

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Deutschland
Lumineszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Spectra Classic)	TECAN, Deutschland
Lambda 2, Spektrophotometer	Perkin Elmer, USA
Labtek 8-well	Nalge Nunc International, Dänemark
Heizblock	Grant, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60)	Olympus, Deutschland
Lösungsreservoir	Forschungswerkstatt der Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin
Magnetrührer	Ika-Combimag, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Merck, Deutschland
Messelektroden (STX-2)	World Precision Instruments, Deutschland
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, Deutschland
Mini-Trans-Blot-Zelle	Biorad, Deutschland
Multi-well-Platten	NUNC, Dänemark
Objektträger	Menzel-Gläser, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Petrischalen	Nalge Nunc International, Dänemark
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Deutschland
Power pac 200	Biorad, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Plastibrand, Deutschland
Silikonscheibe	Drawin Vertriebs GmbH, Deutschland
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Spitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Sterilfilter (Sterivex 0,22 µm)	Millipore, Deutschland
Wasserbad	Haake, Deutschland

Wippe	Fröbel Labor Technik Lindau, Deutschland
Zeiss LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Deutschland
Zentrifuge Z233MK	Hermle, Deutschland
Zentrifuge 5414 C	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge AvantiJ25	Beckman, Deutschland
Millicell PCF Filter	Millipore, Schwalbach

2.2 Verwendete Lösungen, Medien und Substanzen

2.2.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Amylacetat	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
APAAP, Mouse	DakoCytomation, Deutschland
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce, USA
BSA (100 ×)	BioLabs, Deutschland
ChemMate Detection Kit	DakoCytomation, Deutschland
DAPI	Boehringer-Mannheim, Deutschland
Ethanol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande
FKS	Biochrom, Deutschland
Formalin 10% neutral buffered	Sigma Aldrich Co., Deutschland
Gentamicin	Gibco, Großbritannien
Glycin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Glyzerol	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
IFN γ	TEBU, Deutschland
IL-13	R&D, USA
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Deutschland
- Blockierreagenz	
- 10 × TBS-Tween	
- Lumi-Light POD-Substratlösung	
Methanol	J.T. Backer, Niederlande
m β CD	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
PBS ^{+Ca/Mg} -Lösung	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PBS-Tabletten	Life Technologies, Deutschland

Penizillin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
ProTaq _s MountFluor	Biocyc GmbH & Co. KG, Deutschland
Proteinstandard SDS-7B	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Proteinstandard SM0671	Biorad, Deutschland
SabSimplex	PARKE-DAVIS GMBH, Deutschland
SDS	Merck, Deutschland
SSC 20 x	Life Technologies, Deutschland
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
TEMED	Life Technologies, Deutschland
TNF α	TEBU, Deutschland
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Biorad, Deutschland
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Biorad, Deutschland
Trypsin	Gibco, Großbritannien
Tween 20	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Wasser (ddH ₂ O)	Fluka, Deutschland
Ziegen-Serum	Zymed, Deutschland
Zitronensäure	Sigma Aldrich Co., Deutschland

2.2.2 Antikörper

AlexaFluor 488 Ziege anti-Maus Ak	Molecular Probes, USA
AlexaFluor 594 Ziege	Molecular Probes, USA
anti-Kaninchen-POD Ak	Molecular Probes, USA
Anti-Kaninchen IgG-POD-Ak	Roche, Deutschland
Anti-Mouse IgG-POD Fab-Fragmente	Roche, Deutschland
Anti-Rabbit IgG-POD Ak	Roche, Deutschland
Kaninchen anti-HlyA pAk	Dr. Beutin, RKI, Berlin
Kaninchen anti-O4 pAk	Dr. Beutin, RKI, Berlin
Maus anti-E-Cadherin-mAk (Klon 36)	BD Transduction Laboratories, Deutschland
Maus anti-Occludin mAk	Zymed, Deutschland
Maus anti-ZO-1 mAk	Zymed, Berlin

2.2.3 Puffer und Lösungen

10 × Puffer West

144 g	Glycin
30,4 g	Tris HCl
	ad 1 l Aqua bidest.

BSA-Blockierungslösung (Western)

2,5 g	BSA
10mg	Natriumazid
	ad 50 ml PBS/Tween

Permeabilisierungslösung

0,5 %	Triton-X in PBS (Immunfluoreszenzfärbung Filter)
1,0 %	Triton-X in PBS (Immunfluoreszenzfärbung Ratte)

Blockierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung Filter)

1 % (v/v)	Ziegenserum in PBS
-----------	--------------------

Blockierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung Ratte)

8 % (v/v)	Ziegenserum
1 %	BSA
0,8 % (v/v)	Triton X in PBS

physiologische Salzlösung:

140 mmol	Na ⁺
123,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,2 mmol	Mg ²⁺
2,4 mmol	HPO ₄ ²⁻
0,6 mmol	H ₂ PO ₄ ⁻
21 mmol	HCO ₃ ⁻
10 mmol	D(+)-Glucose

0,5 mmol	ss-OH-Butyrat
2,5 mmol	Glutamin
10 mmol	D(+)-Mannose
	ad 1 l Aqua bidest.

Elektrophoresepuffer

100 ml	10 × Puffer West
10 ml	10 % SDS
	ad 1 l Aqua bidest.

Gebrauchslösung (Proteinquantifizierung) je Probe:

196 µl	Pierce BCA Protein Assay Reagenz A
4 µl	Pierce BCA Protein Assay Reagenz B

PBST

2Tbl.	PBS
1 ml	Tween
	ad 1 l Aqua bidest.

20 x SSC

175 g	NaCl
88,2 g	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O
800 ml	H ₂ O
	ad pH 7,0-7,5 mit Zitronensäure _{konz.}
	ad 1 l Aqua bidest.

Transferpuffer

100 ml	10 × Puffer West
100 ml	Methanol
	ad 1 l Aqua bidest.

Tris-Puffer

34 g	Tris-HCl
4,5 g	Tris-Base

44 g	NaCl
5 ml	Tween 20
	ad 5 l Aqua bidest.

5x Laemmli Puffer

0,32 M	Tris pH 6,8
44 % (v/v)	Glyzerol
25 % (v/v)	ss-Merkaptoethanol
12,5 % (w/v)	SDS
0,001 % (w/v)	Bromphenolblau

2.2.4 Medien

Luria-Bertani (LB)	Bio101, USA
Bacto-Agar	BD Bioscience, Frankreich
Ehly-Blutagar	Oxoid, Deutschland
Dulbecco's MEM / NUT MIX F-12 (DMEM / HAM)	Gibco, Deutschland
Dulbecco's MEM (DMEM)	Gibco, Deutschland
MEM / Earle	Biochrom KG, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom KG, Deutschland

2.2.5 Software

Aida	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland
Microcal Origin	Microcal Software Inc., USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Winstat	R. Fitch Software, Deutschland
Screen machine II	Fast Electronic GmbH, Deutschland

2.3 Zellkultur

Eukaryontische Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit jeweiligem Zellkulturmedium versetzt mit 10 % FKS, 1 % Penizillin, 1 % Streptomycin, (im Weiteren als Vollmedium bezeichnet) unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C in einer Atmosphäre von

95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert. Dreimal pro Woche wurde das Vollmedium erneuert. Die Trypsinierung sowie Neuaussaat der Zellen (Passagieren) erfolgte alle 7-10 Tage.

2.3.1 Verwendete Zelllinien

2.3.1.1 T84

Die Zelllinie T84, erzeugt aus einem Kolonkarzinom eines männlichen Patienten, wurde in DMEM / HAM-Vollmedium nach obengenanntem Regime kultiviert. Es wurden Zellen der 23.-26. Passage verwendet.

2.3.1.2 MDCK-C7 und -C11

Aus der Zelllinie MDCK, ursprünglich gewonnen aus der Niere eines erwachsenen, weiblichen Cockerspaniels, wurden durch Gekle et al. die funktionell verschiedenen Subklone C7 und C11 gewonnen. C7 Zellen bilden hochohmige und C11 Zellen niederohmige epitheliale Monolayer und werden als Modelle locker bzw. dichter Epithelien eingesetzt [54]. Es konnte gezeigt werden, dass C7 und C11 Zellen sich in Tight junction Struktur und Zusammensetzung unterscheiden [4].

Die Zellen wurden in MEM-Vollmedium nach oben genanntem Regime kultiviert, wobei das Passagieren alle 14 Tage erfolgte. Es wurden Zellen der 60.-70. Passage verwendet.

