren so CD40L. Dieser bindet an CD40, was wiederum zur Hochregulation von CD80 und CD86 führt.

Diese Signale führen zur Proliferation von naiven T-Zellen. Ohne ein drittes Signal durch spezifische inflammatorische Zytokine (35) können die T-Zellen keine optimalen Effektorfunktionen entwickeln, haben nur eine kurze Lebensdauer und sind nicht in der Lage, eine reaktionsfähige Gedächtniszellpopulation zu entwickeln (148, 167).

2.3.2 Molekulare Mechanismen der T-Zellaktivierung

2.3.2.1 Immunologische Synapse

Die Kommunikation zwischen T-Zelle und APC erfolgt häufig über die sogenannte „immunologische Synapse“. Dieser Begriff wurde bereits 1984 von Norcross (156) geprägt. Er vermutete Ähnlichkeiten im molekularen Ablauf zwischen den Vorgängen bei der Signalübertragung im Nervensystem und der Signalübertragung bei immunologischen Prozessen. Diese Theorie wurde später bestätigt (65, 149).

Inzwischen wurde die Formation dieser Struktur auch bei anderen immunologischen Vorgängen beschrieben, wie z.B. bei der Bindung zwischen NK-Zellen und ihren Zielzellen (165). Die immunologische Synapse besteht aus drei funktionell unterschiedlichen Anteilen, den supramolecular activation clusters (SMAC), dem zentralen Teil c-SMAC, dem peripheren Teil p-SMAC und dem distalen Anteil d-SMAC. Die wichtigsten Komponenten sind TCR/CD3-MHCp (MHC-Peptid-Komplex), CD4, CD28, CTLA-4, CD80/CD86 und Proteinkinase C. Im p-SMAC befinden sich strukturelevante Zytoskelett- und Adhäsionsmoleküle wie LFA1, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und CD2. Der distale Anteil, d-SMAC, ist angereichert mit Molekülen die lange extrazelluläre Domänen besitzen, wie zum Beispiel CD45. Der c-SMAC-Anteil ist für die Antigenerkennung und die nachfolgende T-Zellaktivierung und der p-SMAC-Anteil für die T-Zell-APC Konjugation und die Stabilisierung der immunologischen Synapse von Bedeutung (253). Brossard *et al.* beschrieben bei der Bindung zwischen DCs und T-Zellen noch eine multifokale Form der immunologischen Synapse, bei denen ein einzelner p-SMAC mehrere c-SMACS umschließt (23).

Bindet der TCR einer T-Zelle an einen passenden MHC-Peptid-Komplex auf einer APC, kommt es als unmittelbare Reaktion zu einem schwachen Kalzium-Influx. Die Stärke dieses Signals ist abhängig von der Art des gebundenen Peptids (248). Für kurz dauernde Effektorfunktionen ist dieses schwache Signal ausreichend. Für komplexe Reaktionen wie die T-Zellproliferation ist ein anhaltendes Signal nötig (106). Der dafür benötigte verlängerte Kontakt zwischen den Zellen wird durch die Bildung der immunologischen Synapse ermöglicht. Grakoui *et al.* (65) unterteilen die Bildung der immunologischen Synapse in drei

Abschnitte. Beim ersten Kontakt der T-Zelle mit der APC stellen Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1 eine enge Verbindung zwischen den beteiligten Zellen her, die das „Beprobieren“ des präsentierten Antigens ermöglicht. Findet eine Bindung statt, stoppen frühe Signale von TCR und CD4 die weitere Migration der T-Zelle (40). Wülfing *et al.* (249) postulierten, dass neben der Antigenbindung auch kostimulatorische Signale und endogene MHC-Liganden zur vollständigen Formation der immunologischen Synapse beitragen. Das Fehlen der kostimulatorischen Signale führt zwar nicht zur Verhinderung der Akkumulation von Rezeptoren an der Schnittstelle, aber zu einer Verringerung der Anzahl von TCR-MHCp-Komplexen.

Die TCR-MHC-Peptid-Komplexe werden in Mikrodomänen über einen vermutlich Aktin-Myosin vermittelten Transport (18, 83) ins Zentrum der entstehenden Synapse transportiert und stabilisieren sich dort. Das Zytoskelett der T-Zelle richtet sich neu aus und Korezeptoren und Integrine bilden konzentrische Ringe um den c-SMAC (106).

Die entscheidende Struktur bei der T-Zellaktivierung sind die TCR-Mikrodomänen. Sie initiieren und erhalten die Signalübertragung (29). Schon Stunden nach dem ersten Kontakt zwischen T-Zelle und APC formieren sich die ersten TCR-Mikrodomänen und ein Kalzium-Influx ist meßbar. Verschiedene aktivierte Kinasen können in der Nähe der Mikrodomänen lokalisiert werden. Die Phosphokinase Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) phosphoryliert das Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotiv (ITAM) des CD3 Moleküls. Daraufhin wird ZAP-70 (Zeta chain associated protein) rekrutiert und aktiviert. Es phosphoryliert seinerseits verschiedene Adaptermoleküle, die nach Phosphorylierung verschiedene Signalmoleküle rekrutieren und unterschiedliche Effektorfunktionen kontrollieren. Innerhalb von zwei Minuten wandern die Mikrodomänen aus der Peripherie ins Zentrum der Kontaktstelle. Währenddessen werden in der Peripherie weiter neue Mikrodomänen generiert. Nach fünf Minuten sind in den TCR-Mikrodomänen im zentralen c-SMAC kaum noch aktivierte Kinasen nachweisbar, in den peripheren Mikrodomänen sind sie jedoch im Überfluss vorhanden.

Kostimulatorische Signale werden ebenfalls über Mikrodomänen an der Schnittstelle vermittelt. Das wichtigste kostimulatorische Molekül auf T-Zellen ist CD28. Seine Liganden auf der APC sind CD80/86. Die Bildung von CD28-Mikrodomänen erfolgt nur, wenn eine Bindung zwischen CD28 und seinen Liganden CD80/86 stattgefunden hat. Eine hohe Dichte der Liganden auf der Oberfläche der APC führt zu einer erhöhten Anzahl an CD28 Microclustern auf seiten der T-Zelle. Dabei ist CD86 der Hauptligand für CD28 und beeinflusst seine Konzentration in der immunologischen Synapse (170). Es formieren sich TCR-CD28-Mikrodomänen, die in den c-SMAC transportiert werden. Dort rekrutiert CD28 die Proteinkinase PKC θ , die eine Bedeutung für die vollständige T-Zellaktivierung hat (252).

In früheren Publikationen wurde postuliert, dass der c-SMAC der Hauptort der Signalübertragung ist (65). Varma *et al.* (234) berichteten, dass sich im c-SMAC eine hohe Konzentration lysobisphatischer Säure (LBPS) nachweisen lässt. Ein Lipid, welches eine Rolle bei der Degradierung ubiquitiniertes Membranproteine spielt. Außerdem zeigten sie, dass Interaktionen von TCR und MHCp im c-SMAC bei gleichzeitiger Blockade der Entstehung neuer Mikrodomänen nicht ausreichen, um ein Kalzium-Signal aufrecht zu erhalten. Dies weist daraufhin, dass die Signalübertragung über stabilisierte TCR-Microcluster erfolgt und im c-SMAC terminiert wird. Cemerski *et al.* fanden Hinweise darauf, dass der c-SMAC vielfältige Funktionen hat und in Abhängigkeit von der Antigenqualität zur Signalübertragung oder zur Degradation der Signalmoleküle beiträgt (31).

Yokosuka *et al.* (252) zeigten, dass der c-SMAC zwei distinkte Regionen aufweist. Eine dem traditionellen c-SMAC entsprechende Region mit einer hohen Konzentration an CD3 (CD3hi) und eine weitere Region mit einer niedrigen Konzentration an CD3 (CD3dim) aber einer erhöhten Konzentration an CD28. Die CD3hi-Region liegt zentral, weist nur geringe Konzentrationen an aktivierten Kinasen auf und ist in der Membran unbeweglich, während die CD3dim-Region die CD3hi-Region ringförmig umschließt und mit CD28 und PKC θ angereichert ist. Die Größe des c-SMAC korreliert mit der Stärke des TCR-Signals. Ein starkes Signal könnte zu einer stärkeren Ausprägung der CD3-reichen Region führen, was zu einer Endozytose oder Degradation von TCR Komplexen führen würde. Dies hat möglicherweise Anergie oder Apoptose der T-Zelle zur Folge, während ein schwächeres Signal die Ausprägung der CD3-armen Region begünstigt. Diese wird von CD28 und PKC θ dominiert, was zu Zytokinproduktion und dem Überleben der T-Zelle führt. So wirkt möglicherweise die CD3dim/CD28hi Region als kostimulatorisches Signalosom bei der Aufrechterhaltung der T-Zellsignale, während die CD3hi-Region wie von Varma *et al.* vermutet (234) eine negativ regulatorische Funktion haben könnte (253).

2.3.2.2 B7/CD28 Familie

Der B7-1/B7-2-CD28-CTLA-4 Signalweg ist entscheidend für die T-Zellaktivierung und Toleranz. Die Anzahl an T-Zell-kostimulatorischen Molekülen und die vielfältige Natur der Immunantworten weisen darauf hin, dass es möglicherweise eine funktionelle Hierarchie von kostimulatorischen Molekülen in naiven, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen gibt (194). Der Aktivierungszustand der T-Zelle zum Zeitpunkt der Einwirkung oder des Fehlens eines kostimulatorischen Signals ist entscheidend dafür, ob und wie die Differenzierung, die Expansion oder die Effektorfunktionen (z.B. Zytokinausschüttung) der T-Zelle beeinflusst werden. Auch die Entwicklung und Funktion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-regulatorischen Zellen ist von diesen kostimulatorischen Signalen abhängig (20).

2.3.2.3 CD80/CD86 und CD28/CTLA-4

Die zuerst bekannten Moleküle dieses Signalwegs waren die Mitglieder der B7 Familie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf APCs und ihre Liganden CD28 und CTLA-4 (CD152) auf T-Zellen (13). CD28 hat eine stimulatorische Wirkung (123) auf die T-Zellproliferation, während CTLA-4 inhibitorische Funktionen ausübt (125). Sowohl CD80 als auch CD86 können CD28 und CTLA-4 binden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität (67, 124). Der Ausgang jeder Immunreaktion ist von der Balance zwischen einer CD28-induzierten T-Zellaktivierung und einer CTLA-4 induzierten Inhibition von T-Zellen abhängig. Die Interaktion der Moleküle untereinander und die daraus folgenden Regulationsmechanismen hängen von ihrer Verteilung in der Membran ab. Greene *et al.* berichten, dass eine hochaffine Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 nur stattzufinden scheint, wenn zwei CTLA4-Moleküle kovalent dimerisieren und die Liganden CD80/86 oligomerisiert vorliegen und so eine multivalente Bindung ermöglichen. Dieser Mechanismus kontrolliert die Ligandenbindung und könnte möglicherweise die Signaltransduktion über die Dauer der Rezeptorbindung regulieren (67).

Kristallstrukturanalysen der Bindung zwischen CTLA-4 und CD80/CD86 ergaben, dass CTLA-4 tatsächlich in bivalenten Homodimeren an dimerisiertes CD80/CD86 bindet. Die Bindungsstelle liegt distal am CTLA-4-Homodimer und bildet so mit CD80 und CD86 ein Gitter, in dem jedes CD80- oder CD86-Molekül zwei CTLA-4 Moleküle bindet. Dies ermöglicht die Formation stabiler Signalkomplexe im Rahmen der immunologischen Synapse, erhöht die lokale Konzentration von Liganden und Rezeptoren und verstärkt so möglicherweise die Signalübertragung (191, 208).

CD80 und CD86 werden auf verschiedenen APC wie DC, aktivierten Mø und B-Zellen exprimiert, zeigen jedoch eine unterschiedliche Kinetik. CD86 wird auf APC konstitutiv in niedrigen Konzentrationen ausgeprägt und nach Aktivierung schnell hochreguliert (55), während CD80 erst einige Zeit nach einer Aktivierung nachweisbar ist (75). Das frühere Auftreten von CD86 spricht dafür, dass CD86 der wichtigere Kostimulator für die Einleitung einer Immunantwort ist. CD80 scheint eine regulatorische Funktion im Verlauf der Immunantwort zu haben (3, 194). Versuche mit CD80- oder CD86-Knockout-Mäusen zeigten, dass die beiden Moleküle teilweise überlappende Funktionen haben, obwohl CD80 nicht immer in der Lage ist, die Abwesenheit von CD86 zu kompensieren (138). Auf T-Zellen wird CD28 konstitutiv exprimiert (70), während CTLA-4 erst nach einer Aktivierung schnell hochreguliert wird (122).

CD80 und CD86 liefern wichtige kostimulatorische Signale, um mittels Interaktion mit CD28 die T-Zellantwort zu verstärken und zu erhalten (117). CD28 verstärkt die Signale des TCR. Es senkt die Schwelle für die T-Zellaktivierung, indem es die Anzahl der TCR-Bindungen vermindert, die nötig sind, um eine T-Zellaktivierung auszulösen (237). Weiter wird vermutet,

dass es durch die Wiederverwendung von Phosphoinositolen den Spiegel von Inositoltriphosphat (IP₃) erhält. Dadurch erhält und verlängert es den für die T-Zellaktivierung nötigen durch die TCR-Bindung stimulierten Kalzium-Influx (256). Es stimuliert die Produktion von Zytokinen (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-5, IL-13) und steuert dadurch die Differenzierung in verschiedene Subpopulationen (16), die klonale Expansion von T-Zellen und nimmt über die PI3-Kinase auch Einfluss auf das Bcl-X_L-Motiv und damit auf das Überleben von T-Zellen (27).

Sein Gegenspieler CTLA-4 bildet einen negativen *feedback*-Mechanismus, reguliert die Immunantwort und verhindert überschießende Immunreaktionen, indem es die Produktion von IL-2 und die Expression des IL-2-Rezeptors inhibiert (25) und die T-Zelle in der G1 Phase des Zellzyklus arretiert (68). Diese Funktion ist auch von großer Bedeutung für die Verhinderung von autoimmunen Reaktionen. CTLA-4-defiziente Mäuse entwickeln nach der Geburt massive lymphozytäre Infiltrationen und Gewebszerstörungen in wichtigen Organen, die innerhalb von drei bis vier Wochen zum Tod der Tiere führen (32, 226). Rudd *et al.* (178) vermuten auch positive, von CTLA-4 vermittelte Signale, die Einfluss auf die Zelladhäsion und Motilität sowie auf das Überleben von Zellen haben. Diese Ergebnisse führten zum *reverse-stop signaling model*. Hier wird angenommen, dass CTLA-4 die Schwelle für die T-Zellaktivierung erhöhen könnte, indem es den Kontakt zwischen T-Zelle und APC limitiert und die Formation von Mikrodomänen blockiert. Weiterhin wird diskutiert, dass CTLA-4 die APC-Funktion beeinflussen könnte, indem es Signale zurück sendet und so die Produktion des immunsuppressiven Enzyms Indolamin-2,3,dioxygenase (IDO) stimuliert oder zur Herunterregulation von kostimulatorischen Molekülen auf APCs beiträgt.

2.4 Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der enteralen Mukosa und bei gastrointestinalen Infektionen

Der Verdauungstrakt hat zwei wichtige, aber konträre Aufgaben: Einerseits Nährstoffe aufzunehmen, andererseits als Barriere für pathogene Keime und die intestinale Flora zu dienen. Dabei muss das Immunsystem im Zusammenspiel mit dem Epithel dafür sorgen, dass pathogene Keime erkannt und bekämpft werden. Es darf aber nicht auf die ständig im Darm anwesende apathogene mikrobielle Flora reagieren. Um die Balance zwischen Toleranz gegenüber Kommensalen und Immunität gegenüber Pathogenen sowie zwischen der Aufnahme von Nährstoffen und der Abgrenzung gegenüber unerwünschten Eindringlingen zu halten, ist das intestinale Immunsystem eng reguliert und an diese extremen Bedingungen angepasst. Die Funktionen des angeborenen Immunsystems im Gastrointestinaltrakt sind neben der Erhaltung der Barrierefunktion, die Inhibition von Apoptose und Entzündung, die Beschleunigung der Wundheilung und Regeneration und die Bekämpfung von Pathogenen durch Autophagie oder andere antimikrobielle Verteidigungsmechanismen. Ebenso wichtig ist aber auch die Erhaltung der Toleranz gegenüber Kommensalen und die Kommunikation mit dem adaptiven Immunsystem (30).

2.4.1 Intestinales Immunsystem

Das intestinale Immunsystem ist grundsätzlich in einem Zustand der Hyporeaktivität. Die konstante Stimulation der intestinalen Oberfläche durch PRR der Kommensalen führt zu einer basalen Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, die mit Hilfe limitierter entzündlicher Reaktionen und beschleunigter Wiederherstellung und Heilung von Geweben die mukosale Homöostase erhalten (30). Dieser Zustand wird auch als „physiologische Entzündung“ bezeichnet (186).

M ϕ tragen zur Erhaltung der Homöostase im intestinalen Immunsystem bei, indem sie auf T-Zellen einwirken und die Balance zwischen Th1/Th2-, Th17- und regulatorischen T-Zellen beeinflussen (195). IL-10 defiziente Mäuse entwickeln eine schwere Kolitis als Reaktion auf den dann auftretenden pro-inflammatorischen Phänotyp der intestinalen M ϕ , die große Mengen IL-12 und IL-23 produzieren (94). Die Depletion von M ϕ in diesen Mäusen verhindert die Entwicklung einer Kolitis.

IL-23 begünstigt die Entwicklung und das Überleben eines spezifischen CD4⁺ T-Zell Phänotyps, der durch die Produktion von IL-17 charakterisiert ist. Diese Th17-Zellen reagieren auf IL-23 mit der Produktion von IL-17 und IL-22. IL-17 stimuliert M ϕ und Endothelzellen zur Produktion von pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen und führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen und hat so eine wichtige Funktion bei der

Entstehung akuter Entzündungen. IL-22 führt zur Induktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und zur erhöhten Expression von β -Defensinen in der Haut, im Respirations- und Verdauungstrakt und begünstigt die angeborene Immunantwort in diesen Geweben.

Als Beispiel für die Anpassung von M ϕ an ihre lokale Umgebung zeigten Kamada *et al.*, dass Kolon-M ϕ spezifisch pathogenfreier Mäuse nach der ersten Begegnung mit enterischen Mikroorganismen wie zu erwarten große Mengen an IL-10 produzieren. Zusätzlich zeigten sie eine langsam zunehmende Expression von IFN γ , das die Expression von IL-23 aber vermindert anstatt sie zu begünstigen. Murai *et al.* zeigten, dass von M ϕ produziertes IL-10 T-regulatorische Zellen beeinflusst, indem es die Foxp3-Expression erhöht. T-Zellen dieses Phänotyps unterdrücken die Aktivität von Th1- und Th17-Zellen in entzündeten Geweben. Diese Studien belegen, dass spezifische lokale regulatorische M ϕ essentiell für die Erhaltung der intestinalen Immunhomöostase sind.

2.4.2 Eigenschaften intestinaler M ϕ

Der Gastrointestinaltrakt beherbergt das größte Reservoir von M ϕ im Körper. Intestinale M ϕ stammen höchstwahrscheinlich von Blutmonozyten ab, die in die Schleimhaut einwandern. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, dass mononukleäre Phagozyten im Gegensatz zu Lymphozyten nicht proliferieren. Normale intestinale M ϕ zeigen im Gegensatz zu Blutmonozyten keine Expression von CD14. In der gesunden Schleimhaut werden sie durch physiologische, endogene chemoattraktive Substanzen, während einer Entzündung durch inflammatorische Zytokine und bakterielle Produkte angelockt. In der nicht entzündeten Schleimhaut werden neu eingewanderte, pro-inflammatorische Monozyten Faktoren der extrazellulären Matrix ausgesetzt, welche eine phänotypische und funktionelle Differenzierung in Richtung nicht-inflammatorischer M ϕ bewirken. Residente intestinale M ϕ zeigen daher eine stark verminderte Expression typischer Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr, wie zum Beispiel für LPS oder Immunglobuline (201). Aus diesem Grund sind unter physiologischen Bedingungen intestinale M ϕ , im Gegensatz zu anderen Gewebsmakrophagen oder Blutmonozyten, refraktär gegenüber der Induktion von pro-inflammatorischen Molekülen durch PAMP, Zytokine oder der Phagozytose nekrotischer Zellen (201).

Smith *et al.* (201) setzten Blutmonozyten verschiedenen konditionierten Medien aus. Der Kontakt mit durch intestinale Stromazellen konditioniertem Medium führte zu einer dosisabhängigen Herunterregulation von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und einer Verringerung der Produktion und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine durch lösliche Stimulantien oder Phagozytose, also zu einem Phänotyp, der dem des intestinalen M ϕ entspricht. Wurden die Zellen mit Medien in Kontakt gebracht, die durch intestinale

Epithelzellen oder *Lamina propria*-Monozyten konditioniert wurden, trat dieser Effekt nicht auf. Die Phagozytoseaktivität wurde aber auch in den dem durch Stromazellen konditionierten Medium ausgesetzten Zellen nicht negativ beeinflusst. Sie zeigten hohe Konzentrationen von MHC II-Molekülen und waren hocheffektiv bei der Elimination phagozytierter Mikroorganismen (201, 202, 204). Das Unvermögen residenter intestinaler Mø auf LPS mit der Produktion inflammatorischer Zytokine zu reagieren lässt sich durch die Zugabe von löslichem CD14 nicht beheben, was einen CD14 unabhängigen Mechanismus der Zytokinblockade impliziert (202)

Unter physiologischen Bedingungen wirken residente intestinale Mø hemmend und regulierend auf die mukosale Entzündungsreaktion. Im Falle einer Infektion und der häufig damit verbundenen Verletzung der Schleimhaut wandern, angezogen durch inflammatorische Signale, zirkulierende Blutmonozyten in die Schleimhaut ein. Über vorhandene Läsionen geraten sie in Kontakt mit den intestinalen Mikroorganismen und lösen eine Immunantwort aus. In Untersuchungen an humanen Patienten mit chronischer Darmentzündung (*inflammatory bowel disease* IBD), wurde ein hoher Anteil CD14⁺ Mø in der entzündeten Darmschleimhaut nachgewiesen, was die These der Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut weiter stützt. Mø aus dem Darm von *Morbus Crohn*-Patienten zeigten außerdem eine Expression von CD80 und eine gesteigerte Freisetzung von Sauerstoffradikalen (*respiratory burst*). Radioaktiv markierte CD14⁺ Mø, die aus dem Blut von Patienten mit *Morbus Crohn* gewonnen und wieder inokuliert wurden, konnten vorwiegend in entzündeten Darmabschnitten wiedergefunden werden (69).

2.5 Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Escherichia coli sind eine in sich sehr heterogene Spezies von Bakterien, deren nicht pathogene Vertreter einen Teil der normalen Mikroflora im Darmtrakt von Mensch und Tier darstellen. Einige Untergruppen (Pathovare) haben sich im Laufe der Zeit Merkmale angeeignet, die sie dazu befähigen, intestinale oder extraintestinale Krankheiten auszulösen. Eines dieser Pathovare stellen die STEC dar, deren namensgebende Eigenschaft die Produktion eines Zytotoxins ist, das dem von *Shigella dysenteriae* produzierten Toxin sehr ähnelt (158) und deswegen zunächst als Shiga-like-toxin und später als Shigatoxin bezeichnet wurde. Weitere Bezeichnungen sind Verozytotoxin oder Verotoxin (104).

Dieses Toxin ist vor allem bei Infektionen des Menschen ein bedeutender Virulenzfaktor. STEC, auch als enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) bezeichnet, können beim Menschen, besonders bei Kindern, schwerwiegende Erkrankungen, wie zum Beispiel das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) (95) oder die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) auslösen. Viele EHEC besitzen weitere Virulenzfaktoren, wie die Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*). Diese kodiert für Faktoren, die zu einer sehr engen Anheftung an die Darmschleimhaut und zur Entstehung von *attaching and effacing* (A/E) -Läsionen in der Darmschleimhaut führen.

In Rinderherden ist die Prävalenz für STEC weltweit hoch. In adulten Rindern verläuft die Infektion in den meisten Fällen völlig symptomlos. Trotzdem scheiden die Tiere den Erreger aus und können sich auch immer wieder reinfizieren. Daher wird vermutet, dass STEC bei Infektionen von Rindern eine immunmodulatorische Wirkung im Sinne einer Unterdrückung des Immunsystems ausüben (141). Stx ist bei diesem Geschehen möglicherweise ein Schlüsselfaktor, da es die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten hemmt und die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch Immunzellen und somit die Natur der folgenden Immunantwort beeinflusst (78).

2.5.1 Aufbau und Wirkung des Toxins

Shigatoxin (Stx) gehört wie das Cholera- oder das Pertussistoxin zur Gruppe der heteromeren Proteintoxine mit einem A1:B5-Aufbau (147). Die katalytische A-Untereinheit ist der aktive Teil des Toxins, während die aus fünf gleichartigen Elementen aufgebaute B-Untereinheit für die Bindung an die Zelle nötig ist. Die A-Untereinheit besitzt an ihrem C-terminalen Ende eine α -Helix, um die die Monomere der B-Untereinheit einen Ring bilden (52). Die A-Untereinheit besteht aus zwei Fragmenten A₁ und A₂, wobei nur das A₁-Fragment für die enzymatische Wirkung des Stx verantwortlich ist. Damit diese wirksam werden kann,

muß zunächst die Disulfidbrücke zwischen den beiden Fragmenten der A-Untereinheit gespalten werden (59). Das A₂-Fragment scheint eine Bedeutung für die Assoziation des Holotoxins zu besitzen und die Verbindung zwischen A- und B-Untereinheit zu stabilisieren (12).

2.5.2 Typen von Shigatoxinen

Die Familie der Shigatoxine besteht aus den zwei immunologisch nicht kreuzreagierenden Gruppen Stx1 und Stx2. Beide Toxinvarianten werden von lambdoiden Bakteriophagen kodiert (190, 213). Stx1, das von verschiedenen *E. coli* Stämmen gebildet wird, galt lange als strukturell hoch konserviert und unterscheidet sich häufig nur in einer Aminosäure vom Toxin von *Shigella dysenteriae*. Inzwischen sind verschiedene Stx1-Varianten beschrieben worden, sowohl beim Menschen (Stx1c) (257), als auch beim Rind (Stx1d) (26). Stx1d unterscheidet sich dabei strukturell deutlich von den anderen Varianten. Die Homologie zwischen Stx1d und dem Stx1 des Phagen 933J liegt nur bei 91 % (26). Möglicherweise existieren noch weitere Varianten, die mit den üblichen PCR-Methoden nicht detektiert werden können. Die Strukturhomologie zwischen den A- bzw. B-Untereinheiten von Stx1 und Stx2 liegen bei nur 55% bzw. 57% (155). Es existieren eine Reihe von Stx2-Varianten (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g) (22, 118, 133), die sich bezüglich ihrer biologischen Aktivität unterscheiden (22, 259). Humanpathogene STEC-Stämme (EHEC) können Stx1 und Stx2 gleichzeitig produzieren. Stx2-bildende Stämme werden mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung des HUS beim Menschen in Verbindung gebracht (222).

2.5.3 Shigatoxin-Rezeptor Gb₃ (CD77): Lokalisation, Struktur und Einfluss auf die Zytotoxizität

Der Rezeptor für Stx auf eukaryontischen Zellen ist das Glykosphingolipid Globotriaosylzeramid (Gb₃). Es wird auch als CD77 bezeichnet und auf humanen gerinalen B-Lymphozyten und Burkitt-Lymphom-Zellen exprimiert (135). Die B-Untereinheit des Toxins bindet an die terminale Galabiose des Trisaccharidanteils des Glykolipids (121). Die Variante Stx2e, die in der Pathogenese der Ödemkrankheit des Ferkels eine zentrale Rolle spielt, bindet vorwiegend an das Globotetraosylzeramid (Gb₄) (37) aber auch an Gb₃ (181).

Die rezeptorvermittelte Endozytose des Stx erfolgt über Clathrin-ummantelte Gruben. Auf HeLa- und Verozellen, die bei 0°C mit dem Toxin inkubiert wurden, liegt der Rezeptor gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt vor, während er bei 37°C bevorzugt in Gruben lokalisiert ist (182). Möglicherweise induziert Stx selbst mit Hilfe der Tyrosinkinase Syk die Formation Clathrin-ummantelter Gruben (228). Struktur- und Funktionsstudien zeigten, dass jedes Toxinmolekül 10 Gb₃-Bindungsstellen pro Pentamer aus B-Untereinheiten ausprägt,

was die hohe Bindungsaffinität des Toxins erklärt, die entscheidend für die Zytotoxizität ist (157).

Verschiedene Gb₃-exprimierende Zellen reagieren unterschiedlich empfindlich auf die Einwirkung von Stx. Dies liegt möglicherweise in der Art des Transportweges, der auf die Internalisierung folgt, begründet, welcher wiederum abhängig von der Rezeptordichte, der Lokalisation und der Struktur des Rezeptors zu sein scheint. Dabei ist die Länge der Fettsäurekette des Rezeptormoleküls von entscheidender Bedeutung. Kürzere Fettsäureketten (C16 und C18) führen zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zelle gegenüber dem Toxin. Je länger die Kette ist, desto unempfindlicher zeigen sich die Zellen (11). Zudem scheint die Zusammensetzung der Fettsäurekette einen Einfluß auf die Bindung des Toxins zu haben (98, 169). Auch die Verteilung des Rezeptors in der Zellmembran führt zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten. In einem Vergleich zwischen HeLa-Zellen und humanen Mø und DC zeigten Falguieres *et al.* (46), dass in HeLa-Zellen das Toxin nach der Bindung via retrogradem Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert wird, dies jedoch in humanen Mø und DC nicht der Fall ist. In den HeLa-Zellen ist der Rezeptor in spezialisierten Mikrodomänen, auch als *lipid rafts* bezeichnet (56, 235) lokalisiert, während er in humanen Mø und DC gleichmäßig in der Zellmembran verteilt erscheint.

Bindet das Toxin an den in einer Mikrodomäne lokalisierten Rezeptor, wird der Toxin-Rezeptor-Komplex retrograd zum ER und zur Kernhülle transportiert und dann in das Zytosol entlassen. In einer Trypsin-sensitiven Region am COOH-Ende wird die A-Untereinheit proteolytisch gespalten. Das A₁- und das A₂-Fragment bleiben zunächst durch eine Disulfidbrücke verbunden (185). Die Disulfidbrücke enthält eine Arg-X-X-Arg Sequenz, die ein Konsensus-Motiv für die Spaltung durch die membran-assoziierte Protease Furin enthält (59). Diese Spaltung ist essentiell für die maximale Zytotoxizität (111). Möglicherweise können auch andere Proteasen, wie z.B. Kalpain im Zytosol die Fragmente spalten, jedoch sind sie wesentlich weniger effektiv (159).

Das freigesetzte A₁-Fragment besitzt eine RNA-N-Glykosidase Aktivität (187) und inaktiviert die 28S-RNA der 60S-Ribosomen-Untereinheiten durch die Abspaltung eines Adeninrests (44). Dies verhindert die Elongationsfaktor-1-abhängige Bindung der Aminoacyl-t-RNA an die 60S-Untereinheit (24), hemmt die Peptidkettenverlängerung und somit die Proteinbiosynthese.

Falguieres *et al.* (46) zeigten für humane Mø und DC, in deren Membranen der Rezeptor diffus verteilt vorkommt, dass das Toxin nach der Bindung nicht retrograd ins ER und den Golgi-Apparat transportiert, sondern in lysosomale Kompartimente verbracht und dort degradiert wird. Daher sind die Zellen gegenüber der Wirkung des Stx inert. Gleiches gilt für bovine intestinale proliferierende Kryptenzellen. Auch sie exprimieren Gb₃ diffus verteilt in

der Membran und es erfolgt kein retrograder Transport in den Golgi-Apparat, sondern eine Degradation des Toxins (79). Die Zugabe von Butyrat führt bei verschiedenen Zellarten zur Verkürzung der Fettsäurekettenlänge im Gb₃-Molekül und so zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Toxinwirkung (130, 183, 184). Die Inkubation von humanen Endothelzellen (HUVEC) mit TNF α , die den Rezeptor nur in geringem Maße exprimieren, führte zu einer Erhöhung der Gb₃-Expression um das 10 – 100-fache, die bis zu 2 Tagen andauert, und damit zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Toxin. Dieser Effekt konnte jedoch durch die Zugabe des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid verhindert werden, was darauf schließen lässt, dass die Rezeptormoleküle nicht präformiert in der Zelle vorliegen, sondern unter TNF α Einfluss vermehrt *de novo* synthetisiert werden (229). Die Einwirkung von IL-1 β und LPS führte bei diesen Zellen zu einer Erhöhung der Anzahl der Bindungsstellen für das Toxin. Ähnliche Ergebnisse erzielten Stricklett *et al.* (212). Sie konnten nachweisen, dass unter Einwirkung von TNF α und/oder IL-1 auch humane Hirnendothelzellen (HBEC), die normalerweise gegen die Einwirkung von Stx resistent sind, eine Expression von Gb₃-Molekülen und damit eine Empfänglichkeit für die Zytotoxizität zeigen. Die Expression von Gb₃ ist dabei auf eine vermehrte Transkription und Aktivität von drei in die Synthese von Gb₃ involvierten Enzymen zurückzuführen.

2.5.4 Toxinbindung und TLR4

Fischer *et al.* (50) vermuten, dass Zeramide, strukturelle Bestandteile des Gb₃, ein Agonist für TLR 4 sind und so ein potentielles Signalmolekül zwischen TLR und Glykolipidrezeptoren sein könnten. Die B-Untereinheit des Stx löste bei ihrer Bindung an Gb₃ in humanen embryonalen Nierenzellen eine Freisetzung von Zeramiden und eine Kolo-kalisation von TLR4 und Gb₃ in der Membran aus. Die Autoren vermuten daher, dass Glykolipidrezeptoren als Korezeptoren für TLR 4 dienen, Zeramide ausschütten, wenn ein entsprechender Ligand gebunden wird, und so einen Mechanismus zur pathogenspezifischen Aktivierung von TLR 4 auf mukosalen Oberflächen darstellen. Die Hydrolyse von Gb₃ könnte weiterhin die Anzahl der Rezeptoren auf der Oberfläche verringern und damit auch die Adhäsion von Bakterien verhindern, denen Gb₃ als Rezeptor für Adhäsionsmoleküle dient. Zusätzlich könnte das freigesetzte Oligosaccharid als löslicher Inhibitor bakterieller Bindung fungieren (77). Die Reaktion von epithelialen und myeloiden Zellen auf die Bindung von Zeramiden unterscheidet sich jedoch. Während humane Embryonierenzellen und humane Nierenepithelzellen aktiviert wurden und pro-inflammatorische Zytokine produzierten, löste die Zeramidbindung in murinen, durch IFN γ aktivierte M ϕ die Apoptose der Zellen aus (109). Die apoptotische Reaktion war dabei teilweise von TLR 4 abhängig (221). Dieser Unterschied in

der Reaktion auf das TLR 4-Signal könnte dazu dienen, die massenhafte Apoptose von Epithelzellen, die die mukosalen Oberflächen bedecken, zu vermeiden (50).

Da Gb₃ und TLR 4 in vielen verschiedenen Zellarten koexprimiert werden und die Bindung der StxB-Untereinheit eine erhöhte TLR 4-Expression auf der Zelloberfläche zur Folge hat (50), untersuchten Torgersen *et al.* (227), ob TLR 4 eine Rolle bei der Bindung und dem Transport von Stx in der Zelle spielt. TLR 4 scheint die Bindung von Stx zu erleichtern, ohne die Menge an Gb₃ auf der Zelloberfläche zu beeinflussen. Die genauen Mechanismen sind noch ungeklärt.

