

**Entwicklung und Charakterisierung
eines Membrankultursystems zur
Darstellung der intestinalen Barriere
*in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctorum rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Constanze Nossol

geboren am 05. Februar 1981 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. med. Hermann-Josef Rothkötter

Prof. Dr. med. Michael Fromm

eingereicht am: 30.01.2012

verteidigt am: 02.11.2012

Inhaltsverzeichnis

<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VI</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>XII</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>XIII</i>
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	12
2.1 Probennahme	12
2.1.1 Darmproben.....	12
2.1.2 Blut.....	12
2.2 Isolation von primären Zellen	12
2.2.1 Isolation von porcinen Epithelzellen.....	12
2.2.2 Isolation von PBMCs und Generierung von Monozyten.....	14
2.3 Zelltypen und deren Kultivierung	15
2.3.1 Epithelzellen.....	15
2.3.1.1 Kultivierung von porcinen, primären intestinalen Epithelzellen.....	15
2.3.1.2 Kultivierung von porcinen, kontinuierlichen intestinalen Epithelzelllinien.....	16
2.3.1.2.1 Kultivierung auf impermeablem Untergrund.....	16
2.3.1.2.2 Kultivierung auf permeablem Untergrund.....	18
2.3.1.2.3 Kultivierung als Air-Liquid Interface (ALI) Kultur.....	19
2.3.2 MoDCs.....	20
2.4 Aufbau des Modells	21
2.4.1 Co-Kultivierung auf permeablem Untergrund.....	21
2.4.2 Zusatz von DON und LPS.....	21
2.5 Molekularbiologische Untersuchungen	22
2.5.1 RNA-Isolierung.....	22
2.5.2 PCR.....	22
2.5.3 qPCR.....	23
2.6 Western Blot	23
2.7 Durchflusszytometrie	24
2.8 Nachweis des invasiven Wachstums mittels Softagar-Versuch	24

2.9 Mikroskopische Untersuchungen	25
2.9.1 Histochemie.....	25
2.9.1.1 Nachweis der Alkalischen Phosphatase.....	25
2.9.1.2 Karyotyping.....	26
2.9.1.3 Nachweis von Gap Junctions mittels Lucifer Yellow	26
2.9.2 Immunhistochemie	27
2.9.2.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	27
2.9.2.2 Nachweis der Proliferation mittels BrdU-Einbau.....	27
2.9.3 Elektronenmikroskopie.....	28
2.9.4 Konfokale Mikroskopie.....	29
2.10 Statistische Analyse	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Morphologie und Marker der intestinalen Barriere <i>in vivo</i>	30
3.1.1 Morphologie der intestinalen Epithelzellen.....	30
3.1.2 Aufbau und Merkmale der intestinalen Barriere.....	33
3.1.2.1 Epithelzellen.....	33
3.1.2.1.1 Charakterisierung auf mRNA-Ebene.....	33
3.1.2.1.2 Charakterisierung auf Proteinebene.....	34
3.1.2.2 Dendritische Zellen.....	36
3.2 Isolation, Kultivierung und Charakterisierung von primären intestinalen Epithelzellen aus dem Schwein	37
3.2.1 Isolation von porcinen, primären intestinalen Epithelzellen.....	37
3.2.2 Kultivierung von primären Epithelzellen und Eliminierung von Fibroblasten.....	40
3.2.2.1 Kultivierung primärer Epithelzellen.....	40
3.2.2.2 Eliminierung von Fibroblasten	42
3.2.3 Einsatz von Rho-Kinase-Inhibitor Y27632	43
3.2.4 Charakterisierung von primären, intestinalen Epithelzellen.....	44
3.2.4.1 Charakterisierung auf mRNA-Ebene	44
3.2.4.2 Charakterisierung auf Proteinebene.....	45
3.3 Charakterisierung zweier Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2.....	46
3.3.1 IPEC-1 und IPEC-J2 – zwei Tumorzelllinien?	46
3.3.1.1 Generationszeiten	46
3.3.1.2 Schwellenwert bei der Aussaat	47
3.3.1.3 Invasives Wachstum (Softagar-Versuch)	49
3.3.1.4 Bestimmung der Chromosomenzahl als Hinweis auf eine Tumorzelllinie.....	50

3.3.2 Morphologische Daten	51
3.3.3 Nachweis des Anteils an proliferierenden Zellen	53
3.3.4 Charakterisierung auf mRNA-Ebene	53
3.3.5 Charakterisierung auf Proteinebene	54
3.3.6 Nachweis von Gap Junctions mittels Scratch-Assay	57
3.3.7 Villin als Differenzierungsmarker	58
3.3.7.1 Villin-Expression auf mRNA-Ebene	58
3.3.7.2 Villin-Expression auf Proteinebene	58
3.3.8 Differenzierung in Abhängigkeit von Dexamethason	60
3.3.8.1 Morphologie	60
3.3.8.2 Villin-Expression in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason	61
3.3.9 Nachweis der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase	62
3.3.10 Hinweis auf Veränderungen im Energiestoffwechsel	64
3.3.10.1 GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene	64
3.3.10.2 GAPDH-Expression auf Proteinebene	65
3.4 Entwicklung eines Systems, in dem sich intestinale Epithelzellen in Form und Funktion der <i>in vivo</i>-Situation annähern	66
3.4.1 Kultivierung auf Membranen	66
3.4.1.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)	66
3.4.1.2 Erhebung von morphologischen Daten	67
3.4.1.3 Nachweis der Proliferation	69
3.4.1.4 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf mRNA-Ebene	71
3.4.1.5 Untersuchung von Zellzyklus, Differenzierung und Metabolismus auf mRNA-Ebene	72
3.4.1.6 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene	74
3.4.1.7 Villin als Differenzierungsmarker	76
3.4.1.7.1 Villin-Expression auf mRNA-Ebene	76
3.4.1.7.2 Villin-Expression auf Proteinebene	77
3.4.1.8 Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason	78
3.4.1.8.1 Morphologie	78
3.4.1.8.2 Villin-Expression in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason	80
3.4.1.9 Hinweis auf Veränderungen im Energiestoffwechsel	81
3.4.1.9.1 GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene	81
3.4.1.9.2 GAPDH-Expression auf Proteinebene	82
3.4.1.10 Aufnahme von BSA-DyLight	82
3.4.2 Kultivierung als Air-Liquid Interface (ALI) Kultur	83
3.4.2.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)	83
3.4.2.2 ZO-1 und Zell-Zell-Kontakte	84
3.4.2.3 Erhebung von morphologischen Daten	89
3.4.2.4 Veränderungen des Zellkern-Zell-Verhältnisses	91

3.4.2.5 Phänotyp unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	91
3.4.2.6 Nachweis des Anteils an proliferierenden Zellen	92
3.4.2.7 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf mRNA-Ebene.....	94
3.4.2.8 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene.....	94
3.4.2.9 Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von der Kultivierung.....	95
3.4.2.9.1 Villin-Expression auf mRNA-Ebene	95
3.4.2.9.2 Villin-Expression auf Proteinebene	97
3.4.2.10 Hinweis auf Veränderungen im Energiestoffwechsel in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll	99
3.4.2.10.1 GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene.....	99
3.4.2.10.2 GAPDH-Expression auf Proteinebene.....	100
3.4.2.11 Wirkung von DON auf ALI-Kulturen.....	100
3.4.2.12 Einsatz von MAP-Kinase-Inhibitor U0126	103
3.4.2.12.1 Morphologische Untersuchung.....	103
3.4.2.12.2 Nachweis der Proliferation	104
3.4.2.13 Aufnahme von BSA-DyLight	105
3.5 Entwicklung eines Co-Kultur-Systems – Darstellung der intestinalen Barriere.....	106
3.5.1 Isolation und Charakterisierung von dendritischen Zellen	106
3.5.2 Zusatz von MoDCs zur IPEC-Kultur	109
3.5.2.1 TEER-Verlauf.....	109
3.5.2.2 Veränderungen in IPECs auf mRNA-Ebene während der Co-Kultur	110
3.5.2.3 Veränderungen in MoDCs während der Co-Kultur	112
3.5.3 Basolateraler Zusatz von MoDC-Überständen	113
3.5.4 Apikaler Zusatz von DON in der Co-Kultur.....	114
3.5.5 Apikaler Zusatz von LPS zur Co-Kultur.....	116
3.5.6 Migration von IPECs.....	117
3.5.7 Migration von MoDCs.....	118
4 Diskussion	120
4.1 Die intestinale Barriere <i>in vivo</i>	120
4.2 Isolation und Kultivierung von primären Epithelzellen	125
4.3 Der Weg von primären intestinalen Epithelzellen zur nicht transformierten Zelllinie	130
4.4 IPEC-1 und IPEC-J2- zwei unterschiedlich regulierte Zelllinien – die mögliche Rolle von p53	134

4.5 Die Entwicklung eines Systems, in welchem sich intestinale Epithelzellen in ihrer Form und Funktion der <i>in vivo</i>-Situation annähern	138
4.6 Entwicklung eines Co-Kultur-Systems.....	148
5 <i>Ausblick</i>.....	153
6 <i>Zusammenfassung</i>.....	155
7 <i>Summary</i>	158
<i>Literaturverzeichnis</i>.....	161
Anhang	187
<i>Herstellerverzeichnis</i>	187
1. Reagenzien, Puffer und Zellkulturmedium	191
2. Filter für Fluoreszenzmikroskopie.....	199
3. Daten.....	200
<i>Co-Kultur</i>	200
<i>Danksagung</i>.....	201
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>.....	202

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Komponenten der intestinalen Barriere.....	2
Abbildung 2: Ficoll-Gradienten-Zentrifugation.....	15
Abbildung 3: Zeitplan der Kultivierung der Co-Kulturen.....	21
Abbildung 4: Enterozyten des Zottenepithels des Jejunums.....	31
Abbildung 5: EM-Aufnahme einer Becherzelle im Jejunum.....	31
Abbildung 6: Enterozyten des Zottenepithels des Ileums.....	32
Abbildung 7: EM-Aufnahme einer Becherzelle im Ileum.....	32
Abbildung 8: Jejunum - Charakterisierung auf mRNA-Ebene.....	33
Abbildung 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem anti-ZO-1- (grün) und dem anti-CK-18-Antikörper (rot).....	34
Abbildung 10: Darmausschnitt mit einer CK18-positiven Becherzelle.....	35
Abbildung 11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit FITC-Phalloidin (grün) und dem anti-Occludin-Antikörper (rot).....	35
Abbildung 12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem anti-MHCII- (grün) und dem anti-CD16-Antikörper (rot).....	36
Abbildung 13: Isolation primärer jejunaler Epithelzellen.....	38
Abbildung 14: Isolation primärer Epithelzellen aus dem Ileum.....	39
Abbildung 15: Kultivierung primärer intestinaler Epithelzellen.....	41
Abbildung 16: Einsatz von Y27632.....	43
Abbildung 17: Charakterisierung der Primärkulturen des Jejunums auf mRNA-Ebene.....	44
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von primären intestinalen Epithelzellen mit dem anti-ZO-1- und dem anti-CK18-Antikörper.....	45
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von primären intestinalen Epithelzellen mit dem anti-Occludin-Antikörper und FITC-Phalloidin.....	46
Abbildung 20: Generationszeiten von IPEC-1 und IPEC-J2.....	47
Abbildung 21: Ermittlung des Schwellenwertes bei der Aussaat beider Zelllinien.....	48
Abbildung 22: Nachweis von invasiven Wachstum mittels Softagar-Versuch.....	49

Abbildung 23: Karyotyping.....	50
Abbildung 24: Kultivierung auf impermeablem Untergrund – Phänotyp (EM).....	52
Abbildung 25: Impermeabler Untergrund - Anteil an proliferierenden Zellen.....	53
Abbildung 26: Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere in IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) auf mRNA-Ebene	54
Abbildung 27: Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter.....	55
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von IPEC-1 und IPEC-J2 mit dem anti-Zo-1- und dem anti-CK18-Antikörper	56
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von IPEC-1- und IPEC-J2- Monolayern mit dem anti-Occludin-Antikörper und FITC-Phalloidin	56
Abbildung 30: Nachweis von Gap Junctions mittels Scratch-Assay.....	57
Abbildung 31: Vergleich des Villin-mRNA-Levels beider Zelllinien auf impermeablem Untergrund	58
Abbildung 32: Kultivierung auf impermeablem Untergrund - Nachweis von Villin in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter.....	59
Abbildung 33: Differenzierung in Abhängigkeit von Dexamethason in IPEC-1	60
Abbildung 34: Differenzierung in Abhängigkeit von Dexamethason in IPEC-J2	61
Abbildung 35: Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason	62
Abbildung 36: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in beiden Zelllinien	63
Abbildung 37: Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase in IPEC-1	64
Abbildung 38: Relative Quantifizierung des GAPDH-mRNA-Levels beider Zelllinien	65
Abbildung 39: GAPDH-Expression auf Proteinebene	65
Abbildung 40: TEER-Verlauf der Zelllinien IPEC-1 und IPEC-J2	66
Abbildung 41: Kultivierung auf permeablem Untergrund – Phänotyp.....	68
Abbildung 42: Ausbildung von Bürstensaum und Tight Junctions	69
Abbildung 43: Nachweis der Proliferation auf permeablem Untergrund kultivierter Zellen mittels BrdU-Färbung.....	70
Abbildung 44: Vergleich des Anteils an proliferierenden Zellen.....	70

Abbildung 45: Permeabler Untergrund - Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere in IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) auf mRNA-Ebene.....	71
Abbildung 46: Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter.....	74
Abbildung 47: Lokalisation von ZO-1 und CK18 in beiden Zelllinien.....	75
Abbildung 48: Lokalisation von Claudin-3 und Claudin-4 in beiden Zelllinien.....	76
Abbildung 49: Vergleich des Villin-mRNA-Levels auf permeablem Untergrund kultivierter Zellen.....	76
Abbildung 50: Kultivierung auf permeablem Untergrund - Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter.....	77
Abbildung 51: Kultivierung auf permeablem Untergrund - Lokalisation des Proteins in IPEC-J2.....	78
Abbildung 52: Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason auf permeablem Untergrund in IPEC-1.....	79
Abbildung 53: Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason auf permeablem Untergrund in IPEC-J2.....	80
Abbildung 54: Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason.....	81
Abbildung 55: Kultivierung auf permeablem Untergrund – Veränderung der GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene.....	81
Abbildung 56: Kultivierung auf permeablem Untergrund - GAPDH-Expression auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter.....	82
Abbildung 57: Kultivierung auf permeablem Untergrund - Aufnahme von BSA-DyLight in IPEC-1 und IPEC-J2.....	83
Abbildung 58: TEER-Verlauf der ALI-Kulturen.....	84
Abbildung 59: ZO-1 und Zell-Zell-Kontakte.....	85
Abbildung 60: Analyse der Zell-Zell-Kontakte.....	86
Abbildung 61: Trizelluläre Kontakte.....	87
Abbildung 62: Die hexagonale Elementarzelle.....	88
Abbildung 63: Kultivierung von beiden Zelllinien als Air-Liquid Interface Kultur – Phänotyp.....	89
Abbildung 64: Schema der morphologischen Entwicklung unterschiedlich kultivierter intestinaler Epithelzellen.....	92

Abbildung 65: Nachweis von proliferierenden Zellen in Air-Liquid Interface Kulturen	93
Abbildung 66: Vergleich des Anteils an proliferierenden Zellen zwischen den einzelnen Kultivierungsprotokollen	93
Abbildung 67: ALI-Kultur - Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere in IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) auf mRNA-Ebene	94
Abbildung 68: Expression verschiedener Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll	95
Abbildung 69: Vergleich des Villin-mRNA-Levels in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll	96
Abbildung 70: Expression des Proteins Villin in Abhängigkeit von der Kultivierungsart	97
Abbildung 71: Villin-Expression in IPEC-J2-ALI-Kulturen	98
Abbildung 72: Veränderungen der GAPDH-Expression in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll	99
Abbildung 73: Veränderung der GAPDH-Proteinexpression in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll	100
Abbildung 74: Wirkung von Deoxynivalenol auf den TEER in IPEC-1	101
Abbildung 75: Wirkung von Deoxynivalenol auf den TEER in IPEC-J2	102
Abbildung 76: Morphologische Untersuchung von U0126 behandelten IPEC-1-Zellen	103
Abbildung 77: Morphologische Untersuchung von U0126 behandelten IPEC-J2-Zellen	104
Abbildung 78: Anteil an proliferierenden Zellen unter dem Einfluss von U0126	104
Abbildung 79: Aufnahme von BSA-DyLight in ALI-Kulturen beider Zelllinien	105
Abbildung 80: Überprüfung der Isolation mit CD172a (SWC-3a)	106
Abbildung 81: Abbau von CD172a	107
Abbildung 82: Kultivierung der MoDs	107
Abbildung 83: Vitalitätsbestimmung von MoDCs zu Beginn der Co-Kultur mittels Propidiumiodid	108
Abbildung 84: Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-MHCII- (grün) und dem anti-CD16-Antikörper (rot) von isolierten MoDCs im Alter von sieben Tagen	108
Abbildung 85: Tight Junctions in der Co-Kultur von IPEC-1	109
Abbildung 86: Vergleich des TEER-Verlaufs von Kontrollen und Co-Kulturen	110
Abbildung 87: Veränderungen in IPECs auf mRNA-Ebene während der Co-Kultur	111

Abbildung 88: Veränderungen auf mRNA-Ebene in MoDCs und in co-kultivierten MoDCs	112
Abbildung 89: Veränderungen von ZO-1 und CK18 durch die basolaterale Zugabe von MoDC-Überständen in IPEC-1.....	113
Abbildung 90: Veränderungen von Claudin-3 und Claudin-4 durch die basolaterale Zugabe von MoDC-Überständen in IPEC-1.....	114
Abbildung 91: Zusatz von DON - TEER-Verlauf der Co-Kultur	115
Abbildung 92: Zusatz von LPS - TEER-Verlauf der Co-Kultur	116
Abbildung 93: Erhöhung der Migration von IPEC-1 und IPEC-J2 durch die Applikation von LPS.....	117
Abbildung 94: Untersuchung der Co-Kulturen mittels Elektronenmikroskopie	118
Abbildung 95: Migration von IPECs und MoDCs	119
Abbildung 96: Auswertung der Durchflusszytometrie - MoDCs	200
Abbildung 97: Migration von IPEC-1	200

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokolle für die Isolation intestinaler Epithelzellen.....	13
Tabelle 2: Erhebung morphologischer Daten intestinaler Epithelzellen <i>in vivo</i>	33
Tabelle 3: Isolation primärer Epithelzellen nach dem Protokoll von Gonzalez-Valina (1996) – Bestimmung der Effektivität anhand der Anzahl der Kolonien und der Koloniegröße.	40
Tabelle 4: Isolation primärer Epithelzellen nach dem Protokoll von Gliddon (2008) – Bestimmung der Effektivität anhand der Anzahl der Kolonien und der Koloniegröße.	41
Tabelle 5: Erhebung morphologischer Daten kultivierter Zellen auf impermeablem Untergrund.	52
Tabelle 6: Erhebung morphologischer Daten von auf permeablem Untergrund kultivierten Zellen.	67
Tabelle 7: Untersuchung verschiedener Gene mittels qPCR.	73
Tabelle 8: Berechnung der theoretischen trizellulären Kontakte pro Zelle.....	88
Tabelle 9: Erhebung morphologischer Daten – Vergleich der verschiedenen Kultivierungsprotokolle	90
Tabelle 10: Veränderung des Nukleus-Zell-Verhältnisses.	91
Tabelle 11: Primer für die PCR	194
Tabelle 12: Primer für die qPCR	195
Tabelle 13: Antikörper für die Durchflusszytometrie	196
Tabelle 14: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen.....	197
Tabelle 15: Antikörper für das Western Blotting	198

2 Abkürzungsverzeichnis

A33	<i>Protein arginine N-methyltransferase 1</i> (=PRMT1)
ALI	Air-Liquid Interface
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-Presenting-Cells
B220	<i>Protein tyrosine phosphatase</i> , Rezeptortyp C (=CD45R)
BAD	BCL-2 Antagonist
BAX	Co-Faktor von p53
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Caco-2	<i>human epithelial colorectal adenocarcinoma cells</i>
CCR6	Chemokine-Rezeptor für CCL20
CCR7	Chemokine-Rezeptor für CCL 19 und CCL 21
CD1	<i>cluster of differentiation 1</i> (Glycoprotein)
CD11b	<i>cluster of differentiation 11b</i> (=Integrin alpha M; ITGAM)
CD11c	Integrin alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit; ITGAX)
CD14	<i>cluster of differentiation 14, pattern recognition receptor</i>
CD172a	<i>cluster of differentiation 172a</i> (=SIRP α ; SWC-3a)
CD209	<i>Dendritic cell-specific Intercellular adhesion molecule-3-grabbing Non-Integrin</i> (= DC-SIGN)
CD40	Integral membrane protein; TNF receptor superfamily member 5
CD63	LAMP-3, <i>lysosome-associated membrane protein-3</i> ; Glycoprotein
CD80/86	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (=human CD152)
CD8 α	<i>Cluster of differentiation 8α</i> ; Glycoprotein
CK18	Cytokeratin 18
CLDN1	Claudin-1
CLDN3	Claudin-3
CLDN7	Claudin-7
CO ₂	Kohlendioxid
CTBNN-B1	Beta-Catenin
CX ₃ CR ₁	Chemokine-Rezeptor
CYC 1	Cytochrom C
Da	Dalton
DEC-205	Lymphozyten-Antigen 75 (=CD205)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMEM/HAMS F12	1:1 Mischung aus DMEM und Ham's
DON	Deoxynivalenol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ESPN	Espin
FAK	<i>Focal adhesion Kinase</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HBSS ⁺	Hank's Balanced Salt Solution
HIF-1 α	<i>Hypoxia Inducible Factor Subunit 1 alpha</i>
HIF-1 β	<i>Hypoxia Inducible Factor Subunit 1 beta</i>
HT-29-19A	<i>Human intestinal epithelial cell line</i>
IEC-6	<i>rat intestinal cell line</i>
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-18	Interleukin-18
IL-1b	Interleukin-1beta
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IPEC-1	<i>Intestinal porcine epithelial cells-1 (aus Ileum und Jejunum)</i>
IPEC-J2	<i>Intestinal porcine epithelial cells-J2 (aus Jejunum)</i>
IPI-2I	<i>Intestinal epithelial cell line transformed by SV40</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
L-CAM	<i>Liver cell adhesion molecule</i>
LIG1	Ligase 1
LPS	Lipopolysaccharide
MCL-1	myeloid leukemia cell differentiation protein
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MHCI	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
MHCII	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MHCIIDQ	<i>Major Histocompatibility Complex II (DQ = Heterodimer)</i>
MHCIIDR	<i>Major Histocompatibility Complex II (DR = Heterodimer)</i>
MoDC	<i>Monocyte derived Dendritic Cell</i>
MUC4	Mucin 4
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NGS	<i>Normal goat serum</i>
OCCL	<i>Ocludin</i>
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	<i>Peripheral Blood Molecular Cells</i>
PBS ⁻	<i>Phosphat buffered Saline (Phosphatpuffer) ohne Kalzium und Magnesium</i>
PBS ⁺	<i>Phosphat buffered Saline (Phosphatpuffer) mit Kalzium und Magnesium</i>
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEN/STREP	Pennecillin und Streptomycin
p21	CDK 1-Inhibitor
p53	Tumorsuppressor Protein
RIE	<i>Cell line from the rat small intestine</i>
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SIRP α	<i>Signal regulatory protein alpha (=CD172a)</i>
SS	Schweineserum
SWC-3a	<i>Swine-workshop-cluster 3a (=CD172a)</i>
T84	
DRB*0401/CIITA	<i>Human intestinal cell line</i>
TBS	<i>Tris-hydroxymethyl-aminomethane-buffered Saline</i>

TBS/TWEEN	<i>Tris-hydroxymethyl-aminomethane-buffered Saline-Tween</i>
TCR	T-cell Rezeptor
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
Tris-HCL	<i>Tris-hydroxymethyl-aminomethane-buffered Saline</i>
VIL-1	Villin-1
VIL-2	Villin-2 (Ezrin)
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>
ZO-2	<i>Zonula occludens-2</i>

1 Einleitung

Der Dünndarm ist ein hochdifferenziertes Organ, welches wichtige Funktionen ausübt. Hierzu zählen die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen und gelösten Stoffen aber auch der Aufbau einer Barriere gegen Pathogene und Toxine (Laukoetter et al., 2008). Die Absorption von Stoffen wird durch die Vergrößerung der mukosalen Oberfläche optimiert. Dies wird durch Ausstülpungen (Zotten, Villi) und tubuläre Einstülpungen (Lieberkühn-Krypten) erreicht (Komuro und Hashimoto, 1989). Die intestinalen Villi bilden somit eine große Oberfläche für den letzten Schritt des Abbaus von Nahrungsbestandteilen und deren Aufnahme (Le Ferrec et al., 2001). Die Villi variieren in ihrer Form und Größe je nach Darmabschnitt und Alter. Die Länge der Villi beträgt bei der Ratte zirka 0,5 mm (Komuro and Hashimoto, 1990). Im Schwein misst die Länge der Villi ungefähr 0,3 mm und die Kryptentiefe zirka 0,2 – 0,25 mm im Dünndarm (Hedemann et al., 2002; Scholten et al., 2002). Im Menschen zeigen die Villi eine Länge von 1,5 mm im Jejunum. Im Ileum sind sie wesentlich kürzer und seltener. Die Anzahl variiert hier zwischen 10-40 Villi/mm³ (Faller et al., 2004). Trotz der Vergrößerung der mukosalen Oberfläche muss eine Balance zwischen der hohen Effizienz der Absorption und der barrierebildenden Funktion des Darmes geschaffen werden. Dies wird durch verschiedene strukturelle Komponenten der intestinalen Barriere gewährleistet (Abb. 1). Das einschichtige hochprismatische Epithel der Dünndarmschleimhaut besteht aus vier verschiedenen Arten von Epithelzellen: den absorptiven Zellen, den Paneth-Zellen, den Becherzellen und den endokrinen Zellen (Komuro and Hashimoto, 1990; Marshman et al., 2002; Crosnier et al., 2006; Bjerknes und Cheng, 2005; Laukoetter et al., 2008). Das Dünndarmepithel wird apikal von einer Mukusschicht begrenzt, welche die Enterozyten vor chemischen Einflüssen schützt und die Adhäsion von Bakterien moduliert (Farhadi et al., 2003). Die luminale Grenze des Mukuslayers wird von einem dünnen Wasserfilm gebildet. Seine Größe wird auf zirka 100-800 µm geschätzt (Anderson et al., 1988) und ist wahrscheinlich der limitierende Faktor bei dem Transport von Nahrungsbestandteilen und Medikamenten (Thomson et al., 1993).

Der epitheliale Monolayer bildet eine hoch dynamische Barriere zwischen externen (mukosal/luminal) und internen (serosal/vaskular) Kompartimenten. Die basal liegenden Gewebestrukturen haben möglicherweise einen Einfluss auf die Permeabilität des Epithels durch die Abgabe verschiedener Faktoren (Chakravorty et al., 1999).

Auch die endotheliale Barriere spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktion der intestinalen Barriere. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale Schädigung mit einer Erhöhung der endothelialen und epithelialen Permeabilität einhergeht (Sun et al., 1997). Für die Funktion der epithelialen Barriere ist eine Versorgung der vitalen Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff notwendig (Farhadi et al., 2003). Dies wird durch eine adäquate Perfusion durch den Blutfluss gewährleistet. Als Ursache für eine endotheliale Dysfunktion kommt beispielsweise ein erniedrigter Blut-pH-Wert in Frage (Hotz, et al., 1998).

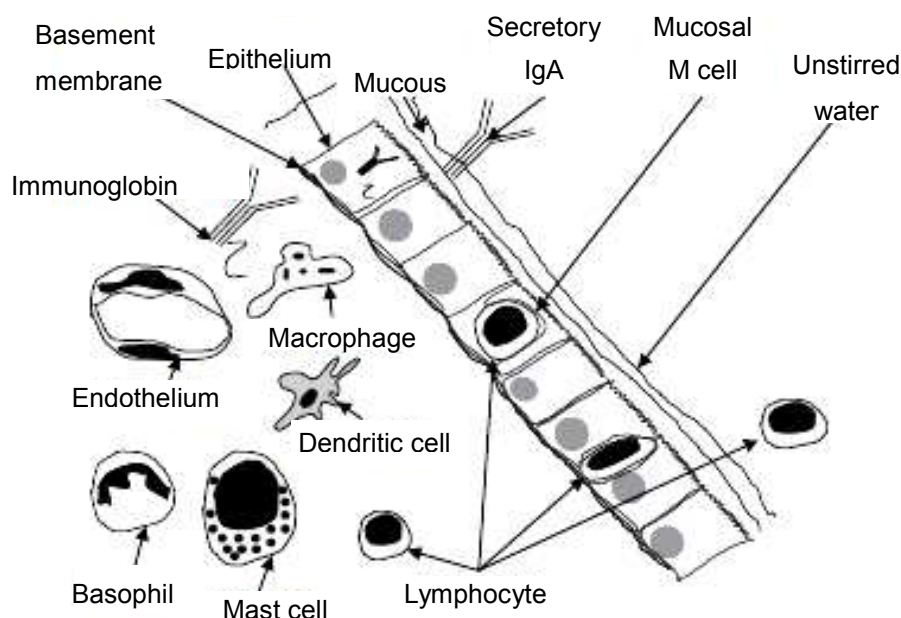


Abbildung 1: Komponenten der intestinalen Barriere (adaptiert aus: Farhadi et al., 2003)

Die Epithelzellschicht unterliegt einer ständigen Erneuerung der Enterozyten. Dieser hohe Zellturnover basiert auf den multipotenten Stammzellen (Watt und Hogan, 2000), welche in den Krypten liegen (Bach et al., 2000; Pinto und Clevers, 2005). In den unteren $\frac{3}{4}$ jeder Krypte befinden sich zirka vier bis sechs solcher Stammzellen (Freeman, 2008; Marshman et al., 2002; Bjerknes and Cheng, 2005). Die Enterozyten differenzieren sich innerhalb von drei Tagen in die verschiedenen Epithelzelltypen (van der Flier, 2009).

Nach der Differenzierung migrieren die Zellen bis an die Spitze der Villi. Nach einer Lebensdauer von etwa ein bis zwei Tagen werden die Zellen apoptotisch und ins Lumen abgestoßen (Hall et al., 1994; Duckworth und Watson, 2011). Somit spiegelt die Lage der Enterozyten entlang der Krypten-Zotten-Achse das Alter der Zellen wider (Booth und Potten, 2000; Marshman et al., 2002). Die Stammzellen differenzieren sich durch unterschiedliche Signale wie p16, p21 und p27 (Tian and Quaroni, 1999). Diese differenzierten Enterozyten sind nur schwer *in vitro* zu kultivieren, da sie eine kurze Lebensdauer von ungefähr vier bis zehn Tagen haben (Fan et al. 2001). Komai und Kimura demonstrierten, dass primäre intestinale Epithelzellen aus keimfreien Schweinen eine zweifach höhere Lebenserwartung haben, als jene isoliert aus einem normalen Schwein (Komai und Kimura, 1979). Eine andere Studie zeigte, dass sich primäre Epithelzellen und Zellen, welche aus einem Tumor entstanden sind, in ihren Expressionsprofilen in 213 Genen unterschieden. Diese verschiedenen Faktoren beinhalteten unter anderem: Wachstumsfaktoren, Zellstruktur, Zellzyklus, Apoptose und Zelladhäsionsmoleküle (Al Moustafa et al., 2002).

Die barrierebildende Funktion des Darmepithels erfordert den Aufbau interzellulärer Junctions (*Zonula occludens*) und die Organisation der zellulären Polarität (apikaler Bürstensaum und laterale Interzellularräume) (Simmons, 1982). Die interzellulären Junctions werden in vier Gruppen unterteilt: a) Adherens Junctions, b) Desmosome, c) Gap Junctions und d) Tight Junctions (Friend und Gilula, 1972). Diese Verbindungen wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Farquhar und Palade, 1963; Stevens und Paul, 1989) und sind durch spezifische Membranproteine charakterisiert. Cadherin ist das wichtigste Membranprotein der Adherens Junction und ist für die kalziumabhängige Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich (Takeichi, 1991). Es handelt sich bei den Cadherinen um transmembranäre Glykoproteine. Zu dieser Familie gehören: E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, L-CAM und verschiedene andere Cadherine (Takeichi, 1991; Nagafuchi et al., 1987; Hatta et al. 1988; Gallin et al. 1987). Desmosomale Junctions werden von den Proteinen Desmoglein und Desmocollins gebildet, welche zur Cadherin-Superfamilie zählen und Zelltyp-spezifische Isoformen ausbilden (Buxton et al., 1993; Holton et al., 1990; Koch et al., 1990). Gap Junctions sind durch verschiedene, transmembranäre Connexine charakterisiert (Loewenstein, 1987; Willecke et al., 1991).

Sie ermöglichen den Austausch von Molekülen zwischen den Zellen bis zu einer Größe von 1 kDa (Porengröße: 2-4 nm; Laird, 1996). Gap Junctions sind nicht stabil sondern haben eine Lebensdauer von zirka fünf Stunden. Connexin 43 und Connexin 32 - zwei wichtige Proteine der Gap Junctions - besitzen die kürzeste Lebensspanne von 1,5-3,5 Stunden (Laird, 1996).

Im Gegensatz zu den Gap Junctions regulieren die Tight Junctions den parazellulären Transport. Die Durchlässigkeit dieser Barriere wird durch ihre molekulare Zusammensetzung bestimmt (Krug, 2009). Der parazelluläre Widerstand, den man durch die Bildung der Tight Junctions erhält ist in den Darmabschnitten unterschiedlich stark ausgeprägt. So ist dieser im Dünndarm (z. B. Jejunum und Ileum) weitaus geringer als der transzelluläre Widerstand, welcher durch die Zellmembran gegeben ist („lecke Epithelien“). Im Gegensatz hierzu ist der parazelluläre Widerstand im *Colon descendens* oder *Colon sigmoideum* viel größer als der transzelluläre Widerstand („dichte Epithelien“) (Krug, 2009). Bei der Harnblase spricht man sogar von „undurchlässigem Epithel“ (Fromm, 2007). Bei dem transzellulären Transport wird die apikale als auch die basolaterale Membran durchquert. Eine Kontrolle erfolgt hier für viele gelöste Stoffe durch spezifische Kanäle. Die Integrität kann *in vitro* durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (*transepithelial electrical resistance*; TEER) mittels einer Elektrode bestimmt werden. Dies wird realisiert durch die Kultivierung der Zellen auf einer permeablen Membran. Die Unterscheidung zwischen transepithelialen und parazellulären Widerstand kann jedoch nicht mittels der bisher angewandten Methode getroffen werden. Diese Unterscheidung kann mittels „two-path impedance spectroscopy“ getroffen werden (Günzel et al., 2012). Die Ermittlung des TEER-Wertes in der konventionellen Zellkultur gibt die Summe aus parazellulären und transzellulären Widerstand an, wobei der TEER-Wert die Permeabilität für Ionen (Na^+ , K^+ , Cl^- und HCO_3^-) widerspiegelt (Fromm et al., 2009). Beim Jejunum und Ileum handelt es sich wie bereits erwähnt um „lecke Epithelien“, das heißt das der transzelluläre Widerstand wesentlich größer ist als der parazelluläre Widerstand. Demzufolge reflektiert der gemessene TEER-Wert zum größten Teil den parazellulären Widerstand. Dieser steht im reziproken Verhältnis zur untersuchten Fläche. Der parazelluläre Widerstand wird wiederum durch die Tight Junctions und den Interzellularraum vermittelt.

Unter der Annahme, dass die laterale Zellmembran dicht ist, könnte der Widerstand des Interzellularraumes – basierend auf der Länge des Interzellularspaltes - den spezifischen Widerstand der Tight Junctions überschreiten (Blikslager et al., 2007). Die Ermittlung der Länge des Interzellularspaltes erweist sich jedoch durch zahlreiche Interdigitationen als schwierig. Überschreitet der Interzellularraum den physiologischen Bereich der Breite der Tight Junctions, so geht der Widerstand des Interzellularraumes gegen null (Claude, 1978). Somit sind die Tight Junctions im „lecken Epithel“ der entscheidende Faktor bei der Bestimmung des parazellulären Widerstandes.

Die Tight Junctions sind durch verschiedene Proteine charakterisiert. Hierzu zählen die vier Klassen der Transmembranproteine: Occludin (Furuse et al., 1993), die Proteinfamilie der Claudine (Tsukita et al., 2001), Tricellulin (Ikenouchi et al., 2005; Krug et al., 2009; Mariano et al., 2011) und JAM (Martin-Padura et al., 1998). Occludin und Claudine sind die entscheidenden Proteine bei der Abdichtung des Layers. Die Tight Junctions können ihre Integrität an die physiologischen Gegebenheiten durch den Grad der Phosphorylierung anpassen (Baumgart and Dignass, 2002). JAM-Proteine wie JAM-A, CAR und ESAM durchspannen die Zellmembran nur einmal (Martin-Padura et al., 1998) und sind an der Neubildung von Tight Junctions beteiligt (Ebnet et al., 2004). Tricellulin hingegen kommt maßgeblich an den Kontaktstellen von drei Zellen vor (Ikenouchi et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TRIC-a einen entscheidenden Bestandteil der trizellulären Kontakte - in Bezug auf die Abdichtung gegenüber von Makromolekülen – darstellt (Krug et al., 2009). Neben diesen vier wichtigen Klassen sind noch andere Tight Junction-assoziierte Proteine am Aufbau beteiligt wie ZO-1, ZO-2, ZO-3, Afadin und Cingulin (Assimakopoulos et al., 2011). Diese assoziierten Proteine stellen unter anderem den Kontakt zum Zytoskelett dar.

Für die detaillierte funktionelle Analyse der epithelialen Zellschicht werden Zellkulturmodelle benötigt. Diese Modelle müssen die jeweiligen Aspekte abbilden und daher an der *in vivo*-Situation validiert werden. Gut untersuchte Modelle stellen die humanen Zelllinien HT-29 und Caco-2 dar. Die Caco-2-Zellen differenzieren sich spontan nach 21 Tagen Kultivierung in polarisierte intestinale Epithelzellen. Erst dann sind Bürstensaum und Tight Junctions nachweisbar (Sambuy et al., 2005). Anhand dieser Zelllinie wurde die Differenzierung von intestinalen Epithelzellen analysiert und der Transport von Arzneimitteln untersucht (Hilgers et al., 1990; Jumarie und Malo, 1990; Gartel et al., 1996).

In den Untersuchungen zur Differenzierung von Caco-2 spielte das Protein Villin eine wichtige Rolle (Chantret, 1987). Bei Villin handelt es sich um ein Ca^{2+} -reguliertes, aktinbindendes Protein, welches mit dem Zytoskelett der Mikrovilli des Bürstensaumes assoziiert ist (Bretscher und Weber, 1979). Somit ist Villin ein wichtiger Marker für die Differenzierung und kommt sowohl in intestinalen als auch in renalen Epithelzellen vor (Bretscher et al., 1981; Reggio et al., 1982; Chantret et al., 1988).

Ein weiterer wichtiger Marker differenzierter intestinaler Epithelzellen in Kultur ist der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER). Dieser wird für Caco-2 mit $260\text{-}420 \Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben (Gres, 1998; Artursson, 1990). Beide Zelllinien – Caco-2 und HT-29 – entstammen aus einem Tumorgewebe. In der vorliegenden Studie sollten Zellen verwendet werden, die nicht transformiert sind und nicht aus einem Karzinom stammen. Aus diesem Grund wurden die Zelllinien – IPEC-1 (*intestinal porcine epithelial cells*, eine Mischung aus ilealen und jejunalen Zellen) und IPEC-J2 (aus dem Jejunum isoliert) – für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet. Die Vorteile des porcinen Modells zur Untersuchung der intestinalen Barriere ergeben sich durch: a) den nicht transformierten Status, b) die Abstammung (kein Tumor), c) die genetische und physiologische Konstitution und d) die Empfindlichkeit gegenüber Toxinen (Pestka and Smolinski, 2005; Rothkötter, 2009; Schierack et al. 2006; Diesing et al., 2011a und 2011b).

Die erfolgreiche permanente Kultivierung primärer intestinaler Epithelzellen aus dem Schwein und die damit verbundene Etablierung von IPEC-1 (ileale und jejunale Epithelzellen) und IPEC-J2 (jejunale Epithelzellen) gelang Berschneider im Jahre 1989 (Berschneider, 1989; Gonzalez-Valina et al., 1996). Diese Zellen wurden innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt der Ferkel isoliert und kultiviert. Die Isolation kann auf verschiedene Weise erfolgen: mechanische Isolation, Chelation und enzymatischer Zellverdau. Bei der mechanischen Methode wird die Mukosa von der darunterliegenden Muskelschicht abgeschabt oder mittels Vibration gelöst (Störstrand, 1968). Die Methode der Chelation wurde von Raul et al. eingeführt. Durch dieses Protokoll ist ein selektives Ablösen entlang der Krypten-Zotten-Achse möglich (Raul et al., 1977). Bei der Chelation werden die Zell-Zell-Kontakte durch die Entfernung des extrazellulären Kalziums verringert (Gonzalez-Vallina et al., 1996). Quaroni et al. entwickelten die Methode des enzymatischen Verdauens und konnte so langlebige Primärkulturen von undifferenzierten Epithelzellen junger Ratten etablieren (Quaroni et al., 1979).

Bei dem enzymatischen Verdau werden verschiedene Proteinkomponenten und Oberflächenrezeptoren hydrolisiert und dadurch wird die Epithelschicht abgelöst (Evans et al., 1992). Als Enzym wird hier häufig Collagenase verwendet. Bei der Etablierung von IPEC-1 und IPEC-J2 wurde die Methode der Chelation angewendet (Berschneider, 1989). Eine weitere permanente Zelllinie aus dem Schwein stellt IPI-2I (ileale Epithelzellen) dar. Diese Epithelzellen wurden aus einem Minipig durch die Methode des enzymatischen Verdau gewonnen (Kaeffer et al., 1993). Die Zelllinie wurde mittels Transfektion durch das SV40-Plasmid etabliert (Kaeffer et al., 1993). Aufgrund des transformierten Zustandes von IPI-2I wurde auch diese für die Untersuchungen ausgeschlossen.

Die intestinalen Epithelzellen sind einer Vielzahl von variablen Bedingungen ausgesetzt wie Druck, mechanischer Stress und Schwankungen in der Sauerstoffversorgung. Die Barriere und die Ionentransportkapazität des intestinalen Layers werden durch Sauerstoff reguliert (Friedman et al., 1998; Taylor et al., 1998). *In vitro*-Zellkulturmodelle, welche für die Analyse der intestinalen epithelialen Funktion verwendet werden, müssen daher die Ernährung und die Sauerstoffversorgung der Epithelzellen *in vivo* widerspiegeln. Zellkulturen werden routinemäßig auf impermeablen Trägern kultiviert, welche mit biologisch-relevanten Komponenten beschichtet sind (Glaum et al., 2010). Diese Konstellation entspricht jedoch in keinster Weise der Situation *in vivo*. Die Enterozyten erhalten unter physiologischen Bedingungen ihre Nährstoffe von der apikalen und basolateralen Seite. Insbesondere wird die Sauerstoffversorgung der Zellen über die basolaterale Seite durch den Blutfluss realisiert (Storch et al., 2008). Die Epithelzellen, welche auf impermeablem Untergrund kultiviert werden, müssen sich an die ausschließlich apikale Nährstoff- und Sauerstoffversorgung anpassen, wobei die Sauerstoffversorgung durch die Diffusionsrate des Zellkulturmediums begrenzt ist. Die Einführung von Membrankultursystemen wie dem TranswellTM-System (Corning, USA) bietet die Möglichkeit, die Bedingungen der intestinalen Barriere nachzustellen. Aufgrund der porösen Struktur der Membranen ist sowohl ein apikaler als auch ein basolateraler Zugang zu den Zellen möglich, eine Situation, welche sich der *in vivo*-Situation annähert. Membrankultivierte Epithelzellen zeigen bezüglich der exprimierten Proteine eine deutliche apikale/basolaterale Polarisation (Fey-Lamprecht et al., 2000). Der permeable Untergrund und das Vorhandensein einer flüssigen, basolateralen Komponente ermöglichen auch die Stoffaufnahme und die -abgabe im basolateralen, epithelialen Kompartiment.

Dies ist essentiell für die Hauptfunktionen der Enterozyten und zwar den selektiven Transport von Ionen, Peptiden und anderen Nährstoffen (Daniel, 2004). Trotz des Vorteils der Membrankultursysteme gegenüber der Kultivierung auf impermeablem Untergrund genügt diese Methode nicht den Anforderungen der metabolisch aktiven und hypoxiesensitiven, intestinalen Epithelzellen (Lewis und McKay, 2009). Sowohl bei der Kultivierung auf impermeablem Untergrund als auch bei der Kultivierung auf Membranen sind die Zellen komplett von Medium bedeckt. Diese Tatsache limitiert die Sauerstoffversorgung dramatisch. Aus diesem Grund werden die sehr sensitiven, primären intestinalen Epithelzellen meist in Sauerstoff angereichertem Medium kultiviert (Bader et al., 2000). Interessanterweise sind konventionelle Membrankulturen, in denen die apikale Oberfläche nur von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt ist, das Mittel der Wahl bei der Kultivierung von Epithelzellen der Atemwege und des Magens (Tchao, 1989; Gruenert et al., 1995; Ootani et al., 2000; Ootani et al., 2001). Diese Methode wird auch als Air-Liquid Interface (ALI) Kultur bezeichnet. Die Anwendung der ALI-Technik auf Epithelzellen des Magens verbesserte die morphologischen und funktionellen Eigenschaften im Kultursystem für GSM06-Zellen (Ootani et al., 2000; Yokoyama et al., 2007). Bei dem ALI-Protokoll wird das apikale Medium zu einem dünnen Film reduziert. Dies stimmt mit den physiologischen Gegebenheiten überein. Dieser Wasserfilm beträgt bei der Ratte im Jejunum zirka 198 μm und im Ileum zirka 217 μm (Wilson und Dietschy, 1974). Des Weiteren wird durch die Reduktion die Diffusionsbarriere minimiert. Die Diffusionsbarriere für Sauerstoff beträgt 100-200 μm (Brahimi-Horn et al., 2007). Dies resultiert in einer verbesserten Sauerstoffversorgung, die den Anforderungen der kultivierten Zellen entspricht. Für die Untersuchung und das Verständnis von biologischen Funktionen ist es unerlässlich, das Kultursystem der *in vivo*-Situation so nah wie möglich anzupassen. Somit wurde die ALI-Technik auf die Membrankulturen von porcinen, intestinalen Epithelzellen – IPEC-1 und IPEC-J2 – übertragen.

Die intestinale Barriere ist jedoch nicht nur durch das Vorhandensein eines intakten und differenzierten Monolayers gekennzeichnet sondern auch durch das Vorkommen von Immunzellen unterhalb der Basalmembran. Die wohl wichtigste Aufgabe der Immunzellen besteht darin Pathogene und andere Antigene zu erkennen, abzuwehren und zu eradizieren. Grundsätzlich kann zwischen angeborener und adaptiver Immunität unterschieden werden (Baumgart, 2004).

Die angeborene Immunität wird durch Mastzellen, Serumglykoproteine und natürliche Killerzellen realisiert. Von entscheidender Bedeutung sind hier die sogenannten „Pathogen Associated Molecular Pattern“ (PAMPs) (Baumgart, 2004; Cerovic et al., 2009). Das angeborene Immunsystem kann Fremdartigene durch solche molekulare Muster erkennen. Diese PAMPs wie zum Beispiel Lipopolysaccharide kommen nur auf Mikroben und nicht auf Zellen des Wirts vor (Medzhitov und Janeway, 2002). Die Erkennung grober Muster ist von Vorteil, da der Organismus nicht für jedes Antigen einen eigenen Rezeptor bereithalten kann und Pathogene in der Lage sind, schnell zu mutieren. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem bedient sich das adaptive Immunsystem spezifischer Rezeptoren auf B- und T-Zellen. B-Zellen können Antigene direkt erkennen und werden so aktiviert (Bernasconi et al., 2002). T-Zellen hingegen erfordern die Präsentation von Antigenen durch spezialisierte Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs). Die Erkennung von spezifischen Antigenfragmenten durch den T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor, TCR) ist nur im Kontext mit den Histokompatibilitätsmolekülen (MHC I und II) und den co-stimulatorischen Molekülen (CD40, CD80 und CD86) möglich. Die Dendritischen Zellen bilden eine heterogene Gruppe von potenten antigenpräsentierenden Zellen (APCs). Dendritische Zellpopulationen können durch verschiedene Oberflächenproteine charakterisiert werden: CD11b, CD11c, CD8 α , CD4, B220, DEC-205, CD209 und die Chemokine-Rezeptoren CCR6, CCR7 und CX₃CR₁ (Niedergang und Kweon, 2005; Cerovic et al., 2009).

Zelluläre Vorläufer der dendritischen Zellen sind Monozyten, welche durch geeignete Faktoren weiter zu MoDCs (*monocyte-derived dendritic cells*) differenziert werden können. Hierfür werden Interleukin-4 (IL-4) und „*granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*“ (GM-CSF) verwendet (Carrasco et al., 2001; Johansson et al., 2003). Nach einer Stimulation von drei bis sieben Tagen sind nicht adhärenente oder schwach adhärenente Zellen mit einer dendritischen Morphologie zu beobachten (Paillot et al., 2001). Eine Generierung von MoDCs kann auch durch den Zusatz von GM-CSF und Interferon- α (IFN- α) erreicht werden (Santini et al., 2009). Porcine MoDCs sind charakterisiert durch CD1⁺CD14⁺CD16⁺CD80/86⁺CD172a⁺ und MHCII⁺ (Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001). Interessanterweise sind porcine MoDCs im Gegensatz zu humanen DCs durch CD14 charakterisiert. In letzteren ist CD14 ein Marker für Monozyten und Makrophagen (Banchereau et al., 2000). Auch MoDCs von anderen Spezies wie die von Katze, Rind und Hund exprimieren CD14 (Miranda de Carvalho et al., 2006).

In der frühen Phase der Differenzierung wird CD172a (SWC-3a; *swine workshop cluster*) auf Monozyten und Granulozyten gebildet. Dieser Marker repräsentiert das „*signal regulatory protein alpha*“ (SIRP- α). Die Co-Expriemierung von CD1⁺ und CD172a zusammen mit einem hohen Level an CD80/86 und MHCII werden als Marker für porcine MoDCs genutzt (Paillot et al., 2001; Summerfield und McCullough, 2009). Jedoch wurde bis heute kein Marker identifiziert, der eine klare Abtrennung zu den aus Monozyten gewonnenen Makrophagen zulässt. Porcine MoDCs, welche aus Monozyten mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF generiert wurden, befinden sich in einem unreifen Zustand und können somit für den Aufbau eines Zellkultur-Modells genutzt werden. Des Weiteren können Untersuchungen wie die Analyse des Reifungsprozesses von dendritischen Zellen mit Hilfe der MoDCs durchgeführt werden.

Es wird angenommen, dass die dendritischen Zellen mit den Epithelzellen interagieren können und unter Erhalt der epithelialen Integrität eine direkte Antigenaufnahme möglich ist. Das Tight Junction Protein Occludin spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Collins, 2002). Die Involvierung von Occludin in solch einen Prozess konnte auch für die Migration von Neutrophilen nachgewiesen werden (Huber et al., 2000). In den verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der TEER nicht durch die Migration beeinflusst wird. An diesen Schnittstellen kommt es zu Unregelmäßigkeiten in der Ausprägung der Tight Junction Proteine (Burns et al., 2000). Interessanterweise migrieren Neutrophile vornehmlich an den Schnittpunkten dreier Zellen den sogenannten trizellulären Kontakten (Burns et al., 2000). Es ist jedoch nicht bekannt, ob dieses Phänomen auch im intestinalen Epithel vorkommt. Der direkte Weg der Antigenaufnahme wurde erstmals von Rescigno beschrieben. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass dendritische Zellen in der Lage sind, Fortsätze ins intestinale Lumen zu senden, um dort direkt Bakterien aufzunehmen (Rescigno et al., 2001). Der Mechanismus ist jedoch noch nicht verstanden. Es wurde weiterhin festgestellt, dass die DCs in der Lage sind Tight Junction-Proteine wie Occludin, Claudin-1 und ZO-1 zu exprimieren. Außerdem wurde auch die Produktion von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und β -Catenin nachgewiesen (Rescigno et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Antigenaufnahme und -abgabe ist die apikale Endozytose von luminalen Antigenen durch die Enterozyten und anschließend die basale Abgabe durch Exosomen. Die Größe solcher Exosomen beträgt zwischen 30-90 nm (Mallegol et al., 2005). Es konnte für HT29-19A und T84-DRB1*0401/CIITA-Zellen die Abgabe von Exosomen unter normalen und unter inflammatorischen Bedingungen nachgewiesen werden (van Niel et al., 2001). Exosomen, welche von der basolateralen Seite abgegeben werden, sind durch die Marker A33, CD63 und MHCII gekennzeichnet (Johnstone et al., 2000; Mallegol et al., 2005). A33 wird nicht von Immunzellen gebildet und ist auf Enterozyten beschränkt (Heath et al., 1997). Somit können basolateral abgegebene Exosomen von professionellen APCs aufgenommen werden.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren: 1.) die Isolation und Charakterisierung von primären Epithelzellen aus dem Darm, 2.) die Beschreibung und der Vergleich der etablierten Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 – in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen, 3.) die Entwicklung eines Membrankultursystems mit einer optimierten Sauerstoffversorgung der metabolisch-aktiven Epithelzellen, 4.) die morphologische und funktionelle Charakteristik dieses Kultursystems und 5) die Entwicklung und Charakterisierung eines Co-Kultursystems zur Darstellung der intestinalen Barriere.

2 Material und Methoden

Die Hersteller der aufgeführten Materialien und Chemikalien sind im Anhang im Herstellerverzeichnis aufgeführt.

2.1 Probennahme

2.1.1 Darmproben

Die Entnahme von Darmproben – Jejunum und Ileum – für die Isolation von intestinalen Epithelzellen erfolgte an neugeborenen Ferkeln des Tierbestandes der LPVG GmbH (Pietrain x Landschwein, Mücheln, Deutschland). Die Ileumproben wurden zirka fünf Zentimeter kranial der Iliozäkalklappe und die Jejunumproben wurden aus der Mitte des Dünndarmkonvolutes entnommen (Pond und Mersmann, 2001). Hierfür wurden die Tiere durch die intracardiale Gabe einer 8%-igen Narcoren-Lösung getötet. Für die Gewinnung von RNA-Proben und zur Anfertigung von Gefrierschnitten für die Immunfluoreszenz wurden von beiden Darmabschnitten – Ileum und Jejunum – auch Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.2 Blut

Die Blutproben wurden von Schweinen des Tierbestandes der LPVG GmbH (Pietrain x Landschwein, Mücheln, Deutschland) unter Standardbedingungen entnommen. Die Entnahme des Blutes erfolgte aus dem *Truncus brachiocephalicus*. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurde Heparin (5000 i.E./ml; 1 ml/20ml) verwendet.

2.2 Isolation von primären Zellen

2.2.1 Isolation von porcinen Epithelzellen

Für die Isolation von intestinalen Epithelzellen wurde der komplette Darm entnommen und mit PBS⁺ befeuchtet. An beiden Enden wurde eine Magensonde befestigt, deren Schlauch auf zirka fünf Zentimeter gekürzt und mit Löchern versehen wurde.

Auf diese Weise konnten die Darmabschnitte gespült und mit verschiedenen Lösungen inkubiert werden. Da mit dieser Methode jedoch beim Spülen nicht das Niveau der Krypten erreicht werden konnte, wurde das Protokoll modifiziert. Infolgedessen wurde bei den nachfolgenden Protokollen der Darm mit Hilfe eines Glasstabes invertiert. Allen angegebenen Lösungen und Puffern wurde Penicillin/Streptomycin zugesetzt (100 µg/ml). Es wurden vier verschiedene Isolierungsprotokolle getestet (Tab. 1).

PROTOKOLL	1	2	3	4
Referenzen	Gonzalez-Valina et al. (1996)	Flint et al. (1991)	Bjerknes und Cheng (1981)	Gliddon et al. (2008)
Darmabschnitt	Ileum und Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum und Jejunum
Rho-Kinase-Inhibitor	+	-	-	+
Waschpuffer	PBS	PBS	PBS	PBS
Präinkubation	Citratpuffer	HBSS ⁻ + 0,5 mM DTT	---	DMEM + 20 mM HEPES + 0,2% BSA
Präinkubationszeit	10 min	---	---	60 min
Inkubationspuffer	PBS + 1,5 mM EDTA + 2 mM Glucose	Chelationspuffer	PBS + 30 mM EDTA	DMEM + 20 mM HEPES + 0,2% BSA + Collagenase A
Inkubationszeit	10 min	20 min	20 min	60 min
Temperatur	37°C	4°C	37°C	37°C

Tabelle 1: Protokolle für die Isolation intestinaler Epithelzellen. Bei dem Protokoll von Gonzalez-Vallina (1996) wurde der Schritt Inkubationspuffer dreimal wiederholt und die letzte Inkubation wurde auf 20 Minuten verlängert. Die daraus folgenden Fraktionen (F1-F4) wurden separat ausgesät.

Den Puffern und Lösungen der Protokolle eins und vier wurde Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 (1 µg/ml) zugesetzt. Beim Protokoll vier wurden die Darmabschnitte mit DMEM/HAMs F12 versetzt mit 20 mM HEPES und 0,2% BSA und Y27632 für 60 Minuten präinkubiert bevor Collagenase A (1 mg/ml) zugesetzt und für weitere 60 Minuten inkubiert wurde.

2.2.2 Isolation von PBMCs und Generierung von Monozyten

Aus den in Punkt 2.1.2 gewonnenen, heparinisierten Blutproben wurden PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) isoliert. Hierfür wurde das heparinisierte Blut zu gleichen Teilen mit 0,03%-igen PBS/EDTA verdünnt und zu je 15 ml auf 50 ml Falcons verteilt. Im Anschluss wurde das verdünnte Blut mit Ficoll unterschichtet (pro 15 ml Blut – 15 ml Ficoll) und für 25 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (800xg und ohne Bremse). Die Interphase wurde abgenommen (Abb. 2) und mit 0,03%-igen PBS/EDTA dreimal gewaschen (10 min, 400xg, 4°C, mit Bremse). Im nächsten Schritt wurden alle Zellen gepoolt und in 50 ml PBS/EDTA aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl abgenommen und die Zellzahl der PBMCs bestimmt. Aus den durch die Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnenen PBMCs wurden Monozyten mit Hilfe des vorhandenen SWC-3a-Rezeptors generiert. 10% der PBMCs sind Monozyten. Die Suspensionslösung wurde zentrifugiert (350xg, 4°C, 10 min). Im Anschluss wurde das Zellpellet mit dem SWC-3a Antikörper resuspendiert (20 µl pro $1 \cdot 10^6$ Monozyten, SWC-3a, Klon 74-22-15, IgG1, Hybridomaüberstände) und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 50 ml PBS/EDTA gewaschen und mit 20 µl pro $1 \cdot 10^7$ Zellen Ziege anti-Maus MACS Microbeads und 80 µl MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^7$ Zellen (0,03%-iges PBS/EDTA + 2% FCS, entgast und auf 4°C vorgekühlt) versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und zentrifugiert (350xg, 10 min, 4°C) und in fünf Millilitern MACS-Puffer aufgenommen. Währenddessen wurde die zur Separation benötigte LS Säule in der magnetischen Separationseinheit befestigt und mit fünf Millilitern MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und im Anschluss wurde die Säule gewaschen bis die Spüllösung klar war. Alle nicht mit MACS Microbeads markierten Zellen wurden so entfernt. Die LS Säule wurde dann aus der Separationseinheit entfernt und auf ein 15 ml Falcon gesetzt.