2.3.1.3 Caco-2

Die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, erzeugt aus einem primären Kolonkarzinom, wurde in MEM / Earle-Vollmedium nach obengenanntem Regime kultiviert. Das Vollmedium enthielt 15 % FKS. Es wurden Zellen der 22.-28. Passage verwendet

2.3.1.4 HT-29/B6

Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 wurde in RPMI nach obengenanntem Regime kultiviert. Der Klon B6 wurde in unserem Labor aus der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 entwickelt [95]. Es wurden die Zellen der 28. – 31. Passage verwendet.

HT-29/B6 Zellen bilden hochdifferenzierte, polarisierte Monolayer und entwickeln einen apikalen Bürstensaum sowie interzelluläre Tight junctions. Funktionell betrachtet besitzen sie die Eigenschaft, Mukus und Chlorid zu sezernieren. Mit Hilfe der hochauflösenden Conductance scanning-Technik, die es erlaubt, zwischen trans- und parazellulären Leitfähigkeiten zu diskriminieren, konnte gezeigt werden, dass es sich um ein dichtes Epithel handelt [57]. Da somit wichtige Eigenschaften von Enterozyten für den Klon B6 nachgewiesen sind, eignet sich dieses Zellmodell für die Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion des distalen Kolons und der Wirkung von Zytokinen [56, 9].

2.3.2 Epithelmodell auf Zellkulturfiltern

Für elektrophysiologische und morphologische Studien wurden die Zellen auf Millicell-PCF-Zellkulturfiltern ausgesät. Die Zellzahl betrug bei Aussaat 7×10^5 Zellen cm^{-2} . Die Zellen wurden anschließend 6 Tage in konventionellen Kulturschalen (Durchmesser: 6 cm) bis zur Konfluenz kultiviert. Der Zellkulturfilter und damit das apikale Kompartiment wurde dafür mit 500 μl , die Kulturschale und damit das basolaterale Kompartiment mit 10 ml Kulturmedium gefüllt. Die durch Zählung im Lichtmikroskop ermittelte Zellzahl betrug bei Konfluenz $4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen cm^{-2} . Die konfluenten Monolayer wurden mit neuem Vollmedium kultiviert und 12 Stunden später mit den Testsubstanzen (Zytokine) inkubiert. Alle Experimente wurden am 7. oder 8. Tag nach Aussaat durchgeführt.

Die verwendeten Millicell-PCF-Filter wiesen eine ausreichende Durchlässigkeit (Porendurchmesser 3 μm und 0,4 μm) für das Kulturmedium und die Inkubationssubstanzen auf. In Vortests erwiesen sich die Filter der Porengröße 0,4 μm für die hier verwendeten *E. coli* als impermeabel. Weiterhin war eine gute Adhäsion der Zellen gewährleistet. Die Filter waren transparent und hatten einen geringen Eigenwiderstand (132 Ω bei einer Fläche von 0,6 cm^2 , Messung bei 37 °C). Da das Filtermaterial gut schneidbar war, ließ sich die Membran für die elektrophysiologischen Untersuchungen und Immunfluoreszenzfärbungen gut von der Ringhalterung trennen. Millicell-PCF-Filter bestehen aus einer Polycarbonatmembran (Filterdurchmesser 12 mm) mit hoher Porendichte, die eine ausreichende Versorgung des Epithels mit dem Zellkulturmedium gewährleistete, wie Versuche mit längerer Kultivierung auf diesem Filtertyp zeigten. Die relativ gute mechanische Eigenstabilität der Millicell-PCF-Zellkulturfilter gewährleistete während der Messungen einen konstanten Abstand der Mikroelektroden zur mukosalen Zelloberfläche. Durch eine leichte Erhöhung des Flüssigkeitsstandes auf der mukosalen Seite des Epithels wurde durch Andruck die horizontale Position des Filters in der

horizontal montierten Ussing-Kammer des Conductance Scanning-Versuchsstandes zusätzlich unterstützt. MDCK-, HT-29/B6- und T84-Zellen, wurden nach 7-8 Tagen für Experimente verwendet, Caco-2-Zellen nach 14 Tagen.

2.3.3 Translokationsexperiment auf Zellfiltern

Zellkulturfilter wurden mit frischem Medium (ohne Zusätze) oder physiologischer Salzlösung gewaschen, indem das vorhandene Medium abgesaugt und vorgewärmtes Medium vorsichtig in das apikale Kompartiment bis Überlauf eingetropfelt wurde. Dies wurde zweimal wiederholt, um Medienzusätze möglichst vollständig zu entfernen. Für Translokationsexperimente wurden die Bakterien mit OD^{Start} von 0,2 – 1,0 in das jeweilige Medium (ohne Zusätze) in das apikale Kompartiment der Zellfilter inokuliert, was einer "multiplicity of infection" (MOI) ≥ 100 entspricht. Anschließend wurde bei 37 °C unter Carbogenatmosphäre kultiviert. Während der Versuche zur Quantifizierung der Translokation wurden die Zellfilter in 12-Well-Platten gestellt, bei gleichem apikalen Volumen von 500 μ l betrug hier das basale Volumen jeweils 2 ml.

Analog zur apikalen Zugabe von Bakterien wurde bei entsprechenden Versuchsansätzen für die Untersuchung des Effektes einer basalen Zugabe der Keime die gleiche OD^{Start} basal inokuliert, unabhängig wie groß das Volumen gewählt war. Die Durchtrittsmenge der Bakterien wurde aus dem jeweils nicht inokulierten Kompartiment mittels Verdünnungsausstrich auf Agar-LB Platten bestimmt; dazu wurden 100 μ l entnommen und entweder verdünnt oder direkt ausplattiert.

2.3.4 Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit Zytokinen

Die Zytokine $TNF\alpha$ und IL-13 wurden in das basale Kompartiment der Zellfilter gegeben und 24-72 h im Zellmedium präinkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen der rekombinanten Zytokine entsprechen denen von Schmitz et al. [146] publizierten Konzentrationen in Überständen stimulierter "human immunodeficiency virus" (HIV) Immunzellen (für $TNF\alpha$, 1000 Units ml^{-1}) und für IL-13 wurden nach Heller et al. 10 ng ml^{-1} [77] eingesetzt. Diese Konzentrationen erzeugen Barriereveränderungen, wie durch transepitheliale Widerstandsabnahme nach Inkubation angezeigt wird [9, 10, 17].

2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.4.1 Messung des transepithelialen Widerstandes

Zur Kontrolle von Viabilität und Konfluenz der Zellen während ihres Wachstums auf den Zellkulturfiltern war eine regelmäßige Messung des transepithelialen Widerstandes (R^t) erforderlich. Diese erfolgte in den Kulturschalen mit Hilfe von zwei fixierten Elektrodenpaaren, die mit einem Widerstandsmessgerät (D. Sorgenfrei, Inst. für Klinische Physiologie) verbunden waren. R^t ergab sich aus den Spannungsänderungen, die durch einen Rechteckstrom ($\pm 10 \mu\text{A}$, 21 Hz) hervorgerufen wurden. Die Messwerte wurden um den Widerstand des leeren Filters und der Badlösung, der sich durch Messung eines zellfreien Filters unter gleichen Bedingungen ergab, korrigiert. Voraussetzung waren die Standardisierung von Filterposition und Eintauchtiefe der Elektroden sowie das Konstanthalten der Temperatur (37°C). Die Zellen verblieben während der Widerstandsmessung im Kulturmedium und wurden zwischen den Einzelmessungen im Zellkulturschrank unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

Da die Absolutwiderstände der verschiedenen Zelltypen und Aussaaten unterschiedlich waren und in den hier dargestellten Experimenten die Änderung des transepithelialen Widerstandes der relevante Parameter war, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Messdaten der Widerstand auf einen gewählten Anfangswert, meist der Beginn einer Stimulation, normiert und in "% R^t_{initial} " angegeben. In Experimente wurden Monolayer folgender transepithelialer Widerstände eingesetzt:

HT-29/B6: 300 - 500 $\Omega \text{ cm}^2$;	Caco-2: 200 - 300 $\Omega \text{ cm}^2$;
MDCK C7: 1800 - 2200 $\Omega \text{ cm}^2$;	MDCK C11: 100 - 200 $\Omega \text{ cm}^2$
T84: 1500 - 1800 $\Omega \text{ cm}^2$.	

2.4.2 Ussing-Experimente

Mit Hilfe der 4-Elektroden-Technik nach Ussing und Zerahn [173] lassen sich Gesamtleitfähigkeit und elektrogener Stofftransport eines Epithels bestimmen. Dabei werden der sogenannte "Kurzschlussstrom" (I_{sc}), die transepitheliale Spannung und der transepitheliale Widerstand bzw. die Leitfähigkeit gemessen. Durch gezielte Gabe von Blockern oder Stimulatoren von Transportmolekülen oder Rezeptoren der Plasmamembran können diese Parameter verändert werden. Die elektrophysiologische Antwort des Epithels gibt Aufschluss über die Art der jeweils vorherrschenden Transportprozesse.