Die Korrelation zwischen Rezeptordichte und Toxinsensitivität ist nicht linear (90). Die Beziehung zwischen Stx und Gb₃ ist komplex und die optimale Interaktion von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z.B. der Zusammensetzung der Fettsäurekette des Zeramidanteils (98). Möglicherweise beeinflussen TLR 4 oder TLR 4-assoziierte Moleküle diese Parameter, indem sie mit Stx/Gb₃-assoziierten Molekülen interagieren. Mehrere Studien beschreiben einen funktionellen Zusammenhang zwischen TLR 4 und Hsp70, welches pro-inflammatorische Kaskaden anstößt und somit APC aktiviert (28, 60).

Außerdem führt eine Depletion von TLR 4 in HUVEC zu einer stark verringerten Stx-Bindung an diese Zellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass TLR 4 ein bestimmender Faktor bei der Bindung an Endothelzellen ist und eine Rolle in der Pathophysiologie spielt.

Obwohl TLR 4 ein wichtiger Faktor im Rahmen der angeborenen Abwehr gram-negativer Bakterien ist, scheint seine Rolle nicht immer vorteilhaft für den Wirt zu sein. Neben den Ergebnissen der Studie von Torgersen *et al.* (227) zeigten auch andere Arbeitsgruppen, dass TLR 4 von Erregern wie uropathogenen *E. coli* und *Bordetella pertussis* ausgenutzt wird, um Schaden anzurichten (33, 96). Weiterhin wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass LPS sowohl den Krankheitsverlauf bei STEC-Infektionen im Tiermodell verschlimmert (199, 255), als auch die Expression von Gb₃ und die Zytotoxizität von Stx in Zellkulturen verstärkt (71, 97, 210).

2.5.5 MAP-Kinasen und ribotoxic stress response

Der Angriffspunkt des Stx in der Zelle sind die Ribosomen. Stx wird daher auch zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (RIP) gezählt. Diese Substanzen werden in zwei Gruppen eingeteilt. Klasse I RIP sind Toxine aus höheren Pflanzen wie Rizin und Sarzin. Es sind N-Glykosidasen, die Ribosomen inaktivieren, indem sie einen spezifischen Adeninrest von der rRNA-Sequenz abspalten. Klasse II RIPs, zu denen auch das Stx gehört, haben zusätzlich zu dieser N-Glykosidaseaktivität, die homolog zu der der Klasse I RIP ist, noch eine oder mehrere B-Untereinheiten, die die Bindung und das Eindringen in die Zelle erleichtern (43, 44, 161). Diese Moleküle lösen in translational aktiven Zellen eine *ribotoxic stress response* aus. Als ribotoxischer Stress wird eine Bindung oder Beschädigung der 28S

rRNA in den translational aktiven Ribosomen von Säugetieren bezeichnet. Dies führt zur Aktivierung von Mitogen aktivierten Protein (MAP)-Kinasen. Diese Aktivierung ist unabhängig davon, ob die Proteinbiosynthese inhibiert wird oder nicht (86).

In Säugetieren existieren drei verschiedene Familien von MAP-Kinasen: die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK), die p38 MAP-Kinasen und die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) (188). Letztere werden auch als Stress-aktivierte Phosphokinasen bezeichnet. Gerät die Zelle unter Stress, z.B. durch Umwelteinflüsse, RIP oder Zytokine (242), werden sie durch eine sequentielle Signalproteinkaskade aktiviert. Die richtige Abfolge der Kaskade wird durch eine partielle Substratspezifität für Gruppen von Proteinkinasen und spezifische Gerüstproteine, die mit den Kinasen Komplexe bilden, sichergestellt (188). Je nachdem welche Kaskade angestoßen wird, haben die MAP-Kinasen Einfluss auf die Entstehung von Entzündungen, auf die Zellproliferation oder die Apoptose (87). Welcher Signaltransduktionsweg letztendlich beschriftet wird, hängt vom Zelltyp und der Art der einwirkenden Stressoren ab (166).

Smith *et al.* (203) zeigten, dass die Inkubation der humanen intestinalen Epithelzelllinie HCT-8 mit Stx1 bereits nach einer Stunde zur Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38 führte. Die Zellen zeigten daraufhin eine gesteigerte IL-8 Produktion. Später führte die Stx1 Einwirkung zum Zelltod. Dies konnte durch die Zugabe des MAP-Kinasen-Inhibitors SB202190 verhindert werden. Die Einwirkung von Stx und die darauf folgende *ribotoxic stress response* stehen in direktem Zusammenhang mit der Induktion von Chemokinen bzw. der Auslösung der Apoptose. Für diese Effekte ist die enzymatische Aktivität des Stx1 nötig, da die Effekte nach der Zugabe einer nicht-toxischen Mutante nicht induziert wurden.

2.6 Wirkung des Stx auf Mø

In der Pathogenese der Stx-assoziierten Krankheiten scheinen Monozyten und Mø in verschiedenen Spezies eine entscheidende Rolle zu spielen, wobei nicht nur die Zytotoxizität des Toxins für die betreffenden Zellen, sondern auch die Beeinflussung verschiedener Zellfunktionen, Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nehmen.

Untersuchungen bezüglich Stx und Mø wurden sowohl an primären Monozyten und Mø, als auch an diversen Zelllinien verschiedener Spezies durchgeführt. Dabei zeigten sich zwischen primären Zellen und Zelllinien, aber auch zwischen verschiedenen Zelllinien deutliche Unterschiede bezüglich der Reaktionen auf das Toxin.

2.6.1 Einfluss von Stx auf humane Mø

Ramegowda und Tesh (177) untersuchten den Effekt von Stx auf humane periphere Blutmonozyten und zwei monozytäre Zelllinien (THP-1 und U-937). Um die monozytären Zelllinien in einen differenzierten makrophagenähnlichen Zustand zu bringen, wurden sie für 48 h mit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) inkubiert.

Alle Zellen wurden mit 10-fachen Verdünnungen von Stx1 oder Stx2e für 48 h inkubiert. Undifferenzierte THP-1 Zellen zeigten sich als sensibel gegenüber den Toxinen. Die Behandlung mit TPA führte sowohl zu einer erhöhten Plastikadhärenz und Phagozytoseaktivität als auch zu einem dramatischen Anstieg der Toxinresistenz. Primäre Blutmonozyten und U-937 Zellen blieben refraktär gegenüber der Toxinwirkung. U-937 Zellen zeigten keine differenzierungsabhängigen Veränderungen ihrer Toxinsensitivität.

Primäre Blutmonozyten und differenzierte THP-1-Zellen synthetisierten nach 18 h oder 24 h Inkubation mit den Toxinen dosisabhängig TNF α und IL1- β . Differenzierte U-937 Zellen zeigten nur bei der höchsten Toxindosis eine signifikante Produktion von TNF α . Die Behandlung von undifferenzierten THP-1 oder U-937 Zellen führte nicht zu einer Zytokinproduktion. Die Differenzierungs-assoziierte Resistenz gegenüber Stx spiegelte sich in einer reduzierten Gb₃-Rezeptor-Expression wider. Die Toxininternalisation war jedoch in differenzierten und undifferenzierten THP-1 Zellen vergleichbar. Für Endothelzellen wurde berichtet, dass die Vorbehandlung mit TNF α zu einer erhöhten Rezeptorexpression führt (160, 229). Dieser Effekt war in den hier untersuchten monozytären Zellen nicht nachzuweisen. Physiologisch relevantere Differenzierungsagenzien wie IFN γ , GM-CSF, VitD₃ oder Butyrat führten ebenfalls zu einer reduzierten Rezeptorexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Der Grad der Reduktion war dabei sehr unterschiedlich. Humane Monozyten, die sich zu Mø differenzieren, scheinen also mit zunehmender Differenzierung

resistenter gegen die Wirkung des Stx zu werden und gleichzeitig die Fähigkeit zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β zu erlangen.

Ähnliche Ergebnisse legten Jacewicz *et al.* (89) für die Wirkung von Stx auf humane intestinale Epithelzellen vor. Der Differenzierungsgrad dieser Zellarten könnte also für die Entwicklung des Krankheitsverlaufs entscheidend sein.

Van Setten *et al.* (233) berichten, dass humane nicht-adhärenente Monozyten Stx mittels eines Gb₃-Rezeptors binden, der sich von dem auf Endothelzellen unterscheidet. Die Bindung von Stx an diesen Rezeptor hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität und führte nicht zur Inhibition der Proteinsynthese, sondern zu einer zeit- und dosisabhängigen Produktion pro-inflammatorischer Moleküle wie IL-1 β , TNF α , IL-6 und IL-8. Die Einwirkung von LPS führte zu einer *de novo* Synthese des Rezeptors und einer erhöhten Expression auf der Zelloberfläche. Monozyten, die mittels zweier aufeinanderfolgender LPS-Stimulationen für dessen Wirkung desensibilisiert wurden, zeigten trotzdem eine Zytokinausschüttung als Reaktion auf Stx, was darauf hindeutet, dass die Wirkung von LPS unabhängig ist.

Harrison *et al.* (73) untersuchten die Wirkung von LPS und Stx1 auf THP-1 Zellen jeweils einzeln und bei gleichzeitiger Zugabe. Die Stimulation durch LPS führte zu einer schnellen Induktion von Transkripten pro-inflammatorischer Zytokine. Die Induktion durch Stx1 verlief langsamer und war weniger stark, hielt aber länger an. Wirkten beide Stimulantien gleichzeitig ein, kam es zu einer schnellen und verlängerten Produktion von Transkripten für pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (72). Die Präsenz beider bakterieller Produkte könnte die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine optimieren. Die Menge an TNF α -Protein im Zellkulturüberstand war nach gleichzeitiger Wirkung von LPS und Stx1 zehnmal so hoch, wie nach der alleinigen Einwirkung von Stx1 (179). Anders verhielt es sich bei verschiedenen Chemokinen. Hier schien Stx1 die Chemokinantwort auf LPS herunter zu regulieren (72). Im Fall von IL-1 β konnte nach der Einwirkung von Stx1 nur ein Bruchteil der nach der vorhandenen mRNA zu erwartenden Proteinmenge an IL-1 β nachgewiesen werden (73). Möglicherweise stört Stx translationale und die Freisetzung betreffende Prozesse von IL-1 β , die bei TNF α nicht relevant sind. Die gleichzeitige Einwirkung von Stx1 und LPS führte aber zu einer IL-1 β -Proteinmenge, die mit der nach der Einwirkung von LPS allein erreichten Menge vergleichbar war. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass der Transport des Toxins einige Zeit in Anspruch nimmt und die Zytokinproduktion als Reaktion auf LPS bereits stattgefunden hat, bevor Stx seine Wirkung entfalten kann. Cherla *et al.* (34) zeigten, dass Stx zur verlängerten Aktivierung von MAP-Kinasen und zur Aktivierung des eukaryotischen Initiations/Translations Faktors 4E (eIF4E) führt. Die gleichzeitige Zugabe von LPS und Stx resultierte in einer Verstärkung der Wirkung. Insgesamt ist zu beobachten, dass Stx einen Einfluss auf die Zytokin- und Chemokinproduktion auf der Ebene der

Transkription hat und die Stabilität von Transkripten, sowie die Aktivierung von Translationsinitiationsfaktoren beeinflusst.

Um eine globalere Aussage über die Wirkung von Stx auf die Genexpression von Mø treffen zu können, untersuchten Leyva-Illades *et al.* (120) Mø-ähnliche THP-1-Zellen mittels Microarrayanalyse. Dazu wurden die Zellen für 6 h mit Stx inkubiert. Sie fanden 36 Gene, die durch die Wirkung von Stx heraufreguliert wurden, 14 davon ausschließlich durch Stx und nicht durch andere ebenfalls in der Studie getestete Substanzen. Die Funktionen der betreffenden Gene lagen in unterschiedlichsten Bereichen, wie z.B. der Regulation der Transkription, Apoptose, Signalübertragung, Chromatinstruktur, Entzündung, Zellproliferation, Zellzyklus und Zelladhäsion. Die relevantesten hochregulierten Gene waren (i) early-growth response 1 (Egr-1), ein Transkriptionsfaktor, der die Zytokin- und Chemokingenexpression positiv reguliert, (ii) Cyclooxygenase 2 (COX-2), ein Enzym, das in die Produktion von inflammatorischen und vasoaktiven Eicosanoiden involviert ist und (iii) verschiedene *dual specificity* Phosphatasen (DUSP), die die Signalübertragung zwischen MAP-Kinasen unterbrechen und dadurch die inflammatorische Antwort herunterregulieren könnten.

2.6.2 Stx und Phagozytose

Shimada *et al.* (197) untersuchten den Einfluss von Stx auf Mø von Ratten. Dazu infizierten sie eine Kultur peritonealer Ratten-Mø mit einem EHEC-Stamm des Serotyps O157:H7. Wurde der gewonnene Zellüberstand Ratten peritoneal injiziert, zeigten sie deutliche gastrointestinale, neuronale und systemische Symptome. Kulturen von Rattenaortaendothelzellen (rAE) reagierten mit einer stark erhöhten Zellmortalität. Diese Wirkungen konnten mittels einer Vorinkubation des Zellüberstands mit Antikörpern gegen Stx1 und Stx2 auf ein Minimum reduziert werden. Die Vorbehandlung mit einer Mischung von Antikörpern gegen TNF α und IL-1 α/β führte zu einer geringfügig aber signifikant verringerten Toxizität. Ein Zellkulturüberstand von mit EHEC infizierten MDCK-Zellen, der als Kontrolle verwendet wurde, zeigte keine toxische Wirkung, weder *in vivo* noch *in vitro*. Die Konzentration an Stx im Zellkulturüberstand stieg innerhalb von 15 – 60 min nach der Infektion rapide an, obwohl die Zahl der Bakterien aufgrund der Phagozytose durch die Mø sank. Bakterien, die ohne Mø kultiviert wurden, zeigten ebenfalls eine Sekretion von Stx in das Medium, die Konzentration lag jedoch zehnfach niedriger.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass der Phagozytoseprozess der Mø in drei Schritten stattfand: (i) Aufnahme des Bakteriums und Phagosomenformation, (ii) Formation des Phagolysosoms und Tötung der Bakterien (iii) Sekretion nicht komplett verdauten Materials in das Zellkulturmedium. Eine immunelektronenmikroskopische Untersuchung mit Goldpartikeln zeigte, dass EHEC in Phagosomen und Phagolysosomen

noch für 15 min nach der Phagozytose Stx produzierten. Im Zytoplasma war kein Toxin nachweisbar und Mø überlebten für mindestens 24 h. Das nicht verdaute Material aus den Phagolysosomen, das von den Mø exozytotisch abgegeben wurde, enthielt signifikante Mengen an Stx1 und Stx2. Wurden Mø mit Cytochalasin präinkubiert, welches die Aktinpolymerisation inhibiert und so die Phagozytose blockiert, blieb der rapide Anstieg der Stx-Konzentration im Zellkulturmedium aus. Die Phagozytose führt also zur Elimination der aufgenommenen Bakterien, aber auch zu einer gesteigerten Toxinproduktion in den Mø und in der Folge zu einem Anstieg der Menge des Toxins im umgebenden Medium.

Poirier *et al.* (172) charakterisierten die Interaktionen zwischen humanen Mø und EHEC O157:H7 (EDL933). Sie untersuchten die Aufnahme- und Überlebensrate der Bakterien, die Zytotoxizität für die Mø und das Genexpressionsprofil der Bakterien während der Infektion in der humanen Makrophagenzelllinie THP-1. EHEC O157:H7 konnten in humanen Mø über 24 h überleben und sich in ihnen sogar vermehren, wobei die Gesamtzahl der lebenden Bakterien über die Zeit leicht abnahm. Es könnten zwei verschiedene Populationen von Bakterien existieren, eine, die in der Lage ist intrazellulär zu überleben, und eine, die abgetötet wird. Diese Hypothese einer doppelten Population wurde für andere Mikroorganismen, die Mø infizieren, wie z.B. *Salmonella*, *E. faecalis* oder *Listeria monocytogenes* postuliert (1, 36, 61). Die Mortalität der Mø lag nach 24 h bei 20%.

22% des Genoms der Bakterien wurde intrazellulär anders reguliert. Die Funktionen der herauf- oder herunterregulierten Gene waren sehr unterschiedlich. Heraufreguliert wurden beispielsweise Gene, die für Systeme zur Eisenaufnahme kodieren, aber auch Gene für die Nukleoidsynthese und DNA-Synthese und -Reparatur. Während der Infektion wurden auch Gene der SOS-Antwort heraufreguliert, welche zur Phageninduktion und zu vermehrter Toxinproduktion führt. Ebenfalls vermehrt aktiviert wurden Gene zur Säureresistenz.

Insgesamt belegt die Studie einen Zusammenhang zwischen dem Maß der Phagozytose von EHEC O157:H7 und der Anwesenheit von Stx. Stx-Mutanten, denen ein oder beide Toxingene fehlten, wurden in größerem Maße phagozytiert als der Wildtyp. Das Toxin hatte weiterhin einen Einfluss auf das Überleben der Bakterien in den Mø. Die Stx-Mutanten zeigten eine geringere Überlebensrate in den Mø als der Wildtyp. Dabei zeigten sich die Stx1- und die Stx1-/Stx2-Mutante als deutlich weniger toxisch als die Stx2 Mutante, deren Zytotoxizität etwa der des Wildtyps entsprach. Die Anwesenheit des Toxins trug demnach zum Überleben der Bakterien in den Mø bei. Stx1 scheint für humane Mø toxischer zu sein als Stx2.

Das verlängerte Überleben von EHEC in Mø könnte verschiedene Funktionen erfüllen. Zunächst könnten sie so die inflammatorische Antwort verstärken, die in der Folge zur Zerstörung der Integrität der Epithelzellbarriere führt und damit die Resorption des Toxins

verstärkt. Weiterhin könnte die Produktion von Stx in Mø und deren nachfolgende Freisetzung zu einem Anstieg der Konzentration des Toxins in der Umgebung führen.

2.6.3 Stx und Apoptose

Humane primäre Mø sind im Vergleich mit Epithel- und Endothelzellen relativ insensitive gegenüber der rezeptorvermittelten Wirkung von Stx, obwohl sie Gb₃ exprimieren (220). Dies hängt damit zusammen, dass der Rezeptor in humanen Mø und DCs nicht mit *lipid rafts* assoziiert ist, sondern gleichmäßig in der Membran verteilt vorliegt. Dies führt dazu, dass das Toxin nach der Bindung nicht retrograd ins ER und den Golgi-Apparat, sondern in lysosomale Kompartimente verbracht wird (46). Harrison *et al.* (71) untersuchten vergleichend die durch Stx1, LPS oder Stx1 und LPS induzierte Apoptose in der humanen Zelllinie THP-1. Dabei verglichen sie die Reaktionen von unbehandelten monozyten-ähnlichen Zellen und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) differenzierten Mø-ähnlichen Zellen. Undifferenzierte Monozyten waren refraktär gegenüber dem Zelltod durch LPS. Wurden sie jedoch mit Stx1 oder mit Stx1 und LPS behandelt, zeigte sich ein rapider Anstieg der Zellmortalität. Differenzierte Zellen zeigen dagegen ein anderes Muster. Sie sind weniger empfindlich gegen die Wirkung von Stx1 jedoch deutlich empfindlicher gegen die Behandlung mit LPS. Die Zugabe von beiden Stimulantien gleichzeitig führt in undifferenzierten und differenzierten Zellen zu einem starken Anstieg der Zellmortalität innerhalb von 12 h, die allerdings in den undifferenzierten Zellen noch ausgeprägter war. Der Nachweis, dass die Zellen tatsächlich der Apoptose zum Opfer fielen, wurde mittels PI/Annexin V-, TUNEL- und *DNA laddering*-Analyse erbracht. Die undifferenzierten Zellen erlagen der Apoptose nach Einwirkung von Stx1 oder Stx1 und LPS. LPS alleine war ein deutlich schlechterer Induktor. In differenzierten Zellen war der Grad der Apoptoseinduktion nach Einwirkung von Stx1 oder LPS deutlich erhöht, eine gemeinsame Wirkung führt zu einer deutlich erhöhten Anzahl der TUNEL-positiven Zellen. Einen ähnlichen Effekt zeigten Suzuki *et al.* (215) in der humanen Mø-Zelllinie U-937. Während weder LPS von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* noch Cycloheximid (ein Proteinsyntheseinhibitor) alleine Apoptose auslösten, kam es nach der gemeinsamen Zugabe beider Substanzen zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate. Die Apoptose konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen CD14 oder TLR 4 vermindert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass anti-apoptotische Signalwege, die normalerweise durch LPS induziert werden, in Anwesenheit eines Proteinsyntheseinhibitors beeinträchtigt werden könnten und es somit zum programmierten Zelltod kommt. Die Zugabe der B-Untereinheit des Stx allein führte nicht zur Apoptose.

Lee *et al.* (114) berichteten, dass Stx1 in undifferenzierten THP-1-Zellen die Apoptose unabhängig von der Anwesenheit von TNF α oder *death receptor* (TNFR oder Fas) aber

abhängig von Caspase-8 auslöst. Sie vermuten, dass die Apoptose keine generelle Reaktion auf die Proteinsyntheseinhibition ist, sondern dass die *ribotoxic stress response* in die Aktivierung von Caspase-8 involviert ist. In anderen Studien zeigten Lee *et al.*, dass Stx1 in differenzierten THP-1 Zellen gleichzeitig apoptotische und Überlebenssignale induziert (115). Die Differenzierung der Zellen ist entscheidend für den Verlauf der Stx-induzierten *endoplasmic stress response*.

2.7 Pathogenese der EHEC Infektion des Menschen

Für die Pathogenese der EHEC-Erkrankung des Menschen ist folgendes Modell beschrieben. Der Erreger wird meist zusammen mit kontaminierter Nahrung oder Wasser oral aufgenommen. Nach der Adhärenz der Bakterien an die Darmschleimhaut produzieren sie Toxin, welches auf transzellulärem und parazellulärem Weg die Epithelzellschranke passiert (2, 134, 171). In Epithelzellen induziert Stx die Produktion und Sekretion von IL-8 (223) und führt zu einer erhöhten Stabilität der IL-8 mRNA (224). In Mø induziert Stx die Produktion von GRO- β (72). IL-8 lockt Granulozyten an, die durch die Freisetzung mikrobizider Substanzen Läsionen in der Mukosa verursachen (100). Diese werden durch GRO- β weiter aktiviert. Zusätzlich sorgt der Stress durch Phagozytose und die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffmetaboliten für die Induktion der toxin-kodierenden Bakteriophagen und damit für eine gesteigerte Toxinproduktion (128, 238). Die Migration der Granulozyten erhöht die Permeabilität der Schleimhaut und gleichzeitig die Menge des Toxins, die in die darunterliegenden Gewebsschichten aufgenommen wird (82). Die in der *Lamina propria* ansässigen residenten Mø reagieren auf die Einwirkung des Stx mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF α , IL-1 β , IL-6 und verschiedenen CC und CXC Chemokinen. Gleichzeitig induziert Stx in den Mø apoptotische Signale (71, 120, 179). Durch die Zytokinwirkung kommt es zum einen zu einer Verschlimmerung der Schleimhautentzündung und zum anderen zu einer verstärkten Expression des Stx-Rezeptors auf den Endothelzellen der intestinalen Mikrogefäße und zu deren Schädigung (229). Diese Schädigung führt zur Thrombosierung kleiner und mittlerer Gefäße. In der Folge kommt es zur Infarzierung der Darmschleimhaut und blutiger Diarrhoe. Ist das Toxin in den Blutstrom gelangt, verursacht es Endothelzellschäden in den Nieren und im Gehirn. Fibrinablagerungen in den Mikrogefäßen verursachen mechanische Schäden an den Erythrozyten und lösen eine hämolytische Anämie aus. Die Thrombosierung vieler kleiner Gefäße hat häufig eine Thrombozytopenie zur Folge (159). Harrison *et al.* vermuten, dass die durch die Entzündung angelockten, neu aus dem Blut eingewanderten Monozyten schnell einer durch Stx und LPS ausgelösten Apoptose zum Opfer fallen, wodurch sie ihre Aufgaben wie Phagozytose und Antigenprozessierung und Präsentation in der Mukosa nicht

erfüllen können. In humanen Granulozyten dagegen verzögert das Toxin die Apoptose (126), die Permeabilität der Darmschleimhaut wird weiter verstärkt und die Toxinaufnahme steigt an. Die systemische Anwesenheit von Stx und LPS könnte die Zytokinausschüttung durch Mø und deren Zelltod durch Apoptose maximieren und zu einer weiteren Verschlimmerung der Erkrankung führen. Die Bedeutung von Stx als Virulenzfaktor für die Pathogenese menschlicher EHEC Erkrankungen beruht demnach nicht allein auf seiner zytotoxischen Wirkung, sondern auch auf seiner modulierenden Wirkung auf Immunzellen, besonders Monozyten und Mø, und deren pro-inflammatorische Reaktionen.

2.8 Arbeitshypothese

Mø sind ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Neben ihrer Aufgabe eindringende Mikroben zu entdecken und direkt zu bekämpfen, sind sie antigen-präsentierende Zellen, die mit Hilfe von MHC II-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und der Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen für die Restimulation und Beeinflussung aktivierter T-Zellen verantwortlich sind. Mø stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

Beim Menschen kann die Infektion mit STEC/EHEC zu Erkrankungen mit erheblichen Komplikationen, wie dem Hämolytisch-urämischem Syndrom mit blutigen Durchfällen, neurologischen Symptomen und Nierenversagen führen. In der Pathogenese dieser Krankheitssyndrome spielen Mø eine Rolle als Quelle pro-inflammatorischer Zytokine, die die Aufnahme und Produktion des Toxins verstärken.

In adulten Rindern verläuft die Infektion mit STEC in den meisten Fällen völlig symptomlos. Die Tiere bleiben aber häufig persistent infiziert und scheiden den Erreger intermittierend aus. Möglicherweise sind auch in Rindern Mø die Schlüsselzellen im Verlauf einer STEC-Infektion. Shigatoxine lösen jedoch, im Gegensatz zur Pathogenese bei Infektionen des Menschen, bei Infektionen von Rindern keine heftige inflammatorische Reaktion aus, sondern haben eine eher dämpfende Wirkung auf das enterale Immunsystem. Eine Wirkung von Stx auf bovine Mø und DC könnte die Kolonisation der Darmschleimhaut durch STEC begünstigen, ohne dass schwerwiegende Konsequenzen für die infizierten Tiere folgen.

Da Mukosamakrophagen in der Darmschleimhaut des Rindes als potentielle Zielzellen für Stx beschrieben wurden (206), war es das Ziel dieser Studie, primäre bovine Mø und DC zu kultivieren und zu charakterisieren. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob diese Zellen den Stx-Rezeptor tragen und wie sich gereinigtes Stx1 auf den Phänotyp und die Funktionen der Zellen auswirkt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere und Blutentnahme

Das verwendete Blut wurde von Milchkühen der Rasse Deutsch-Holstein des Versuchsgutes Oberer Hardthof in Gießen gewonnen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Probanden in Laktation, vorberichtlich klinisch unauffällig und zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Das Blut wurde nach Stauung der *Vena jugularis* mittels einer Staukette unter sterilen Bedingungen entnommen. Zur Punktion der Vene wurde eine sterile Einmalkanüle der Größe 14 Gauge (Terumo, Neolus; Art.-Nr. 603212) verwendet. Im Fall der Blutabnahme zur Gewinnung von Makrophagen (MØ) wurde die Kanüle mittels eines Adapters mit einem Silikonschlauch verbunden. Am anderen Ende des Schlauches befand sich eine Stahlkanüle. Diese wurde durch den Silikondeckel einer 500 ml Glasflasche, in die 100 ml Zitrat (3,8 %) als Antikoagulans vorgelegt worden waren, gestochen und das Blut unter ständigem Schwenken der Flasche aufgefangen. Um die Entlüftung der Flasche zu gewährleisten, wurde eine weitere Kanüle durch den Silikondeckel der Flasche gestochen. Die Blutabnahme zur Gewinnung von dendritischen Zellen (DC) erfolgte mittels 60 ml Spritzen (Fa. Becton Dickinson, Braunschweig), in die 4 ml Zitrat pro 16 ml Blut vorgelegt worden waren.

3.2 Primäre bovine Makrophagen (MØ)

3.2.1 Isolation der peripheren mononukleären Zellfraktion (PBMC): Methode A

Nach der Entnahme wurde das Blut innerhalb von höchstens 30 min in das Labor verbracht. Dort wurden unter einer Sicherheitswerkband jeweils 40 ml Blut in ein steriles 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Fa. Greiner Bio-One Frickenhausen, Art.-Nr.227261) überführt. Es folgte eine Zentrifugation (Kühlzentrifuge 4K15C, Rotor 11350, Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) mit 2380 x g für 20 min bei Raumtemperatur. Das Auslaufen geschah ohne Bremse, um zu verhindern, dass sich die verschiedenen Blutanteile wieder vermischten.

Im Anschluss wurde das Plasma abgenommen und der *Buffy coat* mittels einer Glaspipette gewonnen. Dabei sollte das entnommene Volumen ca. 2 bis 3 ml betragen und 5 ml nicht überschreiten. Das so aus zwei Röhrchen gewonnene Material wurde in einem neuen Röhrchen vereinigt und mit PBS/EDTA auf 45 ml aufgefüllt. Darauf folgte eine Zentrifugation mit 800 x g bei Raumtemperatur für 10 min ohne Bremse. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Röhrchen wieder bis 45 ml mit PBS/EDTA aufgefüllt. Insgesamt wurde dieser Waschschrift dreimal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschrift wurde wiederum vorsichtig der Überstand entfernt und das Pellet in 45 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubationszeit folgte eine weitere Zentrifugation mit 300 x g, bei 4 C° für 10 min. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 45 ml PBS/EDTA resuspendiert und wiederum zentrifugiert (300 x g; 4 C°; 10 min). Dieser Schritt, der der weiteren Entfernung von Thrombozyten diente, wurde dreimal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 25 ml PBS/EDTA resuspendiert und mittels einer Glaspipette auf 20 ml Ficoll Histopaque® (GE Healthcare, München Art.-Nr.17-1440-03) vorsichtig aufgeschichtet. Die Zentrifugation wurde bei Raumtemperatur mit 800 x g für 45 min ohne Bremse durchgeführt.

Während der Zentrifugation bildete sich eine Interphase, in der sich die PBMC angesammelt hatten. Diese Interphase wurde nun vorsichtig entnommen, möglichst ohne die Ficollphase zu berühren, in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit eiskalter PBS ohne Kalzium und Magnesium aufgefüllt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 600 x g; bei 4 C° für 8 min mit Bremsstufe 9. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, diesmal jedoch mit 300 x g bei 4 C° für 10 min und Bremsstufe 9.

Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert, 20 µl Zellsuspension für die Zellzählung entnommen und mit 180 µl Trypanblau vermischt. Dann wurde das Röhrchen wiederum bis 45 ml mit PBS aufgefüllt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Währenddessen erfolgte die Zellzählung in einer Zählkammer nach Neubauer.

3.2.2 Generierung einer Mø-Kultur aus PBMC

Direkt nach der Isolation wurden die gewonnenen PBMC in Mø-Medium I resuspendiert. Als Basismedium (Mø-Medium) wurde IMDM ohne Phenolrot (Fa. Invitrogen, Karlsruhe Art.-Nr. 21056-023) verwendet, dem 20 % FKS (Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe Art.-Nr.A15-245), 1 % Penicillin/Streptomycin (Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe Art.-Nr.A11-010) und 1 % Amphotericin B (Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe Art.-Nr.A11-001) sowie Mercaptoethanol (100 mM) (Fa. Fluka über Sigma-Aldrich Chemie GmbH München (Art.-Nr. 63689) zugesetzt wurden. Mithilfe einer Spritze wurden jeweils 25 ml der Zellsuspension mit einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml in Teflonbeutel („VueLife Bags“, Fa. AFC, Gaithersburg) gefüllt. Die Spritze wurde dabei über einen Luer-lock-Anschluss auf die Teflonbeutel aufgeschraubt. Danach wurden die Beutel verschlossen, einmal mit 75-%igem Ethanol (Fa. Merck KGaA Darmstadt Art.-Nr. 1.00983) eingesprüht und abgewischt und im Brutschrank inkubiert. Bei 37 C° und 5 % CO₂ verblieben sie dort für 8 Tage.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Beutel aus dem Brutschrank entnommen und für 20 min in den Kühlschrank verbracht, um die Zellen von der Beutelwand zu lösen. Danach wurden die Beutel vorsichtig beklopft und mit einer Spritze die Zellsuspension in ein 50 ml

Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden die Beutel noch einmal mit eiskalter PBS gespült und auch diese in das Röhrchen gegeben.

Die Zellen wurden dann zwei Waschschritten in PBS bei 300 x g und Raumtemperatur für 10 min mit Bremsstufe 9 unterzogen, gezählt und in Mø-Medium II entsprechend der Zellzahl resuspendiert.

Abschließend wurden ca. 2×10^6 Zellen in 5 ml Mø-Medium II (2 % FKS) in sterilen 60 mm² Plastikpetrischalen (Fa. Greiner Bio-One Frickenhausen Art.-Nr. 628102) ausgesät und im Brutschrank über Nacht (18 h) inkubiert. Für die Immunfluoreszenz wurden Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen (Fa. Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden Art.-Nr. 144530) verwendet, in die vorher runde Glasdeckgläschen (12 mm; Fa. K.Hecht, Sondheim Art.-Nr. 1001/12) eingelegt worden waren. Für den Phagozytostest wurden Mikrotiterplatten mit 48 Vertiefungen verwendet (Fa. Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden Art.-Nr. 150787). Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und verworfen. Dabei wurde ein großer Teil der Lymphozyten entfernt, während die Mø auf dem Gefäßboden adhärirt hatten. Im Weiteren wurden die Gefäße jeweils dreimal mit Medium gespült, um noch verbliebene Lymphozyten zu entfernen.

Für die Vorversuche in der DFZM wurden die Zellen direkt nach dem Spülen geerntet. Für die Versuche mit Stx1 wurden die Mø vor der Ablösung zunächst in frischem Mø-Medium für 4 h bzw. 24 h mit dem jeweiligen Agens inkubiert.

3.2.3 Inkubation boviner Mø mit Stx1

Mø, die nach Entnahme aus dem Teflonbeutel 18 h lang auf Plastikpetrischalen adhärirt hatten, wurden für 4 h bzw. 24 h Stunden mit LPS (100 ng/ml Medium) (Fa. Sigma-Aldrich, München (Art.-Nr. L-4130), Stx1 (200 verozytotoxische Dosis 50 % [CD₅₀] pro ml Medium) (H.Karch, Münster), Stx1 plus neutralisierendem Antikörper 13C4 (anti StxB1; 1,5 µg/ml Medium) (eigener Zellkulturüberstand) oder nur mit dem Zellkulturmedium bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Quantifizierung des Stx1 erfolgte wie bei Stamm (207) beschrieben. Stx1 und neutralisierender Antikörper wurden vor Verwendung für eine Stunde bei Raumtemperatur präinkubiert. Die Agentien wurden in Reaktionsgefäßen vorverdünnt und dann dem Medium zugesetzt.

3.2.4 Ernte der Mø

Je nachdem, ob die Mø in der DFZM oder zur RNA-Gewinnung eingesetzt werden sollten, kamen unterschiedliche Methoden der Ablösung zum Einsatz:

Für die DFZM-Analyse wurden die Überstände in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und die Petrischalen einmal mit HEPES (RT) gespült, es folgte die Zugabe von 3 ml

Accutase® (PAA Laboratories, Cölbe, Art.-Nr. L11-007) und eine Inkubation im Brutschrank (20 min, 37 °C, 5% CO₂). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schalen beklopft und das Medium mehrmals resuspendiert, um die Ablösung der Zellen zu unterstützen. Dann wurden die jeweiligen Ansätze in ein Röhrchen gepoolt, abzentrifugiert (200 x g 7 min, 20 °C), in PBS resuspendiert und für die Durchführung der Immundekoration eingesetzt.