Die in der Säule gebundenen, SWC-3a positiven, Zellen wurden mit fünf Millilitern MACS-Puffer aus der Säule gespült, mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt und pelletiert (350xg, 10 min, 4°C). Mittels FACS-Analyse wurde die Reinheit überprüft.

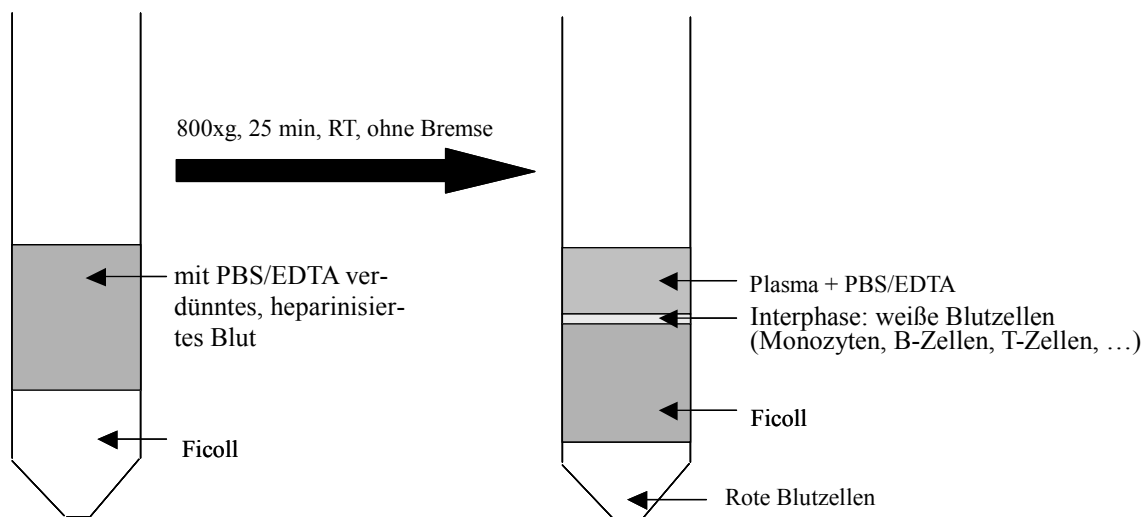


Abbildung 2: Ficoll-Gradienten-Zentrifugation. Das Ficoll wurde mit verdünntem Blut überschichtet und für 25 Minuten bei 800xg zentrifugiert. Die Blutprobe wurde in Erythrozyten, Plasma und weißen Blutzellen aufgetrennt.

2.3 Zelltypen und deren Kultivierung

2.3.1 Epithelzellen

2.3.1.1 Kultivierung von porcinen, primären intestinalen

Epithelzellen

Die gewonnenen, primären intestinalen Epithelzellen wurden in Medium, welches 30% Fibroblasten-konditioniertes Medium enthielt, ausgesät (Schale: 21,5 cm Durchmesser; Glasbodenschale für Immunfluoreszenz). Zu Beginn der Versuche wurden die verschiedenen Zellfraktionen auf unbeschichteten Schalen ausgesät. Diese Variante wurde jedoch verworfen, so dass bei allen folgenden Versuchen nur noch mit Collagen I-beschichtete Schalen verwendet wurden.

Nach Beendigung des Versuches wurden die Zellen für die RNA-Isolierung abgeschabt und in TRIzol aufgenommen. Die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung wurden auf den fixiert. Das Fibroblasten-konditionierte Medium wurde durch Fibroblasten aus dem Darm gewonnen, in dem die Überstände dieser Zellen abgenommen und weggefroren wurden.

2.3.1.2 Kultivierung von porcinen, kontinuierlichen intestinalen Epithelzelllinien

2.3.1.2.1 Kultivierung auf impermeablem Untergrund

Kultivierung

Für die Kultivierung auf einem impermeablen Untergrund wurden Schalen mit einer Folie verwendet. Beide Zelllinien wurden hierfür in Zellkulturflaschen (Kulturfläche: 25 cm²) in Zellkulturmedium (complete, siehe Anhang) herangezogen. Am Tag der Aussaat wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS⁺ (5 ml/Zellkulturflasche) gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA (2 ml/Kulturflasche) gelöst, zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen (350xg, RT, 10 min). Im Anschluss wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,6*10⁵ Zellen/ml für IPEC-1 und 0,5*10⁵ Zellen/ml in Zellkulturmedium (complete, siehe Anhang) auf den Lumox[®]-Schalen ausgesät. Beide Zelllinien wurden für 21 Tage bei 39°C und in einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Die Caco-2-Zelllinie wurde in verschiedenen Versuchen als Positivkontrolle verwendet. Diese Zelllinie wurde wie die IPEC-J2-Zellen mit einer Konzentration von 0,5*10⁵ Zellen/ml in Zellkulturmedium (complete, siehe Anhang). Die Passage beziehungsweise die Aussaat erfolgte nach dem Protokoll der IPEC-Zellen.

Generationszeit

Beide Zelllinien wurden auf 96-Well-Platten in Zellkulturmedium (Kulturfläche/Well: 28 mm²; 100 µl/Well; complete, siehe Anhang) ausgesät. IPEC-1 wurde mit einer Konzentration von 1,2*10⁵Zellen/ml und IPEC-J2 mit einer Konzentration von 1,0*10⁵ Zellen/ml ausgesät (100 µl/Well) und bei 39°C für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und die adhärenenten Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA von der Platte gelöst. Die Zellzahl wurde mit

Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Zellzahl wurde als Ausgangswert (N_0) für die Bestimmung der Generationszeit verwendet. Die übrigen Wells wurden gewaschen und nach 4h, 6h, 8h, 10h, 17h, 24h, 48h, 72h, 4d, 7d, 11d, 14d, 18d, und 22d ausgezählt.

Die Generationszeiten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$tg = \frac{\log 2 * dt}{\log N * \log N_0}$$

dt = Kulturzeit
N = Zellzahl zum Ablesezeitpunkt
N₀ = Zellzahl zum Zeitpunkt null
tg = Generationszeit

Schwellenwert bei der Aussaat

Beide Zelllinien wurden in einer 6-Well-Platte mit unterschiedlichen Gesamtzellzahlen ausgesät (2 ml/Well; Kulturfläche/Well: 9,6 cm²). Die Gesamtzellzahlen pro Well betragen: 10, 100, 1000, 10 000, 30 000 und 60 000. Das Wachstum der Zellen wurde mittels Mikroskop (Hellfeld, Phasenkontrast, 20x, fünf Aufnahmen pro Well) an den Tagen eins und sieben der Kultivierung überprüft.

Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason

IPEC-1 und IPEC-J2 wurden mit einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml (IPEC-1) und $0,6 \cdot 10^5$ Zellen/ml (IPEC-J2) in unterschiedlichen Medien (3 ml) auf Schalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesät. Die Zellen wurden in Medium (complete, siehe Anhang) für zwei Tage kultiviert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt: a) complete Medium, b) FCS-freies Medium oder c) FCS-freies Medium mit Dexamethason (siehe Anhang). Nach zehn Tagen wurde die Morphologie mittels Elektronenmikroskopie erfasst und die Villin-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

2.3.1.2.2 Kultivierung auf permeablem Untergrund

Kultivierung auf permeablem Untergrund

Die Kultivierung auf permeablem Untergrund wurde mit Membrankultureinsätzen durchgeführt (ThinSerts, Greiner-bioone). Beide Zelllinien wurden wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.3.1.2.1) im oberen Kompartiment ausgesät. Am zehnten Tag wurde die Integrität des Monolayers mittels einer TEER-Messung (Milli-TERS) überprüft. Im weiteren Verlauf erfolgte eine schrittweise Herabsetzung der FCS-Konzentration alle zwei Tage (5%; 2,5%; 1%; FCS-frei). IPEC-1 und IPEC-J2 wurden dann für weitere 21 Tage kultiviert, wobei der TEER alle sieben Tage überprüft und das Medium in beiden Kompartimenten alle zwei Tage erneuert wurde.

Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason auf permeablen Untergrund

IPEC-1 beziehungsweise IPEC-J2 wurden im oberen Kompartiment ausgesät, für zehn Tage kultiviert und mittels TEER-Messung auf Integrität überprüft. Im Anschluss wurde das Medium auf der apikalen und basalen Seite gewechselt: a) complete Medium, b) FCS-freies Medium und c) FCS-freies Medium mit Dexamethason (siehe Anhang). Es erfolgte eine Kultivierung für weitere zehn Tage.

Einsatz von Deoxynivalenol (DON)

Die Wirkung des Mykotoxins Deoxynivalenol sollte auf konventionellen Membranen parallel zur ALI-Kultur getestet werden. Nach Beendigung der Kultur (Tag 21 der ALI-Kultur) wurde apikal oder basolateral DON (Stocklösung: 0,2 mg/ml in Ethanol) zugesetzt: 200 ng/ml apikal, 200 ng/ml basolateral, 2000 ng/ml apikal und 2000 ng/ml basolateral. Um Aussagen über den Einfluss von DON treffen zu können, wurden Kulturen mit und ohne den Zusatz des Toxins verglichen. Die DON-Behandlung der Kulturen erfolgte für 24, 48 oder 72 Stunden. An jedem der genannten Tage wurde der TEER erfasst.

TEER-Messung

Bei der Kultivierung auf einer porösen Membran entwickeln die Epithelzellen spezielle Eigenschaften, welche auch im intakten Gewebe gefunden werden wie die Formation eines dichten Monolayers mit „dichten“ Tight Junctions und der sich daraus ergebenden Zellpolarität. Die Untersuchung dieser Funktion kann *in vitro* durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER) erfolgen. Es kann bei der TEER-Messung nicht zwischen dem transzellulären und dem parazellulären Widerstand unterschieden werden. Der transzelluläre Weg durchquert die apikale und basolaterale Zellmembran. Der parazelluläre Weg hingegen durchläuft die Tight Junctions. Somit gibt die hier vorgenommene TEER-Messung die Summe aus transzellulären und parazellulären Widerstand wider. Durch die Festlegung eines Schwellenwertes kann ein Rückschluss auf die Konfluenz des Monolayers gezogen werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein TEER-Wert von 1 kOhm/Well (1,1 kOhm*cm² bei 12-well-Inserts) als Schwellenwert festgelegt. Dieser wurde nach vier Tagen der Kultur erreicht und ging mit der Konfluenz des Monolayers einher (visuelle Kontrolle mittels Mikroskop). In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein TEER-Messgerät mit einer einfachen Messelektrode verwendet. Die Messelektrode wurde mit 70%-igen Ethanol und im nächsten Schritt mit Aqua dest. (Ampuwa) gewaschen. Im Anschluss wurde die Elektrode für zehn Minuten im vorgewärmten Medium äquilibriert. Nach der TEER-Messung erfolgte ein Mediumwechsel.

2.3.1.2.3 Kultivierung als Air-Liquid Interface (ALI) Kultur

Kultivierung

Die Kultivierung als ALI-Kultur wurde auf Membrankultureinsätzen durchgeführt. Für die Gewinnung von RNA- und Proteinproben wurden 12-well-Inserts verwendet. Alle anderen Versuche wurden auf 24-Well-Inserts durchgeführt. Beide Zelllinien wurden wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.3.1.2.2) im oberen Kompartiment ausgesät. Am zehnten Tag wurde die Integrität des Monolayers mittels einer TEER-Messung überprüft. Die FCS-Konzentration wurde alle zwei Tage herabgesetzt (5%, 2,5%, 1%, FCS-frei). Das Medium des oberen Kompartiments wurde entfernt. IPEC-1 und IPEC-J2 wurden für weitere 21 Tage kultiviert, wobei der TEER alle sieben Tage überprüft und das Medium im unteren Kompartiment alle zwei Tage erneuert wurde.

Einsatz von MAP-Kinase-Inhibitor (U0126)

Beide Zelllinien wurden als ALI-Kultur angezogen. Um den Einfluss des Inhibitors zu testen, wurde den ALI-Kulturen während der ALI-Kultivierungszeit (21 Tage) der Inhibitor basolateral (1 µg/ml) zugesetzt. Zeitgleich wurden ALI-Kulturen mitgeführt ohne den Zusatz des Inhibitors.

Einsatz von Deoxynivalenol (DON)

Um die Empfindlichkeit des Zellkultursystems zu testen, wurde den ALI-Kulturen Deoxynivalenol zugesetzt. Hierfür wurden die ALI-Kulturen wie oben beschrieben (FCS-Freisetzung) herangezogen. Am 21. Tag der ALI-Kultivierung wurde apikal oder basolateral DON zugesetzt: 200 ng/ml apikal, 200 ng/ml basolateral, 2000 ng/ml apikal und 2000 ng/ml basolateral. Die unterschiedlichen Konzentrationen des Toxins wurden gewählt um die Auswirkungen von hohen und niedrigen DON-Dosen zu testen. Die behandelten Kulturen wurden mit den Kontrollen (keine DON-Behandlung) verglichen. Eine weitere Kultivierung mit und ohne DON erfolgte für 24, 48 und 72 Stunden. Eine TEER-Kontrolle erfolgte an jedem der genannten Tage.

2.3.2 MoDCs

Die in 2.2.2 gewonnenen Monozyten wurden in Differenzierungsmedium (siehe Anhang) aufgenommen und in 12-Well-Platten ausgesät. Es wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well (Kulturfläche/Well: 3.9 cm²; 1 ml/Well) ausgesät. Für die Co-Kultur-Versuche auf 12-Well-Inserts wurden die Zellen für drei Tage bei 39°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ inkubiert. Am vierten Tag wurde das Differenzierungsmedium (zentrifugiert: 350xg, 3 min, RT) durch Erhaltungsmedium (siehe Anhang) ersetzt. Am fünften Tag wurde wieder ein Mediumwechsel vorgenommen (Hybridmedium; siehe Anhang). Am achten Tag wurde das Medium gewechselt und mit diesem neuen Medium wurden die MoDCs durch Auf- und Abpipettieren von der Platte gelöst (Hybridmedium; gekühlt).

2.4 Aufbau des Modells

2.4.1 Co-Kultivierung auf permeablem Untergrund

Für die Etablierung der Co-Kulturen wurden die Inserts invertiert und die Zellen wie oben beschrieben ausgesät (250 μ l Zellsuspension/Insert mit $1,2 \cdot 10^5$ IPEC-1-Zellen/ml oder $1,0 \cdot 10^5$ IPEC-J2-Zellen/ml). Die Inserts wurden für 24 Stunden mit den Zellen bei 39°C inkubiert (Abb. 3). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Inserts wieder invertiert und in Kulturplatten verbracht. Am siebten Tag der Kultivierung wurde das Medium zu FCS-freiem Medium und am achten Tag zu Hybridmedium gewechselt. Am elften Tag wurde frisches Hybridmedium zugesetzt und die kultivierten MoDCs ($1 \cdot 10^6$) auf der basalen Seite (oberes Kompartiment) ausgesät. Die Co-Kulturen wurden für fünf Tage kultiviert.

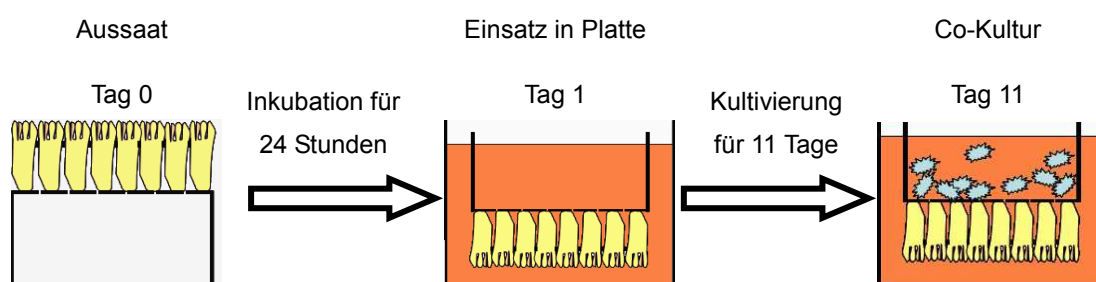


Abbildung 3: Zeitplan der Kultivierung der Co-Kulturen. Die Aussaat erfolgte auf invertierten Inserts. Diese wurden für 24 Stunden bei 39°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden sie in eine Zellkulturplatte eingesetzt und für weitere zehn Tage kultiviert. Am elften Tag wurden die kultivierten MoDCs basal den IPECs zugesetzt und für weitere fünf Tage kultiviert.

2.4.2 Zusatz von DON und LPS

Am elften Tag der Kultur wurden die generierten MoDCs zugesetzt. Zeitgleich wurde auch apikal neues Medium hinzugefügt. Um den Einfluss der MoDCs untersuchen zu können, wurden Kontrollmembranen ohne MoDC-Zusatz mitgeführt. Des Weiteren wurde zusätzlich der Einfluss von Deoxynivalenol (Stocklösung: 0,2 mg/ml in Ethanol) 200 ng/ml, apikal) und Lipopolysacchariden (*Salmonella thyphimurium*; 1 μ g/ml, apikal) in den Kontrollen und Co-Kulturen untersucht.

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

2.5.1 RNA-Isolierung

Den kultivierten Zellen wurde TRIzol (500 µl/Probe) zugesetzt und mittels eines Zellschabers von ihrem Untergrund gelöst. Mit Hilfe einer 21G Spritze wurde die Suspension homogenisiert. Die eingefrorenen Darmabschnitte wurden mit dem Zusatz von TRIzol mittels eines Ultra TURRAX Homogenisators in ihrer Konsistenz angeglichen. Im nächsten Schritt wurde der Suspensionslösung Chloroform (100 µl/500 µl) zugesetzt. Die Gewinnung der RNA aus der löslichen Phase erfolgte durch den Zusatz von Isopropylalkohol. Das Pellet wurde getrocknet und danach in DEPC-Wasser gelöst. Die Lagerung der gewonnenen Proben erfolgte bei -80°C.

2.5.2 PCR

Die RT-PCR (umschreiben von mRNA in cDNA) wurde mit Hilfe des ReverdAid First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen als auch das PCR-Programm erfolgten gemäß den Herstellerinstruktionen. Die spezifischen Primerpaare wurden mittels dem Primer3 Programm (<http://frodo.wi.mit.edu/>), basierend auf der porcinen Sequenz in NCBI, hergestellt (siehe Anhang; Tab. 11). Der PCR-Mastermix von 25 µl enthielt 2 pmol des Primerpaares, 50% FastStart PCR Master Mix und 80 ng des cDNA-Templates. Die PCR-Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 min Präinkubation bei 95°C, gefolgt von 35 thermalen Zyklen (30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei 55°C und 45 s Extension bei 72°C). Der finale Elongationsschritt wurde bei 72°C für die Dauer von 10 min durchgeführt (Eppendorf Mastercycler Gradient, Deutschland). 10 µl des PCR-Produktes wurden durch die Gelelektrophorese (1%-iges Agarosegel, gefärbt mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Agarosegele wurden mit Hilfe des FluorChem[®] Systems analysiert.

2.5.3 qPCR

Der Maxima™ SYBR GREEN qPCR Master Mix wurde für die Durchführung der quantitativen Realtime PCR-Analyse (qPCR) verwendet. Eine Reihe von verschiedenen Primerpaaren wurden benutzt (siehe Anhang; Tab. 12). Der qPCR-Reaktionsansatz (25 µl) enthielt 3 pmol/µl des jeweiligen Primerpaares sowie 60 ng/µl Template-cDNA und 50 % qPCR Maxima™ SYBR GREEN qPCR Master Mix (2x). Die PCR-Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 min Präinkubation bei 95°C und 40 thermalen Zyklen (30 s Denaturierung bei 95°C, 60 s für Annealing und Extension bei 54°C). Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wurde für die Kalkulation der Unterschiede in dem Expressionsprofil benutzt. Im ersten Schritt wurde der CT-Wert des Referenzgens von dem CT-Wert des Zielgens ($\Delta\text{CT} = \text{CT}^{\text{target}} - \text{CT}^{\text{reference}}$) subtrahiert. Nach dieser Normalisierung wurde der ΔCT -Wert der Kontrolle, Kalibrator, von dem ΔCT -Wert der Probe subtrahiert ($\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}^{\text{treatment}} - \Delta\text{CT}^{\text{control}}$). Für die Untersuchung von Villin und GAPDH wurden Zellen, welche im Kühlschrank gelagert wurden, um die Degradierung der mRNA sicherzustellen, als Kalibrator verwendet. Der relative Unterschied zwischen der Expression der gewonnenen Proben und der Kontrolle, welche auf ein Referenzgen normalisiert wurden, basierend auf einer Standardprobe, resultiert in der verwendeten Formel: $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

2.6 Western Blot

Die Zellen wurden nach verschiedenen Protokollen (impermeabel, permeabel und ALI-Kultur) herangezogen. Nach Beendigung des Versuches wurden die Zellen für zehn Minuten mit SDS-Ladepuffer auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben (20µl) wurden zusammen mit dem Prestained Protein Ladder auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese und dem Blotten auf einer 0,45 µm Nitrocellulose-Membran wurde der primäre Antikörper zugegeben. Der sekundäre Antikörper war bereits im benutzten BM Chemiluminescence Western Blotting Kit enthalten. Nach der Entwicklung wurden die Blots mit Stripping-Puffer für die Dauer von 30 Minuten bei 50°C gestripped. Danach wurden sie gewaschen und mit dem anti-Aktin-Antikörper neu beladen. Die Blots wurden mit Hilfe des Flour Chem®-Systems entwickelt.

2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit Expressionsanalysen auf Einzelzellniveau durchzuführen. Es können hierbei verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Jede Einzelzelle wird mit einem Laser bestrahlt und im Anschluss wird die emittierte Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen analysiert. Somit können Aussagen über die Größe, Granularität, den Anteil der fluoreszierenden Zellen innerhalb einer Population und anhand der Fluoreszenzintensität Aussagen über die Expressionsstärke des zu untersuchenden Proteins getroffen werden. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden von der Zellkulturplatte gelöst und mit Cell Wash (BD, Deutschland) drei Waschschrte durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert und danach dreimal gewaschen (siehe Anhang; Tab. 13). Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem entsprechenden sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper versetzt und im Dunkeln für 20 Minuten inkubiert (siehe Anhang; Tab. 13). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für die Messung in 200 μ l frischen Cell Wash aufgenommen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Sowohl MoDCs als IPECs wurden zu Beginn der Co-Kulturen und nach Beendigung des Versuches mittels FACS analysiert. Für die Auswertung der Daten wurden 20 000 Zellen analysiert. Mit Hilfe eines Gates konnte der Zellschrott aus der Analyse ausgeschlossen werden, so dass nur intakte Zellen analysiert wurden. Dies erfolgte jedoch nicht bei der Lebend/Tot-Bestimmung mit Propidiumiodid. Hierfür wurde kein Gate verwendet. Das Propidiumiodid wurde fünf Minuten vor der FACS Analyse zur Probe hinzugegeben und dann auf Eis inkubiert (10 μ l auf 200 μ l Probe).

2.8 Nachweis des invasiven Wachstums mittels Softagar-Versuch

Der Softagar-Versuch (Dodson et al. 1981) wurde modifiziert. Der Feeder-Agar bestand aus 0,5% Agar in DMEM/HAMs F12. Nach dem Erhitzen für zirka drei Minuten wurde dem Agar 5% FCS, HEPES und PEN/STREP zugesetzt. Dieser Agar wurde aufgeteilt: der erste Teil wurde sofort zum Beschichten (Zellkulturflasche: 25 cm²) verwendet und dem zweiten Teil wurde noch ITS und/oder EGF zugefügt. Nach dem Zusatz von EGF und/oder ITS wurde auch dieser Feeder-Agar zum Beschichten verwendet.

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst, gewaschen und mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Im Anschluss wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in 1,5 ml Softagar aufgenommen und auf dem Feeder-Agar verteilt. Dieser Softagar mit einem Gehalt von 0,33% Agar wurde wie oben beschrieben hergestellt. Die Zellen wurden bei 39°C und 5% CO₂ für drei Wochen inkubiert. Somit wurden die Zellen auf vier unterschiedliche Arten kultiviert. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie Caco-2, welche aus einem Tumor stammt, verwendet.

2.9 Mikroskopische Untersuchungen

2.9.1 Histochemie

2.9.1.1 Nachweis der Alkalischen Phosphatase

IPEC-1 und IPEC-J2 wurden für den mikroskopischen Nachweis der Alkalischen Phosphatase auf Glasbodenschalen mit einer Konzentration von $0,6 \cdot 10^5$ Zellen/ml (IPEC-1) und $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml (IPEC-J2) ausgesät. Für die Reaktion wurde eine NBT- (50 mg NBT + 1400 µl DMF + 600 µl DEPC-H₂O) und eine BCIP-Stammlösung (22 mg BCIP + 440 µl DMF) hergestellt.

Für den Ansatz von zehn Millilitern Gebrauchslösung wurden 150 µl der NBT- und 35 µl der BCIP-Stammlösung mit zehn Millilitern TRIS-HCL (0,1 M) für zehn Minuten verrührt (im Dunkeln!) und steril filtriert. An den Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 11, 14, 18 und 21 wurden Bilder aufgenommen. Hierfür wurden die Glasbodenschalen mit sterilem PBS⁻ gewaschen, ein Milliliter der Gebrauchslösung hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Schalen gewaschen und mikroskopiert.

Um die Aktivität der Alkalischen Phosphatase kolorimetrisch zu bestimmen, wurden beide Zelllinien auch auf 96-Well-Platten ausgesät. Parallel wurden Triplikate zur Zellzahlbestimmung und für die Mediumkontrolle ausgesät. Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, die Zellen für die Zellzahlbestimmung abgelöst und gezählt. Die Zellen für die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurden mit der NBT/BCIP-Gebrauchslösung für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells gewaschen und mit 200 µl DMF für drei Stunden auf einem Horizontalrüttler inkubiert. Danach wurde die Absorption mit einem ELISA-Reader (560 nm) bestimmt.

Parallel zum Versuch wurde eine Eichreihe mit Diformazan durchgeführt. Die Menge an gebildeten Diformazan wurde auf die Zellzahl (50 000) bezogen.

2.9.1.2 Karyotyping

Beide Zelllinien wurden für diesen Versuch in Zellkulturflaschen (siehe Punkt 2.3.1.2.1) angezogen. Nach vier Tagen erreichten die Monolayer Konfluenz. Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und für fünf Stunden mit zwei Millilitern Colchizin (0,06 ng/ml in DMEM/5% FCS) inkubiert (39°C, 5%CO₂). Im Anschluss wurden beide Zelllinien gewaschen und mit Trypsin/EDTA (10 min für IPEC-1; 20 min für IPEC-J2) bei 39°C inkubiert, um die Zellen von ihrem Untergrund zu lösen. Die Zellzahl beider Zelllinien wurde bestimmt und die gewonnenen Zellen wurden in hypotonische KCL-Lösung (71 mM) mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit einer Methanol-Essig-Lösung (Verhältnis 3:1) fixiert und Zytospots (siehe Anhang; Anleitung) angefertigt. Die Präparate wurden mit einer Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau) angefärbt, um die Chromosomen sichtbar zu machen. Die Färbung erfolgte nach *Lennart* (Hagemann und Rosenmund, 1989).

2.9.1.3 Nachweis von Gap Junctions mittels Lucifer Yellow

Die direkte Kommunikation von Zellen untereinander wird durch verschiedene Proteinkomplexe wie Tight Junctions, Desmosome, Zelladhäsionsmoleküle und Gap Junctions ermöglicht (Söhl and Willecke, 2004). Gap Junctions sind kanalbildende Proteinkomplexe, welche zwei benachbarte, zytoplasmatische Kompartimente direkt miteinander verbinden (El-Fouly et al., 1987). Je nach der Proteinzusammensetzung der Kanäle kann ein gerichteter oder ungerichteter Transport von Molekülen erzielt werden (Söhl and Willecke, 2004). Der Scratch-Assay ist eine einfache, gut entwickelte Methode, um die Migration von Zellen zu untersuchen (Liang et al., 2007). Jedoch kann dieses Protokoll auch für den Nachweis von Gap Junctions genutzt werden (Wong et al., 2004). Die Markierung von Zellen mit Lucifer Yellow wurde im Jahre 1978 entwickelt (Stewart, 1978). Für die Stammlösung wurde Lucifer Yellow (CH *dipotassium salt*) in HBSS⁺ (1 mg/ml) aufgenommen. Die Gebrauchslösung von 0,05% wurde mit HBSS⁺ hergestellt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf Glasbodenschalen ausgesät.

Für den Nachweis der Gap Junctions wurde mit einer Skalpellklinge ein Schnitt in der Mitte des Monolayers durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit der Lucifer Yellow-Lösung inkubiert und mikroskopiert.

2.9.2 Immunhistochemie

2.9.2.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen beziehungsweise Gefrierschnitte wurden zuerst mit Ethanol für 30 Minuten bei 4°C und im Anschluss mit Aceton für drei Minuten fixiert. Die Proben wurden gewaschen und mit NGS (1:100) blockiert. Es wurden verschiedene Antikörperkombinationen verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit dem primären Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur versetzt. Im Anschluss wurden die Proben dreimal gewaschen und mit einer 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Lösung (1:10, DAPI) inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte ein dreimaliges Waschen der Proben und danach ein Eindecken mit Deckgläsern. Bei allen Immunfluoreszenzfärbungen wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen der primäre Antikörper durch Puffer ersetzt wurde (= sekundäre Antikörperkontrolle). Diese wurden durchgeführt, um mögliche, unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers ausschließen zu können.

2.9.2.2 Nachweis der Proliferation mittels BrdU-Einbau

Bromdesoxyuridin ist ein chemisches Analogon zu Thymidin. Durch dieses Analogon kann im intakten Gewebe der Anteil an proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Das BrdU wird von den Zellen aufgenommen und in phosphorylierter Form anstelle des Desoxythymidintriphosphat in die neu synthetisierte DNA eingebaut (Internetseite b). Für den Nachweis der proliferierenden Zellen wurden beide Zelllinien auf verschiedenen Untergründen (impermeabler Untergrund, permeabler Untergrund, ALI-Kultur) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit BrdU für sechs Stunden bei 39°C inkubiert und dann fixiert (siehe Anhang). Die Membranen wurden aus den Inserts geschnitten. Im nächsten Schritt wurden die Zellen gewaschen (TBS/0,05% Tween, siehe Anhang) und mit 1%-igen Ziegen Serum (NGS) für zehn Minuten blockiert.

Danach folgte eine Behandlung mit 2 M HCL bei 37°C für 30 Minuten und zweimal eine Neutralisation mit 0,1 M Natriumborat (pH 8,5) für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Als Nächstes wurde ein Spülschritt mit TBS/0,05%Tween für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primären anti-BrdU Antikörper (monoklonal, 1:100) für 30 Minuten. Für die weitere Inkubation wurde ein Biotin-gekoppelter sekundärer Antikörper (goat anti-mouse IgG1, 1:50; 30 min) verwendet. Danach wurde ein ABC-Reagenz eingesetzt für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Diaminobenzidin-Lösung (DAB, in 0,1 M PBS, 0,015% H₂O₂ frisch zugesetzt) wurde für eine Minute auf den Zellen belassen und im Anschluss mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die BrdU-positiven (braun) und BrdU-negativen (blau) Zellen wurden manuell mit dem Programm Image J ausgezählt.

2.9.3 Elektronenmikroskopie

Die Präparation für die Elektronenmikroskopie begann mit der Nachfixierung der unterschiedlich kultivierten Zellen. Hierfür wurden die Zellen in einer Lösung aus 0,5% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd (in 0,1 M PB; pH 7,4) über Nacht inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit 0,1 M PB. Danach wurden die Zellen ausgeschnitten und in Phosphatpuffer gelagert. Des Weiteren beinhaltete das Protokoll eine Behandlung mit Osmiumtetroxid (1% in 0,1 M PB) für eine Stunde. Im nächsten Schritt wurden die Proben gewaschen, dehydriert (50%-100% Ethanol) und für eine Stunde mit 1%-iger Uranylazetat-Lösung (in 70% Ethanol) inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen zwischen zwei Folien mit Durcupan ACM flach eingebettet. Die Durchführung der Polymerisation ereignete sich innerhalb von zwei Tagen bei 70°C im Ofen. Die zu untersuchenden Regionen wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und vertikal auf ein Resinblöckchen, welches eine Rille enthielt, geklebt. Mit Hilfe eines Ultracut S Ultramicrotome erfolgte die Anfertigung der Semidünnschnitte (1 µm), welche mit Toluidin-Blau angefärbt wurden. Diese Semidünnschnitte wurden für lichtmikroskopische Untersuchungen benutzt (Messung der Schichtdicke). Die Ultradünnschnitte (50-70 µm) wurden auf Formvarbeschichteten Grids gesammelt, mit Uranylazetat (2 g/100ml) und Citrat (0,1 g/100ml) nachkontrastiert und im Anschluss mit einem LEO 906 E Elektronenmikroskop ausgewertet. Die hier vorliegenden Bilder repräsentieren fünf unabhängige Experimente.

2.9.4 Konfokale Mikroskopie

IPEC-1 beziehungsweise IPEC-J2 wurden auf permeablem Untergrund nach Standardprotokoll und nach dem ALI-Protokoll (FCS-frei) auf 24-Well-Membranen herangezogen und fixiert. Die Untersuchung der Differenzierung erfolgte durch das Protein Villin. Die Membranen wurden mit einem anti-Villin Antikörper (beschrieben in 2.9.2.1) gefärbt und die Verteilung und Lokalisation mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht.

Für die funktionelle Untersuchung der konventionellen und der ALI-Kulturen wurden die Membranen mit BSA-DyLight inkubiert. Hierfür wurden die Zellen vor der Fixierung mit 50 µl BSA-DyLight (apikal) und 200 µl FCS-freiem Medium (basal) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss fixiert, mit DAPI (1:10, 5 Minuten) gefärbt und mit Vectashield versehen und zwischen zwei Deckgläsern eingelegt.

Die Villin-Verteilung und das aufgenommene BSA-DyLight wurde mittels eines Leica SP2 konfokalen Mikroskopes ausgewertet. Die Detektion der dreidimensionalen Verteilung wurde nach der orthogonalen Projektion der optischen Schnitte mittels Image J visualisiert. Die gezeigten Bilder repräsentieren fünf unabhängige Experimente. Mehrere Ausschnitte wurden pro Membran untersucht.

2.10 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS 15 verwendet. In den Abbildungen sind die Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) dargestellt. Bei dem Vergleich der Zelllinien wurde der T-Test angewendet. Bei dem Vergleich der verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurde eine ANOVA in Kombination mit dem Dunnett-Test gerechnet. Dies trifft auch auf die Untersuchung bei dem Toxin DON in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlicher Inkubationsdauer zu ($p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$).

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie und Marker der intestinalen Barriere *in vivo*

3.1.1 Morphologie der intestinalen Epithelzellen

Die untersuchten Enterozyten des Zottenepithels des Schweins zeigten sich hochprismatisch und wiesen einen ausgeprägten Bürstensaum (Abb. 4 und 6) auf. Ihre Zellkerne befanden sich im basalen Teil der Zelle. Das Zytoplasma war relativ hell und kontrastarm. Im Zytoplasma befanden sich zahlreiche Mitochondrien, ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat und rauhes endoplasmatisches Retikulum. Die benachbarten Enterozyten waren im apikalen Bereich durch Tight Junctions miteinander verbunden. Im zentralen und basalen Bereich kamen viele Desmosomen und Interdigitationen vor. Es konnten außerdem mittels Elektronenmikroskopie Becherzellen identifiziert werden (Abb. 5 und 7). Anhand HE-gefärbter Gefrierschnitte konnte die Schichtdicke des Epithels ermittelt werden. Diese betrug im Ileum $23,67 \pm 3,96 \mu\text{m}$ und im Jejunum $23,24 \pm 3,91 \mu\text{m}$ (Tab. 2). Gleichzeitig wurden diese gefärbten Schnitte dazu benutzt, die Anzahl der Zellen pro $10\,000 \mu\text{m}^2$ des Epithels zu bestimmen. Für das Ileum und Jejunum ergaben sich hieraus 170 und 146 Zellen pro $10\,000 \mu\text{m}^2$ des Epithels (Tab. 2). Für die Bestimmung der Zellfläche wurde eine Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Hierfür wurden die Zellgrenzen mit einem anti-ZO-1-Antikörper markiert und mittels des Programmes „AxioVision Rel. 4.8“ - Programmes vermessen. Die durchschnittliche Zellfläche betrug im Ileum $55 \mu\text{m}^2$ und im Jejunum $57 \mu\text{m}^2$. Die Zellkernfläche wurde mittels DAPI angefärbt und vermessen. Die Auswertung der Zellkernflächen ergab für das Ileum eine Größe von $39,94 \mu\text{m}^2$ und für das Jejunum $39,52 \mu\text{m}^2$.

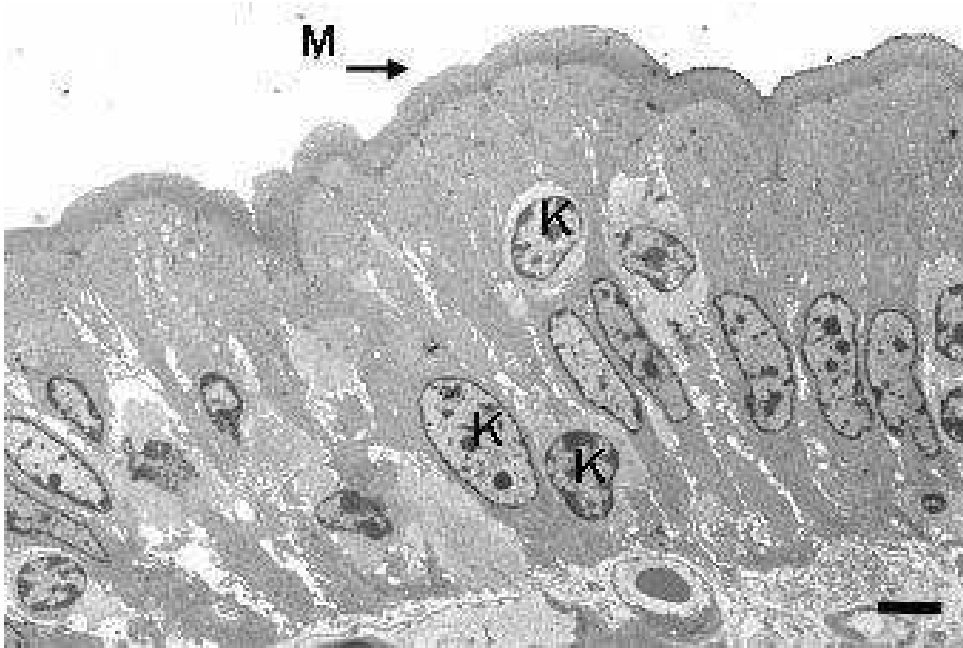


Abbildung 4: Enterozyten des Zottenepithels des Jejunums. Die intestinalen Epithelzellen im Bereich der Zotten zeigten eine hochprismatische Morphologie. Ihre Zellkerne (K) befanden sich unteren Bereich der Zellen. Ein gut entwickelter Mikrovillisaum (M) konnte detektiert werden. (Balken = 2 μm)

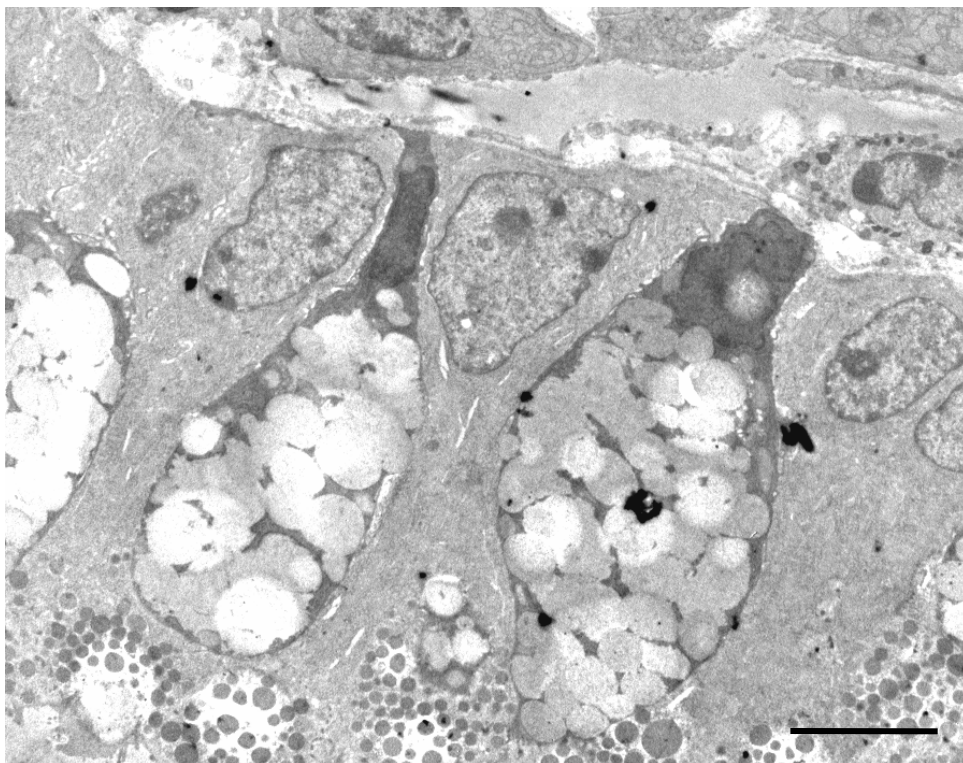


Abbildung 5: EM-Aufnahme einer Becherzelle im Jejunum. (Balken = 5 μm)



Abbildung 6: Enterozyten des Zottenepithels des Ileums. Die Enterozyten des Ileums zeigten sich hochprismatisch mit ovalen Zellkernen und einem gut entwickelten Mikrovillisaum (M). (Balken = 2 μm)

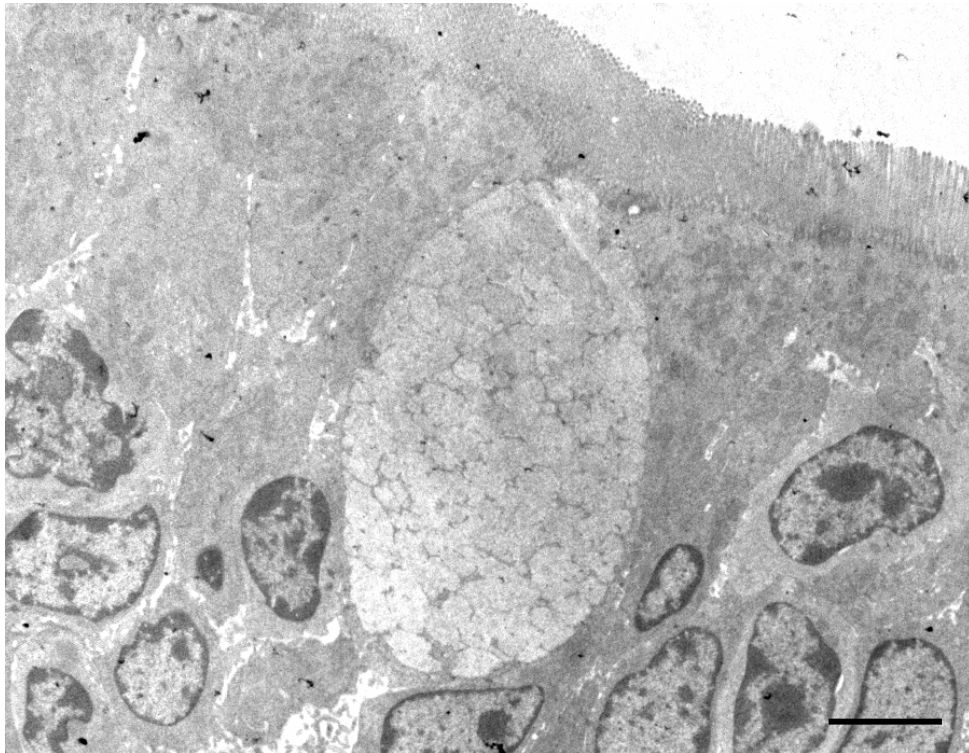


Abbildung 7: EM-Aufnahme einer Becherzelle im Ileum. (Balken = 5 μm)

	ILEUM/JEJUNUM	JEJUNUM
Anzahl der Zellkerne/10000 μm^2	169.76 \pm 73.81	146.29 \pm 79.31
Zellkernfläche [μm^2]	39.94 \pm 10.69	39.52 \pm 11.44
Zellfläche [μm^2]	55.1 \pm 25.44	56.63 \pm 26.41
Schichtdicke [μm]	23.67 \pm 3.96	23.24 \pm 3.91
Theoretisches Zellvolumen [μm^3]	622.86	619.98

Tabelle 2: Erhebung morphologischer Daten intestinaler Epithelzellen *in vivo*. Aus den erhaltenen Daten für die Zellfläche und der Schichtdicke der Epithelzellen wurde das theoretische Volumen eines Enterozyten *in vivo* berechnet. Als Grundform eines Enterozyten wurde der Zylinder zugrunde gelegt.

3.1.2 Aufbau und Merkmale der intestinalen Barriere

3.1.2.1 Epithelzellen

3.1.2.1.1 Charakterisierung auf mRNA-Ebene

Die mRNA wurde aus Proben verschiedener kompletter Darmabschnitte gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR konnte die Genexpression verschiedener Proteine der intestinalen Barriere wie Occludin (319 bp), ZO-1 (251 bp), SGLT-1 (705 bp), Villin (379 bp), β -Aktin (233 bp) und GAPDH (576 bp) nachgewiesen werden. Die Alkalische Phosphatase (ALP 302 bp) stellt ein wichtiges Enzym des Bürstensaumes dar und zeigte eine schwache Ausprägung (Abb.8).

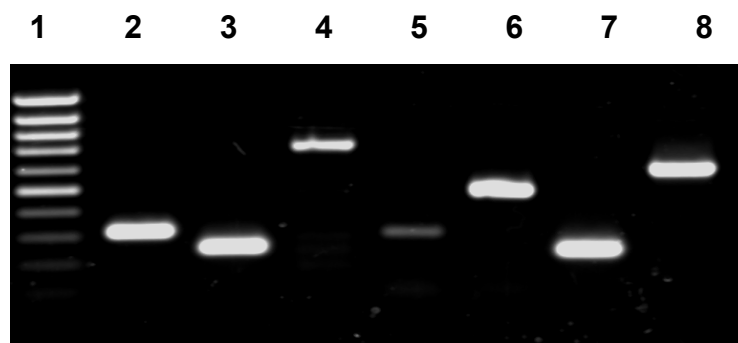


Abbildung 8: Jejunum - Charakterisierung auf mRNA-Ebene. Es wurden verschiedene Marker untersucht: 1) Marker, 2) Occludin, 3) ZO-1, 4) SGLT-1, 5) ALP, 6) VIL-1, 7) β -Aktin und 8) GAPDH.

3.1.2.1.2 Charakterisierung auf Proteinebene

Die einzelnen Epithelzellen waren durch zahlreiche Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden. Im apikalen Bereich konnten Tight Junctions (*Zonula adherens*) nachgewiesen werden. Diese bilden die sogenannte Schlussleiste. Zwei wichtige Proteine der *Zonula adherens* sind die Proteine ZO-1 und Occludin. Occludin stellt eines der vier wichtigen Transmembranproteine dar, besitzt eine hochkonservierte Sequenz und keine Gewebe-spezifischen Isoformen. ZO-1 hingegen ist ein Tight Junction-assoziiertes Phosphoprotein und interagiert unter anderem mit Occludin, JAM, Claudinen, ZO-2, ZO-3 und dem Aktin-Zytoskelett (Assimakopoulos et al., 2011). Beide Proteine konnten in den Darmabschnitten des Ileums und Jejunums von neugeborenen Schweinen detektiert werden (Abb. 9 und 11). Sie zeigten beide eine bandartige, homogene Struktur, welche um die Zellen zog. Eine gleichmäßige Verteilung des Proteins ZO-1 konnte entlang der Krypten-Zotten-Achse festgestellt werden. Occludin hingegen schien auf den Bereich der Krypten beschränkt zu sein. CK18 und Aktin sind zwei Strukturproteine, welche im Darmepithel präsent sind (Abb. 9 und 11). Im intestinalen Epithel konnten nur Einzelzellen mit einer CK18-Markierung beobachtet werden. Diese Zellen konnten aufgrund ihrer Form als Becherzellen identifiziert werden (Abb. 9 und 10). Sie waren sowohl im Epithel des Zotten- als auch des Kryptenbereiches zu finden. Aktin ist entlang der Krypten-Zotten-Achse detektierbar.

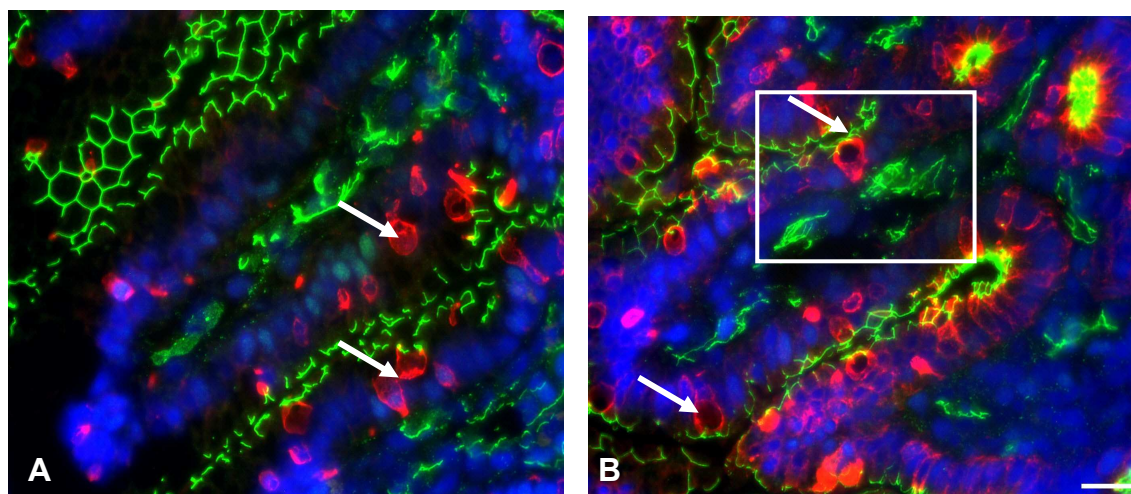


Abbildung 9: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem anti-ZO-1-Antikörper (grün) und dem anti-CK18-Antikörper (rot). Eine deutliche ZO-1-Färbung entlang der Krypten-Zotten-Achse war sowohl im Ileum (A) als auch im Jejunum (B) detektierbar. Eine CK18-Markierung konnte nur bei Einzelzellen beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um Becherzellen (Pfeil). Der markierte Ausschnitt (in B) ist in Abbildung 10 dargestellt (Balken = 20µm)

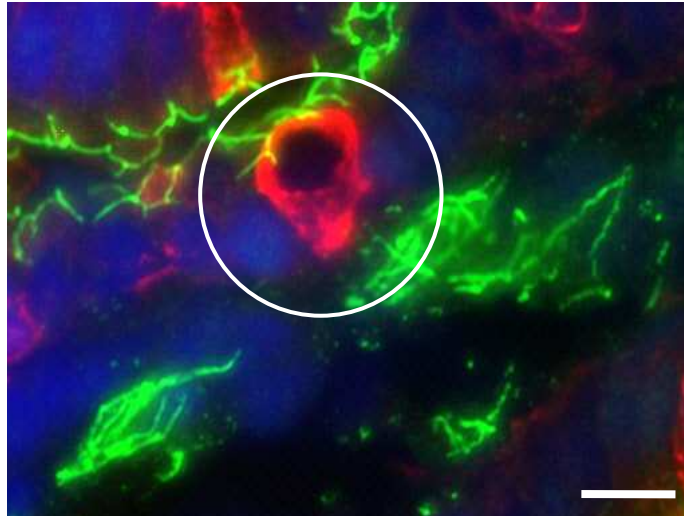


Abbildung 10: Darmausschnitt mit einer CK18-positiven Becherzelle. (Balken = 20 μm)

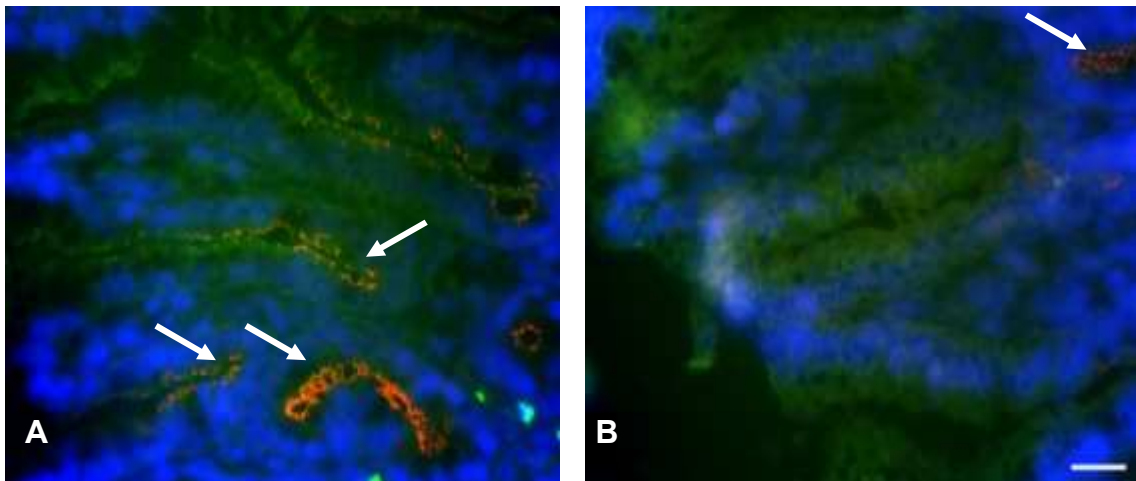


Abbildung 11: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit FITC-Phalloidin (grün) und dem anti-Occludin-Antikörper (rot). Eine deutliche Occludin-Färbung war sowohl im Ileum (A) als auch im Jejunum (B) in den Krypten (Pfeil) detektierbar. (Balken = 20 μm)

3.1.2.2 Dendritische Zellen

In den Gefrierschnitten der verschiedenen Darmabschnitte konnten dendritische Zellen durch eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem anti-MHCII- und dem anti-CD16-Antikörper markiert und detektiert werden (Abb. 12). Diese befanden sich unterhalb der Basalmembran. Es konnten keine doppelmarkierten Fortsätze der dendritischen Zellen zwischen den Epithelzellen des Ileums und Jejunums beobachtet werden.

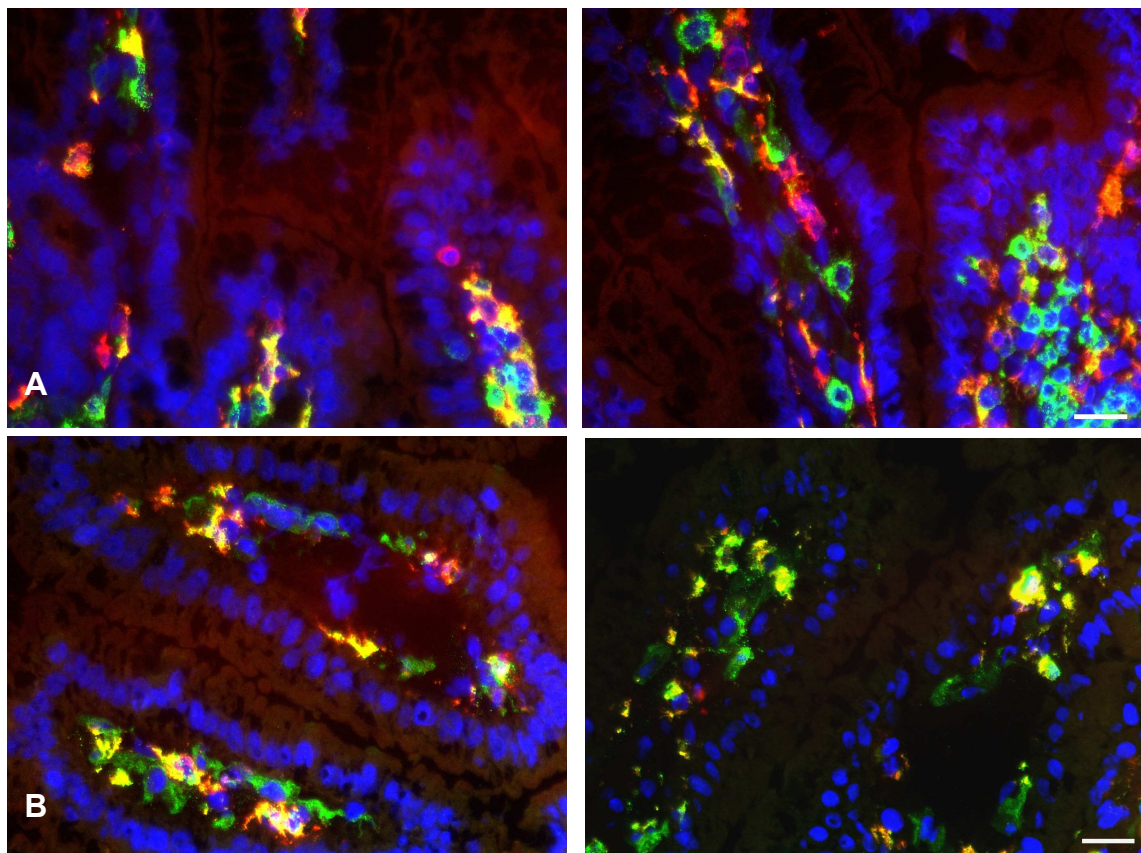


Abbildung 12: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem anti-MHCII- (grün) und dem anti-CD16-Antikörper (rot). Es wurden Kryoschnitte vom Ileum (A) und Jejunum (B) eines neugeborenen Schweines gefärbt. Es waren doppelt positive Zellen unterhalb der Basalmembran zu beobachten. (Balken = 20µm)

3.2 Isolation, Kultivierung und Charakterisierung von primären intestinalen Epithelzellen aus dem Schwein

3.2.1 Isolation von porcinen, primären intestinalen Epithelzellen

Es wurden für die Isolation von primären Epithelzellen verschiedene Protokolle getestet. Die Effizienz der unterschiedlichen Isolationsmethoden wurde durch die HE-Färbung von Gefrierschnitten der unbehandelten und behandelten Darmabschnitte beurteilt. Des Weiteren wurde die Anzahl der lebensfähigen als auch kultivierbaren primären Epithelzellen und die adhärenenten Zellen nach Aussaat derselbigen zur Beurteilung hinzugezogen. Das Protokoll eins (Gonzalez-Vallina et al., 1996) wurde durch die Invertierung des Darmes mit Hilfe eines Glasstabes modifiziert. Dieses bestehende Protokoll bildete die Grundlage für die Entstehung der Zelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 (Gonzalez-Vallina et al., 1996).

Die Protokolle zwei (Bjerknes and Cheng 1981) und drei (Flint et al. 1991) zeigten bei der Austestung nur eine geringe Menge an isolierten und adhärenenten Zellen nach der Aussaat. Dies konnte durch die HE-behandelten Gefrierschnitte des Jejunums und Ileums bestätigt werden (Abb. 13). Nur wenige Epithelzellen hatten sich nach der Behandlung im Vergleich zu Protokoll eins gelöst. Das Protokoll vier (Gliddon et al. 2008) stellt ursprünglich eine Technik für die Isolation von Epithelzellen aus dem Magen dar, wobei die übrigen getesteten Protokolle Techniken für die Isolation von intestinalen Epithelzellen waren (Abb. 14). Die primären Epithelzellen, welche nach Protokoll vier isoliert wurden, waren lebensfähig und adhärenierten an die Collagen I-beschichtete Oberfläche.

