

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden wird die Selektionierung eines translozierenden *E. coli*-Isolates im Vergleich zu nicht translozierenden Spezies dokumentiert (Abschnitt 3.1.1). Weiterführend sind Ergebnisse zum Translokationsprozess unter inflammatorischen Bedingungen dargestellt. Hierbei wird der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Barrierefunktion, das Invasionsverhalten der Isolate (Abschnitt 3.1.5) sowie deren Translokationseffizienz im Zellkultursystem untersucht (Abschnitt 3.1.2). Die fluoreszenzoptische und elektrophysiologische Charakterisierung des bakteriellen Übertrittes werden in den Abschnitten 3.1.6 und 3.1.8 beschrieben. Im Anschluss wird die Übertragung des Translokationsmodells ex-vivo anhand des gestrippten Kolons der Ratte gezeigt (Abschnitt 3.2). Schließlich wird der für den Durchtritt maßgebliche Beitrag des *E. coli*- $\alpha$ -Hämolysins beleuchtet und mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden charakterisiert.

#### 3.1 Translokation intestinal apathogener *E. coli*

Es wurden verschiedene *E. coli*-Isolate im Translokationsmodell auf ihre Fähigkeit zum Durchtritt über eine epitheliale Barriere untersucht. Die intestinale epitheliale Barriere wurde durch das Filter-Zellkulturmodell HT-29/B6 realisiert. Extraintestinal pathogene *Escherichia coli*-Stämme (ExPEC), welche pathologische Wirkungen entwickeln, wenn sie extraintestinale Kompartimente des Organismus erreichen, wurden durch die Auswahl von drei Stämmen repräsentiert: *E. coli* O4, *E. coli* O6:K5, *E. coli* K1. Als Referenzstamm wurde das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 eingesetzt. Alle gewählten Stämme sind nach gegenwärtigem Kenntnisstand intestinal apathogen.

Ein epithelialer Monolayer von HT-29/B6-Zellen wurde apikal mit  $10^9$  Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) des jeweiligen zu testenden Isolates inokuliert und die Anzahl der permeierten Bakterien durch Verdünnungsausstrich aus dem basalen Kompartiment quantifiziert. Gleichzeitig wurde der transepitheliale Widerstand ( $R^t$ ) über den epithelialen Monolayer im Versuchszeitraum gemessen.

##### 3.1.1 Translokationsscreening von *E. coli*-Isolaten (ExPEC)

Die Stämme O4:K3:H5 (*E. coli* O4), O6:K5:H1 (*E. coli* O6:K5), O2:K1:H4 (*E. coli* K1), O6:K5:H1 (*E. coli* Nissle 1917) wurden auf HT-29/B6-Monolayern der 28. – 33. Passage nach Übernachtskultur in LB-Medium in physiologischer Salzlösung inokuliert. Nach

4 h Inkubation erfolgte die Quantifizierung der KBE in der Basallösung. Es zeigte sich, dass nur *E. coli* O4 aus dem Basalkompartiment kultiviert werden konnte ( $2700 \pm 1251$  KBE; Abb. 9), während die Basalmedien aller anderen getesteten Isolate steril blieben. Darüberhinaus kam es während der Translokation des *E. coli* O4 zum Abfall des transepithelialen Widerstandes ( $56,3 \pm 2,7$  % nach 4 h; Abb. 10A). Längere Inkubationszeiten mit *E. coli* O4 führten zum Totalabfall des  $R^t$  ( $16,0 \pm 2,8$  % nach 6,75 h; Abb. 10B). Demgegenüber bewirkten die nicht translozierenden Isolate eine unterschiedlich starke Erhöhung von  $R^t$  auf HT-29/B6-Zellen, besonders deutlich ausgeprägt bei Inkubation mit *E. coli* Nissle 1917 ( $158,0 \pm 3,3$  % nach 5,3 h; Abb. 10B). Der transepitheliale Widerstand von Kontrollfiltern ohne bakterielle Inokulation blieb im Versuchszeitraum konstant.

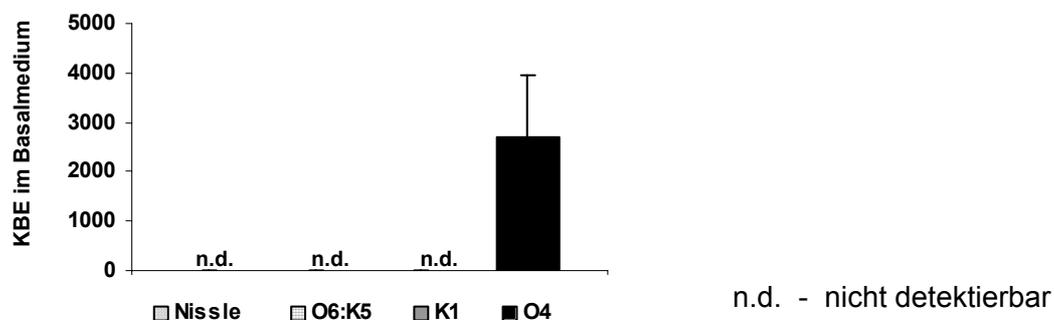


Abb. 9: Translokation von *E. coli* O4 nach 4 h.

Gezeigt ist die Translokation von *E. coli*-Isolaten durch HT-29/B6-Monolayer. Kolonie-bildende Einheiten wurden aus der Lösung des Basalkompartimentes der Zellfilter nach 4 h Inkubationszeit quantifiziert. Es tritt nur *E. coli* O4 durch das Barriere-modell ( $n = 5$ , Mittelwert  $\pm$  SEM).

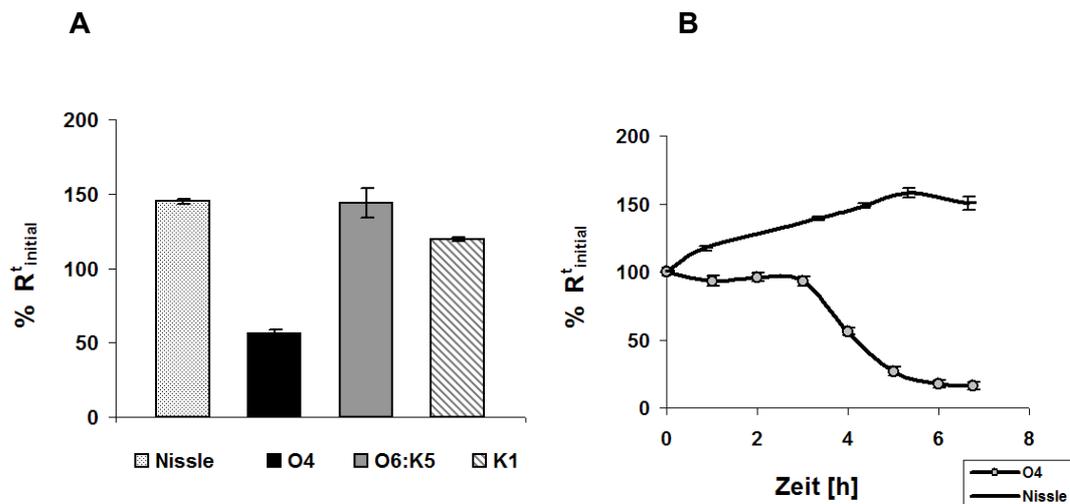


Abb. 10: **Effekt verschiedener *E. coli*-Isolate auf den transepithelialen Widerstand von HT-29/B6-Zellen.**

(A) Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des transepithelialen Widerstandes nach 4 h Inkubation mit *E. coli*-Isolaten ( $10^9$  KBE apikal pro Zellfilter) auf HT-29/B6-Monolayern. Die prozentuale Veränderung wurde bezüglich des Wertes bei Inoculum des jeweiligen Stammes angegeben ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA Bonferroni post-hoc  $p < 0,002$  O4 vs. K1, O6:K5, Nissle).

(B) Die zeitliche Veränderung des relativen transepithelialen Widerstandes (wie unter A) während Inkubation mit *E. coli*-Stämmen ist hier beispielhaft für *E. coli* O4 und *E. coli* Nissle 1917 dargestellt. *E. coli* O6:K5 sowie *E. coli* K1 zeigten ebenfalls einen  $R^t$ -Anstieg im Versuchszeitraum (siehe Abb. 10A).

### 3.1.2 Translokation unter entzündlichen Bedingungen

Eine entzündliche Situation wurde durch Präinkubation des Epithels mit pro-inflammatorischen Zytokinen simuliert. Frühere Arbeiten zeigten, dass hierbei die Barriere geschädigt wird, indem Apoptoserate und Schlussleistenpermeabilität erhöht werden [57, 17, 23]. In diesem experimentellen Ansatz sollte getestet werden, ob intestinal apathogene *E. coli*-Stämme unter der Bedingung einer Vorschädigung der epithelialen Barriere durch pro-inflammatorische Zytokine translozieren können und ob ein Durchtritt durch entzündliche Bedingungen beeinflusst wird.

### 3.1.2.1 Translokation von *E. coli* Nissle 1917 unter $TNF\alpha$ und IL-13

Inkubation von HT-29/B6-Monolayern mit den Zytokinen  $TNF\alpha$  und IL-13 [77] für 24, 48 und 72 h führte zu einem Widerstandsabfall auf  $42 \pm 1$  % (IL-13) bzw.  $9 \pm 0,4$  % ( $TNF\alpha$ ) (Abb. 11). Dies ist Ausdruck einer erhöhten Permeabilität und damit einer verminderten Barrierefunktion. Die eingesetzten proinflammatorischen Zytokine sind Schlüsselmediatoren intestinaler Entzündungsprozesse [77, 20].

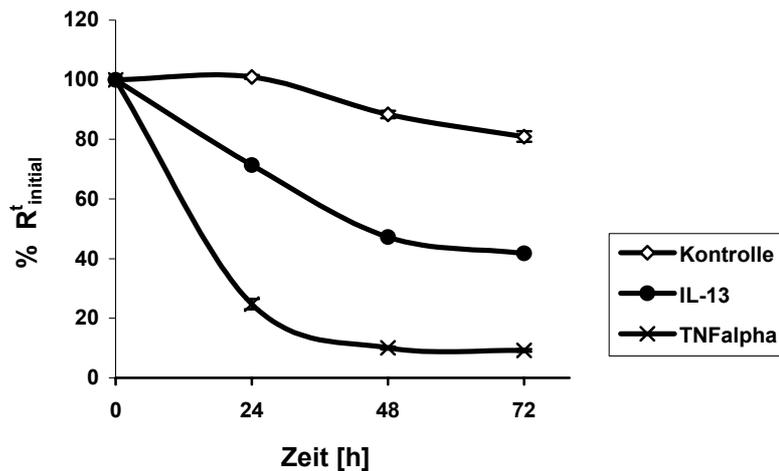


Abb. 11: **Zeitverlauf des transepithelialen Widerstandes von HT-29/B6-Zellen unter proinflammatorischen Zytokinen.**

*Zeitlicher Verlauf des transepithelialen Widerstandes (bezogen auf  $R^t$  bei Zytokin-zugabe) von HT-29/B6-Monolayern bei Inkubation mit  $TNF\alpha$  1000 Units  $ml^{-1}$  und IL-13 10 ng  $ml^{-1}$ . Die Zytokine wurden serosal zugegeben und für die Dauer des Experimentes im Medium belassen ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM; wenn SEM nicht zu sehen ist, liegen diese in den Markierungen der Werte).*

Im Anschluss an die Zytokin-Präinkubation wurden  $10^9$  KBE *E. coli* Nissle 1917 apikal inokuliert und der Translokationsversuch durchgeführt. Es zeigte sich, dass weder  $TNF\alpha$ - noch IL-13-Präinkubation der HT-29/B6-Zellen zum Übertritt des *E. coli* Nissle 1917 führten (Tab. 2). Dies gilt für alle untersuchten Zeitpunkte.

Zeit [h]	KBE im Basalmedium	
	IL-13	TNF $\alpha$
24	n.d.	n.d.
48	n.d.	n.d.
72	n.d.	n.d.

n.d. – nicht detektierbar

Tab. 2: **Translokation von *E. coli* Nissle 1917 unter entzündlichen Bedingungen.**

Nach Präinkubation der Zytokine (siehe oben) wurde bei 24 h, 48 h und 72 h ein Translokationsversuch mit *E. coli* Nissle 1917 durchgeführt. Zu keinem Zeitpunkt waren Keime aus dem Basalmedium kultivierbar; dies traf für beide getesteten Zytokine zu ( $n = 3$ ).

### 3.1.2.2 Einfluss von TNF $\alpha$ und IL-13 auf die Translokation von *E. coli* O4

Analog Abschnitt (3.1.2.1) wurde das Translokationsverhalten des Isolates *E. coli* O4 unter entzündlichen Bedingungen untersucht.