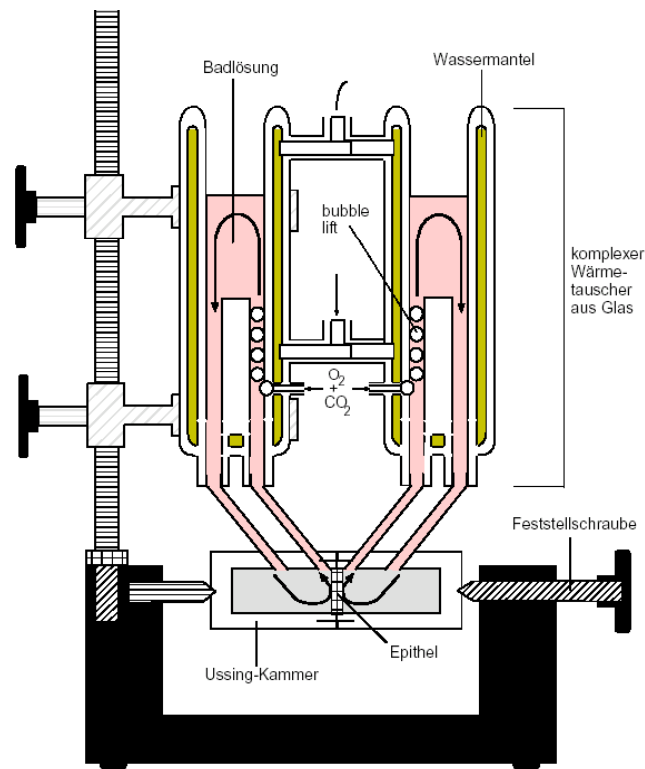


Abb. 3: Ussing-Versuchsstand mit Wärmetauscher sowie integrierter - Begasung und Umwälzung.

Das Epithel ist zwischen den beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer wie eine "Trennmembran" aufgespannt und wird von 37 °C warmer Badlösung umspült. Die Zirkulation der Lösung wird durch die über den "bubble lift" aufsteigenden Gasbläschen aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ aufrechterhalten. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über einen komplexen Wärmetauscher in dessen doppelter Wandung sich Wasser befindet, das über ein temperiertes Wärmebad umgewälzt wird [8].

Die Einzelheiten der Methode können früheren Arbeiten entnommen werden) [173, 39]. In dieser Arbeit wurden Ussing-Experimente durchgeführt, wenn der R^t kontinuierlich über längere Zeiträume gemessen werden sollte (Abschnitt 3.2.1). Der in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Kammeraufbau entsprach grundsätzlich der von Ussing vorgeschlagenen Anordnung, d.h. mit einem vertikal in die Kammer montierten Epithel (Abb. 3). Die beiden durch das Epithel getrennten (mukosalen und serosalen) Flüssigkeitskompartimente enthielten in den Experimenten mit unbehandelten Epithelien Kontroll-Zellmedium. Die physiologischen Druck-, Temperatur- und Begasungsverhältnisse in den beiden Hälften der Kammer waren äquivalent.

2.4.3 Conductance scanning

Um die horizontale Verteilung der Ionenpermeabilität innerhalb eines Epithels quantitativ beschreiben zu können, wurde eine in unserer Arbeitsgruppe (Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin) entwickelte elektrophysiologische Methode eingesetzt, die wir *Conductance scanning* nennen, da sie auf die räumlich aufgelöste Bestimmung der epithelialen Leitfähigkeit abzielt und lokale elektrische Lecks im Gewebe zeigt. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Dorothee Günzel aus dem Institut für Klinische Physiologie durchgeführt.

2.4.3.1 Videomikroskopie

Alle Conductance scanning-Experimente fanden unter lichtmikroskopischer Kontrolle statt. Die Präparation wurde per Lichtmikroskopie durch ein Wasserimmersionsobjektiv (Achromplan 40x 0,75 NA, WD 1,98 mm) betrachtet. Mittels Videokamera und einem digitalen Bildverarbeitungssystem (Screen machine II) konnte das Bild aufgenommen und auf dem Monitor gezeigt werden. Bilder wurden im JPG-Format gespeichert. Es war möglich, Läsionen im Epithel zu erkennen und nachfolgend elektrophysiologisch zu vermessen.

2.4.3.2 Messung der Leitfähigkeitsverteilung mittels *Conductance scanning*

Mit Hilfe der Conductance scanning-Methode [88, 58], die eine Zuordnung lokal gemessener Leitfähigkeiten zu morphologischen Strukturen erlaubt, ist es möglich, regionale Ionenleitfähigkeiten an flächigen Epithelien und an epithelialen Zellkulturen

zu quantifizieren. Mit dieser Methode wird gewissermaßen die Lücke zwischen der Patch clamp-Technik [73], die an Zellmembranen Verwendung findet, und der konventionellen Ussing-Kammer [173], die pauschal den transepithelialen Widerstand (R^t) von Epithelien vermisst, geschlossen. Es kann mit der Conductance scanning-Technik in unterschiedlicher Ortsauflösung auch an Membran-übergreifenden Strukturen, wie Kryptenöffnungen, Schlussleisten, Apoptosen und epithelialen Defekten gemessen werden. Die bisherigen Anwendungen erfolgten in drei Auflösungsstufen: In "niedriger Auflösung" können größere Flächen (mm-Bereich) auf Barrieredefekte untersucht werden, z.B. in Resektionspräparaten von Colitis ulcerosa-Patienten [59]. Die "mittlere Auflösungsstufe" erlaubt die Untersuchung der epithelialen Leitfähigkeiten von Krypten und Oberflächen der Darmschleimhaut. Auf diese Weise ließen sich die elektrogene Na^+ -Resorption [89], die cAMP-vermittelte Cl^- -Sekretion [88], die cAMP- und Aldosteron-induzierte K^+ -Sekretion [66], die Ca^{2+} -vermittelte Cl^- -Sekretion [65] lokalisieren und die apoptotische Leitfähigkeit messen und quantifizieren [56]. Florian et al. nutzten die Methode um den Zeitverlauf der Restitution von Einzellläsionen im intestinalen Epithel elegant abzubilden [46]. In ähnlicher Weise wurden in der vorliegenden Studie, ebenfalls in "mittlerer Auflösung", bakterielle Läsionen am intestinalen Epithel gemessen und quantifiziert. In "hoher Auflösung" lassen sich die Leitfähigkeiten der trans- und parazellulären Wege diskriminieren und mittels eines hierfür entwickelten mathematischen Modells quantifizieren [58]. Das Grundprinzip der Conductance scanning-Technik sei an dieser Stelle kurz skizziert.

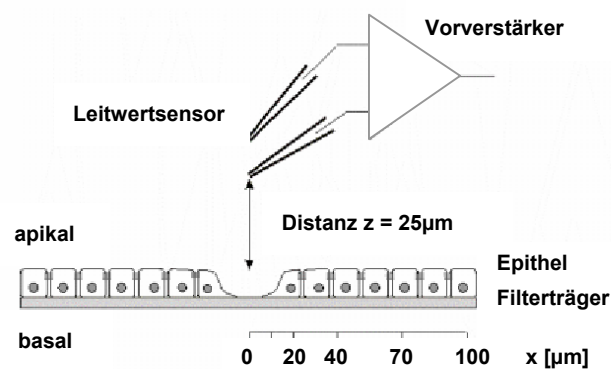


Abb. 4: Schematische Darstellung des Conductance scanning-Prinzips anhand einer Epithelzellläsion.