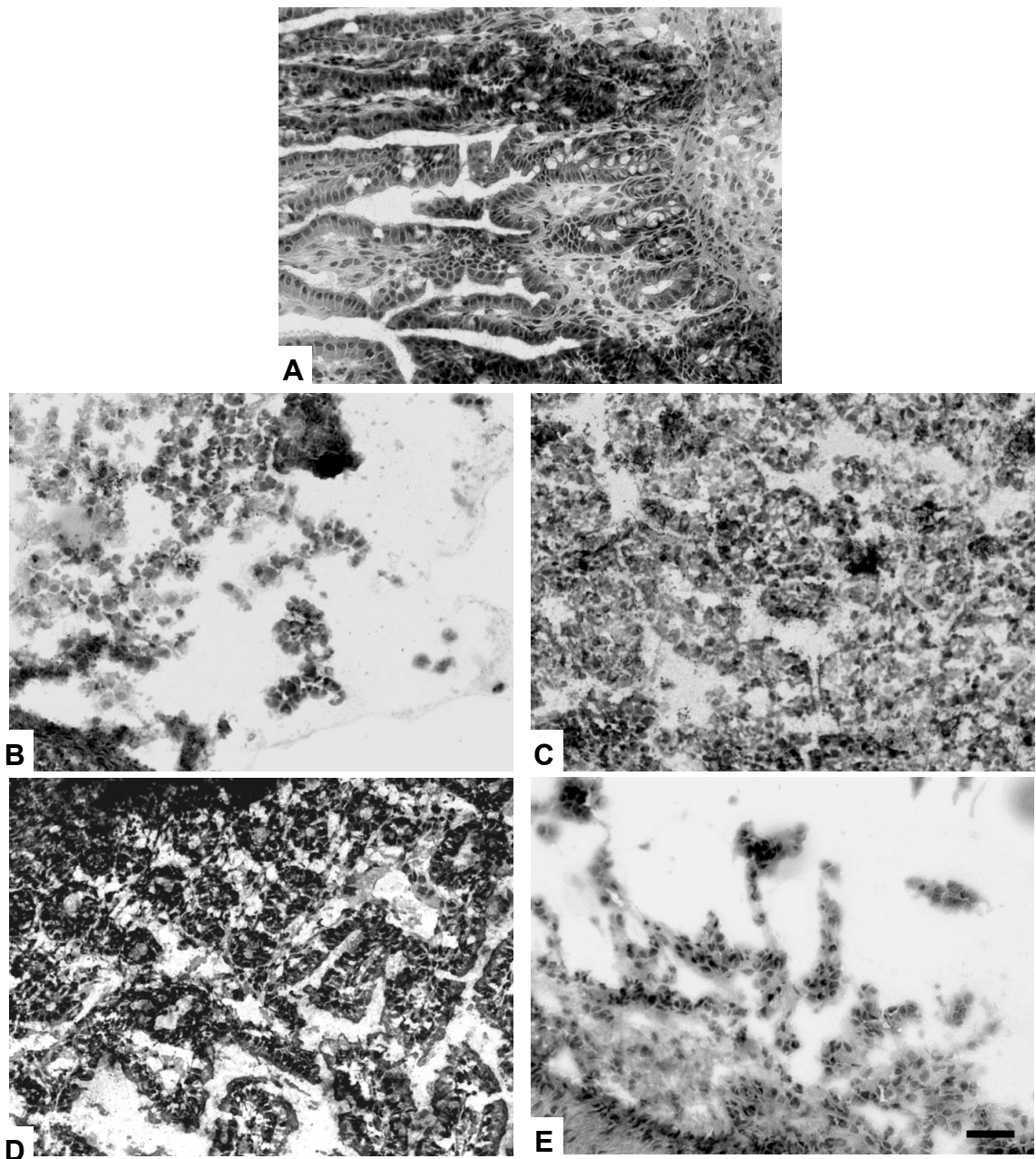


Abbildung 13: Isolation primärer jejunalen Epithelzellen. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Isolation primärer Epithelzellen an Abschnitten des Jejunums getestet. Die Effizienz der Isolation wurde durch eine HE-Färbung überprüft. Hierfür wurden Gefrierschnitte vor (A) und nach (B-E) der Isolation mit HE gefärbt. Vier verschiedene Protokolle wurden angewendet: B) Gonzalez-Vallina et al. (1996), C) Flint et al. (1991), D) Bjerknes & Cheng (1981) und E) Gliddon et al. (2008). Die Protokolle B) und E) zeigten bei der Auswertung der Gefrierschnitte eine Vielzahl an abgelösten Zellen. (Balken = 20µm)

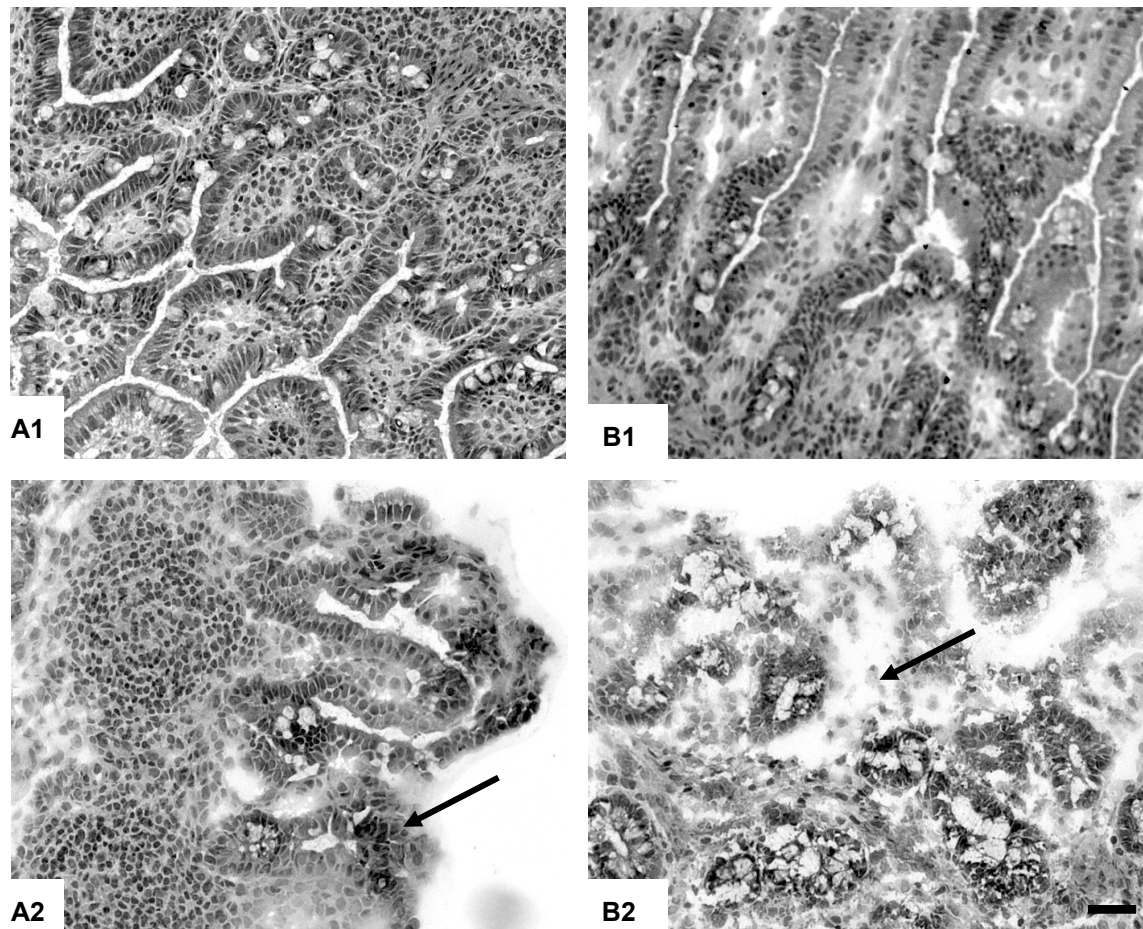


Abbildung 14: Isolation primärer Epithelzellen aus dem Ileum. Zwei verschiedene Methoden zur Isolation intestinaler Epithelzellen wurden an Abschnitten des Ileums getestet. Hierfür wurden die Gefrierschnitte vor (1) und nach (2) der Behandlung mit HE gefärbt, um die Effizienz der Protokolle beurteilen zu können. Beide Methoden, A) Gonzalez-Vallina et al. (1996) und B) Gliddon et al. (2008), zeigten bei der Lösung der ilealen Epithelzellen gute Ergebnisse (Pfeil). (Balken = 20 µm)

3.2.2 Kultivierung von primären Epithelzellen und Eliminierung von Fibroblasten

3.2.2.1 Kultivierung primärer Epithelzellen

Innerhalb von 30-60 Minuten konnten adhärenente Einzelzellen und Zellkolonien mit einer Größe von drei bis zu zehn Zellen beobachtet werden (Abb. 15). Bei dem Protokoll eins (Fraktion vier) konnten nach 24 Stunden durchschnittlich vier Kolonien mit einer Größe von zirka zehn jejunalen Zellen und 25 Kolonien mit einer Anzahl von ungefähr 29 ilealen Zellen detektiert werden (Tab. 3). Jedoch war die Kontamination von Fibroblasten in den primären Epithelzellkulturen, welche nach der Methode von Gliddon (2008) isoliert wurden, wesentlich höher im Vergleich zu den Kulturen, welche nach Protokoll eins isoliert wurden. Somit konnten die isolierten Zellen (Protokoll vier) nur bis zur Passage zwei kultiviert werden. Nach 24 Stunden konnten bei diesem Protokoll 17 Kolonien mit einer durchschnittlichen Größe von 60 jejunalen Zellen und zirka 14 Kolonien mit einer Größe von 172 ilealen Zellen detektiert werden (Tab. 4). Die besten Ergebnisse konnten mit Protokoll eins (Gonzalez-Vallina et al., 1996) und mit Protokoll vier (Gliddon et al., 2008) erzielt werden.

JEJUNUM	F1	F2	F3	F4
durchschnittliche Anzahl der Kolonien pro Schale	0,1	1,4	1	4,2
durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Kolonie	1	2,4	5,5	9,6
ILEUM				
durchschnittliche Anzahl der Kolonien pro Schale	0	0	6,5	25
durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Kolonie	0	0	29	29

Tabelle 3: Isolation primärer Epithelzellen nach dem Protokoll von Gonzalez-Vallina et al. (1996) – Bestimmung der Effektivität anhand der Anzahl der Kolonien und der Koloniegröße. Die vier verschiedenen Fraktionen wurden auf Collagen I-beschichteten Schalen ausgesät und kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die durchschnittliche Anzahl der adhärenenten Kolonien und die mittlere Anzahl der Zellen pro Kolonie bestimmt. Die Fraktion vier zeigte die größte Anzahl an Kolonien und die größte Anzahl an Zellen pro Kolonie.

	JEJUNUM	ILEUM
durchschnittliche Anzahl der Kolonien pro Schale	17	14
durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Kolonie	60	172

Tabelle 4: Isolation primärer Epithelzellen nach dem Protokoll von Gliddon et al. (2008) – Bestimmung der Effektivität anhand der Anzahl der Kolonien und der Koloniegröße. Die Zellen aus dem Ileum zeigten eine ähnliche Anzahl an Kolonien pro Schale, verglichen mit den Werten für das Jejunum. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die adhärennten Kolonien aus dem Ileum mehr Zellen beinhalteten als die Kolonien, die von jejunalen Zellen gebildet wurden.

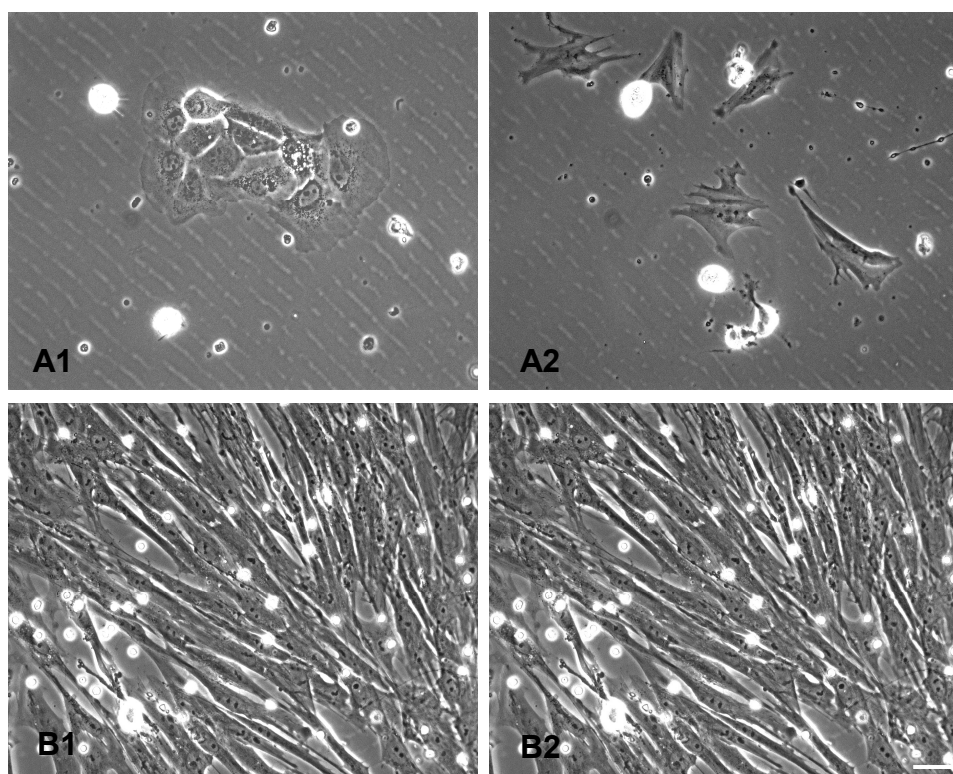


Abbildung 15: Kultivierung primärer intestinaler Epithelzellen. Die isolierten Zellen wurden auf Collagen I-beschichteten Schalen ausgesät. Die Verunreinigung mit Fibroblasten war wesentlich höher beim vierten Protokoll (Gliddon et al., 2008, B) als beim ersten Protokoll (Gonzalez-Vallina et al., 1996, A). (Balken = 20µm)

3.2.2.2 Eliminierung von Fibroblasten

Es wurden verschiedene Möglichkeiten herangezogen, um die Verunreinigung mit Fibroblasten zu verringern.

Abnahme der Überstände

Aufgrund der Tatsache, dass Epithelzellen und Fibroblasten ein unterschiedliches Adhärenzvermögen besitzen, wurden die primären intestinalen Epithelzellen ausgesät und in unterschiedlichen Abständen wurden die Überstände abgenommen und neu ausgesät. Die Zeiträume betragen 30, 60, 120, 120 und 180 Minuten. Nach der ersten Passage konnte keine Verbesserung beobachtet werden, da es durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA zu einer drastischen Zunahme an Fibroblasten kam.

Entfernung der Fibroblasten-Kolonien

Eine weitere Möglichkeit die Anzahl an Fibroblasten zu reduzieren, ist das Herauspräparieren der Fibroblastenkolonien. Mittels Mikroskop wurden die einzelnen, adhärennten Kolonien morphologisch beurteilt. Fibroblastenkolonien wurden mit Hilfe eines wasserfesten Stiftes markiert und im Anschluss mit einem Skalpell entfernt. Diese Methode ist jedoch nur vor der ersten Passage sinnvoll, da sich die in der Schale verbliebene Fibroblastenkolonien nach Kontakt mit Trypsin schnell vermehren und über die gesamte Schalengröße verteilen.

„Limited Dilution“

Zur Gewinnung einer reinen Zelllinie und der damit verbundenen Reduktion der Fibroblasten wurde „Limited Dilution“ angewendet. Hierfür wurde ein Teil der primären Epithelzellen ausgezählt und auf eine Konzentration von 20 Zellen/ml verdünnt. Im Anschluss wurden die primären intestinalen Epithelzellen in Collagen I-beschichteten 96-Well-Platten (80 Platten; pro Well 100 µl) ausgesät und herangezogen. Jedes einzelne Well wurde morphologisch zu unterschiedlichen Zeiten nach der Aussaat beurteilt. Diese Methode führte zwar zur Reduktion der Fibroblasten jedoch konnte kein Wachstum von einzelnen Epithelzellen in einem Well beobachtet werden.

3.2.3 Einsatz von Rho-Kinase-Inhibitor Y27632

Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 wurde benutzt, um die Lebensfähigkeit der isolierten Zellen zu erhöhen. Der Einsatz von Y27632 wurde zuerst mit dem Protokoll eins (Gonzalez-Vallina et al., 1996) getestet (Abb. 16). Ohne die Zugabe des Inhibitors starben die meisten Zellen innerhalb der ersten vier Tage. Mit dem Zusatz des Inhibitors konnte eine höhere Anzahl an adhärennten Zellen und eine höhere Lebensfähigkeit beobachtet werden, da die Zellen bis zur Passage vier kultiviert werden konnten. Die Morphologie der Epithelzellen veränderte sich jedoch nach Passage vier. Sie zeigten nicht mehr das typische Aussehen von Epithelzellen.

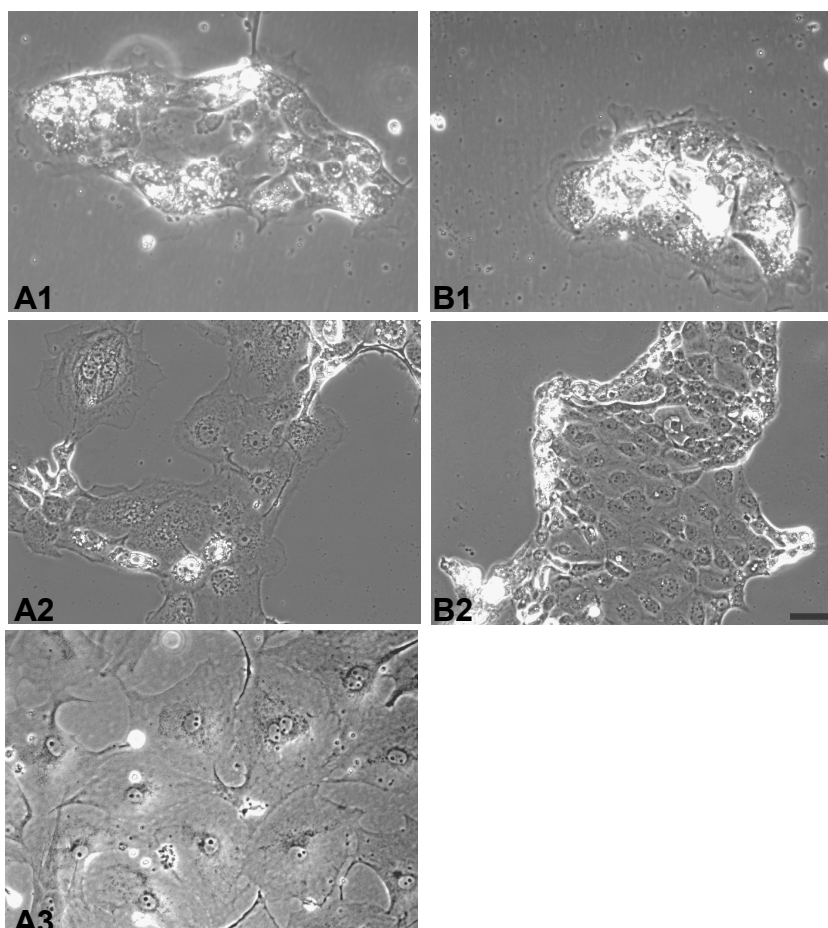


Abbildung 16: Einsatz von Y27632. Der Einsatz des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 wurde beim Jejunum (A) und Ileum (B) getestet. Isolierte Epithelzellen ohne den Inhibitor (1) zeigten einen hohen Anteil an apoptotischen Zellen. Durch den Einsatz an Y27632 (2) konnte eine höhere Viabilität und damit auch eine Erhöhung der Koloniengröße erzielt werden. Die mit dem Inhibitor behandelten Zellen konnten bis zur Passage vier kultiviert werden (A3). Nach der Passage vier verloren die Zellen ihr typisches Aussehen. (Balken = 20µm)

3.2.4 Charakterisierung von primären intestinalen Epithelzellen

3.2.4.1 Charakterisierung auf mRNA-Ebene

Die Primärkultur, welche eine Mischkultur aus Fibroblasten und Epithelzellen darstellte, wurde mittels PCR-Analyse untersucht. Es konnte ein deutliches Signal bei ZO-1, SGLT-1, Aktin und GAPDH beobachtet werden. Ein schwaches aber dennoch sichtbares Signal war bei Occludin, ALP (Alkalische Phosphatase) und VIL-1 (Villin) zu verzeichnen.

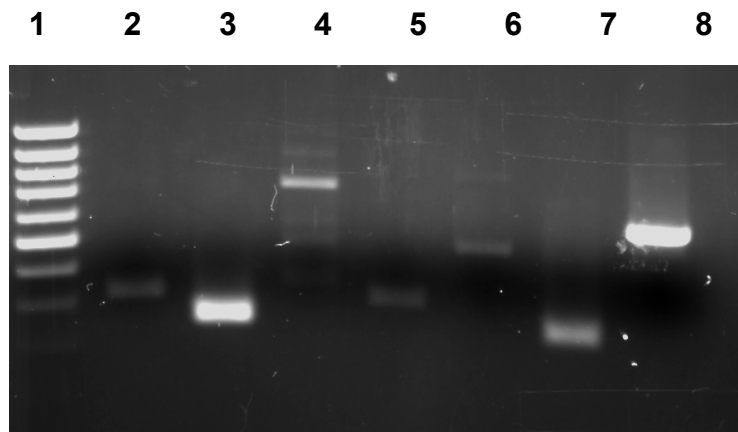


Abbildung 17: Charakterisierung der Primärkulturen des Jejunums auf mRNA-Ebene. Es wurden verschiedene Marker untersucht: 1) Marker, 2) Occludin, 3) ZO-1, 4) SGLT-1, 5) ALP, 6) VIL-1, 7) Aktin und 8) GAPDH.

3.2.4.2 Charakterisierung auf Proteinebene

Tight Junctions

Die primären isolierten Zellen aus dem Ileum und Jejunum wurden auf beschichteten Glasbodenschalen ausgesät. Die Zellen wurden nach vier Tagen der Kultivierung fixiert. Die adhärennten Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern markiert (Abb. 18 und 19). ZO-1 und Occludin, zwei wichtige Marker der Tight Junctions, wurden sowohl in den primären Zellen des Jejunums als auch in den Zellen des Ileums nachgewiesen. Beide Proteine zeigten eine spezifische Lokalisation als Band, welches um die Zellen zieht.

Strukturproteine

Es wurden jejunale und ileale, primäre Epithelzellen ausgesät, fixiert und im Anschluss mit verschiedenen Antikörpern markiert. Zum Nachweis von Strukturproteinen wurde anti-CK18-Antikörper und FITC-Phalloidin verwendet (Abb. 18 und 19). Sowohl jejunale als auch ileale, primäre Epithelzellen zeigten eine starke CK18-Markierung. FITC-Phalloidin wurde zur Detektion von Aktin benutzt. Auch hier zeigten beide Zelltypen eine starke Markierung der Zellen für Aktin.

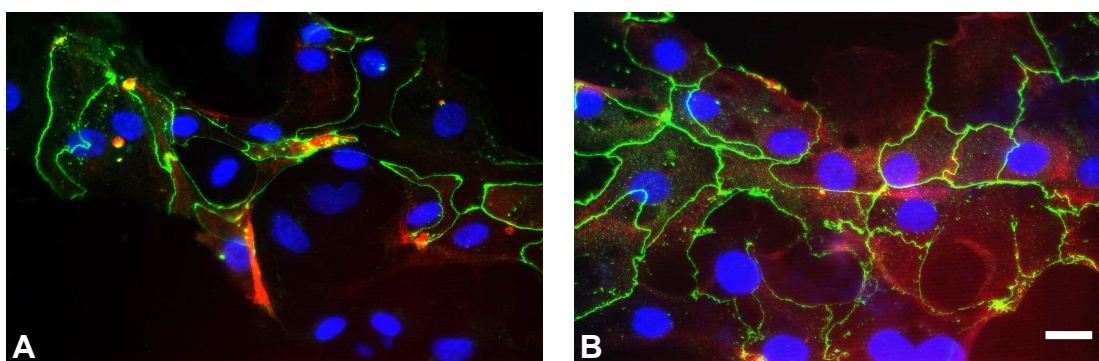


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von primären intestinalen Epithelzellen mit dem anti-ZO-1- und dem anti-CK18-Antikörper. ZO-1 ist ein wichtiges Protein der Tight Junctions und konnte mittels anti-ZO-1-Antikörper (grün) in jejunalen (A) und ilealen (B) primären Epithelzellen detektiert werden. ZO-1 stellte sich als ein Band, welches sich um die Zelle legt, dar. Sowohl jejunale als auch ileale, primäre Epithelzellen zeigten eine CK18-Färbung (rot). (Balken = 20µm)

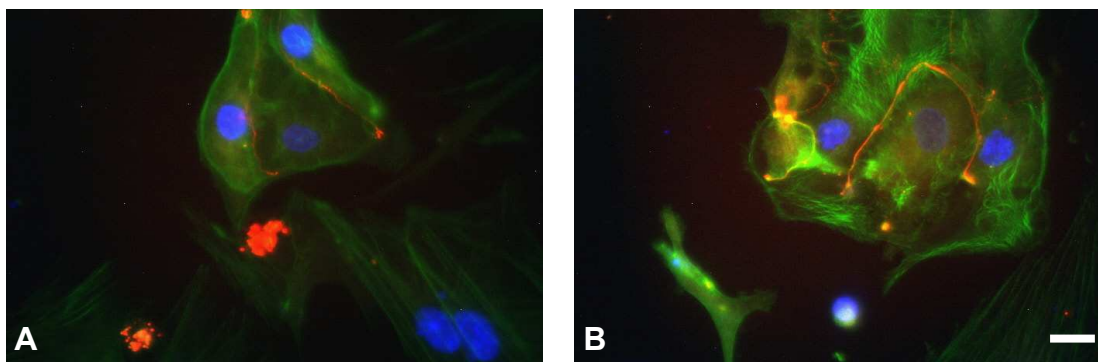


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von primären intestinalen Epithelzellen mit dem anti-Occludin-Antikörper und FITC-Phalloidin. Occludin ist ein wichtiges Protein der Tight Junctions und konnte mittels anti-Occludin (rot) in jejunalen (A) und ilealen (B) primären Epithelzellen detektiert werden. Es zog sich wie ein Band um die Zellen. Aktin wurde mit Hilfe von FITC-Phalloidin (grün) markiert. Beide Zellentypen zeigten eine starke Aktin-Anfärbung. (Balken = 20µm)

3.3 Charakterisierung zweier Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2

3.3.1 IPEC-1 und IPEC-J2 – zwei Tumorzelllinien?

3.3.1.1 Generationszeiten

Beide Zelllinien wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Zellzahl bestimmt (Abb. 20). Die ermittelte Zellzahl für zwei Stunden wurde als Ausgangswert (N_0) benutzt. Dieser Wert entspricht der tatsächlichen Anzahl an Zellen, die an der Oberfläche anhaften. Bei IPEC-1 waren 60% ($0,729 \cdot 10^5$ Zellen/ml) der Zellen nach der Aussaat in der Lage an der Oberfläche der Platte zu adhären. Im Falle von IPEC-J2 adhärten nur 36% ($0,36 \cdot 10^5$ Zellen/ml) der Zellen an der Oberfläche der Zellkulturplatte. Die Generationszeiten wurden in der Log-Phase zum Zeitpunkt 48 Stunden bestimmt. IPEC-1 benötigte für eine Verdoppelung 18,32 Stunden. IPEC-J2 zeigte eine Generationszeit von 19,26 Stunden. Als Kontrolle wurde die Verdoppelungszeit der Zelllinie Caco-2 ermittelt. Diese betrug 20,53 Stunden. Caco-2 zeigte ein Adhärenzvermögen von 36% der ausgesäten Zellen.

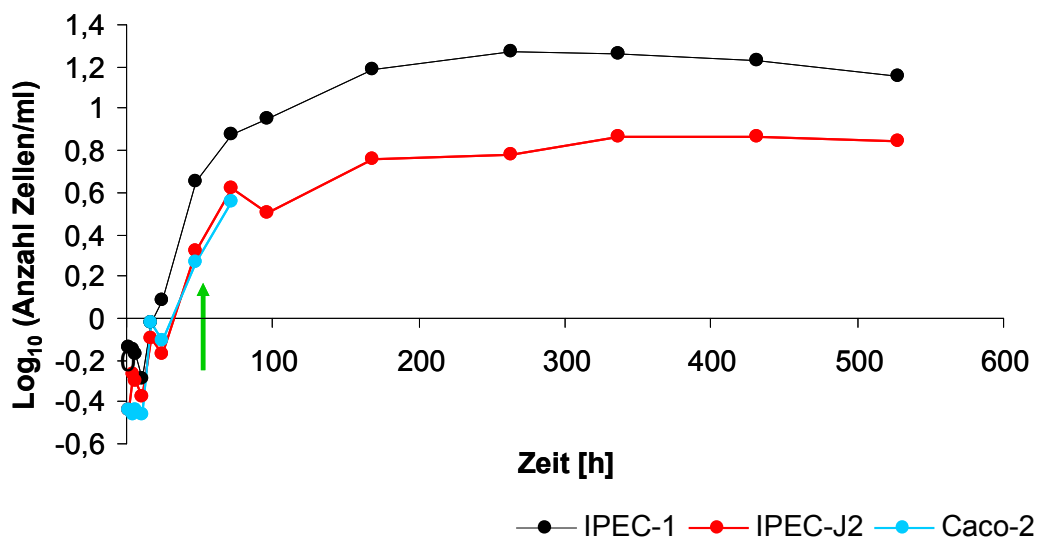


Abbildung 20: Generationszeiten von IPEC-1 und IPEC-J2. Die Generationszeiten wurden innerhalb der Log-Phase (Zeitpunkt: 48 Stunden, grüner Pfeil) bestimmt. Die Generationszeiten betragen 18,32 Stunden (IPEC-1), 19,26 Stunden (IPEC-J2) und 20,53 (Caco-2).

3.3.1.2 Schwellenwert bei der Aussaat

Der Schwellenwert entspricht der Mindestanzahl von Zellen, welche ausgesät werden müssen, um einen konfluenten Monolayer zu erhalten. Hierfür wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen Gesamtzellzahlen ausgesät (Abb. 21). IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten bei niedrigen Gesamtzellzahlen von 10, 100 und 1000 kein Wachstum der ausgesäten Zellen. Nach 24 Stunden konnten adhärenente Einzelzellen beziehungsweise Kolonien mit einer Größe von drei bis fünf Zellen bei niedrigen Zellzahlen (10, 100 und 1000) beobachtet werden. Bei hohen Zellzahlen (10 000, 30 000 und 60 000) zeigten beide Zelllinien Kolonien mit einer Größe von 5-30 Zellen. Nach der Kulturzeit von sieben Tagen konnten keine adhärenente Zellen bei einer Größenordnung von zehn Zellen pro Well beobachtet werden. Bei den Gesamtzellzahlen von 100 und 1000 konnte kein detektierbares Wachstum innerhalb der sieben Tage belegt werden. Es konnten weiterhin nur Einzelzellen und Kolonien mit einer Größe von drei bis fünf Zellen nachgewiesen werden. Bei hohen Zellzahlen von 10 000, 30 000 und 60 000 war ein konfluenten Monolayer zu beobachten.

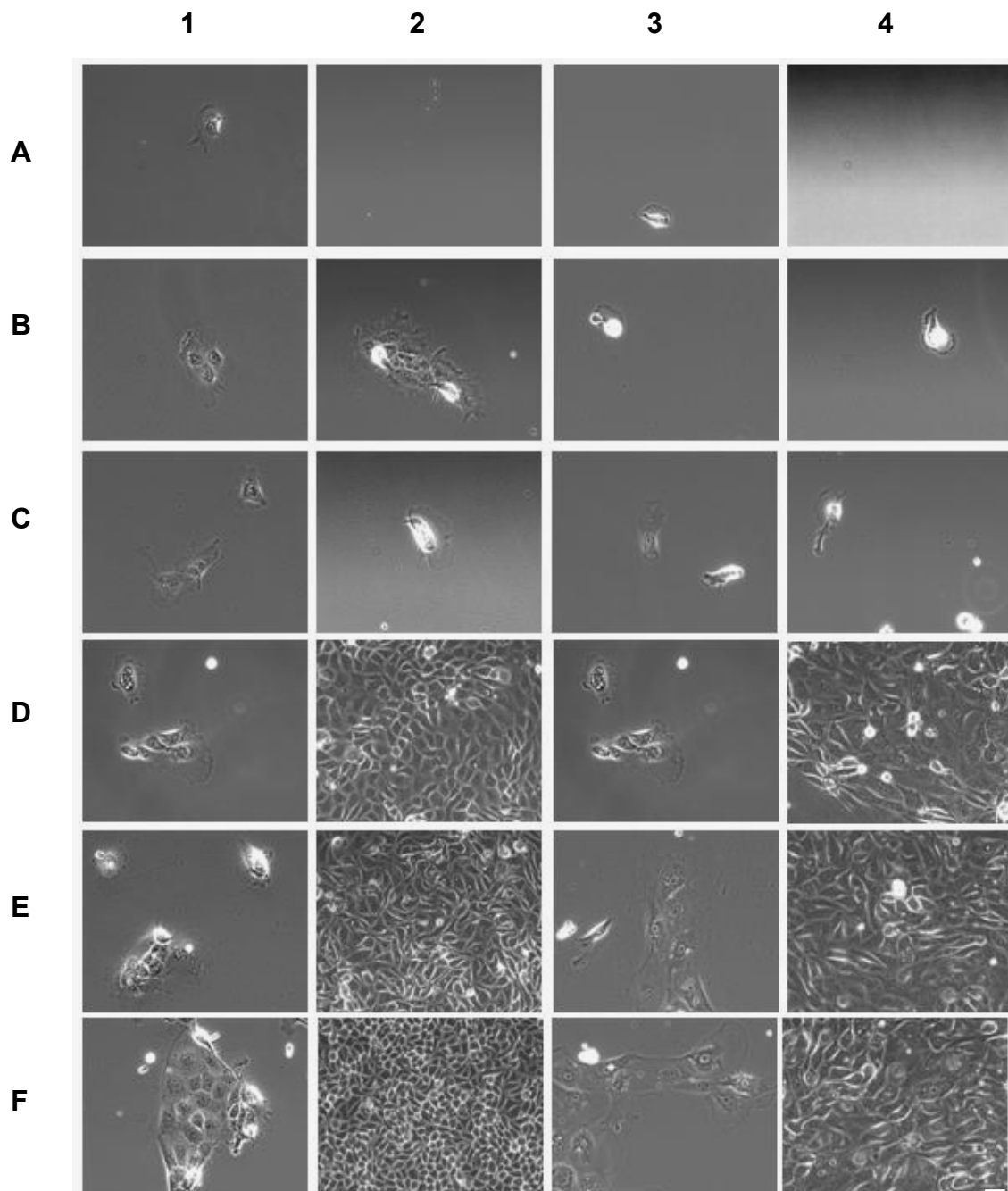


Abbildung 21: Ermittlung des Schwellenwertes bei der Aussaat beider Zelllinien. Es wurden unterschiedliche Gesamtzellzahlen ausgesät: A) 10, B) 100, C) 1000, D) 10 000, E) 30 000 und F) 60 000. IPEC-1 wurde nach 24 Stunden (1) und nach sieben Tagen (2) mikroskopiert. Bei den Gesamtzellzahlen 10, 100 und 1000 war sowohl nach 24 Stunden als auch nach sieben Tagen kein konfluenten Monolayer zu beobachten. Beide Zelllinien zeigten nach sieben Tagen (2 und 4) keine adhärenente Zellen. Bei IPEC-J2 wurden nach 24 Stunden (3) bei den niedrigen Konzentrationen (10, 100 und 1000) einzelne adhärenente Zellen gefunden. Nach sieben Tagen (4) konnte ein konfluenten Monolayer bei den Schwellenwerten 10 000, 30 000 und 60 000 detektiert werden. (Balken = 20µm)

3.3.1.4 Bestimmung der Chromosomenzahl als Hinweis auf eine Tumorzelllinie

Für die Bestimmung der Chromosomenzahlen wurden die Zellen mit Colchizin inkubiert, fixiert und auf einem Objektträger zentrifugiert. Im Anschluss wurden die erhaltenen Proben mit einer Giemsa-Lösung angefärbt (Abb. 23). Danach wurden die Objektträger mikroskopiert und die Chromosomen ausgezählt. Es konnte bei IPEC-1- und IPEC-J2-Zellen eine Chromosomenzahl von 44 bestimmt werden. Die Zelllinie Caco-2 zeigte eine Chromosomenzahl von 88 und ist beispielhaft in Abbildung 23 dargestellt.



Abbildung 23: Karyotyping. Beispielhaft ist hier eine Vergrößerung der Aufnahme von Caco-2 dargestellt (Axioplan2, Ölimmersion, 100x, Spotadvanced; Farbkamera)

3.3.2 Morphologische Daten

Für die Untersuchung der Morphologie der kultivierten Zellen wurden verschiedene Methoden herangezogen. Die Zellgrenzen konnten mittels einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 dargestellt werden. Somit konnte die Anzahl der Zellen/10 000 μm^2 und die flächenmäßige Ausdehnung der Zellen bestimmt werden (Tab. 5). Es ergaben sich bei IPEC-1 $16,98 \pm 2,41$ und bei IPEC-J2 $8,58 \pm 2,45$ Zellen/10 000 μm^2 . Dieser Unterschied in der Anzahl der Zellen pro Fläche konnte durch die Bestimmung der flächenmäßigen Ausdehnung der Zellen erklärt werden. IPEC-J2 zeigte eine größere Fläche pro Zelle als IPEC-1 (IPEC-1: $683,35 \pm 571,36 \mu\text{m}^2$ und IPEC-J2: $1309,84 \pm 774,75 \mu\text{m}^2$). Diese Werte spiegelten sich auch in den Werten für die Fläche der Zellkerne wider. So konnte für IPEC-1 eine Größe des Zellkerns von $122,05 \pm 24,33 \mu\text{m}^2$ und für IPEC-J2 von $167,5 \pm 52,8 \mu\text{m}^2$ ermittelt werden. Eine Aussage über die Schichtdicke konnte mittels der Semidünnschnitte der Elektronenmikroskopie getroffen werden. Die Höhe des Monolayers bei IPEC-1 betrug $3,75 \pm 2,15 \mu\text{m}$ und bei IPEC-J2 $3,47 \pm 2,27 \mu\text{m}$. Aus den ermittelten Daten konnte das theoretische Zellvolumen berechnet werden (Tab. 5). Hierfür wurden verschiedene Annahmen getroffen. Bei den intestinalen Epithelzellen handelt es sich um hochprismatische Zellen, somit wurde als Grundform der Zellen der Zylinder gewählt. Mit Hilfe der Formel zur Volumenberechnung eines Zylinders ($V=\pi r^2 h$) konnte das theoretische Volumen der Zellen berechnet werden. Das Volumen einer IPEC-1-Zelle, welche auf impermeablem Untergrund herangezogen wurde, betrug $324,34 \mu\text{m}^3$. Das theoretische Volumen einer IPEC-J2-Zelle belief sich auf $445,2 \mu\text{m}^3$. Die Elektronenmikroskopie lieferte verschiedene Aufnahmen. Mit Hilfe dieser Bilder konnte die Morphologie der Zellen visuell beurteilt werden (Abb. 24). Es konnte bei beiden Zelllinien ein differenzierter Phänotyp mit apikalen Tight Junctions, Desmosomen und einem vorhandenen Bürstensaum beobachtet werden. Der Bürstensaum war bei IPEC-J2 im Vergleich zu IPEC-1 deutlich ausgeprägter. IPEC-1-Zellen zeigten nur vereinzelte, kurze Mikrovilli.

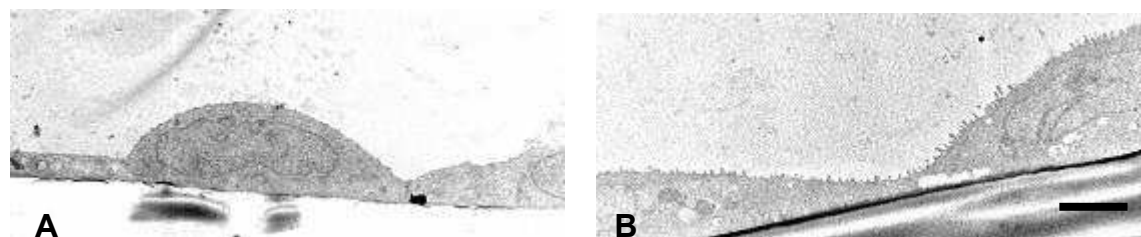


Abbildung 24: Kultivierung auf impermeablem Untergrund – Phänotyp (EM). Die Untersuchung des Phänotyps erfolgte mittels Elektronenmikroskopie. Beide Zelllinien, IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B), zeigten einen flachen, lang gestreckten Phänotyp. Ein ausgeprägter Bürstensaum konnte bei IPEC-J2 beobachtet werden. Wesentlich kürzere Mikrovilli waren bei IPEC-1 zu finden. (Balken = 5 μm)

	IPEC-1	IPEC-J2	SIGNIFIKANZ
Anzahl der Zellkerne/10000 μm^2	16.98 \pm 2.41	8.58 \pm 2.54	p \leq 0,001
Zellkernfläche [μm^2]	122.05 \pm 24.33	167.5 \pm 52.8	p \leq 0,001
Zellfläche [μm^2]	683.35 \pm 571.36	1309.84 \pm 774.75	p \leq 0,001
Schichtdicke [μm]	3.75 \pm 2.15	3.47 \pm 2.27	n.s.
Theoretisches Zellvolumen [μm^3]	324.34 \pm 8.13	445.2 \pm 14.87	---

Tabelle 5: Erhebung morphologischer Daten kultivierter Zellen auf impermeablem Untergrund. Beide Zelllinien zeigten eine Schichtdicke von zirka drei beziehungsweise vier Mikrometern. Aus den ermittelten Daten für die Schichtdicke und der Zellfläche wurde das theoretische Volumen der Zellen berechnet. IPEC-J2 zeigte ein deutlich höheres Volumen als IPEC-1.

3.3.3 Nachweis des Anteils an proliferierenden Zellen

Bromdesoxyuridin (BrdU) bietet als chemisches Analogon zu Thymidin beziehungsweise Desoxyuridin die Möglichkeit der Markierung proliferierender Zellen im intakten Gewebe oder in der Zellkultur. Die Auswertung bei der Kultivierung auf impermeablem Untergrund ergab zwischen beiden Zelllinien einen signifikanten Unterschied (Abb. 25; $p \leq 0,001$). IPEC-1 zeigte einen höheren Anteil (17%) an proliferierenden Zellen als IPEC-J2 (10%).

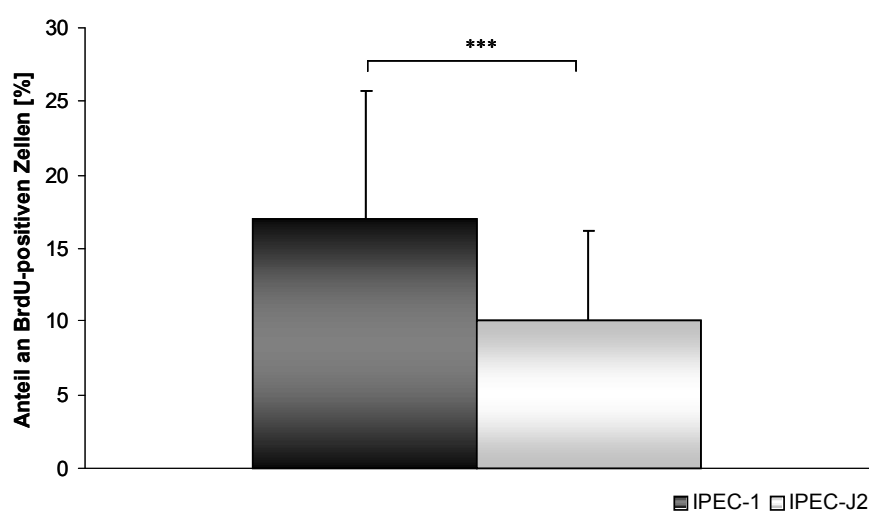


Abbildung 25: Impermeabler Untergrund - Anteil an proliferierenden Zellen. IPEC-1 (17%) zeigte einen signifikant höheren Anteil ($p \leq 0,001$) an proliferierenden Zellen als IPEC-J2 (10%).

3.3.4 Charakterisierung auf mRNA-Ebene

Mittels der PCR-Analyse wurden beide Zelllinien auf mRNA-Niveau untersucht (Abb. 26). In beiden Zelllinien konnten wichtige Marker der Tight Junctions wie Occludin, Claudin-4 und ZO-1 nachgewiesen werden. Eine schwache Bande wurde bei Claudin-3 in IPEC-1 detektiert. Zwei wichtige Proteine des Zytoskeletts sind CK18 und Aktin. Diese zeigten in der PCR ein deutliches Signal sowohl in IPEC-1 als auch in IPEC-J2. Die Marker des Bürstensaums Mucin-1, SGLT-1 und Villin-1 wiesen Unterschiede zwischen den Zelllinien auf. So konnte nur ein schwaches Villin- und SGLT-1-mRNA-Signal in IPEC-1 beobachtet werden.

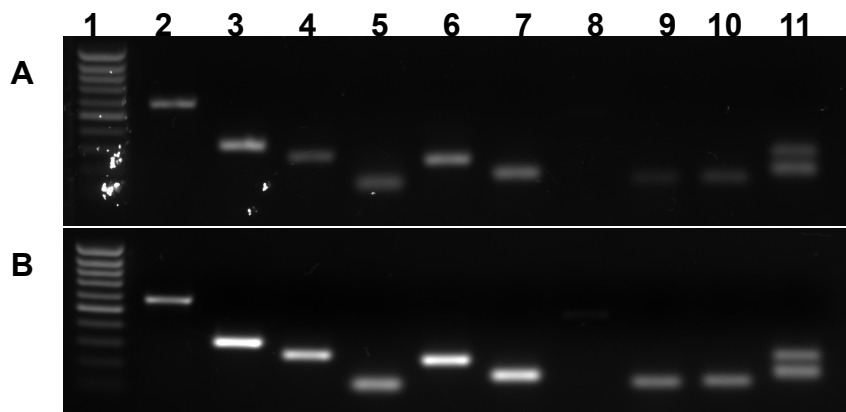


Abbildung 26: Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere in IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) auf mRNA-Ebene. Unterschiedliche Marker wurden auf mRNA-Ebene für beide Zelllinien nachgewiesen: 1) Marker, 2) GAPDH, 3) Occludin, 4) ZO-1, 5) CK18, 6) β -Aktin, 7) Mucin-1, 8) Villin-1, 9) SGLT-1, 10) Claudin-3 und 11) Claudin-4. In IPEC-1 und in IPEC-J2 konnte kein bzw. ein schwaches Signal der Villin-mRNA festgestellt werden. Des Weiteren zeigte IPEC-1 ein niedrigeres mRNA-Signal bezüglich SGLT-1 und Claudin-3.

3.3.5 Charakterisierung auf Proteinebene

Expressionsanalyse der Tight Junction- und Strukturproteine

Die Expressionsanalyse der Proteine erfolgte mittels Western Blot (Abb. 27). Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung (2, 7, 14 und 21 Tage) Proteinproben gewonnen und die Expression ZO-1, Occludin, Claudin-3 und Claudin-4 untersucht. In beiden Zelllinien konnten die Proteine nachgewiesen werden, wobei die Proteinmenge am zweiten Tag der Kultivierung (subkonfluenter Zellrasen) schwach war. Villin-1 konnte in IPEC-1 zu keinem Kultivierungszeitpunkt auf Proteinebene detektiert werden. Als Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Auch GAPDH zeigte am zweiten Tag der Kultivierung eine geringere Proteinmenge aufgrund der Subkonfluenz der Zellen.

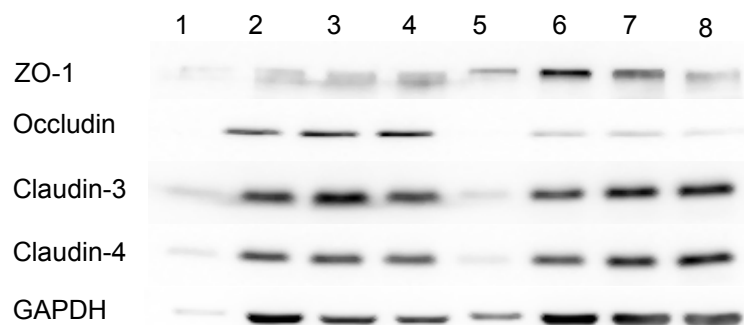


Abbildung 27: Expression verschiedener Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter. IPEC-1 (1-4) und IPEC-J2 (5-8) wurden auf impermeablem Untergrund kultiviert und in unterschiedlichen Abständen wurden Proteinproben gewonnen: 1) und 5) Alter: 2 Tage, 2) und 6) Alter: 7 Tage, 3) und 7) Alter: 14 Tage, 4) und 8) Alter: 21 Tage. Es konnten ZO-1 (225 kDa), Occludin (65 kDa), Claudin-3 (22 kDa) und Claudin-4 (22 kDa) in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten nur ein schwaches Signal der genannten Proteine im Alter von 2 Tagen. GAPDH (37 kDa) wurde als Kontrolle verwendet.

Lokalisation der Tight Junction- und Strukturproteine

Die porcinen, intestinalen Epithelzellen sind durch zahlreiche Zell-Zell-Kontakte gekennzeichnet. Auch diese beiden Zelllinien wiesen im apikalen Bereich Tight Junctions (*Zonula adherens*) auf. Zwei wichtige Proteine dieser *Zonula adherens* sind ZO-1 und Occludin. Beide Proteine konnten in den Zelllinien unabhängig vom Kultivierungsalter (Tag 1 bis Tag 21) nachgewiesen werden. Diese Proteine zeigten in der Immunfluoreszenz eine bandartige, homogene Struktur (Abb. 28 und 29). Somit markieren ZO-1 und Occludin die Begrenzung einer Zelle, womit Rückschlüsse auf die flächenmäßige Ausdehnung der Zellen gezogen werden können.

Ein anti-CK18-Antikörper und FITC-Phalloidin wurden genutzt, um die Strukturproteine - Zytokeratin 18 und Aktin – nachzuweisen (Abb. 28 und 29). Es konnten beide Strukturproteine in beiden Zelllinien unabhängig vom Kultivierungsalter nachgewiesen werden. Sowohl IPEC-1 als auch IPEC-J2 wiesen sogenannte „*stress fibres*“ auf.

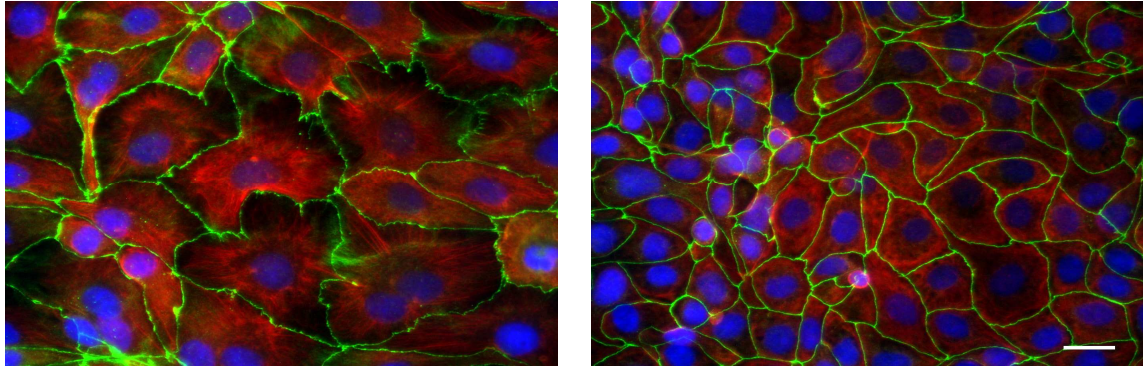


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von IPEC-1 und IPEC-J2 mit dem anti-Zo-1- und dem anti-CK18-Antikörper. ZO-1 (grün), ein Protein der Tight Junctions, konnte in beiden Zelllinien detektiert werden. Es zog sich wie ein Band um die Zellen. CK18 (rot), ein wichtiges Strukturprotein, konnte in beiden Zelllinien markiert werden. (Balken = 20 μm)

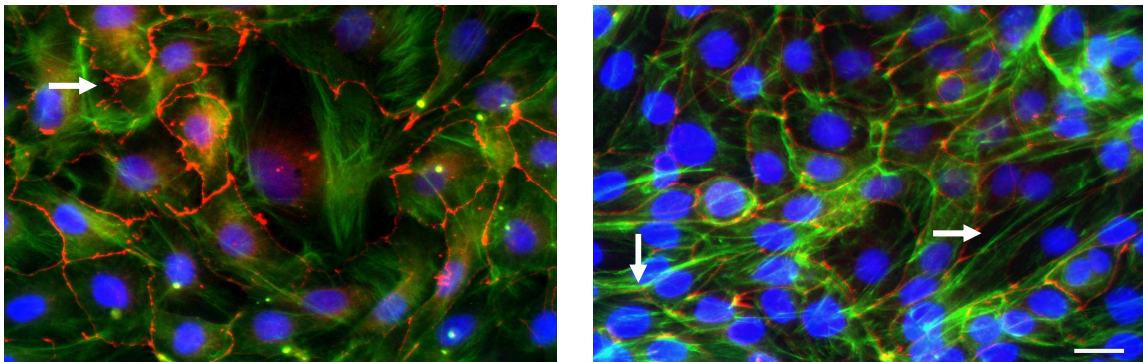


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von IPEC-1- und IPEC-J2-Monolayern mit dem anti-Occludin-Antikörper und FITC-Phalloidin. Das Tight Junction Protein Occludin (rot) konnte in beiden Zelllinien detektiert werden. Aktin wurde durch FITC-Phalloidin (grün) markiert und konnte in allen Zellen beider Zelllinien beobachtet werden. Es konnte in beiden Zelllinien sogenannte „*stress fibres*“ festgestellt werden (Pfeile). (Balken = 20 μm)

3.3.6 Nachweis von Gap Junctions mittels Scratch-Assay

Der Nachweis von Gap Junctions wurde mittels Scratch-Assay und der Zugabe von Lucifer Yellow in beiden Zelllinien realisiert. Dies ist in Abbildung 30 beispielhaft für IPEC-1 dargestellt. Unmittelbar nach der Zugabe von Lucifer Yellow drang der Farbstoff in die zerstörten Zellen am Rande des Schnittes ein. Diese wiederum leiteten den Farbstoff in dahinterliegende Zellen über Gap Junctions weiter.

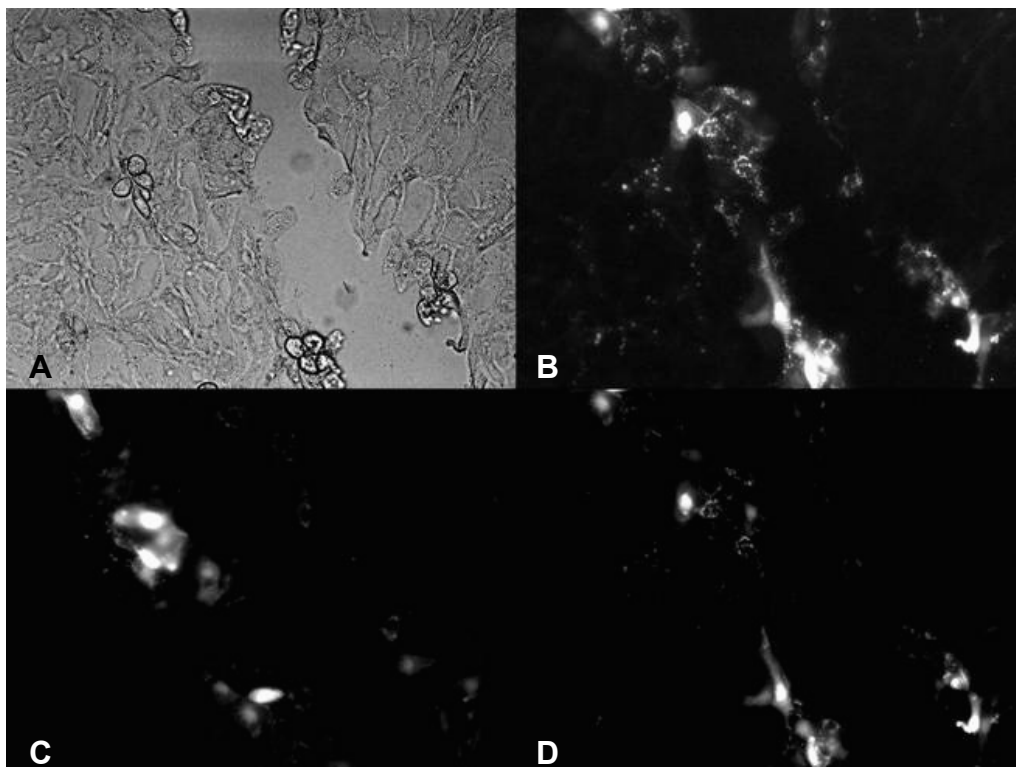


Abbildung 30: Nachweis von Gap Junctions mittels Scratch-Assay. Dies wurde beispielhaft für IPEC-1 dargestellt: A) Hellfeldaufnahme zum Zeitpunkt Null ($t = 0$); B) Fluoreszenzaufnahme zum Zeitpunkt Null [C) $t = 7s$; D) $t = 9s$]

3.3.7 Villin als Differenzierungsmarker

3.3.7.1 Villin-Expression auf mRNA-Ebene

Das Protein Villin ist ein wichtiger Differenzierungsmarker und wurde in IPEC-1 und IPEC-J2 untersucht. Beide Zelllinien wurden auf impermeablem Untergrund ausgesät und für 21 Tage kultiviert. Nach Ablauf der Kultivierung wurden RNA-Proben gewonnen und mittels qPCR analysiert. Es war ein 26,5-fach höheres Villin-mRNA-Level bei IPEC-J2-Zellen zu verzeichnen ($p \leq 0,01$; Abb. 31).

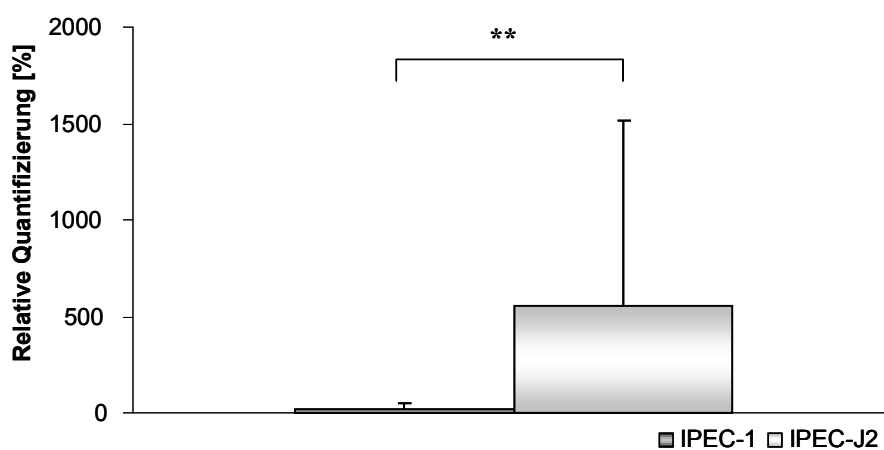


Abbildung 31: Vergleich des Villin-mRNA-Niveaus beider Zelllinien auf impermeablem Untergrund. IPEC-J2 zeigte ein signifikant, höheres Villin-mRNA-Level als IPEC-1 ($p \leq 0,01$).