Bei der Gewinnung der Zellen für die Untersuchung der mRNA wurden zunächst die Überstände abgesaugt und zentrifugiert (10 min, 8000 rpm) (Mikro 20 mit Rotor 2073, Fa. Hettich Zentrifugen, über MAGV Rabenau-Londorf), je 1 ml in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf AG, Hamburg Art.-Nr. 0030120.086) überführt, bei -70° C asserviert und später im ELISA auf ihren IL-10-Gehalt hin untersucht.

Zur Gewinnung der RNA aus den adhärenenten Zellen wurden diese mit eiskalter PBS versetzt und mittels eines Zellschabers (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Art.-Nr. 83.1832) vorsichtig abgelöst. Anschließend wurden die Schalen noch einmal mit kalter PBS ausgespült. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gepoolt und einer Zentrifugation bei 300 x g und 4° C für 8 min unterzogen. Der Überstand wurde komplett entfernt, das Zellpellet in 600 µl RLT Puffer (Fa. Quiagen, Hilden, Art.-Nr. 79216) Puffer mit 2,5 % β-Mercaptoethanol resuspendiert und die Zellsuspension bei -70 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.3 Primäre bovine dendritische Zellen (DC)

3.3.1 Isolation der peripheren mononukleären Zellfraktion (PBMC): Methode B

Zur Gewinnung von DC wurde ein anderes Isolationsprotokoll für PBMC verwendet als oben beschrieben. Dabei wurden 20 ml des gewonnen Blutes mit 17 ml PBS/EDTA vermischt und dann auf 12 ml Ficoll Histopaque[®] aufgeschichtet. Die nachfolgende Zentrifugation wurde bei 800 x g, 20° C für 45 min ohne Bremse durchgeführt. Nach dem Auslaufen wurde die entstandene Interphase abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Dieses wurde auf 45 ml mit PBS/EDTA aufgefüllt und die Zellsuspension gut gemischt. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 250 x g und 20° C für 8 min. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 10 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml PBS/EDTA folgte eine weitere Zentrifugation. Die Pellets wurden noch einmal in PBS/EDTA resuspendiert und bei 200 x g und 20° C für 7 min abzentrifugiert, dann in PBS ohne EDTA resuspendiert und wiederum bei 200 x g und 20° C für 7 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun nochmals in PBS resuspendiert. Es folgte die Zellzählung.

3.3.2 Generierung einer DC-Kultur aus PBMC

Nach einer erneuten Zentrifugation bei 300 x g und RT für 10 min wurde das Zellpellet in 80 µl MACS Puffer (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach 130-091-221) pro 1×10^7 PBMC resuspendiert und 10 µl anti-CD14 Beads (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Art.-Nr. 130-050-201) pro 1×10^7 Zellen zugegeben. Diese wurden dann bei 4 - 8° C für 15 min inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen mit 1 - 2 ml MACS Puffer gewaschen und bei 300 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abpipettiert und bis zu 2×10^8 Zellen in 500 µl MACS Puffer resuspendiert.

Nun folgte die magnetische Separation. Die MS-Säule wurde im Magnetfeld des Vario MACS (Fa. Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Art.-Nr. 130-090-282) platziert und mit 500 µl MACS Puffer gespült. Nachfolgend wurde die Zellsuspension auf die Säule (LS-Column (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Art.-Nr. 130-042-901) verbracht. Nachdem die Zellsuspension hindurchgetropft war, wurde die Säule noch dreimal mit 500 µl MACS Puffer nachgespült, aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein frisches Sammelröhrchen aufgesteckt. Nun wurde 1 ml MACS Puffer auf die Säule pipettiert und mit dem beigelegten Stopfen durch die Säule gedrückt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in einer Konzentration von 1×10^6 CD14⁺ Zellen/ml DC-Medium mit IL-4

und GM-CSF (jeweils ca. 100ng/ml) (D. Werling, Royal Veterinary College, London) in eine Petrischale mit 35 mm² oder in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät.

Nach der Aussaat in die Platte wurden die Zellen für insgesamt 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach den ersten drei Tagen wurde die Platte aus dem Brutschrank entnommen und 15 min unter der Sterilbank stehen gelassen, um die durch die Manipulation aufgeschwemmten Zellen wieder sedimentieren zu lassen. Dann wurden 350 µl / ml altes DC-Medium vorsichtig entnommen und 700 µl / ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes DC-Medium hinzugefügt.

3.3.3 Inkubation boviner DC mit Stx1

Die Inkubation erfolgte wie unter 3.2.3. beschrieben für 4 h. Auf einen Ansatz mit LPS wurde hier verzichtet.

3.3.4 Ernte der DC

Zum Einsatz in der DFZM wurden die Zellsuspensionen der jeweiligen Ansätze kräftig resuspendiert, um eventuell noch am Boden anheftende Zellen abzulösen, und dann aus der Platte entnommen.

3.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung der Mø mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Zeiss Axio 1 Observer (Fa. Carl Zeiss, Jena) wurden die gleichen Antikörper verwendet wie bei der DFZM Analyse (Tab. 1). Die Zellen wurden auf den Glasplättchen, auf denen sie ausgesät worden waren, mit Antikörpern bzw. Farbstoffen inkubiert und fixiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer möglichst bei Lichtausschluss durchgeführt.

3.4.1 Präparatevorbereitung zur Immunfluoreszenzfärbung

Folgende Arbeitsschritte kamen zur Anwendung:

1. Verwerfen des Mediums
2. Kurz waschen in 200 µl PBS (Zellen nicht länger im Puffer stehen lassen)
3. Fixierung der Zellen für 10 min mit 200 µl 2 % Paraformaldehyd (PFA) (Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr. 104005) in PBS
4. Permeabilisierung falls nötig mit 200 µl 0,005 % Digitonin (Fa. Fluka über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Art.-Nr. D1407) in PBS
5. Dreimal 5 min waschen in 200 µl PBS
6. Blockierung mit 200 µl 10 % Ziegen Serum in PBS + 1 % BSA
7. Inkubation 1. Antikörper in 200 µl PBS bei 4 °C über Nacht
8. Dreimal 5 min waschen in 200 µl PBS
9. Inkubation 2. Antikörper in 200 µl PBS 60 min bei RT in feuchter Kammer
10. Zweimal 5 min waschen in 200 µl PBS
11. Kernfärbung mit DAPI (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Art.Nr. D1306) 0,02 % in 200 µl PBS 5 min bei RT in feuchter Kammer
12. Dreimal 5 min mit 200 µl PBS waschen
13. Eindeckeln mit 10 µl VECTASHIELD® (Fa. Vector Laboratories, Peterborough, Art.Nr. H-1200) auf Objektträger
14. Untersuchung der Proben im Fluoreszenzmikroskop

3.5 Durchflußzytometrie (DFZM)

3.5.1 Probenvorbereitung

Antikörper, die für die durchflußzytometrische Analyse und/oder die Immunfluoreszenz verwendet wurden, sind in Tab. 1 aufgelistet.

3.5.1.1 Untersuchung der Zytoskelettausstattung

Die Untersuchung der Zytoskelettausstattung fand über den Nachweis charakteristischer intermediärer Proteinfilamente der Zellen statt. Zellen mesenchymaler Herkunft konnten mit einem gegen Vimentin gerichteten Antikörper detektiert werden, welcher mit einem PE (R-Phycoerythrin)-gekoppelten Sekundäntikörper sichtbar gemacht wurde. Als Kontrolle wurde versucht, Zytokeratin als Marker für Zellen epithelialer Herkunft direkt mit einem FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat)-gekoppelten Antikörper nachzuweisen. Da diese Filamente intrazellulär gelegen sind, mussten die Zellen vor der Färbung fixiert und permeabilisiert werden.

1. Einsetzen von ca. 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte (V-Form; Fa. Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden, Art.-Nr. 249662)
2. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
3. FIXATION: Aufnehmen der Zellpellets in 100 µl 2 % PFA (50 µl PBS + 50 µl Fixierungsreagenz mit 4 % PFA in PBS) pro Vertiefung
4. Inkubation für 30 min bei RT in Dunkelheit
5. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
6. Waschschriff mit 100 µl PBS pro Vertiefung
7. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
8. PERMEABILISIERUNG: Resuspension der Zellpellets in 100 µl Digitoninlösung (0,005 % in PBS) pro Vertiefung
9. Inkubation für 10 min bei RT in Dunkelheit
10. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
11. Zweimaliger Waschschriff mit 100 µl PBS pro Vertiefung danach jeweils
12. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes

13. FÄRBESCHRITT: Resuspension der Zellpellets in 50 µl Gebrauchslösung des jeweiligen Antikörpers pro Vertiefung
14. Inkubation für 20 min in Dunkelheit
15. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
16. Waschschrift mit 100 µl PBS pro Vertiefung
17. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
18. Inkubation mit 50 µl Gebrauchslösung des Sekundärantikörpers pro Vertiefung
19. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
20. Aufnahme der Zellpellets in 50 µl PBS pro Vertiefung und Überführung in Teströhrchen mit 150 µl bis 200 µl PBS (angepaßt an die jeweilige Zellzahl)

Alle Präparationsschritte außer der Fixation und der Permeabilisierung wurden auf Eis durchgeführt.

3.5.1.2 Charakterisierung der Oberflächenantigene

Diese Versuche wurden mit nativen Zellen durchgeführt.

1. Einsetzen von ca. 1×10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen und V-Boden
2. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
3. Inkubation mit dem Primärantikörper (20 min auf Eis im Dunkeln)
4. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
5. Waschschrift mit 100 µl Waschlösung (PBS/BSA 1 % + NaN_3 + Ziegen Serum) pro Vertiefung
6. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
7. Zweite Inkubation mit dem fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper (20 min auf Eis im Dunkeln)
8. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
9. Waschschrift mit 100 µl Waschlösung (PBS/BSA 1 % + NaN_3 + Ziegen Serum) pro Vertiefung

10. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4° C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
11. Aufnahme der Zellpellets in je 50 µl PBS und Überführung in Teströhrchen mit 150 µl bis 200 µl PBS (angepaßt an die jeweilige Zellzahl)

3.5.1.3 Kompetitionsstudie CD77 und rStxB1

Zum Vergleich der Bindungsaffinität des Antikörpers CD77 und der rekombinant hergestellten B-Untereinheit des Stx1 wurde eine Kompetitionsstudie durchgeführt. Alle Versuchsschritte erfolgten auf Eis.

1. Ablösen der Zellen und Überführen in Mikrotiterplatte mit V-Boden.
2. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes.
3. Inkubation mit 50 µl PBS bzw. rStxB1 (1:30) (oder CD77; 1:10) pro Vertiefung 30 min bei 4° C im Dunkeln.
4. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes.
5. Waschschrift mit 100 µl PBS pro Vertiefung.
6. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes.
7. Inkubation mit 50 µl PBS bzw. CD77 (1:10) (oder rStxB1 (1:30)) pro Vertiefung 30 min bei 4 °C im Dunkeln.
8. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
9. Waschschrift mit 100 µl PBS pro Vertiefung
10. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
11. Inkubation mit 50 µl PBS bzw. 13C4 anti StxB1 AK (1:3,3) pro Vertiefung 30 min 4 °C im Dunkeln
12. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
13. Waschschrift mit 100 µl PBS pro Vertiefung
14. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
15. Inkubation mit 50 µl PBS bzw. Sekundärantikörper IgM FITC (1:100) bzw. IgG1 PE (1:300) pro Vertiefung 20 min, 4 °C im Dunkeln
16. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes

17. Waschschrift mit 100 µl PBS pro Vertiefung
18. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
19. Waschschrift mit 100 µl PBS pro Vertiefung
20. Zentrifugation der Mikrotiterplatte (400 x g; 4 min; 4 °C vorgekühlt), Ausschlagen des Überstandes
21. Aufnahmen des Zellpellets in 50 µl PBS und Überführen in Teströhrchen mit 200 µl PBS

3.5.1.4 Phagozytoseaktivitätstest

Zur Untersuchung des Einflusses des Toxins auf die Phagozytoseaktivität wurde das Testkit PHAGOTEST® (Fa. ORPEGEN, Heidelberg) verwendet und das Protokoll modifiziert.

Nach der Entnahme aus dem Teflonbeutel, wurden die Mø in einer Konzentration von 2×10^5 pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte mit 48 Vertiefungen und Flachboden ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen mit vorgewärmtem Medium gewaschen, um möglichst viele Lymphozyten zu entfernen. Die Hälfte der Zellen wurde nun für 30 min mit Stx1 bzw. Stx1 und neutralisierendem Antikörper im Brutschrank vorinkubiert, die andere Hälfte der Zellen blieb zunächst unbehandelt. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit einer Bakteriensuspension von opsonierten FITC-markierten *E. coli* für 120 min. Bei der anderen Hälfte der Zellen erfolgte die Zugabe von Stx1 bzw. St1+Ak und den opsonisierten Bakterien zeitgleich.

1. Zugabe von 90 µl homologem Plasma und 10 µl einer Suspension FITC-markierter *E. coli* pro Vertiefung.
2. Inkubation für 120 min bei 37 °C bzw. 0 °C (Kontrolle).
3. Entnahme des Überstands und Zugabe von 50 µl *Quenching solution* und 150 µl Waschlösung. Gründlich mischen.
4. Entnahme des Überstands und Zugabe von 200 µl Waschlösung.
5. Entnahme des Überstandes.
6. Inkubation mit Accutase® 20 min 37 °C.
7. Ablösen der Zellen durch kräftiges Pipettieren und Überführen in eine Mikrotiterplatte mit V-Boden mit 96 Vertiefungen.
8. Zentrifugation der Mikrotiterplatte 4 min; 400 x g; 4 °C und Ausschlagen des Überstandes.
9. Waschen der Zellen mit PBS/EDTA, 5 min Inkubation.
10. Zentrifugation der Mikrotiterplatte 4 min; 400 x g; 4 °C und Ausschlagen des Überstands.
11. Resuspension in 50 µl PBS.

12. Überführen in Teströhrchen in die 150 µl PBS vorgelegt worden waren.

3.5.2 Probenmessung und -analyse

Zur Probenanalyse wurde ein BD FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) eingesetzt. Dieses Durchflusszytometer ist mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser und mit einem 635 nm „Red Diode“ Laser ausgestattet. Die anhand von Vorversuchen eingestellten Geräteparameter wurden in Form von Standardprotokollen gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Nach der Probenanalyse mit dem gerätespezifischen Programm „Cell Quest Pro“ (Fa. Becton-Dickinson) erfolgte die Aufarbeitung und Auswertung der Daten mit Hilfe des Programmes FCS Express (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Ontario, Kanada). Die Differenzierung der unterschiedlichen analysierten Zellarten gelang über die Parameter Größe (Vorwärtsstreulicht oder „forward scatter“ (FSC)), Granularität (Seitwärtsstreulicht oder „sideward scatter“ (SSC)) und/oder Fluoreszenzeigenschaften (spezielle Kanäle). Zellpopulationen mit gleichen Eigenschaften konnten innerhalb elektronischer Auswertefenster („Gates“) zusammengefasst und genauer analysiert werden. Von jedem Probenansatz wurde stichprobenartig nur eine bestimmte Anzahl von Ereignissen gezählt, analysiert und als Zahl der „Gesamtzellen“ einer Probe definiert.

Tab. 1: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

| Antikörper | (Spezies) Isotyp | Klon | Herkunft/Bezug (Artikelnummer) | Konzentration und Gebr.Lösung |
|-----------------------------------|------------------|---------|--------------------------------|-----------------------------------|
| aboCD2 | (Maus) IgG2a | IL-A43 | IHIT, Zellkultur-Überstand | pur |
| aboCD3 | (Maus) IgG1 | MM1A | VMRD (MM1A) | 1mg/ml 1:400 in PBS/BSA |
| aboCD11a | (Maus) IgG2a | IL-A 99 | Dirk Werling, London | 1:10 in PBS/BSA |
| aboCD11b | (Maus) IgG1 | MM12A | VMRD (MM12A) | 1mg/ml 1:1600 in PBS/BSA |
| aboCD11c | (Maus) IgM | BAQ153A | VMRD (BAQ153A) | 1mg/ml 1:200 in PBS/BSA |
| aboCD14 | (Maus) IgG1 | CAM36A | VMRD (CAM36A) | 1mg/ml 1:1600 in PBS/BSA |
| aboCD21 | (Maus) IgG2a | IL-A 65 | IHIT, Zellkultur-Überstand | Pur |
| αCD77 | (Ratte) IgM | 38.13 | Abd Serotec (MCA579) | für 100 Tests; 1:10 in PBS/BSA |
| aboCD80 | (Maus) IgG1 | ? | Dirk Werling London | 1:10 in PBS/BSA |
| aboCD86 | (Maus) IgG1 | ? | Dirk Werling London | 1:10 in PBS/BSA |
| aboCD172a | (Maus) IgG1 | IL-A 24 | IHIT, Zellkultur-Überstand | Pur |
| α-bovines oberflächeständiges IgM | (Maus) IgG1 | IL-A 30 | IHIT, Zellkultur-Überstand | Pur |
| aboMHC I | (Maus) IgG2a | IL-A 19 | IHIT, Zellkultur-Überstand | Pur |
| αMHC II DR | (Maus) IgGg1 | CC108 | Dirk Werling, London | 1:10 in PBS/BSA |
| αVimentin | (Maus) IgG2a | 3B4 | DAKO (M7020) | 1 ml 1:13 in PBS/BSA |
| αStxB1 | (Maus) IgG1 | 13C4 | IHIT, Zellkultur-Überstand | 1,5mg/ml 1:3,33 |

Tab. 1: (Fortsetzung)

| Antikörper | (Spezies) Isotyp | Klon | Herkunft/Bezug (Artikelnummer) | Konzentration und Gebr.Lösung |
|--|---------------------------------|------|--|-------------------------------------|
| α Maus-IgG1/APC | (Ziege) IgG1 | - | Biozol, Southern Biotech SBA-1070-11-L | 0,5mg/ml 1:500 in PBS/BSA |
| α Maus-IgG/FITC | (Ziege) IgG2a | - | Biozol, Southern Biotech (SBA-1082-02) | 0,5mg/ml 1:300 |
| α Ratte- IgM(μ)/FITC | (Ziege) IgM | - | Dianova, Jackson Immuno Research (112-096-075) | 1,5mg/ml 1:200 in PBS/BSA |
| α Maus-IgG/APC | (Ziege) IgG2a | - | Jackson Immuno Research (115-135-206) | 0,5mg/ml 1:500 in PBS/BSA |
| α Phospholipase C Clostridium perfringens | (Maus) IgG1 Isotypkontrolle | 1E8 | IHIT Zellkulturüberstand | Pur |
| α Phospholipase C Clostridium perfringens | (Maus) IgG2a Isotypkontrolle | 1F9 | IHIT Zellkulturüberstand | Pur |

3.5.3 Makrophagen (Mø)

Bei der Differenzierung der Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC), konnten verschiedene Populationen definiert werden (Abb. 1). Die großen, stark granulierten Mø (R1) und die kleineren weniger granulierten Lymphozyten (R2). Die weitere Analyse sowohl der nativen als auch der fixierten Zellen, bezog sich selektiv auf die in R1 erfassten Zellen, bei denen das Vorhandensein charakteristischer Antigene mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde. Zu diesem Zweck wurden in einer zwei-parametrischen Darstellung (*dot plot*) die Auswertefenster anhand der Negativkontrolle (Probe ohne jegliche Antikörper), der Sekundärantikörper-Kontrolle (Probe nur mit Sekundärantikörpern) und der Isotypkontrolle so eingerichtet, dass mindestens 98 % dieser Zellen im linken unteren Quadranten erschienen. Bei Proben, die mit Primärantikörper inkubiert worden waren, lagen die „antigen-positiven“ Zellen entsprechend der Fluoreszenzintensitäten der jeweils eingesetzten farbstoff-markierten Sekundärantikörper entweder im rechten unteren oder im linken oberen Quadranten. „doppelt-positive“ Zellen erschienen im rechten oberen Quadranten.

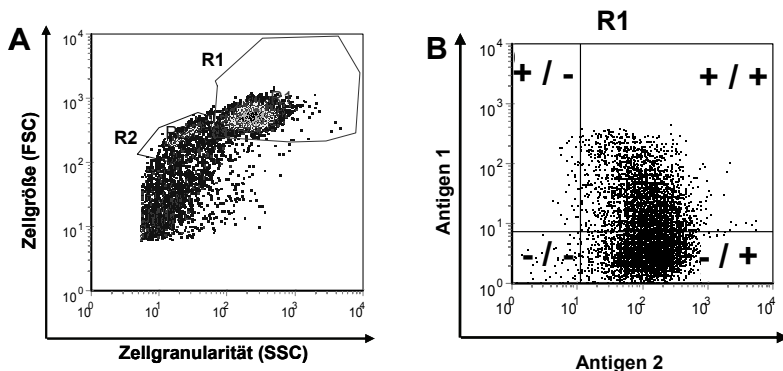


Abb. 1: Auswertungsstrategie durchflußzytometrischer Analysen von Mø-Kulturen

(A) Zellen nach 8 Tagen Kultivierung im Teflonbeutel und 18h Adhärenz auf Plastik ohne weitere Behandlung. Differenzierung der Zellen in R1 (Makrophagen) und R2 (Lymphozyten). Alle Ereignisse, die nicht in R1 oder R2 auftraten, wurden als tote Zellen, Zelltrümmer oder andere Partikel angesehen.

(B) Beispiel für eine 2-Parameter-Darstellung der Messergebnisse für den Nachweis von Antigenen mittels Fluoreszenz bezüglich Zellen aus R1.

Die Reinheit der Makrophagenkulturen wurde mittels Durchflußzytometrie ermittelt (siehe Kap. 3.5.2) Die Berechnung der Anteile der verschiedenen Zellen an der Population erfolgte durch Addition der Zellzahlen aus R1 und R2, und der Annahme dieser Summe als 100 %. Daraus wurden die relativen Anteile der Zellen in der Kultur berechnet.

Der mittlere relative Anteil an Mø in der Kultur lag jeweils in der Mediumkontrolle bei 80 % +/- 11 % (Mittelwert +/- Standardabweichung) für die Kulturen nach 18 h Plastikadhärenz + 4 h Inkubation (n=8), bzw. bei 75 % +/- 12 % für die Kulturen nach 18 h Plastikadhärenz + 24 h Inkubation (n=7).

3.5.4 Dendritische Zellen (DC)

In den Kulturen zur Anzucht von DC zeigten sich in der Durchflußzytometrie ebenfalls verschiedene Populationen. In R1 sind wiederum die großen granulierten Mø zu erkennen. R2 zeigt jedoch in diesem Fall die dendritischen Zellen (Abb.2). Hier wurden nun also die Zellen in R2 selektiv auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Die Einrichtung der Auswertefenster und die Berechnung der Kulturanteile erfolgte analog zum Vorgehen bei den Makrophagen. Die Reinheit der Kulturen betrug 80 % +/- 13,5 % (n=3).

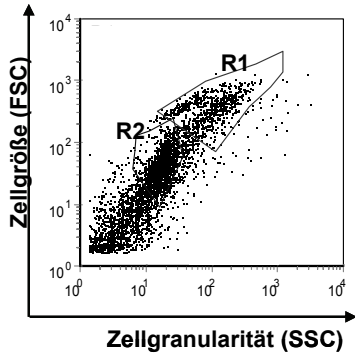


Abb. 2: Darstellung einer DC-Kultur in der DFZM

Zellen nach Aufreinigung von $CD14^+$ Zellen über magnetische Separation und 7 Tagen Kultur in DC-Medium. Differenzierung der Zellen nach R1 (Mø) und R2 (dendritische Zellen) Alle Ereignisse, die nicht in R1 oder R2 auftraten, wurden als tote Zellen, Zelltrümmer oder andere Partikel angesehen.

3.6 Untersuchungen zum Nachweis boviner Zytokin- und Chemokingene

Die RNA Isolation erfolgte unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit (Fa. Quiagen, Hilden, Art.-Nr. 74106) und wurde nach dem Protokoll „Animal Cells I“ aus dem RNeasy® Mini Handbuch durchgeführt.

Die in 600 µl RLT-Puffer (mit 2,5 % β-Mercaptoethanol) eingefrorenen Zellen wurden für 15 - 20 min in einem 37° C warmen Wasserbad aufgetaut. Um eine Homogenisierung zu erreichen, wurde die Zellsuspension zehnmals durch eine 20 Gauge Nadel (0,9 mm Durchmesser; Fa. Dispomed Witt oHG, Gelnhausen) gepresst.

Zu jedem Ansatz wurden nun 600 µl Ethanol (70 %ig) gegeben, die Suspension kräftig gemischt und nachfolgend 600 µl der Mischung auf eine in einem 2 ml Sammelröhrchen befindlichen RNeasy® Mini Säule aufgebracht. Es folgte eine Zentrifugation von Säule und Röhrchen bei 16.000 x g und RT für 35 s. (Mikro 20, Hettich mit Rotor 2073). Der dabei aufgefangene Durchfluss wurde verworfen. Alle Schritte wurden mit den restlichen 600 µl der Probe wiederholt. Jetzt wurde ein Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer durchgeführt. Nach der erneuten Zentrifugation (16000 x g, RT, 15 s) wurde der Durchfluss wiederum verworfen. Als nächstes folgte der erste DNase-Verdau. Dafür wurden pro Säule 10 µl QIAGEN DNase 1 Stammlösung mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und jeweils 80 µl dieser Verdauung auf die Gel-Membran der Säule verbracht und bei 20 - 30° C 20 min inkubiert. Ein erneuter Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer schloss sich an. Danach wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen versetzt. Im Weiteren wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule aufgebracht und bei 13.000 x g und RT für 15 s abzentrifugiert. Dieser Waschschriff wurde noch einmal wiederholt, diesmal jedoch mit einer Zentrifugationszeit von 2 min, um die Gel-Membran der RNeasy® Säule zu trocknen.

Um letzte Reste des Puffers komplett zu entfernen, wurde die Säule in einem neuen Sammelröhrchen nochmals für 2 min zentrifugiert. Danach folgte die Elution der RNA von der Säule. Dazu wurden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg Art.-Nr. 0030 120.086) 10 µl DNase Puffer und 2 µl RNase Inhibitor vorgelegt. Die RNA-Säule wurde in das Reaktionsgefäß überführt und 43 µl RNase-freien Wassers (Fa. Carl Roth GmbH, Art.Nr. T 143.2) auf die Säulenmatrix gegeben. Es folgte eine Zentrifugation (Mikro 20, Hettich mit Rotor 2073) für 15 s. Danach folgte eine erneute Zugabe von 36 µl RNase-freien Wassers auf die Säulenmatrix, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation für 15 s. Nach der Elution waren so 81 µl RNA-Lösung gewonnen worden.

Es folgte der zweite DNase Verdau im Eluat. Zur gewonnenen RNA-Lösung wurden 10 µl Ambion 10x DNase 1 Puffer, 2 µl Amersham DNase 1 (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg, Art.-Nr. 27-0514-02) und 2 µl RNase Inhibitor RNasin (Fa. Fermentas, St.Leon-

Rot, Art.-Nr. E00312) hinzugefügt. Die Mischung wurde für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden zur Inaktivierung der DNase 10 µl 3 M Na-Acetat (1/10 vol) zugegeben und durch Vortexen gemischt.

Nach Zugabe von 200µl 99 % Ethanol (2 bis 2,5 vol) wurde erneut gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben bei -70°C für mindestens 30 min gelagert. Nach einer Zentrifugation bei 4° C und 12000 x g für mindestens 30 min (Zentrifuge 5048 R, Fa. Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand dekantiert. Es wurden 400 µl 70 % EtOH zugegeben und für 5 min bei RT zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand dekantiert. Nach Zugabe von weiteren 400 µl 70 % EtOH wurde der Überstand erneut dekantiert. Ethanolreste wurden vorsichtig mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze entfernt ohne das Pellet zu berühren. Danach trockneten die Pellets mindestens 30 min im offenen Reaktionsgefäß unter einem Zellstofftuch. Ab diesem Schritt konnte die Probe durch Einfrieren gelagert werden. Zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Zugabe von 1,5 µl RNAse Inhibitor und 60 µl RNAse-freien Wasser (Fa. Carl Roth GmbH, Art.Nr. T 143.2). Die Proben wurden dreimal durch Vortexen gemischt und danach jedes Mal kurz abzentrifugiert.

3.6.1 Quantitative RNA-Bestimmung im Photometer

Die Menge der isolierten RNA wurde im Photometer (DU® 640 Spectrophotometer, Fa. Beckman Instruments, München) bestimmt. Aus 5 µl Probe und 65 µl TE-Puffer ließ sich eine 1:14 Verdünnung herstellen, die in einer UltraVette® (Fa. Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim, Art.-Nr. 759015) bei verschiedenen Wellenlängen ($\lambda = 260 \text{ nm}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, $\lambda = 320 \text{ nm}$) gegen TE-Puffer (100 µl) als Leerwert gemessen wurde.

Die Berechnung des RNA-Gehaltes geschah nach folgender Formel:

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

3.6.2 Qualitative Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese

Um die frisch isolierte RNA auf mögliche DNA-Kontaminationen oder Fragmentierungen hin zu untersuchen, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung vorgenommen. Für das Gel wurden 400-500 ng RNA benötigt. Die entsprechende Menge RNA-Lösung wurde mit 2 µl Ladepuffer vermischt und das fehlende Volumen auf 17 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel mit 0,001% Ethidiumbromid (Agarose und Ethidiumbromid gelöst in 1x TAE-Puffer) elektrophoretisch über 30 min bei 80 Volt. Als DNA-Größenmarker wurde Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3 (Fa. Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Art.-Nr. SM0191) seitlich der Nukleinsäuren mitgeführt. 1x TAE-Puffer diente als Laufpuffer in der Gelelektrophoresammer Modell Mini (Fa. Keutz, Reiskirchen, Art.-Nr. 25 301 71).

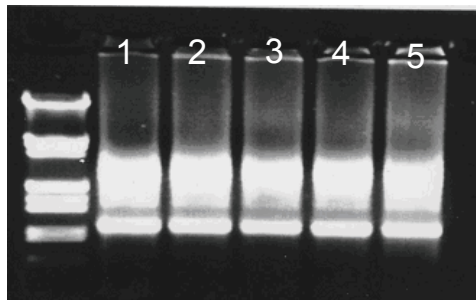


Abb. 3: Überprüfung der RNA-Qualität durch Gelelektrophorese

Auf dem repräsentativen Agarosegel wurden in die Spuren 2 bis 5 RNA Proben aufgetragen und aufgetrennt. Die Kontrollspur zeigt den Marker Lambda Hind Eco III. Es sind keine Kontaminationen durch genomische DNA zu erkennen. Da die Banden alle nahezu gleich breit sind, ist davon auszugehen, dass sämtliche Proben einen ähnlichen RNA Gehalt besitzen.

3.6.3 Reverse Transkription

War die Menge der RNA ausreichend und konnten bei der gelelektrophoretischen Kontrolle keine DNA-Kontaminationen festgestellt werden, wurden 1000 ng RNA in komplementäre DNA (complementary-DNA (cDNA)) umgeschrieben.

Um kontrollieren zu können, ob die genomische DNA des Ausgangsmaterials vollständig verdaut worden war, wurde von jeder Probe zusätzlich zu dem Ansatz für die Umschreibereaktion (plusRT-Ansatz) ein Ansatz angefertigt, der alle Substanzen außer den Primern und der Reversen Transkriptase (RT) enthielt. Diese minusRT-Ansätze wurden nach demselben Protokoll behandelt wie die umzuschreibenden Proben, so dass am Ende der Umschreibereaktion keine cDNA gebildet werden konnte.

Die entsprechende Menge RNA-Lösung wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß mit Wasser für die Molekularbiologie (DEPC-H₂O) auf 23 µl aufgefüllt und für den plusRT-Ansatz mit 2 µl Oligo-d(T)₁₆-Primern (= 0,5 µg), (Fa.Applied Biosystems, Carlsbad, Art.-Nr. N808-0128) ergänzt. Für den minusRT-Ansatz wurden statt der Primer 2 µl H₂O hinzugefügt. Die Proben wurden kurz gevortext und abzentrifugiert und dann im Cyclyer (Gene Amp 9600 PCR System, Fa. Perkin Elmer, Norwalk) für 5 Minuten auf 70° C erhitzt. Danach erfolgte die Lagerung auf Eis. Zu den 25 µl Ansätzen wurden dann jeweils die in Tab. 2 aufgeführten Substanzen hinzugefügt.

Tab. 2: Pro Ansatz verwendete Substanzen für die reverse Transkription

| Substanz | verwendetes Volumen | Bezugsquelle |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| DEPC-H ₂ O | 1 µl | Carl Roth GmbH |
| M-MLV RT 5x Reaktions-Puffer | 8 µl | Promega Corporation |
| dNTP-Mix | 4 µl (0,5 mM) | PAN Biotech |
| Ribonuclease-Inhibitor RNAsin | 1 µl (40 U) | Fermentas |
| M-MLV Reverse Transkriptase | 1 µl (200 U) | Promega Corporation |

Statt der Reversen Transkriptase enthielt der minusRT-Ansatz 1 µl H₂O.

Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben im Cyclyer (Gene Amp 9600 PCR System) 60 Minuten auf 40° C und 2 Minuten auf 94° C erhitzt. Anschließend wurde die gewonnene cDNA sogleich in die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen eingesetzt oder aber bei -20° C eingefroren.

3.6.4 PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen

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

Tab. 3: Basenfolge der Primer für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen

| Primer | Basenfolge 5'bis 3' Ende |
|-----------------------|-------------------------------------|
| bo-GAPDH-Taq2-forward | -GCG ATA CTC ACT-CTT-CTA-CCT-TCG A- |
| bo-GAPDH-Taq2-reverse | -TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC- |

Der pro Ansatz verwendete PCR-Mix zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen setzte sich wie in Tab. 4 dargestellt zusammen.

Tab. 4: Pro Ansatz verwendete Substanzen für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontamination

| Substanz | verwendetes Volumen | Bezugsquelle |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Aqua bidest. | 12,1 µl | - |
| 10 x Ampli Taq Puffer | 2,0 µl | Applied Biosystems |
| 25 mM MgCl ₂ lösl. | 1,2 µl | Applied Biosystems |
| dNTP Mix | 1,0 µl (f.c. 0,2 mM) | PAN Biotech |
| GAPDH-Forward Primer | 1,0 µl (f.c. 0,25 µM) | MWG-Biotech AG |
| GAPDH-Reverse Primer | 1,0 µl (f.c. 0,25 µM) | MWG-Biotech AG |
| Ampli Taq Polymerase | 0,2 µl (1 U) | Applied Biosystems |

Zu jedem der Ansätze wurden 1 µl (25 ng cDNA) Probe bzw. 1 µl H₂O für die Negativkontrolle pipettiert. Als PCR-Positivkontrolle fand eine PBMC-cDNA Verwendung. Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben (20 µl Gesamtvolumen) im Cycler (Gene Amp 9600 PCR System) 40x hintereinander zunächst für 15 s auf 94° C, für

30 s auf 60° C und dann für 30 s auf 72° C erhitzt. Das Ergebnis der PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen wurde mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Dazu wurden die gesamten PCR-Ansätze (je 20 µl) mit jeweils 2,5 µl Ladepuffer vermischt und auf ein 3 %iges Agarosegel (mit 0,003 % Ethidiumbromid, gelöst in 1x TAE-Puffer) aufgetragen. Als Marker dienten 20 µl Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fa. Fermentas, St.Leon-Rot, Art.-Nr. SM0241). Unter Verwendung des Laufpuffers TAE erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 120 Volt über 45 min. Wenn bei keiner der Proben außer der Positivkontrolle eine Bande zu sehen war, galt die Qualität als ausreichend für die Durchführung der *Real time* TaqMan® PCR.