Conductance scanning ist eine Weiterentwicklung des von Frömter entwickelten Prinzips des "Voltage scanning" zu einem quantitativen Messverfahren [51]. In einer Elektrolytlösung wird dicht über dem Epithel das von einem transepithelial applizierten

Wechselstrom induzierte, zwischen zwei Mikroelektroden abfallende Potential gemessen, dessen Größe von der lokalen Leitfähigkeit am Messort abhängt. Mit mathematischen Modellen wird daraus die Leitfähigkeit ("conductivity") der untersuchten Struktur des Epithels berechnet. Konfluente Monolayer wurden horizontal in eine miniaturisierte 4-Elektroden-Ussingkammer eingebaut [58]. Das aus dem über das Epithel angelegten sinusoidalen Klemmstrom ($100 \mu\text{A cm}^{-2}$, 24 Hz) generierte elektrische Feld ($\Delta V / \Delta z$) in der mukosalen Badlösung wurde mit einem mobilen Sensor, dem Mikroelektrodenpaar, in einem konstanten Abstand z_0 von $25 \mu\text{m}$ über der Oberfläche gemessen. Bei dieser Entfernung verschmelzen para- und transzelluläre Beiträge zur Leitfähigkeit [58]. Dieser Abstand wurde durch Annäherung an die Oberfläche bis Kontakt und nachfolgend definiertem Einstellen an jeder Messposition reproduziert. Der vertikale Abstand Δz zwischen beiden Elektroden betrug 20 bis $40 \mu\text{m}$ und wurde durch eine Messung des Widerstands zwischen beiden Elektroden im zylindrischen Container, der mit Kontrollelektrolytlösung bekannten spezifischen Widerstands ρ gefüllt war, durch Berechnung genau ermittelt.

$$\frac{\Delta z = \Delta V \cdot A^{\text{Kammer}} \cdot k}{I} \quad \text{Gleichung (1)}$$

ΔV ist die zwischen beiden Mikroelektroden gemessene Potentialdifferenz, A^{Kammer} die Fläche der Messkammer, I die Amplitude des applizierten Stromes und k die spezifische Leitfähigkeit der Kontrollösung

Um eine Vergleichbarkeit der Rohdaten zu erzielen (z.B. Unabhängigkeit von Klemmstrom), wurde der zwischen den Messelektroden detektierte Spannungsabfall ΔV in die apparente Leitfähigkeit G_A umgerechnet:

$$G_A = \frac{\Delta V / \Delta z}{\rho \cdot U} \quad \text{Gleichung (2)}$$

ΔV ist die zwischen beiden Mikroelektroden gemessene Potentialdifferenz, U die transepitheliale Spannung, Δz der Elektrodenabstand und ρ der spezifische Widerstand der Elektrolytlösung

Ein Gebiet von $100 \times 100 \mu\text{m}$ mit gleichmäßiger Leitfähigkeitsverteilung wurde gewählt und aus Mittelung dieser Werte die basale Leitfähigkeit der Probe ermittelt. Danach wurde der Sensor unter Videokontrolle zu *focal leaks* bewegt und anhand des Leitfähigkeitsmaximums der Läsion der Start für einen punktuellen Scan entlang einer Achse

bei $x = 0, 10, 20, 40, 70, 100 \mu\text{m}$ festgelegt. Läsionen wurden in x und y (90° zueinander) Richtung gescannt und daraus durch genäherte räumliche Integration der Leitfähigkeitswerte über die gescannte Fläche der Leitwert (g) dieser Läsionen errechnet, wobei die basale Leitfähigkeit (ermittelt aus "Plateaubereichen" homogener Verteilung) jeweils abgezogen wurde. Nähere Einzelheiten zur Methode, baulichen Ausführung und Anwendung finden sich bei Gitter et al. [58] und Florian et al. [46, 47]. Die graphische Darstellung der Leitfähigkeitsverteilung über dem Epithel erfolgte nach linearer Interpolation von Zwischenwerten.

2.5 Arbeiten am nativen Epithel: Kolon der Ratte

Neben den Untersuchungen bakterieller Effekte am Zellkulturmodell HT-29/B6 bestand eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit darin, die entsprechenden Modelluntersuchungen im nativen Gewebe zu etablieren. Aus diesem Grunde wurden Experimente am gestrippten Epithel der Ratte (distales Kolon) vorgenommen. Es wurden männliche Albino Wistar Ratten mit Körpergewichten von 200-300 g eingesetzt. Die Tiere wurden mit Standarddiät und Leitungswasser ad libitum gehalten. Die Tötung der Ratten erfolgte durch Begasung mit 100 % CO_2 in einer Glasglocke und unmittelbar nachfolgender Eröffnung des Herzens. Dieses Vorgehen steht im Einklang mit den Richtlinien der "Society of Laboratory Animal Science" (GV-SOLAS). Der Bauchraum der Tiere wurde entlang der Linea alba vom Sternum bis zur Symphyse eröffnet. Das distale Kolon wurde in einer Höhe von ca. 6 cm ab ano abgesetzt, freipräpariert und entnommen. Durch vorsichtige Spülung mit begaster Kontrolllösung wurde der Darminhalt entfernt und danach das entnommene Darmstück entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten.

2.5.1 Präparation des Epithels

Die Präparation des Kolons von Ratten erfolgte nach einer international als "Strippen" bezeichneten Technik [147]. Das in diesen Versuchen verwendete Segment war distales Kolon zwischen Anus und Lymphknoten liegend. Hierbei wurde die Tunica muscularis, Muscularis propria, Tela submucosa und die äußere Schicht der Lamina muscularis mucosae entfernt. Somit bestand das für die Versuche verwendete Gewebe aus Epithel, Lamina propria mucosae und einem Teil der Lamina muscularis mucosae (Abb. 5).

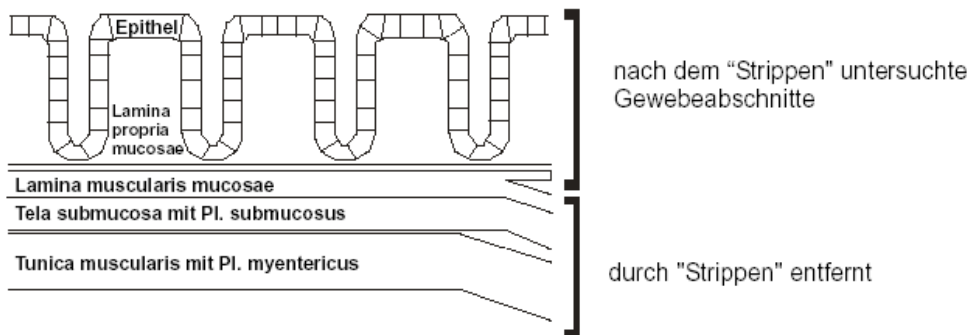


Abb. 5: **Darstellung der nach dem "Strippen" untersuchten Bestandteile der Darmwand.**

Dies konnte in routinemäßig durchgeführten histologischen Untersuchungen bestätigt werden, so dass sichergestellt war, dass in allen Experimenten gleiche Ausgangsbedingungen zu Grunde lagen. Das aufgeschnittene Darmsegment wurde mit der mukosalen Seite nach unten flach auf einer mit Silikon ausgegossenen Petrischale gelegt. Das distale Ende wurde mittels zweier Stecknadeln auf der Unterlage fixiert und das Gewebe vorsichtig in Längsrichtung gespannt, indem das proximale Ende mit einem Objektträger fest auf die Unterlage gedrückt und ein leichter Zug ausgeübt wurde. Mit einem Skalpell wurde die Tunica muscularis entlang des Objektträgers über die ganze Breite des Darmstückes durchtrennt, ohne das Epithel zu verletzen. Die Schnittränder klafften aufgrund der Eigenelastizität der Muskelschichten deutlich auseinander und ließen sich nun mittels Pinzette leicht gemeinsam mit der Tela submucosa und der Lamina muscularis mucosae von der Lamina propria mucosae abziehen. Während des ganzen, etwa 10 min dauernden Vorgangs wurde das Epithel mit begaster Kontroll-Elektrolytlösung feucht gehalten.

2.5.2 Einspannen des Epithels

Das Epithel wurde in zylindrische, hohle Container montiert, die mit den notwendigen Zugängen für Elektroden und Lösungen versehen sind. Aus einer Ratte wurden zwei Darmepithelpräparate gewonnen. Die Hälften der teilbaren Container wurden über Dorne im Außenring einer Hälfte und Bohrungen im Gegenstück des Containers passgenau stirnseitig zusammengesteckt. Das gestrippte Epithel wurde mit Hilfe von 8-10 Stecknadeln unter leichter Dehnung auf der Silikonplatte festgesteckt. Danach wurde eine der zwei zylindrischen Containerhälften mukosal auf das Epithel aufgesetzt und

mit den am Container befindlichen Dornen durchstoßen, so dass das Epithel an der Stirnseite der Containerhälfte fixiert anlag und mit dieser von der Unterlage abgenommen werden konnte. Die komplementär passende Containerhälfte wurde nun serosal aufgesetzt, wobei die zwischen den Dornen befindliche Fläche des Epithels zusammengedrückt wurde und so im zentralen Bereich des Containers eine definierte beidseitig zugängliche Präparatfläche von 0,54 cm² entstand. Die Container wurden mittels Schraubzwinde im Versuchsstand fixiert. Der hierbei entstehende gleichmäßige, axiale Anpressdruck der Containerhälften dichtete die Anordnung ab. Umgehend wurden nun die Begasungsaufsätze mukosal und serosal mit 10 ml begastem Medium (RPMI) gefüllt und mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast.