3.3.7.2 Villin-Expression auf Proteinebene

IPEC-1-Zellen zeigten unabhängig vom Kultivierungsalter keine Villin-Expression (Abb. 32). Eine starke Villin-Expression, wenn die Zelllinie auf impermeablem Untergrund kultiviert wurde, konnte in IPEC-J2-Zellen beobachtet werden. Im Alter von zwei Tagen konnte jedoch noch kein Villin nachgewiesen werden. GAPDH, welches als Beladungskontrolle verwendet wurde, zeigte auch ein schwächeres Signal am zweiten Tag der Kultivierung. Diese schwächere Ausprägung der Proteinbanden am zweiten Tag ergab sich durch die niedrigere Zellzahl des Monolayers (subkonfluent) gegenüber den anderen Tagen.

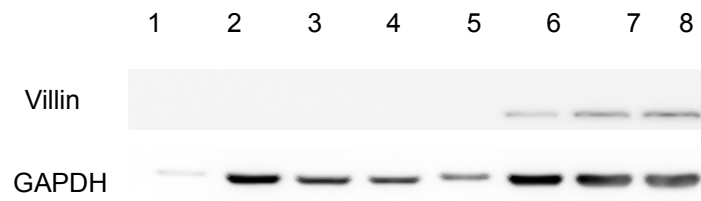


Abbildung 32: Kultivierung auf impermeablem Untergrund - Nachweis von Villin in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter. IPEC-1 und IPEC-J2 wurden unterschiedlich lang kultiviert: 1) und 5) Alter: 2, 2) und 6) Alter: 7 Tage, 3) und 7) Alter: 14 Tage, 4) und 21) Alter: 21 Tage. Es konnte unabhängig vom Kultivierungsalter kein Villin (80 kDa) in IPEC-1 detektiert werden. In IPEC-J2 konnte Villin außer am Tag 2 der Kultivierung nachgewiesen werden. GAPDH-Expression (37 kDa) blieb konstant, nur am zweiten Tag wurde die Expressionsstärke nicht erreicht.

3.3.8 Differenzierung in Abhängigkeit von Dexamethason

3.3.8.1 Morphologie

Dexamethason ist ein Glucocorticoid, das zur Differenzierung von verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten (Yamanouchi et al., 1997) verwendet wird. In beiden Zelllinien konnte im Vergleich zu Zellen, welche in Medium (mit FCS) kultiviert wurden, kein morphologischer Unterschied bezogen auf Phänotyp, Mikrovilli und Tight Junctions festgestellt werden (Abb. 33).

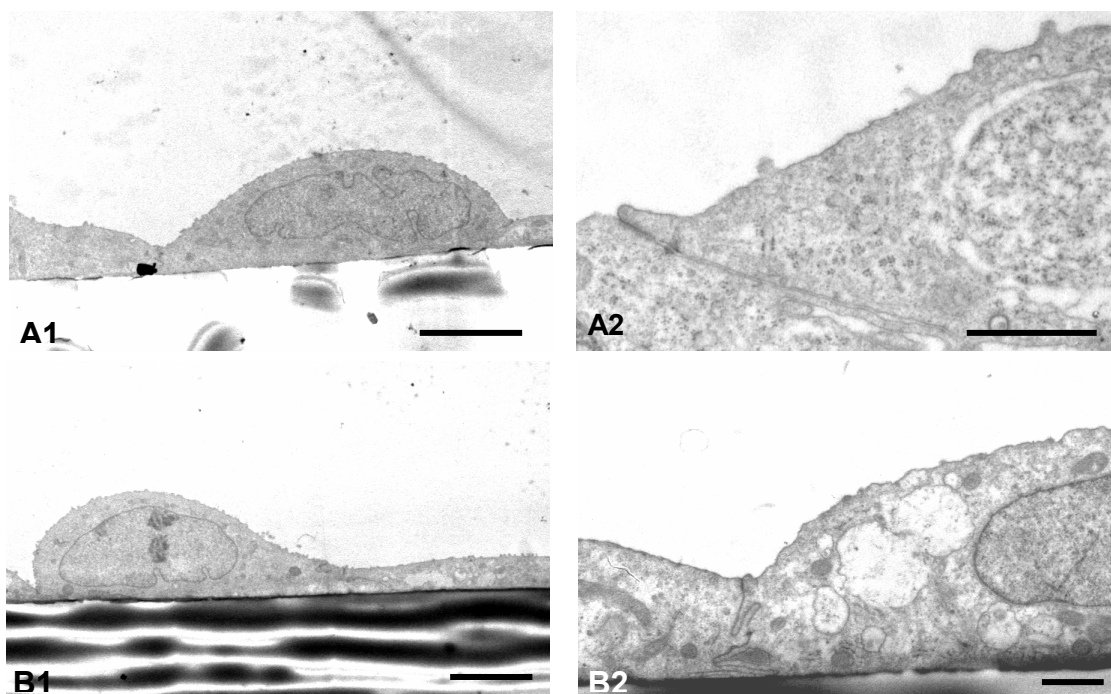


Abbildung 33: Differenzierung in Abhängigkeit von Dexamethason in IPEC-1. Es konnte sowohl bei den Zellen in Medium (A1; complete, siehe Anhang) als auch bei den Zellen, welche mit Dexamethason (B1) behandelt wurden ein flacher, langgestreckter Phänotyp verzeichnet werden. Mit beiden Kultivierungsmethoden (A2 = complete Medium; B2 = Dexamethason) konnten Tight Junctions und nur wenige Mikrovilli festgestellt werden. (Balken [A1, B1] = 5 μm ; Balken [A2, B2] = 1 μm)

Bei IPEC-J2 konnte kein Unterschied zwischen beiden Kultivierungsmethoden verzeichnet werden. Im Vergleich zu IPEC-1 zeigte IPEC-J2 bei beiden Kultivierungsprotokollen längere und mehr Mikrovilli (Abb. 34).

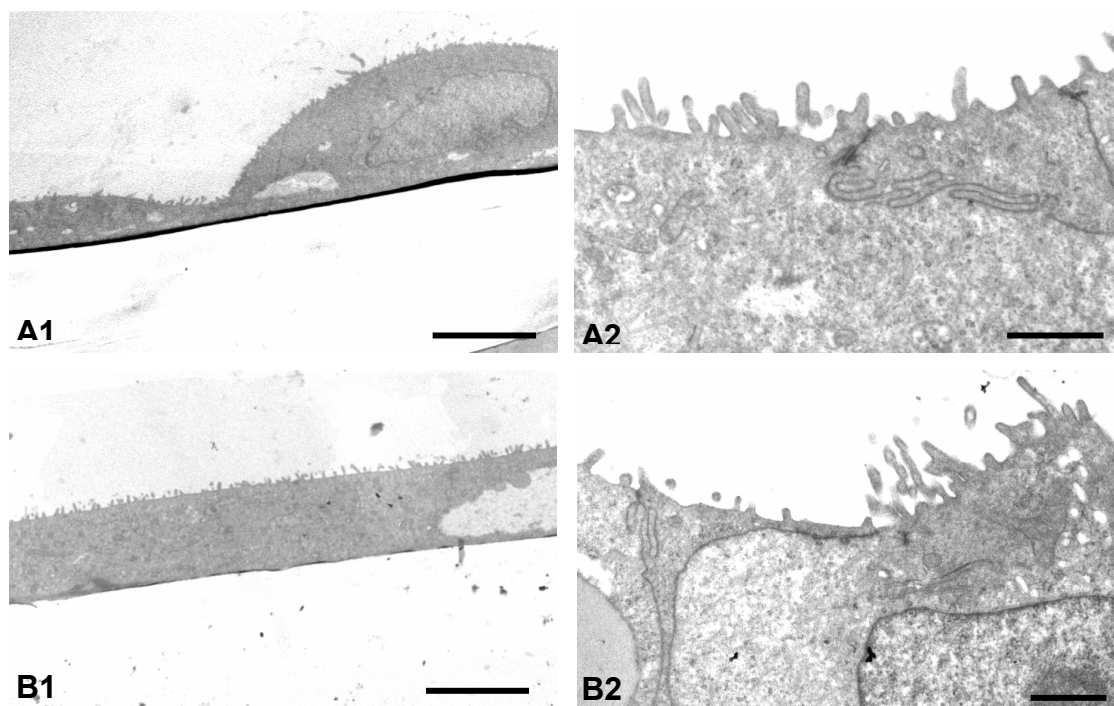


Abbildung 34: Differenzierung in Abhängigkeit von Dexamethason in IPEC-J2. IPEC-J2 zeigte unabhängig vom Kultivierungsprotokoll einen flachen, langgestreckten Phänotyp (A1 = complete Medium; B1 = Dexamethason). Tight Junctions und Mikrovilli konnten auch unabhängig vom Kultivierungsprotokoll beobachtet werden (A2; B2). (Balken [A1, B1] = 5 µm; Balken [A2, B2] = 1 µm)

3.3.8.2 Villin-Expression in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason

Zwei Methoden zur Differenzierung von Zellen sind das Wachstum ohne Serum und wie bereits erwähnt der Zusatz von Dexamethason. Die Expression von Villin als Differenzierungsmarker wurde in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason untersucht (Abb. 35). Beide Zelllinien wurden auf impermeablem Untergrund angezogen und mit unterschiedlichen Medien: complete Medium, FCS-freies Medium und FCS-freies Medium mit Dexamethason versetzt und kultiviert. Im Anschluss wurden Proteinproben gewonnen. In IPEC-1-Zellen konnte kein Villin unabhängig vom Kultivierungsmedium nachgewiesen werden. Eine stabile Villin-Expression war in IPEC-J2-Zellen in allen Kultivierungsmedien zu verzeichnen.

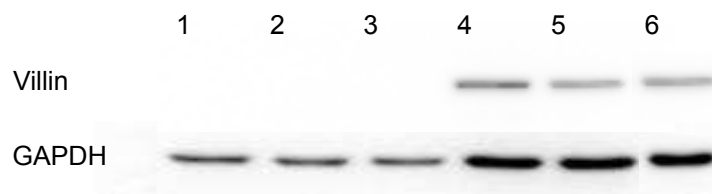


Abbildung 35: Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason. IPEC-1 (1-3) und IPEC-J2 (4-6) wurden auf impermeablem Untergrund mit unterschiedlichen Mediumzusätzen herangezogen: 1) und 4) Dexamethason (in FCS-freiem Medium), 2) und 5) mit FCS (complete Medium) und 3) und 6) FCS-freies Medium. In IPEC-1 konnte kein Villin (80 kDa) detektiert werden. IPEC-J2 zeigte hingegen unabhängig von der Kultivierungsmethode eine Villin-Expression. GAPDH (37 kDa) wurde als Kontrolle verwendet.

3.3.9 Nachweis der Enzym-Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde über die Dauer von 21 Tagen bestimmt (Abb. 36). Relevante Aktivitätswerte waren bei den Zelllinien IPEC-1 und IPEC-2 erst ab dem dritten Tag ermittelbar. Bei beiden Zelllinien konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivität bis zum zehnten Tag beobachtet werden. Im weiteren Verlauf konnte eine konstante Aktivität bis zum 21. Tag verzeichnet werden. Die Aktivitätswerte der IPEC-J2-Zellen waren deutlich höher als die der IPEC-1-Zellen. IPEC-J2 zeigte eine Aktivität von zirka 40 µg Diformazan/50 000 Zellen und IPEC-1 von 14 µg Diformazan/50 000 Zellen.

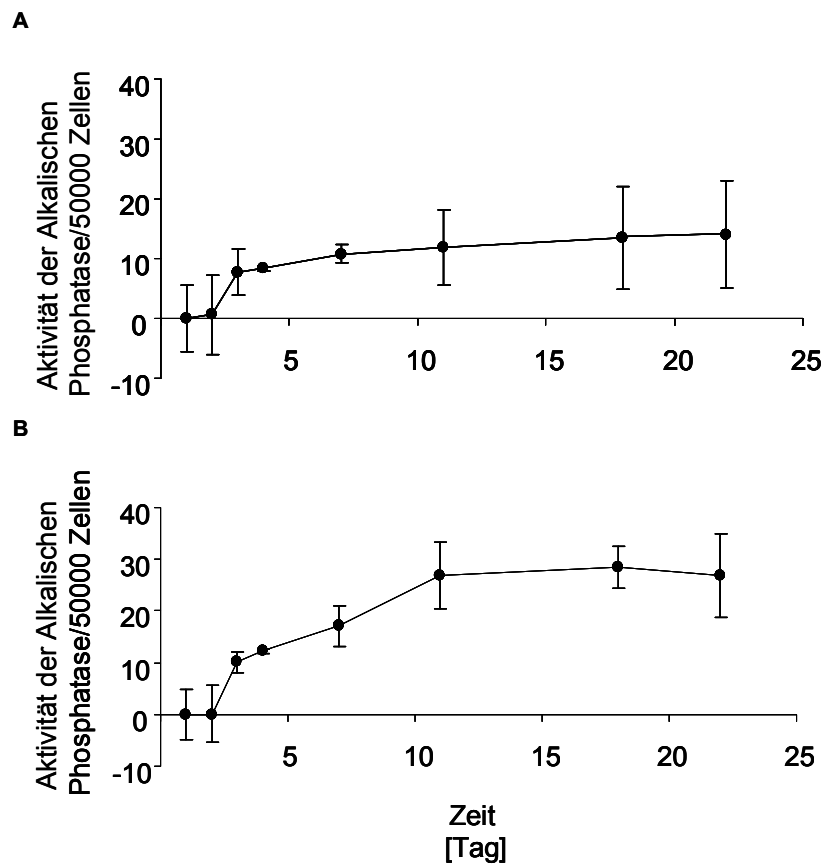


Abbildung 36: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in beiden Zelllinien. Beide Zelllinien zeigten erst ab dem dritten Tag nach der Aussaat eine messbare Aktivität der Alkalischen Phosphatase (gebildetes Diformazan [μg] pro 50 000 Zellen). IPEC-J2 zeigte ein signifikant, höheres Level an gebildeten Diformazan als IPEC-1.

Die Enzym-Aktivität konnte auch histochemisch nachgewiesen werden und ist in Abbildung 37 beispielhaft für IPEC-1 dargestellt. Es konnte ein mosaikartiges Muster – keine einheitliche Anfärbung der Zellen – festgestellt werden.

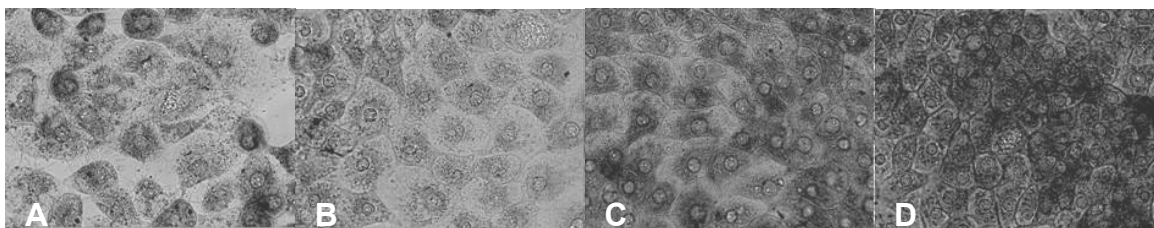


Abbildung 37: Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase in IPEC-1. Der Nachweis wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt: A) Alter: 1 Tag, B) Alter: 2 Tage, C) Alter: 3 Tage und D) Alter: 4 Tage. Die Zellen wiesen eine unterschiedliche Stärke der Anfärbung auf und damit eine unterschiedliche Aktivität der Zellen.

3.3.10 Hinweis auf Veränderungen im Energiestoffwechsel

3.3.10.1 GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene

GAPDH ist wichtiges Enzym der Glykolyse und katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Biphosphoglycerat. Um Aussagen über Unterschiede beziehungsweise Veränderungen bezüglich des Energiestoffwechsels treffen zu können, wurden beide Zelllinien auf impermeablem Untergrund kultiviert, RNA-Proben genommen, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Beim Vergleich der IPEC-1- und IPEC-J2-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der GAPDH-Expression festgestellt werden. (IPEC-1: 155%; IPEC-J2: 143%; Abb. 38).

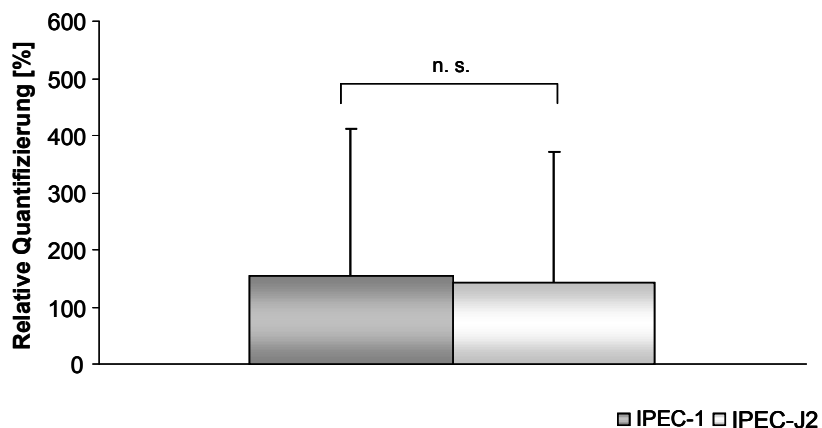


Abbildung 38: Relative Quantifizierung des GAPDH-mRNA-Levels beider Zelllinien. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IPEC-1- und IPEC-J2-Zellen verzeichnet werden (n. s., $p > 0,05$).

3.3.10.2 GAPDH-Expression auf Proteinebene

Im Abstand von 2, 7, 14 und 21 Tagen wurden Proteinproben beider Zelllinien gewonnen. Diese Proben wurden genutzt, um die Entwicklung von GAPDH in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter untersuchen zu können (Abb. 39). Zeitgleich konnte mit dem unterschiedlichen Kultivierungsalter (2. Tag und 7. Tag) der Unterschied zwischen subkonfluenten und konfluenten Monolayern dargestellt werden. GAPDH konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Mit Ausnahme vom zweiten Kultivierungstag wurden keine Unterschiede in der Expression abhängig vom Alter festgestellt. Dieser Unterschied ergibt sich aus der Anzahl der Zellen zu den unterschiedlichen Zeiten.

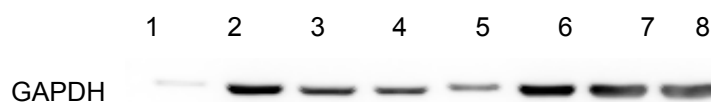


Abbildung 39: GAPDH-Expression auf Proteinebene. Beide Zelllinien (IPEC-1: 1-4 und IPEC-J2: 5-8) wurden auf impermeablem Untergrund kultiviert. In unterschiedlichen Abständen: 1) und 5) Alter: 2 Tage, 2) und 6) Alter: 7 Tage, 3) und 7) Alter: 14 Tage, 4) und 8) Alter: 21 Tage, wurden Proteinproben gewonnen. Es konnte ein Unterschied in beiden Zelllinien in der GAPDH-Expression (37 kDa) festgestellt werden. Am Tag 2 der Kultivierung zeigte sich ein schwaches Signal von GAPDH gegenüber den anderen Kultivierungstagen.

3.4 Entwicklung eines Systems, in dem sich intestinale Epithelzellen in Form und Funktion der *in vivo*-Situation annähern

3.4.1 Kultivierung auf Membranen

3.4.1.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Der transepitheliale elektrische Widerstand spiegelt die Integrität des Zellverbandes wider und ist somit ein wichtiges Merkmal für einen intakten Monolayer. Da die Tight Junctions die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Epithelzellen darstellen, lässt der TEER-Wert somit auch Rückschlüsse auf die Tight Junction-Beschaffenheit zu. Beide Zelllinien wurden auf permeablem Untergrund kultiviert. Nach der Aussaat der Zellen erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des TEER-Wertes. Ein Wert von $1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ (12-well-Inserts; Abb. 40) wurde als Schwellenwert für einen dichten Monolayer angenommen, da dieser Wert mit der Konfluenz des Monolayers einherging. Dies wurde mittels Hellfeldmikroskopie überprüft. Die hier untersuchten Kulturen bildeten das Äquivalent zu den ALI-Kulturen. Der Tag 0 markiert in diesem Falle den Zeitpunkt der „ALI-Setzung“ in den ALI-Kulturen.

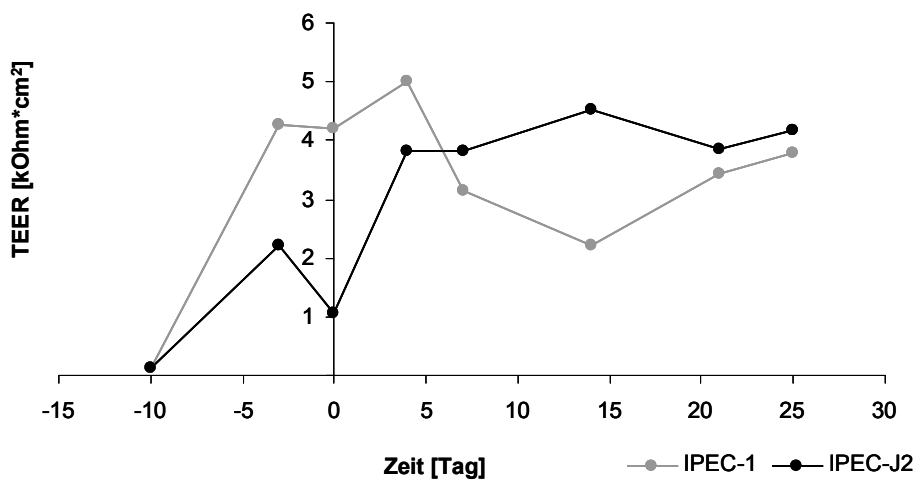


Abbildung 40: TEER-Verlauf der Zelllinien IPEC-1 und IPEC-J2. Der TEER-Wert von $1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ wurde als Schwellenwert für einen dichten Monolayer gekennzeichnet. Dieser Wert wurde für die Dauer von 25 Tagen nicht unterschritten. Der Tag -10 markiert den Tag der Aussaat der Zellen und gibt somit den Eigenwiderstand der Membran wieder.

3.4.1.2 Erhebung von morphologischen Daten

Die Auswirkungen von einem Wechsel des Kultivierungsuntergrundes auf die Morphologie der Zellen wurde durch die Ermittlung verschiedener Parameter untersucht (Tab. 6). Es ergaben sich für IPEC-1 $58,8 \pm 10,31$ Zellen/10 000 μm^2 und für IPEC-J2 $16,19 \pm 2,63$ Zellen/10 000 μm^2 . Dieser Unterschied wurde auch in der Zellfläche und Zellkernfläche deutlich. Die IPEC-J2-Zellen zeigten eine 3,5-fach größere Ausdehnung der Zellfläche und einen 2-fach größeren Zellkern im Vergleich zu den IPEC-1-Zellen. Bei der Schichtdicke konnte eine Erhöhung bei IPEC-1 ($10,54 \pm 2,69$ μm) festgestellt werden. Aus den ermittelten Werten konnte das theoretische Volumen einer Zelle berechnet werden. IPEC-1 zeigte ein kleineres Zellvolumen als IPEC-J2.

	IPEC-1	IPEC-J2	SIGNIFIKANZ
Anzahl der Zellkerne/10000 μm^2	58.8 ± 10.31	16.19 ± 2.63	$p \leq 0,001$
Zellkernfläche [μm^2]	70.65 ± 16.09	143.15 ± 40.34	$p \leq 0,001$
Zellfläche [μm^2]	172.54 ± 56.99	587.83 ± 325.3	$p \leq 0,001$
Schichtdicke [μm]	10.54 ± 2.69	7.31 ± 2.44	$p \leq 0,001$
Theoretisches Zellvolumen [μm^3]	490.80 ± 5.13	628.17 ± 9.52	---

Tabelle 6: Erhebung morphologischer Daten von auf permeablem Untergrund kultivierter Zellen. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festgestellt werden. IPEC-1 zeigte eine größere Anzahl an Zellen pro 10 000 μm^2 , eine geringere Zellfläche und Zellkernfläche als IPEC-J2. IPEC-1 wies jedoch eine höhere Schichtdicke als IPEC-J2 auf.

Diese Ergebnisse konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen belegt werden. Im Vergleich beider Zelllinien konnte ein eher flacher Phänotyp bei den IPEC-J2-Zellen beobachtet werden (Abb. 41). Ein Bürstensaum konnte bei beiden Zelllinien verzeichnet werden, jedoch war dieser bei den IPEC-J2-Zellen deutlicher ausgeprägt als bei den IPEC-1-Zellen (Abb. 42).

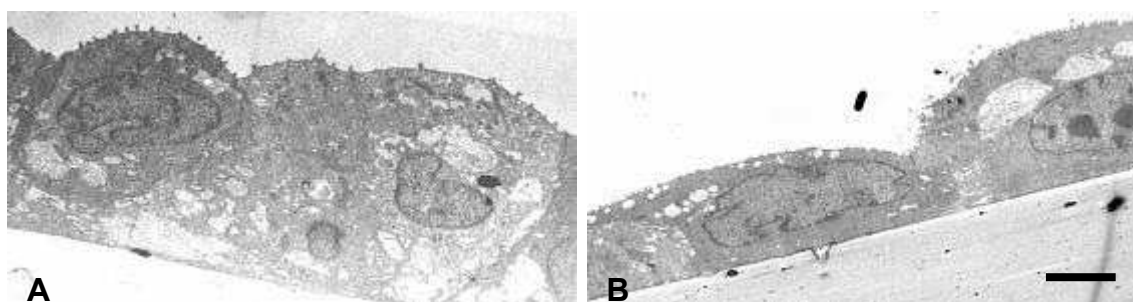


Abbildung 41: Kultivierung auf permeablem Untergrund – Phänotyp (EM). Beide Zelllinien zeigten einen intakten Bürstensaum. Eine größere Ausdehnung der Schichtdicke konnte bei IPEC-1-Zellen (A) im Vergleich zu IPEC-J2-Zellen (B) verzeichnet werden. Die Zelllinie IPEC-J2 wies jedoch Mikrovilli auf als IPEC-1. (Balken = 5µm)

Wie bereits erwähnt, ist der TEER ein wichtiger Marker für die Integrität des Monolayers und gibt Auskunft über die Tight Junctions. Diese sollten mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden (Abb. 42). Hierfür wurden die apikalen Kontaktstellen von zwei benachbarten Zellen untersucht. Sowohl IPEC-1- als auch IPEC-J2-Zellen zeigten im apikalen Bereich ausgeprägte Tight Junctions. Des Weiteren konnten auch zahlreiche Interdigitationen zwischen den Zellen nachgewiesen werden. Ein weiteres Merkmal eines intakten Monolayers ist das Vorhandensein von Desmosomen. Diese sind essentiell für die Kommunikation zwischen den Zellen.

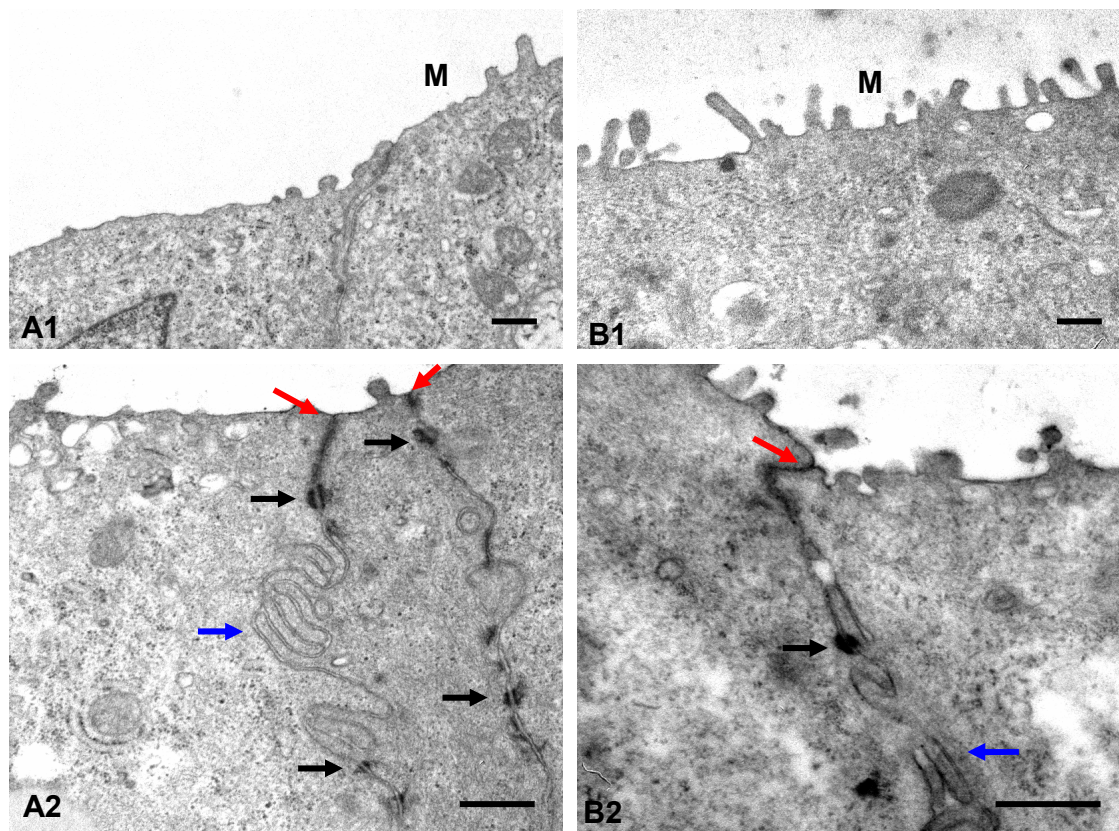


Abbildung 42: Ausbildung von Bürstensaum und Tight Junctions. IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) zeigten beide einen Bürstensaum mit Mikrovilli (M). IPEC-1 zeigte weniger und kürzere Mikrovilli (A1 und A2). Des Weiteren konnten nicht nur Tight Junctions (A2 und B2; roter Pfeil) sondern auch Desmosomen (A2 und B2; schwarzer Pfeil) und Interdigitationen (A2 und B2; blauer Pfeil) nachgewiesen werden. (Balken [A1, B1] = 5 µm; Balken [A2, B2] = 1 µm)

3.4.1.3 Nachweis der Proliferation

Die Proliferation der Zellen, welche auf permeablem Untergrund kultiviert wurden, erfolgte durch den BrdU-Einbau (Abb. 43). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien festgestellt werden (Abb. 42; $p=0,104$). Der Anteil an proliferierenden Zellen lag bei IPEC-1 bei 9,7% und bei IPEC-J2 bei 7,2% (Abb. 44).

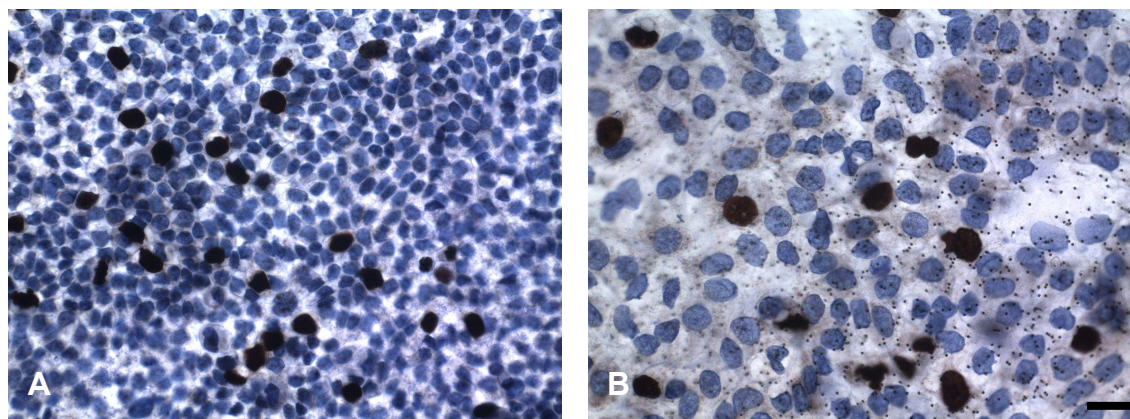


Abbildung 43: Nachweis der Proliferation auf permeablem Untergrund kultivierter Zellen mittels BrdU-Färbung. Der Vergleich der Zelllinien ergab keine Unterschiede. IPEC-1 (A) zeigte den gleichen Anteil an BrdU-positiven (braun) Zellen wie IPEC-J2 (B). Die BrdU-negativen Zellen waren blau markiert. (Balken = 20µm)

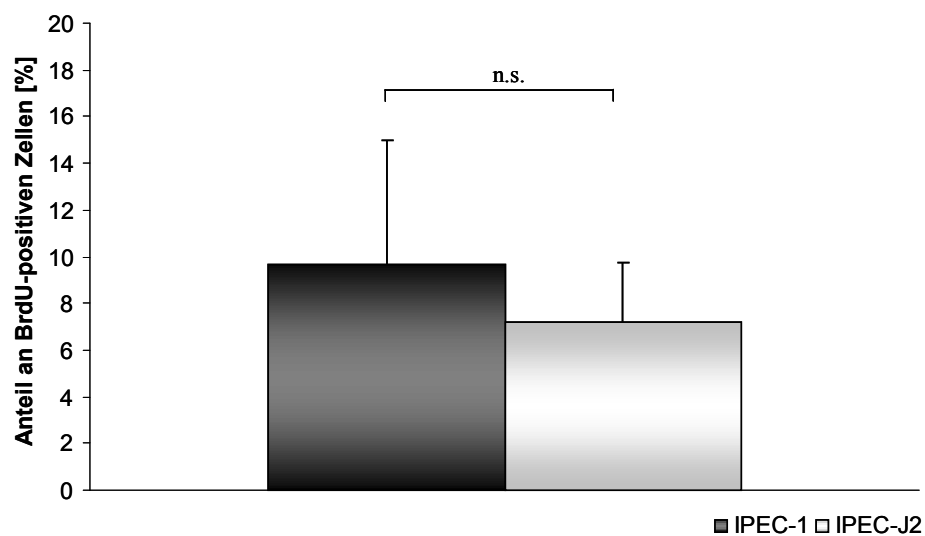


Abbildung 44: Vergleich des Anteils an proliferierenden Zellen. Es konnten keine Unterschiede zwischen Zelllinien festgestellt werden. IPEC-1 wies einen Anteil von 9,7% und IPEC-J2 einen Anteil von 7,2% proliferierenden Zellen auf ($p=0,104$).

3.4.1.4 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf mRNA-Ebene

Die Untersuchung der gewonnenen mRNA-Proben erfolgte durch die PCR (Abb. 45). Vergleicht man die IPEC-1- und IPEC-J2-Zellen kann ein schwächeres Signal bei Occludin und SGLT-1 in der Zelllinie IPEC-J2 festgestellt werden. Betrachtet man die Ausprägung der Banden bei IPEC-1 auf impermeablem (siehe Abb. 26) und auf permeablem Untergrund (Abb. 45) so kann ein stärkeres Signal auf permeablem Untergrund bei allen untersuchten Genen festgestellt werden

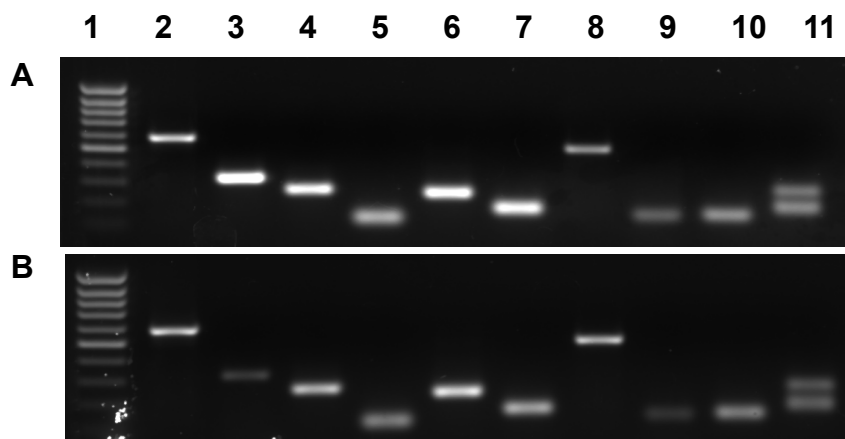


Abbildung 45: Permeabler Untergrund – Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere in IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) auf mRNA-Ebene. Verschiedene Marker wurden auf mRNA-Ebene für beide Zelllinien nachgewiesen: 1) Marker, 2) GAPDH, 3) Occludin, 4) ZO-1, 5) CK18, 6) β -Aktin, 7) Mucin-1, 8) Villin-1, 9) SGLT-1, 10) Claudin-3 und 11) Claudin-4. In IPEC-1 und IPEC-J2 konnte ein positives Signal bei Villin-mRNA festgestellt werden.

3.4.1.5 Untersuchung von Zellzyklus, Differenzierung und Metabolismus auf mRNA-Ebene

Beide Zelllinien wurden auf Membranen für sieben Tage kultiviert und im Anschluss mRNA-Proben gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Unterschiedliche Marker des Zellzyklusses, des Metabolismus und der Differenzierung wurden mittels qPCR untersucht. Die Tabelle 7 zeigt die Relative Quantifizierung (RQ) in Prozent. Beide Zelllinien wurden verglichen, wobei IPEC-1 den Wert 100% in allen Analysen annimmt. Claudin-1, Claudin-3, Claudin-7 und Occludin wurden als Marker für die Zellkommunikation und der Tight Junctions gewählt. Ein signifikant erhöhtes mRNA-Level von Claudin-3 und Claudin-7 (beide: $p \leq 0,001$) wurde in IPEC-J2 registriert. Gene, die für die Differenzierung der Zellen verantwortlich sind, waren signifikant in IPEC-J2 erhöht. Hierzu zählen VIL-2, TLR4, ESPN (alle: $p \leq 0,001$) und MUC4 ($p \leq 0,05$). Das mRNA-Level von LIG1, einem wichtigen Gen für den Prozess der Replikation und die DNA-Reparatur, ist signifikant herunterreguliert in IPEC-J2 ($p \leq 0,001$).

Zu den Genen, die in den Zellzyklus involviert sind, zählen BAD, BAX, BCL-2, MCL-1 und P53. Eine signifikante Erhöhung von P53 und BAD konnte in IPEC-J2 beobachtet werden (beide: $p \leq 0,001$). Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen beiden Zelllinien bei BCL-2 und BAX festgestellt, jedoch konnte eine signifikante Abnahme von MCL-1 in IPEC-J2 beobachtet werden ($p \leq 0,001$).

Wichtige Marker für den Metabolismus sind unter anderem SDH, PDH, HIF-1 α und CYC1. Das mRNA-Level von PDH und CYC1 (beide: $p \leq 0,001$) waren in IPEC-J2 im Vergleich zu IPEC-1 signifikant reduziert. Kein Unterschied konnte im mRNA-Level von SDH und HIF-1 α festgestellt werden. Das mRNA-Level von β -Catenin zeigte zwar keinen signifikanten Unterschied zu IPEC-1, jedoch konnte eine Tendenz des reduzierten β -Catenin-Levels in IPEC-J2 beobachtet werden ($p=0,067$).

Name	Genname	RQ [%]
Occludin	OCCL	40***
Claudin-1	CLDN1	60***
Claudin-3	CLDN3	1540***
Claudin-7	CLDN7	200***
<i>B-cell lymphoma 2</i>	BCL-2	100
BCL-2-Antagonist	BAD	170***
Co-Faktor von P53	BAX	140
Tumorsuppressorgen	P53	30430***
Ligase 1	LIG1	40***
Zelldifferenzierung	MCL-1	50***
Villin-2 (Ezrin)	VIL-2	350***
Toll-like Rezeptor 4	TLR4	850***
Mucin-4	MUC4	250*
Espin	ESPN	250***
<i>focal adhesion kinase</i>	FAK	60***
CDK1-Inhibitor	P21	1100***
Cytochrom C	CYC1	60***
Pyruvat-Dehydrogenase	PDH	60***
Succinat_Dehydrogenase	SDH	110
<i>hypoxia inducible factor</i>	HIF-1 α	102
β -Catenin	CTNN-B1	90

Tabelle 7: Untersuchung verschiedener Gene mittels qPCR. Die in der Tabelle angegebenen RQ-Werte (= Relative Quantifizierung) entsprechen den Werten für IPEC-J2. IPEC-1 wurde grundsätzlich auf 100% gesetzt.

3.4.1.6 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene

Expressionsanalyse auf Proteinebene

Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte durch die Western Blot-Analyse. Die Proben hierfür wurden durch die Kultivierung von IPEC-1 und IPEC-J2 auf permeablem Untergrund gewonnen. Die Probengewinnung wurde in Abhängigkeit vom Alter der Zellen durchgeführt. Vier unterschiedliche Zeitpunkte wurden gewählt: 2 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage. In beiden Zelllinien wurden die Proteine ZO-1, Occludin, Claudin-3, Claudin-4 und GAPDH nachgewiesen (Abb. 46). Im Vergleich der Zelllinien zeigte Occludin jedoch nur eine schwache Ausprägung der Banden in IPEC-J2 zu allen untersuchten Zeitpunkten. Unterschiede in der Ausprägung der Bandenstärke konnte auch bei dem Kultivierungsalter festgestellt werden. Tag 2 der Kultivierung zeigte eine geringe Proteinmenge in allen untersuchten Proteinen. Dies konnte auch bei GAPDH beobachtet werden, welches als Kontrolle verwendet wurde. Die Unterschiede im Kultivierungsalter ergaben sich durch die Subkonfluenz und Konfluenz der Layer. Am zweiten Tag der Kultivierung konnten noch keine konfluenter Monolayer verzeichnet werden.

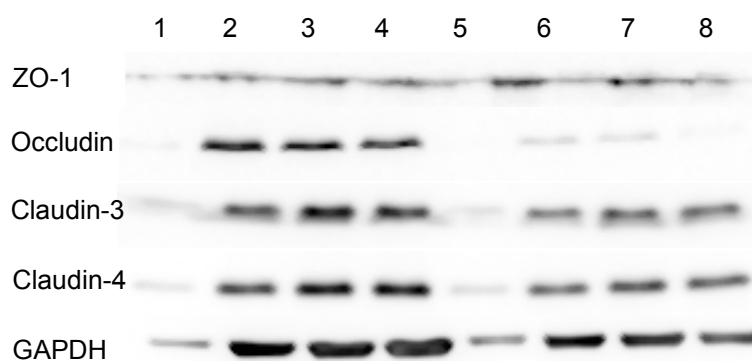


Abbildung 46: Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter. IPEC-1 (1-4) und IPEC-J2 (5-8) wurden auf impermeablem Untergrund kultiviert und in unterschiedlichen Abständen wurden Proteinproben gewonnen: 1) und 5) Alter: 2 Tage, 2) und 6) Alter: 7 Tage, 3) und 7) Alter: 14 Tage, 4) und 8) Alter: 21 Tage. Es konnten ZO-1 (225 kDa), Occludin (65 kDa), Claudin-3 (22 kDa) und Claudin-4 (22 kDa) in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten nur ein schwaches Level der genannten Proteine im Alter von zwei Tagen. GAPDH (37 kDa) wurde als Kontrolle verwendet.

Lokalisation der Proteine

Beide Zelllinien wurden auf Membranen herangezogen und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. ZO-1, Claudin-3 und Claudin-4, welche wichtige Proteine der Tight Junctions darstellen, konnten in den Membrankulturen detektiert werden. Alle drei Proteine befinden sich spezifisch im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Abb. 47 und 48). CK18, ein wichtiges Strukturprotein, konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 47). „*stress fibres*“, die bei der Kultivierung auf impermeablem Untergrund beobachtet wurden, konnten nicht mehr beobachtet werden (Abb. 48).

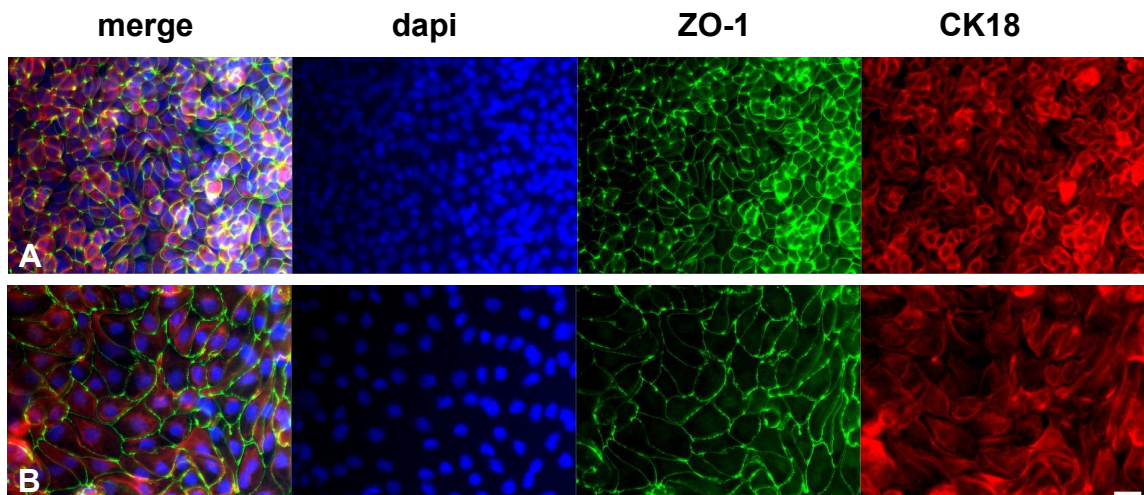


Abbildung 47: Lokalisation von ZO-1 und CK18 in beiden Zelllinien. Für die Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurden ein anti-ZO-1- (grün) und ein anti-CK18-Antikörper (rot) verwendet. Hierfür wurden beide Zelllinien – IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) - auf permeablem Untergrund herangezogen. ZO-1 zeigte sich als ein Band, welches sich um jede Zelle zieht. Dies konnte für beide Zelllinien nachgewiesen werden. (Balken = 20 µm)

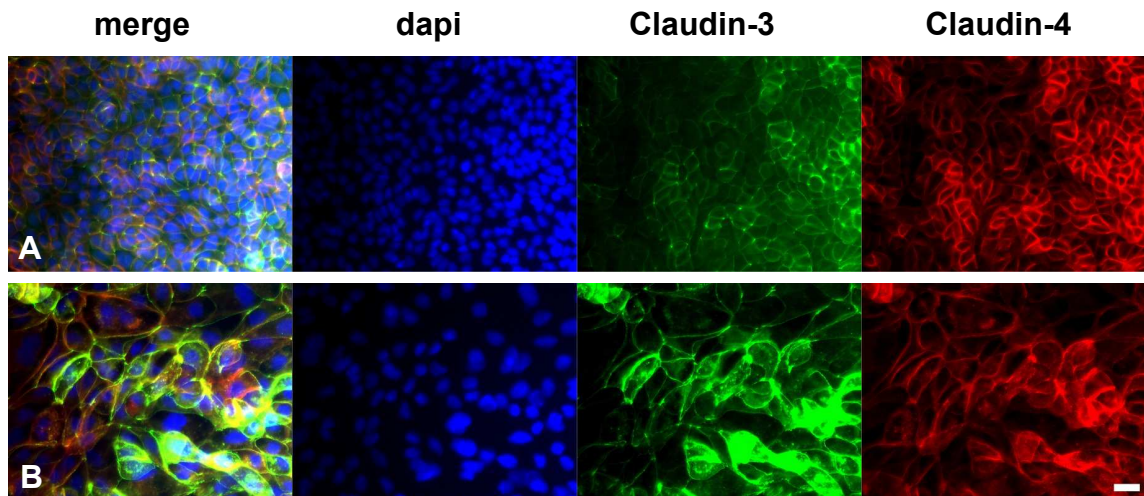


Abbildung 48: Lokalisation von Claudin-3 und Claudin-4 in beiden Zelllinien. Für die Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurde anti-CLD-3- (grün) und ein anti-CLD-4-Antikörper (rot) verwendet. IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) wurden auf permeablem Untergrund kultiviert. Claudin-3 und Claudin-4 waren an den Zellgrenzen detektierbar. Dies konnte für beide Zelllinien nachgewiesen werden. (Balken = 20 μ m)

3.4.1.7 Villin als Differenzierungsmarker

3.4.1.7.1 Villin-Expression auf mRNA-Ebene

Die Untersuchung des Villin-mRNA-Niveaus ergab bei den auf permeablem Untergrund kultivierten Zellen signifikante Unterschiede (Abb. 49; $p \leq 0,001$). IPEC-J2 zeigte eine 9-fache Erhöhung des mRNA-Niveaus von Villin im Vergleich zu IPEC-1.

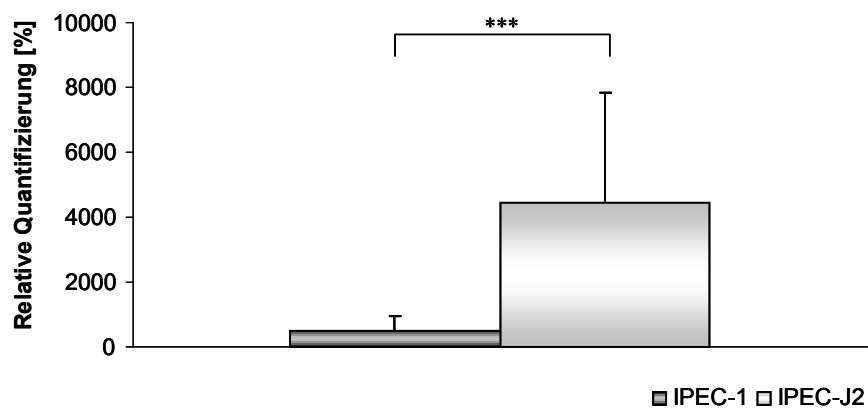


Abbildung 49: Vergleich des Villin-m-RNA-Niveaus auf permeablem Untergrund kultivierter Zellen. Das Villin-mRNA-Niveau war in IPEC-J2 signifikant 9-fach erhöht ($p \leq 0,001$).

3.4.1.7.2 Villin-Expression auf Proteinebene

Expressionsanalyse des Proteins Villin

Die Expression des Proteins Villin lieferte dieselben Ergebnisse wie die Analyse der Proben, welche auf impermeablem Untergrund kultiviert wurden (siehe Abb. 32). In den IPEC-1-Zellen konnte kein Villin - unabhängig vom Kultivierungsalter - nachgewiesen werden (Abb. 50). Die andere Zelllinie IPEC-J2 zeigte eine Villin-Expression mit Ausnahme des zweiten Kultivierungstages. Das Enzym GAPDH wurde als Kontrolle verwendet und konnte an allen Tagen beobachtet werden. Eine schwächere Ausprägung dieser Bande konnte auch hier beim zweiten Tag festgestellt werden. Sowohl im Falle von Villin und auch von GAPDH war die schwächere Bandenausprägung am zweiten Tag der Kultivierung auf die geringe Proteinmenge durch die niedrigere Zellzahl (Subkonfluenz) zurückzuführen.



Abbildung 50: Kultivierung auf permeablem Untergrund - Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter. IPEC-1 (1-4) und IPEC-J2 (4-6) wurden auf permeablem Untergrund: 1) und 5) Alter: 2, 2) und 6) Alter: 7, 3) und 7) Alter: 14 Tage, 4) und 8) Alter: 21 Tage kultiviert. In IPEC-1 konnte kein Villin (80 kDa) detektiert werden. IPEC-J2 zeigte hingegen unabhängig von der Kultivierungsmethode eine Villin-Expression. GAPDH (37 kDa) wurde konstant extrimiert. Am zweiten Tag wurde eine schwächere Bandenstärke gefunden, was auf die geringe Proteinmenge durch die Subkonfluenz der Zellen zurückzuführen ist.

Lokalisation des Proteins Villin

Das Protein Villin wurde in den IPEC-2-Zellen intrazellulär detektiert (Abb. 51). Es konnte keine spezifische Lokalisation des Proteins ausgemacht werden. Da in IPEC-1 mittels Western Blot kein Villin festgestellt werden konnte, wurde keine Immunfluoreszenzfärbung mit IPEC-1 durchgeführt.

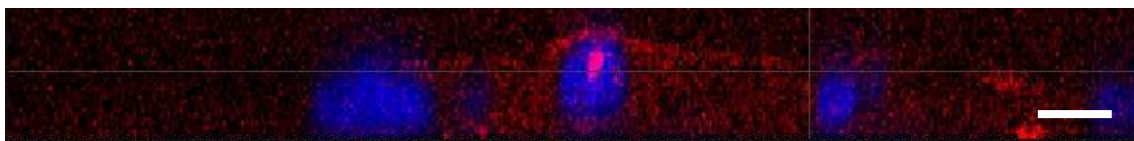


Abbildung 51: Kultivierung auf permeablem Untergrund – Lokalisation des Proteins in IPEC-J2. Das Protein wurde intrazellulär detektiert. (Balken = 5 µm)

3.4.1.8 Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason

3.4.1.8.1 Morphologie

Beide Zelllinien wurden auf permeablem Untergrund mit unterschiedlichen Medien kultiviert: a) complete Medium, b) FCS-freies Medium und c) FCS-freies Medium versetzt mit Dexamethason (Gonzalez-Vallina et al., 1996). Mittels Elektronenmikroskopie wurde die Morphologie der kultivierten Zellen untersucht (Abb. 52 und 53). Beide Zelllinien zeigten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kultivierungsmedien. Es waren flache und langgestreckte Zellen detektierbar. Beide Zelllinien zeigten Mikrovilli, Tight Junctions und einen zentral gelegenen Nukleus unter allen Kultivierungsbedingungen.

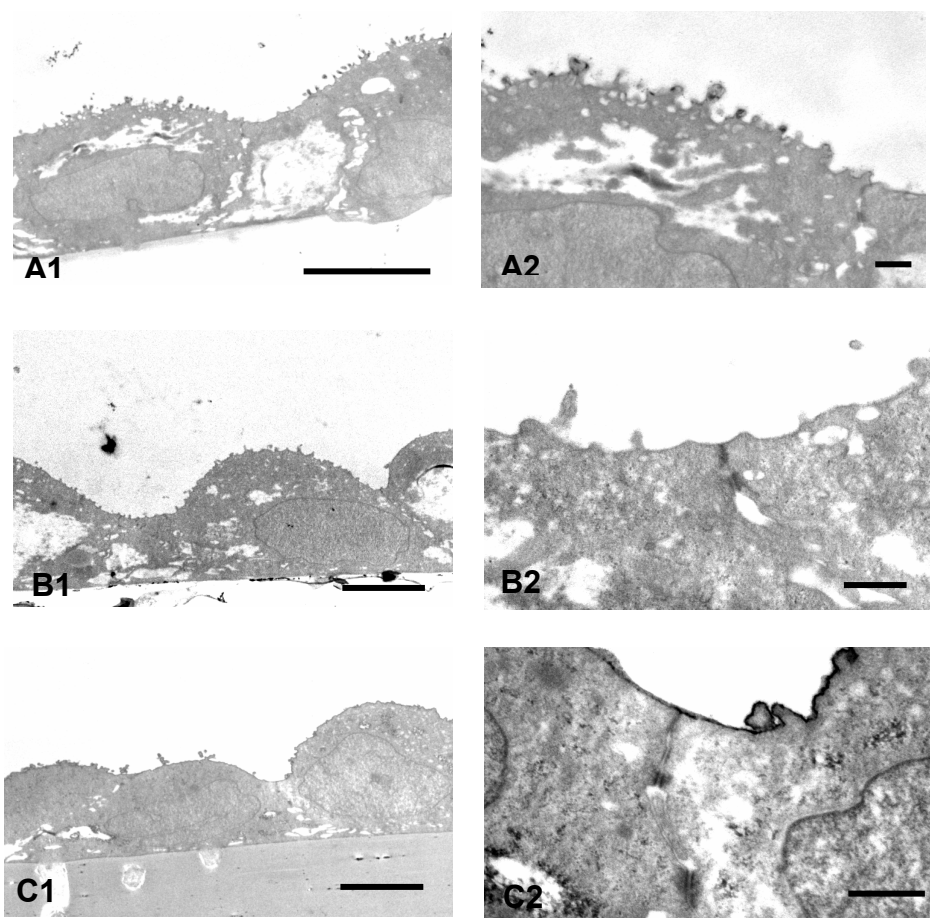


Abbildung 52: Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason auf permeablem Untergrund in IPEC-1. Die Kultivierung erfolgte in complete Medium (A), FCS-freiem Medium (B) und mit Dexamethason (C). Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Morphologie der Zellen festgestellt werden. In allen drei Fällen konnten Mikrovilli und Tight Junctions verzeichnet werden. (Balken [A1, B1, C1] = 5 µm; [A2, B2, C2] = 1 µm)

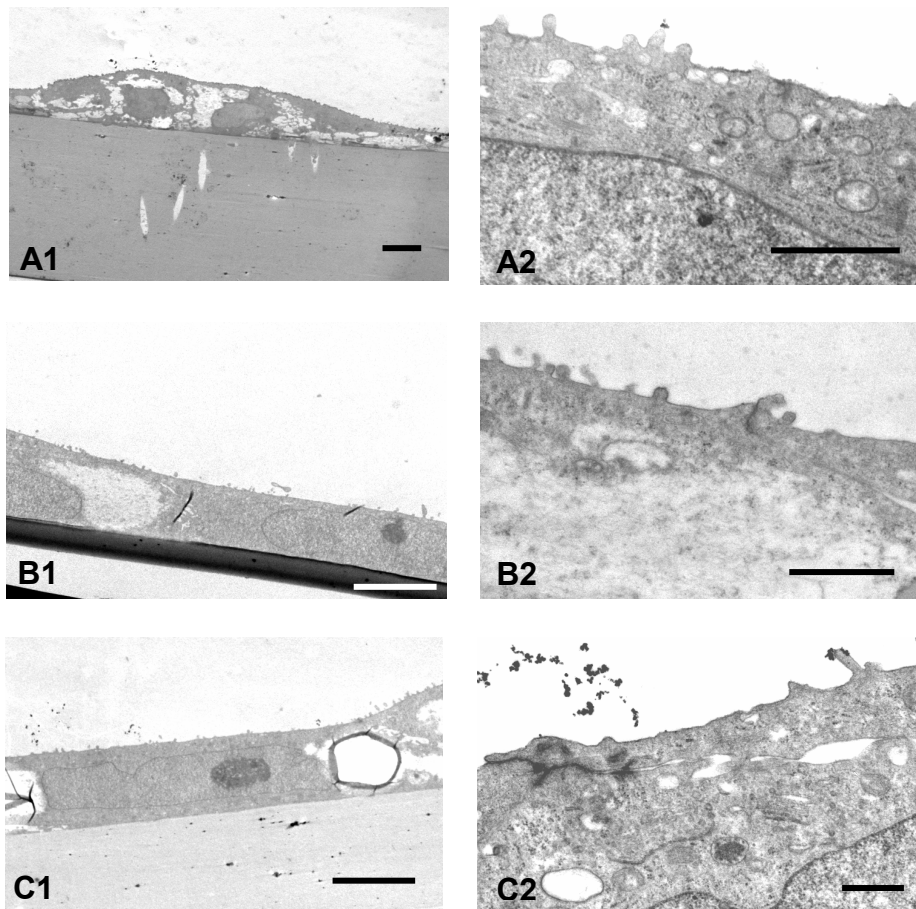


Abbildung 53: Differenzierung in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason auf permeablem Untergrund in IPEC-J2. Die Kultivierung in complete Medium (A), FCS-freiem Medium (B) und mit Dexamethason (C) zeigte keine Unterschiede bezüglich der Morphologie der Zellen. In allen 3 Fällen konnten Mikrovilli und Tight Junctions verzeichnet werden. (Balken [A1, B1, C1] = 5 µm; Balken [A2, B2, C2] = 1 µm)

3.4.1.8.2 Villin-Expression in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason

Beide Zelllinien wurden wie oben beschrieben kultiviert und Proteinproben gewonnen. In IPEC-1 konnte mit keinem Mediumzusatz Villin detektiert werden (Abb. 54). IPEC-J2 zeigte eine Villin-Expression unabhängig von den Mediumzusätzen.