Tab. 5: Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Primerpaare

| Primer | Basenfolge 5' bis 3' Ende | Referenz |
|-----------------|--|----------|
| GAPDH Forw | GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A | (218) |
| GAPDH Rev | TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC | |
| GAP-RANTES Forw | GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA | (218) |
| GAP-RANTES Rev | CCC TCC ACG ATG CCA AAG T | |
| IL-8 Forw | CAC TGT GAA AAA TTC AGA AAT CAT TGT TA | (119) |
| IL-8 Rev | CTT CAC CAA ATA CCT GCA CAA CCT TC | |
| GRO-alpha Forw | CGC CTG TGG TCA ACG AAC T | (218) |
| GRO-alpha Rev | CAC CTT CAC GCT CTG GAT GTT | |
| MCP-1 Forw | CGC TCA GCC AGA TGC AAT TA | (218) |
| MCP-1 Rev | GCC TCT GCA TGG AGA TCT TCT T | |
| RANTES Forw | CCC TGC TGC TTT GCC TAT ATC T | (218) |
| RANTES Rev | GCA CTT GCT GCT GGT GTA GAA A | |
| TGF Forw | GGC CCT GCC CTT ACA TCT G | (218) |
| TGF Rev | CGG GTT GTG CTG GTT GTA CA | |
| IFN Forw | CAG CTC TGA GAA ACT GGA GGA CTT | (239) |
| IFN Rev | TGG CTT TGC GCT GGA TCT | |
| IL-4 Forw | CAT GCA TGG AGC TGC CTG TA | (239) |
| IL-4 Rev | AAT TCC AAC CCT GCA GAA GGT | |
| IL-6 Forw | CTG AAG CAA AAG ATC GCA GAT CTA | (14) |
| IL-6 Rev | CTC GTT TGA AGA CTG CAT CTT CTC | |
| IL-10 Forw | CCA AGC CTT GTC GGA AAT GA | (218) |
| IL-10 Rev | GTT CAC GTG CTC CTT GAT GTC A | |
| IL-12p40 Forw | GCA GCT TCT TCA TCA GGG ACA T | (14) |
| IL-12p40 Rev | CCT CCA CCT GCC GAG AAT T- | |
| TNF-α Forw | TCT TCT CAA GCC TCA AGT AAC AAG T | (119) |
| TNF-α Rev | CCA TGA GGG CAT TGG CAT AC | |

3.6.5 Real time Taqman® PCR

Die Methode der *Real time* TaqMan® PCR basiert auf der Spaltung einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase während der PCR und der Messung der Fluoreszenzintensität durch ein automatisiertes Spektrophotometer, welches in das Sequenzdetektionssystem (ABI PRISM™ 5700), (Fa. Applied Biosystems, Carlsbad) integriert ist.

Die quantitative Untersuchung der verschiedenen Proben und Kontrollen auf den Gehalt an mRNA für die bovinen Zytokin- und Chemokingene *il-4*, *il-6*, *il-10*, *il-12*, *ifn-γ*, *tnf-α*, *il-8*, *gro-α*, *mcp-1*, *tgf-β* und *rantes* erfolgte im Vergleich zum konstitutiv exprimierten „Housekeeping“-Gen *gapdh*. Als Bezugsgröße für die Quantifizierung der mRNA für *rantes* wurde ein eigenes System mit anderen Primern und anderer Sonde (genannt GAP-RANTES) verwendet.

Für jedes Gen wurde im Doppelansatz ein separater PCR-Mix mit den entsprechenden Primer-Paaren (MWG Biotech AG) und der passenden Sonde (Eurogentec, Liege, Belgien) angefertigt (Tab. 5, Tab. 6 und Tab. 7).

Tab. 6: Zusammensetzung des PCR-Mix für die TaqMan® PCR pro Ansatz (25 µl)

| Substanz | verwendete Menge | Bezugsquelle |
|----------------------|----------------------|----------------|
| 2x TaqMan® MasterMix | 12,5 µl | EUROGENTEC |
| Forward Primer | 1,5 µl (f.c. 300 nM) | MWG-Biotech AG |
| Reverse Primer | 1,5 µl (f.c. 300 nM) | MWG-Biotech AG |
| Sonde | 1 µl (f.c. 200 nM) | EUROGENTEC |
| Aqua bidest. | 7 µl | - |

Pro Ansatz wurden jeweils 1 µl Probe (25 ng cDNA) bzw. 1 µl H₂O für die Negativkontrolle hinzugefügt. Nachdem die Ansätze in die Vertiefungen einer MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Fa. Applied Biosciences, Freiburg, Art.-Nr. N8010560) pipettiert und die Platte mit einer durchsichtigen Folie verschlossen worden war, wurden die Proben im TaqMan® Cyclyer einmal für 2 min auf 50 °C, einmal für 10 min auf 95 °C und 40x für 15 s auf 95 °C und für 60 s auf 60 °C erhitzt.

Tab. 7: Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Sonden

Referenzen vgl. Tab. 6

| Sonde | Basenfolge 5' bis 3' Ende |
|---------------|---|
| GAPDH | CTG GCA TTG CCC TCA ACG ACC ACT T |
| GAP-RANTES | ATA CCC TCA AGA TTG TCA GCA ATG CCT CCT |
| IL-8 | AAT GGA AAC GAG GTC TGC TTA AAC CCC AAG |
| GRO- α | CCA GTG CCT GCA GAC CTT GCA GG |
| MCP-1 | CCC AAG TCG CCT GCT GCT ATA CAT TCA A |
| RANTES | CCC GCA CCC ACG TCC AGG AGT |
| TGF- β | CCT GGA TAC ACA GTA CAG CAA GGT CCT GG |
| IFN- γ | AGC TGA TTC AAA TTC CGG TGG ATG ATC T |
| IL-4 | TGC TGC CCC AAA GAA CAC AAC TGA GAA G |
| IL-6 | CAC TCC AGC CAC AAA CAC TGA CCT GCT |
| IL-10 | AGC CTG TGG CAT CAC CTC TTC CAG GTA A |
| IL-12 | CAC CCA AGA ACC TGC AAC TGA GAC CAT TAA |
| TNF- α | AGC CCA CGT TGT AGC CGA CAT CAA CTC C |

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

Zur weiteren Auswertung wurde die vergleichende Ct-Methode ($\Delta\Delta$ Ct-Verfahren) angewendet:

1. Ermittlung der Mittelwerte der Ct-Werte aus den Doppelansätzen für jedes Gen
2. Normalisierung auf das „Housekeeping“-Gen:
 $MW-Ct_{\text{Zielgen}} - MW-Ct_{\text{Housekeeping-Gen}} = \Delta Ct$
3. Bestimmen des Ansatzes „nur Medium“ als Referenzsystem (Kalibrator)
4. Normalisierung auf den Kalibrator:
 $\Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta Ct$
 (dadurch wird der Kalibrator = Null)
5. Berechnung der relativen Mengen durch Einsetzen der $\Delta\Delta$ Ct-Werte in die Formel: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
 (dadurch erreicht der Kalibrator den Wert 1 bzw. 100 %)

3.7 Nachweis von IL-10 im Überstand primärer Mø-Kulturen mittels ELISA

3.7.1 Aufkonzentrierung der Kulturüberstände

Da in den unbehandelten Überständen zunächst kein IL-10 nachgewiesen werden konnte, mussten sie mit Hilfe einer Amicon® Ultra 4 Säule 10000 NMWL (Fa. Millipore) aufkonzentriert werden. Dazu wurden 1,5 ml jeden Überstandes auf je eine Säule aufgeschichtet und mittels Zentrifugation (Zentrifuge 5804R Ausschwingrotor 4500 x g; 25 min; RT) auf ein Volumen von 100 µl reduziert. Als Kontrolle wurde rekombinantes IL-10 1:2000 (14,6 mg/ml; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Werling, Royal Veterinary College, London) verdünnt in PBS bzw. in IMDM verwendet.

3.7.2 Durchführung des ELISA

Zunächst wurde eine Nunc Polysorb-Mikrotiterplatte mit dem Fangantikörper beschichtet. Dazu wurden pro Vertiefung 500 ng Fangantikörper (Serotec MCA2110; 1 mg/ml) in 100 µl Beschichtungspuffer pipettiert. Die Platte wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte zunächst dreimal mit 300 µl PBS/Tween pro Vertiefung gewaschen. Daran schloss sich ein Blockierungsschritt mit Blocking Reagenz (Fa. Roche Applied Science, Mannheim, Art.-Nr. 1112589001), verdünnt 1:10 in *A. demineralisata*, an. Pro Vertiefung wurden 200 µl eingesetzt. Es folgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer für 60 min bei 37° C.

Anschließend wurden die Vertiefungen wiederum dreimal mit 300 µl PBS/Tween pro Vertiefung gewaschen, dann die aufkonzentrierten Proben aufgebracht und 60 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Positivkontrolle diente rekombinantes IL-10 (14,6 mg/ml; D. Werling, Royal Veterinary College, London) 1:200 verdünnt in IMDM.

Nach weiteren drei Waschschritten mit jeweils 300 µl PBS/Tween erfolgte die Detektion mit 200 ng Detektionsantikörper (Klon CC320; 1mg/ml) (Fa. Abd Serotec, Düsseldorf, Art.-Nr. MCA2111B) in 100 µl PBS/Tween pro Vertiefung. Es schloß sich die Inkubation für 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer an.

Danach wurden die Vertiefungen wiederum dreimal mit jeweils 300 µl PBS/Tween gewaschen.

Als Konjugat wurden 100 µl pro Vertiefung Streptavidin:HRP (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg, Art.-Nr. RPN1231-2ML) 1:10000 in PBS/Tween verdünnt hinzugefügt und für 30 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift (dreimal 300 µl PBS/Tween) erfolgte die Substratzugabe (100 µl / Vertiefung; 5 mg/ml Orthophenylendiamin (OPD) (Fa. Sigma Aldrich GmbH, München, Art.-Nr. P6662) + 3 µl 30 %ige H₂O₂ + 10 ml Substratpuffer) und eine Inkubation für 20 min bei 37° C in einer feuchten Kammer. Danach wurde die Reaktion mittels 1N H₂SO₄ abgestoppt und die photometrische Messung mit dem Ascent ELISA Plate Reader bei einer Testwellenlänge von 492 nm durchgeführt.

Berechnung des IL-10 Gehaltes:

Berechnung der OD-Werte:

$$OD_{\text{(Probe berechnet)}} = \frac{OD_{\text{(Probe)}} - OD_{\text{(Substratkontrolle)}}}{OD_{\text{(Positivkontrolle)}} - OD_{\text{(Substratkontrolle)}}} \times \text{Aufkonzentrierungsfaktor}$$

Berechnung des Titers:

$$IL-10 \text{ Titer} = OD_{\text{(Probe berechnet)}} - OD_{\text{(Mediumkontrolle)}}$$

Tab. 8: Verwendete Antikörper für den ELISA

| <u>Antikörper</u> | <u>(Spezies)</u> | <u>Klon</u> | <u>Herkunft/ Bezug</u> | <u>Gebr.Lösung</u> |
|----------------------------|------------------|-------------|----------------------------|--------------------|
| | <u>Isotyp</u> | | | |
| α-IL-10 (Fang-AK) | (Maus) IgG2b | CC318 | Serotec MCA2110 | 500ng/100µl |
| α-IL-10 (Detektions-AK) | (Maus) IgG1 | CC320 | Serotec MCA2111 | 200ng/100µl |

3.8 Statistische Auswertung

Statistische Berechnungen wurden mit dem Windows Programm SPSS für Windows (Version 15, SPSS Inc., USA) durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurden der t-Test für gepaarte Stichproben und die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse, sowie der Student-Newmans-Keuls Test und die Bonferroni Korrektur verwendet.

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

- n.s = nicht signifikant ($p > 0,05$)
- * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$)
- ** = signifikant ($p \leq 0,01$)
- *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

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

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung primärer boviner Makrophagen (M ϕ)

4.1.1 Morphologie

Nachdem die aus dem Vollblut isolierten mononukleären Zellen nach 8 Tagen aus den Teflonbeuteln entnommen und über Nacht in Plastikpetrischalen inkubiert worden waren, zeigte sich in der Lichtmikroskopie ein konfluenten Zellrasen. Die Zellen wiesen ein rundes bis polymorphes Erscheinungsbild auf (Abb. 4). Sie konnten im weiteren Verlauf der Untersuchungen als M ϕ identifiziert werden. Gelegentlich hafteten vergleichsweise kleinere und kugelige Zellen auf der Oberfläche der M ϕ , welche im späteren Verlauf der Untersuchungen als Lymphozyten identifiziert werden konnten.

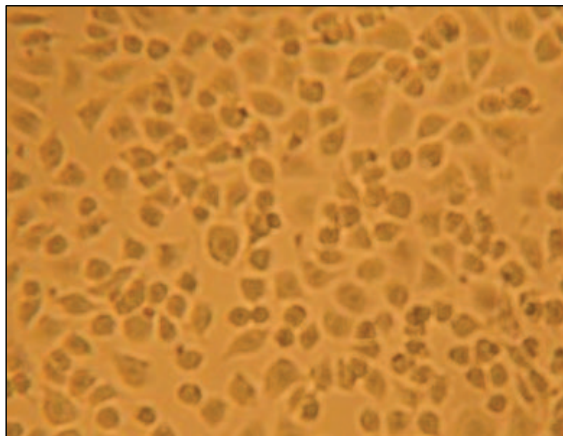


Abb. 4: Primäre bovine plastikadhärente M ϕ

Lichtmikroskopische Aufnahme primärer boviner M ϕ nach 6-tägiger Inkubation in Plastikpetrischalen. Originale Vergrößerung 400-fach.

4.1.2 Zytoskelettausstattung und Oberflächenantigene

In Mø konnte nach Permeabilisierung der Zellen in der Immunfluoreszenz Vimentin in Form von typischen filamentären Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 5). CD14, CD172a und CD80 wurden auf der Oberfläche (zellmembran-assoziiert) nicht-permeabilisierter Zellen nachgewiesen. CD14 und CD172a wurde auf allen Zellen exprimiert, CD80 nur auf einer Subpopulation.

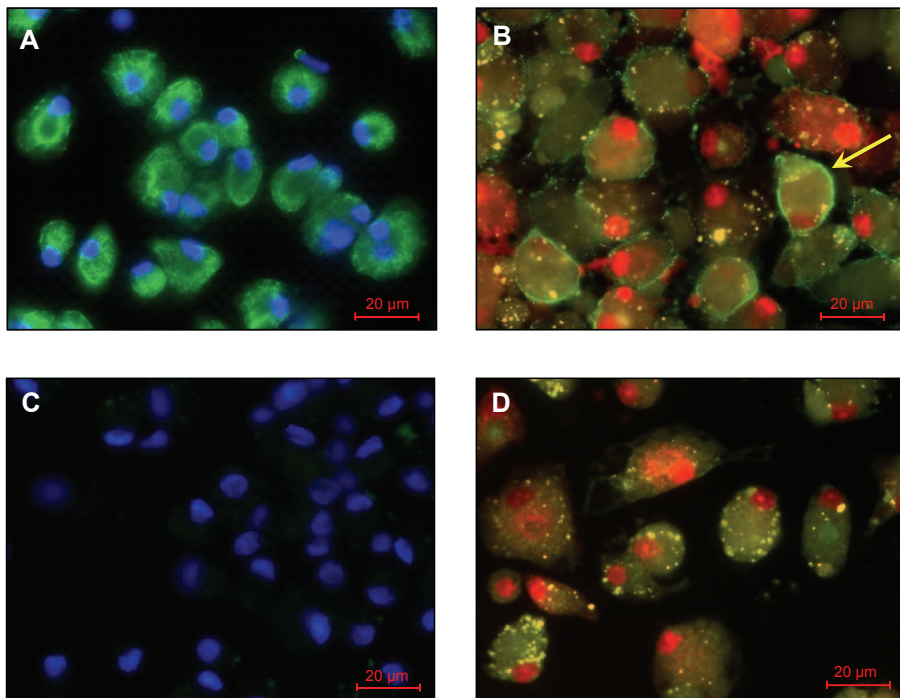


Abb. 5: Zytoskelettausstattung und Oberflächenantigene primärer boviner Mø

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer boviner Mø: Nachweis von FITC-markiertem Vimentin (grün) in permeabilisierten Zellen [A] und zugehörige Sekundärantikörperkontrolle [C]. Kernfärbung mit DAPI (blau). Nachweis von FITC-markiertem CD14 (grün) auf der Oberfläche (gelber Pfeil) nicht permeabilisierter Zellen [B] und zugehörige Sekundärantikörperkontrolle [D]. Kernfärbung mit Propidiumiodid (rot).

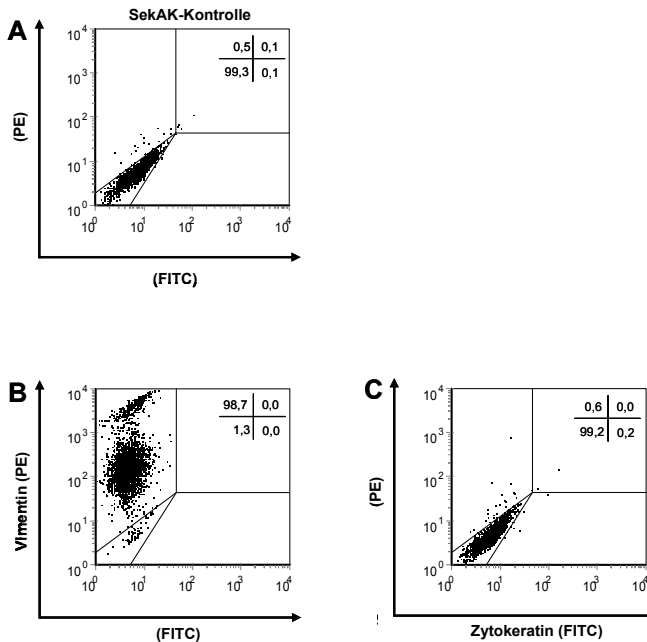


Abb. 6: Zytoskelettausstattung primärer boviner Mø

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse permeabilisierter primärer boviner Mø nach Detektion von Vimentin **[B]** und Zytokeratin **[C]**. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen an. Sekundärantikörperkontrolle **[A]**.

Bei der Untersuchung in der DFZM waren $\geq 98,7\%$ der Zellen positiv für Vimentin, Zytokeratin war nicht nachweisbar ($n=2$; Abb. 6). CD3 konnte ebenfalls nicht und membranständiges IgM nur auf ca. 5% der Mø nachgewiesen werden. CD11c, charakteristisch für dendritische Zellen (DC), war auf $\leq 30\%$ der Zellen mit einer geringen mittleren Fluoreszenzintensität (MFLI, Gradmesser der Menge an Antigenexpression pro Zelle) nachweisbar. Die Mø-spezifischen Marker CD14, CD172a und CD11b wurden von $\geq 98\%$ der Zellen und mit einer hohen MFLI exprimiert. Die Expression von CD80 und CD86 war zwischen den Versuchsansätzen variabel. MHC II wurde auf $\geq 90\%$ der Zellen nachgewiesen (Abb. 7, $n=2-3$). Als Isotypkontrolle wurden Antikörper gegen die Phospholipase C von Clostridium perfringens der Isootypen IgG1 und IgG2a verwendet. Es konnte keine unspezifische Bindung nachgewiesen werden.

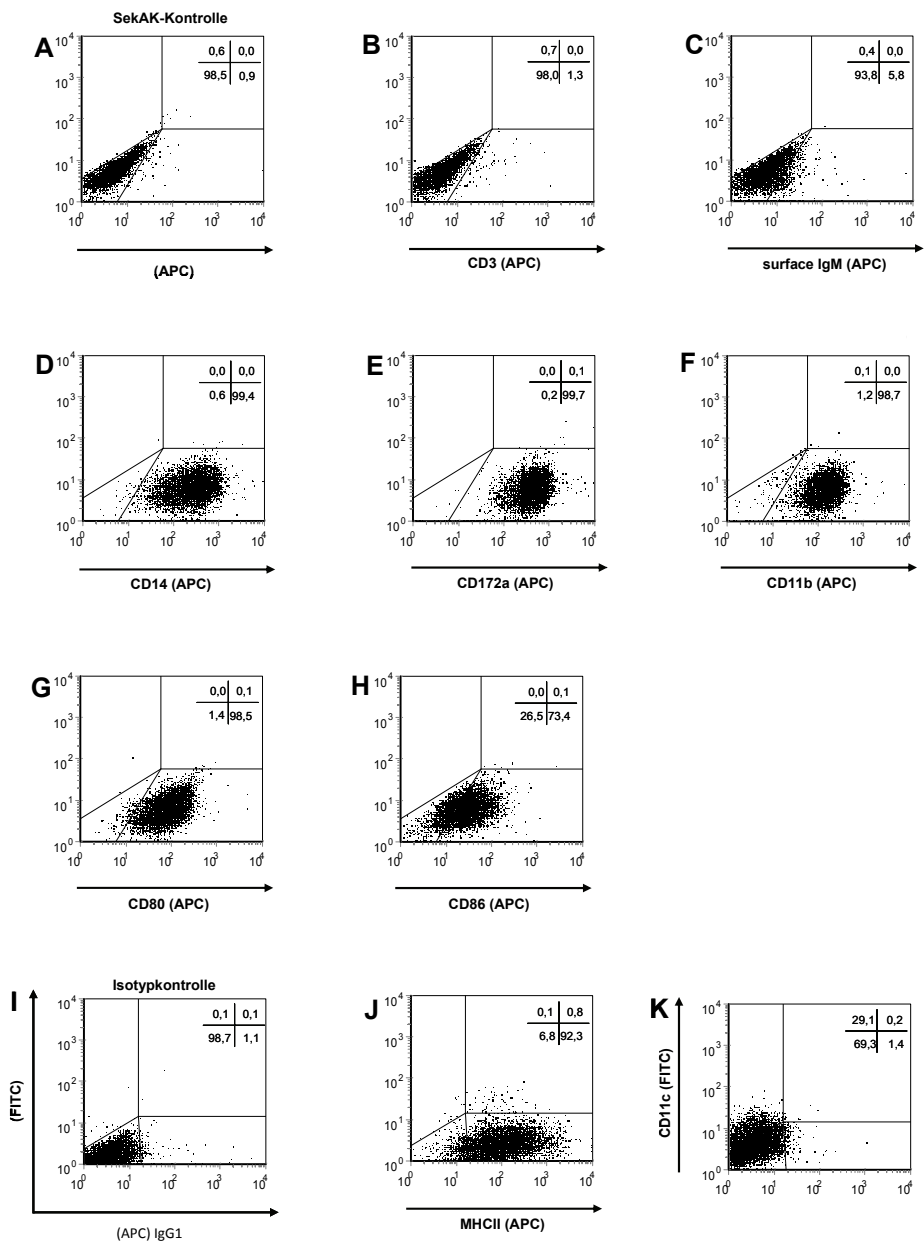


Abb. 7: Charakterisierung der Oberflächenantigene primärer boviner M ϕ
Erläuterungen siehe nächste Seite

Abb.7: (Fortsetzung)

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse nativer primärer boviner Mø nach Detektion der Oberflächenantigene. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in Prozent bezogen auf morphologisch intakte Zellen an. Sekundärintkörperlkontrolle [A] der Analysen B-H; Isotypkontrolle [I] der Analysen J-K.

4.1.3 Shigatoxin-Rezeptor (CD77)-Expression

Der Nachweis von CD77 gelang mit verschiedenen Methoden. In der Immunfluoreszenz nicht permeabilisierter Zellen (n=3) konnte der Rezeptor auf der Oberfläche (Zellmembran-assoziiert) einer Subpopulation der Zellen detektiert werden (Abb. 8). Wurden die Zellen zuvor permeabilisiert, konnte der Rezeptor gleichmäßig in den positiven Zellen verteilt detektiert werden. Der Nachweis des Antigens gelang sowohl mit einem Antikörper gegen CD77 als auch durch Nachweis der Bindung von rekombinanter B-Untereinheit des Stx1 an die Zellen (Abb. 8).

Bei der DFZM-Analyse unterschied sich der Anteil CD77-positiver Zellen nach Immundekoration von nativen bzw. permeabilisierten Zellen (Abb. 9). Bei nativen Zellen war bei 31,9 % +/- 15,7% (n=4) der Zellen CD77 nachweisbar, bei permeabilisierten Zellen sogar bei 83,5% +/- 9,4% (n=4).

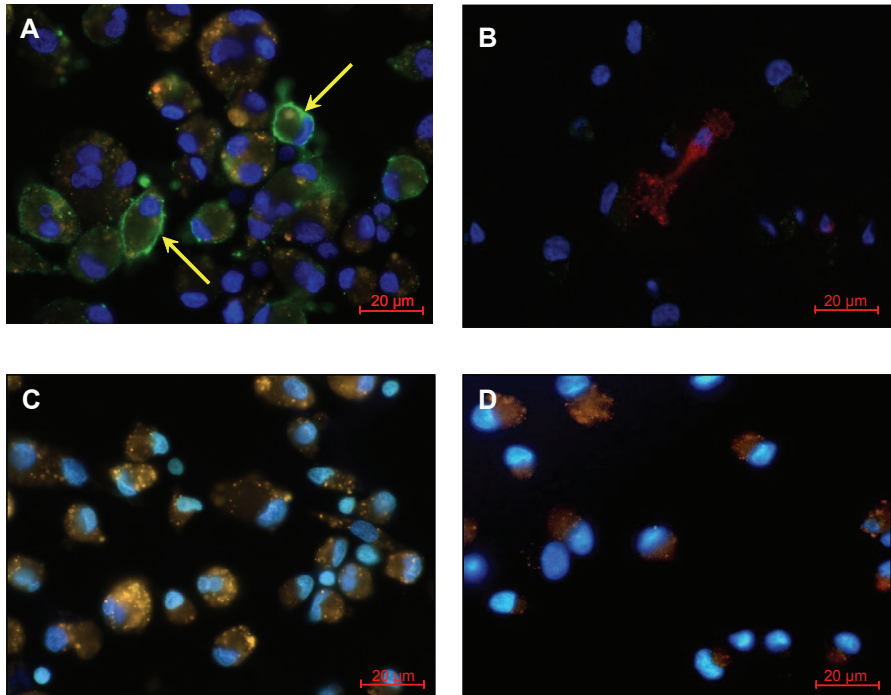


Abb. 8: Shigatoxin-Rezeptor-Expression auf bzw. in bovinen Mø

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer boviner Mø: Nachweis von FITC-markiertem CD77 (grün, gelbe Pfeile), auf der Oberfläche nicht permeabilisierter Zellen **[A]** und zugehörige Sekundäntikörperkontrolle **[C]**. Kernfärbung mit DAPI (blau). Nachweis der Bindung von PE-markiertem rStxB1 (rot) in permeabilisierten Zellen **[B]** und zugehörige Sekundäntikörperkontrolle **[D]**. Kernfärbung mit DAPI (blau).

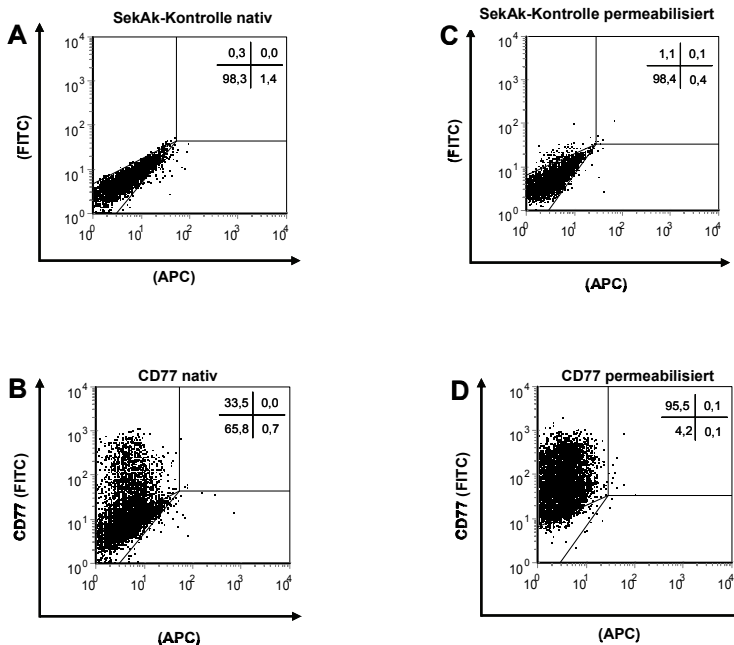


Abb. 9: CD77-Expression auf bzw. in primären bovinen Mφ

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der CD77-Expression primärer boviner Mφ in nativen [B] bzw. permeabilisierten [D] Zellen. Sekundärantikörperkontrollen nativer [A] und permeabilisierter [C] Zellen. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot, geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in Prozent, bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

4.1.4 Kompetitionsstudie mit anti-CD77 Antikörper und rStxB1

Der Nachweis, dass der anti-CD77 Antikörper spezifisch an den Rezeptor für Stx1 gebunden hatte, gelang mit Hilfe einer Kompetitionsstudie, in der die Zellen nicht nur mit Antikörpern gegen CD77, sondern zusätzlich auch mit einer rekombinanten B-Untereinheit (rStxB1) des Stx1 inkubiert wurden. Zur Detektion von rStxB1 wurde anti-rStxB1 Antikörper (13C4) verwendet. Dabei zeigte sich, dass die B-Untereinheit schon in der niedrigsten Konzentrationsstufe die Bindung des anti-CD77 Antikörpers verminderte (Abb. 10). Mit zunehmender Konzentration der rStxB1 wurde dieser Effekt immer deutlicher. Es traten zunächst doppelt positive Zellen auf (Abb. 10, Abb. 11) welche sowohl ein Signal für rStxB1 als auch für CD77 aufwiesen. Nach Inkubation mit noch höheren Konzentrationen der rStxB1 (30 µg/ml Medium) konnte die Bindung des CD77-Antikörpers nahezu vollständig unterdrückt

ERGEBNISSE

werden. Dabei war es unerheblich, ob die Zellen zuerst mit dem Antikörper gegen CD77 oder mit rStxB1 inkubiert worden waren.

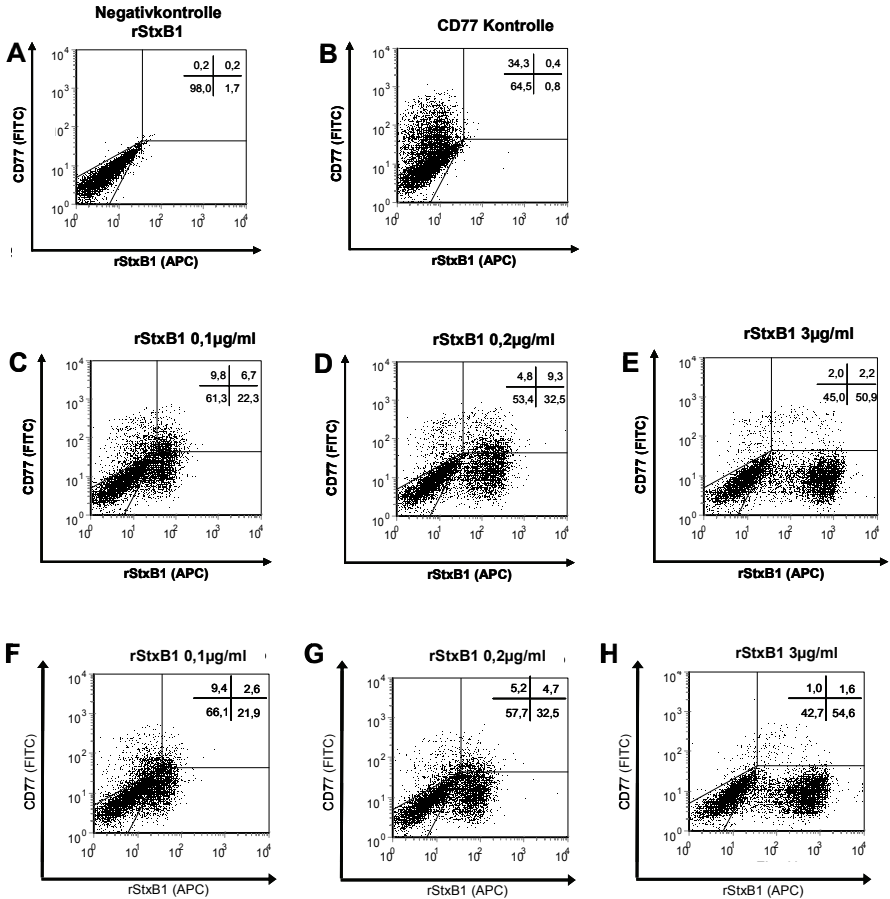


Abb. 10: DFZM-Analyse des Einflusses verschiedener Konzentrationen von rStxB1 auf die Bindung von anti-CD77 an bovine native Mø

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung von CD77 - Antikörper (y-Achse) bzw. verschiedener Konzentrationen von rStxB1 (x-Achse) an native primäre bovine Mø (rStxB1 + CD77) [C-D] (CD77 + rStxB1) [F-H]. Kontrolle ohne rStxB1 mit 13C4 [A]. CD77 Kontrolle ohne rStxB1 [B]. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in Prozent bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

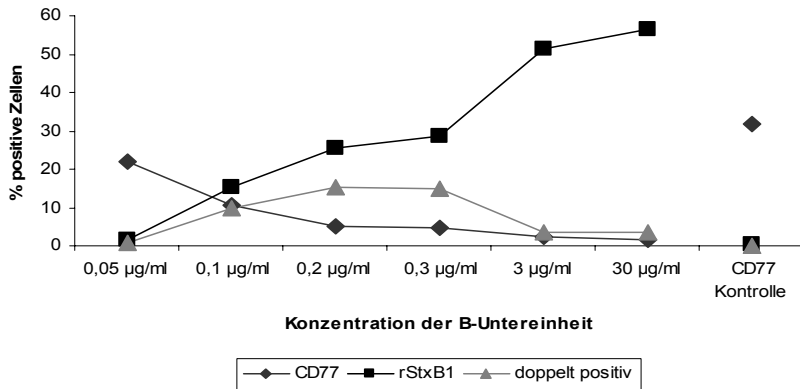


Abb. 11: Kompetitionsstudie mit anti-CD77 und rStxB1

Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung von CD77 - Antikörper bzw. rStxB an native primäre bovine Mø Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von rStxB1. Die Abbildung zeigt Daten für Zellen die zuerst mit rStxB1 und dann mit CD77 inkubiert wurden.

4.1.5 Einfluss von Stx1

4.1.5.1 Vitalität

Die Kulturen wurden mit 200 CD₅₀ Stx1/ml Medium inkubiert. Die Messungen in der DFZM erfolgten nach 4 h und 24 h. Zusätzlich wurde eine Kultur über sechs Tage mittels Lichtmikroskopie beobachtet. Hier zeigte sich beginnend nach 24 h ein deutlicher Zellverlust, charakterisiert durch zunächst kleine Löcher in dem vorher geschlossenen Zellrasen, die mit zunehmender Inkubationsdauer immer größer wurden (Abb. 12). Dieser zytopathische Effekt konnte in den Kulturen, die Stx1 und den neutralisierenden Antikörper 13C4 enthielten, nicht beobachtet werden. Die Kulturen der Mediumkontrolle (vergleiche Abb. 4) erschienen ebenfalls unverändert.

Auch in der durchflusszytometrischen Analyse war ein Einfluss des Toxins auf die Mø zu erkennen. Die Anzahl vitaler Mø in % war im Versuchsansatz mit Stx1 signifikant geringer als in den Ansätzen mit Medium, LPS oder Stx1 + Ak. (Abb. 13).

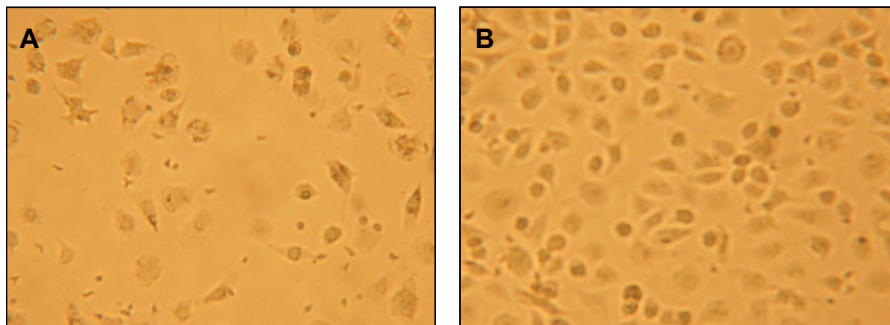


Abb. 12: Einfluss von Stx1 auf Vitalität von bovinen Mø

Lichtmikroskopische Aufnahme primärer boviner Mø nach 8 Tagen im Teflonbeutel, anschließender Aussaat und Anheftung in Plastikpetrischalen und 6-tägiger Inkubation in Medium mit Stx1 [A] oder Medium und Stx1 + Ak [B]. Originale Vergrößerung 400-fach.