2.5.3 Bakterieninkubation in der Ussingkammer

Nach komplettem Einbau aller Epithelien in die Versuchsstände wurde den Ussingkammern mukosal und serosal je 2 µl Antischaummittel (SabSimplex) zugesetzt. Nach einer Einlaufzeit der Epithelien in der Ussingkammer von ca. 0,5-1 h wurden mukosal Bakterien mit einer OD_{Start} von 0,4-0,5 aus einer Vorpräparation mit einer OD von 2 zugegeben.

2.6 Mikrobiologische Arbeiten

2.6.1 *E. coli*-Isolate

Folgende *E. coli*-Isolate wurden verwendet:

O4:K3:H5 (*E. coli* O4) [126]

O6:K5:H1 (*E. coli* O6:K5) [12]

O6:K15:H31 (*E. coli* 536) [71, 15]

O2:K1:H4 (*E. coli* K1) [64]

O6:K5:H1 (*E. coli* Nissle 1917; Mutaflor[®], Ardeypharm[™])

Am Robert-Koch-Institut (RKI) Berlin wurde eine PCR auf klassische Virulenzfaktoren intestinal pathogener *E. coli* durchgeführt und dabei gezeigt, dass keiner dieser Faktoren in den benutzten Isolaten vorhanden ist. Getestet wurde auf: *stx* (Shigatoxine), Intimine, hitzestabiles Enterotoxin, hitzelabiles Enterotoxin, pCVD432 (*Enter-Adhering*

E. coli (EAEC) Plasmid), ipaH (Invasionsplasmid), α -Hämolysin, afimbriale Adhäsine (afa-1, 3, 7 und 8). Bei O4:K3:H5 und O6:K5:H1 wurde Hämolysin detektiert.

2.6.2 Transformierte und Mutanten

Plasmid pSF4000 [43]	Dr. Beutin, RKI, Berlin
<i>E. coli</i> K12pSF4000	Dr. Beutin, RKI, Berlin
<i>E. coli</i> O4mut	selektiert / rekultiviert

2.6.2.1 Selektion einer *hlyA*-defizienten Mutante

Zur Isolierung einer Hämolysin-defizienten Spontanmutante des *E. coli* O4 wurde der Stamm auf Blutagar mittels Vereinzlungsausstrich kultiviert bis einzelne Kolonien, die keinen Lysehof zeigten, isoliert werden konnten. Diese wurden 3× in Folge in LB-Schüttelkultur angezogen und danach wiederum auf Blutagar zur Kontrolle lytischer Aktivität ausplattiert. Es wurde eine Kolonie ohne Lyse isoliert und dieses Isolat als *E. coli* O4mut bezeichnet. Nach Durchführung einer "pulsed-field-gel"-Elektrophorese (PFGE) am RKI Berlin zeigte sich, dass der Stamm ein großes Fragment verloren hatte, sonst aber ein dem Wildtyp analoges Bandenmuster besaß. Die Abwesenheit von α -Hämolsylin und "cytotoxic necrotizing factor-1" (CNF-1) in *E. coli* O4mut wurde durch PCR und durch DNA-Hybridisierung für *hlyA* und *cnf-1* bestätigt. Im Gegensatz zum Wildtyp fehlte in der Mutante ein großes XbaI-Fragment, das im Wildtyp mit den *hlyA*- und *cnf-1*-Sonden hybridisiert. Diese Arbeiten wurden von Dr. Beutin am RKI Berlin durchgeführt.

2.6.2.2 Herstellung einer *hlyA*-Transformante *E. coli* K12

Der Laborstamm *E. coli* K12 wurde mit dem *E. coli*- α -Hämolysin-kodierenden Plasmid pSF4000 transformiert (Dr. Beutin; RKI Berlin). Nachfolgend wurde nach Verdünnungsausstrich auf Chloramphenicolblutagar eine Kolonie mit starker Lyse isoliert und nachfolgend im Wachstumsversuch auf maximale Produktion lytischer Aktivität bezüglich OD_{Start} und Dauer der Kultivierung optimiert. Es zeigte sich, dass nach ÜN-Kultur und Wiederanzucht im LB-Medium ein Ansatz mit OD_{Start} von 0,4 für 1,5 h in RPMI bei 37 °C vergleichbar starke Lysewerte (8 Stufen) wie der Wildtyp *E. coli* O4 im Test liefer-

te. Dieses Protokoll wurde für Versuche wie auch Filtratherstellung mit *E. coli* K12pSF4000 verwendet.

2.6.3 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

2.6.3.1 Stammhaltung

Zur langfristigen Aufbewahrung der Stämme wurden 850 μ l einer ÜN-Kultur mit 150 μ l Glycerin (100 %, autoklaviert) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nachfolgend bei -80 °C gelagert.

2.6.3.2 Anzucht und Kultivierung

Aus Glycerolstocks wurden Übernachtkulturen in 5 ml LB-Medium in 10 ml Greiner-Tubes mittels Öse angeimpft und bei 37 °C und 250 RPM für 16-18 h geschüttelt. Mittels serieller Verdünnung und Ausstreichen auf LB-Agarplatten wurde die Zellzahl viabler Bakterien dieser Kulturen mit ca. 10^9 CFU ml⁻¹ ermittelt. Als Referenzmessung zur Abschätzung der Biomasse diente die photometrische Bestimmung der optischen Dichte der Kulturlösungen bei 578 nm.

2.6.3.3 Optimierung der lytischen Aktivität des *E. coli* O4

Vorversuche zur Barrierschädigung mit *E. coli* O4 zeigten, dass der Effekt maßgeblich von der Konzentration des bakteriellen Inoculums sowie der Medienbeschaffenheit bezüglich des Substratangebotes abhing. Die Bildung von α -Hämolyisin ist in der exponentiellen Phase des bakteriellen Wachstums am höchsten [42]. Versuche zur Optimierung der Hämolyisinausbeute wurden durchgeführt, um einerseits die Kulturbedingungen der *E. coli* in der Zellkultur und auf nativem Epithel der Ratte vergleichbar zu gestalten und andererseits maximal lytische Kulturfiltrate zu erzeugen.

Da sich zeigte, dass *E. coli* O4 aus einer Vorkultur (angezogen aus einer ÜN bis spät-exponentielle Phase) bei gleicher OD(t) stärkere lytische Aktivität entwickelte, wurde bei Bedarf entsprechend vorgegangen; ebenso wirkte sich leichte Sauerstofflimitation in den Ussingkammern (bubble lift minimal: ca. 5 Blasen pro Sekunde bei 11 ml Füllvolumen pro Kammerseite) und Block der Glaswand mittels 0,1 % BSA vorteilhaft aus. Generell war die lytische Aktivität während maximalen Wachstums am größten. Falls

erforderlich, wurden die für Experimente benötigten Volumina frischen LB-Mediums mit einer OD_{Start} von 0,3 aus den ÜN morgens inokuliert und analog kultiviert. Diese Vorkultur wurde bei OD von 1-1,5 bei $7500 \times g$ abzentrifugiert, in dem im jeweiligen Experiment eingesetzten Zellmedium auf exakt $OD = 2$ resuspendiert und bis zur Verwendung kurzfristig auf Eis gelagert. Aus diesem Ansatz wurden die entsprechenden Versuchsansätze mit benötigter OD_{Start} inokuliert.

2.6.3.4 Herstellung von Kulturfiltrat

Aus einer LB ÜN-Kultur wurde eine LB-Vorkultur mit OD 0,3 inokuliert, welche bis zu einer OD von 1,5 wuchs (ca. 2 h). Aus dieser wurde nach Zentrifugation bei $7500 \times g$ 10 min und Resuspendierung des Bakterienpellets in RPMI eine RPMI Kultur mit $OD = 0,4$ inokuliert. Bei einer OD von 1,2 – 1,5 wurde die Kultivierung beendet, die Kultur sofort auf Eis gestellt. Nach Abzentrifugieren der Bakterien bei $7500 \times g$ und 12 min wurde die Supernatante filtriert, aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ asserviert. Die zu benutzenden Sterivex-Filter (0,22 μm Porenweite) wurden > 1 h mit 5 %iger BSA-Lösung geblockt, indem 10 ml dieser Lösung filtriert und die Filter dann blasenfrei gefüllt bei Raumtemperatur (RT) gelagert wurden.