Zellfilter mit HT-29/B6-Zellen wurden entweder für 24 h mit TNF $\alpha$  oder für 48 h mit IL-13 inkubiert. Die unterschiedliche Inkubationsdauer ergab sich aus der Beobachtung, dass die eingesetzten Zytokine zu diesen Zeitpunkten reproduzierbar ca. 80% ihres Maximaleffekts auf den transepithelialen Widerstand erreicht hatten (siehe Abb. 11). Im Anschluss an die Zytokininkubation wurde ein Translokationsexperiment mit *E. coli* O4 in physiologischer Salzlösung durchgeführt.

Unter TNF $\alpha$ -Wirkung vertausendfachte sich die Durchtrittsmenge im Vergleich zur Kontrolle ( $1026 \pm 400$  KBE) auf  $1,3 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$  KBE; IL-13-Einwirkung erhöhte die Translokation auf ein Hundertfaches des Kontrollwertes ( $3,2 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$  KBE).

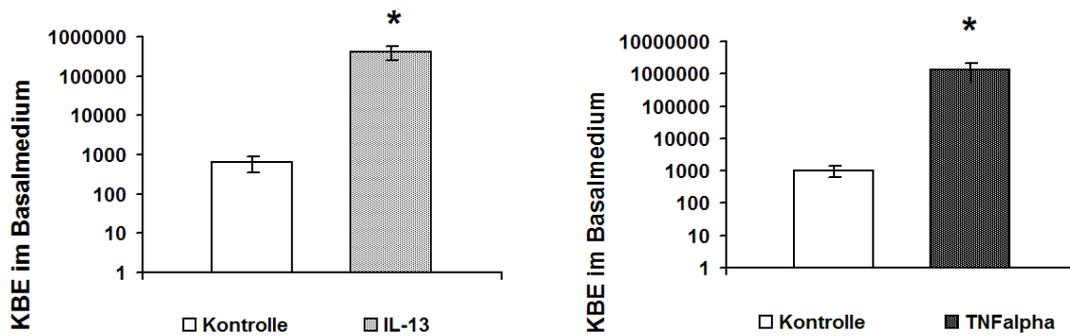


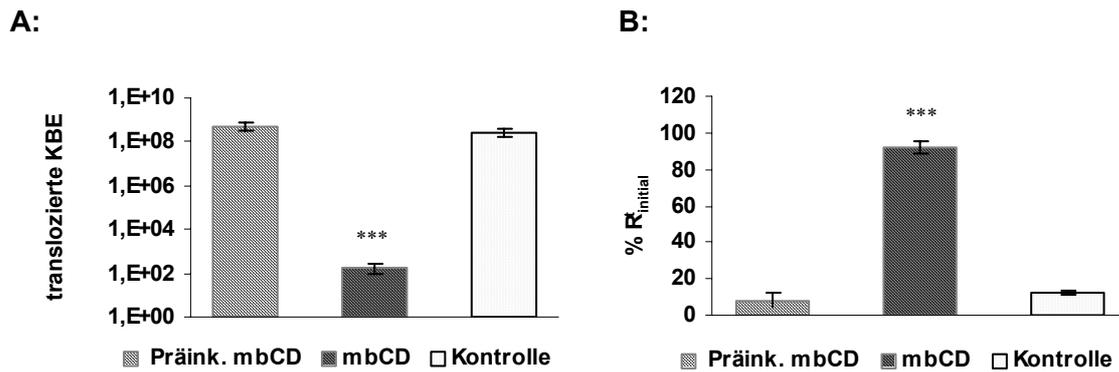
Abb. 12: **Translokation von *E. coli* O4 unter entzündlichen Bedingungen.**

Dargestellt sind die nach 4 h Versuchsdauer aus der Basallösung kultivierten KBE / Filter. Vor Inokulum des *E. coli* O4 wurden die HT-29/B6-Zellen 24 h mit  $1000 \text{ Units ml}^{-1} \text{ TNF}\alpha$  ( $n = 12$ ) bzw. 48 h mit  $10 \text{ ng ml}^{-1} \text{ IL-13}$  ( $n = 8$ ) präinkubiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM, t-Test  $p < 0,05$ ).

Dies zeigt, dass durch Wirkung der proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-13 der Monolayer HT-29/B6 vulnerabler für den *E. coli* O4-Effekt wurde.

### 3.1.3 Hemmung der Translokation von *E. coli* O4

Bezugnehmend auf das von Cruz et al. [33] etablierte Translokationsmodell des *E. coli* C25, welcher transzellulär über eine Modellbarriere intestinaler Epithelzellen tritt, wurden Endozytosehemmer im vorliegenden System der HT-29/B6-Zellen getestet. Da von den in Vorversuchen getesteten Hemmern Nocodazol, Nystatin, Fillipin und Chlorpromazin bei apikaler Zugabe im Versuchszeitraum Effekte auf den trans-epithelialen Widerstand und damit bei Vorinkubation möglicherweise bereits einen unerwünschten Effekt auf die epitheliale Barriere hatten, werden hier Versuche mit Methyl-beta-Cyclodextrin (mbCD) beschrieben. Diese Substanz ist ein ringförmiges Polysaccharid mit hoher Affinität zu Sterolen. Es ergibt sich die Möglichkeit, mittels mbCD den Cholesterolgehalt von Zellmembranen zu modulieren [29]. Damit wird die Fluidität der Membran eukaryonter Zellen verändert und Clathrin-abhängige Endozytose sowie die Ausbildung von Caveolae gehemmt [86, 136].



**Abb. 13: Einfluss von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf Translokationsverhalten und Widerstandseffekt des *E. coli* O4.**

Diagramm (A) zeigt eine Quantifizierung translozierter Keime nach 4 h apikaler Inkubation der Zellfilter mit *E. coli* O4 unter  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  Methyl-beta-Cyclodextrin: 1 h präinkubiert und ausgewaschen vs. 1 h präinkubiert und im Versuch belassen vs. Kontrolle. Abbildung (B) stellt die korrespondierenden relativen Widerstandswerte (bezogen auf  $R_{\text{Inoculum}}^{\dagger}$ ) nach 4 h Inkubation dar. Versuche mit mbCD-Präinkubation über 2 h erbrachten analoge Ergebnisse. Die Versuche wurden in RPMI durchgeführt (A:  $n = 5$ ; B:  $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; ANOVA Bonferroni-post-hoc,  $p < 0,002$  vs. Kontrolle.)

Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin im Kulturmedium hemmt sowohl die Translokation von *E. coli* O4 als auch den bei Durchtritt dieses Stammes auftretenden Widerstandsabfall. Eine Präinkubation der HT-29/B6-Zellen mit mbCD verhindert hingegen weder die Translokation noch den Widerstandsabfall durch *E. coli* O4. Die massive Translokation des Keims bei Widerstandsreduktion von mehr als 95% bedeutet letztlich die Angleichung basaler an die apikale bakterielle Konzentration, da ein solcher Widerstand einen komplett zerstörten Monolayer repräsentiert. Im Vergleich zu initialen Durchtrittsversuchen (Abschnitt 3.1) ist die Anzahl translozierter *E. coli* O4 nach 4 h deutlich erhöht, was sich durch die Verwendung von Zellmedium begründet. Wie sich herausstellte, führen die besseren Wachstumsbedingungen in Zellmedium zu vermehrter Toxinproduktion, wodurch die Schädigung des Monolayers geschieht. Dadurch wird nachfolgend die Translokation des Keims ermöglicht (Abschnitt 3.3.1).

### 3.1.4 Translokationsverhalten des *E. coli* O4mut

Um eine mögliche Beteiligung des *E. coli*- $\alpha$ -Hämolytins am Durchtritt des *E. coli* O4 zu untersuchen, wurde eine phänotypisch selektionierte, nichtlytische Mutante (siehe Abschnitt 2.6.2.1) in Translokationsexperimenten eingesetzt. Im Vergleich zum Wildtyp ergab sich eine drastische Reduktion translozierter Keime um den Faktor  $10^6$ . Im Gegensatz zum Wildtyp kam es bei Inkubation mit der Mutante zu einem Widerstandsanstieg über dem Epithel. Immunfluoreszenzfärbungen der epithelialen Struktur (analog zu Abschnitt 3.1.6) zeigten, dass die Mutante das Epithel nicht widerstandsrelevant schädigen kann, wodurch sich die starke Reduktion translozierter Bakterien im Vergleich zum Wildtyp erklärt. Die dennoch beobachtete, geringe Anzahl von Bakterien im basalen Kompartiment repräsentiert entweder einen transzellulären Anteil des Übertritts oder ist das Ergebnis von einzelnen Öffnungen im Zellverband, welche sich nicht in der globalen Widerstandsmessung niederschlagen. Trotzdem war dies für den untersuchten *E. coli* O4 spezifisch, da die anderen eingesetzten Isolate keinen Durchtritt zeigten (Abschnitt 3.1.1). Nachfolgende Versuche zur Hemmung einer möglichen transzellulären Passage des *E. coli* O4mut blieben erfolglos, es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl translozierter Keime. Beobachtet wurde, dass eine apikale Zugabe von  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  mbCD auf HT-29/B6-Monolayer einen Widerstandsabfall auf  $95,4 \pm 3,5 \%$ ; nach 6 h auf  $91,2 \pm 5,2 \%$  bewirkte. Demgegenüber führte eine basale Gabe gleicher Konzentration und Menge mbCD nach 2,5 h zu einem Abfall auf  $85,5 \pm 3,7 \%$ , der nach 6 h weiter auf  $37,2 \pm 6,7 \%$  des Anfangswiderstandes sank. Somit vergrößert eine Inkubation mit mbCD möglicherweise bereits vorhandene Fehlstellen und antagonisiert so den hemmenden Effekt auf die Internalisierung des Stammes.

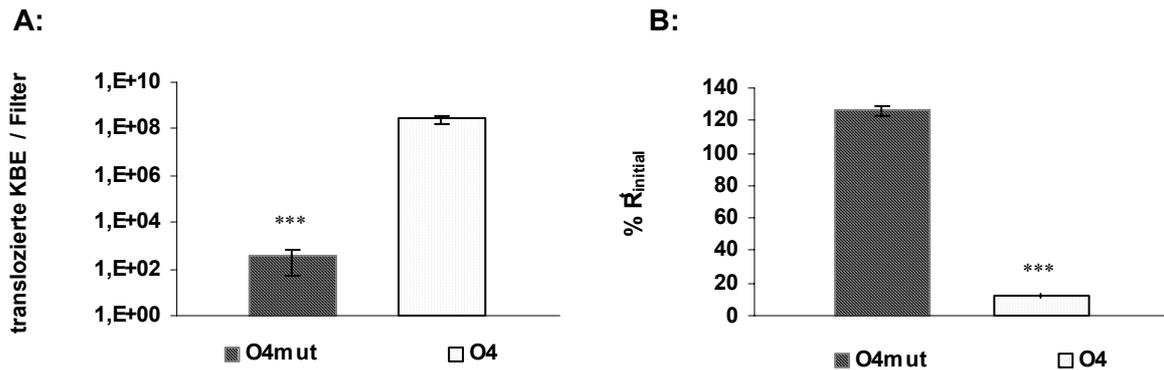


Abb. 14: **Translokation des Wildtyps versus nichtlytische Mutante.**

(A) Aus dem Basalkompartiment der HT-29/B6-Zellfilter durch Koloniezählung bestimmte Keimzahlen nach 4 h apikaler Inkubation mit *E. coli* O4 und O4mut. Die korrespondierenden normierten transepithelialen Widerstände zu Versuchsende (bezogen auf  $R_{\text{Inoculum}}^t$ ) sind unter (B) abgebildet ( $n = 5$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $t$ -Test  $p < 0,002$ ).

Die aufgeführten Versuchsergebnisse belegen die Eignung der nichtlytischen Mutante *E. coli* O4 als Kontrollstamm für weiterführende Invasions- und Translokationsversuche, da dies getrennt vom zellzerstörenden Effekt des Wildtyps untersucht werden konnte.

### 3.1.5 Invasionsverhalten des *E. coli* O4

Einen Weg des Barriereübertritts stellt die Permeation durch die Zellen dar. Um eine Beteiligung dieses Weges für das Isolat *E. coli* O4 zu testen, wurden Invasions- und Translokationsexperimente mit Wildtyp und nichtlytischer Mutante durchgeführt. Dabei wurde das die Translokation des Wildtyps hemmende Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin eingesetzt. Um eine direkte Interaktion des mbCD mit Bakterien oder mit von ihnen gebildeten löslichen Faktoren auszuschließen, wurden die Zellen apikal mit mbCD vorinkubiert. Der Wildtyp O4 zeigte daraufhin eine tendenziell verminderte Internalisierung, welche aber keine statistische Signifikanz erreichte. Die Präsenz von Methyl-beta-Cyclodextrin hingegen hemmte die Internalisierung ähnlich effizient wie den Durchtritt dieses Keims. Gleichzeitig lagen im Kontrollansatz und bei ständiger Präsenz von mbCD die Endwiderstände der VersuchsfILTER nach Bakterieninkubation über dem Ausgangsniveau ( $107,3 \pm 4,4$  % bzw.  $126,4 \pm 2,1$  %) während bei Präinkubation mit dem Hemmer ein Abfall (auf  $75,5 \pm 6,9$  %) zu beobachten war.