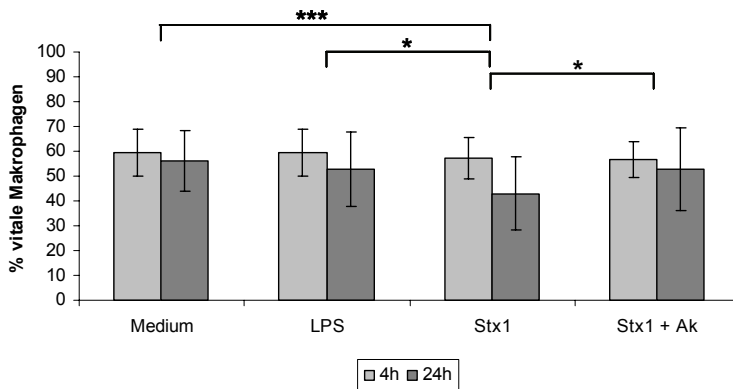


Abb. 13: Anteil vitaler Zellen Mø nach Inkubation mit Stx1

(n=8; Mittelwert ± Standardabweichung). Einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen; Korrektur nach Bonferroni.

4.1.5.2 Phänotypische Veränderungen

Nach Inkubation für 4 h bzw. 24 h mit 200 CD₅₀ Stx1/ml Medium zeigten die Zellen deutliche Abweichungen in der Intensität der Ausprägung ausgewählter Oberflächenantigene gegenüber der Inkubation mit LPS (100 ng/ml Medium) bzw. Stx1 + Ak (1,5 µg/ml Medium) (Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16). Entscheidend für den Grad der Veränderung war dabei, ob die Zellen gleichzeitig CD77 exprimierten. Die CD77-positiven Zellen zeigten sich durch das Toxin stärker beeinflusst als die CD77-negativen Zellen.

In der CD77-positiven Population zeigten bereits nach 4 h alle untersuchten Antigene außer MHC II eine signifikante Reduktion der MFLI im Ansatz mit Stx1 gegenüber dem Versuchansatz mit neutralisierendem Antikörper. Diese Reduktion war schwach signifikant für CD172a und CD80, signifikant für CD14 und sogar hoch signifikant für CD86. Für letzteres Antigen konnte im Ansatz mit LPS bereits nach 4 h eine signifikante Zunahme der MFLI gegenüber der Kontrolle mit Stx1 und neutralisierendem Antikörper beobachtet werden. Nach 24 h nahm die MFLI im Ansatz mit Stx1 für die genannten Antigene noch weiter ab, für MHC II allerdings zeigte sich eine leichte Zunahme der MFLI, dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant.

In der CD77-negativen Population war nach 4 h kein statistisch signifikanter Einfluss des Toxins auf die MFLI der Oberflächenantigene zu erkennen. Auch hier nahm die MFLI für CD86 nach LPS Einwirkung signifikant zu. Nach 24 h zeigten sich lediglich für CD14 und CD86 schwach signifikante Reduktionen der MFLI im Ansatz mit Stx1. MHC II erschien unverändert.

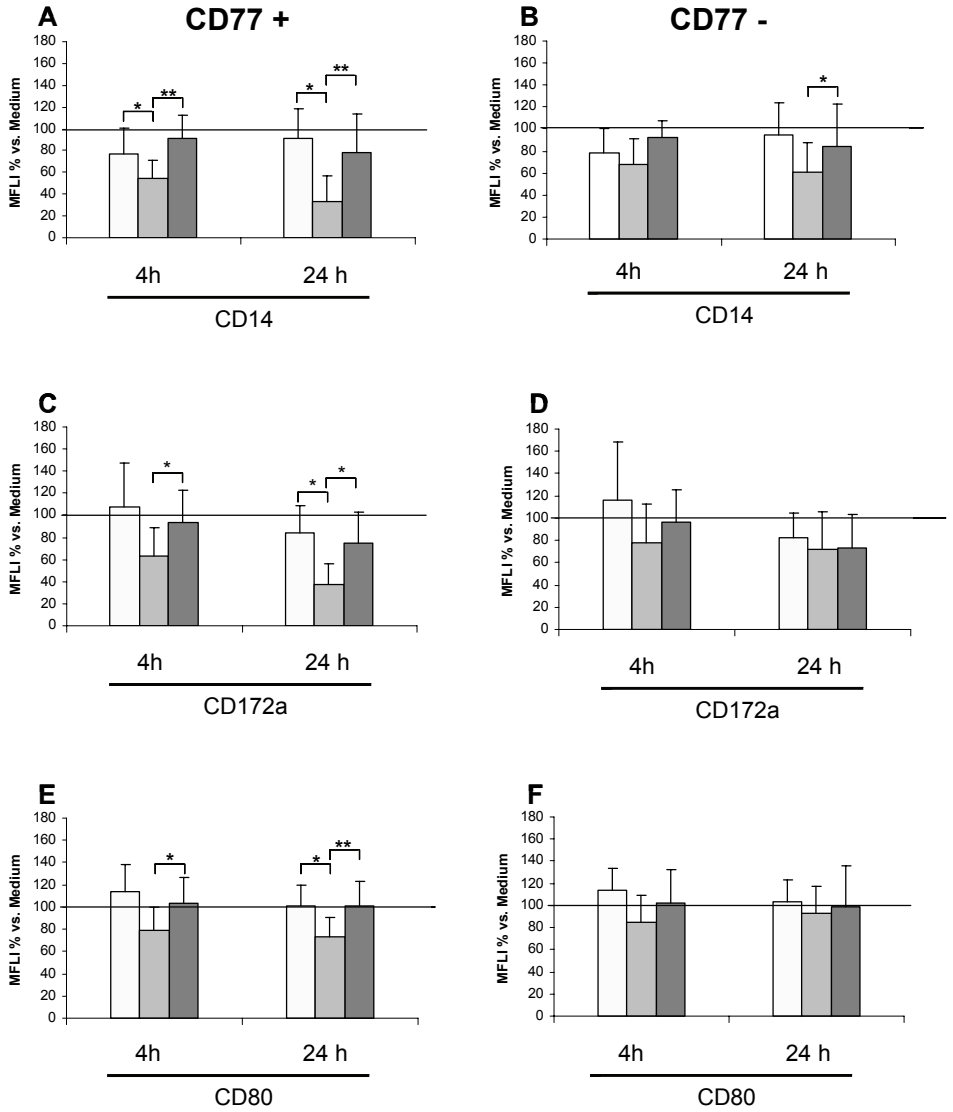


Abb. 14: Expression verschiedener Oberflächenantigene auf primären bovinen Mø nach Inkubation mit Stx1

Erläuterungen siehe nächste Seite

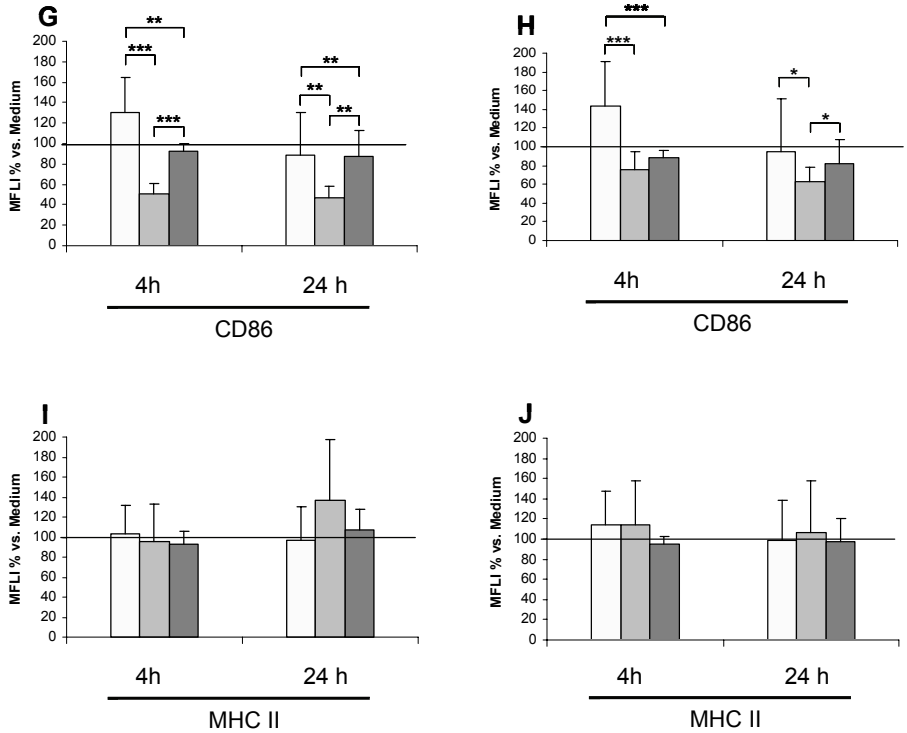


Abb. 14: (Fortsetzung)

Relative MFLI (Median/Min/Max) für verschiedene Antigene auf der Oberfläche nativer boviner primärer Mø normalisiert auf die Mediumkontrolle (=100% horizontale Linie). Die jeweiligen Antigene wurden nach 4 h (n=8) und 24 h (n=7) Inkubation mit LPS (weiß), Stx1 (hellgrau) oder Stx1 + Ak (dunkelgrau) quantifiziert. Die Abbildungen der linken Spalte zeigen die MFLI der CD77-positiven Zellen, die Abbildungen der rechten Spalte die MFLI für die CD77-negativen Zellen. Einfaktorielles Varianzanalyse mit Messwiederholungen. Korrektur nach Bonferroni.

ERGEBNISSE

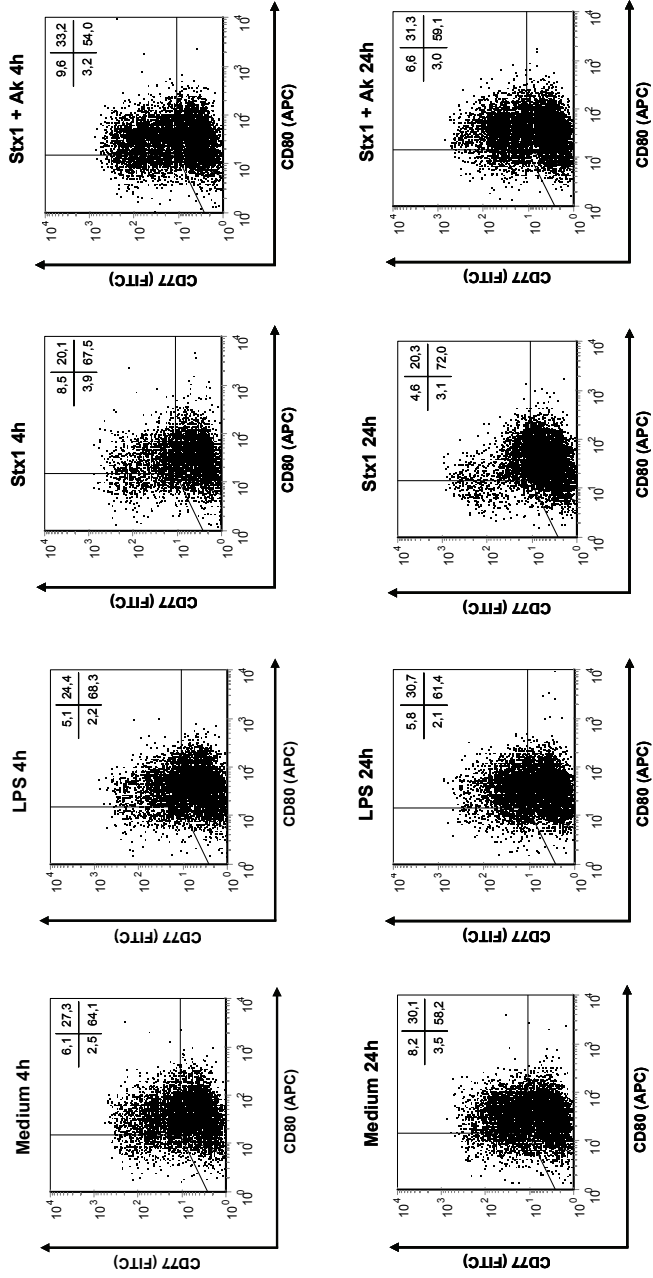


Abb. 15: Expression von CD80 auf bovinen M ϕ nach Inkubation mit Stx1

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der CD77 (y-Achse) bzw. CD80 (x-Achse)-Expression auf nativen bovinen M ϕ nach 4 h (obere Reihe) bzw 24 h (untere Reihe) Inkubation in Medium, LPS, Stx1 oder Stx1+Ak. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

ERGEBNISSE

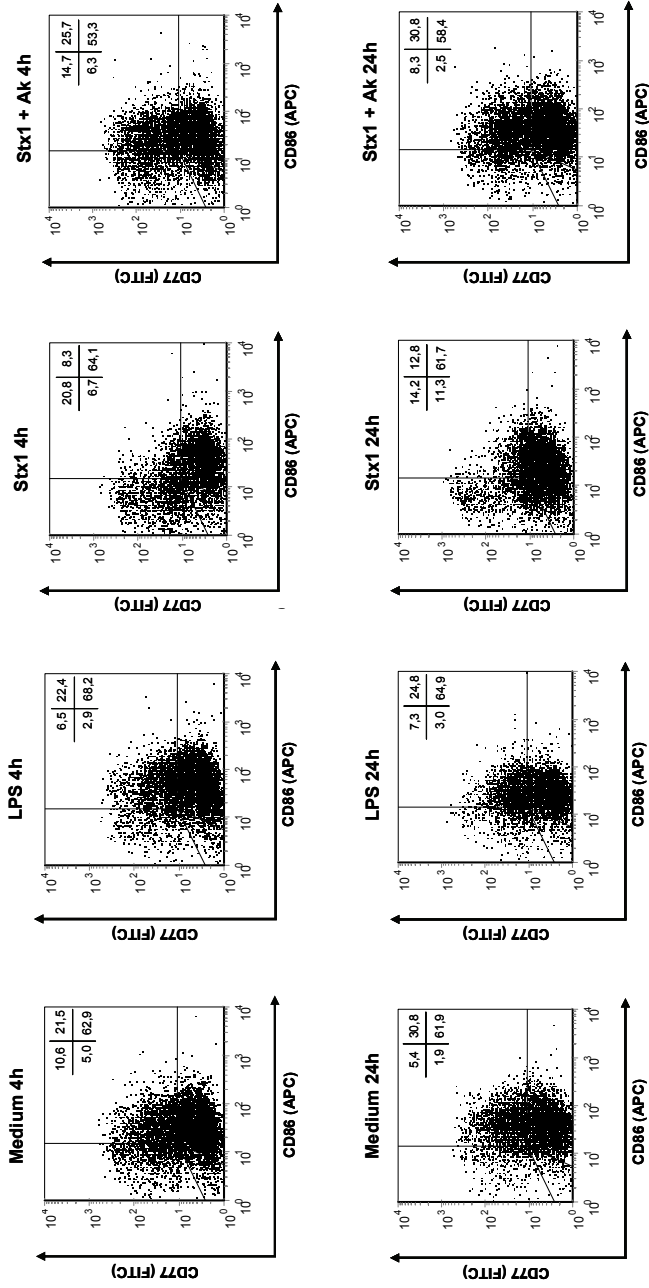


Abb. 16: Expression von CD86 auf bovinen M ϕ

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der CD77 (y-Achse) bzw. CD86 (x-Achse) Expression auf nativen bovinen M ϕ nach 4 h (obere Reihe) bzw 24 h (untere Reihe) Inkubation in Medium, LPS, Stx1 oder Stx1+Ak. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in % bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

4.1.5.3 Phagozytoseaktivität

Die Phagozytoseaktivität der Zellen wurde ebenfalls durch die Inkubation mit Stx1 beeinflusst. Wurde das Toxin 30 min vor den FITC-markierten Bakterien zum Versuchsansatz gegeben, zeigte sich ein schwach signifikanter Anstieg der Phagozytoseaktivität, normalisiert auf die Mediumkontrolle, im Vergleich zum Versuchsansatz mit Toxin und neutralisierendem Antikörper (Abb. 17). Dies war aber nur in zwei von drei Versuchen deutlich erkennbar. Bei zeitgleicher Zugabe der FITC-markierten Bakterien und Toxin oder der FITC-markierten Bakterien und Toxin plus Antikörper zeigte sich eine geringe Reduktion der Phagozytoseaktivität. Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

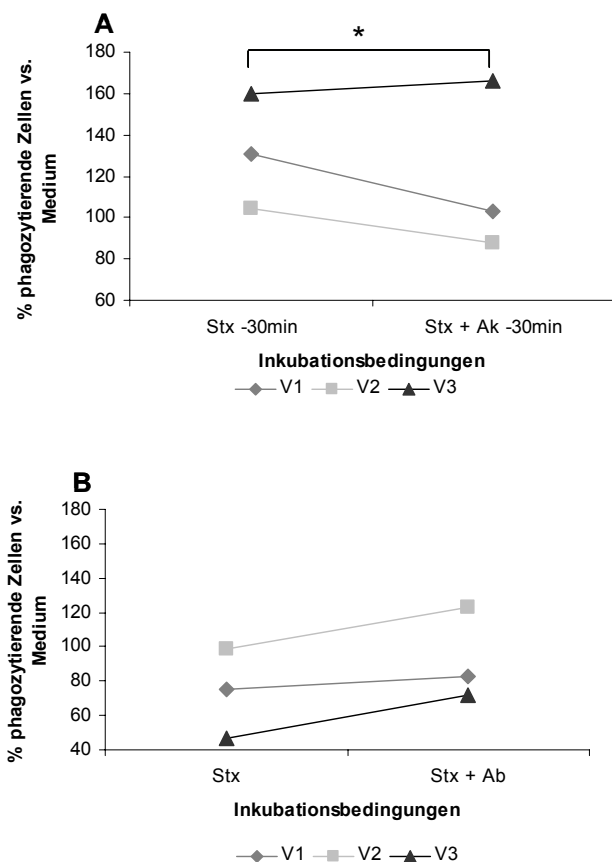


Abb. 17: Phagozytoseaktivität nativer primärer boviner Mø nach Stx1 Inkubation
Erläuterungen siehe nächste Seite

Zugabe des Toxins bzw. Toxin und Antikörper 30 Minuten vor Zugabe der opsonierten Bakterien **[A]** Zugabe des Toxins bzw. Toxin und Antikörper zeitgleich mit den opsonierten Bakterien **[B]**. Einfaktorische Varianzanalyse mit Messwiederholungen; Korrektur nach Bonferroni.

4.1.5.4 Transkription von Zytokin- und Chemokingenen

Eine 4-stündige Inkubation mit 200 CD₅₀ Stx1/ml Medium führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Transkripte, normalisiert auf die Mediumkontrolle, für die Zytokingene *il-4*, *il-6*, *il-10*, *ifn-γ* und *tnf-alpha* sowie für die Chemokingene *il-8* und *gro-α*, gegenüber der Kontrolle mit Stx1 + Ak (Abb. 18). Die Transkription von *tgfb*, *mcp-1* und *rantes* wurde durch Inkubation mit Stx1 nicht signifikant verändert.

Die Einwirkung von LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung der Transkripte der Gene für *il-12*, *ifn-γ*, *il-8* und *gro-α*. Alle anderen untersuchten Gene zeigten keine veränderte Transkriptionsaktivität.

Für die Inkubationsansätze mit Stx1 + Ak konnte im Vergleich zu den Ansätzen mit Stx1 eine deutlich geringere Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden.

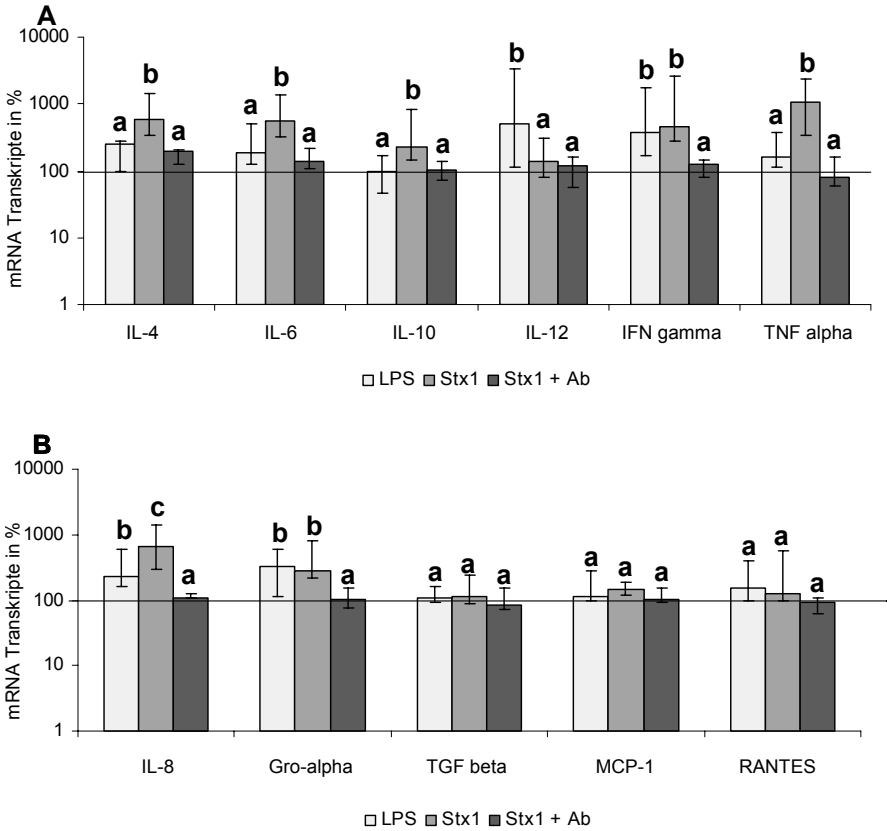


Abb. 18: Chemokin und Zytokingen-Transkription boviner Mø

Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA nach 4 h Inkubation der Zellen mit LPS, Stx1 oder Stx1 + Ak. Auf der y - Achse aufgetragen ist die relative Menge an Transkripten normalisiert auf die Mediumkontrolle (=100% horizontale Linie). Die Werte sind als Median mit Min/Max angegeben. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Werten an Einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen; Korrektur nach Bonferroni).

4.1.5.5 Nachweis von IL-10-Protein

In der Untersuchung der Überstände der Mø-Kulturen mittels ELISA (n=7) zeigte sich, dass nur im Versuchansatz mit LPS eine IL-10-Proteinkonzentration gemessen werden konnte, die signifikant höher lag als die der Mediumkontrolle. In den Ansätzen mit Stx1 und Stx1 + Ak entsprach der Proteingehalt des Überstandes dem der Mediumkontrolle (Abb. 19).

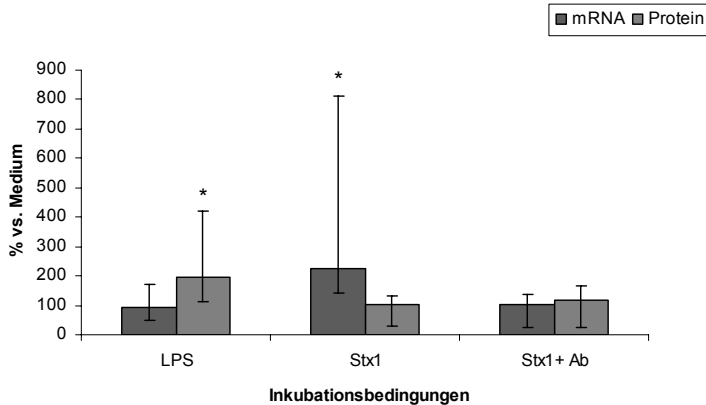


Abb. 19: IL-10 mRNA-Expression boviner Mø und Proteingehalt der Zellkulturüberstände

mRNA-Expression boviner Mø nach Inkubation mit LPS, Stx1 oder Stx1 + Ak im Vergleich mit der Proteinkonzentration von IL-10 in den betreffenden Zellkulturüberständen (n=7). Auf der y-Achse aufgetragen sind die Werte für mRNA bzw. Protein normalisiert auf die Mediumkontrolle (= 100% horizontale Linie). Auf der x-Achse aufgetragen sind die verschiedenen Inkubationsbedingungen. Student Newmans Keuls Test

4.2 Charakterisierung primärer boviner dendritischer Zellen (DC)

4.2.1 Morphologie

Nach Aufreinigung der CD14⁺ Monozyten wurden diese in einem Medium mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Einige Zellen hefteten sich an und bildeten lange Dendriten aus. Die meisten Zellen zeigten sich jedoch rund mit einem exzentrischen Kern und gingen nach einigen Stunden wieder in Suspension. Diese Zellen konnten später als dendritische Zellen identifiziert werden.

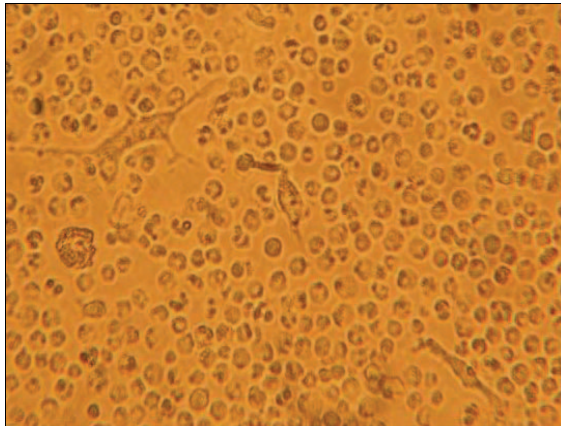


Abb. 20: Bovine dendritische Zellen (DC) in Kultur

Lichtmikroskopische Aufnahme aus Monozyten generierter primärer dendritischer Zellen nach 6 Tagen in Kultur. DC-Medium mit GM-CSF und IL-4. Originale Vergrößerung 400-fach.

4.2.2 Expression von Oberflächenantigenen inkl. CD77

Die Untersuchung der Oberflächenmarker der dendritischen Zellen erfolgte ebenfalls mittels DFZM-Analyse (n=3). Zu einem großen Teil (84,4 % +/- 2,2 %) exprimierten die Zellen CD11c, einen Marker für dendritische Zellen. Auch CD80 und CD86 sowie MHC II wurden ausgeprägt. CD80 jedoch mit 16,4 % +/- 10,5 % deutlich geringer als CD86 (65,2 % +/- 12 %). Das Antigen MHC II konnte auf 85,6 % +/- 5,3 % der DCs nachgewiesen werden. CD14 wurde nur auf 2,8 % +/- 2,1 % der Zellen detektiert. Die Bindung des CD77 Antikörpers konnte nur in sehr geringem Ausmaß (0,7 -1%) nachgewiesen werden (Abb. 21).

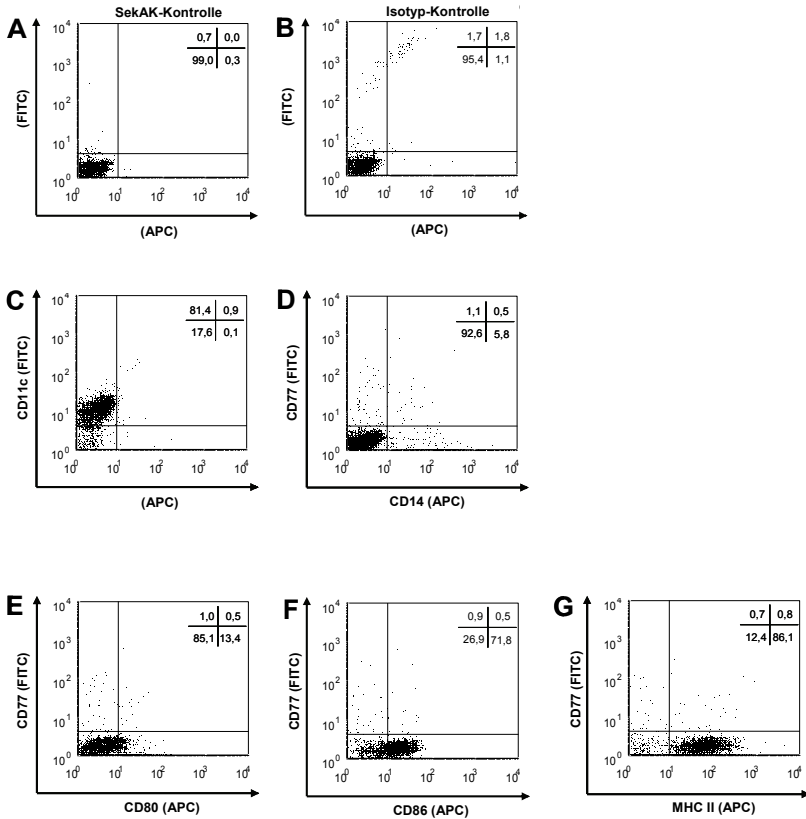


Abb. 21: Oberflächenantigen-Expression primärer boviner DCs

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenantigene primärer boviner DCs und ihrer CD77-Expression (n=3). Sekundärantikörperkontrolle **[A]**, Isotypkontrolle **[B]**, CD11c **[C]**, **[D-G]** doppelt gefärbt, auf der y-Achse CD77 auf der x-Achse CD14 **[D]**, CD80 **[E]**, CD86 **[F]**, MHC II **[G]**. Die Zahlen oben rechts im jeweiligen Dotplot geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in Prozent bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

4.2.3 Bindungsstudie mit rStxB1

Obwohl die Bindung des CD77-Antikörpers kaum nachweisbar war, konnte die rekombinante B-Untereinheit des Toxins an einen Teil der Zellen binden. Dabei war die Anzahl der Zellen, die die B-Untereinheit binden konnten, abhängig von der Konzentration in der die B-Untereinheit zugesetzt wurde. Bei sehr hohen Konzentrationen (100 µg) war bei fast der Hälfte der DCs die Bindung der B-Untereinheit nachzuweisen, bei einer mittleren Konzentration (12,5 µg) noch 30 %, bei niedrigen Konzentrationen (1,625 µg) konnte jedoch kaum noch eine Bindung nachgewiesen werden (Abb. 22 und Abb. 23).

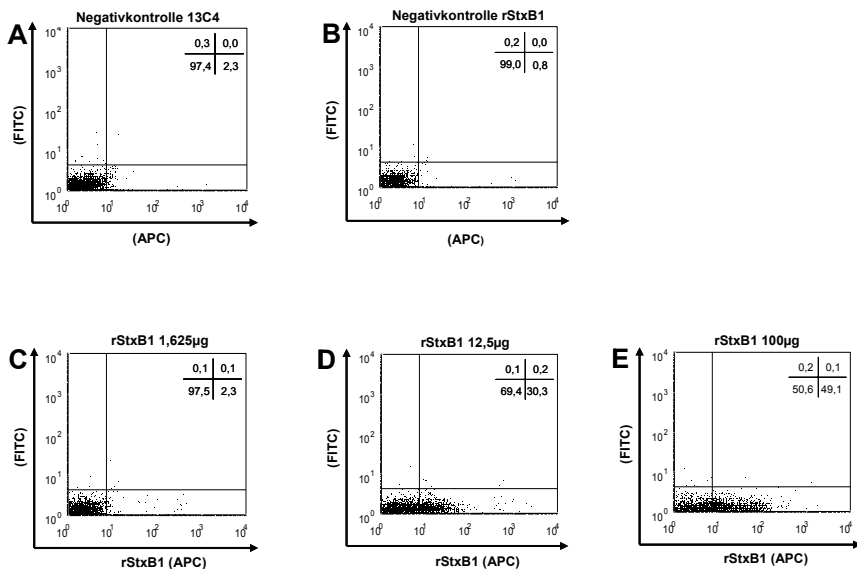


Abb. 22: Bindungsstudie für rStxB1 an primären bovinen DCs

Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung verschiedener Konzentrationen von rStxB1 an native primäre bovine DCs. Negativkontrolle Antikörper 13C4 ohne B-Untereinheit **[A]**, Negativkontrolle B-Untereinheit ohne Antikörper **[B]**. Bindung von rStxB1 an DCs bei verschiedenen Konzentrationen des rStxB1 **[C-E]**. Die Zahlen oben rechts geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in Prozent bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

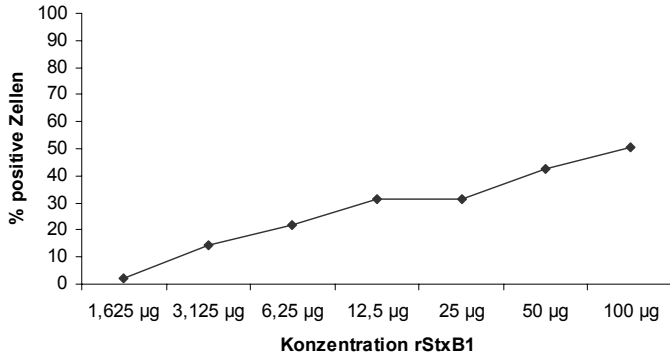


Abb. 23: Bindungsstudie von rStxB1 an primären bovinen DCs

Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung verschiedener Konzentrationen von rStxB1 an native primäre bovine DCs (n=1).

4.2.4 Einfluss von Stx1

Nach der Inkubation der DC mit 200 CD₅₀ Stx1/ml Medium für 4 h war weder der Anteil von Zellen, bei denen CD80, CD86, MHC II oder CD11c nachgewiesen werden konnte (Abb. 24), noch die MFLI (Abb. 25) für den Nachweis der Antigene signifikant verändert. Lediglich im Ansatz mit Stx1 und neutralisierendem Antikörper stieg die MFLI für CD14 deutlich an.

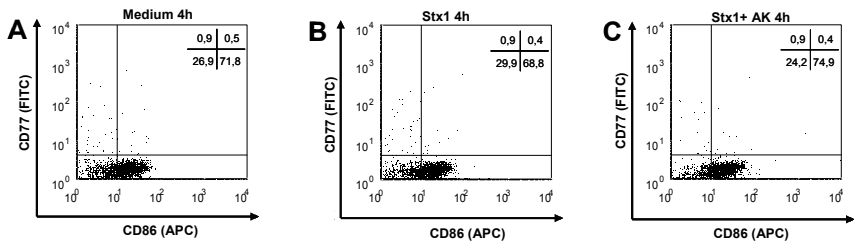


Abb. 24: Analyse der CD86-Expression primärer boviner DCs nach Inkubation mit Stx1

Repräsentative Darstellung (Dotplots) der durchflusszytometrischen Analyse der CD77 (y-Achse) bzw. CD86 (x-Achse)-Expression auf nativen, bovinen primären DCs nach 4 h Inkubation in Medium [A], Stx1 [B] oder Stx1 + Ak [C] (n=3). Die Zahlen oben rechts in den jeweiligen Dotplots geben den Anteil der Zellen in den Quadranten in Prozent bezogen auf morphologisch intakte Zellen an.

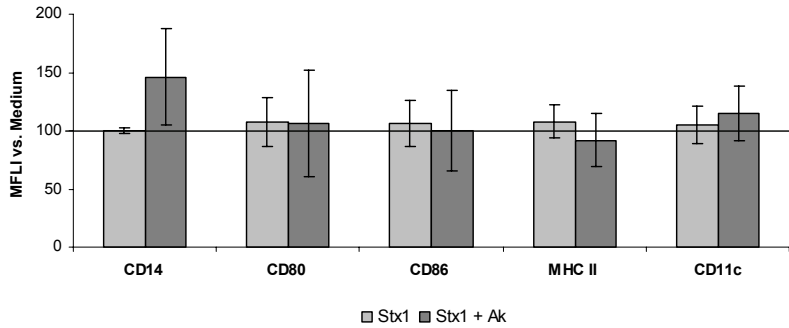


Abb. 25: Veränderung der MFI verschiedener Antigene auf primären bovinen DCs nach Inkubation mit Stx1 oder Stx1 + Ak

Normalisiert auf die Mediumkontrolle (= 100 % horizontale Linie), 4 h Inkubation mit Stx1 oder Stx1 + Ak (n=3) Mittelwert +/- Standardabweichung.