Für die Inokulierung von Ussingexperimenten wurden die *E. coli* analog bis zur LB-Vorkultur am Versuchstag angezogen. Die VK wurde nach Gewinnung des Bakterienpellets durch Zentrifugation ($7500 \times g$, 12 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) in RPMI auf $OD = 2$ konzentriert. Diese Lösung wurde bis zum Inokulum in die Ussingkammern auf Eis gelagert.

2.6.4 Hämolysetest

Zur Abschätzung der hämolytischen Aktivität bakterieller Kulturen oder Filtrate wurde ein semiquantitativer Test entwickelt, der aufgrund der Lyse eingesetzter Erythrozythen die lytische Aktivität einer seriell verdünnten Testlösung beurteilt.

Testvorbereitung:

Dazu wurden 96 Well-Mikrotiterplatten wie folgt präpariert: In die 1. Spalte wurde $50 \mu\text{l}$ $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ + $460 \mu\text{g ml}^{-1}$ Gentamicin vorgelegt; alle weiteren Wells wurden analog mit $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Gentamicin befüllt. Die Erythrozytenlösung wurde aus defibriertem Schafsblut wie folgt hergestellt: Das Blut wurde 1:10 $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ verdünnt, bei $1500 \times g$ 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und dies dreimal wiederholt. Aus dem

gewaschenen Pellet wurde dann eine 1 %ige Erythrozythenlösung (v/v) in PBS^{+Ca/Mg} angesetzt und gut gemischt. Das Erythrozythenpellet wurde auf Eis gelagert und daraus die Testlösung jeweils frisch angesetzt.

Durchführung:

65 µl der jeweiligen Testlösung wurden in Wells der 1. Spalte (A) als Doppelbestimmung einpipettiert und anschließend mittels Multipipette gemischt. 65 µl aus der 1. Spalte wurden in die 2. Spalte (B) einpipettiert, was einer 1 : 1,769-fachen Verdünnung der Lösung in Spalte A entspricht. Nach wiederholtem Mischen wurde das Verfahren bis Spalte 12 (L) fortgesetzt. Spalte 12 entspricht somit einer 940-fachen Verdünnung der Ausgangslösung. Nach Zugabe von 50 µl der 1 %igen Erythrozythenlösung / Well (nicht gemischt) wurden die abgedeckten Testplatten 1 h bei 37 °C inkubiert, dann ÜN bei 4 °C gelagert. Die lytische Aktivität wurde anhand der Pelletgröße in Referenz zur Negativkontrolle beurteilt.

2.6.5 Gentamicin-Killing-Assay

Diese Methode dient der Bestimmung internalisierter Mikroorganismen, wobei man davon ausgeht, dass durch die hohe extrazelluläre Konzentration von Gentamicin (das nicht zellgängig ist) alle für dieses Antibiotikum empfindlichen Organismen abgetötet werden. Dies wurde in einem Vorversuch geprüft; 100 µg ml⁻¹ Gentamicin töteten 100 % von 10⁹ KBE ml⁻¹ *E. coli* O4 in 1 h, wie durch Ausstreichen auf LB-Agar bestätigt wurde.

Zellen, nach Inkubation mit dem entsprechenden Bakterienstamm, wurden 2 mal mit Medium gewaschen, danach in gleichem Medium mit 100 µg ml⁻¹ Gentamicin für 1,5 h bei Standardkultivierungsbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit PBS^{+Ca/Mg} wurden die Zellen mit 500 µl pro Filter 1 % Triton-X 100 in PBS^{+Ca/Mg} 10 min lysiert, danach die KBE durch Verdünnungsausstriche ermittelt.

Um den Invasionstest zu validieren, wurde das nichtinvasive Probiotikum *E. coli* Nissle im Vergleich zur nichtlytischen Mutante des *E. coli* O4 (*E. coli* O4mut) auf HT-29/B6-Zellen getestet. Es ergab sich ein Wert von 131 ± 60 KBE nach 4 h Inkubation mit 10⁸ KBE Inoculum apikal, wogegen O4mut im gleichen Versuch 3220 ± 293 KBE erreichte.

2.6.6 Verdünnungsausstrich ("agar-plate-counting")

Das Verfahren dient der Bestimmung Kolonie-bildender Einheiten einer Testlösung, welche eine gute Näherung der Lebendzellzahl der in der Lösung befindlichen kultivierbaren Organismen darstellt.

Die Testlösung wurde in 10er Schritten seriell in PBS^{+Ca/Mg} verdünnt (je 1 ml in 9 ml) und die entsprechenden Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden Einzelkolonien ausgezählt und daraus KBE ml⁻¹ der Testlösung errechnet. Auszählende Platten wurden als Dreifachbestimmungen angesetzt.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Acetonfällung von Proteinen

Die auf Eis vorgekühlte Filtratlösung wurde 1:1 mit auf eiskaltem 100 % igem Aceton versetzt und ÜN auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 16000 × g 12 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl ddH₂O resuspendiert.

2.7.2 Proteinbestimmung

Die spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Reagenz (Bicinchoninsäurereagenz) beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduzieren, welche dann mit Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex bilden [156].

Der Proteinbestimmungs kit wurde nach den Instruktionen des Herstellers jeweils frisch angesetzt. In 96-well-Plates wurden 50 µl Probe in geeigneter Verdünnung mit 950 µl Pierce-BCA-Reagenz gemischt, danach 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Endpunktmessung der Farbreaktion erfolgte photometrisch bei 562 nm. Zur Erstellung der Eichkurve wurde BSA eingesetzt. Die Proteinbestimmung wurde zur Abschätzung der Proteingehalte der Resuspendate aus Acetonfällung durchgeführt.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteingemischen mittels SDS-PAGE erfolgte in Anlehnung an die Methode von Laemmli [98], wobei Proteine aufgrund ihres Ladungs-Masseverhältnisses in einer definierten Gelmatrix im elektrischen Feld wandern.

Für die Darstellung von *E. coli*- α -Hämolyysin wurde ein 8,5-prozentiges Gel hergestellt. Das Gießen des Gels erfolgte zwischen zwei Glasscheiben, die durch einen 1,5 mm Abstandshalter voneinander getrennt in einer Apparatur befestigt waren. Die erste Fraktion des Gels, das Trenngel, wurde luftblasenfrei in die Gelkammer pipettiert und vorsichtig mit 1 ml absolutem Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels für 30 min wurde das Ethanol abgegossen und Reste des Alkohols mit einem Filterpapier entfernt. Die zweite Fraktion des Gels, das Sammelgel wurde nun aufgeschichtet und ein Probenkamm eingesteckt, um später Vertiefungen zur Probenpipettierung zu erhalten. Dabei betrug das maximale Probenvolumen 60 μ l. Nach erneuter Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Probentaschen mit Elektrophoresepuffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Die Gele wurden dann in einer Elektrodenhalterung arretiert, in Elektrophoresekammern eingesetzt und die Kammern mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

Für die Gele wurden für jede Spur 25 μ l Proteingemisch hergestellt, bestehend aus 5 μ l 5 \times Laemmli-Puffer und 20 μ l Proteinlösungen Aceton-gefällter Kulturfiltrate. Es wurde nicht auf Proteingehalt normiert, sondern gleiche Volumina aufgetragen, da dies verglichen werden sollte. Mittels Proteinbestimmung (Abschnitt 2.7.2) wurde kontrolliert, dass die eingesetzten Volumina nicht zur Überladung der Gele führten. Das Probengemisch wurde dann für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Probentaschen des Polyacrylamidgels geladen. Als Größenmarker wurden 5 μ l SM0671 verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 100 V durchgeführt, bis die Pufferfront am unteren Rand der Gelkammer angelangt war.

2.7.4 Immunoblot (Westernblot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sollten mittels Antikörperreaktion spezifisch dargestellt werden, was auf einem Gel nicht möglich ist. Daher wurden durch Elektrotransfer in einem elektrischen Feld die Proteine auf eine stabile Nylonmembran übertragen und fixiert.

Elektrotransfer

Die Nylonmembran wurde zunächst entsprechend der Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und für 5 min in absolutem Ethanol geschwenkt. Danach wurden die Membran, zwei Schwämme sowie zwei Whatman 3MM-Filterpapiere für circa 15 min in Transferpuffer equilibriert. Währenddessen wurde das Polyacrylamidgel aus der Apparatur herausgelöst, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen 5 min vorsichtig in Transferpuffer geschwenkt. Nachdem die Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht und die Gel-Membran-Einheit oben und unten mit je einem Filterpapier und einem Schwamm abgedeckt war, wurde diese „Sandwich“-Konstruktion mit einem Kühlakku und einem Rührstäbchen in die Transfer-Apparatur eingebaut, und die negativ geladenen Proteine bei 100 V für 60 min auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen.