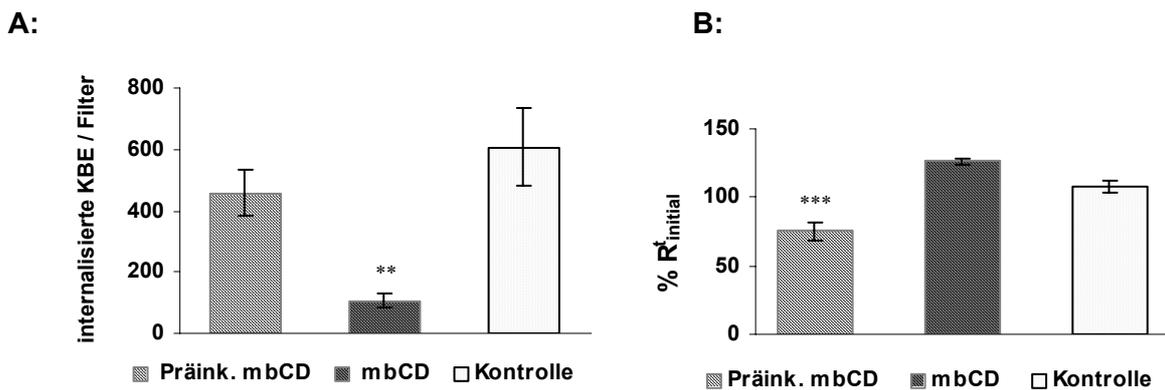


Abb. 15: Invasionsversuch *E. coli* O4.

*HT-29/B6-Monolayer* wurden für 2,5 h mit  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  mbCD vorinkubiert ("Präink. mbCD") und vor Inoculum ausgewaschen bzw. wurde mbCD 10 min vor Inoculum des *E. coli* O4 zugegeben ( $5 \text{ mmol l}^{-1}$ ; "mbCD"). Kontrolle war ein Ansatz ohne den Hemmer. Alle Ansätze wurden mit einer OD von 0,2 inokuliert und für 2,5 h inkubiert. ( $n = 5$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA Bonferroni-post-hoc  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,002^{***}$  vs. Kontrolle). (A) Bei Versuchsende mittels Gentamicin-Killing-Assay bestimmte intrazellulären Keime pro Filter. (B) Transepitheliale Widerstände am Ende der bakteriellen Inkubation (bezogen auf  $R^i_{\text{Inoculum}}$ ).

Dieser Abfall ist Ausdruck einer durch *E. coli* O4 verursachten Zerstörung des Monolayers mit darauffolgender Translokation (siehe Abschnitt 3.1.3) und stellt damit eine Verfälschung der Invasionswerte dar, da hierdurch Zugang der Bakterien zum basalen Kompartiment verstärkt stattfand und damit die Vergleichbarkeit zur Kontrolle der Invasionsbestimmung fraglich ist. Interessanterweise wird bei Präinkubation mit mbCD die durch den Layer gebildete Barriere vulnerabler für den *E. coli* O4-Effekt. Kürzere Inkubationszeiten zum Ausschluss der Überlagerung des zellzerstörenden Effektes über die Invasionseigenschaften des O4 waren nicht praktikabel, da die internalisierten Keimzahlen dann zu gering waren und die ständige Kontrolle des transepithelialen Widerstandes im Versuchszeitraum zur Abschätzung der Barriereintegrität nicht durchführbar war. Aus diesem Grund wurde die nichtlytische Mutante des Keims zur Bestimmung der invasiven Eigenschaften herangezogen, da sich zeigte, dass dieser nicht, oder nur in sehr begrenztem Maße, zur Zellschädigung fähig ist, da der dafür determinierende Faktor  $\alpha$ -Hämolyse fehlt (Abschnitt 2.6.2.1).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die nichtlytische Mutante des *E. coli* O4 in Invasionsversuchen getestet. Hierbei ergab sich, dass die Internalisierung ebenfalls durch Präinkubation mit mbCD gehemmt werden konnte. Gleichzeitig wurde durch ständige Anwesenheit des Hemmers im Apikalkompartiment der Filter die Invasion der Mutante nahezu vollständig verhindert. Die Endwiderstände lagen alle über Ausgangsniveau, was eine Schädigung des Monolayers in für die Internalisierung relevanter Größe ausschließt.

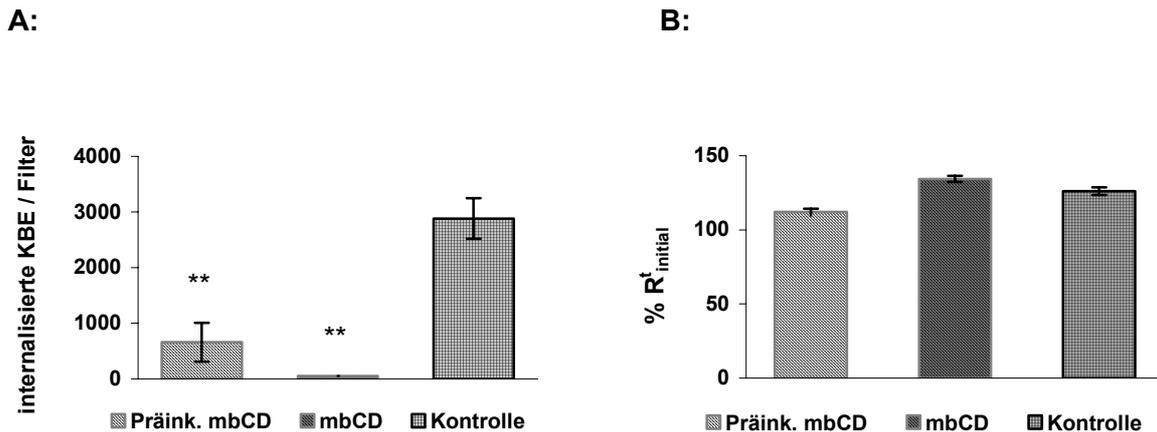


Abb. 16: Invasionsversuch *E. coli* O4mut.

HT-29/B6-Monolayer wurden für 2,5 h mit 5 mmol l<sup>-1</sup> mbCD vorinkubiert ("Präink. mbCD") und vor Inoculum ausgewaschen bzw. wurde mbCD 10 min vor Inoculum des *E. coli* O4mut zugegeben (5 mmol l<sup>-1</sup>; "mbCD"). "Kontrolle" wurde ohne den Hemmer inkubiert. Alle Ansätze wurden mit einer OD von 0,2 inokuliert und für 2,5 h inkubiert. (n = 5, Mittelwert ± SEM, ANOVA und Bonferroni-post-hoc, p < 0,002 \*\*\* vs. Kontrolle). (A) Bei Versuchsende mittels Gentamicin-Killing-Assay bestimmte intrazellulären Keime pro Filter. (B) Transepitheliale Widerstände am Ende der bakteriellen Inkubation (bezogen auf R<sup>t</sup><sub>Inoculum</sub>).

Diese Versuche zeigen, dass *E. coli* O4 die Fähigkeit zur Invasion des Epithels besitzt, welche unabhängig von der zellzerstörenden Aktivität des Wildtypstammes nachweisbar ist. Vergleichend wurde *E. coli* Nissle 1917 - ein nichtinvasiver, aber adhärenter Keim - in diesem Invasionsversuch getestet und zeigte minimale Invasion von 10 ± 5 KBE / Filter (n = 5).

### 3.1.6 Optische Darstellung des Translokationsweges

Basierend auf dem durch *E. coli* O4 verursachten Widerstandsabfall, der eine barriere-relevante Zerstörung der Epithelschicht vermuten ließ, wurde der Durchtritt der Bakterien durch das Epithel optisch dargestellt. Hierzu wurden mittels Immunfluoreszenz-techniken (Abschnitt 2.8) Zellgrenzen der Epithelzellen, deren Kerne und die *E. coli* mit verschiedenen Fluorophoren markiert. Die Verwendung von für *E. coli* impermeablen Filtern mit entsprechend kleiner Porengröße ermöglichte die Lokalisation der Durchtrittsorte, da die Keime am Ort der Permeation durch das Epithel auf der Filterebene akkumulierten. Diese Orte waren mittels Fluoreszenzmikroskopie eindeutig zu identifizieren. Diese Vorgehensweise ermöglichte nach Aufnahme von optischen Schnitten solcher Durchtrittsorte die dreidimensionale Darstellung verschieden stark ausgeprägter Translokationsprozesse.

#### 3.1.6.1 Bakterielle Translokation mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie

In Kontrollfiltern, inkubiert mit der Hämolyisin-defizienten Mutante *E. coli* O4mut (siehe Abschnitt 2.6.2.1), ergab sich nach Immunfluoreszenzfärbung ein homogenes, einschichtiges Epithel mit apikal adhärierenden Bakterien (Abb. 17). Die Färbung des Tight junction-assoziierten Proteins ZO-1 zeigte eine netzartige Verteilung im apikalen Bereich der Zellen. ZO-1 ist ein Marker von Zell-Zell-Verbindungen [119] und gibt damit einerseits Kontaktbereiche der Epithelzellen an und markiert andererseits die Grenze zwischen apikaler und lateraler Membran. Es ist zu erkennen, dass Bakterien an der apikalen Membran der Zellen adherieren, da das Signal über dem des ZO-1 in apikaler Richtung lokalisiert ist. Die Kernfärbung ist flächig durchgehend basal lokalisiert und zeigt eine mehrheitlich einschichtige Anordnung der Kerne. Der transepitheliale Widerstand solcher Filter war nach Bakterieninkubation stets höher als zum Zeitpunkt des Inoculum. Abb. 17 und Abb. 18 repräsentieren damit *E. coli*-inkubierte Monolayer, welche morphologisch und funktionell keine Schädigung und damit eine intakte Barriere aufweisen.

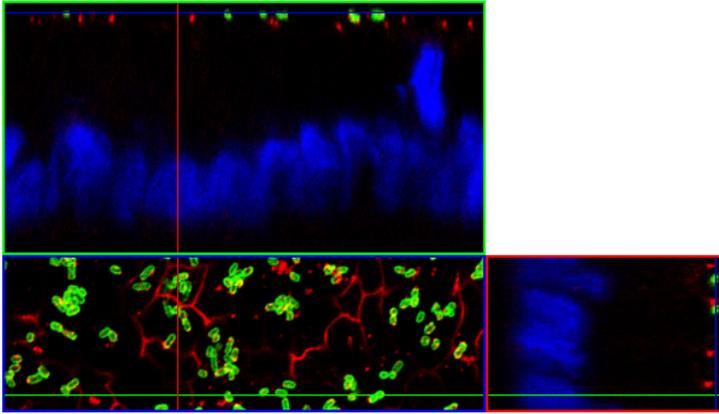
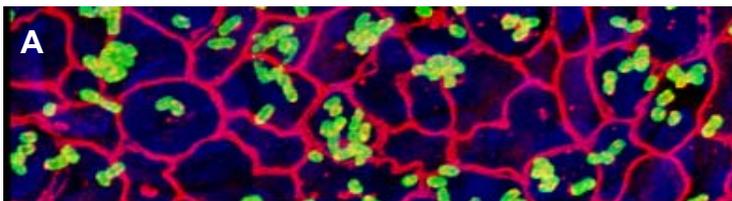
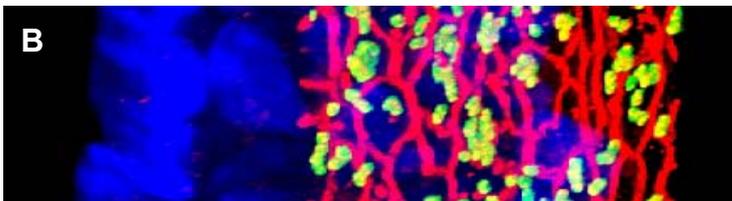


Abb. 17: **Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie eines HT-29/B6-Monolayers inkubiert mit *E. coli* O4mut.**

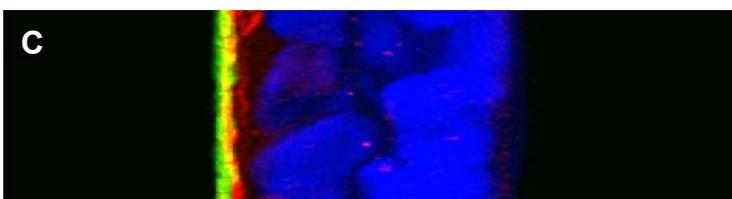
Die Schnittbilddarstellung eines HT-29/B6-Monolayers, der mit *E. coli* O4mut für 4 h inkubiert wurde, keinen Widerstandsabfall und keine Translokation zeigte. Angefärbt wurden das Tight junction-assoziierte Protein ZO-1 (rot), *E. coli* O4 (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Die Bildgröße beträgt x: 60  $\mu\text{m}$ , y: 20  $\mu\text{m}$ , z: 30  $\mu\text{m}$ .