5 DISKUSSION

Mehrere Studien beschäftigten sich bereits mit dem Einfluss des Shigatoxins (Stx) von *Escherichia coli* auf Zellen des bovinen Immunsystems. So konnte man zeigen, dass Lymphozyten nach Stimulation durch Mitogene den Stx-Rezeptor Gb₃/CD77 exprimieren. Stx1 löst zwar keinen zytopathischen Effekt aus, die Zellen werden jedoch in ihrer Aktivierung und Proliferation *in vitro* gehemmt (143, 144). Weiterhin verändert Stx1 die Zytokin-Genexpression intraepithelialer Lymphozyten (142, 145, 152, 207). Andere Arten von Zellen, die bei enteralen Infektionen von Rindern mit Stx-bildenden *E. coli* (STEC) dem Toxin ausgesetzt werden, sind dagegen resistent gegenüber Stx. Bei bovinen Granulozyten löst Stx1 weder einen zytotoxischen Effekt aus, noch beeinflusst es die Phagozytose- oder *oxidative burst*-Leistung, da die Zellen CD77 nicht exprimieren (41). Primäre bovine Kolonepithelzellen sind zwar in der Lage CD77 zu synthetisieren, exprimieren den Rezeptor aber kaum auf ihrer Oberfläche und zeigen keine Reaktion auf das Toxin. In solchen Epithelzellkulturen wurde jedoch eine Population von vimentin-positiven Zellen nachgewiesen, die nicht epithelialen sondern mesenchymalen Ursprungs sind und CD77 auf der Oberfläche exprimieren. Nach Zugabe von Stx1 verschwinden diese Zellen aus den Kulturen. Eine aus diesen Vimentin-positiven Zellen etablierte Zelllinie zeigte ebenfalls eine hohe CD77-Expression und reagierte auf Stx1 mit einer veränderten Zytokin- und Chemokin-Genexpression. Aufgrund ihres Phänotyps wurden diese Zellen als Gewebsmakrophagen angesprochen (206).

Makrophagen (M ϕ) sind Induktor- und Effektorzellen des Immunsystems und steuern die Migration von Immunzellen in der Schleimhaut (136). Harrison *et al.* berichteten, dass die humane M ϕ -ähnliche Zelllinie THP-1, nach Stx-Einwirkung ein verändertes Zytokin- und Chemokin-Genexpressionsmuster sowie eine erhöhte mRNA-Stabilität zeigt (73). Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass M ϕ nach Einwirkung von Stx die Quelle proinflammatorischer Zytokine sind, die zur Gewebsschädigung im Verlauf einer STEC-Infektion beitragen. Lee *et al.* zeigten, ebenfalls anhand der THP-1-Zelllinie, dass die Einwirkung von Stx1 sowohl zur Aktivierung von Signalwegen, die zum Überleben der Zelle beitragen führt, als auch zur Aktivierung von Signalwegen, die in der Apoptose münden (115).

M ϕ könnte somit in mehrfacher Hinsicht eine Bedeutung im Verlauf der bovinen STEC-Infektion zukommen. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation an primären, aus dem Blut gesunder Rinder gewonnenen M ϕ untersucht, ob bovine M ϕ den Stx-Rezeptor tragen und ob das Toxin einen Einfluss auf morphologische und/oder funktionelle Parameter der Zellen hat. Es zeigte sich, dass bovinen M ϕ nicht nur CD77 oberflächlich exprimieren, sondern auf die Behandlung mit Stx1 außerdem mit einem veränderten Phänotyp, einem veränderten Zytokin- und Chemokin-Genexpressionsprofil und einer reduzierten Vitalität

reagieren. Neben Zellen des adaptiven Teils des Immunsystems, gehören damit auch Mø zu den Zielzellen für Shigatoxine beim Rind.

Zu Beginn der Studie stellte sich die Frage, ob die Untersuchungen mit Hilfe einer Zelllinie oder an primären Zellen durchgeführt werden sollten. Es stand eine permanente Zelllinie aus SV40-transfizierten bovinen peritonealen Mø zur Verfügung („Bomac“) (205). Untersuchungen von Taubert *et al.* (217) zeigten jedoch, dass sich die Reaktionen primärer boviner Mø von denen der Zelllinie, zum Beispiel im Hinblick auf die Phagozytoseaktivität, unterscheiden. Es kann daher vermutet werden, dass sich einige ursprüngliche Eigenschaften von peritonealen Mø durch die Transformation der Zelllinie oder über die Zeit verändert haben. Um den Einfluss von durch die Immortalisierung bedingten Artefakten auf die Untersuchungen zu vermeiden, wurden alle Versuche mit primären, aus Monozyten abgeleiteten Mø durchgeführt.

Zur Gewinnung der Mø wurde in einem ersten methodischen Ansatz das frisch gewonnene Vollblut direkt auf einen Ficollgradienten aufgeschichtet, die gewonnene mononukleäre Zellfraktion in RPMI 1640 Medium mit Phenolrot resuspendiert, in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Filter ausgesät und die nicht erwünschten Lymphozyten nach 24h abgespült (140). Die Monozyten hatten sich über Nacht am Plastikboden der Zellkulturflasche angeheftet. Die auf diese Weise erreichte Zellzahl war jedoch nicht zufriedenstellend. Ein weiteres Problem war die große Heterogenität der generierten Population und die sehr starke Anheftung der Zellen an den Boden der Zellkulturflasche. Daher wurde die Methode von Jungi *et al.* (93) leicht modifiziert und in allen weiteren Versuchen verwendet. Hierbei wird das Blut vor dem Auftragen auf den Ficollgradienten zentrifugiert und nur die Leukozytenfraktion auf den Gradienten aufgeschichtet. Die gewonnene mononukleäre Zellsuspension wird in IMDM Medium resuspendiert und in Teflonbeuteln inkubiert. Teflon ist inert und die Monozyten können nur locker an die Wände der Beutel adhären. Sie entwickeln sich daher nur bis zum Stadium des Promakrophagen. Nach acht Tagen wurde die Zellsuspension in einfache Plastikpetrischalen ausgesät, in denen sich die Promakrophagen anhefteten und zu reifen Mø differenzierten. Insgesamt war bei diesem Verfahren der materielle und zeitliche Aufwand der Zellkultivierung erheblich und es dauerte mehr als eine Woche bis ein geschlossener Zellrasen zur Durchführung der Experimente zur Verfügung stand. Die so generierten Zellen erwiesen sich allerdings sowohl innerhalb des Versuches, als auch zwischen den verschiedenen Isolationen als sehr homogen.

Ein ungewöhnliches Problem ergab sich, nachdem aufgrund der Resttoxizität für eukaryontische Zellen dem Medium kein Amphotericin B mehr zugesetzt werden sollte. Nach ca. drei bis vier Tagen Inkubation im Teflonbeutel zeigte sich eine Kontamination mit Trypanosomen. Hierbei könnte es sich um einen apathogenen Blutparasiten des Rindes, *Trypanosoma theileri*, handeln, der weltweit vorkommt und durch Bremsen übertragen wird.

Diese Organismen werden bei der Isolation der mononukleären Zellfraktion über den Ficollgradienten angereichert, überleben und vermehren sich in der Zellkultur. Die Kontamination führte zu einer Schädigung der Zellen und zu einer sehr schlechten Adhäsion nach der Aussaat in die Plastikpetrischale. Das Phänomen der Kontamination mit *T. theileri* in bovinen Zellkulturen wurde bereits von Løstrie-Trussart *et al.* beschrieben. Die Zugabe von 0,5 µg Amphotericin B pro ml Medium ist aber ausreichend, um das Wachstum der Parasiten zu unterdrücken, ohne die kultivierten Zellen zu beeinflussen (129). Deshalb wurde in dieser Studie entschieden Amphotericin B doch dem Medium zuzugeben. Eine Vermehrung von Trypanosomen in den Mø-Kulturen wurde danach nicht mehr beobachtet.

Ein weiteres Problem trat bei der Charakterisierung der Zellen mittels Immunfluoreszenz und durchflusszytometrischer Analyse auf. Die Mø nahmen Partikel des dem Medium als Indikator zugesetzten Phenolrots auf und zeigten daher im FL-2-(PE)-Kanal des Zytometers eine starke Hintergrundfluoreszenz. Um das Problem zu umgehen, wurden die Zellen nur noch in IMDM Medium ohne Phenolrot kultiviert. Zwar wiesen die Zellen auch weiterhin eine Autofluoreszenz auf, diese war aber viel geringer ausgeprägt und zeigte sich unspezifisch in verschiedenen Fluoreszenzkanälen.

Die am Plastik haftenden Mø ließen sich mit Hilfe von Trypsin nur schlecht oder gar nicht ablösen. Dieses Problem konnte durch den Einsatz von Accutase[®] gelöst werden. Die so gewonnenen Zellsuspensionen konnten durchflusszytometrisch analysiert werden. Die Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes ergab zwei deutlich unterscheidbare Populationen: große granulierten Zellen und deutlich kleinere, weniger granulierten Zellen. Diese beiden Populationen wurden jeweils getrennt voneinander analysiert.

Nach Permeabilisierung der geernteten Zellen konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse und Immunfluoreszenzmikroskopie in der Population großer, granulierter Zellen Vimentin in der typischen filamentären Struktur, aber kein Zytokeratin nachgewiesen werden. Es handelte sich also um Zellen mesenchymalen Ursprungs. Fast alle Zellen waren positiv für CD14, ein Protein, das vor allem auf Monozyten und Mø von Säugetieren vorkommt und als Teil des LPS-Rezeptors fungiert. CD172a, auch als signal-regulatorisches Protein alpha (SIRPα) bezeichnet, kommt vorwiegend auf bovinen Monozyten und Mø, Granulozyten, dendritischen Zellen (DC) und Neuronen vor und ist an der Regulation der Leukozytenadhäsion und Transmigration sowie der T-Zellaktivierung und Phagozytose beteiligt (42). Dieses Antigen war bei über 98 % der Zellen nachweisbar, genauso wie CD11b, ein Integrin, das auf Monozyten, Mø, Granulozyten und NK-Zellen vorkommt. Zusätzlich konnte MHC II detektiert werden, welches, neben B-Zellen, nur auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zu finden ist. Ein unterschiedlich großer Anteil der Zellpopulation exprimierte auch die kostimulatorischen Faktoren CD80 und CD86. CD3, typischerweise auf T-Zellen nachweisbar konnte nicht, und oberflächenständiges IgM, das

für B-Zellen charakteristisch ist, auf einem geringen Anteil der Zellen nachgewiesen werden. Die charakteristische Morphologie, sowie die Expression typischer Oberflächenantigene lassen darauf schließen, dass es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um bovine M ϕ handelte.

Das *in vitro* Modell stellt zweifellos eine von den *in vivo* im Darm herrschenden Bedingungen abweichende Situation dar, da die M ϕ isoliert betrachtet und nicht von anderen anwesenden Zellen und dem umgebenden Milieu beeinflusst werden. Daher sind die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die *in vivo* Situation übertragbar. Die Verwendung von in Teflonbeuteln angezüchteten und mittels Plastikadhärenz aufgereinigten, Monozyten-generierten M ϕ ist jedoch ein etabliertes Modell für initiale Untersuchungen bei entsprechende Fragestellungen (9, 58, 230, 231).

In der Mediumkontrolle waren im Mittel 32 % der nicht-permeabilisierten bovinen M ϕ positiv für CD77. Nach Permeabilisierung war der Rezeptor sogar im Mittel in 84 % der Zellen nachweisbar. Globotriaosylzeraamid (CD77) scheint demnach in den Zellen nicht nur nach Einwirkung von Stressoren *de novo* synthetisiert zu werden, wie von van de Kar *et al.* für humane Endothelzellen postuliert (229), sondern in bovinen M ϕ ständig in der Zelle gespeichert vorzuliegen.

Eine mögliche Wirkung des Stx auf Zellen ist an die zelluläre Expression des Rezeptors gebunden. Zellen, die CD77 nicht tragen, sind resistent gegenüber Stx. Unter bestimmten Bedingungen können auch ehemals resistente Zellen sensitiv, bzw. bereits empfängliche Zellen noch empfindlicher auf das Toxin reagieren. Nach Einwirkung verschiedener Substanzen, wie zum Beispiel LPS, IL-1 β oder TNF- α , beginnen Zellen den Rezeptor auszuprägen bzw. vermehrt auszuprägen (212, 229).

Der für den Nachweis von CD77 auf bovinen M ϕ verwendete Antikörper 38.13 wurde durch Verschmelzung von murinen Myelomzellen mit gegen Daudi-Zellen gerichteten Rattensplenozyten (244) hergestellt. Lanne *et al.* (110) wiesen mittels Dünnschichtchromatographie nach, dass 38.13 an CD77 bindet. Um sicherzustellen, dass CD77 auch auf bovinen M ϕ als Shigatoxin-Rezeptor fungiert, wurde eine Kompetitionsstudie mit anti-CD77 (38.13) und verschiedenen Konzentrationen einer rekombinanten Stx1 B-Untereinheit (rStxB1) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von rStxB1 die Bindung von 38.13 schon in geringen Konzentrationen verminderte, in mittleren Konzentrationsbereichen traten doppelt positive Zellen auf und bei hohen Konzentrationen wurde die 38.13-Bindung völlig unterdrückt. Dieses Ergebnis zeigt, dass der verwendete Antikörper gegen CD77 (38.13) auf bovinen M ϕ spezifisch an den Shigatoxin-Rezeptor bindet.

Der für die Neutralisation des Toxins verwendete Antikörper stammt vom Hybridomazellklon 13C4. Smith *et al.* (200) zeigten mittels einer Verdünnungsreihe von 13C4-Antikörpern, die

auf eine mit Gb₃ beschichtete Mikrotiterplatte aufgebracht wurde, dass dieser Antikörper die Bindung von Stx1 dosisabhängig hemmt. Bei den Kompetitionsstudien wurde 13C4 zur Detektion von rStxB1 verwendet und war auch noch in der Lage an rStxB1 zu binden, wenn dies bereits an die Oberfläche von Zellen gebunden hat. Alternative Rezeptoren für Stx wurden in der Literatur mehrfach postuliert (219, 51) ihre Existenz bzw. ihre funktionelle Bedeutung konnte jedoch nicht sicher bestätigt werden. Da in Lösung befindliches rStxB1 auch spontan Multimere ausbildet, waren nach Bindung der Multimere an einzelne Gb₃-Moleküle auf der Zelloberfläche möglicherweise immer noch rStxB1-Moleküle ohne Gb₃-Interaktion für die Bindung von 13C4 verfügbar.

Diverse Autoren beschreiben eine zytotoxische Wirkung von Stx auf verschiedene Zellarten, darunter auch Leukozyten (220). Während humane primäre Mø relativ insensitive gegenüber Stx sind, reagiert die humane Zelllinie THP-1 abhängig von ihrem Entwicklungszustand auf eine Behandlung mit dem Toxin. Undifferenzierte, monozytenähnliche Zellen unterliegen einer rapiden Apoptose, in differenzierten Mø-ähnlichen Zellen ist dieser Effekt reduziert und verzögert (113). In den mit primären bovinen Mø durchgeführten Versuchen war nach Toxineinwirkung im mikroskopischen Bild ebenfalls ein verzögerter (≥ 24 h) aber deutlicher zytopathischer Effekt zu sehen, der sich in größer werdenden Lücken im vorher konfluenten Zellrasen manifestierte. Die Kontrollen zeigten noch nach sechs Tagen Konfluenz. In der Durchflusszytometrie war dieser zytopathische Effekt ebenfalls zu erkennen. Der Anteil vitaler Mø an den Gesamtereignissen der Messung war gegenüber der Mediumkontrolle höchst signifikant ($p=0,0001$) und gegenüber der Kontrolle mit LPS ($p=0,043$) und der Kontrolle mit neutralisierendem Antikörper ($p=0,033$) schwach signifikant verringert. Der Signifikanzunterschied zwischen Mediumkontrolle und Antikörperkontrolle lag nicht in einem deutlich geringeren mittleren Anteil vitaler Mø, sondern in einer größeren Standardabweichung begründet. Möglicherweise war die Neutralisation nicht in allen Versuchen gleichmäßig, weil das Toxin nicht restlos gebunden wurde oder nicht gebundener freier Antikörper einen Einfluss auf die Zellen ausübte. Diese Varianzfaktoren waren in der unbehandelten Mediumkontrolle nicht vorhanden.

Für verschiedene Zellarten ist beschrieben, dass Stx im Rahmen der endoplasmatischen Stressreaktion die Induktion der Apoptose sowohl auf extrinsischem als auch intrinsischem Weg auslöst (112, 220). Ein weiterer Vorgang der zeitgleich mit Apoptosesignalen auftritt, sie aber auch abhängig von Stimulus und Zellart antagonisieren kann, ist die Autophagie (112). Lee *et al.* setzten in ihrer Untersuchung toxinsensitive und -resistente Zellen, die CD77 auf ihrer Oberfläche exprimierten, der Wirkung von Stx aus. In beiden Zelltypen fand die Formation von Autophagosomen statt, doch nur in den sensitiven Zellen konnte eine Aktivierung von Caspasen und Calpain beobachtet werden. Diese war verbunden mit der

Spaltung von Beclin-1 und *autophagy gene product-5* (Atg5) (246, 254) und verwandelte so ein Überlebenssignal der Zelle in ein Signal, das den Zelltod zur Folge hatte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Induktion der Autophagie eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung des Weges, den das Toxin in der Zelle nimmt, spielt und somit in resistenten Zellen zum Überleben beiträgt, indem es das Toxin daran hindert, pro-apoptotische Signale auszulösen. In dieser Studie wurden bovine Mø nach Einwirkung von Stx nicht auf Apoptosemarker untersucht, dies bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Nach Einwirkung von Stx1 konnten deutliche Veränderungen im Phänotyp der bovinen Mø festgestellt werden. Da die Wirkung von Stx1, wie von Mangeney *et al.* (135) beschrieben, von der Anwesenheit des Rezeptors CD77 abhängig ist, wurden die Zellen zur Untersuchung des Phänotyps in der Durchflusszytometrie nach Zellen, die für CD77 positiv bzw. negativ waren, unterschieden und die Zellpopulationen getrennt voneinander analysiert. Die Ergebnisse der Messungen der behandelten Zellen wurden auf die Mediumkontrolle normalisiert und dann verglichen. Während CD77-negative Zellen nach 4 h keine und nach 24 h nur schwach signifikante Veränderungen einiger untersuchter Oberflächenantigene zeigten, war in der Gruppe der CD77-positiven Zellen bereits nach 4 h die MFLI aller untersuchten Antigene außer MHC II signifikant verändert. Dieser Effekt hielt auch nach Ablauf von 24 h noch weiter an. Im Gegensatz dazu, war in beiden Populationen nach Einwirkung von LPS eine signifikante Erhöhung der MFLI für CD86 erkennbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Veränderungen in den mit Stx1 behandelten Zellen spezifisch für das Toxin sind. Die geringgradigen Veränderungen in der CD77-negativen Zellpopulation lassen sich möglicherweise damit erklären, dass die Zellen den Rezeptor schon komplett internalisiert hatten und daher durch das Toxin beeinflusst wurden bevor der Rezeptor in der Durchflusszytometrie nicht mehr nachweisbar war.

Die MFLI für CD14 wurde durch die Einwirkung von Stx1 signifikant geringer. Mehrere Studien beschreiben eine positive Korrelation der Reaktivität von Mø gegenüber LPS mit der Expression von CD14. Während transgene Mäuse, die humanes CD14 überexprimieren, hypersensitiv sind und mit einer erhöhten Letalitätsrate auf LPS reagieren, zeigen CD14-defiziente Mäuse eine Resistenz gegenüber der Einwirkung von LPS oder der Inokulation mit *E. coli* und entwickeln keine Schocksymptome (48, 76). Schon kurz nach der Einwirkung kommt es zu einer stark erhöhten Infiltration durch Neutrophile und in der Folge zu einer geringeren Bakteriämie und einer zehnmals schnelleren Beseitigung der gram-negativen Bakterien (76). Ein weiterer Faktor für die verbesserte Beseitigung könnte die geringere Produktion der Zytokine IL-1 und TNF- α sein, welche das Wachstum und die Invasivität gram-negativer Bakterien verbessern (131, 174). Suzuki *et al.* (215) zeigten, dass die Kombination von LPS und dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid in einer humanen

Mø-Zelllinie zur Apoptose führt, während die einzelnen Substanzen diesen Effekt nicht auslösen. Durch die Zugabe von Antikörpern gegen CD14 konnte die Apoptose jedoch signifikant vermindert werden. Das könnte darauf hindeuten, dass unter dem Einfluss eines Proteinsyntheseinhibitors mögliche, durch LPS beeinflusste anti-apoptotische Signalwege beeinträchtigt werden. Die gemeinsame Einwirkung von LPS und dem Proteinsyntheseinhibitor Stx ist mit dem experimentellen Ansatz mit LPS und Cycloheximid vergleichbar. Sollte dieser Effekt in bovinen Mø auftreten, wäre die Herunterregulation von CD14 ein effektiver Mechanismus der Apoptose zu entgegenen.

CD172a (syn SIRP α) zeigte nach Toxineinwirkung ebenfalls eine signifikant geringere MFLI. Ein Ligand für CD172a ist CD47 (236). Die Bindung von CD47 an CD172a reguliert die Phagozytoseaktivität in Mø gegenüber Wirtszellen herunter (163). Mäuse, denen die zytoplasmatische Domäne des Moleküls fehlt, zeigen eine Thrombozytopenie, was sich eventuell mit einer vermehrten Phagozytose durch Mø erklären lässt (250). Es wird vermutet, dass CD172a allgemein angeborene Immunfunktionen negativ reguliert und beim Menschen eine Bedeutung für die Homöostase von T-Zellen und NK-Zellen besitzt (116). Ebenso kann die Phosphorylierung von MAP-Kinasen durch CD172a beeinflusst werden. Eine stärkere CD172a-Expression bewirkt eine geringere Stimulation von NF κ B und AP-1 und macht die Zelle resistent gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose. Dagegen werden pro-inflammatorische Zytokine verstärkt produziert, wenn CD172 weniger stark exprimiert wird. Auch im Rahmen der TLR4-Aktivierung und damit der Reaktion auf LPS hat CD172a eine Bedeutung. Kong *et al.* postulieren, dass die Stärke der Expression von CD172a ein Kontrollmechanismus für die Stärke einer Immunreaktion sein könnte (102). In der vorliegenden Studie führte die Einwirkung von LPS auf bovine Mø allerdings nicht zu einer signifikanten Veränderung der MFLI für CD172a. Tendenziell zeigte sich nach 4 h LPS-Einwirkung eine leicht erhöhte und nach 24 h eine gering erniedrigte MFLI, während nach Stx1-Einwirkung in CD77-positiven Zellen die MFLI bereits nach 4 h deutlich erniedrigt war und nach 24 h noch weiter abfiel. In CD77-negativen Zellen zeigten sich ähnliche Tendenzen für die Wirkung von LPS und Stx, die jedoch nicht statistisch signifikant waren.

CD80 und CD86 kommen auf Mø und DCs vor und haben eine kostimulatorische Funktion bei der T-Zellaktivierung. Sie können auf T-Zellen sowohl den stimulatorischen Rezeptor CD28, als auch den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 binden. Aktivierte pro-inflammatorische Mø zeigen schnell eine vermehrte Expression von CD86 (54). Dies ist auch in der vorliegenden Studie der Fall. Bereits 4 h nach LPS-Einwirkung ist die MFLI für CD86 in CD77-positiven und -negativen Zellen signifikant erhöht. Nach 24 h ist die Expression in etwa wieder auf dem Ausgangsniveau der Mediumkontrolle. Für CD80 ist nach 4 h eine leicht, aber nicht signifikant, erhöhte MFLI feststellbar. Dies ist plausibel, da eine Veränderung der Expression von CD80 auf Mø nach LPS-Einwirkung erst nach 24 bis 48 h

zu erwarten ist (53). Freeman *et al.* (55) postulieren, dass CD86 ein entscheidendes kostimulatorisches Signal dafür ist, ob eine T-Zelle aktiviert wird oder in Anergie fällt. Im Gegensatz zur Wirkung von LPS, fiel nach Einwirkung von Stx1 in CD77-positiven Zellen die MFLI für CD86 schon nach 4 h deutlich ab und blieb nach Ablauf von 24 h auf diesem niedrigen Niveau. Dieser Effekt war in geringerem Maße auch in CD77-negativen Zellen zu sehen. Für CD80 zeigt sich eine signifikante Reduktion der Expression in den CD77-positiven Zellen ebenfalls bereits nach 4h.

Professionell antigenpräsentierende Zellen wie M ϕ oder DCs präsentieren über MHC II Peptide an T-Zellen. Nach Einwirkung von Stx1 auf bovine M ϕ waren für dieses Antigen keine statistisch signifikanten Änderungen nachweisbar. In den CD77-positiven Zellen zeigte sich nach 4h keine Änderung und nach 24h ein tendenzieller Anstieg der MHC II-Expression. Jedoch schwankten die Werte in den einzelnen Versuchen so stark, dass keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte. In den CD77-negativen Zellen war kein Effekt einer Behandlung auf die MHC II-Expression nachweisbar.

Im Weiteren wurde die Phagozytoseaktivität der bovinen M ϕ untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse auf die Mediumkontrolle normalisiert und dann verglichen. Die Zellen wurden entweder zuerst 30 min mit dem Toxin und dann mit opsonierten, FITC-markierten Bakterien inkubiert oder die Inkubation erfolgte zeitgleich. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche waren uneinheitlich. Bei zeitgleicher Zugabe von Toxin und Bakterien zeigte sich eine Reduktion der Phagozytoseaktivität gegenüber der Kontrolle mit neutralisiertem Toxin, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Bei der verzögerten Zugabe der Bakterien zeigte sich in zwei von drei Versuchen ein schwach signifikanter Anstieg der Phagozytoseaktivität gegenüber dem Ansatz mit neutralisiertem Toxin. Im dritten Versuch war der deutlichste Anstieg der Phagozytoseaktivität gegenüber der Mediumkontrolle erkennbar, allerdings nahezu kein Unterschied zwischen Toxin und neutralisiertem Toxin, möglicherweise hat hier die Neutralisation des Toxins nicht vollständig funktioniert. Um eine gesicherte Aussage über den Einfluss von Stx1 auf die Phagozytoseaktivität primärer boviner M ϕ treffen zu können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Die beiden Versuchsansätze könnten die Sequenz der Ereignisse *in vivo* widerspiegeln. Es wäre vorstellbar, dass M ϕ auf der Mukosa zeitgleich auf den Erreger und das Toxin treffen, während M ϕ in der Mukosa möglicherweise erst dem durch Resorption aufgenommenen Toxin ausgesetzt werden und dann auf eindringende Bakterien treffen. Shimada *et al.* (197) konnten zeigen, dass STEC in M ϕ aus Ratten noch einige Zeit überleben und vermehrt Toxin produzieren, das später über Exozytose freigesetzt wird. Dies führt zu einer höheren Konzentration von Toxin im umliegenden Gewebe. In dem Fall, dass die M ϕ auf der Mukosa, dem Erreger und seinem Toxin zeitgleich begegnen, ihre Phagozytoseaktivität leicht reduzieren, wäre zwar keine

Eliminierung aber eine Reduzierung der Erregeranzahl bei moderater Toxinproduktion möglich. In der Mukosa könnten die Verhältnisse dem zweiten Versuchsansatz entsprechen, da das Toxin aus dem Darmlumen eventuell leichter in die Mukosa eindringen kann als die Bakterien selbst. Die hier residenten Mø, könnten dann nach Toxineinwirkung ihre Phagozytoseaktivität verstärken und die eindringenden Erreger eliminieren, wodurch deren Toxinproduktion ansteigen würde. Die Zahl der Erreger und damit auch die Menge des produzierten Toxins in der Mukosa ist deutlich geringer als auf der Oberfläche der Mukosa. Möglicherweise reicht die Toxinkonzentration in der Mukosa so aus, um die residenten Mø zu schädigen oder auszuschalten. So wird es einigen Bakterien ermöglicht den Lymphknoten zu erreichen, ohne systemische Veränderungen zu verursachen. Eventuell stellt sich so ein Gleichgewicht zwischen Bakterien und Immunzellen ein, das eine permanente Besiedlung der Schleimhaut erlaubt aber keine schwerwiegenden Folgen für den Wirt hat.

Um auch die mögliche Wirkung von Stx1 auf das Zytokin- und Chemokinspektrum der Mø zu betrachten, wurde die Transkription einiger ausgewählter Gene untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse auf die Mediumkontrolle normalisiert und dann verglichen. Untersucht wurden die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , und TNF- α , sowie die Chemokine IL-8, GRO- α , TGF- β , MCP-1 und RANTES. Bei den Mø-Präparationen, die für die Untersuchungen in der RT-PCR verwendet wurden, können geringfügige Verunreinigungen mit Lymphozyten nicht ausgeschlossen werden. Es ist daher möglich, dass in einem geringen Umfang auch Gen-Transkripte aus diesen Lymphozyten gemessen wurden. Die Aussagekraft der RT-PCR ist auf die Transkription und das Vorhandensein der spezifischen mRNA beschränkt, es kann daher nur der Einfluss auf die Transkriptionsaktivität und nicht die tatsächliche Produktion von Proteinen beurteilt werden. Harrison *et al.* (73) führten eine Studie über den Einfluss von Stx auf humane Mø der THP-1 Zelllinie durch, in der nur ein kleiner Teil der nach den vorhandenen mRNA-Transkripten zu erwartenden Proteinmenge an IL-1 β nachgewiesen werden konnte. Die Menge an mRNA für TNF- α korrelierte dagegen mit der gemessenen Proteinmenge. Stx ist ein ribotoxisches Toxin, welches die Proteinbiosynthese hemmt. In der Folge kann die transkribierte mRNA nicht in Proteine umgesetzt werden. Dieser Vorgang bricht jedoch nicht abrupt direkt nach Toxinbindung ab. Der retrograde Transport der A-Untereinheit in der Zelle nimmt noch einige Zeit in Anspruch (73). Je nachdem wie schnell die Transkription eines Gens heraufreguliert wird, kann das entsprechende Protein noch weiter produziert werden oder nicht. Die Untersuchung der Transkription fand in dieser Arbeit nur zu einem Zeitpunkt, nämlich 4 h nach der Einwirkung des Stressors statt. Die gewonnenen Ergebnisse stellen also nur eine Momentaufnahme dar. Es kann nicht beurteilt werden, ob die Menge an mRNA erhöht ist, weil sie gerade angestiegen ist, oder ob sie schon höher angestiegen war und schon wieder im Abfall begriffen ist. Für eine eindeutige

Beurteilung müsste der Verlauf der Reaktion mittels Messungen zu weiteren Zeitpunkten verfolgt werden. Weiterhin beeinflusst Stx möglicherweise auch post-transkriptionelle Prozesse und die Freisetzung mancher Proteine (73). Daher muss für eine sichere Aussage das Protein selbst nachgewiesen werden. Dies ist im Rahmen dieser Studie nur für IL-10 geschehen, das mittels ELISA bestimmt wurde. Trotzdem geben die Ergebnisse Hinweise auf Unterschiede in der Reaktion auf LPS oder Stx1, die in weitergehenden Untersuchungen näher betrachtet werden sollten.

Zwischen den Zytokin- und Chemokinprofilen der Zellen aus der Mediumkontrolle und den Inkubationen mit LPS bzw. Stx1 zeigten sich signifikante Unterschiede. In Ansätzen mit Stx1 und Antikörper war die Transkriptionsaktivität deutlich geringer als in Ansätzen mit Stx1. Dies lässt vermuten, dass in diesen experimentellen Ansätzen die Neutralisierung des Toxins mittels Antikörper erfolgreich war. Die Reaktionen auf LPS oder Stx1 unterschieden sich deutlich voneinander. Nach Einwirkung von LPS traten signifikant häufiger Transkripte von *il-12*, *ifn-γ*, *il-8* und *gro-α* auf. Auch die Anzahl von Transkripten für *il-4*, *il-6* und *tnf-α* stieg geringfügig an. Die Herkunft der IFN-γ-Transkripte kann nicht eindeutig bestimmt werden, da neben den MØ auch die verunreinigenden Lymphozyten eine Quelle sein könnten. Das gleiche gilt für IL-4 und IL-10. Nach Einwirkung von Stx1 stieg die Zahl der Transkripte für *il-4*, *il-6*, *il-10*, *ifn-γ*, *tnf-α*, *il-8* und *gro-α* signifikant an. Für *tgf-β*, *mcp-1* und *rantes* zeigte sich unter keiner der verschiedenen Inkubationsbedingungen eine Veränderung in der Anzahl der Transkripte gegenüber der Mediumkontrolle.

Die mit LPS inkubierten bovinen MØ zeigten typische Merkmale eines klassisch aktivierten MØ, wie sie im Rahmen einer von Th1-Zellen geprägten Entzündungsreaktion auftreten. Klassisch aktivierte oder M1 MØ sind Effektorzellen, die hocheffektiv Mikroben eliminieren. Typischerweise produzieren sie pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-12, IFN-γ und TNF-α (151). Die Reaktion der Zellen auf LPS zeigt, dass die Zellen funktionell intakt und in der Lage sind, adäquat auf einwirkende Noxen zu reagieren.

Die mit Stx1 inkubierten MØ zeigen diesen klassischen Entzündungstyp nicht. Auch hier wurden pro-inflammatorische Moleküle heraufreguliert, die in einer durch Th1 geprägten Immunreaktion dominieren. Gleichzeitig zeigte sich ein Anstieg für Transkripte von Molekülen, die typisch für eine durch Th2-Zellen bestimmte Immunreaktion sind. Neben dem klassisch aktivierten MØ vom M1-Typ existiert außerdem der Typ des sogenannten alternativ aktivierten oder M2-MØ (150). Nach Einwirkung von IL-4 entwickeln sich MØ in diese Richtung. Mosser *et al.* beschreiben MØ vom M2-Typ jedoch nicht als einen definierten Zelltyp, sondern als eine Population von Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften, die sich in weitere Untergruppen einteilen lassen (151). Neben dem klassisch aktivierten M1-MØ beschreiben diese Autoren Wundheilungs-MØ und regulatorische MØ. Zusammenfassend postuliert der Autor, dass Mischformen aus allen MØ-Typen existieren, die je nach

Umgebungseinflüssen fließend ineinander übergehen können. Der in dieser Studie nach Inkubation mit Stx1 ausgeprägte Phänotyp entspricht am ehesten dem von Mosser *et al.* beschriebenen Typ II aktivierter Mø, die auch als regulatorische Mø bezeichnet werden. Typische Merkmale sind die gleichzeitige Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen, wobei IL-10, aber kein IL-12 produziert wird.

Für das Zytokin IL-10 wurde ein ELISA durchgeführt, um die tatsächliche Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand der verschiedenen Versuchsansätze zu bestimmen. Trotz des signifikanten Anstiegs der mRNA-Konzentration im Ansatz mit Stx1, konnte nur im Ansatz mit LPS eine im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant erhöhte Proteinmenge gemessen werden. Die Ansätze mit Stx1 und Stx1 + Ak zeigten keine Veränderung. Der Nachweis einer im Vergleich zur Mediumkontrolle geringen Erhöhung (200 %) der IL-10 Proteinkonzentration im Ansatz mit LPS, könnte auf eine TLR4-vermittelte endogene IL-10 Induktion hinweisen, die der Aktivierung durch IL-12 entgegenwirken soll, um durch die Immunreaktion bedingte Schäden zu verhindern (19). Die trotz erhöhter mRNA-Konzentrationen unveränderte Proteinkonzentration im Ansatz mit Stx1 könnte auf die ribotoxischen Eigenschaften des Toxins zurück zu führen sein. Ob tatsächlich kein Protein produziert wurde, zusätzlich noch post-translationale Prozesse oder die Freisetzung beeinträchtigt wurden, oder ob die Produktion des IL-10-Proteins zum Zeitpunkt der Messung noch nicht angelaufen war, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht eindeutig beurteilen.