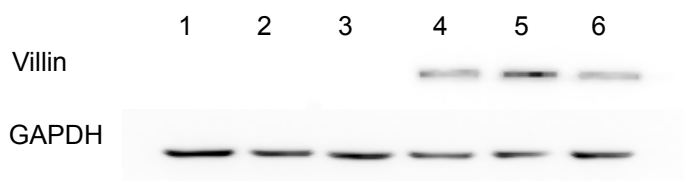


Abbildung 54: Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von FCS und Dexamethason. IPEC-1 (1-3) und IPEC-J2 (4-6) wurden auf permeablem Untergrund mit unterschiedlichen Mediumzusätzen herangezogen: 1) und 4) Dexamethason (in FCS-freiem Medium), 2) und 5) mit FCS (complete Medium) und 3) und 6) FCS-freies Medium. In IPEC-1 konnte kein Villin (80 kDa) detektiert werden. Die Zelllinie IPEC-J2 zeigte eine Expression unabhängig von den Mediumzusätzen. Die Kontrolle GAPDH wurde konstant exprimiert.

3.4.1.9 Hinweis auf Veränderungen im Energiestoffwechsel

3.4.1.9.1 GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene

Bei der Analyse von GAPDH mittels qPCR konnte zwischen beiden Zelllinien ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 55). IPEC-1 zeigte ein 3-fach, höheres GAPDH-mRNA-Level als IPEC-J2 ($p \leq 0,001$).

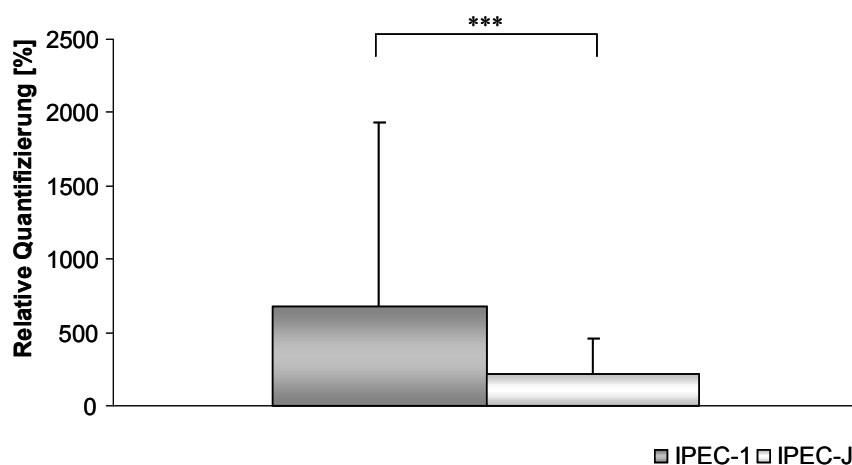


Abbildung 55: Kultivierung auf permeablem Untergrund – Veränderung von GAPDH auf mRNA-Ebene. IPEC-1 zeigte ein signifikant, 3-fach höheres GAPDH-mRNA-Level ($p \leq 0,001$) als IPEC-J2.

3.4.1.9.2 GAPDH-Expression auf Proteinebene

GAPDH wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung untersucht (Abb. 56). Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf das Alter der Zellen festgestellt werden. Am zweiten Tag ist die schwächere GAPDH-Bande auf die geringe Proteinmenge der subkonfluenten Zellen zurückzuführen.



Abbildung 56: Kultivierung auf permeablem Untergrund – GAPDH auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsalter. IPEC-1 (1-4) und IPEC-J2 (5-8) wurde an verschiedenen Tagen untersucht, um das Level an GAPDH (37 kDa) zu ermitteln: 1) und 5) Alter: 2 Tage, 2) und 6) Alter: 7 Tage, 3) und 7) Alter: 14 Tage, 4) und 8) Alter: 21 Tage.

3.4.1.10 Aufnahme von BSA-DyLight

IPEC-1 und IPEC-J2 wurden auf permeablem Untergrund kultiviert. Das Alter und die Behandlung entsprechen denen der ALI-Kulturen (Ausnahme: apikales Medium vorhanden). Nach Beendigung der Kultivierung wurde das vorhandene Medium abgesaugt. Es erfolgte eine apikale Zugabe von 50 µl BSA-DyLight und ein basaler Zusatz von 200 µl frischem FCS-freiem Medium. Nach einer Inkubation von 24 Stunden mit BSA-DyLight war das Protein apikal auf den Zellen, jedoch nicht intrazellulär nachweisbar (Abb. 57).

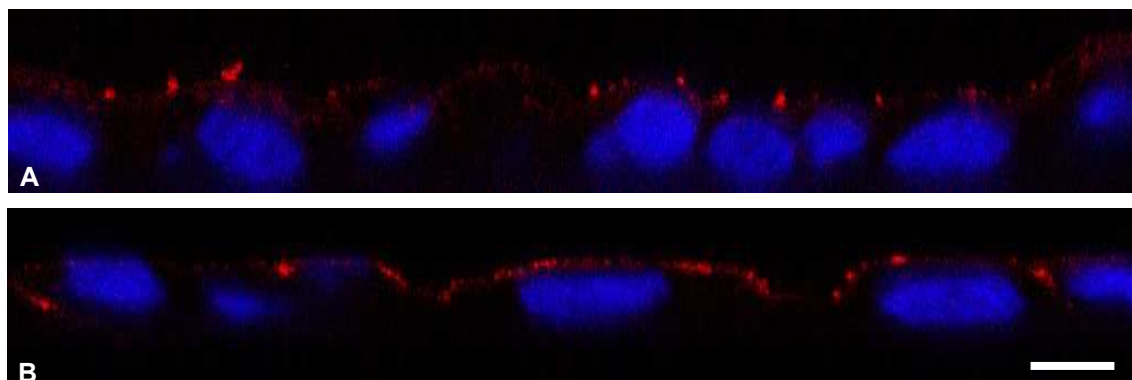


Abbildung 57: Kultivierung auf permeablem Untergrund – Aufnahme von BSA-DyLight in IPEC-1 und IPEC-J2. BSA-DyLight wurde für 24 Stunden apikal inkubiert. Das Protein war in beiden Zelllinien nur apikal auf den Zellen und nicht intrazellulär nachweisbar. (Balken = 5 μm)

3.4.2 Kultivierung als Air-Liquid Interface Kultur

Beide Zelllinien konnten erfolgreich als Air-Liquid Interface Kultur kultiviert werden. Das apikale Medium wurde für die Dauer von 21 Tagen entfernt. Zur Kontrolle wurden gleichzeitig Kulturen (siehe Kapitel 3.4.1) mitgeführt, welche nach dem Standardprotokoll herangezogen wurden. Nach 21 Tagen wurde das Experiment beendet.

3.4.2.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Der TEER wurde während der Kultivierung in regelmäßigen Abständen überprüft. Der Tag -10 kennzeichnet den Tag der Aussaat der Zellen und gibt somit den Eigenwiderstand der Membran wider. Nach 10 Tagen der konventionellen Kultivierung der Zellen wurde das apikale Medium entfernt. Dieser Zeitpunkt ist als Tag 0 definiert und gibt den Beginn der ALI-Kultur wieder. Der Schwellenwert von $1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ wurde während der ALI-Kultivierung nicht unterschritten (Abb. 58). Die IPEC-J2-Zellen hingegen zeigten niedrigere TEER-Werte im Vergleich zu den IPEC-1-Zellen.

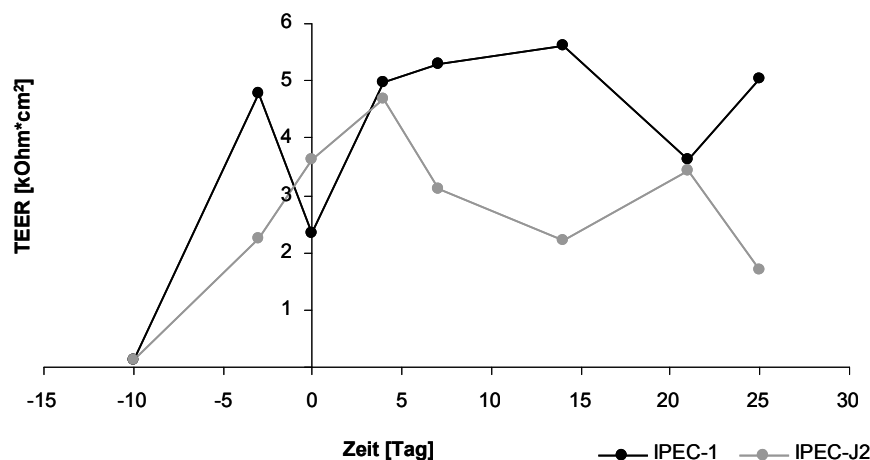


Abbildung 58: TEER-Verlauf der ALI-Kulturen. Beide Zelllinien zeigten einen TEER-Verlauf oberhalb von $1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$. Das apikale Medium wurde für die ALI-Kulturen entfernt. Dies wird durch den Tag 0 markiert..

3.4.2.2 ZO-1 und Zell-Zell-Kontakte

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungsprotokolle: A) impermeabler Untergrund, B) permeabler Untergrund, C) ALI-Kultur und D) *in vivo*, konnte eine Zunahme der Zellen pro Sichtfeld beobachtet werden (Abb. 59). Hierfür wurde die Markierung des Tight Junction-assoziierten Proteins ZO-1 hinzugezogen. Die Zelllinie IPEC-1 zeigte durch die Anwendung des ALI-Protokolls eine deutliche Annäherung der Zellfläche an *in vivo*. Die Zunahme der Zellen pro Sichtfeld und die damit einhergehende Verringerung der Zellfläche war bei der Zelllinie IPEC-J2 nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der Zelllinie IPEC-1.

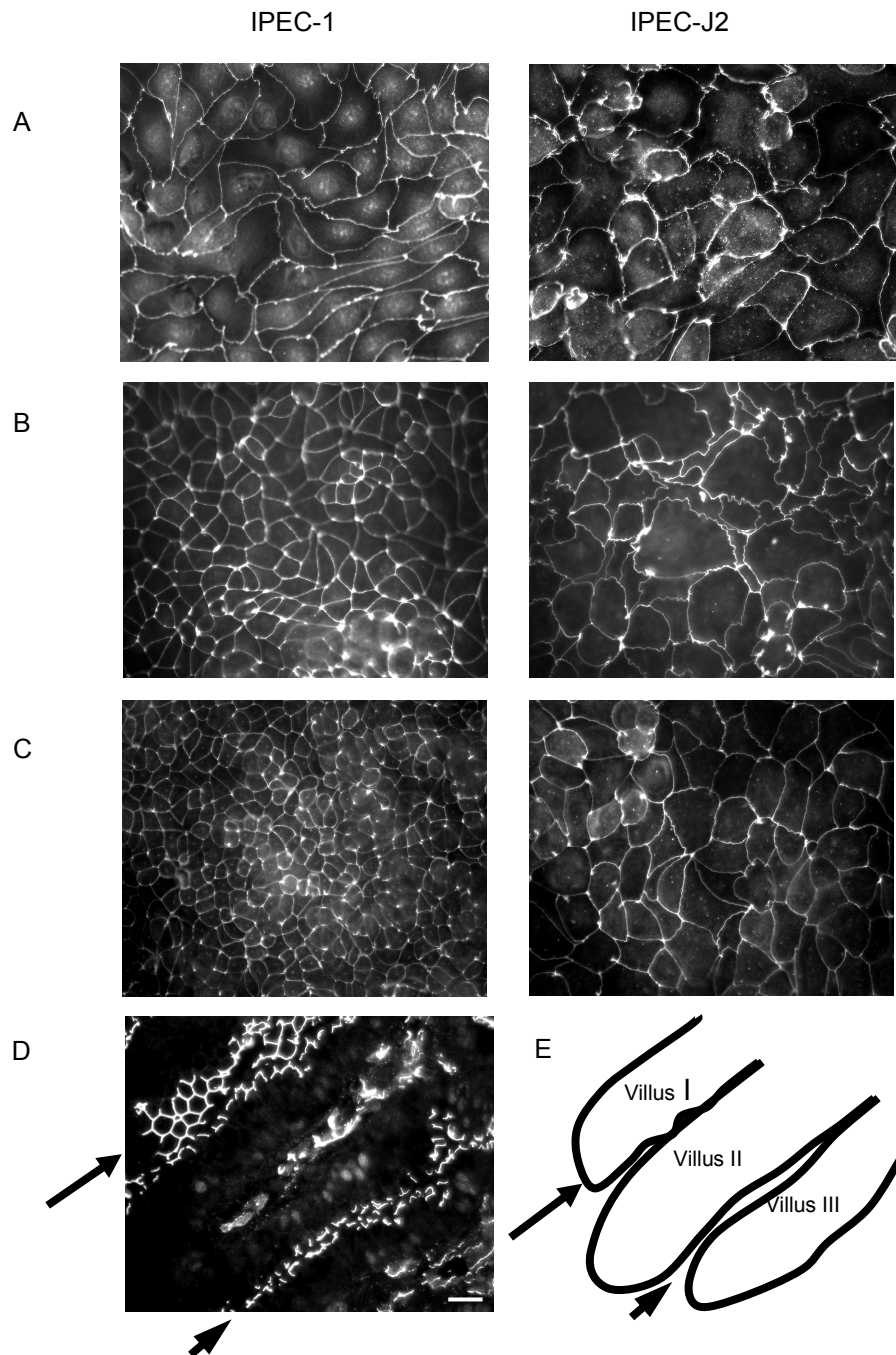


Abbildung 59: ZO-1 und Zell-Zell-Kontakte. Die Zelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 wurden auf unterschiedliche Weise kultiviert: A) impermeabler Untergrund, B) permeabler Untergrund, C) ALI-Kultur, D) *in vivo* und E) Beschreibung der in D) ausgewerteten Villi. Bei dem Vergleich der unterschiedlich kultivierten Zellen konnte eine Zunahme der Anzahl der Zellen pro Sichtfeld beobachtet werden. Dies war besonders deutlich bei den IPEC-1-Zellen. (Balken = 20 μm)

Des Weiteren konnte in den ALI-Kulturen von IPEC-1 im Vergleich zu den Kontrollen eine Akkumulation von ZO-1 im Bereich der trizellulären Kontakte (*tricellular contacts*) verzeichnet werden (Abb. 60). Die Analyse hierzu wurde mittels Image J durchgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder von ZO-1 wurden hierfür aufeinander abgeglichen, um die unterschiedlichen Kultivierungsprotokolle miteinander vergleichen zu können. Dabei ergaben sich folgende Parameter: *Threshold*: 190 (IPEC-1) und 230 (IPEC-J2), Pixelgröße: 1-300 (IPEC-1) und 100-99999 (IPEC-J2) und Zirkularität: 0,8-1,0 (IPEC-1) und 0,3-1,0 (IPEC-J2).

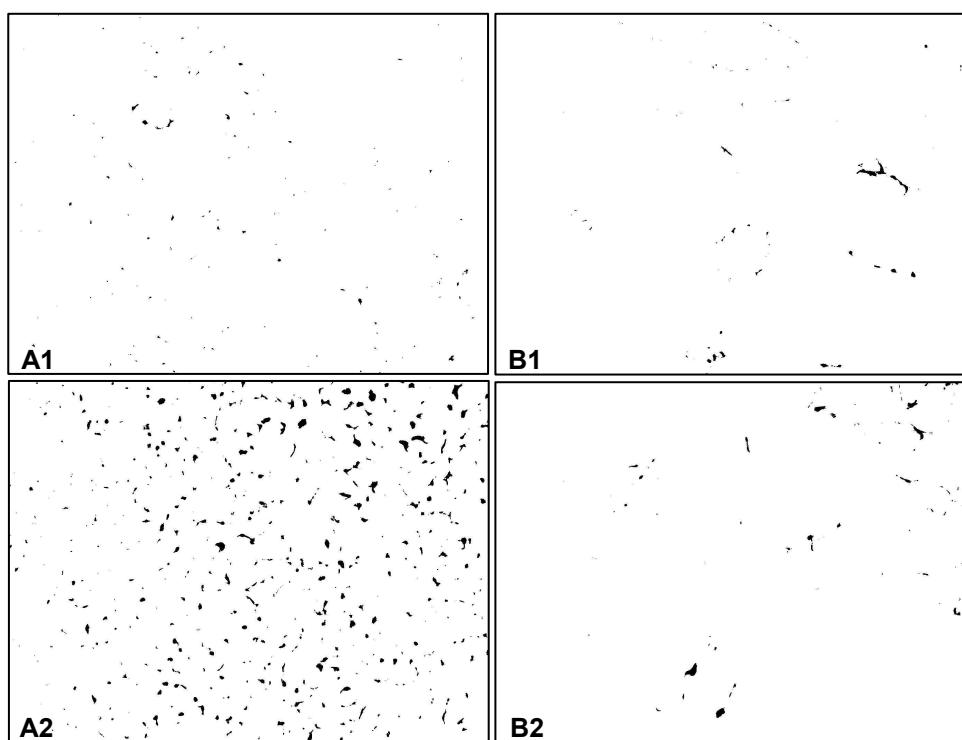


Abbildung 60: Analyse der Zell-Zell-Kontakte. IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) wurden unter dem Standardprotokoll (1; Kontrolle) und nach dem ALI-Protokoll (2) kultiviert. Es konnte eine Zunahme der Akkumulation von ZO-1 (A2) in den Kontaktstellen von drei Zellen bei IPEC-1 festgestellt werden.

Die Analyse mittels Image J ergab eine höhere Anzahl an trizellulären Kontakten bei dem Vergleich von IPEC-1-Zellen, welche auf permeablem Untergrund (= Kontrolle) und als ALI-Kultur herangezogen wurden. Dasselbe Ergebnis konnte für IPEC-J2-Zellen mit der Analyse von ZO-1 durch Image J nicht belegt werden (Abb. 61).

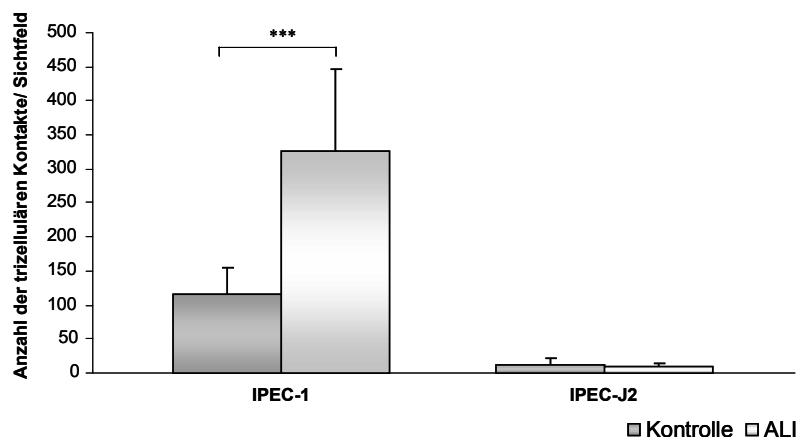


Abbildung 61: Trizelluläre Kontakte. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der ALI-Kultur und der Kultur auf permeablem Untergrund bei der Zelllinie IPEC-1 festgestellt werden ($p \leq 0,001$).

Legt man einem epithelialen Monolayer die hexagonalen Elementarzellen zu Grunde, welche der dichtesten Kugelpackung entsprechen, so muss jede Rand- beziehungsweise Eckzelle mit drei Zellen des unteren und drei Zellen des oberen Stockwerks in Verbindung treten. Unter der Annahme des Zylinders als Grundform für eine epitheliale Zelle kann man im Idealfall davon ausgehen, dass demzufolge 1 zentrale Zelle mit 6 Nachbarzellen (Abb. 62) sechs trizelluläre Kontakte bildet. Legt man dies zugrunde, so kann man jeder Zelle theoretisch zwei trizelluläre Kontakte zu ordnen. Bildet man nun das Verhältnis aus den ermittelten trizellulären Kontakten und der Zellzahl, erhält man für die Kontrollen bei IPEC-1 den Wert von 0,56 und für die ALI-Kulturen den Wert von 0,84 (Tab. 8). Der höchste Wert, welcher erreicht werden kann, ist 2 (pro Zelle 2 trizelluläre Kontakte). Die ALI-Kulturen entsprechen somit eher der optimalen und dichtesten Packungsform als die mitgeführten Kontrollen, die nach dem Standardprotokoll herangezogen wurden. Bei IPEC-J2 konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den ALI-Kulturen festgestellt werden (Tab. 8).

	IPEC-1	IPEC-J2
	Kontrolle	Kontrolle
trizelluläre Kontakte	116	12
Zellzahl pro Sichtfeld	207	87
Verhältnis	0,56	0,14
	ALI-Kultur	ALI-Kultur
Trizelluläre Kontakte	325	10
Zellzahl pro Sichtfeld	385	57
Verhältnis	0,84	0,18

Tabelle 8: Berechnung der theoretischen trizellulären Kontakte pro Zelle

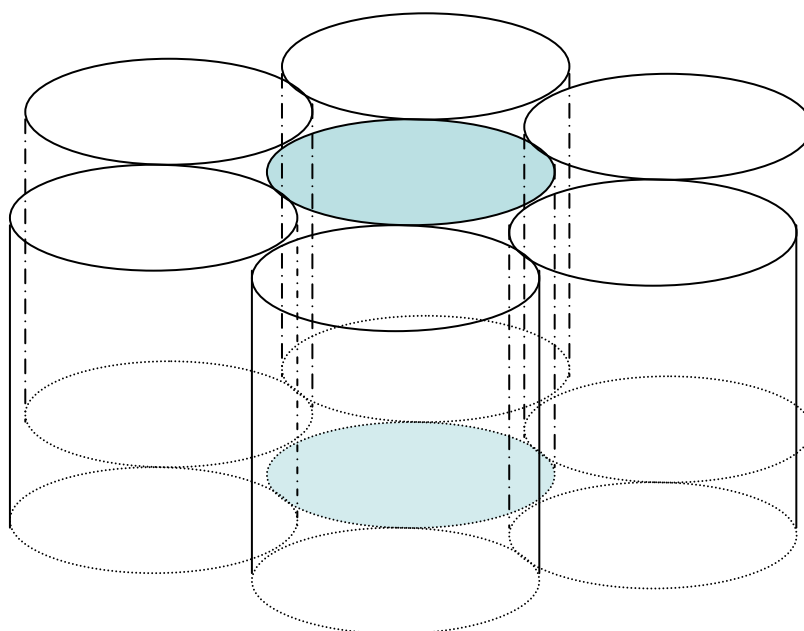


Abbildung 62: Die hexagonale Elementarzelle. Legt man den Zylinder als Grundform einer Epithelzelle zugrunde, so kann mit Hilfe der Elementarzelle die theoretische Anzahl an trizellulären Kontakte/Zelle bestimmt werden. Betrachtet man einen „unendlichen“ Zellrasen, so hat eine Zelle Anteil an 6 trizellulären Kontakten ($6 \cdot \frac{1}{3} = 2$). Damit ergeben sich bei einer optimalen Packung der Zellen 2 trizelluläre Kontakte pro Zelle.

3.4.2.3 Erhebung von morphologischen Daten

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungsprotokolle fällt eine deutliche Annäherung von IPEC-1 an die ermittelten *in vivo*-Werte auf (Tab. 9). Es kommt zur signifikanten Zunahme der Anzahl der Zellen pro $10\,000/\mu\text{m}^2$, des theoretisch berechneten Zellvolumens und der Schichtdicke in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund < permeabler Untergrund < ALI-Kultur. Des Weiteren konnte eine signifikante Abnahme der Zell- und Zellkernfläche in der gleichen Reihenfolge verzeichnet werden. Diese morphologischen Veränderungen konnten durch Aufnahmen der Elektronenmikroskopie bestätigt werden (Abb. 63). Beim Vergleich beider Zelllinien zeigte IPEC-1 einen eher „blasenförmigen“ Phänotyp. IPEC-J2 stellte sich flacher und langgestreckt im Vergleich zu IPEC-1 dar. Die Zellkerne der IPEC-1-ALI-Kulturen lagen basal. Für IPEC-J2 konnte dies nicht bestätigt werden. Hier konnten zentralständige Zellkerne beobachtet werden (Abb. 63). Des Weiteren zeigte die Zelllinie IPEC-J2 keine signifikante Zunahme der Zellen/ $10\,000\ \mu\text{m}^2$. Im Gegensatz hierzu ergab sich eine signifikante Abnahme der Zell- und der Zellkernfläche in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur. Eine Zunahme der Schichtdicke und des hypothetischen Zellvolumens konnten in dergleichen Reihenfolge beobachtet werden. Für die Berechnung des Zellvolumens wurde die Annahme getätigt, dass es sich bei der Zellform um einen Zylinder handelt. Mit Hilfe der Formel für die Volumenberechnung eines Zylinders ($V = \pi r^2 h$) konnte das hypothetische Zellvolumen ermittelt werden. Dieses zeigte auch bei IPEC-1 eine signifikante Zunahme in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund < permeabler Untergrund < ALI-Kultur.

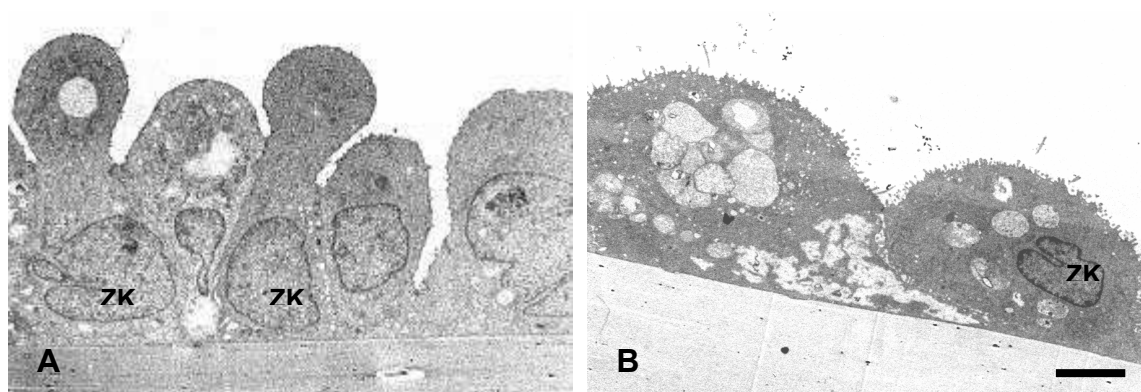


Abbildung 63: Kultivierung von beiden Zelllinien als Air-Liquid Interface Kultur – Phänotyp. Eine Zunahme der Schichtdicke konnte sowohl bei den IPEC-1- (A) als auch bei den IPEC-J2-Zellen (B) detektiert werden. Die Erhöhung der Schichtdicke war bei den IPEC-1-Zellen durch einen „blasenförmigen“ Phänotyp gekennzeichnet. Die Zellkerne (ZK) befanden sich in den IPEC-1-Zellen basal und in den IPEC-J2-Zellen zentral.

	IPEC-1			
	Impermeabler Untergrund	Permeabler Untergrund	ALI-Kultur	Darm <i>in vivo</i>
Anzahl der Zellen/10000 μm^2	16.98 \pm 2.41 ^a	58.8 \pm 10.31 ^{ab}	109.01 \pm 21.97 ^{bc}	169.76 \pm 73.81 ^c
Zellkernfläche [μm^2]	122.05 \pm 24.33 ^a	70.65 \pm 16.09 ^b	39.93 \pm 9.33 ^c	39.94 \pm 10.69 ^d
Zellfläche [μm^2]	683.35 \pm 571.36 ^a	172.54 \pm 56.99 ^b	72.91 \pm 25.43 ^c	55.1 \pm 25.44 ^c
Schichtdicke [μm]	3.75 \pm 2.15 ^a	10.54 \pm 2.69 ^b	17.41 \pm 5.07 ^c	23.67 \pm 3.96 ^d
Hypothetisches Zellvolumen [μm^3]	324.34	490.80	527	622.86
	IPEC-J2			
	Impermeabler Untergrund	Permeabler Untergrund	ALI-Kultur	Darm <i>in vivo</i>
Anzahl der Zellen / 10000 μm^2	8.58 \pm 2.54 ^a	16.19 \pm 2.63 ^a	24.67 \pm 6.04 ^a	146.29 \pm 79.31 ^b
Zellkernfläche [μm^2]	167.5 \pm 52.8 ^a	143.15 \pm 40.34 ^b	117.26 \pm 26 ^c	39.52 \pm 11.44 ^d
Zellfläche [μm^2]	1309.84 \pm 774.75 ^a	587.83 \pm 325.3 ^b	461.59 \pm 212.39 ^c	56.63 \pm 26.41 ^d
Schichtdicke [μm]	3.47 \pm 2.27 ^a	7.31 \pm 2.44 ^b	8.09 \pm 2.98 ^c	23.24 \pm 3.91 ^d
Hypothetisches Zellvolumen [μm^3]	445.2	628.17	616.15	619.98

Tabelle 9: Erhebung morphologischer Daten – Vergleich der verschiedenen Kultivierungsprotokolle. Die hochgestellten Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kultivierungsprotokollen einschließlich der *in vivo*-Daten.

3.4.2.4 Veränderungen des Zellkern-Zell-Verhältnisses

Im ersten Schritt wurde aus der ermittelten Zellfläche der Radius bestimmt. Dies erfolgte unter der Annahme, dass es sich bei der Zellform um einen handelt Zylinder handelt. Der daraus gewonnene Radius und die Schichtdicke wurden zur Berechnung des Volumens ($V = \pi r^2 h$) herangezogen. Als Grundform für den Zellkern wurde die Kugel ($V = \frac{4}{3} \pi r^3$) gewählt. Das Volumen des Zellkernes und das der Zelle wurden dann ins Verhältnis gesetzt. Es konnte bei beiden Zelllinien eine Abnahme des Zellkern-Zell-Verhältnisses in Abhängigkeit des Untergrundes beziehungsweise des Kultivierungsprotokolles in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur beobachtet werden (Tab. 10).

	impermeabler Untergrund		permeabler Untergrund		ALI-Kultur	
	IPEC-1	IPEC-J2	IPEC-1	IPEC-J2	IPEC-1	IPEC-J2
Kernfläche [μm^2]	122,5	167,5	70,65	143,15	39,9	117,2
Volumen des Kerns [μm^3]	127,5	114,76	31,41	90,32	13,31	67
Zellfläche [μm^2]	683	1310	172,5	587,8	73	462
Volumen der Zelle [μm^3]	324,5	445	490,8	628,17	527	616,15
Verhältnis Zellkern/Zelle	0,39	0,25	0,06	0,14	0,03	0,1

Tabelle 10: Veränderung des Nukleus-Zell-Verhältnisses. Zur Berechnung des Volumens des Zellkernes wurde als Grundform die Kugel gewählt. Aus der Messung der Kernfläche konnte der Radius und damit das Volumen ($V = \frac{4}{3} \pi r^3$) berechnet werden.

3.4.2.5 Phänotyp unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen

Das theoretische Zellvolumen konnte durch die ermittelte Fläche der Zellen und durch die Schichtdicke berechnet werden. Anhand der vorhandenen Daten konnte im Anschluss ein Modell entwickelt werden (Abb. 64). Als Grundform einer Epithelzelle wurde der Zylinder ($V = \pi r^2 h$) gewählt. Die Zelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten beide morphologische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Flache, langgestreckte Zellen konnten auf impermeablem Untergrund beobachtet werden. Eine deutliche Veränderung des Phänotyps konnte bei der Kultivierung auf Membranen detektiert werden.

IPEC-1 und IPEC-J2 wiesen eine Erhöhung der Schichtdicke und eine Verringerung des Durchmessers der Zellen auf. Diese Anpassung an den Phänotyp von intestinalen Epithelzellen *in vivo* wurde durch die Kultivierung als Air-Liquid Interface Kultur gesteigert. Eine weitere Zunahme der Zellhöhe und eine zusätzliche Reduktion der Zellfläche wurden verzeichnet, wobei diese morphologische Anpassung an die *in vivo*-Situation deutlicher bei IPEC-1 als bei IPEC-J2 ausgeprägt war.

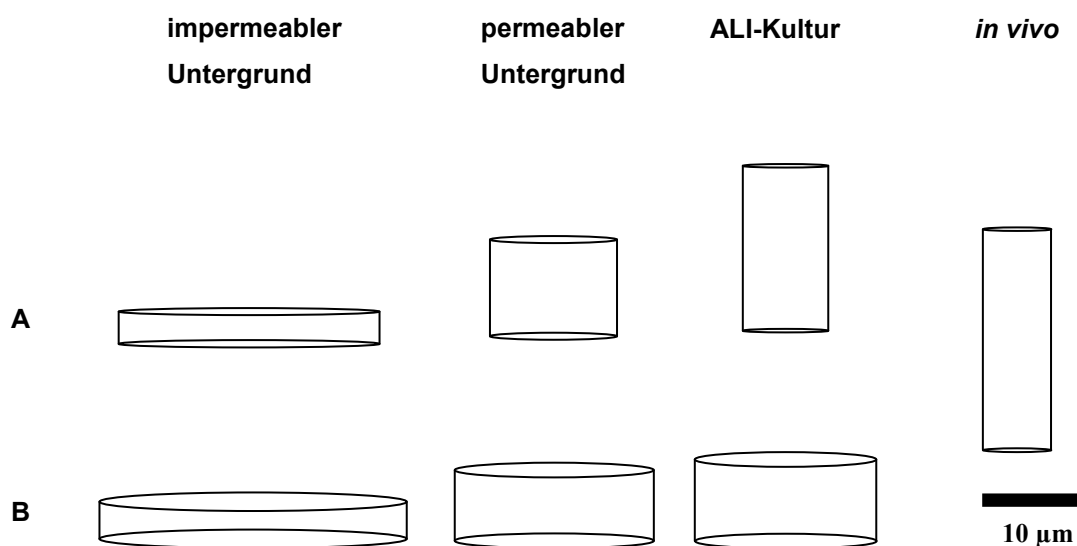


Abbildung 64: Schema der morphologischen Entwicklung unterschiedlich kultivierter intestinalen Epithelzellen. IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) wurden auf verschiedene Weise kultiviert: a) impermeabler Untergrund, b) permeabler Untergrund und c) als ALI-Kultur. Es konnte eine Annäherung an den Phänotyp *in vivo* beobachtet werden. Dies war bei IPEC-1 deutlicher ausgeprägt.

3.4.2.6 Nachweis des Anteils an proliferierenden Zellen

Der Nachweis erfolgte mittels BrdU-Einbau (Abb. 65). Beim Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wurde in IPEC-1 eine signifikante Abnahme der Proliferation in der Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur festgestellt (Abb. 66). Bei IPEC-J2 konnte zwar eine Abnahme der Proliferation in der Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur beobachtet werden, jedoch war diese nicht signifikant.

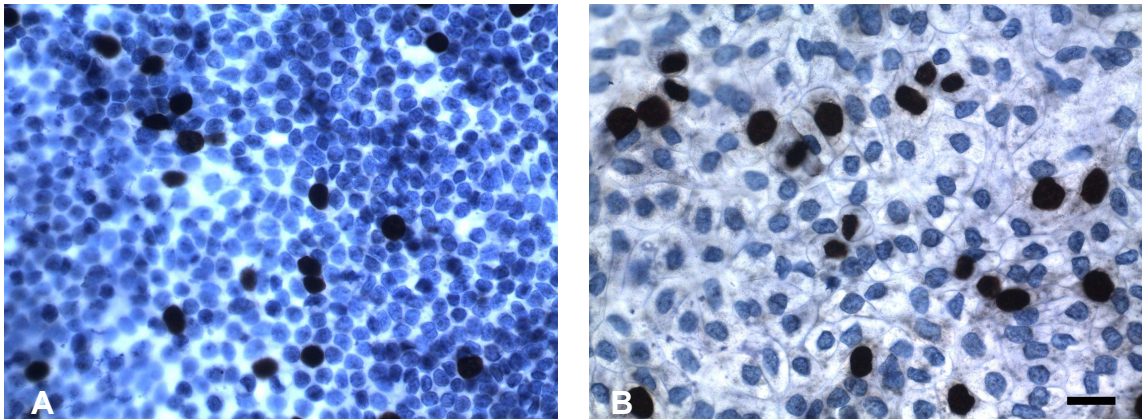


Abbildung 65: Nachweis von proliferierenden Zellen in den ALI-Kulturen. IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) wurden mit BrdU inkubiert, fixiert und mit anti-BrdU gefärbt. Die Kulturen wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die proliferierenden Zellen sind braun und die BrdU-negativen Zellen blau dargestellt.

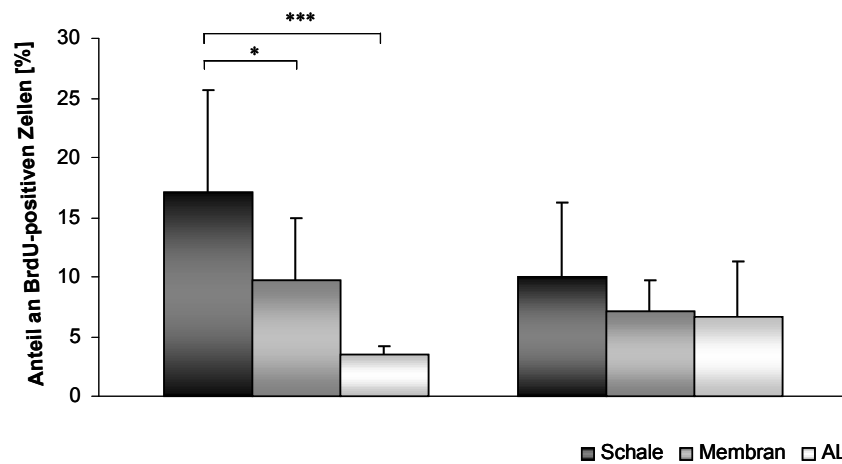


Abbildung 66: Vergleich des Anteil an proliferierenden Zellen zwischen den einzelnen Kultivierungsprotokollen. In IPEC-1 konnte eine signifikante Abnahme der Proliferation in der Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur beobachtet werden. In IPEC-J2 war eine Abnahme zu verzeichnen.

3.4.2.7 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf RNA-Ebene

In beiden Zelllinien konnten GAPDH, Occludin, ZO-1, CK18, Aktin, Mucin-1, SGLT-1, Claudin-3 und Claudin-4 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 67). Zwischen beiden Zelllinien ergab sich ein Unterschied im mRNA-Signal von Villin-1 und SGLT-1. Villin zeigte nur ein sehr schwaches Signal in den ALI-Kulturen von IPEC-1. SGLT-1 hingegen war in IPEC-J2 sehr schwach bis gar nicht nachweisbar.

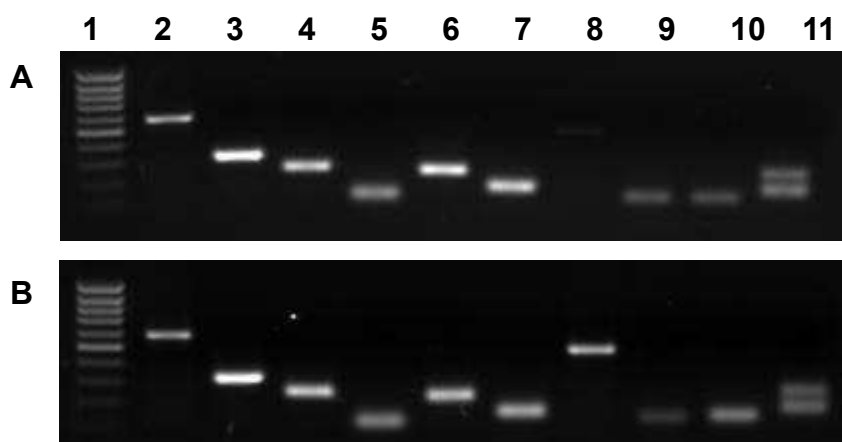


Abbildung 67: ALI-Kultur - Expressionsanalyse verschiedener Marker der intestinalen Barriere in IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) auf mRNA-Ebene. Verschiedene Marker wurden auf mRNA-Ebene für beide Zelllinien nachgewiesen: 1) Marker, 2) GAPDH, 3) Occludin, 4) ZO-1, 5) CK18, 6) β -Aktin, 7) Mucin-1, 8) Villin-1, 9) SGLT-1, 10) Claudin-3 und 11) Claudin-4. In IPEC-1 konnte nur ein schwach positives Signal an Villin-mRNA festgestellt werden.

3.4.2.8 Nachweis wichtiger Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene

Beide Zelllinien wurden auf verschiedene Marker der intestinalen Barriere in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll untersucht. Es konnten keine Unterschiede beim Vergleich von ZO-1, CK18 und Claudin-4 festgestellt werden (Abb. 68). Da Unterschiede in der Ausprägung von GAPDH beobachtet wurden, wurde β -Aktin als Kontrolle verwendet (siehe 3.4.2.7.2). Hier ergaben sich keine Unterschiede in der Ausprägung zwischen den Kultivierungsprotokollen.

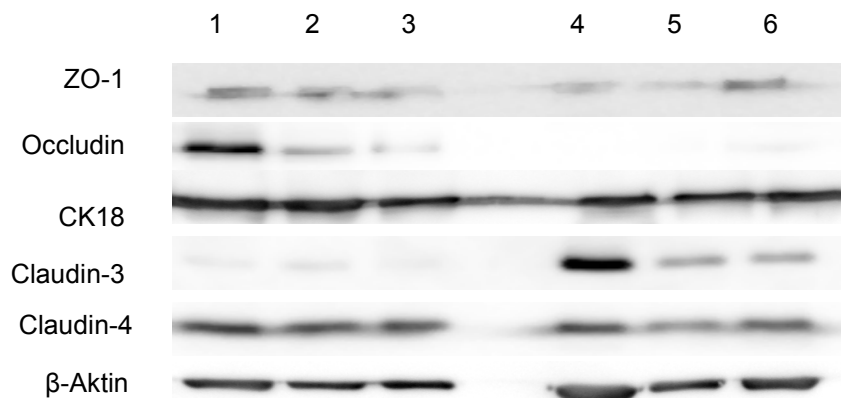


Abbildung 68: Expression verschiedener Marker der intestinalen Barriere auf Proteinebene in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll. IPEC-1 (1-3) und IPEC-J2 (4-6) wurden nach unterschiedlichen Protokollen kultiviert: 1) und 4) auf impermeablen Untergrund 2) und 4) auf konventionellen Membranen, 3) und 6) als ALI-Kultur. ZO-1 (225 kDa), Occludin (65 kDa), CK18 (50 kDa), Claudin-3 (22 kDa) und Claudin-4 (22 kDa) konnten mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde β -Aktin (36 kDa) verwendet. Occludin konnte nur schwach in IPEC-J2 unabhängig vom Kultivierungsprotokoll nachgewiesen werden.

3.4.2.9 Villin als Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von der Kultivierung

3.4.2.9.1 Villin-Expression auf mRNA-Ebene

IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten beide eine signifikante Erhöhung des Villin-mRNA-Niveaus vom impermeablen Untergrund zum permeablen Untergrund (IPEC-1: $p \leq 0,001$; IPEC-J2: $p \leq 0,01$; Abb. 69). In IPEC-1 konnte auch eine signifikante Erhöhung des mRNA-Niveaus in der ALI-Kultur im Vergleich zum impermeablen Untergrund festgestellt werden ($p \leq 0,001$). Eine Tendenz der Zunahme des Villin-mRNA-Niveaus zwischen impermeablen Untergrund und ALI-Kultur war in IPEC-J2 zu verzeichnen ($p = 0,085$).

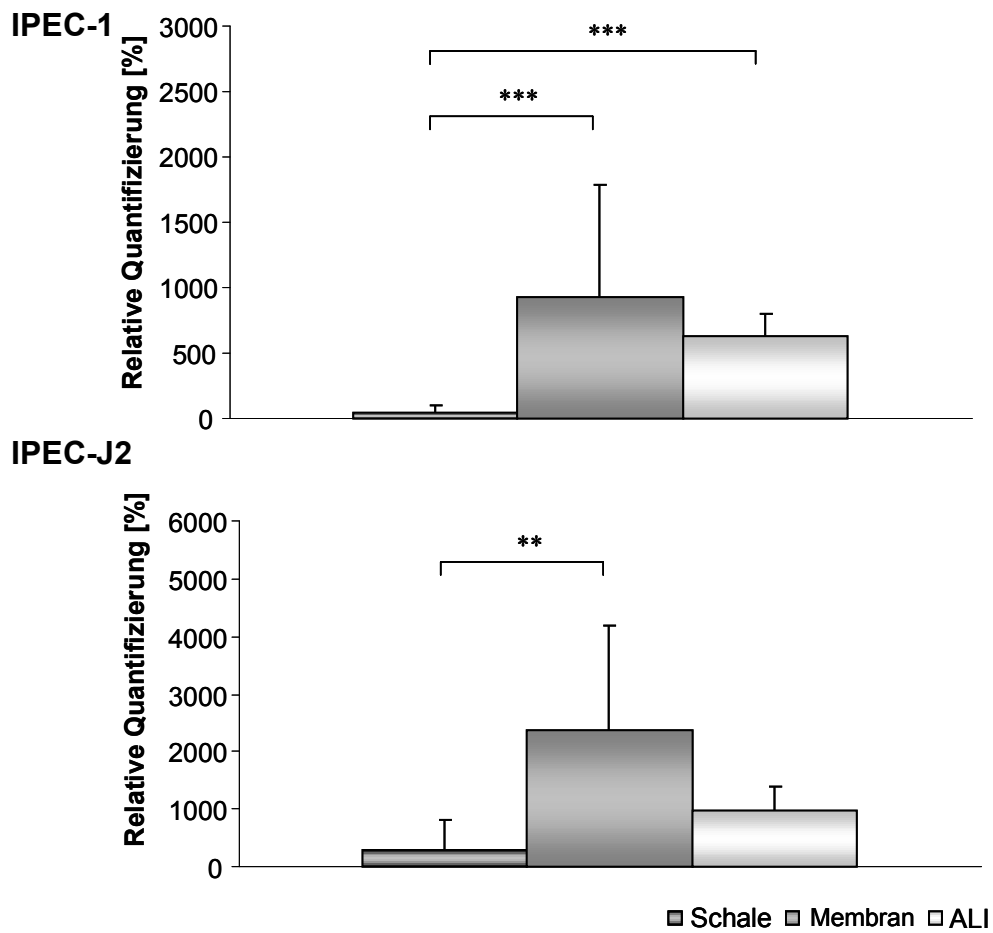


Abbildung 69: Vergleich des Villin-mRNA-Niveaus in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll. IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten eine signifikante Erhöhung des Villin-mRNA-Niveaus zwischen impermeablen und permeablen Untergrund (IPEC-1 = $p \leq 0,001$; IPEC-J2 = $p \leq 0,01$). Bei den IPEC-1-Zellen war auch eine signifikante Zunahme bei Vergleich vom impermeablen Untergrund und der ALI-Kultur zu verzeichnen.

3.4.2.9.2 Villin-Expression auf Proteinebene

Expression des Proteins Villin

Eine Expression des Proteins Villin war in IPEC-J2 unabhängig von dem Kultivierungsprotokoll nachweisbar (Abb. 70). Die Zelllinie IPEC-1 hingegen zeigte keine Expression auf impermeablem und permeablem Untergrund. In den ALI-Kulturen konnte eine schwache Villin-Expression festgestellt werden. Da in vorhergehenden Versuchen Veränderungen in der GAPDH-Expression zu verzeichnen waren, wurde β -Aktin als Kontrolle verwendet.

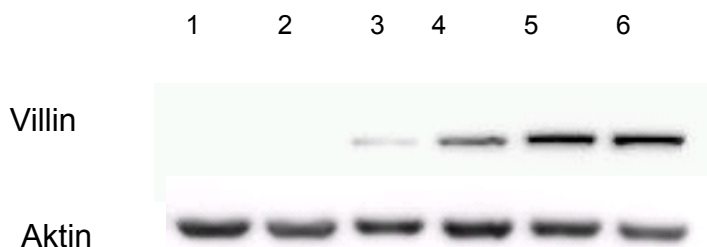


Abbildung 70: Expression des Proteins Villin in Abhängigkeit von der Kultivierungsart. Beide Zelllinien – IPEC-1 (1-3) und IPEC-J2 (4-6) – wurden auf unterschiedliche Art und Weise kultiviert: 1) und 4) impermeabler Untergrund, 2) und 5) permeabler Untergrund, 3) und 6) als ALI-Kultur. IPEC-J2 zeigte unabhängig von der Kultivierungsart eine Villin-Expression (80 kDa). In IPEC-1 konnte Villin nur in den ALI-Kulturen nachgewiesen werden. β -Aktin (36 kDa) wurde als Kontrolle verwendet und war gleichmäßig exprimiert.

Lokalisation des Proteins Villin

Da in IPEC-1 nur eine schwache Villin-Expression mittels Western Blot nachweisbar war, wurde nur IPEC-J2 mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (Abb. 71). In IPEC-J2 konnte eine spezifische Lokalisation des Proteins Villin festgestellt werden. Dieses Protein konnte nur an der apikalen Membran der Zellen beobachtet werden.

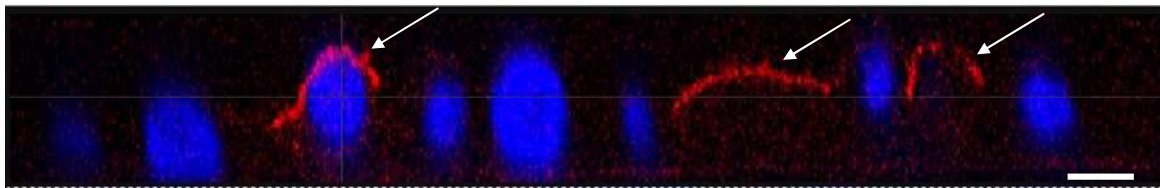


Abbildung 71: Villin-Expression in IPEC-J2-ALI-Kulturen. Es konnte eine spezifische Lokalisation des Villin-Proteins an der apikalen Membran der Zellen festgestellt werden (Pfeile). (Balken = 5µm)

3.4.2.10 Hinweis auf Veränderungen im Energiestoffwechsel in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll

3.4.2.10.1 GAPDH-Expression auf mRNA-Ebene

Es konnten Veränderungen im GAPDH-mRNA-Level in IPEC-1 beobachtet werden (Abb. 72). Es war sowohl ein signifikanter Anstieg vom impermeablen zum permeablen Untergrund ($p \leq 0,05$) als auch ein signifikanter Abfall beim Vergleich vom permeablen Untergrund und der ALI-Kultur ($p \leq 0,05$) zu verzeichnen. IPEC-J2 zeigte hingegen nur geringfügige Schwankungen im GAPDH-mRNA-Level.

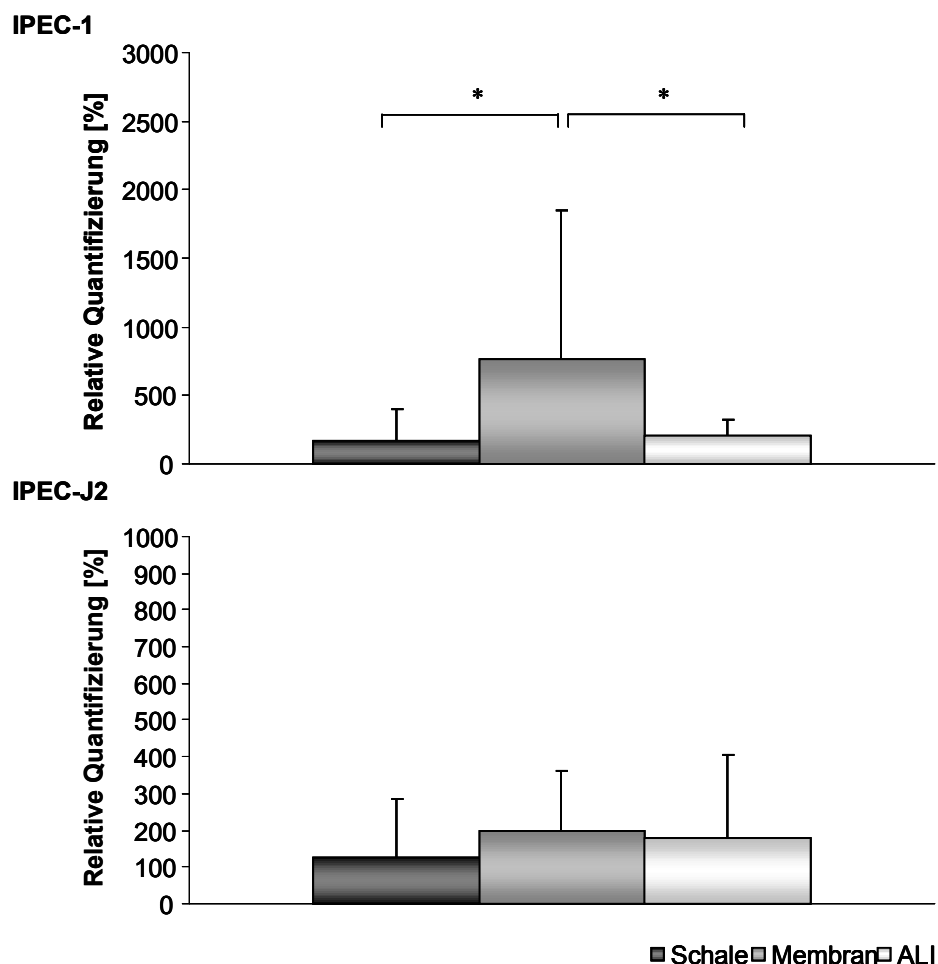


Abbildung 72: Veränderungen der GAPDH-Expression in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll. In IPEC-1 konnte ein signifikanter Anstieg ($p \leq 0,05$) des GAPDH-mRNA-Niveaus zwischen impermeablen Untergrund und permeablen Untergrund verzeichnet werden. Bei dem Vergleich vom permeablen Untergrund und der ALI-Kultur wurde in IPEC-1 eine signifikante Abnahme gefunden. In IPEC-J2 hingegen wurden auf mRNA-Niveau nur geringfügige Schwankungen beobachtet.

3.4.2.10.2 GAPDH-Expression auf Proteinebene

Es konnte in beiden Zelllinien eine Abnahme des GAPDH-Proteins in den ALI-Kulturen beobachtet werden (Abb. 73). Die Kultivierung auf impermeablem Untergrund und permeablem Untergrund zeigte eine konstante Ausprägung. β -Aktin wurde als Kontrolle verwendet. Hier konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsbedingungen festgestellt werden.

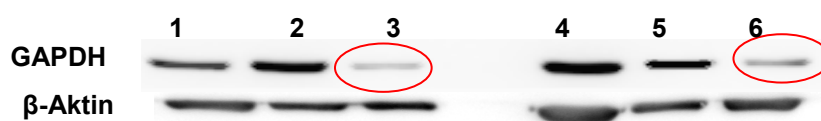


Abbildung 73: Veränderungen der GAPDH-Protein-Expression in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll. Es konnte in IPEC-1 (1-3) und in IPEC-J2 (4-5) eine Abnahme des GAPDH-Proteins (37 kDa) in den ALI-Kulturen (3 und 6) verzeichnet werden. Die Kultivierung auf impermeablem (1) und permeablem Untergrund (2) zeigte eine konstante Ausprägung in IPEC-1. In IPEC-J2 konnte kein Unterschied zwischen impermeablen (4) und permeablen (5) Untergrund festgestellt werden. β -Aktin (36 kDa) wurde als Kontrolle verwendet und war gleichmäßig exprimiert.

3.4.2.11 Wirkung von DON auf ALI-Kulturen

Für die Untersuchung der Wirkung des Mycotoxins Deoxynivalenol wurden sowohl Kontrollen (Kultivierung auf permeablem Untergrund) als auch ALI-Kulturen herangezogen. Der statistische Vergleich erfolgte zwischen den DON-behandelten und den unbehandelten Zellen. In den IPEC-1-ALI-Kulturen konnte mit DON 2000 ng/ml basolateral ein signifikanter Abfall des TEERs schon nach 24 Stunden beobachtet werden (Abb. 74; $p \leq 0,05$). Dieser Abfall wurde erst nach 48 Stunden in den konventionellen Membrankulturen beobachtet ($p \leq 0,05$). Die niedrige DON-Konzentration von 200 ng/ml apikal verursachte einen signifikanten Anstieg des TEERs in den ALI-Kulturen von IPEC-1 zum Zeitpunkt 48 ($p \leq 0,05$) und 72 ($p \leq 0,01$) Stunden.

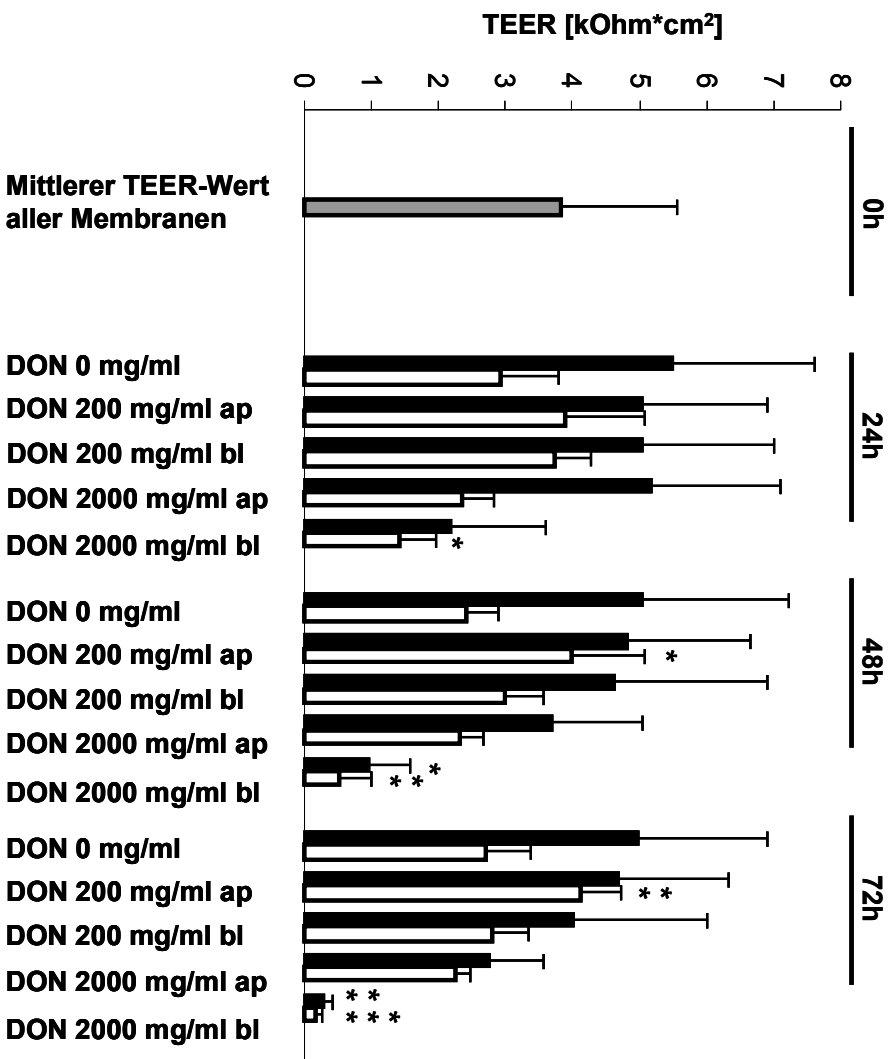


Abbildung 74: Wirkung von Deoxyvalenol auf den TEER in IPPEC-1. Zu Beginn des Versuches wurde der TEER-Wert aller Membranen überprüft und gemittelt (3,7 kOhm*cm²; grauer Balken; 24-Well-Inserts). Ein signifikanter TEER-Abfall konnte in den ALI-Kulturen (weiße Balken) schon ab 24 Stunden (DON 2000bi) beobachtet werden. Ein signifikanter Anstieg war in den ALI-Kulturen ab 48 Stunden (DON 200ap) nachweisbar. Ein Abfall des TEERs in den Kulturen, welche unter Standardbedingungen (schwarze Balken) herangezogen wurden, war ab 48 Stunden (DON 2000bi; p<0,05) zu verzeichnen.