Drehwinkel 0°



Drehwinkel +45°



Drehwinkel -90°

Abb. 18: **Projektion aus Abb. 17: ungeschädigter Monolayer mit adhärenenten Bakterien.**

Dargestellt ist eine 3D-Projektion aus gleichem Datensatz wie Abb. 18 unter verschiedenen Betrachtungswinkeln (A: Draufsicht; B: Rotation um 45°). Die strikte apikale Lokalisation von Bakterien und Tight junction ist deutlich zu erkennen (Bild C).

Zellfilter, die nach durch *E. coli* O4 verursachten Widerstandsabfall gefärbt wurden, zeigten lokale Ansammlungen von Bakterien unter dem Epithel (Abb. 19A). Durch die Verwendung von bakteriendichten Filtern akkumulierten die Bakterien nach Penetration des Monolayers auf Filterebene und waren nach Immunfluoreszenzfärbung als grün-fluoreszierende Plaques eindeutig zu identifizieren und quantifizieren. Dabei ergab sich eine positive Korrelation von Anzahl der Plaques und korrespondierendem Widerstandsabfall der Filter (Abb. 19B). Der beobachtete Widerstandsabfall *E. coli* O4 inkubierter Monolayer wird durch die entstehenden fokalen Läsionen im Zellverband verursacht, wobei im Zeitverlauf der Bakterieninkubation sowohl die Anzahl als auch die Größe der beobachteten Läsionen zunahm.

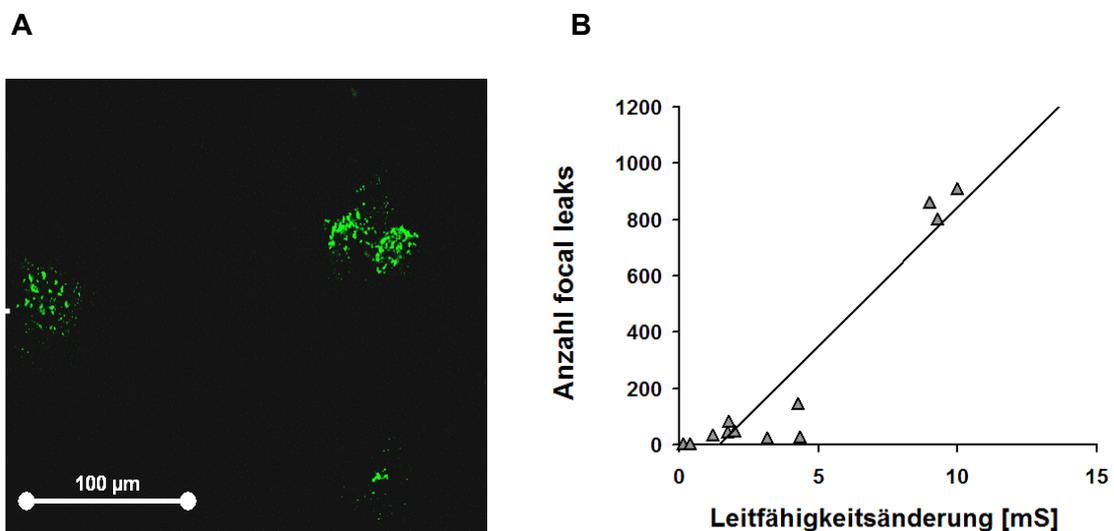


Abb. 19: *E. coli* O4-Akkumulation auf Filterebene von Zellkulturfiltern.

(A) Gefärbt wurde *E. coli* O4 (grün). Im Bild dargestellt sind Ansammlungen von *E. coli* O4 auf Filterebene eines Monolayers von HT-29/B6-Zellen. Der Widerstandsabfall dieser Zellfilter betrug nach 3-4 h 40-60 % des Ausgangswertes. Die Lokalisation der Bakterienplaques entspricht der Lokalisation der basalen Zellmembran (= Filtermembran).

(B) Änderung der Leitfähigkeit (bezogen auf den Wert bei Inoculum) von *E. coli* O4-inkubierten HT-29/B6-Zellfiltern unmittelbar vor Fixierung. Nach Immunfluoreszenzfärbung der Bakterien wurde die Anzahl der Ansammlungen pro Filter unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops ermittelt ( $n = 13$ ), wobei die Anhäufungen unabhängig ihrer Größe gezählt wurden. Es wurde ein linearer Zusammenhang unterstellt und die Werte entsprechend gefittet ( $r = 0,9$ ).

Mehrfachfluoreszenzfärbung wichtiger struktureller Elemente des epithelialen Monolayers wie Zellkerne und Proteine der Zell-Zell-Verbindungen (Abb. 17) und dreidimensionale Auflösung der Epithelschädigung (Abb. 22) ermöglichte die genaue morphologische Charakterisierung der fokalen Läsionen. Es zeigte sich, dass durch die Einwirkung des *E. coli* O4 Zellen aus dem epithelialen Verband zerstört wurden und an diesen Orten die Penetration der Bakterien durch die Epithelschicht erfolgte. Zusätzlich wurde beobachtet, dass E-Cadherin an den Rändern fokaler Läsionen verstärkt anfärbbar war, was nicht auf Occludin und ZO-1 zutraf.

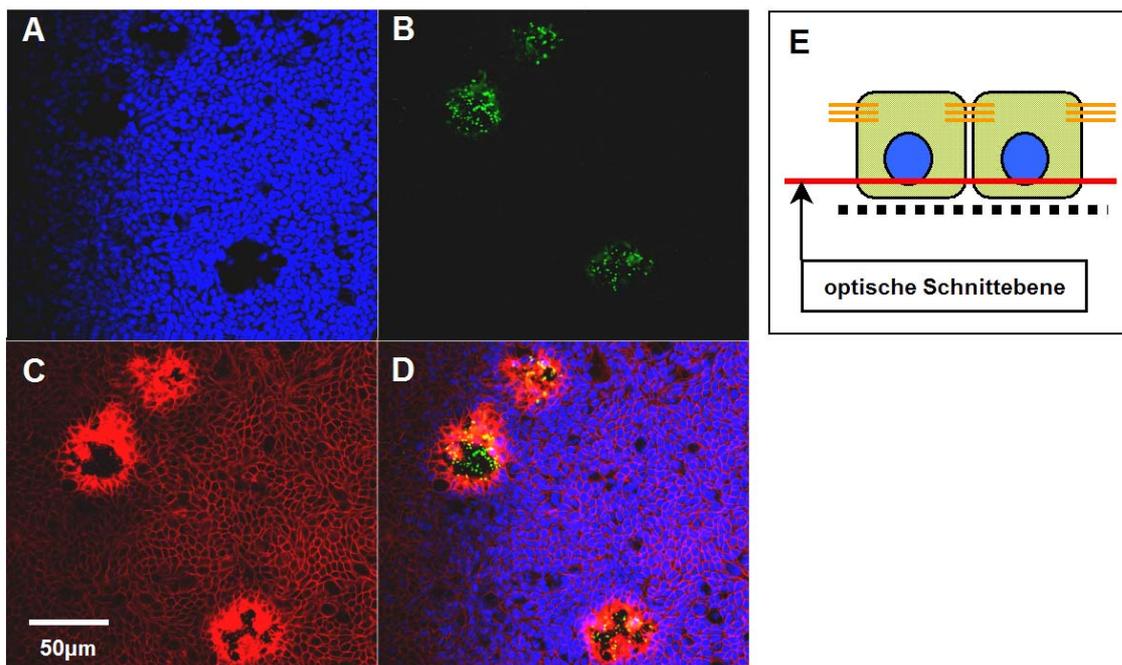


Abb. 20: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von focal leaks im epithelialen Monolayer.**

Dargestellt ist eine nach Fluoreszenzkanälen aufgeteilte konfokale Aufnahme (A - D) in einer Schnittebene ca. 7  $\mu\text{m}$  über Filterniveau (schematisch im Bildteil E gezeigt) eines *E. coli* O4-inkubierten Monolayers von HT-29/B6-Zellen mit einem Widerstandsabfall von ca. 50 % vor Fixation. Gefärbt wurde *E. coli* O4 (grün); Zellkerne (blau) und E-Cadherin (rot). Für diese Darstellung wurde eine E-Cadherinmarkierung gewählt, da dieses Protein aufgrund seiner Verteilung in den Zellen die lateralen Zellmembranen anzeigt und somit bis fast auf Filterniveau sichtbar macht. (Bildbereich 360  $\times$  360  $\mu\text{m}$ ). (A) Verteilung der Zellkerne über den Monolayer. Größere Bereiche ohne Kernfärbung zeigen lokale Schädigungen der Zellschicht an. (B) Bakterielle Plaques an Orten der Epithelschädigung. (C) Epitheliale Zellgrenzen, visualisiert durch E-Cadherinfärbung. Am Rand von focal leaks ist das

Signal stark erhöht. (D) Überlagerungsbild aller Fluoreszenzkanäle. Es zeigt die Lokalisation der Bakterien in fokalen Läsionen im Epithel, dargestellt durch die fehlenden Kern- und E-Cadherinfärbungen. (E) Schematische Anordnung von Epithelzellen (grün) auf einer Filtermembran (schwarz gestrichelt); Tight junctions sind orange und Zellkerne blau dargestellt. Die durch das CLSM realisierte optische Schnittebene ist durch eine rote Linie angezeigt.

Zum genaueren Verständnis der Dynamik fokaler Läsionen im Bezug zur Widerstandsänderung wurden Zellfilter nach geringem (ca. 20 %) und großem Widerstandsabfall (ca. 80 %) fixiert, gefärbt und repräsentative Läsionen mittels CLSM abgebildet. Als Läsionen zählten nur Lokalisationen in der Epithelschicht, bei denen Bakterien eindeutig unterhalb der Tight junction identifizierbar waren, da diese Struktur als begrenzend für eine parazelluläre Permeation angesehen wurde. Initial, korrespondierend zu geringem Widerstandsabfall, fanden sich wenige, kleine Läsionen, die Durchtrittsorte mit wenigen Mikrometern Durchmesser bildeten (Bsp. Abb. 21, siehe auch Abb. 19B). Bei fortgeschrittenem Widerstandsabfall hingegen bildeten sich großflächige Areale ohne Epithelzellen, welche massive Akkumulationen von Bakterien auf Filterebene zeigten. In beiden Fällen, also auch bei starker Schädigung des Monolayers durch *E. coli* O4, blieb die Fokaltät der Schädigung erhalten. Dies lässt auf progressive Zerstörung der Epithelzellen an bereits entstandenen Läsionen durch Einwirkung des *E. coli* O4 schließen.