Neben der Wirkung von Stx1 auf bovine Mø wurde in dieser Studie auch dessen Wirkung auf bovine DCs untersucht. Die Gewinnung der Monozyten für die Anzucht und Kultivierung boviner DCs erfolgte, im Unterschied zur Gewinnung für die Generierung von Mø, mittels Aufreinigung CD14-positiver Zellen mit Hilfe magnetischer Kügelchen. Dies war nötig, da bovine DCs nicht wie Mø stark, sondern nur locker adhären oder in Suspension bleiben. Die Lymphozyten konnten daher nicht wie bei den Mø einfach abgespült, sondern mussten bereits vor der Kultivierung entfernt werden. Aus den gewonnenen Monozyten wurden durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF und einer Inkubation für 7 Tage (180) DCs generiert. Die Zellen zeigten in der Durchflusszytometrie für DCs typische Oberflächenmarker. Sie waren positiv für CD11c, MHC II, CD80 und CD86, aber zum größten Teil negativ für CD14. Dieser Phänotyp entspricht dem in der Originalpublikation (180) beschriebenen und bestätigt, dass es sich bei den generierten Zellen tatsächlich um DCs handelt.

Im Gegensatz zu Mø zeigten bovine DCs keine Expression des Stx-Rezeptors CD77. Vereinzelt Nachweise in der Durchflusszytometrie (1-2 %) können auf einzelnen nicht vollständig zu DCs entwickelten Zellen beruhen. Da der CD77-Antikörper und StxB1 nicht

ausschließlich an die gleiche Isoform des Rezeptors binden, wurden diese Zellen in einem alternativen experimentellen Ansatz auf rStxB1-Bindungsstellen untersucht. Auch hier war in niedrigen Konzentrationen (1,625 µg/ml) keine und erst bei hohen Konzentrationen (12,5 µg/ml und 30 µg/ml) eine Bindung nachweisbar. Da in Mø bereits eine rStxB1-Konzentration von 0,1 µg/ml für den Nachweis einer Bindung ausreichend war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung von rStxB1 an DCs bei hohen Konzentrationen des Liganden unspezifisch ist.

Nach 4 h Inkubation mit dem Toxin bzw. dem neutralisierten Toxin zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Phänotyps der Zellen. Lediglich im Ansatz mit Stx1 und Antikörper war ein deutlicher Anstieg der MFLI für CD14 erkennbar. Hierbei handelt es sich aber vermutlich um ein Artefakt, aufgrund eines Problems, das schon bei früheren Versuchen der Arbeitsgruppe auftrat. Dabei bindet der Komplex aus Toxin und dem neutralisierenden Antikörper unspezifisch an die Zellen (möglicherweise an einen Fc-Rezeptor) und wird dann statt des gesuchten Antigens durch den Sekundärantikörper gebunden. Die gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Reaktion boviner DCs auf Stx1 sich deutlich von denen boviner Mø unterscheidet.

Im Verlauf der Pathogenese der Erkrankungen, die beim Menschen durch STEC ausgelöst werden können, reagieren humane Mø auf Shigatoxine mit einem pro-inflammatorischen Zytokinprofil. Es kommt zu einer klassischen Immunreaktion vom Th1-Typ. Die Gewebsalterationen werden dabei nicht nur durch die verschiedenen Virulenzfaktoren der Erreger einschließlich der Shigatoxine verursacht, sondern sind die Folge einer aggressiven Immunreaktion. Bei STEC-Infektionen von Rindern kommt es dagegen in den meisten Fällen nicht zu pathohistologischen Veränderungen. Treten Symptome der Infektion auf, sind diese nur gering ausgeprägt (243). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass auch in Rindern Mø die Schlüsselzellen für den Verlauf der Immunantwort nach Stx-Einwirkung sind. Im Gegensatz zu humanen Mø, lösen sie jedoch wahrscheinlich keine klassische, sondern eine alternative Entzündung aus (92). Das Modell der alternativen Entzündung geht davon aus, dass die Vermehrung von Mø des alternativen Typs nicht durch Rekrutierung von Blutmonozyten, sondern durch Proliferation der Mø im Gewebe erzielt wird. Hierdurch würde eine Rekrutierung inflammatorischer Zellen und die dadurch induzierte, potentielle Gewebsschädigung vermieden. Typische, von solchen Mø produzierte Zytokine sind IL-4 und IL-10 und nicht wie bei der klassischen Entzündung IL-12. IL-4 kann den Influx von Granulozyten blockieren und die Produktion pro-inflammatorischer chemotaktischer Substanzen in Mø herunterregulieren (49, 127). IL-10 schränkt durch seine dämpfende Wirkung auf Mø die Entzündung und damit den Schaden, der verursacht wird, ein. Gleichzeitig wird aber manchmal auch die vollständige Eradikation des auslösenden Agens

und damit die vollständige Heilung verhindert. Die Folge sind chronische oder persistierende Infektionen.

Die Stimulierbarkeit naiver und differenzierter T-Zellen durch verschiedene APC ist unterschiedlich. DCs sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind, naive T-Zellen zu stimulieren. Ihre Fähigkeit differenzierte T-Zellen zu stimulieren, ist viel schwächer ausgeprägt (107, 154). Diese Aufgabe wird hauptsächlich von M ϕ übernommen. Der Unterschied im Differenzierungszustand der T-Zelle hat außerdem einen Einfluss darauf, welche Signale vorhanden sein müssen, um die betreffende T-Zelle zu aktivieren. Naive T-Zellen aus Mäusen können allein durch die Bindung der kostimulatorischen Moleküle zur Proliferation und Zytokinausschüttung aktiviert werden, während in differenzierten Zellen zusätzlich IL-12 nötig ist. Die Anwesenheit von IL-12 bei der Stimulation naiver T-Zellen hat keinen zusätzlichen Effekt. Die Autoren schließen daraus, dass durch den kombinierten Einfluss von IL-12 und kostimulatorischer Signale sonst nicht-reaktive oder anergische T-Zellen zur Proliferation angeregt werden könnten (107, 154). Auch die Ausstattung der Zellen mit Oberflächenmarkern, speziell mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, hat Einfluss auf die Interaktion zwischen T-Zelle und APC. Ding *et al.* (39) beschreiben, dass die Menge der B7-Moleküle (CD80, CD86) auf der Zelloberfläche entscheidend für das Stattfinden einer effektiven Kostimulation ist. Yang *et al.* (251) berichten weiterhin, dass die Reifung und Entwicklung neonataler, humaner, naiver CD4-Zellen abhängig von der Menge der B7-Moleküle auf der stimulierenden APC ist. Werden die Zellen unter neutralen Bedingungen (keine Anwesenheit von Zytokinen) von APCs mit einer hohen Menge an B7-Molekülen auf der Oberfläche stimuliert, entwickeln sie sich eher zum Th2-Typ, bei geringerer Menge zum Th1-Typ. Wille *et al.* (245) führten eine Studie durch, in der das durch Stx in bovinen M ϕ ausgelöste Bild in Mäusen durch Zugabe von Antikörpern künstlich erzeugt wurde. IL-10 defiziente Knockout-Mäuse entwickeln normalerweise nach einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* eine fulminante Entzündungsreaktion und Schocksymptome, ausgelöst durch CD4-positive T-Zellen. Dies führt zu hohen Konzentrationen von IL-12 und IFN- γ im Serum und schließlich zum Tod der Tiere. Die Zugabe von Antikörpern nur gegen IL-12 oder B7-1/2 beeinflusste das Überleben der Tiere nicht. Wurden jedoch beide Signalwege gleichzeitig blockiert, überlebten die Tiere trotz ihres fehlenden IL-10 Bildungsvermögens. Die Neutralisation von IL-12 und die Blockade der Interaktion von CD40/CD40L allein waren ebenfalls nicht ausreichend, um die Entzündungsreaktion zu verhindern. Dies weist darauf hin, dass die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in diesem Fall der entscheidende Faktor für den Verlauf der Immunreaktion waren.

Intestinale M ϕ sind grundsätzlich in einem niedrig reagiblen Zustand, da sie nicht auf die ständig anwesenden bakteriellen Kommensalen reagieren dürfen. Abweichungen von diesem Status können zu chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie der *Inflammatory*

bowel disease (IBD) des Menschen führen. Infiziert sich ein Mensch mit STEC, so reagiert das Darmimmunsystem auf diese Störung mit einer klassischen Entzündungsreaktion. Zusätzliche Monozyten werden aus dem Blut rekrutiert und die inflammatorische Reaktion führt zu einer erhöhten Permeabilität der Schleimhautschanke, durch die nun vermehrt sowohl Bakterien, als auch von den Bakterien gebildetes und freigesetztes Toxin gelangen können. Dieser Vorgang setzt sich weiter fort, so dass die Immunreaktion die Situation verschlimmert (176).

Die Ergebnisse für bovine Mø deuten darauf hin, dass diese auf die Einwirkung von Stx1 nicht wie humane Mø mit einer klassischen Entzündung reagieren, sondern eine alternative Entzündungsreaktion auslösen. Die damit verbundene Proliferation von Gewebsmakrophagen statt einer Rekrutierung von Blutmonozyten würde die Integrität der Schleimhaut nicht negativ beeinflussen und damit das Eindringen des Erregers in die Mukosa erschweren. Die zunächst verminderte Phagozytoseaktivität von Mø auf der Mukosa, könnte die starke Akkumulation von Toxin in den Mø und dessen konzentrierte Freisetzung durch Exozytose verhindern. Die Mø in der Mukosa dagegen, steigern ihre Phagozytoseaktivität, um das Eindringen weiterer Erreger zu vermeiden. Die Anzahl der Erreger und die Menge des Toxins ist in der Mukosa jedoch deutlich geringer. Eventuell stellt sich so nach einiger Zeit ein Gleichgewicht zwischen den Immunzellen und dem Erreger ein. Neben ihrer Phagozytoseaktivität verändern bovine Mø nach Stx1-Einwirkung auch ihren Phänotyp. *In vitro* zeigten die Mø nach Stx1-Einwirkung eine deutliche Herabregulation des Oberflächenmoleküls CD14, was eventuell einen Mechanismus darstellt, der Apoptose zu entgehen. Intestinale Mø zeigen im Gegensatz zu anderen Gewebsmakrophagen und Blutmonozyten, aufgrund der im Darm anwesenden Kommensalen, auch ohne Einwirkung von Stx eine sehr niedrige Expression von CD14. Möglicherweise schützt diese Tatsache die intestinalen Mø *in vivo* teilweise vor der Zytotoxizität. Die Herabregulation des die Immunantwort negativ regulierenden CD172a, nach Stx1 Einwirkung, deutet auf proinflammatorische Vorgänge hin. Eine verminderte Expression von CD172a, führt gleichzeitig auch zu einer verringerten NO-Synthese und einer verminderten *oxidative-burst* Aktivität (4), was mit der beobachteten verminderten Phagozytoseaktivität im Einklang steht.

Mø sind verantwortlich für die Restimulation differenzierter T-Zellen. Der Wirkung von Stx1 ausgesetzte bovine Mø regulierten in dieser Studie die Anzahl der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche stark herunter. Die Menge der auf der Zelloberfläche befindlichen kostimulatorischen Moleküle ist entscheidend für eine effektive T-Zellstimulation (39). Die verminderte Verfügbarkeit kostimulatorischer Moleküle könnte also einen negativen Einfluss auf die Auslösung und den Verlauf einer T-Zellantwort haben, oder die T-Zellen sogar in Anergie fallen lassen. In Mäusen kann die Anwesenheit von IL-12 anergische T-Zellen auch bei geringer Kostimulation aktivieren. Bovine Mø zeigten nach

Stx1-Einwirkung keine vermehrte Transkription des IL-12-Gens. Die Expression von MHC II veränderte sich in mit Stx1 inkubierten Mø nicht signifikant.

Alle beobachteten Veränderungen der bovinen Mø nach Einwirkung von Stx1 weisen auf eine Entwicklung in Richtung eines von Mosser *et al.* (151) beschriebenen regulatorischen Mø hin, der sich durch eine erhöhte MHC II-Expression bei gleichzeitig verminderter Phagozytoseaktivität und einer reduzierten Fähigkeit Mikroben zu töten, sowie einer reduzierten Antigenpräsentation auszeichnet und auf die Proliferation von T-Zellen eher hemmend wirkt. Die Zusammensetzung der Immunzellen im Darm zwischen neugeborenen Kälbern und älteren Tieren unterscheidet sich stark (57). Der Umstand, dass Kälber manchmal eine blutige Diarrhoe nach STEC-Infektion zeigen, lässt sich eventuell durch die in dieser Studie beobachtete Resistenz boviner DCs gegen Stx erklären. Die Stimulation naiver T-Zellen durch DCs wird durch Stx vermutlich nicht beeinflusst. Beim ersten Kontakt mit dem Erreger könnte eine klassische entzündliche Reaktion ablaufen und die bekannten Symptome verursachen. Beim zweiten Kontakt mit dem Erreger und dem Toxin liegt die Aufgabe der Stimulation der differenzierten T-Zellen hauptsächlich bei den Mø, die sich aber durch die Toxineinwirkung in Richtung des regulatorischen und damit anti-inflammatorischen Phänotyps entwickeln.

Sowohl für den Menschen als auch für das Rind ist also die Beeinflussung der Funktionen der Mø durch das Stx entscheidend. Beim Menschen wird eine stark pro-inflammatorische Antwort ausgelöst, die zwar zur Eliminierung des Erregers, aber auch zur Schädigung des Wirtes führt. Beim Rind zeigt sich eine anti-inflammatorische Reaktion, die eine Schädigung des Wirtes vermeidet, dafür aber keine Eliminierung des Erregers erreicht. In beiden Fällen nutzt der Erreger eigentlich sinnvolle Abwehrstrategien zu seinem Vorteil aus. Auch andere Pathogene, wie zum Beispiel *Coxiella burnetii*, interferieren mit der Aktivierung von Mø oder induzieren die Entwicklung des regulatorischen Phänotyps (5, 15). Diese Art der Reaktion könnte die Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines Impfstoffs gegen STEC erklären, da das Toxin Mø anti-inflammatorisch beeinflusst und diese daher keine pro-inflammatorischen Zytokine produzieren. Dies ist aber notwendig, um eine protektive Immunantwort auszulösen (151). Die Ergebnisse dieser Studie stützen die Hypothese, dass Stx1 die immunologischen Funktionen boviner Mø moduliert und so eine inflammatorische Reaktion unterdrückt. Dies gilt für die primäre unspezifische Entzündungsreaktion, aber auch für ihren Einfluss auf das adaptive Immunsystem.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (STEC) sind in der globalen Rinderpopulation weit verbreitet. Nur selten treten Krankheitserscheinungen auf. Infizieren sich dagegen Menschen, zum Beispiel über kontaminierte Lebensmittel, Getränke oder den Kontakt zu infizierten Tieren, können STEC schwerwiegende Erkrankungen verursachen. Der wichtigste Virulenzfaktor dieser Erreger ist das namensgebende Shigatoxin (Stx). M ϕ und DC sind im Verlauf der Immunantwort die ersten Immunzellen, die das Eindringen von Pathogenen erkennen und bekämpfen. In der Pathogenese der humanen Erkrankung spielt die pro-inflammatorische Reaktion von M ϕ auf Stx eine entscheidende Rolle. In dieser Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass STEC bei Rindern über ihre Wirkung auf M ϕ das Immunsystem modulieren und eine stark inflammatorische Reaktion verhindern.

Zunächst wurde daher überprüft, ob die betreffenden Zellen den Rezeptor für das Stx (CD77) exprimieren und welche Veränderungen ihres Phänotyps und ihrer Funktion unter Einfluss von gereinigtem Stx1 beobachtet werden können. Dazu wurde die Wirkung von Stx1 auf primäre bovine M ϕ und DCs mittels Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie, reverser *Real Time* PCR und eines IL-10 ELISAs untersucht.

In den aus Blutmonozyten generierten Kulturen primärer boviner M ϕ , lag der Anteil der den Stx-Rezeptor CD77 tragenden nativen Zellen im Mittel bei 32 %. In fixierten und permeabilisierten Zellen, wurde der Rezeptor im Mittel in 84 % der Zellen nachgewiesen. In Bindungsversuchen mit der rekombinanten B-Untereinheit (rStxB) des Toxins, band diese je nach eingesetzter Konzentration an 30 – 50 % der nativen Zellen. In primären bovinen DCs konnte keine CD77-Rezeptorexpression beobachtet werden. Die Vitalität der M ϕ wurde durch die Inkubation mit Stx1 signifikant beeinträchtigt. Nach mehr als 24 Transkriptionsaktivität für die Zytokin- und Chemokingene *il-4*, *il-6*, *il-10*, *ifn- γ* , *tnf- α* , *il-8* und *gro- α* stieg gegenüber dem Kontrollansatz mit Stx1 plus neutralisierendem Antikörper signifikant an. In den im ELISA untersuchten Zellkulturüberständen der mit Stx1 inkubierten Zellen konnte, trotz der erhöhten Transkriptionsaktivität für *il-10*, keine erhöhte Konzentration an IL-10 Protein im Vergleich zur Mediumkontrolle nachgewiesen werden.

Bovine M ϕ exprimieren Stx-Rezeptoren, die bei bovinen DCs zu fehlen scheinen. Stx1 ist zytotoxisch für bovine M ϕ und verändert sowohl die Expression von Oberflächenantigenen, als auch die Transkriptionsaktivität für verschiedene Zyto- und Chemokingene. Bovine M ϕ , nicht jedoch DCs konnten somit als Zielzellen für Stx1 identifiziert werden. M ϕ spielen damit wahrscheinlich nicht nur im Verlauf der humanen sondern auch der bovinen STEC-Infektion jeweils eine entscheidende, jedoch gegensätzliche Rolle. Während die Reaktion der M ϕ auf das Toxin bei der humanen Infektion pro-inflammatorisch geprägt ist, ist die Reaktion bei der

bovinen Infektion eher anti-inflammatorisch. Diese Ergebnisse sind damit ein weiterer Schritt zum Verständnis der Wirtsadaptation von STEC an ihren Reservoirwirt Rind.

7 SUMMARY

Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are widespread in the cattle population worldwide but clinical symptoms caused by STEC are sparse in bovines. By contrast, human STEC infections, e.g. caused by consumption of contaminated food, beverages or contact with infected animals, may lead to severe clinical sequelae. The most important STEC virulence factor is the eponymous Shigatoxin (Stx). Macrophages (Mø) and dendritic cells (DC) are the first line of defense against invading pathogens. Stx-induced pro-inflammatory responses of Mø are central during the pathogenesis of human disease. In this study, we hypothesized that STEC also modulate the cattle immune system by acting on Mø and DC.

After testing whether bovine Mø and DCs express CD77, the receptor for Stx, further studies were conducted aiming at unveiling alterations in cellular phenotype and function upon incubation with purified Stx1. To this end, flow cytometry, immune fluorescence microscopy, reverse real time PCR, and IL-10 ELISA were deployed.

By average 32 % of native primary bovine Mø expressed CD77. In fixed and permeabilized cells an average of 84% of cells stained positive for CD77. The recombinant B-subunit of the toxin (rStxB1) bound to 30 – 50 % of native cells. Bovine primary DCs showed no CD77-expression. Mø vitality was significantly impaired by Stx1. Beginning 24 h after addition of Stx1 to the cultures, a distinct cytopathic effect was visible by light microscopy. In CD77-positive Mø Stx1 considerably altered the expression of surface antigens. Expression of CD14, CD172a and the costimulatory molecules CD80 and CD86 was significantly downregulated after 4 h of incubation with Stx1 while MHC II expression remained unaffected. Surface antigens on DCs appeared unaltered by Stx1. Mø phagocytosis was also affected by the toxin. Stx1 modified the transcriptional activity for different cyto- and chemokine genes. The number of transcripts for *il-4*, *il-6*, *il-10*, *ifn-γ*, *tnf-α*, *il-8* and *gro-α* increased significantly. Despite enhanced *il-10* transcription no elevated levels of IL-10 protein were detectable in culture supernatants of Stx1 challenged Mø, as compared to medium control.

The results illustrate that bovine Mø express CD77, which apparently is lacking on bovine DCs. Stx1 was cytotoxic for bovine Mø and altered the expression patterns of surface antigens as well as the cyto- and chemokine transcription profile. Bovine Mø must thus be considered target cells for Stx. Consequently, Mø play a central but opposite role in bovine and human STEC infection. While the immune response of Mø to Stx is pro-inflammatory in humans, Stx-induced effects in bovine Mø are primarily anti-inflammatory. These findings strengthen our understanding of the way STEC have adopted a commensal-like lifestyle in their reservoir host.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abshire, K. Z., and F. C. Neidhardt.** 1993. Growth rate paradox of *Salmonella typhimurium* within host macrophages. *J Bacteriol* **175**:3744-8.
2. **Acheson, D. W., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky, and G. T. Keusch.** 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* **64**:3294-300.
3. **Acuto, O., and F. Michel.** 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* **3**:939-51.
4. **Adams, S., L. J. van der Laan, E. Vernon-Wilson, C. Renardel de Lavalette, E. A. Dopp, C. D. Dijkstra, D. L. Simmons, and T. K. van den Berg.** 1998. Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. *J Immunol* **161**:1853-9.
5. **Agrawal, A., and B. Pulendran.** 2004. Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell Mol Life Sci* **61**:2859-65.
6. **Akashi, S., R. Shimazu, H. Ogata, Y. Nagai, K. Takeda, M. Kimoto, and K. Miyake.** 2000. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **164**:3471-5.
7. **Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**:675-80.
8. **Anderson, C. F., and D. M. Mosser.** 2002. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* **168**:3697-701.
9. **Andresen, R., J. Picht, and G. W. Lohr.** 1983. Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *J Immunol Methods* **56**:295-304.
10. **Appleman, L. J., and V. A. Boussiotis.** 2003. T cell energy and costimulation. *Immunol Rev* **192**:161-80.
11. **Arab, S., and C. A. Lingwood.** 1998. Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *J Cell Physiol* **177**:646-60.
12. **Austin, P. R., P. E. Jablonski, G. A. Bohach, A. K. Dunker, and C. J. Hovde.** 1994. Evidence that the A2 fragment of Shiga-like toxin type I is required for holotoxin integrity. *Infect Immun* **62**:1768-75.
13. **Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and C. Somoza.** 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* **366**:76-9.
14. **Behrendt, J. H., C. Hermosilla, M. Hardt, K. Failing, H. Zahner, and A. Taubert.** 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet Parasitol* **151**:97-109.
15. **Benoit, M., B. Barbarat, A. Bernard, D. Olive, and J. L. Mege.** 2008. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur J Immunol* **38**:1065-70.
16. **Bian, Y., S. Hiraoka, M. Tomura, X. Y. Zhou, Y. Yashiro-Ohtani, Y. Mori, J. Shimizu, S. Ono, K. Dunussi-Joannopoulos, S. Wolf, and H. Fujiwara.** 2005. The capacity of the natural ligands for CD28 to drive IL-4 expression in naive and antigen-primed CD4+ and CD8+ T cells. *Int Immunol* **17**:73-83.
17. **Bianchi, M. E.** 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**:1-5.
18. **Billadeau, D. D., J. C. Nolz, and T. S. Gomez.** 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* **7**:131-43.
19. **Boonstra, A., R. Rajsbaum, M. Holman, R. Marques, C. Asselin-Paturel, J. P. Pereira, E. E. Bates, S. Akira, P. Vieira, Y. J. Liu, G. Trinchieri, and A. O'Garra.**

2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* **177**:7551-8.
20. **Bour-Jordan, H., and J. A. Bluestone.** 2009. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* **229**:41-66.
21. **Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, J. G. Gribben, and L. M. Nadler.** 1996. The role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev* **153**:5-26.
22. **Brett, K. N., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 2003. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. *J Clin Microbiol* **41**:2716-22.
23. **Brossard, C., V. Feuillet, A. Schmitt, C. Randriamampita, M. Romao, G. Raposo, and A. Trautmann.** 2005. Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* **35**:1741-53.
24. **Brown, J. E., T. G. Obrig, M. A. Ussery, and T. P. Moran.** 1986. Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1 inhibits protein synthesis in reticulocyte lysates by inactivation of aminoacyl-tRNA binding. *Microb Pathog* **1**:325-34.
25. **Brunner, M. C., C. A. Chambers, F. K. Chan, J. Hanke, A. Winoto, and J. P. Allison.** 1999. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* **162**:5813-20.
26. **Burk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bulte, and E. Martlbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* **41**:2106-12.
27. **Burr, J. S., N. D. Savage, G. E. Messah, S. L. Kimzey, A. S. Shaw, R. H. Arch, and J. M. Green.** 2001. Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* **166**:5331-5.
28. **Calderwood, S. K., J. Theriault, P. J. Gray, and J. Gong.** 2007. Cell surface receptors for molecular chaperones. *Methods* **43**:199-206.
29. **Campi, G., R. Varma, and M. L. Dustin.** 2005. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* **202**:1031-6.
30. **Cario, E.** 2008. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* **24**:725-32.
31. **Cemerski, S., J. Das, E. Giurisato, M. A. Markiewicz, P. M. Allen, A. K. Chakraborty, and A. S. Shaw.** 2008. The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* **29**:414-22.
32. **Chambers, C. A., T. J. Sullivan, and J. P. Allison.** 1997. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* **7**:885-95.
33. **Chassin, C., S. Vimont, F. Cluzeaud, M. Bens, J. M. Goujon, B. Fernandez, A. Hertig, E. Rondeau, G. Arlet, M. W. Hornef, and A. Vandewalle.** 2008. TLR4 facilitates translocation of bacteria across renal collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* **19**:2364-74.
34. **Cherla, R. P., S. Y. Lee, P. L. Mees, and V. L. Tesh.** 2006. Shiga toxin 1-induced cytokine production is mediated by MAP kinase pathways and translation initiation factor eIF4E in the macrophage-like THP-1 cell line. *J Leukoc Biol* **79**:397-407.
35. **Curtsinger, J. M., C. S. Schmidt, A. Mondino, D. C. Lins, R. M. Kedl, M. K. Jenkins, and M. F. Mescher.** 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **162**:3256-62.
36. **de Chastellier, C., and P. Berche.** 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect Immun* **62**:543-53.

37. **DeGrandis, S., H. Law, J. Brunton, C. Gyles, and C. A. Lingwood.** 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem* **264**:12520-5.
38. **Deleault, K. M., S. J. Skinner, and S. A. Brooks.** 2008. Tristetraprolin regulates TNF TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Mol Immunol* **45**:13-24.
39. **Ding, L., and E. M. Shevach.** 1994. Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* **24**:859-66.
40. **Dustin, M. L., S. K. Bromley, Z. Kan, D. A. Peterson, and E. R. Unanue.** 1997. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3909-13.
41. **Eisenberg, T., C. Menge, and G. Baljer.** 2001. Granulocytes from sheep and cattle significantly differ in their sensitivity towards CD77-transduced apoptosis. *Immunobiology*:310.
42. **Ellis, J. A., W. I. Morrison, B. M. Goddeeris, and D. L. Emery.** 1987. Bovine mononuclear phagocytic cells: identification by monoclonal antibodies and analysis of functional properties. *Vet Immunol Immunopathol* **17**:125-34.
43. **Endo, Y., K. Mitsui, M. Motizuki, and K. Tsurugi.** 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* **262**:5908-12.
44. **Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara, and K. Igarashi.** 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* **171**:45-50.
45. **Erwig, L. P., and P. M. Henson.** 2007. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol* **171**:2-8.
46. **Falguieres, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero, and L. Johannes.** 2001. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* **12**:2453-68.
47. **Fearon, D. T., and R. M. Locksley.** 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**:50-3.
48. **Ferrero, E., D. Jiao, B. Z. Tsuberi, L. Tesio, G. W. Rong, A. Haziot, and S. M. Goyert.** 1993. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2380-4.
49. **Fine, J. S., A. Rojas-Triana, J. V. Jackson, L. W. Engstrom, G. S. Deno, D. J. Lundell, and L. A. Bober.** 2003. Impairment of leukocyte trafficking in a murine pleuritis model by IL-4 and IL-10. *Inflammation* **27**:161-74.
50. **Fischer, H., P. Ellstrom, K. Ekstrom, L. Gustafsson, M. Gustafsson, and C. Svanborg.** 2007. Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. *Cell Microbiol* **9**:1239-51.
51. **Flagler, M. J., S. S. Mahajan, A. A. Kulkarni, S. S. Iyer, and A. A. Weiss.** Comparison of binding platforms yields insights into receptor binding differences between shiga toxins 1 and 2. *Biochemistry* **49**:1649-57.
52. **Fraser, M. E., M. M. Chernaia, Y. V. Kozlov, and M. N. James.** 1994. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* **1**:59-64.
53. **Freedman, A. S., G. J. Freeman, K. Rhyhart, and L. M. Nadler.** 1991. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol* **137**:429-37.

54. **Freeman, G. J., A. S. Freedman, J. M. Segil, G. Lee, J. F. Whitman, and L. M. Nadler.** 1989. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol* **143**:2714-22.
55. **Freeman, G. J., J. G. Gribben, V. A. Boussiotis, J. W. Ng, V. A. Restivo, Jr., L. A. Lombard, G. S. Gray, and L. M. Nadler.** 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* **262**:909-11.
56. **Friedrichson, T., and T. V. Kurzchalia.** 1998. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**:802-5.
57. **Fries, P. N., Y. I. Popowych, L. Guan le, and P. J. Griebel.** Age-related changes in the distribution and frequency of myeloid and T cell populations in the small intestine of calves. *Cell Immunol* **271**:428-37.
58. **Garland, R. J., S. S. Kaneria, J. P. Hancock, C. G. Steward, and A. W. Rowbottom.** 1999. The use of Teflon cell culture bags to expand functionally active CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Methods* **227**:53-63.
59. **Garred, O., B. van Deurs, and K. Sandvig.** 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* **270**:10817-21.
60. **Gehrmann, M., G. Liebisch, G. Schmitz, R. Anderson, C. Steinem, A. De Maio, G. Pockley, and G. Multhoff.** 2008. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One* **3**:e1925.
61. **Gentry-Weeks, C. R., R. Karkhoff-Schweizer, A. Pikis, M. Estay, and J. M. Keith.** 1999. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **67**:2160-5.
62. **Gerber, J. S., and D. M. Mosser.** 2001. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* **166**:6861-8.
63. **Goerdts, S., and C. E. Orfanos.** 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* **10**:137-42.
64. **Gordon, S.** 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**:23-35.
65. **Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin.** 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**:221-7.
66. **Gratchev, A., P. Guillot, N. Hakiy, O. Politz, C. E. Orfanos, K. Schledzewski, and S. Goerdts.** 2001. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* **53**:386-92.
67. **Greene, J. L., G. M. Leytze, J. Emswiler, R. Peach, J. Bajorath, W. Cosand, and P. S. Linsley.** 1996. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J Biol Chem* **271**:26762-71.
68. **Greenwald, R. J., M. A. Oosterwegel, D. van der Woude, A. Kubal, D. A. Mandelbrot, V. A. Boussiotis, and A. H. Sharpe.** 2002. CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol* **32**:366-73.
69. **Grimm, M. C., P. Pavli, E. Van de Pol, and W. F. Doe.** 1995. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa—implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* **100**:291-7.
70. **Gross, J. A., E. Callas, and J. P. Allison.** 1992. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol* **149**:380-8.
71. **Harrison, L. M., R. P. Cherala, C. van den Hoogen, W. C. van Haaften, S. Y. Lee, and V. L. Tesh.** 2005. Comparative evaluation of apoptosis induced by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in human monocytic and macrophage-like cells. *Microb Pathog* **38**:63-76.
72. **Harrison, L. M., C. van den Hoogen, W. C. van Haaften, and V. L. Tesh.** 2005. Chemokine expression in the monocytic cell line THP-1 in response to purified shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides. *Infect Immun* **73**:403-12.
73. **Harrison, L. M., W. C. van Haaften, and V. L. Tesh.** 2004. Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. *Infect Immun* **72**:2618-27.

74. **Hasegawa, M., K. Yang, M. Hashimoto, J. H. Park, Y. G. Kim, Y. Fujimoto, G. Nunez, K. Fukase, and N. Inohara.** 2006. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem* **281**:29054-63.
75. **Hathcock, K. S., G. Laszlo, C. Pucillo, P. Linsley, and R. J. Hodes.** 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* **180**:631-40.
76. **Haziot, A., E. Ferrero, F. Kontgen, N. Hijiya, S. Yamamoto, J. Silver, C. L. Stewart, and S. M. Goyert.** 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* **4**:407-14.
77. **Hedlund, M., M. Svensson, A. Nilsson, R. D. Duan, and C. Svanborg.** 1996. Role of the ceramide-signaling pathway in cytokine responses to P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Exp Med* **183**:1037-44.
78. **Heyderman, R. S., M. Soriani, and T. R. Hirst.** 2001. Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends Microbiol* **9**:262-6.
79. **Hoey, D. E., L. Sharp, C. Currie, C. A. Lingwood, D. L. Gally, and D. G. Smith.** 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell Microbiol* **5**:85-97.
80. **Howard, C. J., G. P. Brooke, D. Werling, P. Sopp, J. C. Hope, K. R. Parsons, and R. A. Collins.** 1999. Dendritic cells in cattle: phenotype and function. *Vet Immunol Immunopathol* **72**:119-24.
81. **Howard, C. J., B. Charleston, S. A. Stephens, P. Sopp, and J. C. Hope.** 2004. The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Anim Health Res Rev* **5**:191-5.
82. **Hurley, B. P., C. M. Thorpe, and D. W. Acheson.** 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* **69**:6148-55.
83. **Ilani, T., G. Vasiliver-Shamis, S. Vardhana, A. Bretscher, and M. L. Dustin.** 2009. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* **10**:531-9.
84. **Inohara, N., and G. Nunez.** 2001. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* **20**:6473-81.
85. **Inohara, N., and G. Nunez.** 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**:371-82.
86. **Iordanov, M. S., D. Pribnow, J. L. Magun, T. H. Dinh, J. A. Pearson, S. L. Chen, and B. E. Magun.** 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol Cell Biol* **17**:3373-81.
87. **Ip, Y. T., and R. J. Davis.** 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**:205-19.
88. **Ishii, K. J., K. Suzuki, C. Coban, F. Takeshita, Y. Itoh, H. Matoba, L. D. Kohn, and D. M. Klinman.** 2001. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* **167**:2602-7.
89. **Jacewicz, M. S., D. W. Acheson, M. Mobassaleh, A. Donohue-Rolfe, K. A. Balasubramanian, and G. T. Keusch.** 1995. Maturation regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *J Clin Invest* **96**:1328-35.
90. **Jacewicz, M. S., M. Mobassaleh, S. K. Gross, K. A. Balasubramanian, P. F. Daniel, S. Raghavan, R. H. McCluer, and G. T. Keusch.** 1994. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin. *J Infect Dis* **169**:538-46.
91. **Janeway, C. A., Jr., U. Dianzani, P. Portoles, S. Rath, E. P. Reich, J. Rojo, J. Yagi, and D. B. Murphy.** 1989. Cross-linking and conformational change in T-cell receptors: role in activation and in repertoire selection. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 2**:657-66.