In IPEC-J2 konnte bei der Applikation von der niedrigen DON-Konzentration kein signifikanter Anstieg des TEERs verzeichnet werden (Abb. 75). Ein Abfall des TEERs nach der Applifikation hoher DON-Konzentrationen von basolateral war in den Kontrollen (permeabler Untergrund) schon ab 24 Stunden (DON 2000bl; $p \leq 0,01$) und in den ALI-Kulturen erst nach 48 Stunden (DON 2000bl; $p \leq 0,01$) zu beobachten.

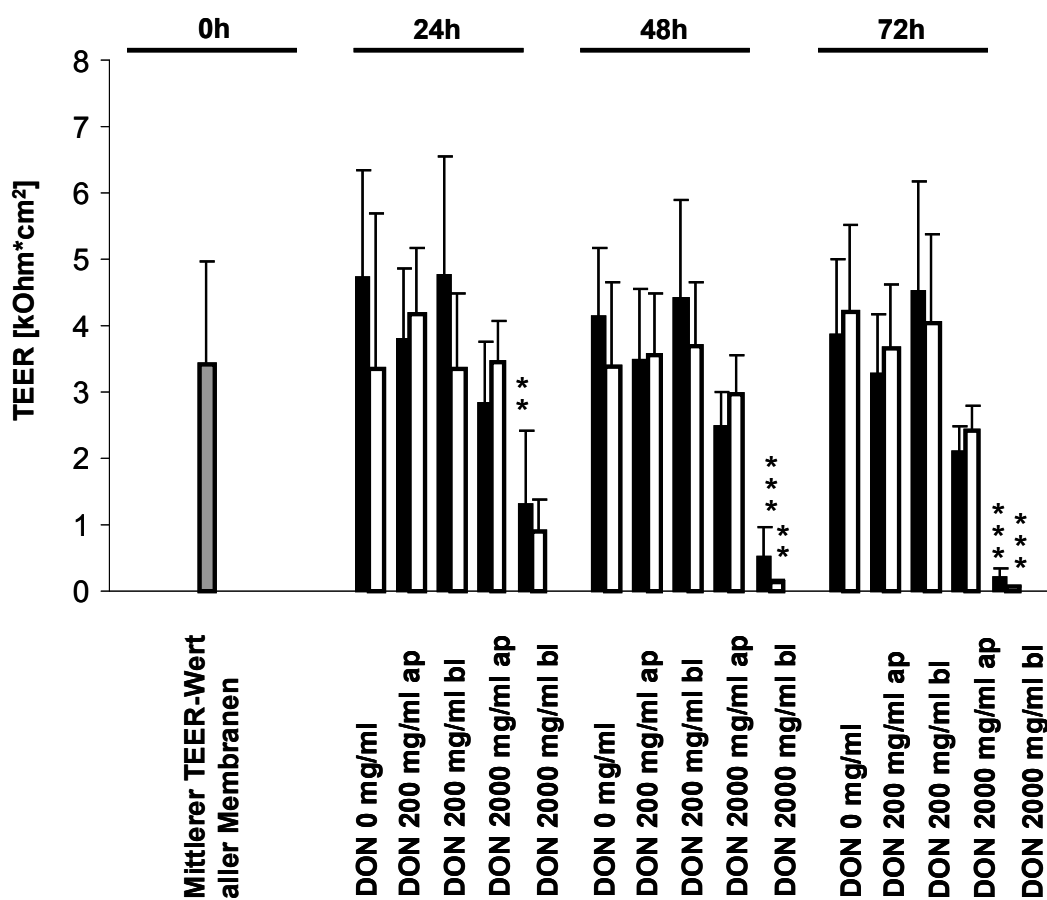


Abbildung 75: Wirkung von Deoxynivalenol auf den TEER in IPEC-J2. Zum Zeitpunkt 0h wurden die TEER-Werte aller Membranen bestimmt und gemittelt (3,4 kOhm*cm²; grauer Balken; 24-Well-Inserts). Ein signifikanter TEER-Abfall konnte in den ALI-Kulturen (weiße Balken) erst ab 48 Stunden (DON 2000bl; $p \leq 0,01$) beobachtet werden. Ein signifikanter Anstieg war weder in den ALI-Kulturen noch in den Kulturen, welche nach Standardbedingungen (schwarze Balken) kultiviert wurden, zu verzeichnen.

3.4.2.12 Einsatz von MAP-Kinase-Inhibitor U0126

3.4.2.12.1 Morphologische Untersuchung

Der MAP-Kinase-Inhibitor U0126 wurde den ALI-Kulturen basal zum Medium zugesetzt. Zeitgleich wurden ALI-Kulturen mitgeführt, denen kein Inhibitor zugegeben wurde. Diese Kulturen wurden mittels Elektronenmikroskopie ausgewertet. Es konnte in IPEC-1 und IPEC-J2 kein morphologischer Unterschied zwischen den ALI-Kulturen und den ALI-Kulturen, denen U0126 zugesetzt wurde, festgestellt werden (Abb.76 und 77). Auch bei der Ausbildung der Tight Junctions konnten keine Unterschiede verzeichnet werden.

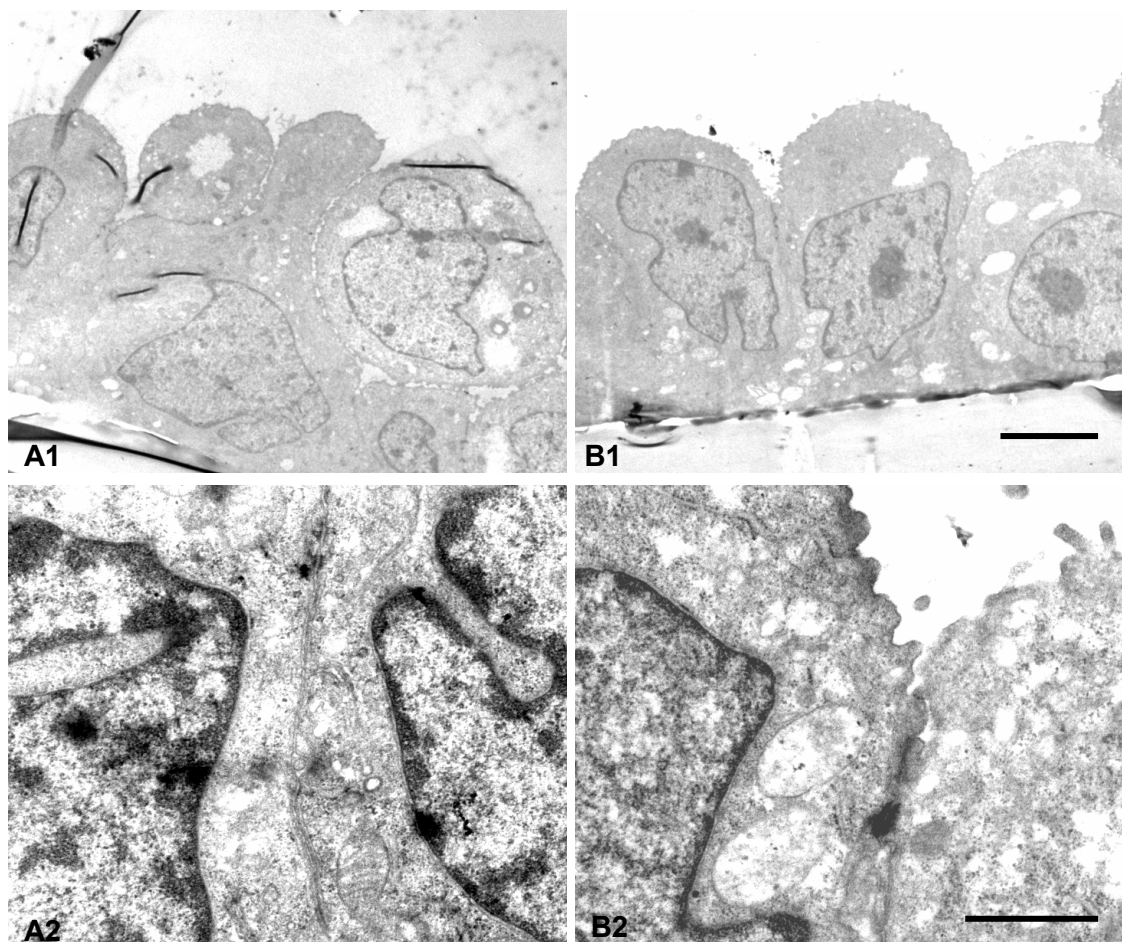


Abbildung 76: Morphologische Untersuchung von U0126 behandelten IPEC-1-Zellen. Der MAP-Kinase-Inhibitor U0126 wurde den ALI-Kulturen (B) basal zugesetzt. Als Kontrollen wurden ALI-Kulturen ohne Zusatz (A) mitgeführt. Es konnten keine Unterschiede in der Morphologie (A1 und B1) festgestellt werden. Auch in der Ausbildung der Tight Junctions konnten keine Unterschiede (A2 und B2) verzeichnet werden. (Balken [A1, B1]= 5 µm; [A2, B2]= 1 µm)

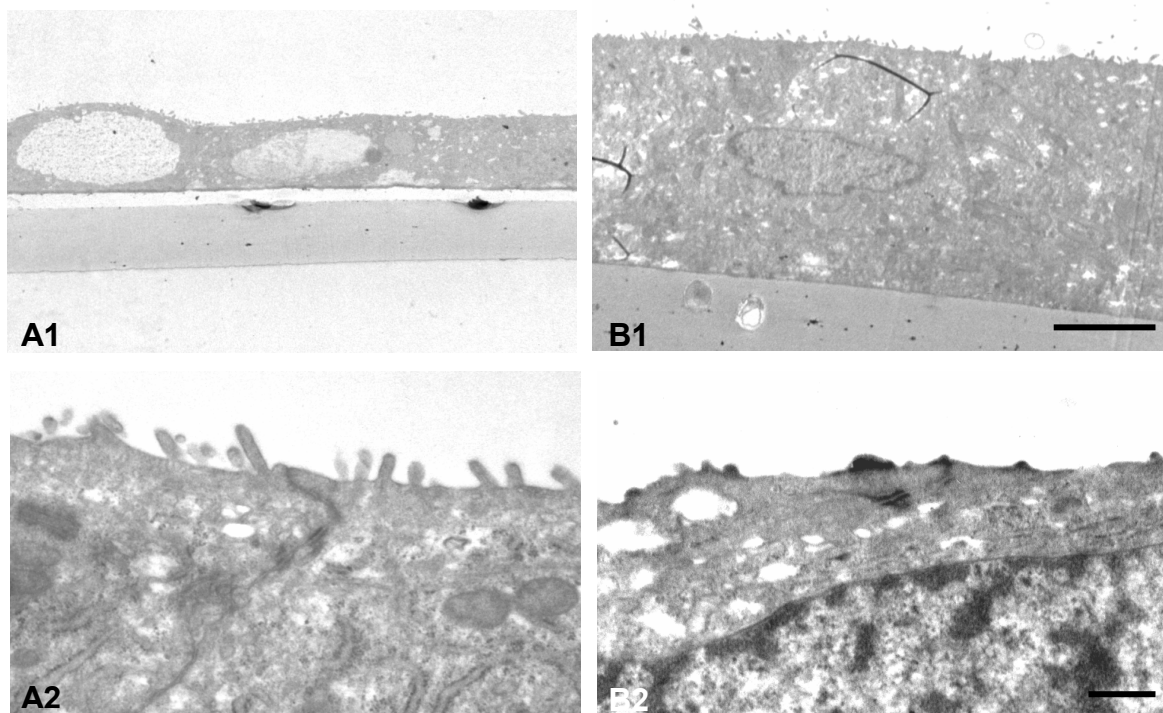


Abbildung 77: Morphologische Untersuchung von U0126 behandelten IPEC-J2-Zellen. Die IPEC-J2-Zellen wurden als ALI-Kulturen (A) herangezogen. Um zu überprüfen, ob der Inhibitor U0126 (B) einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen hat, wurde dieser basal den ALI-Kulturen zugesetzt. Es konnte kein Unterschied im Phänotyp festgestellt werden. (Balken [A1, B1] = 5 μ m; [A2, B2] = 1 μ m)

3.4.2.12.2 Nachweis der Proliferation

Die Wirkung des Inhibitors auf die Proliferation der ALI-Kulturen wurde mittels BrdU-Einbau untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den ALI-Kulturen mit und ohne den Zusatz des Inhibitors festgestellt werden (Abb. 78).

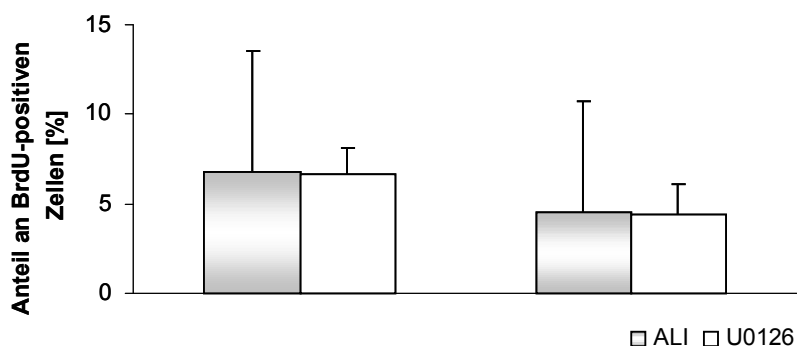


Abbildung 78: Anteil an proliferierenden Zellen unter dem Einfluss von U0126. Beide Zelllinien wurden als ALI-Kulturen herangezogen. Für die Dauer der ALI-Kultur wurde den Zellen der Inhibitor basolateral zugesetzt. ALI-Kulturen ohne Inhibitor wurden als Kontrollen mitgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den ALI-Kulturen mit und ohne den Zusatz des Inhibitors festgestellt werden.

3.4.2.13 Aufnahme von BSA-DyLight

In Abbildung 79 ist die konfokale Analyse des markierten BSA-Proteins in den ALI-Kulturen dargestellt. Diese Kulturen wurden für 24 Stunden mit BSA-DyLight inkubiert. Dieses Protein konnte sowohl in IPEC-1 als auch in IPEC-J2 intrazellulär nachgewiesen werden (Abb. 79). Somit wurde dieses Protein von den Zellen aktiv aufgenommen.

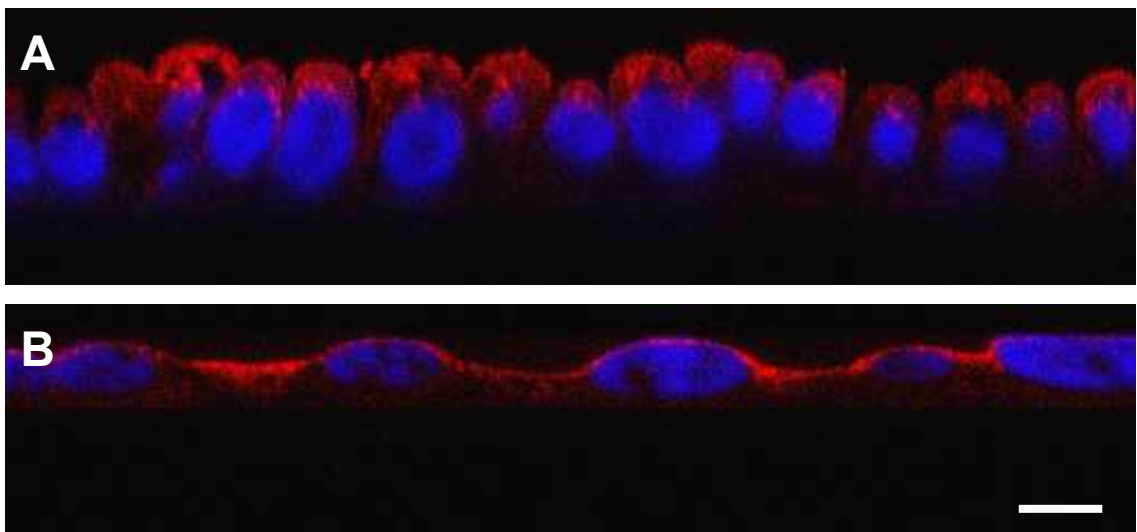


Abbildung 79: Aufnahme von BSA-DyLight in ALI-Kulturen beider Zelllinien. In IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) konnte intrazellulär BSA-DyLight nachgewiesen werden. (Balken = 5µm)

3.5 Entwicklung eines Co-Kultursystems – Darstellung der intestinalen Barriere

Co-Kulturen im Membransystem

3.5.1 Isolation und Charakterisierung von dendritischen Zellen

Isolation von MoDCs mittels CD172a

Für die Entwicklung des Co-Kultursystems wurden MoDCs aus PBMCs generiert. Die Monozyten wurden mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation und dem CD172a-Antikörper (SWC-3a) mittels MACS isoliert. Die Reinheit der gewonnenen Zellen wurde mittels FACS-Analyse ausgewertet. Es ergaben sich im Mittel 98,5% CD172a-positive und 1,5% CD172a-negative Zellen (Abb. 80).

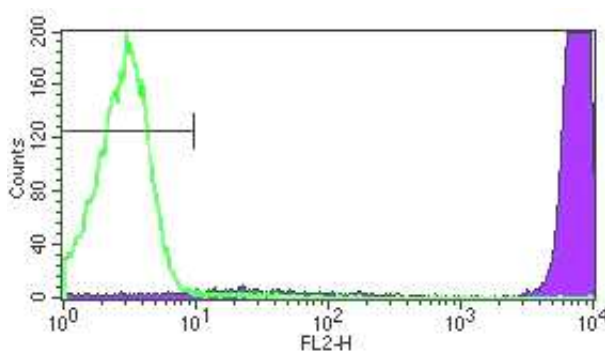


Abbildung 80: Überprüfung der Isolation mit CD172a (SWC-3a).

Abbau von CD172a

Nach der Isolation mit CD172a wurde getestet, wie lange der Antikörper braucht, um abgebaut zu werden (Abb. 81). Hierfür wurden isolierte Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem goat-anti mouse IgG1-Antikörper (gekoppelt mit PE) inkubiert und gefacst. Als Kontrolle (K) wurden Zellen verwendet, welche nicht durch das MACS separiert wurden und dementsprechend keinen gebundenen Antikörper besitzen. Am Tag der Separation (0d) war ein stark positives Signal zu verzeichnen.

Auch am dritten Tag wurde immer noch ein deutlich positives Signal gefunden. Erst am siebten Tag stimmten die Signale der Kontrollen mit denen der isolierten Zellen überein.

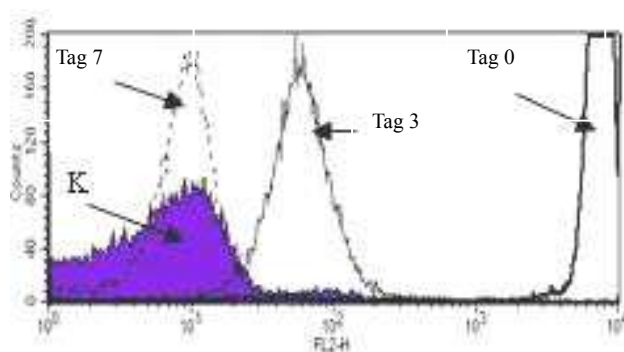


Abbildung 81: Abbau von CD172a. Erst am siebten Tag der Kultivierung stimmten die Signale der Kontrollen mit denen der isolierten Zellen überein.

Generierung von MoDCs mittels IL-4 und GM-CSF

Die MoDCs wurden durch den Zusatz von GM-CSF und IL-4 zum Kultivierungsmedium generiert. Nach drei Tagen der Kultivierung waren MoDCs mit Fortsätzen zu beobachten (Abb. 82).

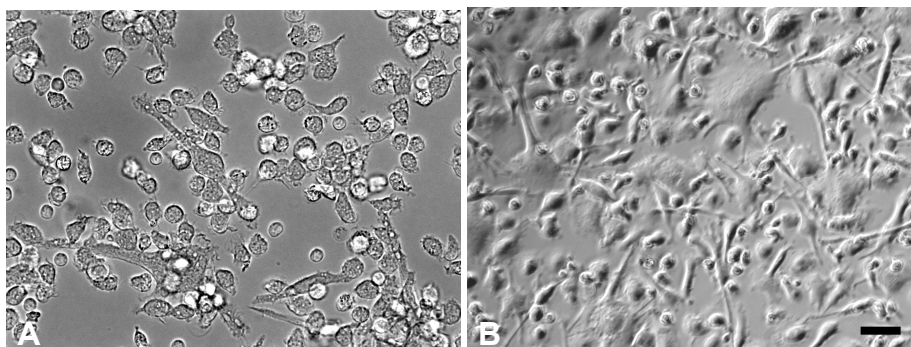


Abbildung 82: Kultivierung der MoDCs. A) Tag 1 im Differenzierungsmedium; B) Tag 3 im Differenzierungsmedium. Es konnte nach drei Tagen der Kultivierung im Differenzierungsmedium (Zusatz von IL-4 und GM-CSF) eine Ausbildung von Fortsätzen beobachtet werden (Balken = 20µm)

Vitalitätsbestimmung

Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der lebenden und toten Zellen bestimmt. Zu Beginn der Co-Kultur (Alter: 7 Tage) konnten im Durchschnitt 90% lebende Zellen und zirka 10% tote Zellen festgestellt werden (Abb. 83).

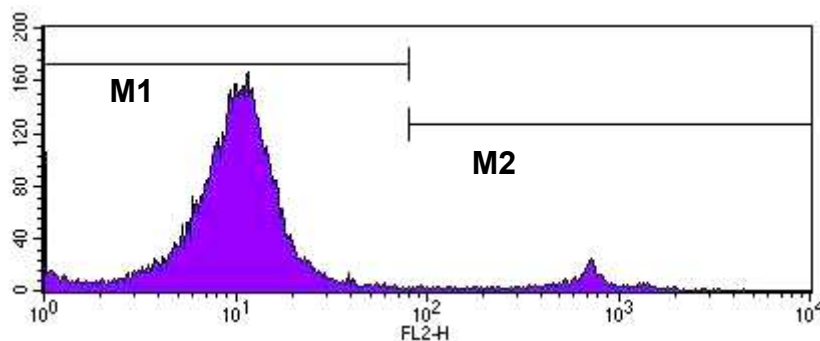


Abbildung 83: Vitalitätsbestimmung von MoDCs zu Beginn der Co-Kultur mittels Propidiumiodid. Der Marker 1 gibt die Anzahl der intakten Zellen (92,3%) und Marker 2 (7,7%) gibt die Anzahl der toten Zellen an.

Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz

Die Doppelfärbung von CD16 und MHCII, welche auf den Darm angewendet wurde, ist hier auf die MoDCs übertragen worden. Die isolierten MoDCs zeigten eine CD16/MHCII-Doppelmarkierung (Abb. 84).

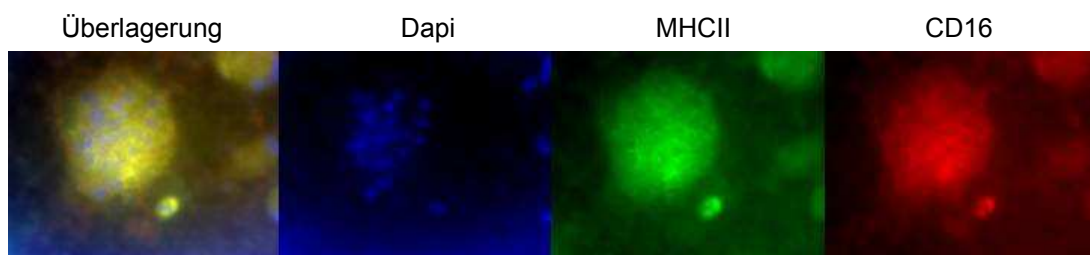


Abbildung 84: Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-MHCII- (grün) und dem anti-CD16-Antikörper (rot) von isolierten MoDCs im Alter von sieben Tagen. Die MoDCs zeigten eine Doppelmarkierung mit dem MHCII- und CD16-Antikörper.

3.5.2 Zusatz von MoDCs zur IPEC-Kultur

3.5.2.1 TEER-Verlauf

Als Kontrolle zu den Co-Kulturen wurden Kulturen mitgeführt, denen keine MoDCs (= Kontrolle) am elften Tag zugesetzt wurden. Die Kontrollen beider Zelllinien zeigten einen stabilen TEER-Verlauf über die gesamte Zeitspanne des Versuches (Abb. 86). Am Ende des Versuches (Tag 15) konnte ein TEER-Wert von $7,2 \pm 2,4 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$ in den IPEC-1-Kontrollen beobachtet werden. Ein TEER-Wert von fast $10,5 \pm 1,3 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$ wurde bei den Kontrollen von IPEC-J2 gefunden. Die Co-Kulturen zeigten jedoch einen signifikanten TEER-Abfall (IPEC-1: $0,7 \pm 0,6 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$; IPEC-J2: $1,4 \pm 1,7 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$; $p \leq 0,01$) innerhalb der folgenden 5 Tage. Das Vorhandensein intakter Tight Junction ist für die Integrität des Layers entscheidend. Deshalb wurden die Co-Kulturen mittels einer ZO-1/CD16-Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dies ist beispielhaft für IPEC-1 dargestellt. Es konnte in den Co-Kulturen eine Zerstörung des Layers und damit der Tight Junctions beobachtet werden. Dies hat zur Folge, dass der TEER abfällt (Abb.85).

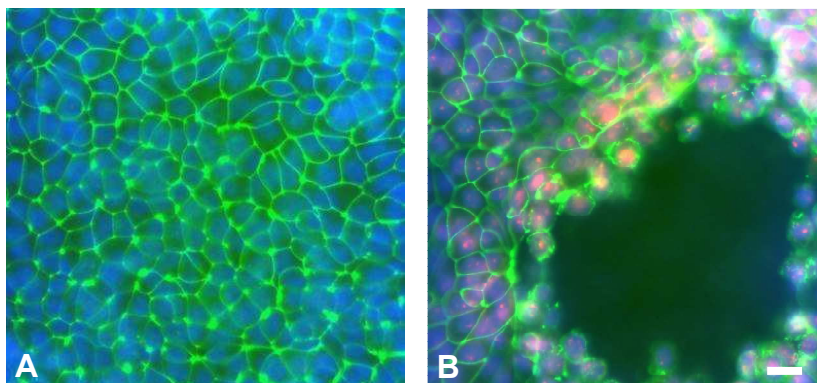


Abbildung 85: Tight Junctions in der Co-Kultur von IPEC-1. Die Kulturen wurden mit dem anti-ZO-1-Antikörper (grün) und dem anti-CD16-Antikörper (rot) gefärbt. In den Kontrollen (A) wurden intakte Tight Junctions festgestellt. In den Co-Kulturen (B) konnte eine „Zerstörung“ der Tight Junctions beobachtet werden. CD16 diente hierbei als Marker für MoDCs. (Balken = 20 μm)

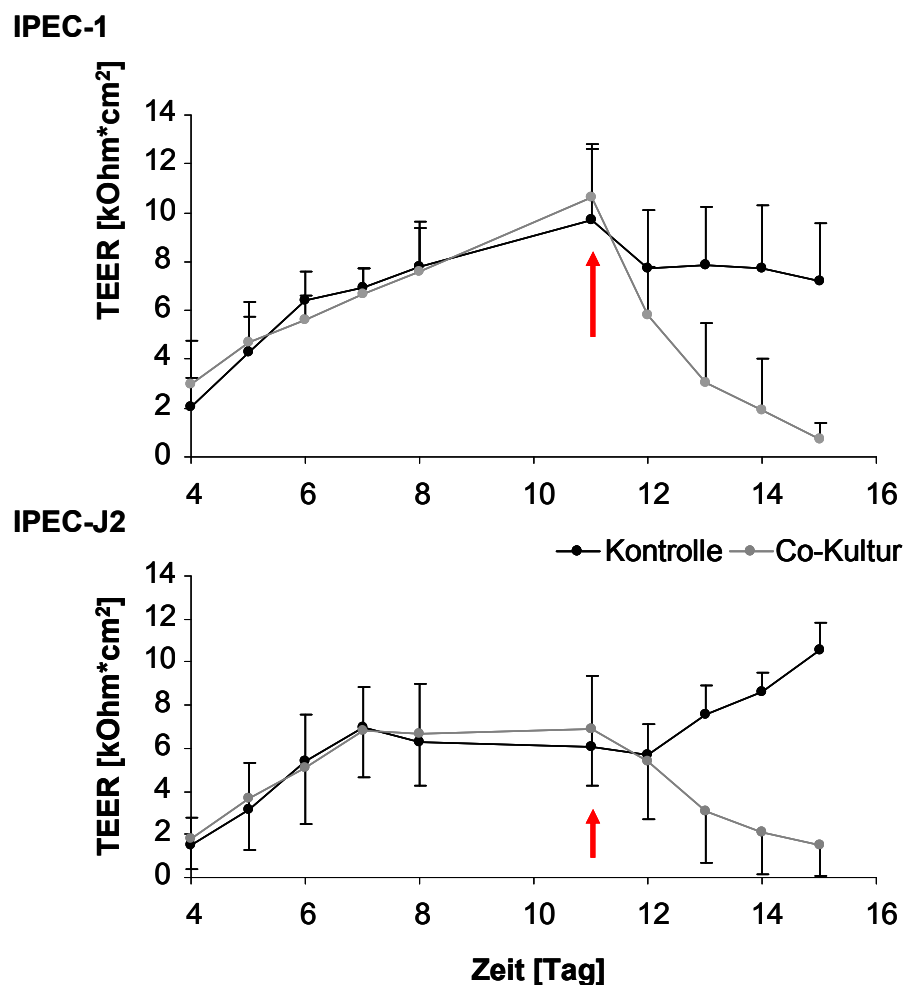


Abbildung 86: Vergleich des TEER-Verlaufs von Kontrollen und Co-Kulturen. In beiden Zelllinien konnte in den Kontrollen ein stabiler TEER-Verlauf verzeichnet werden. In den Co-Kulturen (Beginn der Co-Kultur = roter Pfeil) von IPEC-1 und IPEC-J2 wurde ein TEER-Abfall beobachtet.

3.5.2.2 Veränderungen in IPECs auf mRNA-Ebene während der Co-Kultur

Nach Beendigung des Co-Kultur-Versuches wurden RNA-Proben von den Co-Kulturen (getrennt nach IPECs und MoDCs) und den Kontrollen gewonnen und untersucht (Abb.87). Anhand von IL-10 wird deutlich, dass eine saubere Trennung von MoDCs und IPECs in den Co-Kulturen möglich ist, da in IPEC-1 und IPEC-J2 kein IL-10-mRNA nachweisbar war. In den Co-Kulturen und Kontrollen der kultivierten Zellen konnte GAPDH, Occludin, ZO-1, CD209, TNF α , IL-2, IL-6 gut, IL-8, IL-12 und IL-18 dagegen nur schwach nachgewiesen werden.

MHCII DR, IFN γ , rCX $_3$ CR $_1$, IL-1b, IL-4 und IL-10 konnten auf mRNA-Ebene weder in den Kontrollen noch in den Co-Kulturen beider Zelllinien nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass in IPEC-1 in der Co-Kultur das Signal von IL-8 stark abnimmt. In IPEC-J2 hingegen die Marker CD209, TNF α , IL-2 und IL-12 verstärkt exprimiert werden.

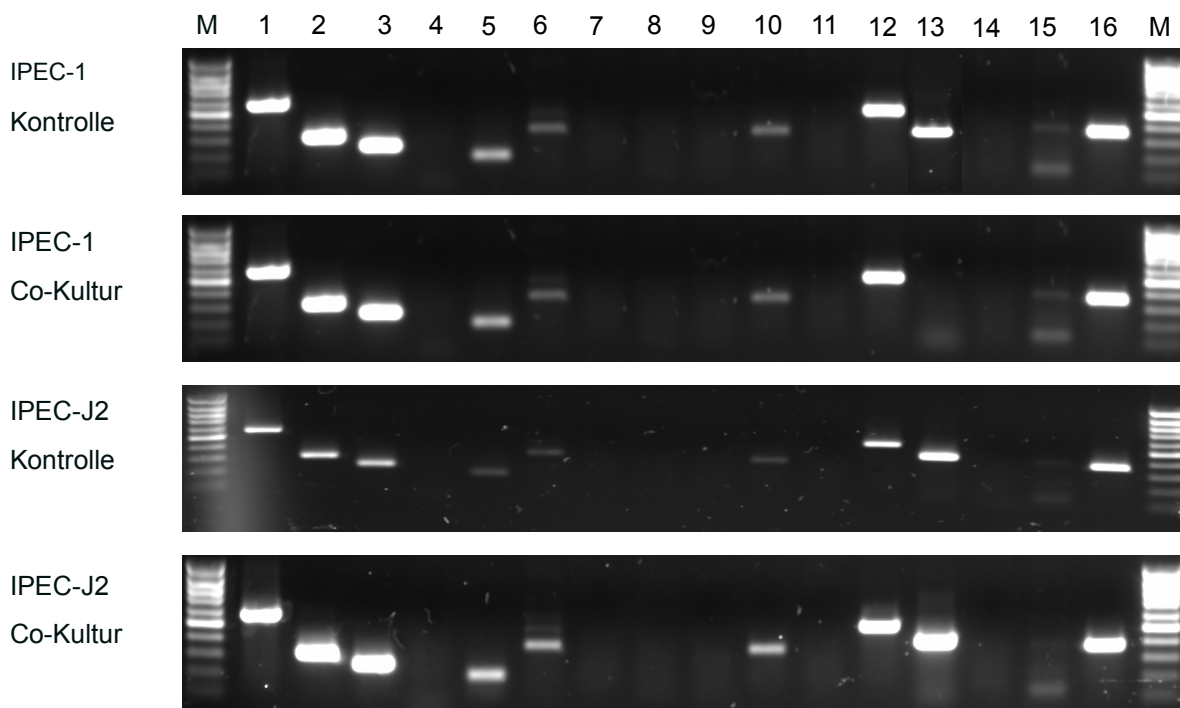


Abbildung 87: Veränderungen in IPECs auf mRNA-Ebene während der Co-Kultur. Es wurden unterschiedliche Gene untersucht: (1) GAPDH, (2) Occludin, (3) ZO-1, (4) MHCII DR, (5) CD209, (6) TNF α , (7) IFN γ , (8) CX $_3$ CR $_1$, (9) IL-1 β , (10) IL-2, (11) IL-4, (12) IL-6, (13) IL-8, (14) IL-10, (15) IL-12 und (16) IL-18. Es konnten keine Unterschiede in beiden Zelllinien auf mRNA-Ebene zwischen Kontrollen und Co-Kulturen beobachtet werden.

3.5.2.3 Veränderungen in MoDCs während der Co-Kultur

Veränderungen auf mRNA-Ebene

Die Untersuchung der MoDCs auf mRNA-Ebene ergab Hinweise auf Veränderungen bei Occludin, TNF α und IL-6. Hier zeigte sich ein erhöhtes Level an mRNA in Co-Kulturen (Abb. 88). GAPDH, ZO-1, CD209, IL-1b, IL-2, IL-8, IL-10 und IL-18 konnte in beiden MoDCs nachgewiesen werden. IL-12 war hingegen nur schwach nachweisbar. IFN γ , MHCIIDR, rCX₃CR₁ und IL-4 konnten nicht nachgewiesen werden.

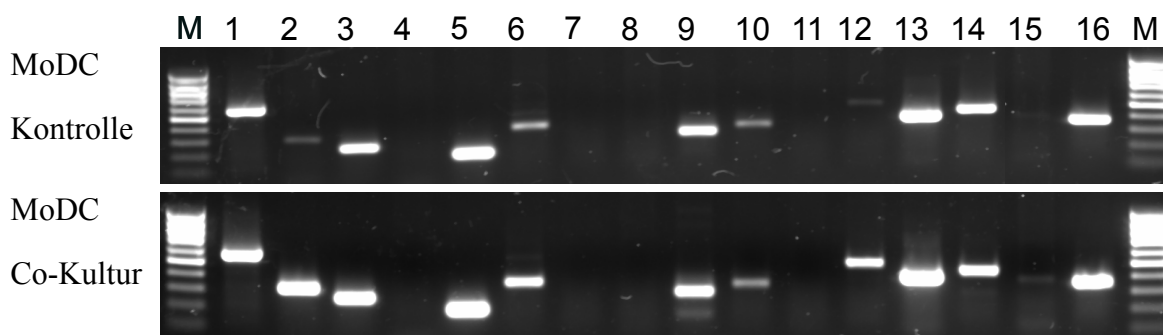


Abbildung 88: Veränderungen auf mRNA-Ebene in MoDCs und in co-kultivierten MoDCs. Es wurden unterschiedliche Gene untersucht: (1) GAPDH, (2) Occludin, (3) ZO-1, (4) MHCIIDRa, (5) CD209, (6) TNF α , (7) IFN γ , (8) CX₃CR₁, (9) IL-1 β , (10) IL-2, (11) IL-4, (12) IL-6, (13) IL-8, (14) IL-10, (15) IL-12 und (16) IL-18.

Veränderungen auf Proteinebene

Die kultivierten MoDCs wurden zu Beginn des Versuches – am Tag 7 der Kultivierung – mittels FACS analysiert. Es wurden verschiedene Marker untersucht: SWC-3a (nur zu Beginn des Versuches), CD3, CD4, CD8, CD16, CD40, CD80/86, MHCIIDQ und MHCIIDR (siehe Anhang). Zu Beginn und am Ende des Versuches waren weniger als 1% der Zellen CD3-positiv. Zeitgleich wurde CD4 überprüft. Auch hier waren weniger als 2% CD4-positiv. Bei CD8 konnte ein Anstieg verzeichnet werden und zwar von zirka 2% auf fast 13%. Dieses Ergebnis ist jedoch nur ein Hinweis, da die Überprüfung der Veränderungen auf Proteinebene nur zweimal durchgeführt wurde. Bei CD8 und CD80/86 gibt es nur ein Ergebnis nach Beendigung des Versuches. Somit konnte dieser Versuch auch statistisch nicht ausgewertet werden. Es konnte eine Abnahme der positiven Zellen für CD16, CD40, CD80/86 und MHCIIDQ festgestellt werden. Der Anteil an positiven Zellen für MHCIIDR blieb fast gleich (siehe Anhang; 3. Daten).

3.5.3 Basolateraler Zusatz von MoDC-Überständen

Nach der Stimulation der MoDCs mit GM-CSF und IL-4 wurden bei beiden Zelllinien ein Mediumwechsel zu DMEM mit 10% Schweineserum durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wurde das Medium abgenommen, abzentrifugiert und weggefroren. IPEC-1 und IEPC-J2 wurden nach dem Protokoll für Co-Kulturen herangezogen und am elften Tag der Kultivierung wurden keine MoDCs zugegeben sondern basolateral ein Milliliter der MoDC-Überstände. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, denen nur DMEM mit 10% Schweineserum zugesetzt wurde. Innerhalb von 72 Stunden konnte ein Abfall des TEERs bei IPEC-1 beobachtet werden. IPEC-J2 zeigte hingegen keinen Abfall des TEERs. Die Zellen wurden im Anschluss fixiert und mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die IPEC-1-Kontrollen zeigen Auffälligkeiten in der Immunfluoreszenz (Abb. 89 und 90). Claudin-3, Claudin-4 und ZO-1 zeigen sich spezifisch zwischen zwei benachbarten Zellen. Auch CK18, ein wichtiges Protein des Zytoskeletts, ist in den Kontrollen vorhanden. Die mit den Überständen inkubierten Zellen, zeigten eine Aufbeziehungsweise Ablösung des Epithels. Dies konnte auch durch die Färbung mit ZO-1, Claudin-3 und Claudin-4 bestätigt werden. Mit den Kulturüberständen zeigte sich ein vergleichbares Bild zu den Immunfluoreszenzfärbungen der Co-Kultur-Versuche.

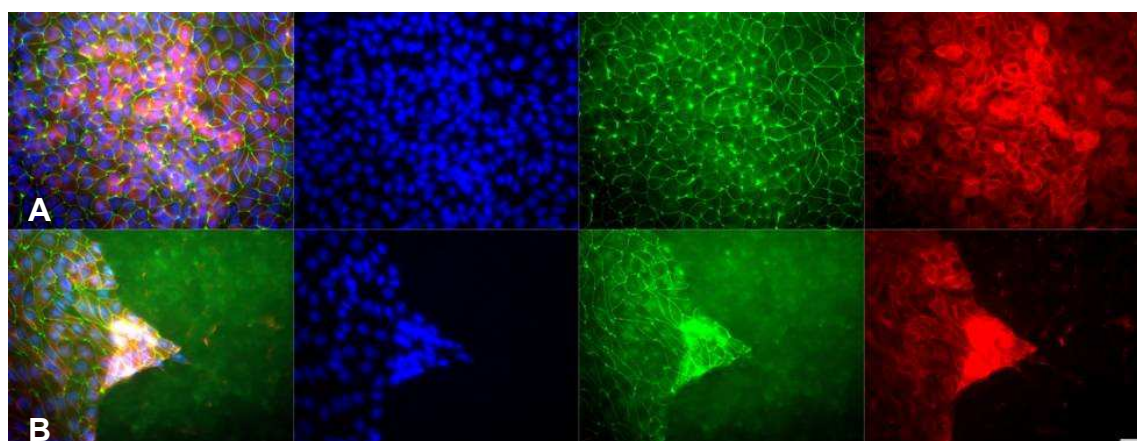


Abbildung 89: Veränderungen von ZO-1 und CK18 durch die basolaterale Zugabe von MoDC-Überständen in IPEC-1. Die Kontrollen (A) wurden basolateral mit DMEM/SS inkubiert. Parallel hierzu wurden Zellen (B) mitgeführt, denen basolateral MoDCs-Überstände zugesetzt wurden. Sowohl ZO-1 (grün) als auch CK18 (rot) zeigten gravierende Veränderungen, da sich das komplette Epithel von der Membran löst. (Balken = 20 µm)

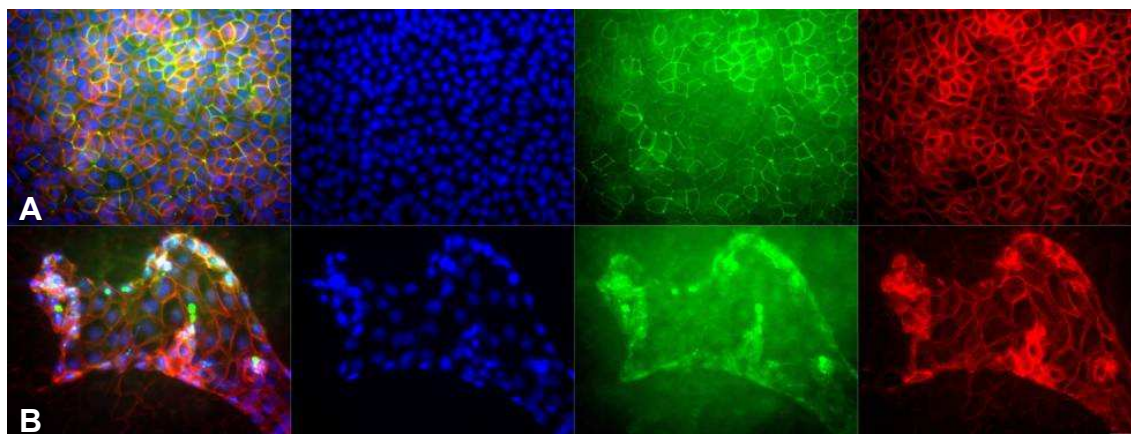


Abbildung 90: Veränderungen von Claudin-3 und Claudin-4 durch die basolaterale Zugabe von MoDC-Überständen in IPEC-1. In den Kontrollen (A) konnte eine gleichmäßige Verteilung von Claudin-3 (grün) und Claudin-4 (rot) entlang der Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden. Bei der Untersuchung der Membranen, die basolateral mit den Überständen inkubiert wurden, konnte eine Auf- beziehungsweise Ablösung des Epithel beobachtet werden. (Balken = 20 µm)

3.5.4 Apikaler Zusatz von DON in der Co-Kultur

Beide Zelllinien wurden als Co-Kultur kultiviert. Am Tag 11 wurden die MoDCs der Kultur hinzugefügt. Zeitgleich wurde das Hybridmedium gewechselt und dem unteren Kompartiment (apikales Medium der Zellen) 200 ng/ml DON zugesetzt. In beiden Zelllinien konnte ein Abfall des TEERs (IPEC-1: $1,2 \pm 1,3 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$; IPEC-J2: $0,6 \pm 0,2 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$) verzeichnet werden. Die Kontrollen, welchen nur DON zugesetzt wurde, zeigten keinen Abfall des TEERs am Ende des Versuches (IPEC-1: $7,4 \pm 1,4 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$; IPEC-J2: $10,4 \pm 2,1 \text{ kOhm} \cdot \text{cm}^2$; Abb. 91).

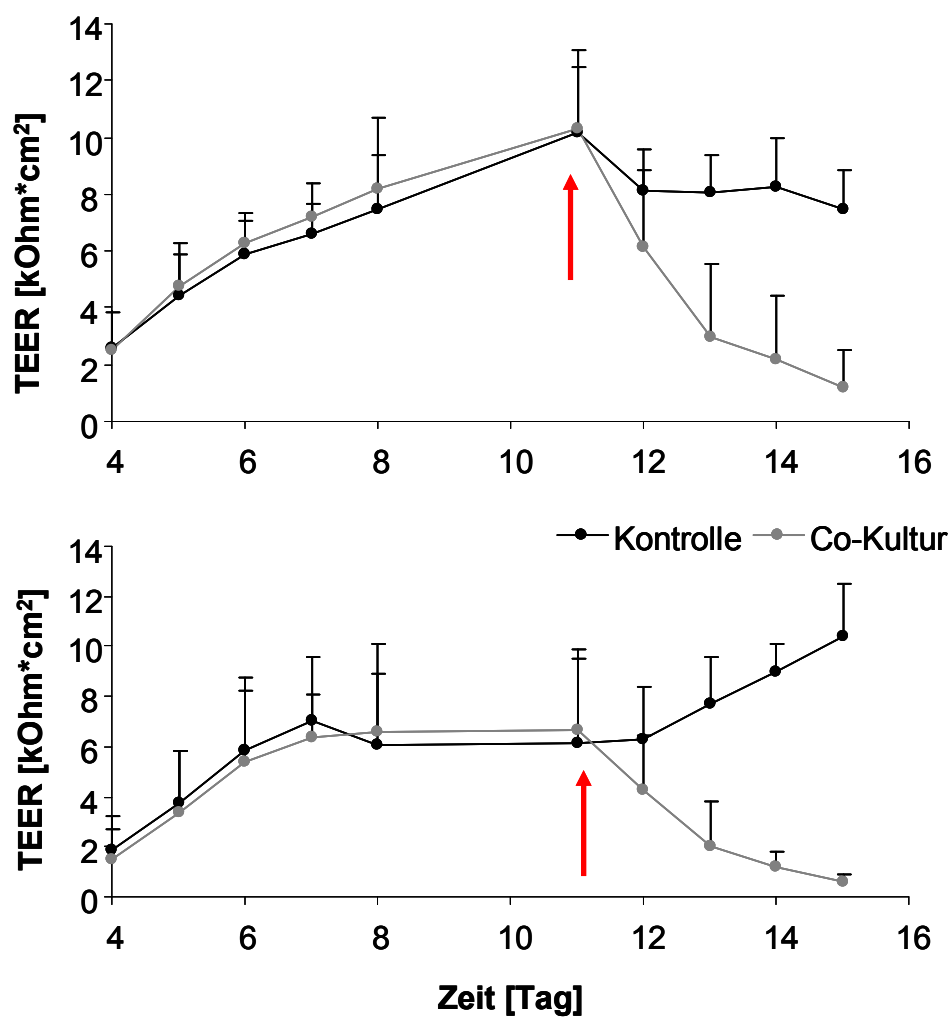


Abbildung 91: Zusatz von DON - TEER-Verlauf der Co-Kultur. Beide Zelllinien zeigten einen Abfall des TEERs nach Zusatz von MoDCs und DON (Beginn der Co-Kultur = roter Pfeil). Die Kontrollen, denen nur DON zugefügt wurde, wiesen keinen Abfall des TEERs auf.

3.5.5 Apikaler Zusatz von LPS zur Co-Kultur

IPEC-1 und IPEC-J2 wurden kultiviert und am Tag 11 wurden MoDCs der Kultur hinzugefügt. Zeitgleich wurde das Hybridmedium gewechselt und dem unteren Kompartiment (apikales Medium der Zellen) 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS zugesetzt. Nach Beendigung des Versuches konnten in den Kontrollen von IPEC-1 und IPEC-J2 TEER-Werte von über 7 $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ verzeichnet werden (IPEC-1: $7,8 \pm 1,9 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$; IPEC-J2: $8,7 \pm 2,4 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$). In den Co-Kulturen konnte in beiden Zelllinien ein TEER-Abfall verzeichnet werden (IPEC-1: $0,7 \pm 0,2 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$; IPEC-J2: $0,7 \pm 0,3 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$). Die Kontrollen, welchen nur LPS zugesetzt wurde, zeigten keinen Abfall des TEERs am Ende des Versuches (Abb. 92).

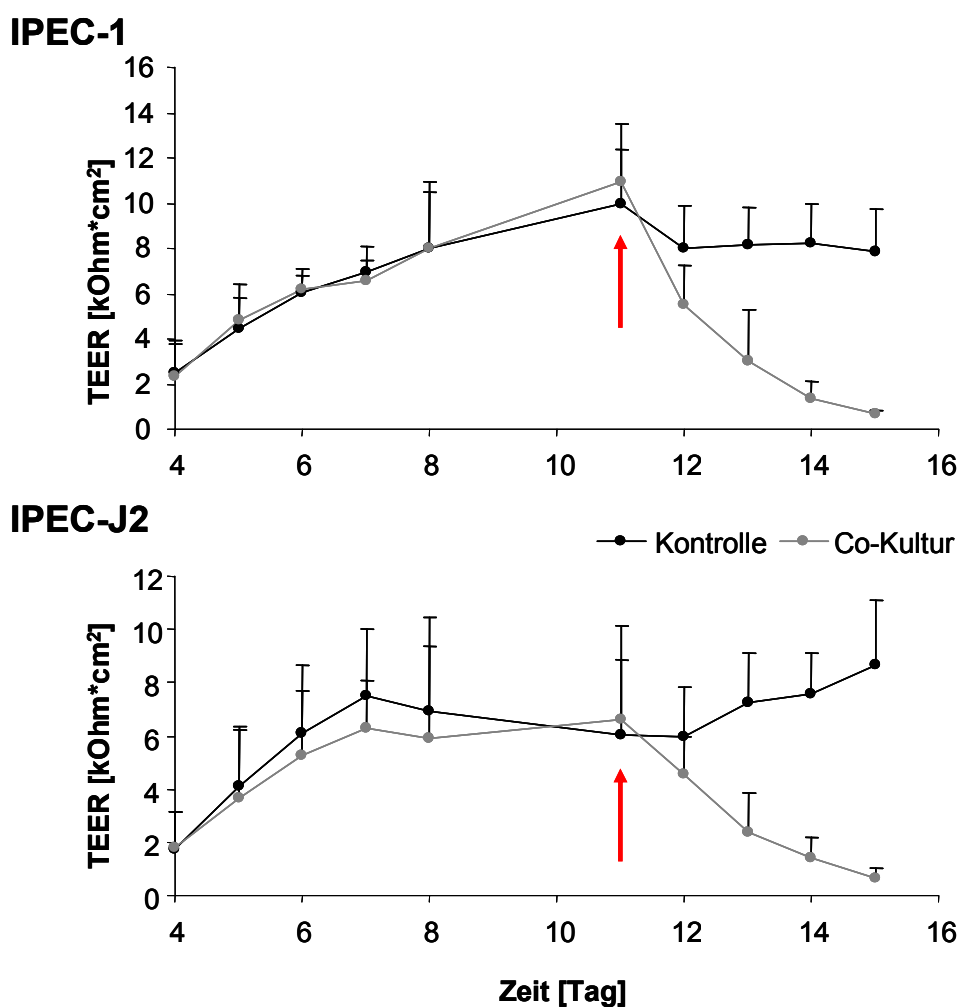


Abbildung 92: Zusatz von LPS – TEER-Verlauf der Co-Kultur. Beide Zelllinien zeigten einen Abfall des TEERs nach Zusatz von MoDCs und LPS (Beginn der Co-Kultur = roter Pfeil). Die Kontrollen, denen nur LPS zugefügt wurde, wiesen keinen Abfall des TEERs auf.

3.5.6 Migration von IPECs

Durch den Zusatz von LPS (apikal, 1 $\mu\text{g/ml}$) konnte die Migration der Zellen mittels Immunhistochemie (Aktin und DAPI) sowohl bei IPEC-1 als bei IPEC-J2 gesteigert werden (Abb. 93). Bei IPEC-1 migrierten zehn Zellen pro Fläche. Durch den Zusatz von LPS konnten 27 Zellen pro Fläche festgestellt werden ($p=0,076$). Somit konnte eine Tendenz des Anstiegs an migrierten Zellen pro Fläche verzeichnet werden. Bei IPEC-J2 wurde eine signifikante Zunahme der Migration gefunden ($p\leq 0,01$). Bei dem Zusatz von DON konnte keine Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen ohne DON beobachtet werden.

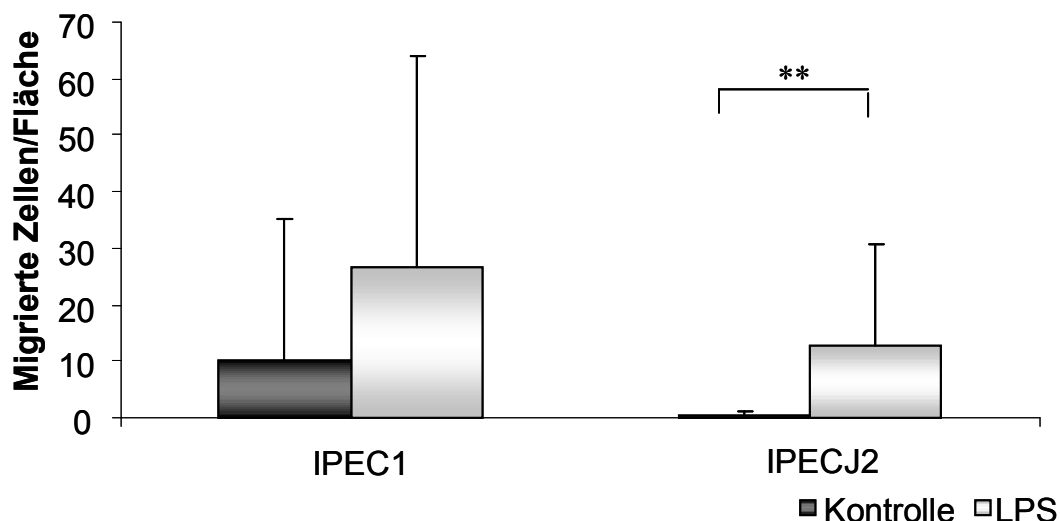


Abbildung 93: Erhöhung der Migration von IPEC-1 und IPEC-J2 durch die Applikation von LPS. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Migration bei IPEC-J2 durch den Zusatz von LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) erzielt werden ($p\leq 0,01$). Eine Tendenz war bei IPEC-1 zu verzeichnen ($p=0,076$).

3.5.7 Migration von MoDCs

Die Migration von MoDCs konnte mittels Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden. Somit wurden co-kultivierte Membranen fixiert und mittels EM ausgewertet. Mit Hilfe der Analyse konnte bestätigt werden, dass nicht nur die IPEC-1- und IPEC-J2-Zellen migrieren sondern auch MoDCs (Abb. 94 und 95). In Bezug auf MoDCs konnte festgestellt werden, dass diese Zellen dendritische Fortsätze in die Poren der Membran entsenden.