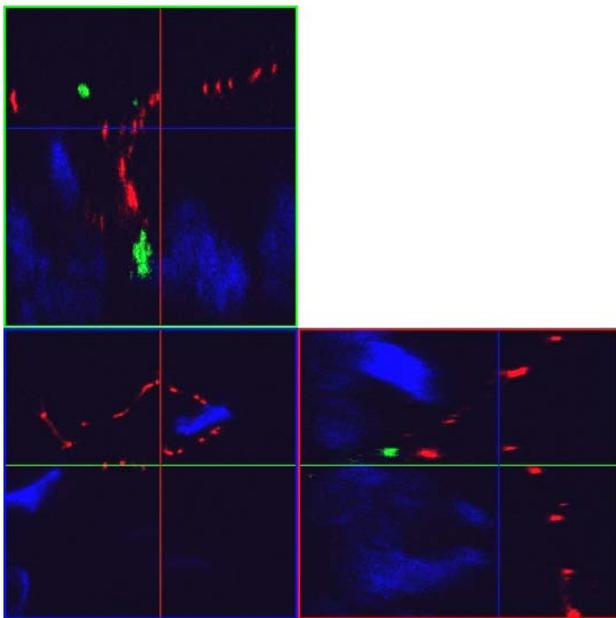


Abb. 21: **Schnittbilddarstellung eines "frühen" focal leaks.**

*Schnittbilddarstellung eines HT-29/B6-Monolayer, der mit E. coli O4 bis zu einem Widerstandsabfall von ca. 20 % inkubiert und anschließend fixiert wurde. Angefärbt wurden das Tight junction-Protein Occludin (rot), E. coli O4 (grün) und Zellkerne mit DAPI (blau). Die Bildgröße beträgt x: 37 µm, y: 37 µm, z: 40 µm. Die xy-Schnittebene zeigt eine initiale Läsion, umrandet von der Tight junction benachbarter Zellen (Occludinsignal = rot). In xz- sowie xz-Ebenen ist der Durchtritt einiger Bakterien zu sehen, die sich unterhalb der trichterförmigen Absenkung des Occludinnetzes befinden.*

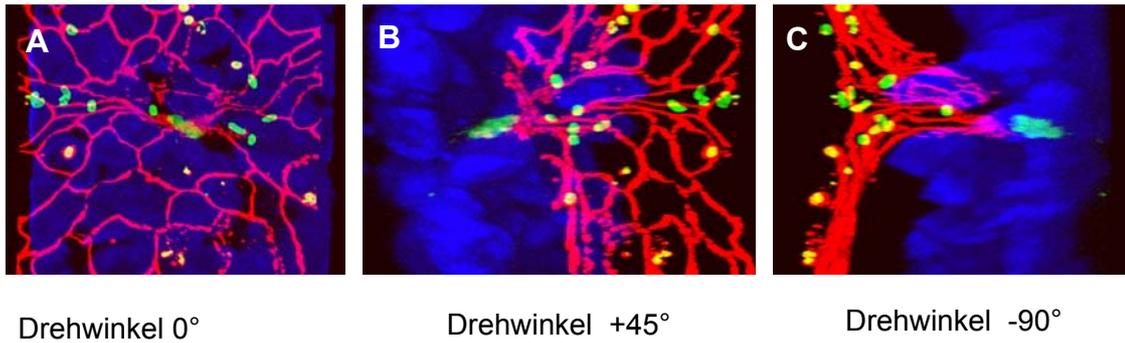


Abb. 22: **Projektion eines "frühen" focal leaks.**

3D-Projektion aus gleichem Datensatz wie Abb. 21 unter verschiedenen Betrachtungswinkeln. Es ist zu erkennen, dass das apikale Tight junction-Netz zur Läsion hin trichterförmig erniedrigt ist und an diesem Ort die Bakterien durchtreten. Die Größe der Läsion beträgt weniger als 5  $\mu\text{m}$ , gemessen am Occludinsignal der das Loch umgebenden Tight junction.

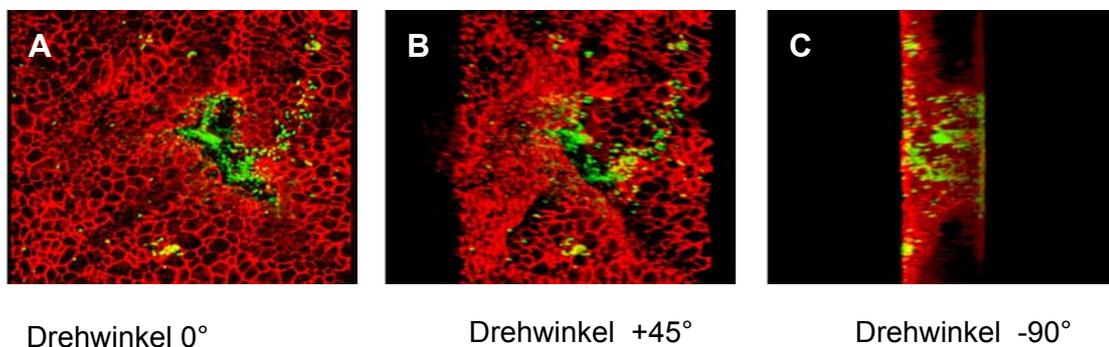


Abb. 23: **Projektion eines "späten" focal leaks.**

Läsion im HT-29/B6-Zelllayer bei ca. 80% Widerstandsabfall. Anfärbt wurden E-Cadherin (rot) und E. coli O4 (grün). Die Bildgröße beträgt x: 160  $\mu\text{m}$ , y: 160  $\mu\text{m}$ , z: 55  $\mu\text{m}$ . Die Längsausdehnung der Läsion beträgt ca. 120  $\mu\text{m}$ , die Breite ca. 30  $\mu\text{m}$  (gemessen an je maximaler Ausdehnung bezüglich E-Cadherinmarkierung).

### 3.1.7 Fokale Läsionen an verschiedenen epithelialen Zelllinien

Im Zuge der Charakterisierung des  $\alpha$ -Hämolytins als relevantes Toxin des *E. coli* O4-Effektes (Abschnitt 3.3.1) wurde zellfreies Kulturfiltrat des *E. coli* O4 hergestellt. Dieses Filtrat bot die Möglichkeit, im Vorhinein die lytische Aktivität der Präparation zu bestimmen und so exakt reproduzierbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Das *E. coli* O4-Kulturfiltrat wurde auf weiteren widerstandsbildenden Epithelien getestet, um die Übertragbarkeit des Effektes auf andere Zelllinien zu untersuchen. Dabei wurden T84-, MDCK-C7- und -C11- sowie Caco-2-Zellen eingesetzt und die Wirkung des Kulturfiltrates durch Widerstandsverlauf der Epithelien und morphologischer Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen der eingesetzten Zellfilter beurteilt. Alle eingesetzten epithelialen Zelllinien zeigten einen durch *E. coli* O4-Filtrat verursachten Widerstandsabfall mit zugehöriger fokaler Epithelschädigung, wobei das Ausmaß der Schädigung unterschiedlich war (Abb. 24).

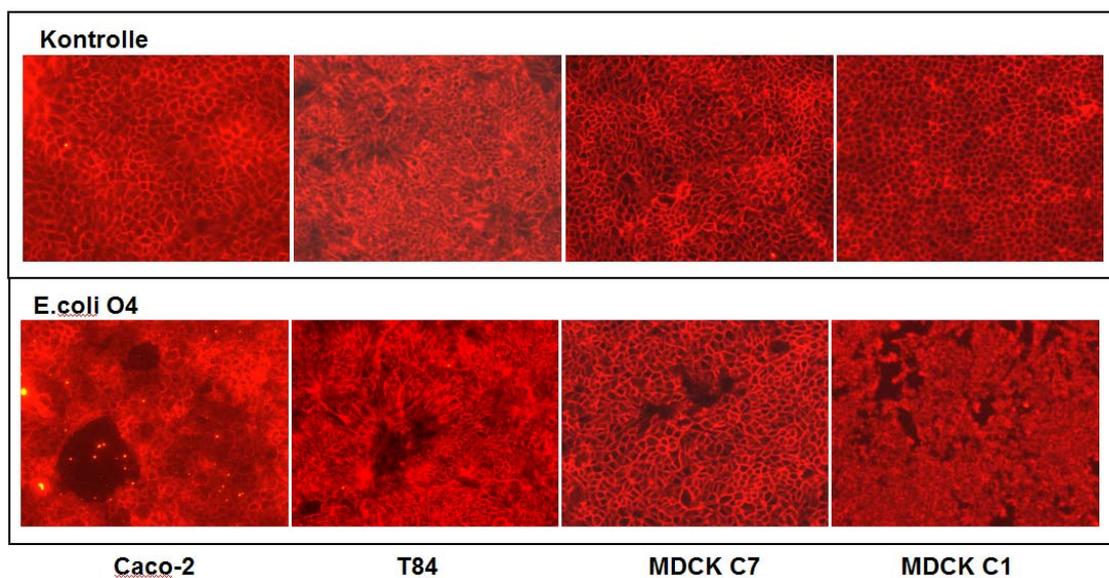


Abb. 24: **Focal leaks an verschiedenen epithelialen Zelllinien.**

*Epifluoreszenzaufnahmen epithelialer Monolayer verschiedener Zelllinien. Caco-2- und T84-Zellen wurden mit E. coli O4 apikal inokuliert, MDCK-C7- und -C11-Zellen mit dem Kulturfiltrat des E. coli O4. Der Widerstandsverlauf der Filter wurde gemessen und diese anschließend mit anti-E-Cadherin gefärbt (n = 3). Der Bildbereich beträgt 220 × 200  $\mu$ m.*

Der transepitheliale Widerstand Bakterien-exponierter Zellfilter fiel nach 3 h bei T84-Zellen auf  $21,5 \pm 0,6$  % und auf  $13,7 \pm 1,5$  % bei Caco-2-Zellen. Bei MDCK-C7- und -C11-Zellen kam es nach Inoculum bereits nach 1,5 h zu einem Abfall auf  $2,5 \pm 0,1$  %

bzw.  $20,8 \pm 2,5$  % des initialen Widerstands. Kontrollinkubationen mit dem Filtrat des *E. coli* O4mut hatten keine Effekte auf Widerstände. Morphologisch waren die Epithelien unverändert. Dies zeigt, dass sich der durch *E. coli* O4 hervorgerufene Effekt der fokalen Epithelschädigung auf andere epitheliale Zelllinien übertragen lässt.

### 3.1.8 Elektrophysiologische Charakterisierung von *focal leaks*

Der bei Translokation des *E. coli* O4 auftretende Widerstandsabfall des Epithels wurde mittels *Conductance scanning* untersucht, um die Lokalisation der Leitfähigkeitserhöhung zu bestimmen. Diese Methode erfasst die Leitfähigkeitsverteilung über der Epitheloberfläche [58] und ermöglicht es, diese mit dem morphologischen Befund der Bakterien-induzierten fokalen Läsionen zu korrelieren.

Dazu wurden Kontrollen und *E. coli* O4-inkubierte HT-29/B6-Monolayer unter videomikroskopischer Kontrolle flächig abgescannert. *Focal leaks* waren dabei lichtmikroskopisch zu erkennen (Abb. 25A) und ihre Leitfähigkeit wurde nachfolgend mittels *Conductance scanning* quantifiziert. Diese Läsionen wiesen im Zentrum stark erhöhte Leitfähigkeiten auf, die mit zunehmendem Abstand vom Zentrum der Läsion (meist innerhalb 50 - 100  $\mu\text{m}$ , siehe Abb. 25B) bis auf das Niveau des intakten Umgebungsepithels abnahmen.

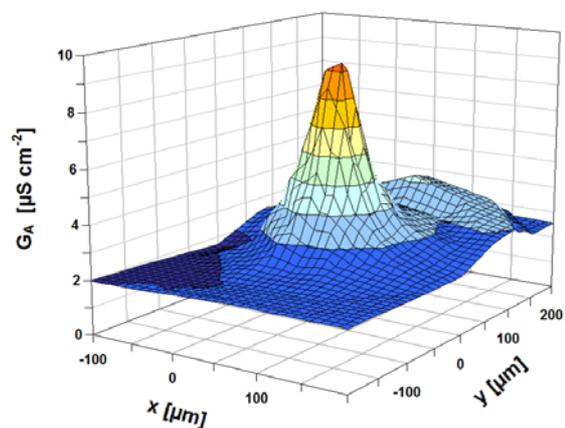
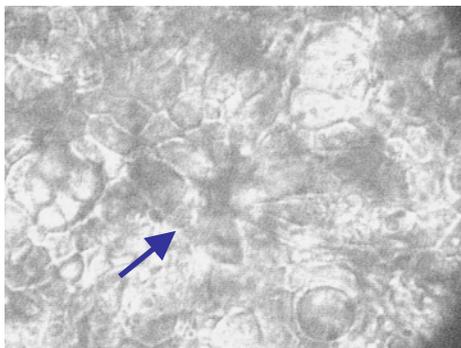


Abb. 25: **Charakterisierung von *focal leaks*.**

(A) Videomikroskopische Aufnahme eines charakteristischen "frühen" focal leaks im HT-29/B6-Monolayer. (B) Mittels *Conductance scanning* gemessene Leitfähigkeitsverteilung über einem focal leak.

Fokale Leitfähigkeitserhöhungen treten auch in unbehandeltem HT-29/B6-Kontrollepithel auf und sind dort charakteristisch für apoptotische Rosetten [17].

Apoptosen und frühe *focal leaks* sind lichtmikroskopisch nicht eindeutig zu unterscheiden: Strukturen erhöhter Leitfähigkeit wurden in Kontrollfiltern aber vergleichsweise selten beobachtet. Ihr Leitwert lag stets unter  $0,22 \mu\text{S}$ . Dies stimmt mit früheren Resultaten unserer Arbeitsgruppe zu apoptotischen Veränderungen an HT-29/B6-Monolayern [17] sehr gut überein. Läsionen *E. coli* O4-exponierter HT-29/B6-Filter hingegen erreichten Leitwerte von bis zu  $4,84 \mu\text{S}$  (Abb. 26) und ein Vergleich beider Ansätze ergab für die vermessenen Läsionen einen zehnfach höheren mittleren Leitwert *E. coli* O4-exponierter Monolayer ( $1,29 \pm 0,29 \mu\text{S}$ ) gegenüber Kontrollfiltern ( $0,12 \pm 0,03 \mu\text{S}$ ;  $p < 0,002$ ). Außerhalb apoptotischer Rosetten oder *focal leaks* war die Leitfähigkeitsverteilung in Kontroll- und *E. coli* O4-Epithelien homogen und die basale Leitfähigkeit in *E. coli* O4-Monolayern ( $1,48 \pm 0,17 \text{ mS cm}^{-2}$ ) nicht signifikant erhöht (Kontrollen:  $1,35 \pm 0,08 \text{ mS cm}^{-2}$ , siehe Abb. 26).