Immunodetektion

Nach erfolgtem Elektrotransfer wurde die Membran kurz in PBS/Tween gespült und anschließend zur Verhinderung unspezifischer Antigen-Antikörperreaktionen mit 50 ml PBS/Tween/ 5 % Magermilchpulver zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Spülvorgang mit PBS/Tween für 5 min wurde die Membran einem zweiten Blockadeschritt bei 4 °C über Nacht in 50 ml PBS/Tween/5 % BSA/0,02 % NaAzid bei 4 °C schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Membran in 50 ml Primär-Antikörper (polyklonales Kaninchenserum gegen *E. coli*- α -Hämolyisin in PBS/Tween/5 % BSA/0,02 % NaAzid 1:10000) für 2 h RT. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für 2 \times 10 min in PBS/Tween und anschließend für 10 min in TBS/Tween gewaschen. 15 μ l des Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers, der gegen den Fc-Teil von Kaninchenantikörpern gerichtet ist, wurden in 15 ml TBST/1 % Blockier-Reagenz gelöst und die Membran für 90 min darin inkubiert. Nach Wiederholung zweier Waschschrte mit PBS/Tween und anschließend TBS/Tween entwickelte die Membran für exakt 5 min in einer Küvette mit 10 ml Lumi-Light-Lösung im Dunkeln. Nach Ablauf der 5 min wurde die Membran zwischen 2 Transparentfolien gelegt und im LAS-1000 die Licht-Emission der Lumi-Light-spaltenden Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit der Aida-Software.

2.8 Fluoreszenzfärbung von Epithelien

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der optischen Kontrasterhöhung von Zielstrukturen, meist Proteinen, durch spezifische Markierung mit Antikörpern. Diese sind entweder direkt mit einem Fluorophor gekoppelt oder werden in einem nachfolgenden Schritt über einen zweiten Antikörper fluoreszenzmarkiert. Die markierten Strukturen werden fluoreszenzoptisch abgebildet.

Alle Präparate wurden nach Durchführung aller jeweiligen Färbeschritte mit ddH₂O gespült und durch kurzes Waschen mit 98 % Ethanol auf dem Objektträger getrocknet. Im Anschluss wurden die Präparate mit 30 µl (60 µl bei Rattengewebe) Mount Fluor ProTaq_s mukosal überschichtet und durch Auflegen und leichtes Andrücken eines Deckgläschens "eingedeckelt". Die Objektträger wurden bis zur Mikroskopie bei RT dunkel in Kladden gelagert.

2.8.1 Immunfluoreszenzfärbung auf Zellfiltern

Die Fixierung der Filter erfolgte mit eiskaltem Methanol bei -20 °C für 15 min. Nach einmaligem PBS^{+Ca/Mg}-Waschen wurden die Zellen mit 0,5 % Triton-X 100 für 12 min RT permeabilisiert und anschließend mittels 1,5 %igem Ziegen Serum in PBS^{+Ca/Mg} (nachfolgend als Blockierungslösung bezeichnet) für 45 min RT geblockt. Die Primärantikörper gegen die Proteine Occludin, E-Cadherin oder ZO-1 wurden jeweils 1:100, das Serum gegen *E. coli* O4 1:1000 in Blockierungslösung als Mischung angesetzt und 130 µl apikal und 90 µl basal zugegeben, gefolgt von Übernachtinkubation bei 4 °C oder 3 h RT. Nach 4maligem Waschen mit Blockierungslösung (1, 5, 10 und 10 min) fand eine zweite Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (λ_{EX} = 488 oder 594 nm; 1:500 in Blockierungslösung als Mischung; 150 µl apikal, 100 µl basal) gegen die entsprechende Primärantikörperspezies für 3 h RT statt. Überschüssige Antikörper wurden wiederum durch 4 Waschschritte (1, 5, 10 und 10 min) mit Blockierungslösung entfernt.

2.8.2 Immunfluoreszenzfärbung des Epithels der Ratte

Es wurde eine Methode zur Färbung des gesamten in der Ussingkammer befindlichen Gewebes entwickelt und als "whole mount" bezeichnet.

Die Fixierung des Gewebes erfolgte sofort nach Ausbau der Präparate aus den Ussingständen. Dazu lag das gesamte Präparat plan auf einer Unterlage und wurde mit 10 %igem Formalin überschichtet und für 0,5 h RT "anfixiert". Der dem in den Ussingkammern untersuchten Bereich entsprechende Ausschnitt der Epithelien wurde mittels einer Lochstanze von 8 mm Durchmesser (ca. 0,5 cm²) ausgestanzt. Es ergab sich ein rundes Präparat, das für weitere 5 h in 6 ml Formalin fixiert wurde. Bis zur Färbung lagerten die Präparate dann in PBS^{+Ca/Mg} bei 4 °C für eine Zeit von mindestens 24 h.

Die Permeabilisierung des Rattengewebes erfolgte mittels 1 % Triton-X bei 37°C für 1 h. Danach wurde 3 h unter Schütteln mit Blockierungslösung (8 % Ziegenserum, 1 % BSA, 0,8 % Triton-X 100 in PBS^{+Ca/Mg}, 400 µl/Präparat) inkubiert. Alle nachfolgenden Wasch- und Färbeschritte wurden in dieser Blockierungslösung durchgeführt. Unter Schütteln bei 4 °C inkubierten die Präparate mit Primärantikörpern (Ansatz wie unter 2.8.1; 200 µl/Well) ÜN, jedoch mindestens 15 h. Nach exzessivem Waschen (5, 10, 30 und 60 min) wurde analog mit Sekundärantikörpern inkubiert und nachfolgend gewaschen.

2.8.3 Färbung von Zellkernen

Zellkerne der Epithelien wurden mit dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI angefärbt. Dazu wurden die Zellfilter oder Präparate des Kolons der Ratte für 15 - 30 min in 1 µg ml⁻¹ DAPI in PBS^{+Ca/Mg} (200 µl pro Epithel oder Filter) bei Raumtemperatur inkubiert und danach in PBS^{+Ca/Mg} gewaschen.

2.9 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

2.9.1 Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Ein Konfokalmikroskop (oder CLSM für "confocal laser scanning microscope") ist eine Variante des Lichtmikroskopes, das optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten aufnehmen kann. Mit einem Computer können diese Schnittbilder schichtweise zu einer dreidimensionalen Darstellung zusammengesetzt werden, die das untersuchte Präparat im Bereich der physikalischen Auflösungsgrenzen repräsentieren und die Lokalisation von zu untersuchenden Strukturen in diesen Objekten ermöglichen. In einem konventionellen Lichtmikroskop ist das Bild eine Überlagerung aus einer scharfen Abbildung der Punkte in der Objektebene und einer unscharfen Abbildung der Punkte ober- und unterhalb. In einem Konfokalmikroskop dagegen wird das Licht von

außerhalb der Objektebene mit einer Lochblende unterdrückt. Das Ergebnis ist eine deutliche Reduktion des Streulichtes in der zu betrachtenden Ebene.

In dieser Arbeit kam das Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 META der Firma Carl Zeiss unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Präparate zum Einsatz. Bei diesem Gerät wird ein Laser-Brennfleck sehr schnell zeilenweise in einer Objektebene bewegt. Das aus dem Brennfleck emmitierte Fluoreszenzlicht wird auf eine kleine Lochblende (Pinhole) abgebildet, hinter der sich ein lichtempfindlicher Empfänger befindet. Aus dem Empfängersignal wird dann zeilenweise im Computer ein (Schnitt-)Bild zusammengesetzt. Ein Laser-Scanning-Mikroskop ist ein komplexes System, das aus folgenden Komponenten besteht: Einem klassischen Mikroskop-Stativ, einem sogenannten Scan-Kopf, Ansterelektronik und -optik für diesen Scankopf, Computer zur Steuerung der Hardware, Signalerfassung, -auswertung, -darstellung und -archivierung.

2.9.2 Graphische Darstellung von konfokalen z-Stapel Aufnahmen

Die aus der Aufnahme von z-Stapeln mittels LSM510 META erhaltenen 3D-Datensätze von Präparaten werden entweder in Schnittbilddarstellung, 3D-Projektion oder Bildern ausgewählter optischer Schnittebenen dargestellt. Nachfolgend sind die verschiedenen Arten der Darstellung anhand von Beispielen erläutert.

Schnittbilddarstellung:

Die Darstellung wird anhand eines Beispielkörpers, der fiktiv mittels "optical slicing" im CLSM aufgenommen wurde, gezeigt.