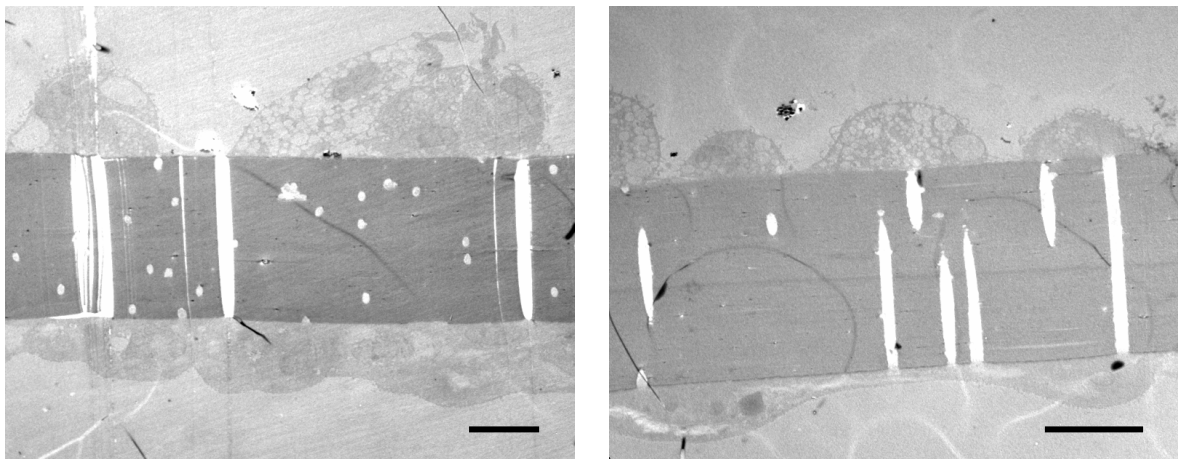


Abbildung 94: Untersuchung der Co-Kulturen mittels Elektronenmikroskopie. IPEC-1 (A) und IPEC-J2 (B) wurden mit MoDCs co-kultiviert. (Balken = 10 μm)

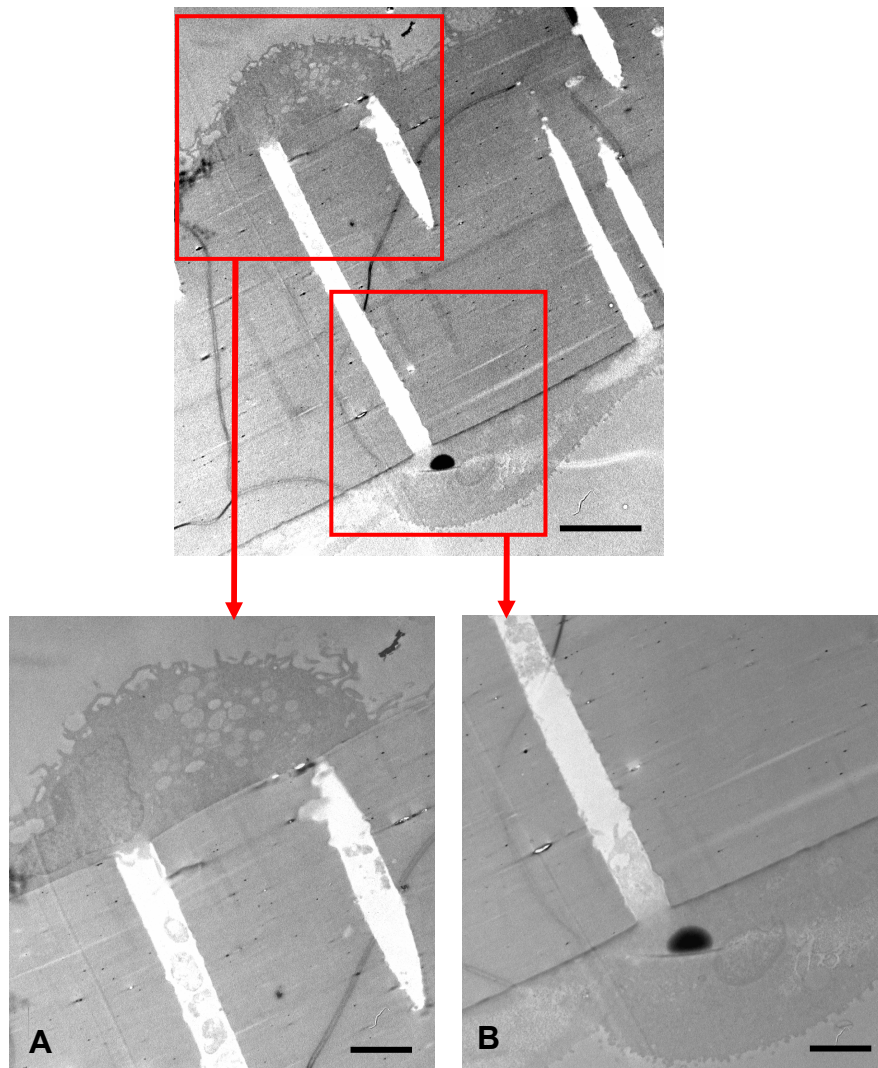


Abbildung 95: Migration von IPECs und MoDCs. Mittels EM wurde die Migration von MoDCs (A) und IPECs (B) untersucht. Beide Zelltypen sendeten dendritische Fortsätze in die Poren der Membran. Dies ist hier anhand von IPEC-J2 beispielhaft dargestellt. (Balken = 5 μm ; [A, B] = 2 μm)

4 Diskussion

4.1 Die intestinale Barriere *in vivo*

Die intakte, intestinale Barriere *in vivo* ist durch verschiedene Komponenten zum Beispiel ein Mukuslayer, Epithelzellen, Basalmembran und Immunzellen gekennzeichnet. Erst das Zusammenspiel dieser Komponenten ermöglicht die selektive Aufnahme von Nahrungsbestandteilen oder die Verteidigung des Organismus gegen Pathogene. Die Untersuchung grundlegender Mechanismen bei den unterschiedlichen Funktionen des Darmes kann nur *in vivo* erfolgen. Infolgedessen ist eine bestmögliche Charakterisierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* von Nöten. Der Aufbau der intestinalen Barriere *in vivo* ist unter anderem durch zwei entscheidende Schichten gekennzeichnet, die den Epithelzellen aufliegen. Das sind zum einen ein Mucuslayer und zum anderen ein dünner Wasserfilm, welcher sich auf der mucösen Schicht befindet. Nicht nur der dünne Wasserfilm sondern vor allem die Mucuschicht spielen eine entscheidende Rolle bei der Diffusion von Stoffen (Smithson et al., 1981). Es konnte in einer Studie anhand von Ratten gezeigt werden, dass der dünne Wasserfilm eine Größe von zirka 700 μm hat (Smithson et al., 1981). Anderson et al. hingegen beschrieben für die Ratte eine Größenordnung von 100-800 μm (Anderson et al., 1988). Die Mukusschicht an sich entspricht ungefähr dem Doppelten der Länge der Mikrovilli bei der Ratte (Smithson et al., 1981; Szentkuti und Lorenz, 1995). Jedoch unterliegt diese Schicht einer großen Schwankung. Szentkuti und Lorenz konnten bei Ratten nach 48-stündigen Fasten Schichtdicken von $28,8 \pm 25,6 \mu\text{m}$ und $93,3 \pm 59,4 \mu\text{m}$ feststellen (Szentkuti und Lorenz, 1995). Es wurde spekuliert, dass die Fütterungsbedingungen ein entscheidender Faktor bei der Ausbildung des Mucuslayers sind (Szentkuti und Lorenz, 1995). Dieser Mucuslayer dient nicht nur zum Schutz vor Verdauungsenzymen oder zur Beförderung des Nahrungsbreies, sondern ist auch entscheidend für die Bindung von Bakterien (Rojas et al., 2002). Außerdem bildet diese Mukusschicht zusammen mit dem Wasserfilm die Diffusionsbarriere für niedermolekulare Lösungen bei der gleichzeitigen Bildung von einer Barriere gegen Mikroorganismen und ihre Toxinen (Lamont, 1992).

Das Epithel des Dünndarms ist ein hochdynamisches System. Es unterliegt einer ständigen Erneuerung. Dieses wird durch das Vorhandensein von vier bis sechs multipotenten, undifferenzierten Stammzellen realisiert, welche in den Krypten liegen (Freeman, 2008).

Die Tochterzellen der multipotenten Stammzellen wandern zirka drei Tage entlang der Krypten-Zotten-Achse aufwärts und verlieren ihre Fähigkeit zur Proliferation am Ausgang der Krypte. Der Villus dagegen ist durch verschiedene Zelltypen wie absorbtive Zellen, Becherzellen und endokrine Zellen gekennzeichnet. Die Becherzellen im Schwein sind durch eine große Anzahl an Vesikeln in den Zellen gekennzeichnet. Dies trifft sowohl auf das Ileum als auch das Jejunum zu. Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen geschieht während der Aufwärtsbewegung in Richtung Villusspitze (van der Flier & Clevers, 2009). Nur Paneth-Zellen sind in der Lage abwärts – zum Kryptenboden – zu wandern (Karam et al, 1999; Menard et al., 1989). Fan et al. konnte zeigen, dass die Enterozytenmigration im neonatalen Schwein im Dünndarm zwischen 3,2 $\mu\text{m}/\text{h}$ und 3,0 $\mu\text{m}/\text{h}$ beträgt (Fan et al. 2001). Die Stammzellen differenzieren sich durch den Effekt von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) wie p16, p21 und p 27 (Tian und Quaroni, 1999). An der Zottenspitze kommt es zur terminalen Differenzierung und letztendlich zur Apoptose der Epithelzellen, welche ins Lumen entlassen werden (Cheng und Leblond, 1974; Loeffler, 1993; Hall et al., 1994; Loeffler, 1997). Die intestinale Differenzierung umfasst somit zwei wesentliche Schritte: 1.) der Wechsel von multipotenten Stammzellen zu proliferierenden Zellen und 2.) der irreversible Verlust des proliferativen Potentials und die damit verbundene Differenzierung der Epithelzellen. Die Lebensdauer einer solchen Zelle beträgt zirka zwei bis sieben Tage (Crosnier, 2006). Fan et al. 2001 konnte hingegen eine Lebensdauer von 4,2 und 10,2 Tagen nachweisen, wobei Unterschiede zwischen den proximalen und distalen Segmenten des Dünndarms aufgezeigt werden konnten (Fan et al., 2001).

In vitro zeigen Enterozyten eine charakteristische Morphologie, welche eng mit ihrer Funktion in Verbindung steht. Daher wurde die Morphologie *in vivo* mit den verschiedenen *in vitro*-Systemen verglichen und in Beziehung gesetzt. Für das porcine Tiermodell liegen nur wenige morphologische Daten für die Enterozyten vor. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp der Enterozyten im Schwein durch die Ermittlung geometrischer Parameter beschrieben. Im Schwein beträgt die Höhe des Enterozyten zirka 24 μm bei einer Zelldichte von zirka 146-169 Zellen/10 000 μm^2 . Ähnliche Werte für die Enterozytenhöhe konnten für den Menschen ermittelt werden. Hier beträgt die Schichtdicke zirka 32 μm (Keefe et al., 2000).

Bei Kindern wurden Epithelzellhöhen von 22-25 μm gefunden (Maiuri et al., 1996). Diese Werte konnten auch für Ratten bestätigt werden. Bei dieser Spezies betrug die Höhe zirka 25 μm (Driák et al., 2008). Die Höhe des Enterozyten ist weiterhin von der Position der einzelnen Epithelzelle abhängig. In der Ratte konnte unter anderem ein Höhenunterschied zwischen den Enterozyten an der Villusbasis ($\approx 25 \mu\text{m}$) und der Spitze des Villus ($\approx 35 \mu\text{m}$) beobachtet werden (Driák et al., 2008). Aus den erfassten morphologischen Parametern wurde das mittlere Enterozytenvolumen abgeschätzt. Für die *in vivo*-Situation wurde ein Volumen von zirka $620 \mu\text{m}^3$ ermittelt. Aufgrund fehlender Daten kann dieser Wert in der Literatur nicht verifiziert werden. Es ist lediglich bekannt, dass sich das Volumen einer Zelle in hypotonischer Umgebung vergrößert (MacLeod et al., 1992).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Morphologie des Darmepithels ist die Ausbildung eines Bürstensaumes. Es konnte sowohl im Ileum als auch im Jejunum in den untersuchten Proben ein intakter Bürstensaum gefunden werden, wobei deutlich weniger Mikrovilli in Abschnitten des Ileums zu finden waren. Diese Mikrovilli sind aufgrund der Polarisation der Zellen nur auf der apikalen Seite zu finden. Der Bürstensaum ist von einer Schicht aus Proteinen, Glykoproteinen und Zuckerresten überzogen, welche als Glycocalyx bezeichnet wird und der Mucusschicht folgt (Egberts et al., 1984; Mowat, 2003). Die Mikrovilli sind fingerförmige, bürstenartige Fortsätze und dienen der Oberflächenvergrößerung. Sie besitzen einen verringerten Diffusionswiderstand für kleine Moleküle und sind somit predistiniert für die Aufnahme und Abgabe von Nährstoffen (Westergaard und Dietschy, 1974). Die Länge der Mikrovilli beträgt im adulten Schwein zirka zwei bis drei Mikrometer. Die Mikrovilli enthalten ein zentrales Bündel von Aktinfilamenten (Mooseker und Tilney, 1975; Madara, 1987), welches mit den für die Aktin-Dynamik wichtigen Molekülen Villin und Fimbrin assoziiert ist (Coudier et al., 1983). Zur lateralen Oberfläche wird das Aktinbündel durch Myosin-I und zum Zytoskelett durch Spektrin verbunden (Goodman, 2008).

In polarisierten Enterozyten wird die apikale Grenze durch dichte Zell-Zell-Kontakte (Tight Junctions) gebildet. Tight Junctions formen eine selektive Barriere und kontrollieren den parazellulären Transport von Ionen, Wasser und gelösten Stoffen im Epithel (Van Itallie et al., 2004 a, b; Pappenheimer et al., 1994). Der Tight Junction-Komplex beinhaltet eine große Anzahl an membranassoziierten oder Membranproteinen, welche im Epithel des Schweins bisher nur unzureichend charakterisiert sind.

Für die physikalische Verbindung zwischen zwei Zellen sind eine ganze Reihe von Proteinen relevant zum Beispiel Occludin und Claudine (Musch et al., 2006). Diese Adaptorproteine verbinden nicht nur zwei Zellen miteinander (Musch et al., 2006) sondern sind auch für die Anbindung der Tight Junction-Proteine an das Aktin und Zytokeratin-Skelett der Zelle verantwortlich (Madara, 1987). ZO-1 interagiert nicht nur mit Occludin sondern mit einer Vielzahl an Tight Junction-assoziierten Proteinen wie ZO-2, ZO-3, Paxillin, Talin und β -Catenin (Stevenson et al., 1986; Schneeberger und Lynch, 2004). In der hier vorliegenden Arbeit wurde speziell die Transkription, Expression und die räumliche Verteilung von ZO-1 und Occludin *in vivo* und *in vitro* untersucht. Occludin und ZO-1 konnten bereits zusammen mit Claudin-1 im neonatalen Schwein nachgewiesen werden (Kansagra et al., 2003). Die Zellen der Säugetiere enthalten ein komplexes Zytoskelett, welches sich aus: a) aktinbeinhaltenden Mikrofilamenten, b) tubulinenthaltenden Mikrotubuli und c) Intermediärfilamenten zusammensetzt (Steinert, 1993). Aktin ist ein wichtiges Protein des Zytoskelettes und ist im Darm des Schweines stark exprimiert. Zytokeratin-18 (CK18) ist auch im Darm vertreten und konnte in den Kulturen der Primärzellen und der kontinuierlichen Zelllinien von IPEC-1 und IPEC-J2 nachgewiesen werden. Zytokeratine sind charakteristisch für Epithelzellen und treten in verschiedenen Kombinationen auf (Moll et al., 1982b). CK18 befindet sich in der Trachea, im Urothelium, im Gastrointestinaltrakt, in der Leber, im Pankreas und im embryonalen Epithel (Moll et al., 1982a). Im Darm des Schweines wird CK18 hauptsächlich von M-Zellen (microfold) exprimiert (Gebert et al., 1994). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gebert (1994) konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass CK18 nicht nur von M-Zellen, sondern auch von Becherzellen und Zellen der Krypten (Kucharzik et al., 1998) exprimiert wird. In der hier vorliegenden Arbeit konnten die CK18-positiven Zellen *in vivo* als Becherzellen identifiziert werden. Im Zellkultursystem wurde CK18 in beiden kontinuierlichen Epithelzelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 – gefunden. Dieser Befund lässt eine Abstammung der beiden Zelllinien aus Kryptenzellen vermuten.

Die basale Grenze der Enterozytenschicht ist die Basalmembran. Die Basalmembran besteht aus einer Reihe von verschiedenen Stoffen wie Collagen IV, Laminin und Fibronektin (Beaulieu, 1997; Groulx et al, 2011). Diese Membran stellt jedoch keine kontinuierliche Grenze dar. Es existieren vielmehr Poren, welche den Durchtritt von Stoffen bis zu einem

gewissen Grad erlauben. Des Weiteren konnte mittels Elektronenmikroskopie die Größe der Poren bestimmt werden. Diese Untersuchungen ergaben beim Menschen für das Colon eine Größe von zirka fünf Mikrometern und in der Ratte konnte eine Größe von 0,5 bis 5 μm belegt werden (Nishizono et al., 1994; Komuro, 1985). Die Poren der Basalmembran ermöglichen unter anderem die basale Freisetzung von Chemokinen und können somit aktiv zur immunologischen Reaktion beitragen. TGF α , IL-1, IL-10, IL-15 und IL-18 werden konstitutiv von intestinalen Epithelzellen sezerniert (Oswald, 2006), während IL-1 α oder - β , IL-6, IL-8, TNF α , MCP-1, CCL-20 und GM-CSF als Antwort auf eine mikrobielle Infektion freigesetzt werden (Jung et al., 1995; Stadnyk, 2002). Epithelzellen sind in der Lage Fortsätze in die Poren der Basalmembran zu entsenden und können dadurch in Kontakt mit anderen Zellen treten wie zum Beispiel Immunzellen (Komuro, 1985). Die epitheliale Kommunikation über die Basalmembran hinweg umfasst jedoch nicht nur niedermolekulare Botenstoffe. Epithelzellen können nachweislich membranumschlossene Vesikel – sogenannte Exosomen – durch die Poren in das basale Kompartiment abgeben (van Niel et al., 2001). Diese Exosomen haben eine Größe von 30-90 nm (van Niel et al., 2001). Rescigno et al. konnten auch die direkte Aufnahme von luminalen Bakterien durch DCs nachweisen. Dendritische Zellen sind in der Lage, Occludin und Claudin-1 zu bilden. Somit können die DCs mit ihren Dendriten das Epithel penetrieren, ohne die Integrität der Barriere zu beeinflussen, da Tight Junction-ähnliche Strukturen ausgebildet werden (Rescigno et al., 2001; Rimoldi et al., 2004; Rimoldi und Rescigno, 2005). Die DCs sind auf der basolateralen Seite des Epithels lokalisiert und können die an der basolateralen Seite abgegebenen Antigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren (Makala, 2004). Dendritische Zellen konnten im Darm mittels einer Doppelfärbung von CD16 und MHCII nachgewiesen werden. Die dendritischen Zellen in der subepithelialen Schicht sind wesentlich an der Toleranzreaktion gegen kommensale Mikroorganismen und Nahrungsantigene beteiligt (Summerfield und McCullough, 2009). In der *Lamina propria* des Schweines sind DCs durch die Marker MHCII⁺CD172a⁺CD11R1⁺CD16⁺ charakterisiert (Haverson et al., 2000). Das Markerprofil ist weiterhin von der Lokalisation der DCs abhängig: 1) *Lamina propria* DCs: CD172a⁺CD11R1⁺, 2) DCs im subepithelialen Dome: CD172a⁺CD11R1⁻, 3) DCs der interfollikulären Region: CD172a⁻CD11R1⁻ und 4) DCs im mesenterischen Lymphknoten: CD172a⁻CD11R1⁺ (Bimczok et al., 2005).

4.2 Isolation und Kultivierung von primären Epithelzellen

Für die Isolation und Kultivierung primärer intestinaler Epithelzellen wurden für verschiedene Spezies unterschiedliche Methoden entwickelt zum Beispiel für die Ratte (Quaroni, 1985), für die Maus (Karasuyama und Melchers, 1985) und für das Schwein (Berschneider, 1989). Die Isolationsmethoden umfassen meist die mechanische Dissoziation, Kalzium-Chelationsprotokolle und den enzymatischen Verdau. In der vorliegenden Arbeit kamen vier Protokolle zur Anwendung: 1) eine Kombination aus mechanischer Dissoziation und Chelation (Gonzalez-Vallina et al., 1996, modifiziert), 2) eine Kombination aus mechanischer Dissoziation und Chelation bei 4°C (Flint et al., 1991), eine Kombination aus mechanischer Dissoziation und Chelation bei Raumtemperatur (Bjerknes et al., 1981) und 4) eine Kombination aus mechanischer Dissoziation und enzymatischen Verdau (Gliddon et al., 2008). Die Kombination aus mechanischer Dissoziation und Chelation (Gonzalez-Vallina et al., 1996) als auch die Kombination aus mechanischer Dissoziation und enzymatischen Verdau (Gliddon et al., 2008) zeigten die besten Ergebnisse. Die Modifikation bestand in der Invertierung des Darmes, um die geringe Ausbeute an Kryptenzellen im Originalprotokoll zu erhöhen. Die Protokolle nach Bjerknes und Cheng (1981) und Flint et al. (1991) wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen, da die Ausbeute an lebenden Zellen zu gering war. Bei der Isolation durch die mechanische Dissoziation und Chelation (Gonzalez-Vallina et al., 1996) sollte eine getrennte Charakterisierung der Krypten- und Villusepithelzellen erzielt werden. Als Chelationsagens wurde Citratpuffer verwendet. Bei der Methode von Gonzalez-Vallina et al. (1996) sollten sich zuerst die Epithelzellen der Zotten und danach die Epithelzellen der Krypten ablösen. Durch die Probennahme nach der Isolation und der Färbung von Gefrierschnitten mit Hämatoxylin-Eosin konnte das Ablösen von Zellen aus der Kryptenregion gezeigt werden. Das Protokoll von Gliddon und Kollegen führte zu einer guten Zellausbeute jedoch aber auch zu einer hohen Verunreinigung mit Fibroblasten (Gliddon et al., 2008). Durch weitere Modifizierungen konnte die Verunreinigung mit Fibroblasten reduziert werden. Baten et al. konnten durch den Einsatz niedriger Konzentrationen von Collagenase (0,2 mM), EGTA (0,1 mM) und Trypsin (0,01 mM) eine hohe Ausbeute an lebenden Zellen bei der Isolation von Enterozyten aus dem Kolon erzielen (Baten et al., 1992). Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von 1 mg/ml Collagenase entspricht somit dem 10-fachen der Konzentration, die Baten et al. verwendet haben. Gibson D'Ambrosio et al. beschrieben in ihrer Arbeit eine

Schädigung der Membranstruktur bei Zellen, die hoch konzentrierten Enzymlösungen oder zu lange den Inkubationslösungen ausgesetzt waren. Dieses beeinflusste auch die Adhäsion der Zellen negativ (Gibson D'Ambrosio et al., 1986). Durch den enzymatischen Verdau kommt es grundsätzlich zur Verunreinigung mit Fibroblasten. Walzer und Kollegen konnten eine neue Methode entwickeln, die sich zwar auch der Methode des enzymatischen Verdau bedient, jedoch die Verunreinigung stark abnahm. Das in der Studie verwendete Enzym – Thermolysin – wirkt nur selektiv auf spezifische Moleküle der Basalmembran und konnte so auch die Zellausbeute und Vitalität steigern (Walzer et al., 1989).

Die Verunreinigung mit Fibroblasten ist ein wesentlicher Faktor, welcher die Kultivierung der primären Epithelzellen erschwert. Nachdem Passagieren der Zellen war eine hohe Anzahl an Fibroblasten detektierbar, welche schon innerhalb von zwei Tagen die primären Epithelzellen überwuchsen. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die Aktivierung der Fibroblasten durch Trypsin. Infolgedessen beginnen die Fibroblasten zu proliferieren (Akers et al, 2000). Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden zur Reduktion der Fibroblasten in der Präparation getestet. Zuerst wurde versucht die Fibroblasten mittels Skalpell zu entfernen. Hierfür wurden die Fibroblastenkolonien markiert und im Anschluss mit einem Skalpell vom Boden der Schale abgeschabt. Diese Methode ist sehr zeitaufwändig, erlaubt aber die Reduktion des Fibroblastenanteils in der Kultur. Eine andere Möglichkeit zur Fibroblastenreduktion war der Zusatz von Collagenase A zum Medium nach der Passage der Zellen (Pickartz, 2002). Es konnte jedoch keine Reduktion der Fibroblastenkontamination erzielt werden. Um eine reine Epithelzellkultur zu erhalten, wurde ebenfalls die „*Limited Dilution*“-Technik in Kombination mit Protokoll eins (Gonzalez-Vallina et al., 1996) ausgetestet. Der Anteil an FCS im Medium spielt beim Überleben einzelner Zellklone eine wesentliche Rolle (Evans et al., 1992; Kaeffer et al., 1993). In den verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass mit 0,1% FCS im Medium die Epithelzellen zwar noch lebensfähig sind, jedoch nicht mehr proliferieren. Der Serumanteil für das Zellwachstum muss mindestens 1% betragen (Evans et al., 1992; Kaeffer et al., 1993). Bei Konzentrationen von 10% und größer kommt es wiederum zur starken, mesenchymalen Proliferation (Pickartz, 2002). In der hier vorliegenden Arbeit wurde außerdem das unterschiedliche Sedimentationsverhalten der verschiedenen Zelltypen genutzt, um die Verunreinigung mit mesenchymalen Zellen zu verringern.

Hierfür wurden in unterschiedlichen Zeitabständen nach der Aussaat die Überstände abgenommen und wieder ausgesät. Jedoch brachte diese Methode nicht den gewünschten Erfolg. Moyer und Mitarbeiter dagegen konnten mit diesem Protokoll Epithelzellen in ihrer Kultur anreichern (Moyer et al., 1990). Eine weitere Möglichkeit stellt das unterschiedliche Verhalten beim Passagieren dar. So lösen sich Fibroblasten früher von der Kulturplatte als Epithelzellen. Dies konnte von Owens belegt werden (Owens, 1976).

Nicht nur die Verunreinigung mit darunterliegenden Stromazellen hat einen großen Einfluss auf die Kultivierung der primären Zellen sondern auch die extrazelluläre Matrix. In diesem Zusammenhang konnte eine verbesserte Anhaftung der primären Enterozyten aus dem Schwein auf Collagen I-beschichteten Schalen beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte auch schon von Perreault und Beaulieu belegt werden. Aus Kaninchen isolierte Enterozyten zeigten ein zweifach stärkeres Anhaften auf Matrigel-beschichteten Platten im Vergleich zu unbeschichteten Platten (Perreault und Beaulieu, 1998). Matrigel ist ein Extrakt aus dem *Engelbreth-Holm-Swarm* Tumor (Kleinman et al., 1986) und beinhaltet in unterschiedlichen Anteilen eine Mischung aus Collagen, Laminin und anderen Proteinen (Kleinman et al., 1986). Die Verwendung von ein bis zwei Millimeter starken Matrigelen beziehungsweise Collagengelen wirkt sich jedoch negativ auf die Anhaftung und das Wachstum von primären Epithelzellen aus (Pickartz, 2002).

Die primären Epithelzellen der hier vorliegenden Arbeit konnten bis zur Passage vier kultiviert werden, was darauf schließen lässt, dass die isolierten Zellen möglicherweise ihren Ursprung in den Krypten haben. Nach Passage vier war eine Veränderung der Zellform zu verzeichnen. Die Zellen zeigten einen weniger uniformen Zelltypus, welcher auch nach der nächsten Passage zu beobachten war. Dies weist auf eine irreversible Veränderung des Phänotyps hin. Odedra et al. (1996) konnten primäre intestinale Epithelzellen aus der Ratte bis zu 12 Populationsverdoppelungen kultivieren. Erst danach kam es zur Veränderung des Phänotyps (Odedra et al., 1996). Die Isolation von intestinalen Epithelzellen ergibt nur wenig lebensfähige Zellen (Evans et al., 1994). Die differenzierten Epithelzellen, welche vom normalen Darm eines Säugers gewonnen werden können, sind nur schwer *in vitro* zu kultivieren und haben eine kurze Lebensspanne von zirka vier bis zehn Tagen in Kultur (Fan et al., 2001). Komai und Kimura (1979) demonstrierten eine zweifache Verlängerung der Lebensspanne der primären intestinalen Epithelzellkulturen, wenn diese aus keimfreien

Tieren anstatt aus konventionell gefütterten Tieren gewonnen wurden. In dieser Studie wurden neugeborene, gnotobiotische Schweine verwendet, um den Keimbesatz so gering wie möglich zu halten. Studien haben gezeigt, dass sich primäre Epithelzellen und aus Krebs gewonnene Epithelzelllinien signifikant in der Expression von bis zu 213 Genen unterscheiden. Diese beinhalten Wachstumsfaktoren, Zellstruktur, Zellzyklus, Apoptose und Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Al Moustafa et al. 2002). Primäre Epithelzellen besitzen auch eine veränderte Sensibilität gegenüber Pathogenen im Vergleich zu Epithelzelllinien, welche aus einem Tumor abgeleitet wurden (Patel et al., 1985). Jedoch stammen die meisten intestinalen Epithelzelllinien wie Caco-2, T84, HT-29, Colo205 und SW620 von tumoröses Gewebe ab.

Es gibt nur wenige nicht transformierte intestinale Epithelzelllinien wie IEC-6 und IEC-18, welche aus dem Dünndarm der Ratte gewonnen wurden. Neben diesen Zelllinien zählen auch IPEC-1 und IPEC-J2, welche aus dem Darm von neugeborenen Ferkeln etabliert wurden, zu den nicht transformierten Epithelzelllinien (Gonzalez-Vallina et al., 1996; Quaroni et al., 1979; Schierack et al., 2006; Vincentini et al., 1996). Quaroni et al. (1979) etablierte die erste intestinale Epithelzelllinie (IEC) durch die Isolation von Kryptenzellen aus neugeborenen Ratten. Jedoch besitzt diese Epithelzelllinie Nachteile: a) sie haben nur kurze und spärlich verteilte, apikale Mikrovilli, b) eine limitierte Expression von Tight Junction-Proteinen und Desmosomen, c) wachsen nicht auf Membranen, d) bilden keinen dichten Monolayer und e) den Epithelzellen fehlen die meisten aktiven Transportsysteme und normalen Enzyme des Bürstensaumes (Weng et al., 2005, Quaroni 1996, Versantvoort 2002). Die isolierten Primärzellen in dieser Arbeit konnten durch verschiedene Methoden charakterisiert werden. So konnten zwei wichtige Proteine der Tight Junctions in den Kulturen nachgewiesen werden und zwar Occludin und ZO-1. Des Weiteren wurden Zytoskelettbestandteile wie Aktin und Zytokeratin 18 in den Primärkulturen gefunden. CK18 – als wichtiges Protein des Zytoskeletts – wird *in vivo* jedoch nur in Becherzellen oder M-Zellen beobachtet (Kucharzik et al., 1998). CK-18-positive Zellen wurden nicht nur in den Primärkulturen sondern auch in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien festgestellt. Mögliche Gründe für dieses positive Ergebnis sind das vorhandene Substrat, die Kulturbedingungen oder der Ursprung an sich. Das vorhandene Substrat führt wahrscheinlich zu einer Art von Formstress und damit zur Expression von CK18.

Es ist bekannt, dass Zytokeratine eine wichtige Rolle in der morphologischen und strukturellen Entwicklung von intestinalen Epithelzellen spielen vor allem in der Zelldifferenzierung und in der Antwort auf Stress (Quaroni et al., 1991; Welch et al., 1985). Außerdem ist die Expression von CK8 und CK18 durch *Mrj* – zugehörig zur DnaJ/Hsp40-Proteinfamilie – reguliert. Dieses Protein ist auch bei dem Stress-induzierten „heat shock protein“ Hsp/c70 involviert (Izawa et al., 2000). Interessanterweise sind Zytokeratine wie CK7, CK8, CK18 und CK19 auch in Adenokarzinomen (zum Beispiel: des Gastrointestinaltraktes) exprimiert (Moll et al., 1983). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Aktin und Tubulin um hoch konservierte Sequenzen in den verschiedenen Zelltypen.

Für zukünftige Experimente sind invertierte Darmsegmente die Methode der Wahl sowie die Beschichtung mit Collagen I für eine bessere Anheftung der Epithelzellen. Möglicherweise führt eine dünne Beschichtung mit Matrigel zu einer weiteren Verbesserung der Adhärenz der Zellen (Albini et al., 1992). Die extrazelluläre Matrix ist ein wichtiger Faktor für die Anhaftung der Zellen als auch für den Phänotyp der Zellen. Auf impermeablem Untergrund zeigen humane Enterozyten einen undifferenzierten Phänotyp und auf Matrigel-beschichtete Schalen einen differenzierten Phänotyp (Kleinman und Martin, 2005).

4.3 Der Weg von primären intestinalen Epithelzellen zur nicht transformierten Zelllinie

In dieser Studie konnten mittels zwei verschiedener Protokolle primäre intestinale Epithelzellen aus dem Schwein isoliert und kultiviert werden. Diese primären Epithelzellen zeigten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene charakteristische Epithelzellmarker wie zum Beispiel verschiedene Tight Junction-Komponenten. Wesentliche Faktoren bei der Gewinnung von primären Zellen sind: die Ausbeute, die Lebensfähigkeit und das Adhäsionsverhalten der isolierten Zellen. Analog zu den primären Präparationen wurde das Adhäsionsverhalten von IPEC-1 und IPEC-J2 untersucht. So adhärten 60% der passagierten IPEC-1-Zellen auf dem impermeablen Zellkulturträger, während lediglich nur 36% bei IPEC-J2 anwuchsen. Die Etablierung einer Zelllinie setzt also eine hohe Anzahl lebensfähiger und adhärierender Zellen voraus.

Bei den vorliegenden Experimenten wurde beobachtet, dass während der Isolation und innerhalb der ersten vier Kultivierungstage die meisten primären Zellen starben. Infolgedessen wurde nach Methoden gesucht, die das Überleben und die Viabilität der Zellen steigern. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass humane embryonale Stammzellen (hES), welche mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 behandelt wurden, ein höheres Überleben zeigten (Baker, 2009; Sato et al., 2011). Analog zu den primären intestinalen Enterozyten aus dem Schwein zeigten die hES hohe Apoptoseraten, wenn sie aus dem Zellverband herausgelöst wurden (Watanabe et al., 2007; Takehara et al., 2008; Sato et al., 2009). Durch die Zugabe von Y27632 konnte die Überlebensfähigkeit der hES gesteigert werden (Watanabe et al., 2007; Takehara et al., 2008; Sato et al., 2009). Diese Hypothese wurde auf die primären Enterozyten, welche aus dem Schwein isoliert wurden, übertragen. Die Zugabe dieses Inhibitors konnte die Viabilität der isolierten primären Zellen nach dem Protokoll von Gonzalez-Vallina et al. (1996) erhöhen. Ohne den Zusatz dieses Inhibitors starben die meisten primären Zellen spätestens nach vier Tagen. Durch die Zugabe von Y27632 konnte auch die Adhärenz der frisch isolierten Zellen gesteigert werden. Diese Zellen konnten bis Passage vier kultiviert werden. Die beiden Proteine – Rho und Rho-Kinase (ROCK) – spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung von verschiedenen zellulären Signalwegen.

Die Mitglieder der Rho-Familie sind involviert in: a) die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, b) die Formation von „*stress fibres*“, c) die Ausbildung der Zellpolarität, d) die Membrantransportvorgänge und e) die Regulation der Transkriptionsaktivität (Amano et al., 1997; Kawabata et al., 2004; Leung et al., 1996). Die Inhibierung von ROCK selbst durch Y27632 blockiert offenbar Apoptose-initiierte Prozesse innerhalb des Zytoskeletts (Krawetz et al., 2009). In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Y27632 die Kultivierung von primären intestinalen Epithelzellen verbessert, jedoch war auch mit dem Einsatz des Inhibitors lediglich eine Kultivierung der Epithelzellen bis Passage vier möglich. Als denkbare Gründe für die schlechte Kultivierbarkeit kommen die geringe gewonnene Zellmenge und eine zu geringe Aussaatdichte in Frage. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden unterschiedliche Gesamtzellzahlen der beiden etablierten Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 – ausgesät. Als minimale Konzentration wurde 10 000 Zellen pro Milliliter gefunden. Unterhalb dieser Grenze konnte sich auch nach langer Kultivierung kein konfluenter Zellrasen mehr ausbilden. Für die Etablierung einer kontinuierlichen Zelllinie müssen somit drei wesentliche Voraussetzungen gegeben sein: a) ein gutes Adhäsionsverhalten der Zellen, b) eine hohe Anzahl an lebenden Zellen und c) eine relativ kurze Generationszeit. Dies muss über jede Passage der Zellen gewährleistet sein. Natürlich gibt es hier mit hoher Wahrscheinlichkeit Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies. Geht man von diesen Voraussetzungen aus, ist die Methode der „*Limited Dilution*“ eher ungeeignet. Somit erklärt sich der Befund, dass mit dieser gängigen Methode keine Zellkolonien aus einer Einzelzelle etabliert werden konnten.

Unter den vielen Faktoren, welche die Gewinnung von primären Epithelzellen aus dem Darm beeinflussen, ist der initiale Adhäsionsschritt einer der Wichtigsten. Die Lebensfähigkeit und das Adhäsionsvermögen der primären Zellen konnten zwar mit Hilfe des Rho-Kinase-Inhibitors verbessert werden, jedoch ist die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff ein nicht zu vernachlässigender Faktor. So wurde in unterschiedlichen Protokollen oxygeniertes Medium für die Kultivierung von primären Zellen verwendet (Iype, 1971; Atkuri et al., 2007). Die intestinalen Epithelzellen werden basal durch den Blutfluss mit Sauerstoff versorgt und sind in ihrem Metabolismus nicht auf Glykolyse angewiesen.

Durch die Isolierung und die Aussaat der primären Epithelzellen wird die Zelle gezwungen einen Wechsel von Oxidativer Phosphorylierung zur Glykolyse vorzunehmen, da die Sauerstoffversorgung in der Zellkultur nicht der *in vivo*-Situation entspricht. Möglicherweise ist der Wechsel zwischen oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse ein entscheidender Faktor bei der Kultivierung von primären Zellen. Eine wesentliche Verbesserung der Sauerstoffversorgung bietet die Kultivierung von primären intestinalen Epithelzellen als Air-Liquid-Interface Kultur (Sato et al., 2009; Ootani et al., 2009). Ein Faktor, der die Adaptation an die hypoxischen Bedingungen in der konventionellen Zellkultur vermittelt, ist HIF-1 (*hypoxia inducible factor*). HIF-1 ist verantwortlich für die Veränderungen in der Geneexpression, welche durch die Hypoxie hervorgerufen werden (Papandreou et al., 2006). Die verminderte mitochondriale Sauerstoffversorgung spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumorentwicklung (Semenza, 2004). Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg oder andere onkogene Ereignisse führen oft zur Stabilisierung von HIF-1 (Majmundar et al., 2010).

Eine weitere Möglichkeit zur Etablierung einer kontinuierlichen Zelllinie ist die maligne Transformation. Unter maligner Transformation versteht man den Übergang von normalen Zellen, welche in ihrem Wachstum kontrolliert sind, zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen. Dies kann durch chemische Einflüsse oder durch sogenannte transformierende (onkogene) Viren (Rous-Sarkom-Virus; SV40) erfolgen. Transformierte Zellen zeigen somit die charakteristischen Merkmale von Tumorzellen wie unkontrolliertes Wachstum, Veränderungen von Zell-Zell-Kontakten, Wachstum in sogenannten Weichagar und die Ausbildung von Tumoren nach einer Injektion der Zellen in Tiere. Bei einer Kultur von adhären-ten Zellen wie IPEC-1 und IPEC-J2 wird das Wachstum der Zellen durch den Kontakt zur Nachbarzelle gehemmt, so dass es zur Ausbildung eines einschichtigen Monolayers kommt. Durch eine Transformation unterbleibt diese Hemmung und es kommt zur Formation von Multilayern (Rothen-Rutishauser et al., 2000). Für IPEC-1 und IPEC-J2 konnte diese Ausbildung von mehrschichtigen Layern nicht bestätigt werden. Auch die Untersuchung der beiden Zelllinien im Weichagar ergab keine Hinweise auf eine tumoröse Transformation. Die Formation von Multilayern wurde für Caco-2, einer aus einem Tumor stammenden Zelllinie, beschrieben (Rothen-Rutishauser et al., 2000). Hier kommt es zur unkontrollierten Zellteilung und es werden mehrere Lagen übereinander geschichtet. Die Caco-2-Zellen wurden als Positivkontrolle für das Wachstum im Weichagar verwendet und zeigten ein invasives Wachstum.

Die kultivierten primären Epithelzellen zeigten den Phänotyp einer Epithelzelle. Es konnten Tight Junction-Proteine wie ZO-1 und Occludin nachgewiesen werden. Tight Junctions (TJ) bilden für den parazellulären Weg eine Diffusionsbarriere für lösliche Stoffe und sind an der Polarisierung der Zellen beteiligt. Die Durchlässigkeit der Barriere ist physiologisch reguliert, wobei eine Zerstörung der Tight Junctions schwere Erkrankungen verursacht (Mitic et al., 2000; Musch et al., 2006). Occludin ist ein Phosphoprotein der Tight Junctions und enthält vier transmembranäre Domänen (Furuse et al., 1993). Vergleicht man das Vorhandensein und die Verteilung der Tight Junction-Proteine zwischen den primären Zellen und den beiden Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 – kann kein Unterschied festgestellt werden. In MDCK-Zellen konnte die Interaktion von Occludin und Claudinen nachgewiesen werden (McCarthy et al., 1996). Occludin selbst kann die Permeabilität der Barriere beeinflussen, jedoch hat der Verlust von Occludin keinen Einfluss auf den TEER oder die Adhäsion der Zellen. Somit muss Occludin eine andere Bedeutung haben und eher eine fakultative Komponente der intestinalen Barriere sein (Saitou et al., 1998). *In vivo* ist Occludin auf die Krypten beschränkt und nimmt entlang der Krypten-Zotten-Achse im neu geborenen Schwein ab. Diese Tatsache ist ein Indiz dafür, dass sowohl die primären Zellen als auch beide Zelllinien ihren Ursprung in den Krypten haben. ZO-1 ist ein weiteres zytoplasmatisches Protein der Tight Junctions, wobei die Verteilung von ZO-1 nicht nur auf die Krypten beschränkt ist. Beide Zelllinien und die primären Zellen zeigen eine spezifische ringförmige Verteilung von ZO-1. Im Jahre 1986 wurde ZO-1 zum ersten Mal beschrieben. Es ist mit anderen regulatorischen zytoplasmatischen Proteinen und Aktin gekoppelt (Stevenson et al., 1986). Zonula occludens-Proteine (ZOs) sind ein Teil der membranassoziierten Guanylat-Kinase (MAGUK) Superfamilie und können an Claudine, Occludin, Aktin-Mikrofilamente, Cingulin und an das Protein-Kinase C- λ -interagierende Protein binden (Mitic et al., 2000). Die Tight Junctions werden durch eine klassische Signalkaskade reguliert. Dies erfolgt über die Abgabe von intrazellulären Kalzium und der Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) (Denker and Nigam, 1998). Erst kürzlich vorgenommene Analysen bestätigen, dass auch Claudine eine wesentliche Rolle in der Regulation und Funktion der Tight Junctions spielen. Claudine polymerisieren in lineare Fibrillen im Gegensatz zu Occludin (Lal-Nag and Morin, 2009).

4.4 IPEC-1 und IPEC-J2 – zwei unterschiedlich regulierte Zelllinien – die mögliche Rolle von p53

Die porcinen Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 – wurden bezüglich Zellzyklus, Metabolismus und Differenzierung mittels qPCR untersucht. In IPEC-J2 konnte ein 300-fach erhöhtes mRNA-Level für p53 ermittelt werden. Während die Halbwertszeit des Proteins sehr kurz ist (15-30 Minuten; Kim et al., 2001), wurde für das Transkript von p53 eine Halbwertszeit von 22 Stunden ermittelt (Kim et al., 2001). P53 wird nach DNA-Schädigung posttranslational stabilisiert. Es handelt sich um ein zentrales Molekül und bewirkt über verschiedene Signalkaskaden eine Wachstumsarretierung und ab einer bestimmten Konzentration wirkt es pro-apoptotisch (Lu et al., 2001). Die Gründe für das unterschiedliche p53-mRNA-Level können einerseits ein verstärkter Abbau von p53-mRNA in IPEC-1 oder andererseits eine stärkere Stabilisierung von p53-mRNA in IPEC-J2 sein. Maquat und Carmichael diskutierten in ihrer Arbeit, dass die mRNA-Stabilität durch eine „nonsense mediated mRNA decay (NMD)“ vermittelt wird (Maquat und Carmichael, 2001). Dieses tritt entweder im Zytoplasma oder im Nukleus auf. NMD ist ein Mechanismus, der die mRNA-Degradation aktiviert und durch eine vorzeitige Beendigung zu einer Herabregulierung der mRNA-Translation führt (Maquat und Carmichael, 2001). Möglicherweise könnte in diesem Mechanismus der Grund für eine hohe Stabilität der mRNA in IPEC-J2 liegen.

Es ist bekannt, dass p53 verschiedene Gene auf mRNA-Niveau regulieren kann. In normalen Zellen wird p53 auf einem niedrigen Level exprimiert. Dieses wird durch einen negativen „*feedback loop*“ reguliert (Harris und Levine, 2005). MDM-2 bindet an das p53-Protein, um die Degradation durch die E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität einzuleiten (Yin et al., 2002). Bisher konnten 10 positive und negative „*feedback loops*“ im p53-Signalweg nachgewiesen werden (Harris und Levine, 2005). Das p14/p19 ARF-Protein bindet an MDM-2, reguliert die Aktivität von MDM-2 herab und erhöht so das Level von p53 (Honda und Yasuda, 1999). Der p14/19 ARF-MDM-2-Komplex ist im Nukleus lokalisiert. Der Nukleus ist der Ort der ribosomalen Biogenese, wo p14/19 ARF selbst die Rate des Prozessierens der Vorläufer-RNA in reife, ribosomale Untereinheiten beeinflussen kann (Sugimoto et al., 2003). Datta et al. zeigten, dass p14/19 ARF auch die Myc-Aktivität ändern kann (Datta et al., 2004). Möglicherweise basiert das hohe Level an p53 in IPEC-J2 auf einen Defekt in der ribosomalen Biogenese.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass p53 eine wichtige Rolle in der Regulation der adaptiven Antwort auf Hypoxie in Tumorzellen spielt (Royds et al., 1998). So stellen Mutationen im p53-Gen die weitverbreitetsten Defekte in Tumoren dar. Royds et al. konnten zeigen, dass mutiertes p53 das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen erhöht (Royds et al., 1997). In der hier vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen beiden Zelllinien bezüglich des mRNA-Levels von HIF-1 α festgestellt werden. Durch die Anwendung des ALI-Protokolls auf intestinale Epithelzellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine verbesserte Sauerstoffversorgung die funktionelle und strukturelle Differenzierung von IPEC1 und IPEC-J2 fördert (Nossol et al., 2011). Jedoch konnten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festgestellt werden, IPEC-1 scheint sensitiver gegenüber der Sauerstoffversorgung als IPEC-J2 zu sein (Nossol et al., 2011). Die Arbeiten zur Regulation von p53 und HIF-1 α stehen gegenwärtig noch aus.

Eine weitere wichtige Funktion von p53 ist die Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung durch die Regulation verschiedener Gene wie *LIG-1*, *MCL-1*, *P21*, *BAD*, *BAX* und *BCL-2* (Macleod et al., 1995). Eine Schädigung der DNA führt zum Beispiel zur Akkumulation von transkriptional-aktiven p53. Dies wiederum induziert die Expression von p21-mRNA und die Expression von p21. P21 agiert als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen und beeinflusst so den Zellzyklus (Cox und Lane, 1995). Die Hochregulation von p21-mRNA kann aber auch unabhängig von p53 stattfinden. Die Expression scheint auf post-transkriptionalen Wege reguliert zu sein, da die Erhöhung von p21-mRNA von einer Erhöhung des Protein-Levels begleitet ist. Dies wurde für MEL-Zellen während der Differenzierung und durch Serum-Restimulation gezeigt (Macleod et al., 1995). Die Induktion von Apoptose durch p53 wird durch die Aktivierung der BAX-Expression und der Herabregulation von BCL-2 realisiert (Cox und Lane, 1995). In diesem Fall verändert sich das Verhältnis zwischen BAX und BCL-2 und die Zellen durchlaufen Apoptose (Cox und Lane, 1995). In der hier vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen den Zelllinien bezüglich des BAX/BCL-2-mRNA-Verhältnisses festgestellt werden. P53 ist auch verantwortlich für eine Erhöhung der Transkription und Expression von BAD (Jiang et al., 2006), welches in dieser Studie signifikant in IPEC-J2 erhöht ist.

Zusammen mit p53 bildet BAD an der äußeren Mitochondrienmembran einen Komplex, welcher die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranspalt bewirkt (Jiang et al., 2006). Es konnte eine Akkumulation von p53 und BAD in den Mitochondrien und ein reduziertes Vorkommen im Zytosol festgestellt werden. Dies war assoziiert mit einer Abgabe von Cytochrom C (Jiang et al., 2006). Die Verteilung von BAD und p53 wurde in IPEC-1/IPEC-J2 nicht untersucht. Weitere durch p53-regulierte Gene lassen eine Verbindung zwischen Differenzierung und Altern zu. Der Alterungsprozess beinhaltet Veränderungen der mt-DNA, eine übermäßige Produktion an ROS (*reaktive oxygen species*) und einen metabolischen Wechsel von mitochondrialer Atmung zur Glykolyse durch die ATP-Versorgung und einem erhöhten Level an H₂O₂ (Wei, 1998). Alternde Zellen wiederum produzieren ein erniedrigtes Level an PDH und zeigen einen erniedrigten Sauerstoffverbrauch durch weniger respiratorisch-aktive Enzyme. Dies weist auf eine Erhöhung der anaeroben Glykolyse durch oxydativen Stress hin (Zwerschke et al., 2003).

Relevante Veränderungen des mRNA-Levels sind dem Komplex der zellulären Differenzierung zu zuordnen. Villin-1, Villin-2, Espin, TLR-4 und MUC-4 spielen hierbei eine wichtige Rolle und sind in IPEC-J2 im Vergleich zu IPEC-1 signifikant hochreguliert. Parallel hierzu wurden im TEM weniger und kürzere Mikrovilli bei IPEC-1 beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass diese verschiedene Gene einen Einfluss auf das Wachstum der Mikrovilli und somit auf die Differenzierung haben. Friederich zeigte, dass Villin in das Wachstum der Mikrovilli und damit in die Reorganisation der Aktin-Mikrofilamente involviert ist (Franck et al., 1990; Friederich et al., 1989, 1992). Die hier vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass verschiedene Gene bei der Morphogenese der Mikrovilli eine Rolle spielen wie Espin oder Ezrin (VIL-2). Espin ist unter anderem für die Länge der Mikrovilli verantwortlich. Loomis und Mitarbeiter zeigten anhand ihrer Studie einen reproduzierbaren, konzentrationsabhängigen Verlängerungseffekt der PABs von CL4-Epithelzellen (Loomis et al., 2003). Es konnte eine 1,5- bis 2,5-fache Verlängerung der Mikrovilli bei 2% (2 µm) und 10% (3,4 µm) des maximalen Espin-Levels nachgewiesen werden (Loomis et al., 2003). Im Vergleich zu IPEC-1 zeigte IPEC-J2 ein erhöhtes Level an Espin-mRNA. Eine weitere Erklärung für die Unterschiede des Bürstensaumes zwischen den beiden Zelllinien ist möglicherweise im Ursprung der Zellen zu finden. Mucherjee und Williams fanden Unterschiede zwischen Epithelzellen der Krypten und Zotten in der Maus.

Während die Epithelzellen der Krypte nur vereinzelte und kurze Mikrovilli aufwiesen, wurden bei den Epithelzellen der Zottenregion vergleichsweise mehr und längere Mikrovilli gefunden (Mucherjee und Williams, 1967).

β -Catenin ist ein weiterer wichtiger Marker für die Differenzierung von Zellen und ist in den Wnt/ β -Catenin-Signalweg involviert. IPEC-1 und IPEC-J2 zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression von β -Catenin. Das APC-abhängige Protein (*adenomatous polyposis coli*) inaktiviert β -Catenin. Durch den Verlust von APC kommt es zur Akkumulation von β -Catenin im Nukleus. Dies führt zur Unterdrückung der Differenzierung (Andreu et al., 2005). Auf der anderen Seite erfordert jedoch die Proliferation in intestinalen Epithelzellen den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und unterliegt einer negativen Rückkopplung durch das Dickkopf-Protein unter der Kontrolle des Villin-Promotors (Pinto et al., 2003). In nicht proliferierenden Zellen kann ein niedriges Level an zytoplasmatischen und nuklearen β -Catenin gefunden werden. Eine erhöhte β -Catenin-Expression oder eine erhöhte Stabilität wird in vielen Krebstypen beobachtet (Miwa und Furuse, 2001; van Dekken und Wink, 2007; Clevers, 2006). Weitere Marker für differenzierte Epithelzellen sind Proteine der Tight Junctions, welche die Durchlässigkeit der epitheliale Barrier regulieren (Matter und Balda, 2003; Tsukita et al., 2001). Die Tight Junctions formen die apikalen, parazellulären Junctions der polarisierten, intestinalen Epithelzellen. In IPEC-J2 konnte ein signifikant reduziertes Level an Claudin-1 und Occludin und ein signifikant erhöhtes Level an Claudin-3 und Claudin-7 auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Occludin interagiert mit Claudinen und kann den elektrischen Widerstand in MDCK durch die Beeinflussung der extrazellulären Konformation der Claudine erhöhen (McCarthy et al., 1996). Das Fehlen von Occludin in Stammzellen hat jedoch keinen Effekt auf den TEER oder die Zelladhäsion (Saitou et al., 1998). Dies konnte auch für den Darm gezeigt werden (Saitou et al., 2000). Somit scheint Occludin nur eine fakultative Rolle in der Bildung der epitheliale Barriere zu spielen (Saitou et al., 1998; Saitou et al., 2000).

4.5 Die Entwicklung eines Systems, in welchem sich intestinale Epithelzellen in ihrer Form und Funktion der *in vivo*-Situation annähern

Es existieren verschiedene Methoden zur Kultivierung von intestinalen Epithelzellen *in vitro*. Die Kultivierung auf impermeablen oder permeablen Untergrund sind weitverbreitete Protokolle in der Zellkultur. Differenziertere zellbiologische und molekularbiologische Methoden zeichnen ein immer detaillierteres Bild der intestinalen Barriere ab. Diese verfeinerten Methoden zeigen aber auch signifikante Diskrepanzen zwischen der *in vivo*- und der *in vitro*-Situation im Zellkulturmodell auf. Des Weiteren werden widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer Untersuchungsmethode durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen gefunden (Sambuy et al., 2005). Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines neuen Kultursystems, welches die *in vivo*-Situation der intestinalen Barriere optimal nachstellt. Das Zellkulturmodell soll dabei die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der intestinalen Barriere *in vivo*, speziell der Epithelzellschicht, möglichst weitreichend *in vitro* wiedergeben. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei etablierte intestinale Zelllinien, porcinen Ursprungs, eingesetzt (Berschneider, 1989; Gonzalez-Vallina et al., 1996; Schierack et al., 2006). Die Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 – wurden auf impermeablen Untergrund (Platte), permeablen Untergrund (Membran) und als *air-liquid interface culture* kultiviert. Die verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurden gewählt, um die Auswirkungen derselbigen auf die Morphologie und Funktion der Zellen zu untersuchen. Die morphologischen Parameter waren folgende: Zelldichte, Zellfläche, Zellkernfläche und Schichtdicke. Beide intestinalen Epithelzellen zeigten eine Zunahme der Zelldichte und der Schichtdicke in dieser Reihenfolge: Kultivierung auf impermeablen Untergrund < Kultivierung auf einer Membran < Kultivierung als Air-Liquid Interface (ALI) Kultur. Umgekehrt verhielt es sich bei der Zellgröße und der Zellkernfläche. Hier kommt es zur Abnahme beider Parameter in der gleichen oben genannten Reihenfolge. Die Schichtdicke der ALI-Kultur liegt mit zirka 23-24 μm im Bereich der *in vivo*-Situation (siehe Kapitel 4.1). Aus den verschiedenen Parametern wurde ein geometrisches Modell des Zellvolumens und des Zellkern-Zell-Verhältnisses berechnet. Bei einer Zunahme des Zellvolumens wurde eine Abnahme des Zellkern-Zell-Verhältnisses

in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur gefunden. Das Verhältnis zwischen Zellkern und Zelle stellt einen wichtigen Kontrollpunkt in der Entwicklung und Differenzierung dar. Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass es in der Embryonalentwicklung von Seesternen erst zur Adhärenz der Blastomeren kommt, wenn das Zellkern-Zell-Verhältnis 0,06 beträgt (Masui et al., 2001). Ähnliche Werte geben Huber und Gerace (2007) an. In ihrer Studie wurde ein Verhältnis von 0,08 ermittelt (Huber and Gerace, 2007). Ein vergleichbares Verhältnis wurde für IPEC-J2 in der ALI-Kultur gefunden. In IPEC-1 wird dieser Wert schon auf permeablen Untergrund erreicht und verringert sich weiter in den ALI-Kulturen. Neumann und Nurse fanden heraus, dass die Größe des Zellkerns durch das umgebende Zytoplasma kontrolliert wird. Gleichzeitig ergab sich eine Vergrößerung des Zellvolumens (Neumann und Nurse, 2007). Die Vergrößerung des Zellvolumens konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden und zwar in folgender Reihenfolge: Kultivierung auf impermeablen Untergrund < Kultivierung auf einer Membran < Kultivierung als ALI-Kultur. Deschenes et al. konnte anhand von Hepatozyten zeigen, dass eine Abnahme des Zellkern-Zell-Verhältnisses mit einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität einhergeht (Deschenes et al., 1981). Dies wird als Marker für die Differenzierung von Hepatozyten interpretiert (Deschenes et al., 1981). Eine andere Studie konnte das Zellvolumen und Zellzyklusveränderungen in Zusammenhang bringen. HL-60-Zellen zeigten eine tägliche Reduktion des Zellvolumens und zeitgleich konnte eine Zunahme der Anzahl der Zellen festgestellt werden (Zucker et al., 1983). Es wurde vermutet, dass es zu Unterschieden in der Verweildauer in den verschiedenen Zellzyklusstadien während der Differenzierung gekommen ist (Zucker et al., 1983). Oney und Mitarbeiter konnten in einer Studie den Einfluss des Zytoplasma-Zellkern-Verhältnisses belegen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Zytoplasma-Zellkern-Verhältnisses die c-jun-Transkription und den AP-1-Komplex beeinflussen (Oney et al., 2005). C-jun und AP-1 sind zwei wesentliche Komponenten im Zellwachstum. Ein weiterer Einfluss in Bezug auf p63 konnte durch Arpitha und Srinivasan belegt werden. P63 stellt ein Schlüsselgen in der Proliferation und Differenzierung dar (Möritz, 2006). In einer Studie von Arpitha konnte belegt werden, dass Zellen mit einem hohen Zytoplasma-Zellkern-Verhältnis ein hohes Level an p63 exprimieren und demzufolge einen langsameren Zellzyklus vollführen (Arpitha and Srinivasan, 2008).

Interessanterweise scheint das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma ein Limit bei 1:25 zu erreichen. So können Zellkerne mit einem Durchmesser von 5-25µm zirka das 125-fache ihrer Größe bedienen (Bruusgaard et al., 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen weisen in den unterschiedlichen Kultursystemen Zellkerndurchmesser von zirka 5-15 µm auf. Betrachtet man die ermittelten theoretischen Werte für das Zellvolumen, so kann man feststellen, dass die theoretischen Werte für die Versorgung des Zytoplasmas (125-fache Größe vom Zellkerndurchmesser) nicht überschritten werden.

Neben der morphologischen Charakterisierung können Differenzierungsmuster auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene untersucht werden. Barnard et al. (1989) postulierte, dass TGFβ mit Epithelzellen assoziiert ist und die Proliferation einer Kryptenzelllinie *in vitro* inhibiert (Barnard et al., 1989). Kurokawa et al. konnten die Differenzierung der Zelllinie IEC-6 durch TGFβ nachweisen. In dieser Studie führte die Behandlung von IEC-6 mit TGFβ zur Verminderung des Einbaus von [³H]-Thymidin und zu einer Reduktion der FCS-induzierten Stimulation. TGFβ ist somit wahrscheinlich für die Inhibition der proliferativen Aktivität von intestinalen Epithelzellen und deren Differenzierung verantwortlich (Kurokawa et al., 1987). Ein weiterer wichtiger Faktor der zellulären Differenzierung ist durch die extrazelluläre Matrix gegeben. Eine deutliche Differenzierung konnte für T84, Caco-2, HT-29-Cl.19A und HT29-Cl.16E gezeigt werden, wenn diese auf Collagen I-beschichteten Membranen kultiviert wurden (Laboisse et al., 1994). Die Sucraseaktivität von Caco-2-Zellen ist allerdings bei einer Kultivierung auf Laminin vergleichsweise höher als bei einer Kultivierung auf Collagen I (Basson et al., 1996). Weiterhin besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von Pharmaka eine Differenzierung zu erreichen. Gonzalez-Vallina et al. (1996) zeigten anhand von IPEC-1 eine Glukocortikoid-vermittelte zelluläre Differenzierung der Zellen. Dieses mit Dexamethason auf Membranen erzielte Ergebnis konnte in der hier vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. In allen überprüften Fällen zeigten die IPEC-1-Zellen typische apikale Tight Junctions und Mikrovilli. Eine Expression von Villin konnte jedoch auch nach Dexamethasonbehandlung nicht beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu konnte anhand von HT-29 eine Differenzierung durch Methotrexat (MTX) nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von Konzentrationen von 10⁻⁷ mol/L MTX wurde eine Mischpopulation von absorptiven Zellen und Goblet-Zellen erhalten. Eine Erhöhung der Konzentration auf 10⁻⁴ und 10⁻³ mol/L MTX resultierte in einen Wechsel von Mucus-produzierenden Zellen zu absorptiven Zellen. Eine weitere Möglichkeit zur

Differenzierung dieser Zelllinie ist die Substitution von Glucose durch Galactose und der Gebrauch von Inosin oder Uridin als Kohlenstoffquelle (Neutra 1989, Zweibaum 1991). Möglicherweise führt die morphologische Polarität auch zur funktionellen Polarität.