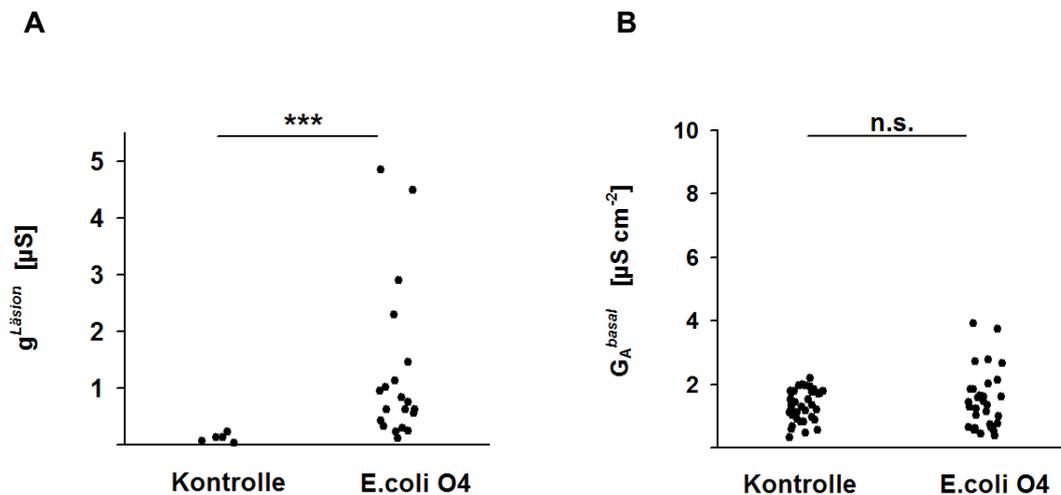


Abb. 26: **Conductance scanning.**

(A) Leitwerte von leaks ( $g^{\text{Läsion}}$ ) *E. coli* O4-inkubierter ( $n = 21$ ) vs. Kontrollmonolayer ( $n = 5$ ). (B) basale Leitfähigkeit ( $G_A^{\text{basal}}$ ) *E. coli* O4-inkubierter ( $n = 38$ ) vs. Kontrollmonolayer ( $n = 31$ ).

Damit wurde gezeigt, dass der Widerstandsabfall *E. coli* O4-exponierter epithelialer Layer durch Ausbildung permanenter, fokaler Läsionen - *focal leaks* - begründet ist und diese den Durchtritt von Soluten gestatten, während umgebendes Epithel hinsichtlich seiner Solutpermeabilität nicht beeinträchtigt wird.

### 3.2 **Focal leaks am Kolonepithel der Ratte**

Ein wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit ist die Hypothese, dass als "intestinal apathogen" klassifizierte *E. coli* unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, die epitheliale Barriere zu schädigen und/oder diese zu überwinden. Um diese Hypothese zu testen, wurden mit dem Isolat O4, von dem hier gezeigt wurde, dass es im Zellkulturmodell transloziert und invasiv ist, Versuche am nativen Kolon der Ratte durchgeführt. Die Verwendung von "gestripptem" Kolon in Ussingkammern (Abschnitt 2.5) ermöglicht aufgrund der Langlebigkeit des Präparats die Messung des transepithelialen Widerstandes über die gesamte Versuchszeit. Im Anschluss konnten diese Epithelien, wie zuvor die Zellkulturen, mittels Immunfluoreszenz gefärbt und Widerstandsveränderungen nach Bakterienexposition morphologischen Veränderungen zugeordnet werden. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse zeigen eindeutig die Potenz extraintestinal pathogener *E. coli*, bereits im Darm Schädigungen relevanten Ausmaßes hervorzurufen.

#### 3.2.1 Widerstandsverlauf der *E. coli* O4-Wirkung am Kolonepithel der Ratte

Basierend auf den vorangegangenen Versuchen im Zellkulturmodell wurde der Effekt der Läsionsbildung im nativen Epithel der Ratte nachvollzogen. In Ussingexperimenten wurde dazu distales Kolon der Ratte mit *E. coli* O4 (n = 37) versus *E. coli* O4mut (n = 26) mukosal inkubiert (siehe Abschnitt 2.5.) und der Widerstandsverlauf der Epithelien über der Zeit dokumentiert. Kontrollepithelien ohne Zugabe von Bakterien hielten einen stabilen Widerstand nach "Einlaufen" länger als 10 h. Die lytische Aktivität der in der Ussingkammer wachsenden Kulturen wurde über den Versuchszeitraum kontrolliert. Es wurden nur geringe Variationen zwischen den Versuchen beobachtet, welche, beurteilt anhand ihrer lytischen Wirkung im Zellkulturmodell, keinen Unterschied in ihrer zellzerstörenden Potenz darstellten.

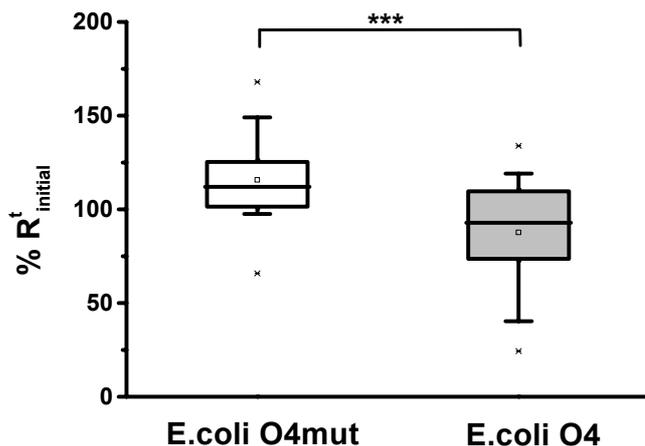


Abb. 27: Widerstand *E. coli* O4-inkubierter Kolonepithelien der Ratte.

In Ussingkammern montierte Kolonepithelien wurden mukosal mit *E. coli* O4 ( $n = 37$ ) vs. *E. coli* O4mut ( $n = 26$ ) inkubiert und die Widerstandswerte nach 4 h ausgewertet (bezogen auf  $R^t_{Inoculum}$ ). Dargestellt ist die prozentuale Änderung des transepithelialen Widerstands bezogen auf den Wert bei Inokulum. Der Boxplot zeigt folgende Streu- und Lagemaße der Datenverteilung: Minima und Maxima (Sterne), 5 % und 95 % Perzentil (Spannweitenlinien), 25 % und 75 % Perzentil (Grenzen der Box), Median (Linien in der Box) und Mittelwert (Kästen in der Box). "\*\*\*\*" zeigt statistische Signifikanz ( $p < 0,002$ ) nach Mann-Whitney-U-Testung an.

Im Vergleich zu *E. coli* O4mut zeigten *E. coli* O4 inkubierte Epithelien einen deutlichen Widerstandsabfall nach 4 h Inkubation, welcher in einer Subgruppe ( $R^t_{4h} < 65\%$ ) meist weiter sank. Mittelwert und Median lagen in der Gruppe *E. coli* O4 beide unterhalb des Ausgangswiderstandes, vergleichbar mit Zellkulturergebnissen stiegen diese bei der Mutante im Mittel über die Versuchszeit leicht an. Eine repräsentative Anzahl von Epithelien aller Widerstandsverläufe wurde mittels Immunfluoreszenz gefärbt und bewertet ( $n=5$ ). Dabei ergab sich, dass Präparate beider Stämme mit Widerstandsanstieg oder nur leichtem Widerstandsabfall (auf 80-90 %) mit der eingesetzten Färbung nicht zu unterscheiden waren. Demgegenüber gingen Widerstandsabfälle unter 65 % mit der Ausbildung fokaler Läsionen im Oberflächenepithel und massiver Zunahme der bakteriellen Adhärenz einher (Absch. 3.2.2). Trotzdem blieb ein statistisch signifikanter Unterschied bei Vergleich beider Gruppen auch dann erhalten, wenn in der *E. coli* O4-Gruppe alle Widerstandswerte unter 65 % nicht in den Test einfließen, da bei diesen die Entstehung von Läsionen als maßgebliche Ursache des Widerstandsabfalls zugeordnet wurde ( $p = 0,013$ ; Mann-Whitney-U-Test). Für diesen signifikanten Unterschied war mit den gewählten

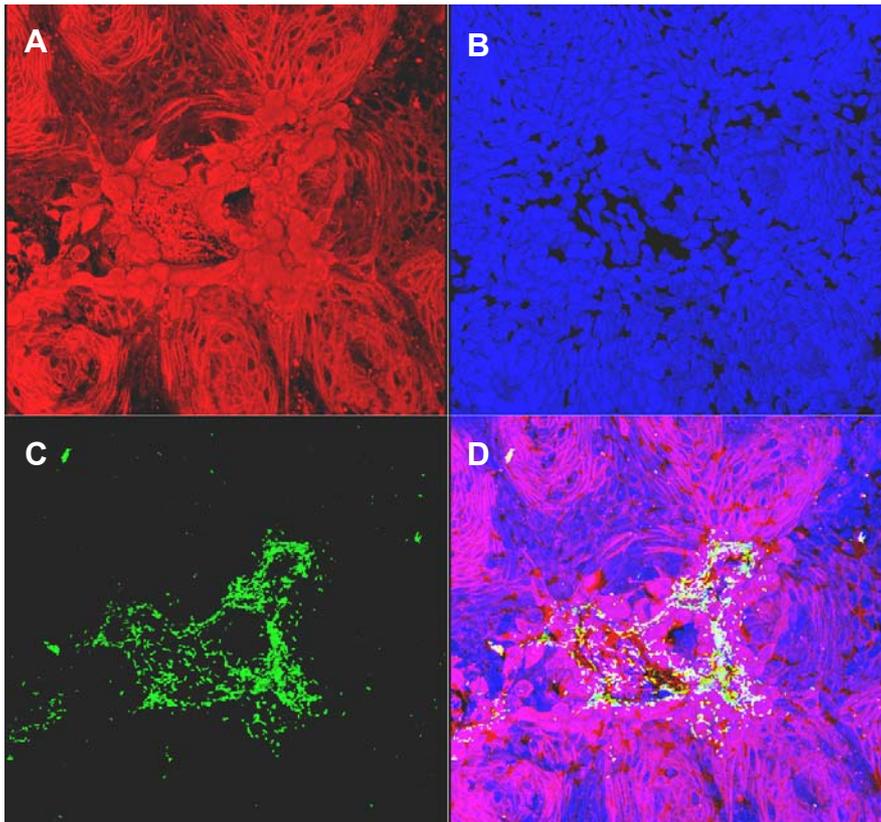
Methoden morphologisch kein Unterschied zu erkennen. Unterschiede im Kurzschlussstromverhalten als Maß einer ständig erhöhten sekretorischen Aktivität wurden ebenfalls nicht beobachtet.

### 3.2.2 Optische Darstellung von *focal leaks* am Kolonepithel der Ratte

Nach Etablierung eines Färbeprotokolls zur Immunfluoreszenz an formalinfixierten Kolonepithelien der Ratte ("whole mount") war es möglich, Veränderungen im vollständigen, in der Ussingkammer Bakterien-exponierten Gewebe zu untersuchen. Im Gegensatz zu Gewebeschnitten gelang es hierdurch, die Anzahl, die Verteilung und die Ausdehnung von Läsionen, die Adhärenz sowie die Penetration der eingesetzten *E. coli* ins Gewebe besser zu beurteilen. Des Weiteren wurden durch dieses Protokoll Schneideartefakte vermieden. Verglichen mit der Läsionsbildung im Zellkulturmodell wiesen native Epithelien, die nach Widerstandsabfall unter 65 % gefärbt wurden, deutlich weniger, dafür oft größere Läsionen auf. Teilweise waren nur ein bis zwei große (1-2 mm Durchmesser) Bereiche des Oberflächenepithels zerstört, während der übrige Bereich morphologisch intakte Strukturen aufwies. Gleichzeitig wurden auch kleine, dem Zellkulturmodell vergleichbare Läsionen beobachtet. Epithelien ohne Widerstandsabfall zeigten keine Läsionen. Hier war außerdem kaum bakterielle Adhärenz zu beobachten. Im Gegensatz dazu adherierten in Bereichen zerstörten Oberflächenepithels massiv *E. coli* O4 (Abb. 28C), während in umgebenden Arealen wiederum kaum adhärente Bakterien detektiert wurden. Areale außerhalb fokaler Läsionen waren für alle eingesetzten Epithelien morphologisch nicht zu unterscheiden.