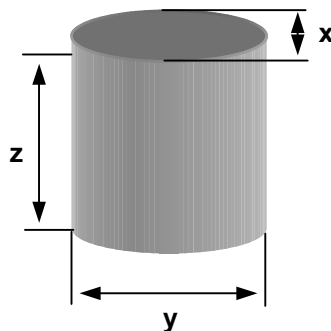


Abb. 6: **Darzustellendes Beispielobjekt - Zylinderkörper mit ellipsoider Grundfläche.**

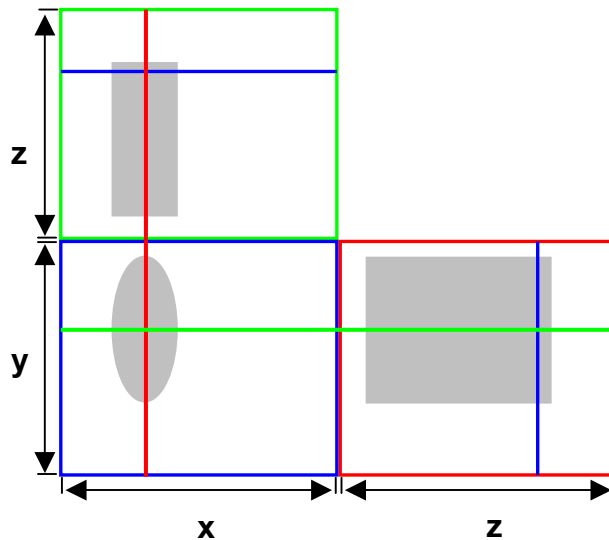


Abb. 7: **Schematische Darstellung eines konfokalen Schnittbildes am Beispiel Zylinderkörper mit ellipsoider Grundfläche.**

X und y beschreiben die laterale, z die axiale Ausdehnung des Präparates in Referenz zum Lichtweg des abbildenden Objektivs. Das blaue Teilbild zeigt die Aufnahme eines xy-Scans parallel zum Objektträger (Draufsicht). Die Position der roten Linie markiert den Ort der yz-Projektion, die im roten Teilbild dargestellt ist. Analog ist im grünen Teilbild die xz-Projektion entlang der grünen Linie dargestellt. Die blaue Linie gibt die Höhe der ausgewählten xy-Projektion in z-Richtung an.

3D-Projektion

Aus dem z-Stapel einer konfokalen Aufnahme wurde mittels Computer eine in x-Richtung drehbare 3D-Projektion des Präparates generiert. Es werden Einzelbilder der Projektion unter Angabe des Drehwinkels gezeigt.

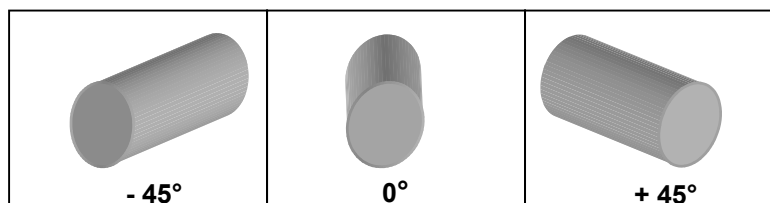


Abb. 8: **Einzelbilder einer 3D-Projektion unter verschiedenen Drehwinkeln.**

Bilder ausgewählter Ebenen

Aufnahmen ausgewählter Ebenen in z-Richtung werden als x-y-Bilder dargestellt.

2.9.3 Aufnahme von bakteriellen Läsionen

Epithelläsionen mit Bakteriendurchtritt im Zellkulturmodell wurden mittels Epifluoreszenz am LSM unter Verwendung des FITC Filters als Ansammlungen von Bakterien auf Filterebene lokalisiert. Der so ausgewählte Bereich wurde unter Verwendung hochauflösender Ölimmersionsobjektive (63× 1,4 NA Planapochromat; 40× 1,3 NA Neofluar) über die gesamte Höhe des Epithels unter Benutzung der "z-stack"-Funktion des LSM-Systems im Multitrackmode der eingesetzten Fluoreszenzen abgebildet. Aus diesem Datensatz entstanden die gezeigten Projektionen und Schnittbilder.

Mikroskopisch ergaben sich Läsionen im Epithel der Ratte aufgrund der dort vorliegenden massiven Adhärenz der *E. coli*, welche an unbeschädigten Arealen fast nicht zu beobachten war. Zusätzlich zur stark vermehrten Adhärenz der Bakterien war im Bereich von Läsionen eine losere Anordnung von Kernen zu sehen, welche der Lamina Propria zugeordnet wurden, da die Epithelschicht dort fehlte. Das durch Färbung von Zelladhäsionsproteinen gebildete Netz der Epithelzellen war in geschädigten Bereichen demzufolge ebenfalls verschwunden, was insgesamt eine eindeutige Zuordnung des Phänomens ermöglichte. Es wurden dann analog z-Stapel der interessanten Bereiche aufgenommen.

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel und WinStat. Die Grafiken wurden mit Excel und Origin erstellt. Alle Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben (mit n bezeichnet). Bei allen Zellkulturversuchen erfolgte die Darstellung der ermittelten Werte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes ("standard error of the mean"; SEM). Signifikanztestungen wurden bei zwei zu vergleichenden Gruppen mittels t-Test, bei Mehrfachtestung mittels ANOVA (einfaktoriell und Bonferroni post-hoc-Test zur Feststellung sich unterscheidender Mittelwerte) durchgeführt. Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von 5 % abgelehnt ($p < 0,05$). In den Abbildungen bedeuten: "*" = $p < 0,05$; "**" = $p < 0,01$ und "***" = $p < 0,002$.

Die Widerstandsentwicklung von Epithelien der Ratte wurde mittels Mann-Whitney-U-Testung beurteilt und im Boxplot dargestellt, da hier nicht von einer Normalverteilung der Grundgesamtheit ausgegangen werden kann und diese Darstellung die Werteverteilung besser veranschaulicht. Alle Versuche wurden mindestens zweifach wiederholt.

2.11 Versuchsabläufe

Im Rahmen der Dissertation wurde zunächst ein Epithelmodell mittels intestinaler Zelllinien auf permeablen Membranen (Millicell Transwell-System) für Translokationsexperimente etabliert. Anschließend wurden zur Charakterisierung der bakteriellen Translokation folgende Versuche durchgeführt:

- Screening nach translozierenden *E. coli*-Isolaten im Zellkulturmodell HT-29/B6 (Abschnitt 3.1.1)
- Messung des Widerstandsverlaufes während der Translokation (Abschnitt 3.1.1)
- Charakterisierung der Leitfähigkeitserhöhung durch die Translokation mittels Conductance scanning (Abschnitt 3.1.8)
- Wiederholung des Durchtritts an weiteren epithelialen Zelllinien (MDCK-C7 und -C11; Caco-2; T84; Abschnitt 3.1.7)
- Testung des Einflusses proinflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, IL-13) auf R^t Verlauf und Translokation (Abschnitt 3.1.2)
- Bestimmung der invasiven Eigenschaften von *E. coli*-Isolaten (Abschnitt 3.1.5)
- Messung des Einflusses von Endozytosehemmern auf Widerstandsverlauf, Translokation und Invasion (Abschnitt 3.1.3 und 3.1.5)
- Entwicklung und Anwendung eines geeigneten Färbeprotokolls zum Anfärben von Tight junction-Elementen, Zellkernen und Bakterien zur Darstellung der Translokation im Zellkulturmodell (Abschnitt 2.8)
- Entwicklung eines Verfahrens zur räumlichen Darstellung der bakteriellen Translokation mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.9.3)
- Übertragung des Translokationsmodells in das native Epithel der Ratte – Etablierung der Ussingversuche, Kulturbedingungen der Isolate in Ussingkammern (Abschnitt 3.2)

- Entwicklung und Anwendung eines geeigneten Färbeprotokolls zum Anfärben von Tight junction-Elementen, Zellkernen und Bakterien zur Darstellung der Translokation am Epithel der Ratte („whole mount“) (Abschnitt 3.2.2)
- Charakterisierung der Beteiligung von α -Hämolysin am bakteriellen Durchtritt (*focal leaks*); durch Erzeugen einer *hlyA*-defizienten Mutante *E. coli* O4, sowie eines Hämolysin-transformierten *E. coli* K12 (Abschnitt 3.3.1)
- Optimierung der Herstellung zellfreier Kulturüberstände mit hämolytischer Aktivität (Abschnitt 2.6.3.4)
- Charakterisierung der Hämolysinwirkung am Epithelmodell HT-29/B6 (Abschnitt 3.3.1.1.1)
- Etablierung der Proteinanalytik des Hämolysins mittels Western-Blot (Abschnitt 3.3.1)