92. **Jenkins, S. J., D. Ruckerl, P. C. Cook, L. H. Jones, F. D. Finkelman, N. van Rooijen, A. S. MacDonald, and J. E. Allen.** Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**:1284-8.
93. **Jungi, T. W., M. Thony, M. Brcic, B. Adler, U. Pauli, and E. Peterhans.** 1996. Induction of nitric oxide synthase in bovine mononuclear phagocytes is differentiation stage-dependent. *Immunobiology* **195**:385-400.
94. **Kamada, N., T. Hisamatsu, S. Okamoto, T. Sato, K. Matsuoka, K. Arai, T. Nakai, A. Hasegawa, N. Inoue, N. Watanabe, K. S. Akagawa, and T. Hibi.** 2005. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol* **175**:6900-8.
95. **Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior.** 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **151**:775-82.
96. **Kerfoot, S. M., E. M. Long, M. J. Hickey, G. Andonegui, B. M. Lapointe, R. C. Zanardo, C. Bonder, W. G. James, S. M. Robbins, and P. Kubes.** 2004. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* **173**:7070-7.
97. **Keusch, G. T., D. W. Acheson, L. Aaldering, J. Erban, and M. S. Jacewicz.** 1996. Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells. *J Infect Dis* **173**:1164-70.
98. **Kiarash, A., B. Boyd, and C. A. Lingwood.** 1994. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem* **269**:11138-46.
99. **Kim, J. G., S. J. Lee, and M. F. Kagnoff.** 2004. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* **72**:1487-95.
100. **King, A. J., S. Sundaram, M. Cendoroglo, D. W. Acheson, and G. T. Keusch.** 1999. Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters. *J Infect Dis* **179**:503-7.
101. **Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**:194-9.
102. **Kong, X. N., H. X. Yan, L. Chen, L. W. Dong, W. Yang, Q. Liu, L. X. Yu, D. D. Huang, S. Q. Liu, H. Liu, M. C. Wu, and H. Y. Wang.** 2007. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha} contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med* **204**:2719-31.
103. **Kono, H., and K. L. Rock.** 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**:279-89.
104. **Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**:775-9.
105. **Koonin, E. V., and L. Aravind.** 2000. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* **25**:223-4.
106. **Krummel, M. F., and M. M. Davis.** 2002. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* **14**:66-74.
107. **Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri.** 1994. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* **180**:211-22.
108. **Kundig, T. M., A. Shahinian, K. Kawai, H. W. Mittrucker, E. Sebzda, M. F. Bachmann, T. W. Mak, and P. S. Ohashi.** 1996. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* **5**:41-52.

109. **Lakics, V., and S. N. Vogel.** 1998. Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages. *J Immunol* **161**:2490-500.
110. **Lanne, B., M. Jondal, and K. A. Karlsson.** 1996. Gal alpha 4Gal-binding antibodies: specificity and use for the mapping of glycolipids of Burkitt lymphoma and other human tumors. *Glycobiology* **6**:423-31.
111. **Lea, N., J. M. Lord, and L. M. Roberts.** 1999. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of Escherichia coli O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* **145 (Pt 5)**:999-1004.
112. **Lee, M. S., R. P. Cherla, M. H. Jenson, D. Leyva-Illades, M. Martinez-Moczygemba, and V. L. Tesh.** Shiga toxins induce autophagy leading to differential signalling pathways in toxin-sensitive and toxin-resistant human cells. *Cell Microbiol* **13**:1479-96.
113. **Lee, M. S., R. P. Cherla, E. K. Lentz, D. Leyva-Illades, and V. L. Tesh.** Signaling through C/EBP homologous protein and death receptor 5 and calpain activation differentially regulate THP-1 cell maturation-dependent apoptosis induced by Shiga toxin type 1. *Infect Immun* **78**:3378-91.
114. **Lee, S. Y., R. P. Cherla, I. Caliskan, and V. L. Tesh.** 2005. Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism. *Infect Immun* **73**:5115-26.
115. **Lee, S. Y., R. P. Cherla, and V. L. Tesh.** 2007. Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1. *Infect Immun* **75**:1291-302.
116. **Legrand, N., N. D. Huntington, M. Nagasawa, A. Q. Bakker, R. Schotte, H. Strick-Marchand, S. J. de Geus, S. M. Pouw, M. Bohne, A. Voordouw, K. Weijer, J. P. Di Santo, and H. Spits.** Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:13224-9.
117. **Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone.** 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**:233-58.
118. **Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, and W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxicigenic Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **69**:7549-53.
119. **Leutenegger, C. M., A. M. Alluwaimi, W. L. Smith, L. Perani, and J. S. Cullor.** 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* **77**:275-87.
120. **Leyva-Illades, D., R. P. Cherla, C. L. Galindo, A. K. Chopra, and V. L. Tesh.** Global transcriptional response of macrophage-like THP-1 cells to Shiga toxin type 1. *Infect Immun*.
121. **Lingwood, C. A., H. Law, S. Richardson, M. Petric, J. L. Brunton, S. De Grandis, and M. Karmali.** 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant Escherichia coli produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* **262**:8834-9.
122. **Linsley, P. S., J. Bradshaw, J. Greene, R. Peach, K. L. Bennett, and R. S. Mittler.** 1996. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* **4**:535-43.
123. **Linsley, P. S., W. Brady, L. Grosmaire, A. Aruffo, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter.** 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* **173**:721-30.
124. **Linsley, P. S., J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter, and R. Peach.** 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**:793-801.
125. **Linsley, P. S., P. M. Wallace, J. Johnson, M. G. Gibson, J. L. Greene, J. A. Ledbetter, C. Singh, and M. A. Tepper.** 1992. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* **257**:792-5.

126. **Liu, J., T. Akahoshi, T. Sasahana, H. Kitasato, R. Namai, T. Sasaki, M. Inoue, and H. Kondo.** 1999. Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **67**:6203-5.
127. **Loke, P., M. G. Nair, J. Parkinson, D. Guiliano, M. Blaxter, and J. E. Allen.** 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol* **3**:7.
128. **Los, J. M., M. Los, A. Wegrzyn, and G. Wegrzyn.** Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**:322-9.
129. **Lostrie-Trussart, N., J. J. Letesson, C. Didembourg, and A. Depelchin.** 1988. The use of amphoterin B in prevention of *Trypanosoma theileri* growth in bovine cell culture. *Vet Parasitol* **29**:9-17.
130. **Louise, C. B., S. A. Kaye, B. Boyd, C. A. Lingwood, and T. G. Obrig.** 1995. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect Immun* **63**:2766-9.
131. **Luo, G., D. W. Niesel, R. A. Shaban, E. A. Grimm, and G. R. Klimpel.** 1993. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infect Immun* **61**:830-5.
132. **Ma, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N. E. Miller, M. Hukkanen, G. F. Ma, and Y. T. Konttinen.** 2003. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* **60**:2334-46.
133. **Mainil, J. G., and G. Daube.** 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* **98**:1332-44.
134. **Malyukova, I., K. F. Murray, C. Zhu, E. Boedeker, A. Kane, K. Patterson, J. R. Peterson, M. Donowitz, and O. Kovbasnjuk.** 2009. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G78-92.
135. **Mangeney, M., C. A. Lingwood, S. Taga, B. Caillou, T. Tursz, and J. Wiels.** 1993. Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Res* **53**:5314-9.
136. **Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati.** 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**:677-86.
137. **Matzinger, P.** 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**:991-1045.
138. **McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, and A. H. Sharpe.** 1998. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* **165**:231-47.
139. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-7.
140. **Menge, C.** 2003. Protocols to study effects of Shiga toxin on mononuclear leukocytes. *Methods Mol Med* **73**:275-89.
141. **Menge, C.** 2006. Immunomodulatorische Wirkung und pathogenetische Bedeutung der *Escherichia coli* Shigatoxine beim Rind. Habilitationsschrift, Justus-Liebig Universität Giessen, Germany.
142. **Menge, C., M. Blessenohl, T. Eisenberg, I. Stamm, and G. Baljer.** 2004. Bovine ileal intraepithelial lymphocytes represent target cells for Shiga toxin 1 from *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**:1896-905.
143. **Menge, C., B. Neufeld, W. Hirt, R. Bauerfeind, G. Baljer, and L. H. Wieler.** 1999. Phenotypical characterization of peripheral blood leucocytes in the newborn calf. *Zentralbl Veterinarmed B* **46**:559-65.
144. **Menge, C., I. Stamm, M. Blessenohl, L. H. Wieler, and G. Baljer.** 2003. Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb3/CD77+ bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha. *Exp Biol Med* (Maywood) **228**:377-86.

145. **Menge, C., I. Stamm, P. M. Van Diemen, P. Sopp, G. Baljer, T. S. Wallis, and M. P. Stevens.** 2004. Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *J Med Microbiol* **53**:573-9.
146. **Menzies, M., and A. Ingham.** 2006. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol* **109**:23-30.
147. **Merritt, E. A., and W. G. Hol.** 1995. AB5 toxins. *Curr Opin Struct Biol* **5**:165-71.
148. **Mescher, M. F., J. M. Curtsinger, P. Agarwal, K. A. Casey, M. Gerner, C. D. Hammerbeck, F. Popescu, and Z. Xiao.** 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* **211**:81-92.
149. **Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer.** 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**:82-6.
150. **Mosser, D. M.** 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**:209-12.
151. **Mosser, D. M., and J. P. Edwards.** 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**:958-69.
152. **Moussay, E., I. Stamm, A. Taubert, G. Baljer, and C. Menge.** 2006. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **113**:367-382.
153. **Muraille, E., T. De Smedt, J. Urbain, M. Moser, and O. Leo.** 1995. B7.2 provides co-stimulatory functions in vivo in response to staphylococcal enterotoxin B. *Eur J Immunol* **25**:2111-4.
154. **Murphy, E. E., G. Terres, S. E. Macatonia, C. S. Hsieh, J. Mattson, L. Lanier, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. Murphy, and A. O'Garra.** 1994. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* **180**:223-31.
155. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
156. **Norcross, M. A.** 1984. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* **135D**:113-34.
157. **Nyholm, P. G., G. Magnusson, Z. Zheng, R. Norel, B. Binnington-Boyd, and C. A. Lingwood.** 1996. Two distinct binding sites for globotriaosyl ceramide on verotoxins: identification by molecular modelling and confirmation using deoxy analogues and a new glycolipid receptor for all verotoxins. *Chem Biol* **3**:263-75.
158. **O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson, and S. B. Formal.** 1982. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**:763-9.
159. **O'Loughlin, E. V., and R. M. Robins-Browne.** 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect* **3**:493-507.
160. **Obrig, T. G., C. B. Louise, C. A. Lingwood, B. Boyd, L. Barley-Maloney, and T. O. Daniel.** 1993. Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem* **268**:15484-8.
161. **Ogasawara, T., K. Ito, K. Igarashi, T. Yutsudo, N. Nakabayashi, and Y. Takeda.** 1988. Inhibition of protein synthesis by a Vero toxin (VT2 or Shiga-like toxin II) produced by *Escherichia coli* O157:H7 at the level of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes. *Microb Pathog* **4**:127-35.
162. **Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez.** 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**:4812-8.
163. **Okazawa, H., S. Motegi, N. Ohyama, H. Ohnishi, T. Tomizawa, Y. Kaneko, P. A. Oldenborg, O. Ishikawa, and T. Matozaki.** 2005. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol* **174**:2004-11.
164. **Oppenheim, J. J., and D. Yang.** 2005. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* **17**:359-65.

165. **Orange, J. S.** 2008. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **8**:713-25.
166. **Ouyang, D. Y., Y. Y. Wang, and Y. T. Zheng.** 2005. Activation of c-Jun N-terminal kinases by ribotoxic stresses. *Cell Mol Immunol* **2**:419-25.
167. **Pape, K. A., A. Khoruts, A. Mondino, and M. K. Jenkins.** 1997. Inflammatory cytokines enhance the in vivo clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4+ T cells. *J Immunol* **159**:591-8.
168. **Park, J. S., D. Svetkauskaite, Q. He, J. Y. Kim, D. Strassheim, A. Ishizaka, and E. Abraham.** 2004. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* **279**:7370-7.
169. **Pellizzari, A., H. Pang, and C. A. Lingwood.** 1992. Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry* **31**:1363-70.
170. **Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, K. Wojnoonski, and J. P. Allison.** 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* **21**:401-13.
171. **Philpott, D. J., C. A. Ackerley, A. J. Kiliaan, M. A. Karmali, M. H. Perdue, and P. M. Sherman.** 1997. Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am J Physiol* **273**:G1349-58.
172. **Poirier, K., S. P. Faucher, M. Beland, R. Brousseau, V. Gannon, C. Martin, J. Harel, and F. Daigle.** 2008. Escherichia coli O157:H7 survives within human macrophages: Global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infect Immun.*
173. **Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**:2085-8.
174. **Porat, R., B. D. Clark, S. M. Wolff, and C. A. Dinarello.** 1991. Enhancement of growth of virulent strains of Escherichia coli by interleukin-1. *Science* **254**:430-2.
175. **Porcheray, F., S. Viaud, A. C. Rimaniol, C. Leone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, and G. Gras.** 2005. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* **142**:481-9.
176. **Proulx, F., E. G. Seidman, and D. Karpman.** 2001. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* **50**:163-71.
177. **Ramegowda, B., and V. L. Tesh.** 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun* **64**:1173-80.
178. **Rudd, C. E., A. Taylor, and H. Schneider.** 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* **229**:12-26.
179. **Sakiri, R., B. Ramegowda, and V. L. Tesh.** 1998. Shiga toxin type 1 activates tumor necrosis factor-alpha gene transcription and nuclear translocation of the transcriptional activators nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Blood* **92**:558-66.
180. **Sallusto, F., and A. Lanzavecchia.** 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**:1109-18.
181. **Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg, and H. C. Krivan.** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect Immun* **58**:611-8.
182. **Sandvig, K., S. Olsnes, J. E. Brown, O. W. Petersen, and B. van Deurs.** 1989. Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from Shigella dysenteriae 1. *J Cell Biol* **108**:1331-43.
183. **Sandvig, K., K. Prydz, M. Ryd, and B. van Deurs.** 1991. Endocytosis and intracellular transport of the glycolipid-binding ligand Shiga toxin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **113**:553-62.

184. **Sandvig, K., M. Ryd, O. Garred, E. Schweda, P. K. Holm, and B. van Deurs.** 1994. Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol* **126**:53-64.
185. **Sandvig, K., and B. van Deurs.** 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* **76**:949-66.
186. **Sansonetti, P. J.** 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* **4**:953-64.
187. **Saxena, S. K., A. D. O'Brien, and E. J. Ackerman.** 1989. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **264**:596-601.
188. **Schaeffer, H. J., and M. J. Weber.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**:2435-44.
189. **Schebesch, C., V. Kodelja, C. Muller, N. Hakij, S. Bisson, C. E. Orfanos, and S. Goerdts.** 1997. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology* **92**:478-86.
190. **Schmidt, H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* **152**:687-95.
191. **Schwartz, J. C., X. Zhang, A. A. Fedorov, S. G. Nathenson, and S. C. Almo.** 2001. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* **410**:604-8.
192. **Schwartz, R. H.** 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**:1349-56.
193. **Schwartz, R. H., D. L. Mueller, M. K. Jenkins, and H. Quill.** 1989. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 2**:605-10.
194. **Sharpe, A. H., and G. J. Freeman.** 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**:116-26.
195. **Sheikh, S. Z., and S. E. Plevy.** The role of the macrophage in sentinel responses in intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* **26**:578-82.
196. **Shi, Y., J. E. Evans, and K. L. Rock.** 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**:516-21.
197. **Shimada, O., H. Ishikawa, H. Tosaka-Shimada, and S. Atsumi.** 1999. Exocytotic secretion of toxins from macrophages infected with *Escherichia coli* O157. *Cell Struct Funct* **24**:247-53.
198. **Shirey, K. A., L. E. Cole, A. D. Keegan, and S. N. Vogel.** 2008. *Francisella tularensis* live vaccine strain induces macrophage alternative activation as a survival mechanism. *J Immunol* **181**:4159-67.
199. **Siegler, R. L., T. J. Pysher, R. Lou, V. L. Tesh, and F. B. Taylor, Jr.** 2001. Response to Shiga toxin-1, with and without lipopolysaccharide, in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *Am J Nephrol* **21**:420-5.
200. **Smith, M. J., H. M. Carvalho, A. R. Melton-Celsa, and A. D. O'Brien.** 2006. The 13C4 monoclonal antibody that neutralizes Shiga toxin Type 1 (Stx1) recognizes three regions on the Stx1 B subunit and prevents Stx1 from binding to its eukaryotic receptor globotriaosylceramide. *Infect Immun* **74**:6992-8.
201. **Smith, P. D., C. Ochsenbauer-Jambor, and L. E. Smythies.** 2005. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* **206**:149-59.
202. **Smith, P. D., L. E. Smythies, M. Mosteller-Barnum, D. A. Sibley, M. W. Russell, M. Merger, M. T. Sellers, J. M. Orenstein, T. Shimada, M. F. Graham, and H. Kubagawa.** 2001. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* **167**:2651-6.
203. **Smith, W. E., A. V. Kane, S. T. Campbell, D. W. Acheson, B. H. Cochran, and C. M. Thorpe.** 2003. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **71**:1497-504.
204. **Smythies, L. E., M. Sellers, R. H. Clements, M. Mosteller-Barnum, G. Meng, W. H. Benjamin, J. M. Orenstein, and P. D. Smith.** 2005. Human intestinal macrophages

- display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* **115**:66-75.
205. **Stabel, J. R., and T. J. Stabel.** 1995. Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet Immunol Immunopathol* **45**:211-20.
206. **Stamm, I., M. Mohr, P. S. Bridger, E. Schropfer, M. König, W. C. Stoffregen, E. A. Dean-Nystrom, G. Baljer, and C. Menge.** 2008. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect Immun* **76**:5381-91.
207. **Stamm, I., M. Wuhrer, R. Geyer, G. Baljer, and C. Menge.** 2002. Bovine lymphocytes express functional receptors for *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Microb Pathog* **33**:251-64.
208. **Stamper, C. C., Y. Zhang, J. F. Tobin, D. V. Erbe, S. Ikemizu, S. J. Davis, M. L. Stahl, J. Seehra, W. S. Somers, and L. Mosyak.** 2001. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* **410**:608-11.
209. **Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig.** 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**:685-711.
210. **Stone, M. K., G. L. Kolling, M. H. Lindner, and T. G. Obrig.** 2008. p38 mitogen-activated protein kinase mediates lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induction of shiga toxin 2 sensitivity in human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* **76**:1115-21.
211. **Stout, R. D., C. Jiang, B. Matta, I. Tietzel, S. K. Watkins, and J. Suttles.** 2005. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* **175**:342-9.
212. **Stricklett, P. K., A. K. Hughes, Z. Ergonul, and D. E. Kohan.** 2002. Molecular basis for up-regulation by inflammatory cytokines of Shiga toxin 1 cytotoxicity and globotriaosylceramide expression. *J Infect Dis* **186**:976-82.
213. **Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**:135-40.
214. **Sutterwala, F. S., G. J. Noel, R. Clynes, and D. M. Mosser.** 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* **185**:1977-85.
215. **Suzuki, T., M. Kobayashi, K. Isatsu, T. Nishihara, T. Aiuchi, K. Nakaya, and K. Hasegawa.** 2004. Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide. *Infect Immun* **72**:1856-65.
216. **Takeda, K.** 2005. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **11**:51-5.
217. **Taubert, A.** 2010. Untersuchungen zur zellulären Immunantwort sowie zu wirtszellgebundenen Reaktionen gegen *Eimeria bovis*-Infektionen. Habilitation. Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen.
218. **Taubert, A., H. Zahner, and C. Hermosilla.** 2006. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet Parasitol* **142**:214-22.
219. **te Loo, D. M., L. A. Monnens, T. J. van Der Velden, M. A. Vermeer, F. Preyers, P. N. Demacker, L. P. van Den Heuvel, and V. W. van Hinsbergh.** 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* **95**:3396-402.
220. **Tesh, V. L.** Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* **5**:431-53.
221. **Thieblemont, N., and S. D. Wright.** 1997. Mice genetically hyporesponsive to lipopolysaccharide (LPS) exhibit a defect in endocytic uptake of LPS and ceramide. *J Exp Med* **185**:2095-100.
222. **Thorpe, C. M.** 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis* **38**:1298-303.

223. **Thorpe, C. M., B. P. Hurley, L. L. Lincicome, M. S. Jacewicz, G. T. Keusch, and D. W. Acheson.** 1999. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **67**:5985-93.
224. **Thorpe, C. M., W. E. Smith, B. P. Hurley, and D. W. Acheson.** 2001. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun* **69**:6140-7.
225. **Ting, L. M., A. C. Kim, A. Cattamanchi, and J. D. Ernst.** 1999. Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* **163**:3898-906.
226. **Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe.** 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**:541-7.
227. **Torgersen, M. L., N. Engedal, A. M. Pedersen, H. Husebye, T. Espevik, and K. Sandvig.** Toll-like receptor 4 facilitates binding of Shiga toxin to colon carcinoma and primary umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **61**:63-75.
228. **Utskarpen, A., R. Massol, B. van Deurs, S. U. Luvrak, T. Kirchhausen, and K. Sandvig.** Shiga toxin increases formation of clathrin-coated pits through Syk kinase. *PLoS One* **5**:e10944.
229. **van de Kar, N. C., L. A. Monnens, M. A. Karmali, and V. W. van Hinsbergh.** 1992. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* **80**:2755-64.
230. **van der Meer, J. W., J. S. van de Gevel, R. H. Beelen, D. Fluitsma, E. C. Hoefsmid, and R. van Furth.** 1982. Culture of human bone marrow in the teflon culture bag: identification of the human monoblast. *J Reticuloendothel Soc* **32**:355-69.
231. **van der Meer, J. W., J. S. van de Gevel, I. Elizenga-Claassen, and R. van Furth.** 1979. Suspension cultures of mononuclear phagocytes in the teflon culture bag. *Cell Immunol* **42**:208-12.
232. **Van Gool, S. W., J. Vermeiren, K. Rafiq, K. Lorr, M. de Boer, and J. L. Ceuppens.** 1999. Blocking CD40 - CD154 and CD80/CD86 - CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. *Eur J Immunol* **29**:2367-75.
233. **van Setten, P. A., L. A. Monnens, R. G. Verstraten, L. P. van den Heuvel, and V. W. van Hinsbergh.** 1996. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood* **88**:174-83.
234. **Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M. L. Dustin.** 2006. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**:117-27.
235. **Varma, R., and S. Mayor.** 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**:798-801.
236. **Vernon-Wilson, E. F., W. J. Kee, A. C. Willis, A. N. Barclay, D. L. Simmons, and M. H. Brown.** 2000. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1. *Eur J Immunol* **30**:2130-7.
237. **Viola, A., and A. Lanzavecchia.** 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* **273**:104-6.
238. **Wagner, P. L., D. W. Acheson, and M. K. Waldor.** 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**:1934-7.
239. **Waldvogel, A. S., B. M. Hediger-Weithaler, R. Eicher, A. Zakher, D. S. Zarlenga, L. C. Gasbarre, and V. T. Heussler.** 2000. Interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus. *Vet Immunol Immunopathol* **77**:201-12.

240. **Werling, D., O. C. Jann, V. Offord, E. J. Glass, and T. J. Coffey.** 2009. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol* **30**:124-30.
241. **Werling, D., and T. W. Jungi.** 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* **91**:1-12.
242. **Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis.** 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**:589-607.
243. **Wieler, L. H., G. Sobjinski, T. Schlapp, K. Failing, R. Weiss, C. Menge, and G. Baljer.** 2007. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **120**:296-306.
244. **Wiels, J., M. Fellous, and T. Tursz.** 1981. Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:6485-8.
245. **Wille, U., E. N. Villegas, L. Craig, R. Peach, and C. A. Hunter.** 2002. Contribution of interleukin-12 (IL-12) and the CD28/B7 and CD40/CD40 ligand pathways to the development of a pathological T-cell response in IL-10-deficient mice. *Infect Immun* **70**:6940-7.
246. **Wirawan, E., L. Vande Walle, K. Kersse, S. Cornelis, S. Claerhout, I. Vanoverberghe, R. Roelandt, R. De Rycke, J. Verspurten, W. Declercq, P. Agostinis, T. Vanden Berghe, S. Lippens, and P. Vandenabeele.** Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* **1**:e18.
247. **Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison.** 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**:1431-3.
248. **Wulfig, C., J. D. Rabinowitz, C. Beeson, M. D. Sjaastad, H. M. McConnell, and M. M. Davis.** 1997. Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *J Exp Med* **185**:1815-25.
249. **Wulfig, C., C. Sumen, M. D. Sjaastad, L. C. Wu, M. L. Dustin, and M. M. Davis.** 2002. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol* **3**:42-7.
250. **Yamao, T., T. Noguchi, O. Takeuchi, U. Nishiyama, H. Morita, T. Hagiwara, H. Akahori, T. Kato, K. Inagaki, H. Okazawa, Y. Hayashi, T. Matozaki, K. Takeda, S. Akira, and M. Kasuga.** 2002. Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem* **277**:39833-9.
251. **Yang, L. P., C. E. Demeure, D. G. Byun, N. Vezzio, and G. Delespesse.** 1995. Maturation of neonatal human CD4 T cells: III. Role of B7 co-stimulation at priming. *Int Immunol* **7**:1987-93.
252. **Yokosuka, T., W. Kobayashi, K. Sakata-Sogawa, M. Takamatsu, A. Hashimoto-Tane, M. L. Dustin, M. Tokunaga, and T. Saito.** 2008. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* **29**:589-601.
253. **Yokosuka, T., and T. Saito.** The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* **340**:81-107.
254. **Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner, and H. U. Simon.** 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**:1124-32.
255. **Yuhas, Y., A. Weizman, G. Dinari, and S. Ashkenazi.** 1995. An animal model for the study of neurotoxicity of bacterial products and application of the model to demonstrate that Shiga toxin and lipopolysaccharide cooperate in inducing neurologic disorders. *J Infect Dis* **171**:1244-9.
256. **Zaru, R., C. P. Berrie, C. Iurisci, D. Corda, and S. Valitutti.** 2001. CD28 co-stimulates TCR/CD3-induced phosphoinositide turnover in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **31**:2438-47.

257. **Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **40**:1441-6.
258. **Zhang, X., and D. M. Mosser.** 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* **214**:161-78.
259. **Zheng, J., S. Cui, L. D. Teel, S. Zhao, R. Singh, A. D. O'Brien, and J. Meng.** 2008. Identification and characterization of Shiga toxin type 2 variants in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and humans. *Appl Environ Microbiol* **74**:5645-52.

9 ANHANG

9.1 Puffer und Lösungen

Citratlösung (3,8 %)

| | |
|--|-----------|
| Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O | 38,0 g |
| A. dest. | 1000,0 ml |

Erythrozythen-Lyse-Puffer

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

HEPES – Puffer-Stammlösung

10 x; pH 7,4

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

HEPES – Puffer (1 x, pH 7,4)

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

HEPES-Puffer + EDTA (0,1 %)

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

NaCl-Lösung (0,89 %)

| | |
|----------|-----------|
| NaCl | 8,9 g |
| A. dest. | 1000,0 ml |

PBS – Stammlösung 10 x (pH 7,4)

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

PBS – Puffer (pH 7,4)

| | |
|----------------------|--------------|
| PBS 10 x Stammlösung | 100,0 ml |
| A. dest. | ad 1000,0 ml |

PBS/BSA (1 %)

| | |
|--------------------|-----------|
| BSA | 10,0 g |
| PBS – Puffer (1 x) | 1000,0 ml |

PBS – EDTA – Stammlösung
10 x (pH 7,4)

| | |
|---|-----------|
| NaCl | 80,0 g |
| KCl | 2,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 14,2 g |
| Na – EDTA x H ₂ O | 20,0 g |
| A. dest. | 1000,0 ml |

PBS – EDTA – Puffer (pH 7,4)

| | |
|-----------------------------|--------------|
| PBS – EDTA 10 x Stammlösung | 100,0 ml |
| A. dest. | ad 1000,0 ml |

Trypanblau-Lösung

| | |
|------------|-------|
| Trypanblau | 0,2 g |
|------------|-------|

ANHANG

NaCl-Lösung (0,89 %) 1000,0 ml

Trypsin-Lösung (1 x)

Trypsin (10 x) 100,0 g

HEPES-Puffer mit 0,1 % EDTA 900,0 ml

Zellkulturmedium 1 = Makrophagenmedium I

IMDM ohne Phenolrot 195,0 ml

FKS 50,0 ml

Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lsg 2,5 ml

Amphotericin B (250 µg/ml) 2,5 ml

2-β-Mercaptoethanol (100 mM) 0,5 µl/ml

Zellkulturmedium 2 = Makrophagenmedium II

IMDM ohne Phenolrot 480,0 ml

FKS 10,0 ml

Penicillin (10000 IE/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Lsg 5 ml

Amphotericin B (250 µg/ml) 5 ml

2-β-Mercaptoethanol (100 mM) 0,5 µl/ml

Zellkulturmedium 3 = DC-Medium

RPMI 1640 ohne Phenolrot 22,5 ml

FKS 2,5 ml

Gentamicin (20 µg/ml) 12,5 µl

GM-CSF (100 ng/ml) 125 µl

IL-4 (100 ng/ml) 125 µl

2-β-Mercaptoethanol (100 mM) (Zugabe direkt vor Verwendung) 0,5 µl/ml

Puffer für den ELISABeschichtungspuffer (pH 10,33)Lösung A:

| | |
|--------------------------|--------|
| Na_2CO_3 | 4,24 g |
| <i>A.dest</i> | 200 ml |

Lösung B:

| | |
|------------------|--------|
| NaHCO_3 | 1,68 g |
| <i>A.dest</i> | 100 ml |

Gebrauchslösung

| | |
|-----------------|------------|
| Lösung A | 17 ml |
| Lösung B | 8 ml |
| <i>A.bidest</i> | ad 1000 ml |

PBS-Tween (1x) pH 7,2 (mit NaOH)

| | |
|--|------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,47 g |
| NaCl | 8,18 g |
| Tween 20 | 0,5 ml |
| <i>A.bidest</i> | ad 1000 ml |

PBS-Tween (20x) pH 7,2(mit NaOH)

| | |
|--|-----------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 5 g |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 4,7 g |
| NaCl | 81,8 g |
| Tween 20 | 5 ml |
| <i>A.bidest</i> | ad 500 ml |

Substratpuffer

| | |
|---|------------|
| Zitronensäure x 1 H_2O | 4,67 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 10,18 g |
| <i>A.dest</i> | ad 1000 ml |

Stoppreagenz

| | |
|-----------------------------|--------|
| H_2SO_4 95% | 10 ml |
| <i>A.bidest</i> | 390 ml |

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

10.1 Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Auswertungsstrategie durchflußzytometrischer Analysen von Mø-Kulturen | 44 |
| Abb. 2: Darstellung einer DC-Kultur in der DFZM | 45 |
| Abb. 3: Überprüfung der RNA-Qualität durch Gelelektrophorese | 48 |
| Abb. 4: Primäre bovine plastikadhärente Mø | 59 |
| Abb. 5: Zytoskelettausstattung und Oberflächenantigene primärer boviner Mø | 60 |
| Abb. 6: Zytoskelettausstattung primärer boviner Mø | 61 |
| Abb. 7: Charakterisierung der Oberflächenantigene primärer boviner Mø (vorherige Seite) | 62 |
| Abb. 8: Shigatoxin-Rezeptor-Expression auf bzw. in bovinen Mø | 64 |
| Abb. 9: CD77 Expression auf bzw. in primären bovinen Mø | 65 |
| Abb. 10: DFZM-Analyse des Einflusses verschiedener Konzentrationen von rStxB1 auf die Bindung von anti-CD77 an bovine native Mø | 66 |
| Abb. 11: Kompetitionsstudie mit anti-CD77 und rStxB1 | 67 |
| Abb. 12: Einfluss von Stx1 auf Vitalität von bovinen Mø | 68 |
| Abb. 13: Anteil vitaler Zellen Mø nach Inkubation mit Stx1 | 68 |
| Abb. 14: Expression verschiedener Oberflächenantigene auf primären bovinen Mø nach Inkubation mit Stx1 | 70 |
| Abb. 15: Expression von CD80 auf bovinen Mø nach Inkubation mit Stx1 | 72 |
| Abb. 16: Expression von CD86 auf bovinen Mø | 73 |
| Abb. 17: Phagozytoseaktivität nativer primärer boviner Mø nach Stx1 Inkubation | 74 |
| Abb. 18: Chemokin und Zytokingen-Transkription boviner Mø | 76 |
| Abb. 19: IL-10 mRNA Expression boviner Mø und Proteingehalt der Zellüberstände | 77 |
| Abb. 20: Bovine dendritische Zellen (DC) in Kultur | 78 |
| Abb. 21: Oberflächenantigen-Expression primärer boviner DCs | 79 |
| Abb. 22: Bindungsstudie für rStxB1 an primären bovinen DCs | 80 |
| Abb. 23: Bindungsstudie von rStxB1 an primären bovinen DCs | 81 |
| Abb. 25: Veränderung der MFLI verschiedener Antigene auf primären bovinen DCs nach Inkubation mit Stx1 oder Stx1 + Ak | 82 |

10.2 Tabellen

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Verwendete Antikörper für Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie | 42 |
| Tab. 2: Pro Ansatz verwendete Substanzen für die reverse Transkription | 49 |
| Tab. 3: Basenfolge der Primer für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen | 50 |
| Tab. 4: Pro Ansatz verwendete Substanzen für die PCR zur Überprüfung auf DNA-Kontamination | 50 |
| Tab. 5: Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Primerpaare | 52 |
| Tab. 6: Zusammensetzung des PCR-Mix für die TaqMan® PCR pro Ansatz (25 µl) | 53 |
| Tab. 7: Basenfolge der in der TaqMan® PCR verwendeten Sonden | 54 |
| Tab. 8: Verwendete Antikörper für den ELISA | 57 |

11 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei allen, die es mir möglich gemacht haben, diese Arbeit zu verfassen. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Menge, danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Konzeption der Arbeit. Seine fachliche Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine Geduld bei der Korrektur der Arbeit, seine Bereitschaft sein umfangreiches Wissen jederzeit zu teilen und die immer freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre waren für das Gelingen dieser Arbeit entscheidend.

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

Meinem Betreuer, Herrn Philip S. Bridger, PhD, danke ich für die engagierte Betreuung, die fortwährende Unterstützung und die manchmal kontroversen aber immer hilfreichen Diskussionen sowie für seine freundliche Hilfe bei der Auswertung der gewonnenen Daten.

Bei Frau Dr. Melanie Mohr bedanke ich mich, für die freundliche Einweisung in die Benutzung des FACS und die Interpretation der Daten.

Frau Gabriele Köpf möchte ich danken, für ihre sehr kompetente Einführung in alle in dieser Arbeit angewendeten molekularbiologischen Techniken. Ihre ständige Unterstützung, nicht nur in wissenschaftlichen Fragen, hat mir bei auftretenden Schwierigkeiten immer weiter geholfen.

Frau Ursula Leidner, danke ich für die Einführung in die Arbeit in der Zellkultur, ihre Hilfsbereitschaft und Flexibilität bei der Durchführung der Versuche und die Bereitstellung großer Mengen guter Laune, bereits am frühen Morgen.

Ein großer Dank gilt allen Doktoranden. Die gegenseitige Unterstützung, der Zusammenhalt und die Freundschaft, waren wirklich außergewöhnlich. Ich werde diese Zeit nie vergessen.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter/innen des Instituts für das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Versuchsguts Oberer Hardthof, hier besonders Herrn Axel Brandt, für die Unterstützung bei den Blutentnahmen danken.

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

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Helge Karch und Frau Dr. Martina Bielaszewska, für die freundliche Überlassung des aufgereinigten Shigatoxins sowie bei Dr. Dirk Werling, für die Hilfe bei der Etablierung der Makrophagenisolation und die Überlassung von Antikörpern und Zytokinen.


ANHANG

Ein wichtiger Rückhalt während der Doktorandenzeit, waren mein Freund Jens und alle meine Freunde. Euch vielen Dank für Unterstützung, Trost, Ansporn aber auch für Ablenkung zur rechten Zeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Angelika und Jürgen Loos, die mich immer unterstützt, an mich geglaubt und mich gefördert haben und mir alles ermöglichten, was ich mir gewünscht habe, sowohl in Hinsicht auf meinen beruflichen Weg, als auch in privaten Belangen.

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

Daniela Loos



ISBN 978-3-86345-133-2



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvf.net · Homepage: <http://www.dvf.de>