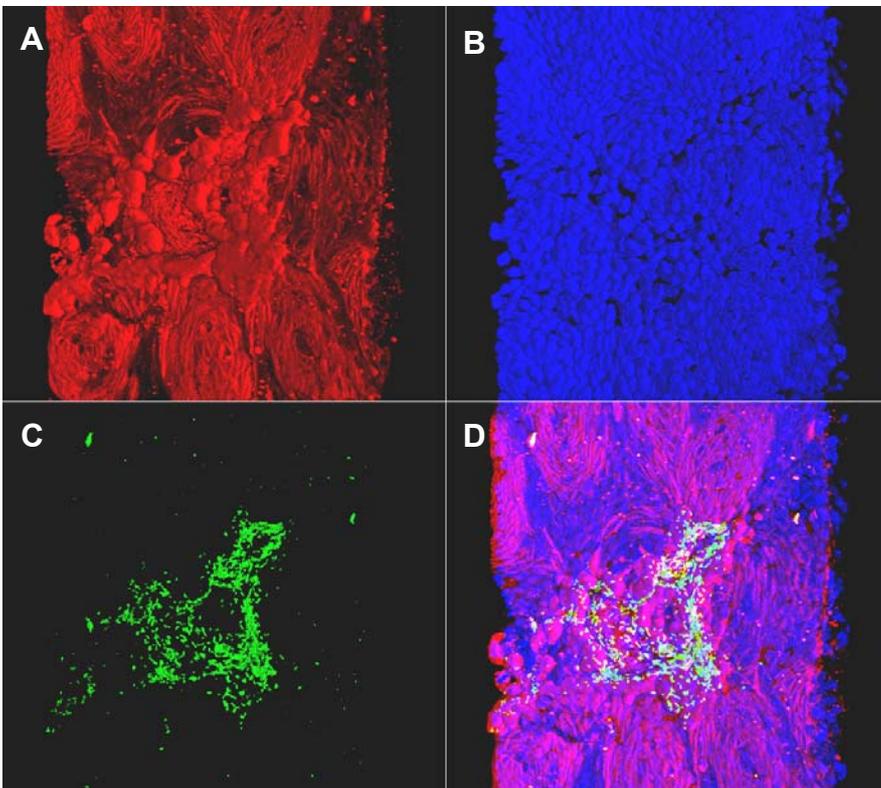
Die konfokalmikroskopische Darstellung der Schädigung des Kolonepithels der Ratte in axialer Richtung erfasst im Gegensatz zu den Monolayern der Zellkulturexperimente nur einen Ausschnitt des eingesetzten Präparates, da die nativen Präparationen eine Dicke von mehreren hundert Mikrometern aufweisen, mit der optischen Schnitttechnik sinnvollerweise jedoch nur etwa 50 µm "tief" abgebildet werden kann. Größere Abbildungstiefen führen zu stärkeren Abbildungsfehlern und die Signalstärke nimmt drastisch ab. Es wurde von mukosaler Seite in die Kolonmukosa der Ratte fokussiert, wodurch das Oberflächenepithel, Kryptenwälle und Teile der Lamina propria abbildbar waren. Damit entspricht der im Kolon der Ratte abgebildete Bereich dem Zellkulturmodell.

I:



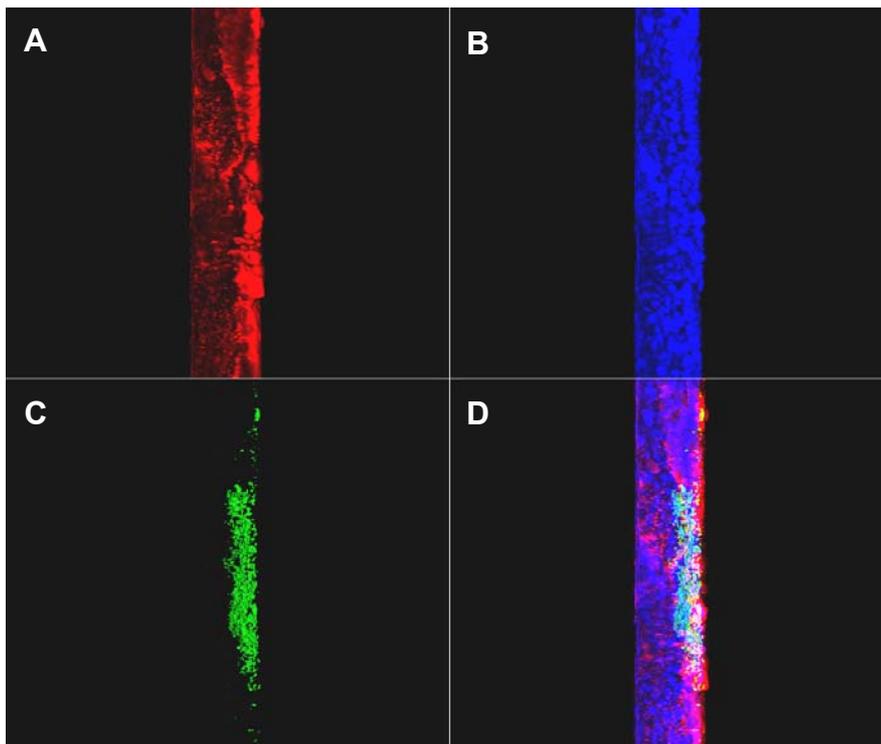
Drehwinkel 0°

II:



Drehwinkel -45°

III:



Drehwinkel +90°

Abb. 28: **Projektion eines focal leaks im Kolonepithel der Ratte.**

3D-Projektion einer Läsion im Kolonepithel der Ratte nach Widerstandsabfall durch *E. coli* O4 unter verschiedenen Betrachtungswinkeln. Gefärbt sind E-cadherin (A-rot), *E. coli* O4 (C-grün) und Zellkerne (B-blau); der Bildbereich D stellt die Überlagerung aller drei Fluoreszenzkanäle dar. Die Läsion befindet sich in der Bildmitte, der Randbereich zeigt die normale Morphologie des Epithels mit Oberflächenepithel und Krypteneingängen. Der abgebildete Präparatbereich beträgt x: 230  $\mu\text{m}$ , y: 230  $\mu\text{m}$ , z: 36,4  $\mu\text{m}$ . Der Ort der Epithelschädigung ist durch verstärktes E-Cadherinsignal, bakterielle Adhärenz und losereres Kernmuster angezeigt (Abb. 28-I). In Abb. 28-III ist die Penetration der Bakterien bis auf die Ebene der Lamina propria unterhalb des Oberflächenepithels gut zu erkennen. (A) In der Bildmitte ist die fokale Schädigung des Oberflächenepithels durch verstärktes E-Cadherinsignal angezeigt; die netzartige Struktur ist nicht mehr vorhanden und es sind herausgelöste Zellen zu erkennen. Es sind Krypten anhand ihrer ringförmigen Superstruktur auf der Darstellung zu erkennen. (B) Während im Randbereich das dichte Kernmuster des Kryptenwall- und Oberflächenepithels abgebildet ist, zeigt die Bildmitte die Auflösung dieser Anordnung. (C) Adhärierende *E. coli* O4 finden sich überwiegend im Bereich der Schädigung.

### 3.3 Mechanismus der Translokation von *E. coli* O4

Die bei *E. coli* O4 beobachtete massive Translokation bei gleichzeitigem Widerstandsabfall deutete auf ein zellschädigendes Toxin als wichtigen Faktor für den beobachteten Effekt. Da Kultivierung des Stammes O4 auf Blutagarplatten lytisches Potenzial zeigte und uropathogene *E. coli* mehrheitlich  $\alpha$ -Hämolysinträger sind, wurde eine entsprechende Analytik durchgeführt. Im Ergebnis wurde die Beteiligung des *E. coli*- $\alpha$ -Hämolysins am beschriebenen Effekt der Barrierestörung durch Transformanten- und Mutantenexperimente eindeutig belegt.

#### 3.3.1 Identifikation des *E. coli*- $\alpha$ -Hämolysins

Zum Nachweis des *E. coli*  $\alpha$ -Hämolysins wurden Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) und Western-Blot Analysen durchgeführt. Hierbei wurden Filtrate von *E. coli*-Stämmen untersucht, die sich in ihrem Verhalten hinsichtlich der Erzeugung fokaler Läsionen unterschieden. Dabei handelte es sich um Filtrate *hlyA*-positiver (*K12pSF4000*,) und *hlyA*-negativer *E. coli* (*E. coli* O4mut, *E. coli* K12) die mit dem Originalfiltrat des *E. coli* O4 verglichen wurden. Als Referenz wurden außerdem *E. coli* G536 (uropathogener Referenzstamm,  $\alpha$ -*hlyA*-positiv) [15] und *E. coli* O6:K5 ( $\alpha$ -*hlyA*-positiver Stamm mit nicht detektierbarer lytischer Aktivität) untersucht. Die eingesetzten Filtrate wurden vor Western-Blotting auf ihre lytische Aktivität im Hämolysitetertest sowie auf ihre Wirkung im HT-29/B6-Zellfiltermodell getestet. Die Detektion des Hämolysins durch anti-HlyA-Serum im Westernblot korrelierte eindeutig mit jeweils lytischer Aktivität im Hämolysitetertest. Um eindeutige Widerstandsabnahme im Zellkulturversuch zu detektieren, sind Filtrate mit höheren Aktivitäten (> 5 Stufen im Titerest) erforderlich; da sich einerseits Widerstandsanstieg durch *E. coli*-Zugabe und Abnahme desselben durch lytische Aktivität kompensieren, andererseits geringere Aktivitäten vom Epithel toleriert werden, was möglicherweise auf Restitutionsprozesse zurückzuführen ist. Es ist nicht gelungen, für alle lytischen Stämme Präparationen hoher lytischer Aktivität zu erhalten.

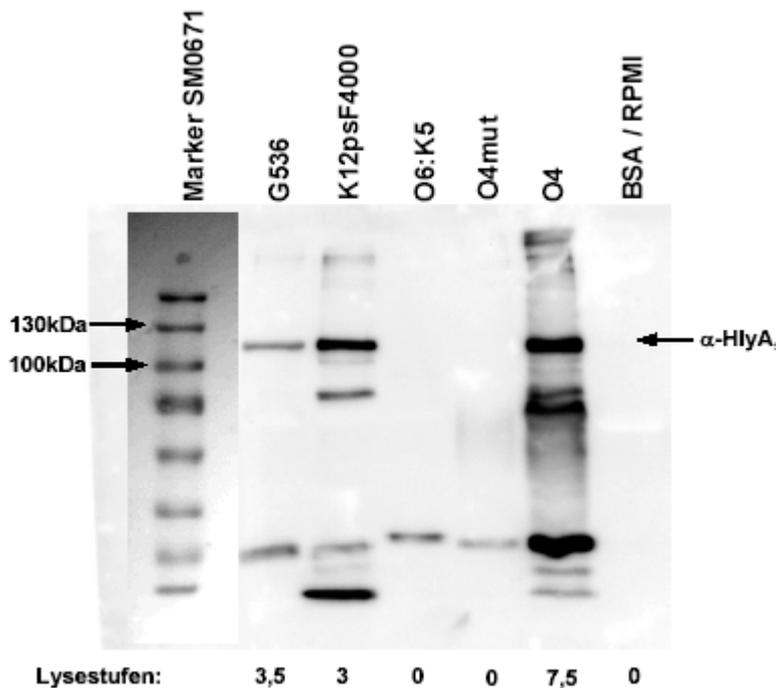


Abb. 29: **Westernblot *E. coli*  $\alpha$ -Hämolyisin: lytische vs. nichtlytische Kulturfiltrate.**

*Aliquots von Kulturfiltraten verschiedener E. coli-Stämme wurden nach Proteinfällung und Auftrennung mittels SDS-PAGE geblottet und mit anti-Hämolyserum inkubiert. Es wurden gleiche Filtratvolumina in die Analyse eingesetzt. Als Negativkontrolle diente 5 % BSA in RPMI. Auffällig ist die  $\alpha$ -Hämolyisinbande zwischen 100 und 130 kDa, die typischerweise nur bei lytischen Filtraten auftritt.*

Die lytische Aktivität jeweiliger Kulturfiltrate korrelierte mit der Detektion einer Bande bei ca. 110 kDa im Westernblot (Abb. 29). Die entstandenen weiteren Banden können nicht klar zugeordnet werden, wahrscheinlich handelt es sich um proteolytische Spaltprodukte des Hämolyisins. Unspezifitäten des polyklonalen Serums sind ebenfalls nicht auszuschließen, da die Immunisierung der Kaninchen (Ref. Dr. Beutin, RKI Berlin) mit bakteriellen Überständen durchgeführt wurde. Der mit dem Hämolyisinkodierenden Plasmid pSF4000 transformierte *E. coli* K12 zeigte jedoch eindeutig die Ausbildung der benannten Bande im Vergleich zum nichtlytischen Ausgangsstamm bei ca. 110 kDa (Abb. 30). Diese Bande fehlt ebenfalls bei *E. coli* O4mut und bei *E. coli* O6 (Abb. 29). Dies zeigt, dass es sich hierbei um  $\alpha$ -Hämolyisin handelt.

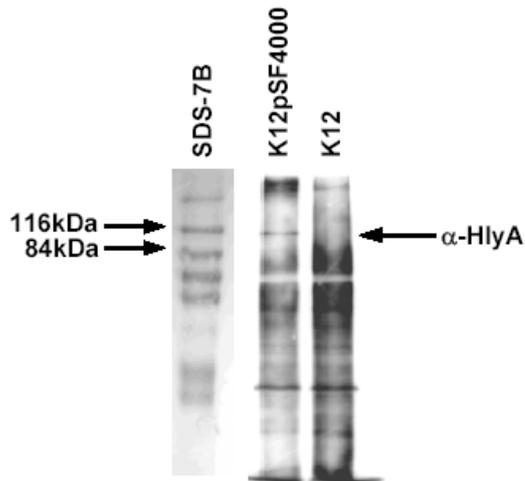


Abb. 30: **Westernblot Hämolysin-transformierter vs. Wildtyp *E. coli* K12.**

Kulturfiltrate von *E. coli* K12pSF4000 und *E. coli* K12 wurden nach Proteinfällung und Auftrennung mittels SDS-PAGE geblottet und mit anti-Hämolysinserum inkubiert.

### 3.3.1.1 *E. coli*-α-Hämolysin im Zellkulturmodell

Die unter 3.3.1 beschriebenen Kulturfiltrate des *E. coli* K12pSF4000 (HlyA+), K12 (HlyA-), O4 (HlyA+) und O4mut (HlyA-) wurden im Zellkulturversuch eingesetzt. Der Effekt auf den transepithelialen Widerstand und die Morphologie des Monolayers wurden untersucht. Die eingesetzten lytischen Filtrate führten zu Widerstandsabfall und ähnlicher Morphologie wie *E. coli* O4-inokulierte Zellfilter (Abb. 31). Um vergleichbare Immunfluoreszenzfärbungen zu erhalten und die Größe und Ausdehnung der *focal leaks* analog dem Wildtyp beurteilen und bestätigen zu können, wurde dem lytischen Filtrat die nichtlytische Mutante *E. coli* O4mut zugemischt und diese Filter im Vergleich zu Filtern ohne diese Kombination gefärbt. Es ergaben sich ähnliche fokale Läsionen wie bei Wildtypinkubation wobei durch Anfärbung der Markerbakterien die Durchgängigkeit dieser *focal leaks* bis auf Filterebene gezeigt werden konnte. Dadurch wurde gezeigt, dass die Ausbildung fokaler Läsionen eine direkte Wirkung des α-Hämolysins des *E. coli* O4 ist.

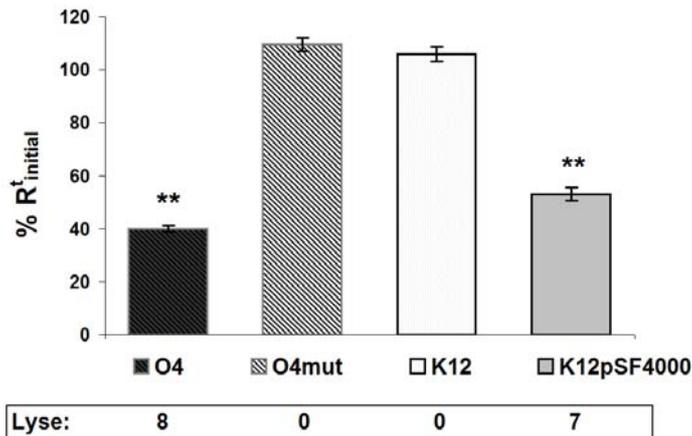


Abb. 31: **Widerstandseffekt von Kulturfiltraten von HlyA+ vs. HlyA-E. coli-Stämmen im Zellkulturmodell.**

Prozentualer transepithelialer Widerstand nach 1 h Inkubation mit jeweiligem Kulturfiltrat (bezogen auf  $R^t_{Zugabe}$ ). Die lytische Aktivität der Filtrate wurde im Hämolysetitertest bestimmt ( $n = 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; ANOVA und Bonferroni-post-hoc;  $p < 0,01$  für O4 vs. O4mut; K12pSF4000 vs. K12).

Da in vorangegangenen Experimenten die Translokation durch Anwesenheit, nicht aber durch Präinkubation des Sterol-extrahierenden Methyl-beta-Cyclodextrin gehemmt werden konnte, wurde diese Substanz zusammen mit lytischem Filtrat auf HT-29/B6- Filtern eingesetzt.

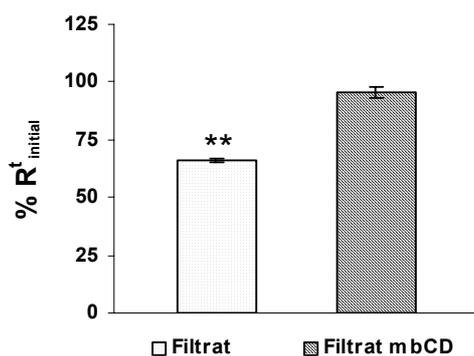


Abb. 32: **Hemmung der E. coli O4-Filtratwirkung durch mbCD.**

Prozentualer transepithelialer Widerstand (bezogen auf  $R^t_{Zugabe}$ ) nach 90 min apikaler Inkubation von HT-29/B6-Monolayern mit E. coli O4-Kulturfiltrat  $\pm$  5 mmol l<sup>-1</sup> mbCD ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM; t-Test,  $p < 0,01$ ).

Analog zum Abschnitt 3.1.3 war der durch *E. coli* O4-Filtrat verursachte Widerstandsabfall ebenfalls durch mbCD hemmbar.

Diese Experimente zeigen, dass die Barrierschädigung durch *focal leaks* auf die Wirkung des Hämolytins zurückzuführen ist. Des Weiteren beruht die Hemmung des Effektes durch *E. coli* O4 bei Anwesenheit von Methyl-beta-Cyclodextrin nicht auf einer Wirkung des Hemmers auf die Bakterien. Der Hemmer scheint das Hämolytin direkt zu beeinflussen oder dessen Interaktion mit der Membran zu stören. Aus diesen Ergebnissen wird ebenfalls deutlich, dass die Anwesenheit der Bakterien für den Effekt der Barrierschädigung nicht zwingend notwendig ist. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Wirkung der Kulturüberstände von basaler Seite der Zellfilter weit größer als von apikaler Seite ist. Ein Zehntel der apikal eingesetzten Menge führt von basaler Seite zu vergleichbarem Widerstandsabfall, was die progressive Größenzunahme der Läsionen bei apikaler / mukosaler Applikation des Toxins gut erklärt.

#### 3.3.1.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um den funktionalen Zusammenhang zwischen eingesetzter Hämolytinkonzentration und Barrierschädigung des Epithels zu charakterisieren, wurde mit Filtrat von *E. coli* K12pSF4000 eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Der Effekt auf die Barriere wurde als transepithelialer Widerstand über der Zeit gemessen. Das im Kulturfiltrat enthaltene Antibiotikum Chloramphenicol hatte im Versuchszeitraum keinen Effekt auf die Messgröße. Ausgehend vom Kulturfiltrat (8,5 Lysestufen im Hämolyse-Titertest; relative Konzentration = 1) wurde durch Verdünnung in Zellmedium eine Konzentrationsreihe hergestellt und davon apikal jeweils 500 µl auf HT-29/B6 Monolayer gegeben.

Es ergab sich ein konzentrationsabhängiger Widerstandsabfall mit einem sigmoidalem Verlauf im Dosis-Wirkungs-Diagramm (Abb. 33). Ein Zehntel der Ausgangskonzentration erzeugte kurzzeitig einen signifikanten Widerstandsabfall, der nach 4 h wieder Kontrollniveau erreichte ( $85,7 \pm 2,2 \%$  vs.  $91,0 \pm 2,3 \% R_{Zugabe}^t$  (Kontrolle);  $p < 0,16$ ). Geringere Konzentrationen hatten keinen Effekt. Obwohl der maximale Widerstandsabfall des unverdünnten Kulturfiltrates ( $8,6 \pm 0,7 \% R_{Zugabe}^t$ ) erst nach 2 erreicht wurde, ist die Dosis-Wirkungs-Kurve für 1 h Inkubationsdauer angegeben, da hier die geringe Konzentration von 0,1 bereits ihre maximale Wirkung entfaltetete ( $76,1 \pm 1,6 \% R_{Zugabe}^t$ ; Abb. 33B).

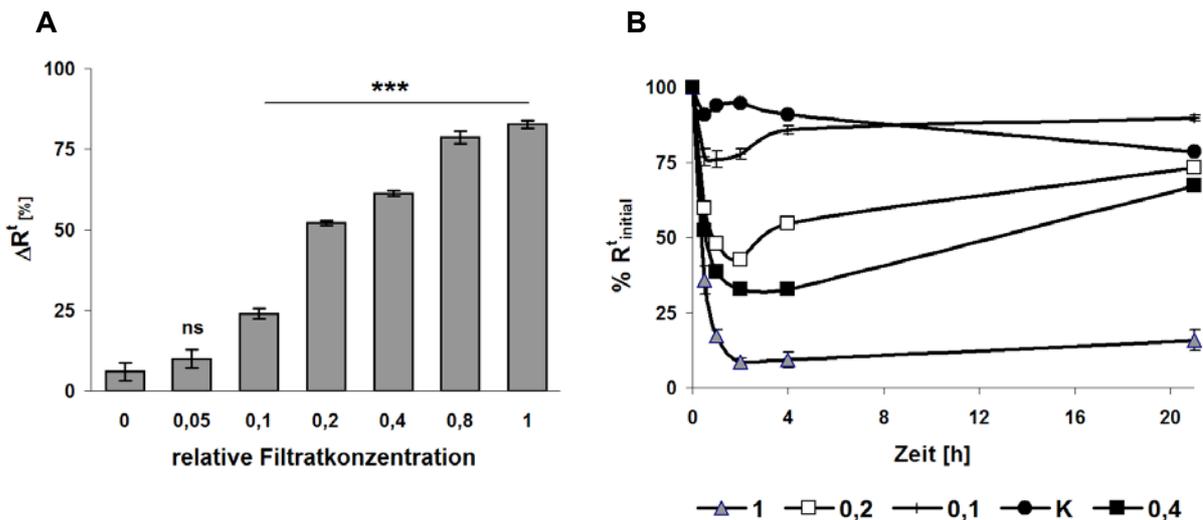


Abb. 33: Dosis-Wirkungs-Beziehung von *E. coli*- $\alpha$ -Hämolyisin.

HT-29/B6-Monolayer wurden apikal mit verschiedenen Verdünnungen des *E. coli* K12pSF4000-Kulturfiltrates inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Ausgangskonzentration des unverdünnten Filtrats. Der Widerstand ist als prozentuale Abnahme des initialen Widerstands zum Zeitpunkt der Zugabe angegeben (A) bzw. als Prozent des Initialwiderstandes (B).

(A) Widerstandsänderung nach 1 h Inkubation. (B) Zeitverlauf der Inkubation ( $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM; ANOVA und Bonferroni-post-hoc;  $p < 0,002$  für Konzentrationen  $> 0,1$  vs. Kontrolle).

Das K12pSF4000-Hämolyisin verursacht kurzzeitig im Konzentrationsbereich von ca. einer Größenordnung (0,1 - 0,4  $\times$  Konzentration des Kulturfiltrates) eine transiente Barrierschädigung im epithelialen Monolayers der HT-29/B6-Zellen. Bereits nach 2 h waren die entstandenen Lecks repariert und es kam wieder zur elektrischen Abdichtung. Nur annähernd maximale Konzentrationen ( $> 50$  % der Ausgangskonzentration) induzierten eine bleibende Schädigung.

Dies verdeutlicht die Bedeutung eines hohen Expressionslevels an aktivem  $\alpha$ -Hämolyisin für die Ausbildung einer Keim-induzierten Barriestörung. Wachstum in Zellmedium, ohne die Nährstoffkompetition durch andere Keime, stellt für *E. coli* O4 ein optimales Wachstumsmilieu dar. Es ist also anzunehmen, dass die erreichte Hämolyisinausbeute unter limitierten Bedingungen – also im normalen Darm – kleiner ist.