In der *in vivo*-Situation generieren proliferative Zellspezies der intestinalen Krypten Enterozyten, welche auf dem Weg von der Krypte zur Zotte eine Reihe von Differenzierungs- und Reifungsschritten durchlaufen. Der Aufbau von Zell-Zell-Kontakten ist bei diesem Prozess von entscheidender Bedeutung. In allen drei Kultivierungssystemen konnten Zell-Zell-Kontakte anhand des Tight Junction-Proteins ZO-1 und durch elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden. *In vitro* konnte durch verschiedene Experimente gezeigt werden, dass auch Zell-Zell-Kontakte eine Differenzierung begünstigen können und somit das *in vivo*-Signal ersetzen können (Peterson et al., 1993). Die frühen proliferativen Stadien von Caco-2 sind undifferenziert, bilden aber nach erreichter Konfluenz einen polarisierten Monolayer mit apikalen Tight Junctions und gut entwickelten Mikrovilli aus. Diese Zellen exprimieren verschiedene Enzyme wie Disaccharidasen und Peptidasen und transportieren Ionen und Wasser zur basolateralen Membran (Pinto et al., 1983). In Caco-2 ist dieser Zell-Zell-Kontakt ein kritischer Schritt in der Induzierung des Differenzierungsprozesses (Aliaga et al., 1999; Taupin und Podolsky, 1999; Pinto und Clevers, 1983; Engle et al., 1998, Deschenes et al., 2000; Deschenes et al., 2001).

Bei der Analyse der Tight Junctions ergab sich ein verstärktes ZO-1-Signal an den trizellulären Kontaktstellen der Zellen. Diese Akkumulation wurde zur Quantifizierung der Kontaktstellen herangezogen. Dabei ergab sich ein Wert von 0,8 trizellulärer Kontakten pro Zelle. Für den epithelialen Monolayer kann von einer hexagonalen, dichtesten Kugelpackung ausgegangen werden. Für die Grundform einer hochprismatischen Epithelzelle wurde der Zylinder gewählt. Diese wabenartige Struktur ist in Flachschnitten des Epithels deutlich sichtbar (Nossol et al., 2011). Im Idealfall geht eine zentrale Zelle mit sechs Nachbarzellen 6 trizelluläre Kontakte ein (2 trizelluläre Kontakte pro Zelle). Krug und Mitarbeiter konnten bei Experimenten mit MDCK-Zellen einen Wert von $1,6 \cdot 10^6$ trizelluläre Kontakte/cm² ermitteln (Krug, 2009; Westphal et al., 2010). Während bei IPEC-1 der theoretische Wert fast erreicht wird, ist das Verhältnis bei IPEC-J2 deutlich kleiner.

Trizelluläre Tight Junctions sind exponierte Areale in der epithelialen Zellschicht. Es wurden charakteristische Proteine identifiziert, welche vorwiegend aber nicht ausschließlich in den trizellulären Tight Junctions vorhanden sind. Das Tricellulin ist ein 63,6 kDa großes Protein und besitzt vier transmembranäre Regionen. Dabei handelt es sich um zwei extrazelluläre und zwei kurze, intrazelluläre Loops (Ikenouchi et al., 2005). Anhand der epithelialen Zelllinie Eph4 konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Tricellulin-Expression den transepithelialen Widerstand (TEER) signifikant reduziert. Dieses Ergebnis konnte durch den Nachweis eines verstärkten Durchtritts von FITC-Dextran 4000 verifiziert werden (Ikenouchi et al., 2005). Eine entscheidende Rolle des Tricellulin bei der Regulation des parazellulären Durchtritts ist damit wahrscheinlich (Ikenouchi et al., 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Technik der Air-Liquid Interface (ALI) Kultur wurde ursprünglich an MDCK und NBT-II etabliert (Tchao, 1989). Eine ALI-Kultivierung dieser Zellen verursachte eine verstärkte Differenzierung. Die hierfür verantwortlichen, molekularen Mechanismen sind Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Yokoyama (2006) analysierte GSM06-ALI-Kulturen mit Blick auf den MAP-Kinase-Signalweg. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass MAP-Kinasen durch die ALI-Kultur aktiviert werden. In den ALI-Kulturen war die Phosphorylierung von ERK1/2 erhöht und kann durch den Inhibitor U0126, einem Inhibitor der MAP-Kinase (MEK) (Yokoyama 2006), inhibiert werden. Dieser Mechanismus konnte in der hier vorliegenden Arbeit an IPEC-1 und IPEC-J2 nicht bestätigt werden. Ganz im Gegensatz zur Studie von Yokoyama (2006), konnte kein Unterschied in der Proliferation von ALI-Kulturen und ALI-Kulturen mit dem Zusatz des Inhibitors festgestellt werden. Grundsätzlich kann die p38-MAPK-Aktivität in den Differenzierungsprozess eingebunden sein. So konnte beispielsweise an Caco-2 eine Erhöhung der p38-MAPK-Aktivität nach Erreichen der Konfluenz festgestellt werden. Als Substrat für die Phosphorylierung wurde CDX3 identifiziert. Umgekehrt reduziert sich durch die spezifische Inhibierung von p38 MAPK signifikant die Expression von Differenzierungsmarkern wie Alkalische Phosphatase, Sucrase-Isomaltase und Villin (Houde et al., 2001). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass p38 MAPK in die Regulation von CDX2/3 und somit in die Funktion und Regulation der Differenzierung von intestinalen Epithelzellen involviert ist.

CDX1 wird hauptsächlich in den Krypten exprimiert und die Inhibierung von CDX1 führt zur Reduktion der Proliferation *in vitro* (Lorentz et al. 1997). Im Gegensatz hierzu ist CDX2/3 hauptsächlich in den Enterozyten des Oberflächenepithels exprimiert (James et al. 1994). Verschiedene Gene werden durch entweder CDX1 oder CDX2/3 reguliert. Diese Gene und deren Proteine definieren einen differenzierten Phänotyp zum Beispiel Sucrase-Isomaltase, Glukagon und Lactase (Suh et al. 1996, Jin et al. 1997, Treisman et al. 1996).

Es ist bekannt, dass intestinale Epithelzellen ihre Zellteilung stoppen, wenn sie von der Krypte zum Villus wandern. Jedoch sind die grundlegenden Mechanismen, die zur Induzierung der Differenzierung *in vivo* führen noch wenig untersucht. Es gibt verschiedene Marker, welche eine differenzierte Zellpopulation definieren. Hierzu zählen Statin und Villin. Statin ist ein 57 KD großes, nukläres Protein (Sandig et al., 1994), welches nicht in proliferierenden Enterozyten der Kryptenregion gefunden wird. Im Gegensatz dazu zeigt der Villus, Statin-positive differenzierte Enterozyten (Bissonnette 1990). Dies konnte durch die Untersuchungen von Wang und Lin (1986) bestätigt werden. Durch die Behandlung der Zellen mit serumfreien Medium kam es zur rapiden Abnahme von Statin bis es nicht mehr detektierbar war (Wang and Lin, 1986). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass es eine enge Beziehung zwischen der Expression von Statin und dem Stadium des Zellzyklusaustrittes im *in vitro*-Kultursystem gibt. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch Villin eine wichtige strukturelle Komponente des Zytoskeletts und ein Differenzierungsmarker ist (Coudrier et al., 1988; Dubouet et al., 1987; Robine und Louvard, 2000). Coudrier et al. konnten anhand von HT-29 nachweisen, dass die hohe Syntheserate und die Umverteilung von Villin zum apikalen Pol mit der Existenz und der Entwicklung eines gut entwickelten Bürstensaumes korreliert (Coudrier et al., 1988; Ezzell et al., 1989; Robine et al., 1996).

Eine wesentliche Funktion von differenzierten intestinalen Epithelzellen ist die Bildung einer Barriere zwischen der Umwelt und dem Organismus, als auch den Transport von luminalen Nährstoffen wie Proteine und Lipide zu sichern (Zegers und Hoekstra, 1998). Um die Empfindlichkeit des ALI-Kultursystems zu untersuchen, wurde dem System das Mykotoxin Deoxynivaleol zugesetzt. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen (200 oder 2000 ng/ml) und unterschiedliche Applikationswege (apikal und basolateral) gewählt. Bei IPEC-J2 konnte in den Kontrollen (konventionelle Membrankultur) ein signifikanter TEER-Abfall schon nach 24 Stunden (2000 ng/ml; basolateral) beobachtet werden.

Diesing et al., zeigten für IPEC-J2 gleiche Ergebnisse für jüngere Zellen (Alter 4-7) (Diesing et al., 2011b). Bei den ALI-Kulturen kam es erst nach 48 Stunden zum signifikanten TEER-Abfall. Interessanterweise, konnte bei dem Vergleich von IPEC-1 und IPEC-J2 festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse gegenläufig verhalten. In IPEC-1 konnte ein signifikanter TEER-Abfall nach 24 Stunden (2000 ng/ml, basolateral) in den ALI-Kulturen und nicht in den konventionellen Membrankulturen verzeichnet werden. Gleichzeitig war ein signifikanter Anstieg bei einer DON-Gabe von 200 ng/ml (apikal) in den ALI-Kulturen nach 48 Stunden zu beobachten. Pinton et al. konnten für IPEC-1 (konventionelle Membrankulturen) einen signifikanten TEER-Abfall nach 24 Stunden nachweisen. Dies erfolgte jedoch bei einer DON-Gabe von 20 μ M (Pinton et al., 2009), was einer DON-Konzentration von 5926 ng/ml entspricht. Somit kann zumindestens für die ALI-IPEC-1-Kultur eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Mycotoxin Deoxynivalenol bestätigt werden.

Als weiterer funktioneller Aspekt der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme von Proteinen am Modellprotein BSA untersucht. In dieser Arbeit konnte im Vergleich zu Zellen, welche unter Standardbedingungen kultiviert wurden, eine erhöhte Aufnahme des Modell-Proteins BSA in ALI-kultivierten IPEC-Zellen belegen. Die Zerlegung von Nahrungsproteinen im Darm resultiert in eine Vielzahl von Fragmenten mit unterschiedlicher Molekulargröße. Udall et al. konnte zeigen, dass die Aufnahme von Makromolekülen (BSA) auch beeinflusst vom Alter ist. So konnte gezeigt werden, dass mehr Protein in jungen Kaninchen aufgenommen wird als in Älteren (Udall et al., 1981). Udall et al. argumentierten, dass die intestinale Barriere in Neugeborenen noch nicht ausgereift ist und somit den erhöhten Transport von Proteinen ermöglicht (Udall et al., 1981). Gleiches konnten Leary und Lecce (1976) am Modelltier Schwein nachweisen. Jedoch fanden sie auch Unterschiede zwischen den einzelnen Darmabschnitten (Leary und Lecce, 1976; 1979). Eine andere Studie konnte belegen, dass Stress die transepitheliale Aufnahme im Jejunum von Ratten erhöht (Kiliaan et al., 1998).

β -Lactoglobulin-Protein wird in Fragmente zerlegt, welche eine geringe Molekulargröße besitzen, wie Oligopeptide oder Aminosäuren. BSA hingegen ergibt Fragmente, welche der Größe des Originalproteins entsprechen (Brandtzaeg und Tolo, 1977; Hemmings, 1978; Pang, 1981; Stern und Walker, 1984).

Die Aufnahme von intakten Peptiden lässt die Annahmen zu, dass 1.) Peptide als Zwitterionen transportiert werden, 2.) der Transport nicht Na^+ -abhängig ist, 3.) es sich um einen gerichteten, aktiven Transport handelt und 4.) es sich um einen ATP-abhängigen Prozess handelt. Die Enzyme des Bürstensaumes zerlegen Proteine, welche dann durch PepT-1 ins Zytosol der Zellen gelangen (Rubio-Aliaga and Daniel, 2008). Diese Aufnahme ist ein energieabhängiger Prozess, welcher ATP erfordert. Auf dieser Grundlage basiert die Hypothese dieser Studie, dass eine verbesserte Sauerstoffversorgung durch die ALI-Kultiveringung, in eine höhere Menge an verfügbaren ATP resultiert. Die höhere Menge an ATP resultiert wiederum in eine erhöhte Aufnahme des Modell-Proteins. Liegt eine „normale“ Sauerstoffversorgung vor, so kommt es zur Umsetzung von Glukose zu Pyruvat durch glykolytische Enzyme. Im Anschluss wird Pyruvat von den Mitochondrien für eine weitere Umsetzung durch den „tricarboxylic acid-“ (TCA) Zyklus aufgenommen (Kim et al., 2006).

Wie in der Literatur beschrieben, ist die Glykolyse der wesentliche Stoffwechselweg, um ATP zu produzieren, wenn eine Limitierung von Sauerstoff vorliegt (Dickman und Mandel, 1989). Die Regulation der Glykolyse unterliegt demzufolge dem Sauerstoffgehalt und damit auch dem „*hypoxia inducible factor*“ (HIF) (Rocha, 2007). Die Blutzirkulation bringt Sauerstoff zum Gewebe und der partielle O_2 -Druck der eingeatmeten Luft liegt bei zirka 160 mmHg. Der Sauerstoff gelangt dann durch die Kapillaren der Alveolen zum Organ mit einem partiellen Druck von 104 mmHg. Eine weitere Senkung des partiellen Druckes erfolgt im venösen System. Der arterielle Sauerstoffdruck eines gegebenen Gewebes ist abhängig vom Typ: a) Rattenleber – 16 mmHg und b) Thymus – 10 mmHg (Brahimi-Horn et al., 2007). Diese „normalen“ partiellen Sauerstoffdrücke können vom molekularen Standpunkt aus als hypoxisch angesehen werden. Die Diffusionsdistanz von Sauerstoff in einem Gewebe beträgt zirka 100-200 μm (Brahimi-Horn et al., 2007). Wie bereits erwähnt, spielt hier auf dem molekularen Level der Transkriptionsfaktor HIF-1 eine wesentliche Rolle. HIF-1 besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Weiterhin ist bekannt, dass die α -Untereinheit nicht bei dem Vorhandensein von Sauerstoff detektiert werden kann. Jedoch ist diese Untereinheit unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen nachweisbar und steht im engen Zusammenhang mit der Ausbildung von Tumoren (Yamamoto et al., 2008). Im Gegensatz hierzu ist die β -Untereinheit Sauerstoff-unabhängig. Diese Untereinheit ist grundsätzlich nachweisbar (Semenza, 2003). Die HIF-1 α -Untereinheit wird in den *in vitro*-Kulturen von verschiedenen Zellen gefunden.

Diese werden mit einem partiellen Sauerstoffdruck von 5% Sauerstoff (40 mmHg) durchgeführt. Die meisten Experimente erfolgen jedoch bei 1% und 2% Sauerstoff (8-16 mmHg). Dies kann als hypoxisch angesehen werden (Brahimi-Hornet al., 2007) und entspricht in der hier vorliegenden Arbeit den Kulturen auf impermeablen und permeablen Untergrund. Unter solchen Bedingungen kann die HIF-1 α -Untereinheit schon nach wenigen Stunden im Zellkern nachgewiesen werden. Eine Veränderung von den Bedingungen zu nicht hypoxischen Kultivierungsbedingungen würde sich in einem Verlust an nachweisbarer HIF-1 α -Untereinheit äußern. Bei einer Limitierung von Sauerstoff ist diese Untereinheit stabil und bindet an den Partner HIF-1 β -Untereinheit. Zusammen binden sie an das „*hypoxia-response element*“ (HRE), welche mit Co-Aktivatoren wie CBP/p300 verbunden sind und die Transkription von zirka 70 verschiedenen Genen aktivieren oder unterdrücken (Yamamoto et al., 2008). Durch die Glykolyse entsteht jedoch nur ein Bruchteil (1/15) der Menge an ATP im Vergleich zur Menge, welche erzielt werden kann, wenn der finale, oxidative Breakdown von CO₂ und H₂O zur Energiegewinnung genutzt wird (Eigenbrodt und Glossmann, 1980).

Die verbesserte Sauerstoffversorgung in den ALI-Kulturen könnte somit zu einem Wechsel von der Glykolyse zur Oxidativen Phosphorylierung geführt haben, wodurch eine größere Menge an ATP zur Verfügung steht. Neben den morphologischen Veränderungen gab es Hinweise auf Veränderungen im Energiestoffwechsel. GAPDH als wichtiges Enzym der Glykolyse zeigte auf mRNA-Ebene signifikante Veränderungen bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. In IPEC-1 konnte eine signifikante Erhöhung des GAPDH-Levels zwischen impermeablen und permeablen Untergrund verzeichnet werden. Gleichzeitig konnte eine signifikante Abnahme des mRNA-Levels zwischen permeablen Untergrund und ALI-Kultur beobachtet werden. In IPEC-J2 konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Auf Proteinebene wurde in beiden Zelllinien keine Veränderung zwischen impermeablen und permeablen Untergrund gefunden. Jedoch konnte in beiden Zelllinien eine Abnahme von GAPDH auf Proteinebene zwischen permeablen Untergrund und ALI-Kultur beobachtet werden. Diese Hypothese konnte durch eine Studie von Wenger (2002) untermauert werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass viele verschiedene Gene Sauerstoff-reguliert sind.

Eine wichtige Gruppe von Genen ist verantwortlich für die Glukose-Aufnahme und die Glykolyse wie Phosphofruktokinase L, GAPDH, Aldolase A, Phosphoglycerat Kinase 1, Enolase 1 and Lactat- Dehydrogenase A (Wenger,2002). Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Tatsache, dass intestinale Epithelzellen einem oxidativen Gradienten unterliegen, von einen anaeroben Darmlumen zu einer sauerstoffreichen, subepithelialen Schicht (Taylor and Colgan, 2007). Des Weiteren gibt diese Studie Hinweise darauf, dass es durch die ALI-Kultivierung zur Abnahme von GAPDH kommt. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine verbesserte Sauerstoffversorgung einen Einfluss auf den Metabolismus hat und somit verschiedene Sauerstoff-regulierte Gene an- beziehungsweise abschaltet.

4.6 Entwicklung eines Co-Kultur-Systems

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro*-Kultursystem untersucht, welches die Morphologie und Funktionalität des intestinalen Epithels detailliert darstellt. In den ALI-Kulturen handelt es sich jedoch bisher um Zellkulturen eines einzigen Zelltyps. Die intestinale Barriere ist jedoch bekanntermaßen ein komplexes System verschiedener zellulärer Populationen mit jeweils unterschiedlichen Aufgaben. Mit Hinblick auf die immense makrobiologische Besiedlung und die Aufnahme von Proteinstrukturen ist die Einbindung des intestinalen Epithels in das Immunsystem von besonderem Interesse. Zur Darstellung dieser Einflussgröße wurden auf der basalen Seite der IPEC-Membrankulturen primäre CD172a-positive MoDCs co-kultiviert. Die Reinheit der Präparation lag bei 98%. Mittels CD172a können verschiedene Gruppen von DCs unterschieden werden. Im porcinen Blut kommen eine ganze Reihe CD172a-positiver, antigenpräsentierender Zellen vor wie Monozyten, konventionelle Blut-DCs, pDCs und DC-Vorläufer (Summerfield und McCullough, 2009). Konventionelle Blut-DCs gehören auch zur Gruppe der PBMCs und sind durch $CD172a^+CD4^-CD14^-$ gekennzeichnet. In der *in vitro*-Kultur wurde eine Hochregulierung von MHCII und co-stimulatorischen Molekülen beobachtet (Summerfield und McCullough, 2009). Der Hauptanteil an porcinen Blutmonozyten ist durch: $CD1^-CD4^-CD14^+CD16^+CD172a^+$ gekennzeichnet (Summerfield und McCullough, 2009). Die Identität der verwendeten MoDCs wurde durch die Separation mit CD172a, Immunfluoreszenzfärbungen mit MHCII und CD16 und FACS-Analysen mit CD3, CD4, CD8, CD16, CD40, CD80/86, CD172a und MHCII gewährleistet. Als wichtiger Marker zur Unterscheidung von MoDCs und Makrophagen wird CD163 angesehen. Dieser Marker wird bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hochreguliert und ist bei der Inkubation von Monozyten mit GM-CSF/IL-4 vermindert (Sanchez et al., 1999).

Viele der bisher beschriebenen Co-Kultur-Systeme berücksichtigen lediglich die Wirkung löslicher Faktoren. Häufig ist also ein direkter, physiologischer Kontakt aufgrund der Geometrie nicht möglich (Zoumpopoulou et al., 2009). In dem hier untersuchten System werden die MoDCs auf der basolateralen Seite der Epithelzellschicht kultiviert und können somit analog zur *in vivo*-Situation physischen Kontakt zu den Epithelzellen haben. Bei der Co-Kultivierung der beiden Zelltypen konnte ein TEER-Abfall innerhalb der ersten fünf Tage verzeichnet werden.

Der signifikante Zusammenbruch der Integrität wurde in anderen Studien nicht untersucht, da die Co-Kultivierung nicht über einen solch langen Zeitraum erfolgt. Die meisten Studien beenden die Kultivierung nach maximal 24 Stunden (Rescigno et al., 2001). Um den Einfluss der löslichen Faktoren im untersuchten System von der physischen Interaktion abzugrenzen, wurden Zellkulturüberstände kultiverter MoDCs basolateral appliziert. Tatsächlich verursachten bereits diese Überstände in Abwesenheit physischer Interaktionen mit den MoDCs einen TEER-Abfall. Viele lösliche Faktoren könnten hierfür eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass MoDCs und Monozyten in der Kultur durch die Stimulation von GM-CSF IL-8 produzieren (Takahashi et al., 1993). Es konnte durch verschiedene Studien gezeigt werden, dass auch IL-8 die Permeabilität des Epithels beziehungsweise Endothels beeinflussen kann (Biffl et al., 1995).

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit einer Interaktion von MoDCs und Epithelzellen durch welche die Integrität der Barriere gestört wird. Die Expression von Tight Junction Proteinen in MoDCs wie ZO-1 und Occludin, wurden bereits gezeigt (Rescigno et al., 2001) und in dieser Studie auf mRNA-Ebene bestätigt. Das Vorhandensein von Occludin scheint ein wesentlicher Faktor bei der direkten Aufnahme von Bakterien durch DCs und der Erhaltung der Integrität zu sein. Bei der Migration von Neutrophilen durch das Epithel wird der TEER nicht beeinflusst (Huber et al., 2000). Die Möglichkeit der direkten Aufnahme von Bakterien wurde auch schon *in vivo* von Niess et al. (2005) beschrieben. Hier führte die Aufnahme von *S. typhimurium* zum T-Zellen-Priming (Niess et al., 2005). Dieser Prozess der luminalen Antigenaufnahme ist jedoch abhängig von der Expressierung des Chemokinerezeptors CX₃CR₁ auf dendritischen Zellen. Die direkte Aufnahme von Bakterien durch MoDCs wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht. Das Vorhandensein CX₃CR₁ konnte in der vorliegenden Studie auch auf mRNA-Ebene nicht bestätigt werden.

Bei der Untersuchung des Co-Kultur-Systems mittels Elektronenmikroskopie konnten Fortsätze beider Zelltypen nachgewiesen werden. Die Möglichkeit der Ausbildung von Fortsätzen und die Abgabe von Exosomen deuten zusammen mit entsprechenden Markern auf die Funktion der Epithelzelle als antigenpräsentierende Zelle hin. Aufgrund der Polarisation der Epithelzellen sind die Antigenaufnahme nur an der apikalen Seite und die Antigenpräsentation nur an der basalen Seite möglich (Hershberg et al., 1998). Direkte Kontakte zwischen Epithelzellen und zum Beispiel CD4⁺ T-Zellen scheinen jedoch limiert.

Daraus ergab sich die Hypothese, dass intestinale Epithelzellen Exosomen entlassen können, welche als Vehikel für luminale Antigene dienen. Möglicherweise sind die in dieser Studie festgestellten Fortsätze „Vorstufen“ dieser Exosomen. Exosomen konnten schon für HT-29A und T84 nachgewiesen werden (van Niel et al., 2001). Basolateral entlassene Exosomen weisen charakteristische Marker wie A33 und CD63 auf (Johnstone et al., 2000; Simon et al., 1990). Gleichzeitig wurde unter inflammatorischen Bedingungen ein niedriges Level von MHCI und MHCII auf Exosomen beobachtet. Das Level an MHCI und MHCII weist auf eine spezifische Orientierung der Antigenpräsentation hin (Mallegol et al., 2005).

Die Möglichkeit, das Enterozyten Fortsätze durch die Basalmembran entsenden, konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie belegt werden (Komuro, 1985; Hashimoto und Komuro, 1988). Diese Fortsätze der intestinalen Epithelzellen waren auf die oberen 2/3 Drittel des Villusses beschränkt. In diesem Gebiet traten zirka $1-2 \cdot 10^4/\text{mm}^2$ auf (Komuro, 1985). Die Häufigkeit des Vorkommens solcher Fortsätze verbunden mit dem in dieser Studie erhaltenen Ergebnis, zeigt den regen „Verkehr“, welcher an der *Lamina propria* herrscht (Komuro, 1985). Verschiedene weitere Studien in unterschiedlichen Spezies konnten die von Epithelzellen gebildeten Fortsätze bestätigen (Donnellan, 1965; Mathan et al., 1972; Marsh and Trier, 1974; Komuro and Hashimoto, 1990). Mathan (1972) konnte diese basalen Prozesse im Duodenum der Ratte nachweisen und zwar in steigender Anzahl und Größe während der letzten zwei Tage der fetalen Entwicklung. Gleichzeitig treten diese Fortsätze in großer Anzahl bei der säugenden Ratte bis zum Alter von 7 bis 10 Tagen (Mathan, 1972). Es wurde vermutet, dass dies ein wichtiger Prozess in der „Reifung“ der Mucosa darstellt. Jedoch konnten solche dynamischen Prozesse im Ileum in vergleichbaren Altersstadien nicht nachgewiesen werden (Komuro, 1985). Dies wiederum ist wahrscheinlich durch die funktionellen Unterschiede zwischen dem proximalen Teil des Darmes und den anderen Darmabschnitten gegeben (Rodewald, 1970; 1973). Somit scheint neben den eher seltenen Vorkommen der Fortsätze von DCs, ein wesentlicher Mechanismus der Antigenaufnahme und Präsentation der Enterozyt selbst zu sein. Hinweise für diesen Mechanismus konnten in der hier vorliegenden Arbeit gefunden werden. Die Zugabe von LPS führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl migrierter Zellen. Der Enterozyt als Regulator der Immunantwort konnte durch verschiedene Studien belegt werden.

Rescigno et al. postulierte die Möglichkeit von zwei verschiedenen Gruppen von Enterozyten: 1. Enterozyten an der Villusspitze und 2. Enterozyten an der Villusbasis. Die Enterozyten der ersten Gruppen sind deutlich mehr Bakterien ausgesetzt als die der zweiten Gruppe und könnten damit bei der Toleranzinduktion eine Rolle spielen (Rescigno et al., 1998).

Nicht nur der Kontakt von Bakterien mit den Enterozyten kann die Immunantwort beeinflussen. Auch verschiedene andere Faktoren, welche durch die Enterozyten gebildet werden, beeinflussen die Funktion von dendritischen Zellen im Epithel. Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass Epithelzellen einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion von DCs haben (Iwasaki und Kelsall et al., 1999; Shale und Ghosh, 2009). Rimoldi et al. konnte die Ausbildung eines mucosalen Phänotyps der MoDCs durch die Inkubation von MoDCs mit Überständen von Epithelzellen zeigen (Rimoldi et al., 2005). In der hier vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. Bei der Co-Kultur von MoDCs mit IPECs trat eine Veränderung auf Proteinebene bei verschiedenen Markern auf und zwar eine Abnahme von MHCII und CD80/86. Dieses Ergebnis wird durch verschiedene Studien gestützt (Rimoldi et al., 2005; Buttler et al., 2006; Iliev et al., 2009). Buttler et al. vermutet, dass durch die Inkubation ein tolerogener Phänotyp der DCs induziert wird, welcher durch eine Abnahme von MHCII und CD86, eine Erhöhung der Produktion von TGF und IL-10 und eine Reduzierung der Produktion von IL-12p70 charakterisiert ist (Buttler et al., 2006). Die Ausbildung eines tolerogenen Phänotyps konnte auch durch die Inkubation mit Überständen von Caco-2 und IEC-6 mit MoDCs nachgewiesen werden (Iliev et al., 2009).

In den vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese MoDCs nicht in der Lage sind, inflammatorische Zytokine zu produzieren und eine Th1-Antwort auszulösen (Rimoldi et al., 2005b). Eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des tolerogenen Phänotyps der MoDCs scheint das Protein „*thymic stromal lymphopoietin*“ (TSLP) zu sein (Rimoldi et al., 2005a). Dieses Protein wie auch RA und TGF β wird von den Epithelzellen abgegeben und ist für die Ausbildung eines CD103⁺ tolerogene Phänotyps der DCs verantwortlich (Rimoldi et al., 2005b; Rescigno et al., 2006). Der Einfluss von Enterozyten auf MoDCs konnte auch bei der Co-Kultur mit Bakterien gezeigt werden (Rimoldi et al., 2005b). So produzieren MoDCs, welche direkt mit Bakterien inkubiert wurden, IL-10 und IL-12 und induzierten eine Th1- und eine Th2-Antwort.

MoDCs, welche mit den Überständen von Bakterien-stimulierten Enterozyten kultiviert wurden, produzierten nur IL-10 und induzierten eine Th2-Antwort (Rimoldi et al., 2005).

5 Ausblick

Konventionelle Membrankultursysteme sind ein erster Schritt bei der Darstellung der epithelialen *in vivo*-Situation von *in vitro*-Kulturen. Während die bisherigen Optimierungsversuche meist auf die physikalischen Interaktionen zwischen Zelle und Membran abzielten, wurde bei den hier etablierten, epithelialen ALI-Kulturen mit der verbesserten O₂-Versorgung ein für Epithelzellen neuer Aspekt der *in vitro*-Kultivierung untersucht. Tatsächlich konnte hierbei eine morphologische und funktionelle Annäherung der unter ALI-Bedingungen kultivierten Epithelzellen an die *in vivo*-Situation gezeigt werden. Die bisher untersuchten Merkmale der ALI-IPEC-Kultur sind sicher nicht als vollständig zu betrachten. Weitere wichtige Differenzierungsmarker wie Enzyme, Transporter oder typische Rezeptoren wie TLR müssen untersucht werden. Die epitheliale ALI-Kultur stellt somit einen neuen *in vitro*-Zugang dar, welcher die Untersuchung bisher unverstandener, epithelialer Prozesse ermöglicht. Ein wesentlicher Punkt ist zunächst die Frage, auf welchem Wege die Sauerstoffversorgung die beobachtete funktionelle und morphologische Reifung moduliert. Es muss daher der funktionelle Status der zellulären Energieversorgung in ALI- und in den konventionellen Kulturen in einer vergleichenden Studie betrachtet werden, wobei die Rolle der Glykolyse und der mitochondrialen Oxidativen Phosphorylierung eine initiale Frage ist. Im nächsten Schritt ist die molekulare Koppelung des Energiestoffwechsels an die beobachteten morphologischen und funktionellen Veränderungen zu klären. Einen ersten Ansatz hierfür wären die Ergebnisse für HIF und die MAPK's.

Die in diesen Untersuchungen gefundenen, morphologischen und funktionellen Charakteristika der ALI-IPEC-Kulturen lassen weitere interessante Eigenschaften vermuten. Die Expression des Tight Junction Proteins Tricellulin konnte in Vorversuchen in den Zelllinien nachgewiesen werden. Dieses Protein ist vermutlich eine entscheidende Komponente in der Regulation der epithelialen Permeabilität.

Das ALI-IPEC-Kultursystem ist aufgrund seiner weitreichenden Approximation der *in vivo*-Situation ein wertvolles Hilfsmittel zur Untersuchung epithelialer Prozesse. Die Wirkung von Medikamenten, Probiotika oder Toxinen kann in diesem hochwertigen *in vitro*-System völlig neu beurteilt werden. Erste Versuche mit dem Mycotoxin Deoxynivalenol geben beispielsweise Hinweise auf eine höhere Empfindlichkeit von ALI-Kulturen im Vergleich zu konventionellen Membrankulturen bei IPEC-1.

Schließlich ergibt sich die Option der Kombination des ALI-Protokolls mit dem etablierten IPEC-MoDC-Co-Kultur-System. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage geschaffen, dieses Kultursystem für die Co-Kultivierung von dendritischen Zellen und intestinalen Epithelzellen zu nutzen. Weiterführende Untersuchungen betreffen zunächst die weitere Charakterisierung der dendritischen Zellen im Kultursystem. Neben den bereits untersuchten Markern wäre die Bestimmung von CD209 und CD163 für die Unterscheidung dendritischer Zellen zu Makrophagen wichtig. Die räumliche Trennung der Zelltypen und deren jeweilige Zugänglichkeit ermöglichen mit einfachen Mitteln die Erfassung der spezifischen Reaktionsmuster der jeweiligen Zellen. Die Analyse der unter Normal- oder Belastungsbedingungen freigesetzten Chemokine und Interleukine eröffnet die kontrollierte Co-Kultur unter ALI-Bedingungen und damit völlig neue Perspektiven.

6 Zusammenfassung

Die intestinale Barriere ist durch ein komplexes Zusammenwirken zellulärer und molekularer Komponenten charakterisiert. Die luminalen Begrenzung der intestinalen Barriere besteht aus einem polarisierten, einschichtigen Epithelzelllayer. Diese Epithelschicht ist unter anderem für den Abbau, die selektive Aufnahme und den Transport von Nährstoffen vom Lumen des Darmes ins Blut verantwortlich. Andererseits sind zwischen den einzelnen Epithelzellen enge Kontakte (Tight Junctions), welche einen unkontrollierten Durchtritt von Molekülen und Mikroorganismen unterbinden. Diese funktionellen Anforderungen an die intestinale Epithelzelle bedingt die stark polarisierte Morphologie und räumliche Lokalisation von Transport- und Enzymsystemen. Der Aufbau eines aussagekräftigen Zellkulturmodells muss diese Vorgaben möglichst weitgehend erfüllen. Das Ziel dieser Arbeit war daher der Aufbau eines *in vitro*-Zellkultursystems der intestinalen Epithelzellbarriere mit dem an die *in vivo*-Situation stark angenäherten morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Grundsätzlich kommen für diese Fragestellungen die primären als auch die kontinuierlichen Zellkulturen in Frage.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Isolation und Charakterisierung von intestinalen Epithelzellen aus dem Schwein mit unterschiedlichen Methoden gezeigt. Die Ergebnisse wurden mit Untersuchungen bezüglich zwei porciner, intestinaler Epithelzelllinien (IPEC-1 und IPEC-J2), die nicht transformiert oder karzinogenen Ursprungs sind, verglichen. Es konnte der intestinale Ursprung, aber auch die Untransformiertheit und der nicht karzinogene Ursprung beider Zelllinien – IPEC-1 und IPEC-J2 - durch Chromosomenzahlbestimmung und einem Wachstumsversuch im Softagar belegt werden.

Parallel wurde eine neue Kultivierungsmethode für intestinale Epithelzellen als wichtigster Bestandteil der intestinalen Barriere entwickelt. Die air-liquid interface Kultur ist das Mittel der Wahl bei der Kultivierung von Epithelzellen der Atemwege und der des Magens. Mit dieser Methode konnte eine morphologische und funktionelle Annäherung der Zelllinien an die *in vivo*-Situation erreicht werden. Bei der ALI-Kultur wird die apikale Mediumsäule zu einem dünnen Film reduziert, wodurch die Sauerstoffversorgung der Zellen entscheidend verbessert wird. Die Beschreibung wichtiger morphologischer und funktioneller Eigenschaften erfolgte durch verschiedene Techniken im Vergleich mit konventionellen Zellkulturen auf impermeablen und permeablen Untergrund.

(A) Der Phänotyp der kultivierten Zellen konnte durch die Vermessung und Berechnung der Schichtdicke, der Anzahl der Zellen pro Fläche, der Zellkernfläche, Zellfläche und des Zellkern-Zell-Verhältnisses beschrieben werden. Aus den ermittelten Daten wurde ein geometrisches Modell erstellt und die untersuchten Kultivierungsmethoden miteinander verglichen. Die Auswertung von Gefrierschnitten ermöglichte zudem ein Vergleich mit *in vivo*-Daten. Es konnte eine stetige Annäherung der Morphologie der kultivierten intestinalen Epithelzellen an die *in vivo*-Daten in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur gezeigt werden. Die beste Annäherung an die *in vivo*-Situation konnte bei der ALI-Kultur gefunden werden. Dies war besonders deutlich bei IPEC-1. Die Veränderungen des zellulären Feinbaus wurden mittels elektronenmikroskopischer Technik untersucht.

(B) Im nächsten Schritt wurde die Expression wichtiger Gene des Bürstensaumes, des Energiestoffwechsels und des Zytoskeletts auf mRNA-Ebene und Proteinebene untersucht. Die mRNA von GAPDH, CK18, β -Aktin, Mucin-1, Villin-1 und SGLT-1 konnte in den verschiedenen Kulturen nachgewiesen werden. Villin-1 als wichtiger Differenzierungsmarker und GAPDH als wichtige Komponente im Energiestoffwechsel wurden weiterführend mittels qPCR und Western Blot untersucht. Villin-1 konnte nur in den ALI-Kulturen auf Proteinebene nachgewiesen werden. GAPDH zeigte wesentliche Unterschiede in den Western Blot-Analysen, wobei eine Abnahme des GAPDH-Proteins in den ALI-Kulturen verzeichnet werden konnte. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es möglicherweise zu Veränderungen im Stoffwechsel durch die verbesserte Sauerstoffversorgung der ALI-Kulturen gekommen ist, da GAPDH ein wichtiges Protein der Glykolyse darstellt.

(C) Um weitere Aussagen bezüglich des Vergleiches beider Zelllinien treffen zu können, wurden weitere wichtige Gene aus dem Bereich des Zellzyklus, der Differenzierung und des Metabolismus auf mRNA-Ebene untersucht. Hierbei ergab sich ein 300-fach erhöhtes p53-mRNA-Level für IPEC-J2. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde p53 als zentrales Gen für mögliche Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien gewählt und im Zusammenhang mit den anderen untersuchten Genen diskutiert.

(D) Die Expression und Struktur der Tight Junctions als wichtiges Merkmal für einen intakten Monolayer wurde durch PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzen erfasst. ZO-1, Occludin, Claudin-3 und Claudin-4 konnten in allen Kulturen nachgewiesen werden. Auffallend war eine Akkumulation von ZO-1 in den trizellulären Kontakten der Zellen. Gap Junctions als wichtiges Merkmal für die Kommunikation der Zellen untereinander konnten mittels Scratch-Assay unter der Verwendung von Lucifer Yellow nachgewiesen werden.

(E) Die Proliferation der Zellkulturen wurde mittels BrdU-Einbau in den verschiedenen Systemen erfasst. Es konnte eine Abnahme der Proliferation der Zellen abhängig vom Kultursystem verzeichnet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine fortschreitende Differenzierung der Zellen in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur.

(F) Die funktionellen Eigenschaften der *in vitro*-Systeme wurden schließlich in Form von der Aufnahme eines Modellproteins in den Epithelzelllayer untersucht. Eine Aufnahme des Modellproteins BSA konnte nur in den ALI-Kulturen gezeigt werden, während in den anderen Systemen lediglich eine apikale Anlagerung beobachtet werden konnte (Nossol et al., 2011).

In einem weiteren Schritt wurde das Membrankulturmodell mit der zellulären Komponente der MoDCs ergänzt. Dendritische Zellen, als antigenpräsentierende Zellen, spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. Diese Zellen wurden aus Monozyten mittels IL-4 und GM-CSF generiert und kultiviert. Ein wichtiges Merkmal einer intakten Barriere *in vivo* ist der Kontakt der DCs zur Basalmembran (hier permeabler Untergrund). Dies konnte durch die inverse Aussaat der Epithelzellen realisiert werden. Die so gewonnenen Co-Kulturen wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Die Entsendung von Fortsätzen in die Poren konnte sowohl für die DCs als auch für die Epithelzellen nachgewiesen werden.

7 Summary

The intestinal barrier is established and characterised by the interplay of different cellular and molecular components. The luminal border of the intestinal barrier consists of a polarised epithelial monolayer. These cells are responsible for digestion, selective uptake and the transport of nutrients from the luminal side of the gut to the blood. On the other side there are close contacts called tight junctions between adjacent epithelial cells. The tight junctions prevent an uncontrolled paracellular passage of molecules and microorganisms. These functional requirements on the epithelial cells imply a polarised morphology and a three-dimensional localisation of transport- and enzyme systems. The establishment of a suitable epithelial cell culture model has to fulfil these preconditions. The aim of this study was the establishment of an *in vitro* cell culture system which resembles the intestinal barrier *in vivo* as closely as possible. Isolated primary cells and continuous cell lines are both a possibility to answer the open questions.

In this study the isolation and characterisation of porcine intestinal epithelial cells was shown with different methods. The study was extended with an analysis of two established cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. These cell lines are non-transformed and not tumour derived. The intestinal, non-transformed and non-carcinogenic nature of these cell lines was documented by the quantification of the number of chromosomes and the growth in soft agar.

At the same time an improved culture method was developed to study intestinal epithelial cells as an important component of the intestinal barrier. The air liquid interface (ALI) culture is the method of choice in the culture of airway and gastric epithelial cells. In the ALI cultures the apical medium is reduced to a thin film, which results in an improved oxygen supply. The descriptions of important morphological and functional features were realised through different methods and the comparison of the three culture conditions: impermeable support, permeable support and ALI-culture. A morphological and functional *in vivo*-approximation of both cell lines was found.

Most important results:

(A) The phenotype of the cultured cells was described by analysing the layer thickness, cell number per area, cell area, nucleus area and nucleus/cell ratio. The determined data were used to establish a geometric model and to compare the different culture methods. The analysis of the cryo sections of the small intestine enabled the comparison with *in vivo* data. A steady approximation of the morphology of the cultured cells to the *in vivo* situation was noticed in the sequence of impermeable support > permeable support > ALI culture (Nossol et al., 2011). Changes in the cellular structure were analysed by electron microscopy.

(B) In the next step the expression of different genes regulating brush border, metabolism and cytoskeleton were examined by PCR and western blot. GAPDH, CK18, β -actin, Mucin-1, Villin-1 and SGLT-1 were detected by PCR in the different cultures. Villin-1 was found by western blot only in ALI cultures. GAPDH as an important protein of the glycolysis showed differences in the western blot analyses in the different cultures. A decreased GAPDH-level was detected in the ALI cultures of both cell lines. Possibly, changes in the metabolism took place due to the improved oxygen supply.

(C) For the comparison of both cell lines important genes of the cell cycle, differentiation and metabolism was analysed on the mRNA-level. A 300-fold up regulation of P53 was found in IPEC-J2 compared to IPEC-1. P53 was chosen as a central gene to discuss the differences between the cell lines IPEC-1/IPEC-J2.

(D) An important characteristic of an intact monolayer is the expression and the structure of the tight junctions. This was examined via PCR, western blot and immunofluorescence. ZO-1, occludin, claudin-3 and claudin-4 were detected in all cultures. A remarkable accumulation of ZO-1 was found in the tri-cellular contacts of the cells. Cell communication is realised through the existence of gap junctions. Gap junctions were analysed by the Scratch-Assay and the use of Lucifer Yellow.

(E) The proliferation of the cell cultures was tested using the BrdU-incorporation method. The decrease of BrdU-positive cells depended on the culture system. This indicates a progressive differentiation of the cells in the following sequence: impermeable support > permeable support > ALI-culture.

(F) The functional characteristics of the *in vitro*-systems were further examined by the uptake of labelled BSA. The uptake of BSA was detected only in ALI-cultures, whereas no intracellular BSA-DyLight was found in conventional membrane cultures. The conventional cultures showed only an apical coating with the protein (Nossol et al., 2011).

Another step was the addition of MoDCs to the membrane cultures. Dendritic cells are antigen-presenting cells and play an important role in the immune response. These cells were generated with IL-4 and GM-CSF from porcine peripheral blood monocytes. One important feature of an intact barrier *in vivo* is the contact between DCs and the basement membrane. This was studied in inverted membrane cultures of the epithelial cells. The co-cultures were examined using electron microscopy. Dendrites of both cell types were found in the pores of the membrane demonstrating the interaction of epithelia and DC.

Literaturverzeichnis

Akers, I. A., M. Parsons, M. R. Hill, M. D. Hollenberg, S. Sanjar, G. J. Laurent, und R. J. McAnulty. (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**:L193-L201.

Al Moustafa, A. E., M. A. Alaoui-Jamali, G. Batist, M. Hernandez-Perez, C. Serruya, L. Alpert, M. J. Black, R. Sladek, und W. D. Foulkes . (2002). Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* **21**:2634-2640.

Albini, A., D. M. Noonan, A. Melchiori, G. F. Fassina, M. Percario, S. Gentleman, J. Toffenetti, und G. J. Chader. (1992). Laminin-induced retinoblastoma cell differentiation: possible involvement of a 100-kDa cell-surface laminin-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **89**:2257-2261.

Aliaga, J. C., C. Deschenes, J. F. Beaulieu, E. L. Calvo, und N. Rivard. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **277**:G631-G641.

Amano, M., M. Nakayama, und K. Kaibuchi. (2010). Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton* **67**:545-554.

Anderson, B. W., A. S. Levine, D. G. Levitt, J. M. Kneip, und M. D. Levitt. (1988). Physiological measurement of luminal stirring in perfused rat jejunum. *Am J Physiol* **254**:G843-G848.

Arpitha, P., N. V. Prajna, M. Srinivasan, und V. Muthukkaruppan. (2005). High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: Implications on epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**:3631-3636.

Artursson, P. und C. Magnusson. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* **79**:595-600.

Assimakopoulos, S.F., Papageorgiou, I. und A. Charonis. (2011). Enterocytes` tight junctions: From molecules to diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol* **2(6)**: 123-137.

Atkuri, K. R., L. A. Herzenberg, A. K. Niemi, T. Cowan, und L. A. Herzenberg. (2007). Importance of culturing primary lymphocytes at physiological oxygen levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:4547-4552.

-
- Bacallao, R., A. Garfinkel, S. Monke, G. Zampighi, und L. J. Mandel.** (1994). ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**:3301-3313.
- Bach SP, Renahan AG Potten CS.** (2000). Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* **21**:469-476.
- Bader, A., T. Hansen, G. Kirchner, C. Allmeling, A. Haverich, und J. T. Borlak.** (2000). Primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures to study drug oxidation reactions. *Br J Pharmacol.* **129**:331-342.
- Baker, M.** (2009). Many intestinal villi from a single stem cell, in culture, *In: Nature Reports Stem Cells.* Nature Publishing Group.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. T. Liu, B. Pulendran, und K. Palucka.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **18**:767-811.
- Barnard, J. A. und G. Warwick.** (1993). Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ.* **4**:495-501.
- Basson, M. D., G. Turowski, und N. J. Emenaker.** (1996). Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* **225**:301-305.
- Baten, A., K Samoto und M. Shamsuddin.** (1992). Long-term culture of normal human colonic epithelial cells in vitro. *FASEB* **6**:2726-2734.
- Baumgart, D. C. und A. U. Dignass.** (2002). Intestinal barrier function. *Curr. Opin. Clin Nutr Metab Care* **5**:685-694.
- Beaulieu, J. F.** (1997). Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog. Histochem. Cytochem.* **31**:1-78.
- Bernasconi, N. L., E. Traggiai und A. Lanzavecchia.** (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* **298**:2199-2202
- Berschneider, H. M.** (1989). Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl, 9th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association
- Biffl, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore, V. S. Carl, R. J. Franciose und A. Banerjee.** (1995). Interleukin-8 Increases Endothelial Permeability Independent of Neutrophils. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* **39(1)**:98-103.

-
- Bimczok, D., E. N. Sowa, H. Faber-Zuschratter, R. Pabst und H.-J. Rothkötter.** (2005). Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *Eur. J. Immunol.* **35**:1418-27.
- Bissonnette, R., M. J. Lee, und E. Wang.** (1990). The differentiation process of intestinal epithelial cells is associated with the appearance of statin, a non-proliferation-specific nuclear protein. *J Cell Sci* **95 (Pt 2)**:247-254.
- Bjerknes, M. und H. Cheng.** (1981). Methods for the isolation of intact epithelium from the mouse intestine. *Anat. Rec.* **199**:565-574.
- Bjerknes, M. und H. Cheng.** (2005). Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**:G381-G387.
- Blikslager, A.T., Moeser, A.J., Gookin, J.L., Jones, S.L. und J. Odle.** (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* **87**:545-564.
- Booth, C. und C. S. Potten.** (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* **105**:1493-1499.
- Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche, und J. Pouyssegur.** (2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med. (Berl)* **85**:1301-1307.
- Brahimi-Horn, M. C. und J. Pouyssegur.** (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **581**:3582-3591.
- Brandtzaeg, P. und K. Tolo.** (1977). Mucosal penetrability enhanced by serum-derived antibodies. *Nature* **266**:262-263.
- Bretscher, A. und K. Weber.** (1979). Villin: the major microfilament associated protein of the intestinal microvillus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:2321-2325
- Bretscher, A., M. Osborn, J. Wehland, und K. Weber.** (1981). Villin associates with specific microfilamentous structures as seen by immunofluorescence microscopy on tissue sections and cells microinjected with villin. *Exp. Cell Res.* **135**:213-219.
- Brusgaard, J. C., K. Liestol, M. Ekmark, K. Kollstad, und K. Gundersen.** (2003). Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J Physiol* **551**:467-478.

-
- Burgess.** (1997). The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **94**:469-474.
- Burns, A. R., R. A. Bowden, S. D. MacDonell, D. C. Walker, T. O. Odebunmi, E. M. Donnachie, S. I. Simon, M. L. Entman, und C. W. Smith.** (2000). Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *Journal of Cell Science* **113**:45-57.
- Butler, M., C. Y. Ng, D. A. van Heel, G. Lombardi, R. Lechler, R. J. Playford, und S. Ghosh.** (2006). Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *European Journal of Immunology* **36**:864-874.
- Buxton, R. S., P. Cowin, W. W. Franke, D. R. Garrod, K. J. Green, I. A. King, P. J. Koch, A. I. Magee, D. A. Rees, J. R. Stanley, und .** (1993). Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol* **121**:481-483.
- Cario, E.** (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**:1182-1193.
- Cario, E.** (2010). Heads up! How the intestinal epithelium safeguards mucosal barrier immunity through the inflammasome and beyond. *Curr. Opin. Gastroenterol* **26**:583-590.
- Carrasco, C. P., R. C. Rigden, R. Schaffner, H. Gerber, V. Neuhaus, S. Inumaru, H. Takamatsu, G. Bertoni, K. C. McCullough, und A. Summerfield.** (2001). Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* **104**:175-184.
- Cerovic, V., C. D. Jenkins, A. G. Barnes, S. W. Milling, G. G. MacPherson, und L. S. Klavinskis.** (2009). Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol* **182**:2405-2415.
- Chakravortty, D. und K. S. Kumar.** (1999). Modulation of barrier function of small intestinal epithelial cells by lamina propria fibroblasts in response to lipopolysaccharide: possible role in TNFalpha in inducing barrier dysfunction. *Microbiol. Immunol* **43**:527-533.
- Chantret, I., A. Barbat, E. Dussaulx, M. G. Brattain, und A. Zweibaum.** (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* **48**:1936-1942.
- Cheng, H. und C. P. Leblond.** (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat.* **141**:537-561.

-
- Claude, P.** (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* **39**:219-232.
- Collins, J. E.** (2002). Adhesion between dendritic cells and epithelial cells maintains the gut barrier during bacterial. *Gut* **50**:449-450.
- Coudrier, E., D. Kerjaschki, und D. Louvard.** (1988). Cytoskeleton organization and submembranous interactions in intestinal and renal brush borders. *Kidney Int* **34**:309-320.
- Coudrier, E., H. Reggio, und D. Louvard.** (1983). Characterization of an integral membrane glycoprotein associated with the microfilaments of the pig intestinal microvilli. *The EMBO Journal* **2**(3):469-475.
- Cox, L. S. und D. P. Lane.** (1995). Tumor suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *BioEssays* **17**(6): 501-508.
- Crosnier, C., D. Stamatakis, und J. Lewis.** (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* **7**:349-359.
- Cummings, J. H. Antoine J. M. Azpiroz F. Bourdet-Sicard R. Brandtzaeg P. Calder P. C. Gibson G. R. Guarner F. Isolauri E. Pannemans D. Shortt C. Sandra S. Tuijtelars S. and Watzl B.** (2004). Gut health and immunity. *Eur. J. Nutr.* **43**:118-173.
- Daniel, H.** (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev Physiol* **66**:361-384.
- Datta, A., A. Nag, W. Pan, N. Hay, A. L. Gartel, O. Colamonici, Y. Mori und P. Raychaudhuri.** (2004). Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J. Biol. Chem.* **279**:36698-36707.
- de Souza, N.** (2009). A question of culture. *Nature Methods* **6**:481.
- Denker, B. M. und S. K. Nigam.** (1998). Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol* **274**:F1-F9.
- Deschenes, C., A. Vezina, und N. Rivard.** (2000). The cell cycle inhibitor p27(KIP1) plays a crucial role in differentiation of human intestinal cells. *Gastroenterology* **118**:A547.
- Deschenes, C., A. Vezina, J. F. Beaulieu, und N. Rivard.** (2001). Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**:423-438.

- Deschenes, J., J. P. Valet, und N. Marceau.** (1981). The relationship between cell volume, ploidy, and functional activity in differentiating hepatocytes. *Cell Biophys.* **3**:321-334.
- Dickman, K. G. und L. J. Mandel.** (1989). Glycolytic and oxidative metabolism in primary renal proximal tubule cultures. *Am J Physiol* **257**:C333-C340.
- Diesing, A.-K., C. Nossol, P. Panther, N. Walk, A. Post, J. Kluess, P. Kreutzmann, S. Dänicke, H. J. Rothkötter, und S. Kahlert.** (2011)a. Mycotoxin Deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol. Lett.* **200**:8-18.
- Diesing, A. K., C. Nossol, S. Danicke, N. Walk, A. Post, S. Kahlert, H. J. Rothkötter, und J. Kluess.** (2011)b. Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *PLoS. One.* **6**:e17472.
- Dodson, M. G., J. Slota, C. Lange, und E. Major.** (1981). Distinction of the phenotypes of in vitro anchorage-independent soft-agar growth and in vivo tumorigenicity in the nude mouse. *Cancer Res.* **41**:1441-1446.
- Donnellan, W. L.** (1965). The structure of the colonic mucosa. The epithelium and subepithelial reticulo-histiocytic complex. *Gastroenterology* **49**:496-514.
- Driák, D., J. Österreicher, J. Vávrová, Z. Řeháková und Z. Vilasová.** (2008). Morphological changes of rat jejunum after whole body γ -irradiation and their impact in biodosimetry. *Physiol. Res.* **57**:475-479
- Duckworth, C. A. und A. J. Watson.** (2011). Analysis of epithelial cell shedding and gaps in the intestinal epithelium. *Molecular Biology* **763**:105-114
- Dudouet, B., S. Robine, C. Huet, C. Sahuquillo-Merino, L. Blair, E. Coudrier, und D. Louvard.** (1987). Changes in villin synthesis and subcellular distribution during intestinal differentiation of HT29-18 clones. *J Cell Biol* **105**:359-369.
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff und J. Fierer.** (1993). Epithelial cells secrete the chemokine Interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infection and Immunity.* **61(11)**:4569-4574.
- Egberts, H. J., J. F. Koninkx, J. E. van Dijk und J. M. Mouwen.** (1984). Biological and pathobiological aspects of the small intestinal epithelium. A review. *Vet. Q.* **6(4)**: 186-199
- Eigenbrodt, E. und Glossmann, H.** (1980). Glycolysis - one of the keys to cancer? *TIPS.* 240-245
- El Fouly, M. H., J. E. Trosko, und C. C. Chang.** (1987). Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell Res.* **168**:422-430.

-
- Engle, M. J., G. S. Goetz, und D. H. Alpers.** (1998). Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *Journal of Cellular Physiology* **174**:362-369.
- Evans, G. S., N. Flint, A. S. Sommers, und B. a. P. C. S. Eyden.** (1992). The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* **101**:219-231.
- Evans, G. S., N. Flint, und C. S. Potten.** (1994). Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol* **56**:399-417.
- Ezzell, R. M., M. M. Chafel, und P. T. Matsudaira.** (1989). Differential localization of villin and fimbrin during development of the mouse visceral endoderm and intestinal epithelium. *Development* **106**:407-419.
- Faller, A., M. Schünke, G. Schünke und E. Taub** (2004). *The human body: An introduction to structure and function.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 411.
- Fan, M. Z., B. Stoll, R. Jiang, und D. G. Burrin.** (2001). Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. *Journal of Animal Science* **79**:371-381.
- Farhadi, A., A. Banan, J. Fields, und A. Keshavarzian.** (2003). Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol.* **18**:479-497.
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E.** (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* **17**:375-412.
- Fey-Lamprecht, F., T. Groth, W. Albrecht, D. Paul, und U. Gross.** (2000). Development of membranes for the cultivation of kidney epithelial cells. *Biomaterials* **21**:183-192.
- Flint, N., F. L. Cove, und G. S. Evans.** (1991). A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis. *Biochem J* **280 (Pt 2)**:331-334.
- Freeman, H. J.** (2008). Crypt region localization of intestinal stem cells in adults. *World Journal of Gastroenterology* **14**:7160-7162.
- Friedman, G. B., C. T. Taylor, C. A. Parkos, und S. P. Colgan.** (1998). Epithelial permeability induced by neutrophil transmigration is potentiated by hypoxia: role of intracellular cAMP. *J Cell Physiol* **176**:76-84.
- Friend, D. S. und N. B. Gilula.** (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* **53**:758-776.

-
- Fromm, M.** (2007). Transport in Membranen und Epithelien, In: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Schmidt, R. F., Lang, F. (Hrsg.), 30. Auflage, Kap. 3, S. 41-54 und 971-973. Springer Medizin, Heidelberg.
- Fromm, M., Krug, S.M., Zeissig, S., Richter, J.F., Rosenthal, R., Schulzke, J.D. und D. Günzel.** (2009). High-Resolution analysis of barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165:74-81.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, und S. Tsukita.** (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**:1777-1788.
- Gallin, W. J., B. C. Sorkin, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham.** (1987). Sequence analysis of a cDNA clone encoding the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **84**:2808-2812.
- Gartel, A., M. S. Serfas, M. Gartel, E. Goufman, G. S. Wu, W. S. El-Deiry, und A. L. Tyner.** (1996). P21 (WAF1/CIP1) Expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of Caco-2 intestinal epithelia cell line. *Experimental cell Research* **227**:171-181.
- Gebert, A., H. J. Rothkötter, und R. Pabst.** (1994). Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res.* **276**:213-221.
- Gibson D'Ambrosio, R. E., M. Samuel und S. M. D'Ambrosio** (1986). A method for isolating large numbers of viable disaggregated cells from various human tissues for cell culture establishment. *In Vitro* **22**:529-534
- Glaum, R., M. Wiedmann-Al-Ahmad, U. Huebner, und R. Schmelzeisen.** (2010). Tissue engineering of composite grafts: Cocultivation of human oral keratinocytes and human osteoblast-like cells on laminin-coated polycarbonate membranes and equine collagen membranes under different culture conditions. *J Biomed Mater. Res. A* **93**:704-715.
- Gliddon, B. L., N. V. Nguyen, P. A. Gunn, P. A. Gleeson, und I. R. van Driel.** (2008). Isolation, culture and adenoviral transduction of parietal cells from mouse gastric mucosa. *Biomed Mater.* **3**:034117.
- Gonzalez-Vallina, R., H. Wang, R. Zhan, H. M. Berschneider, R. M. Lee, N. O. Davidson, und D. D. Black.** (1996). Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). *Am. J Physiol* **271**:G249-G259.
- Goodman, S. R.** (2008). *Medical Cell Biology - Third Edition.* Elsevier, China. ISBN 978-0-12-370458-

-
- Gres, M. C., B. Julian, M. Bourrie, V. Meunier, C. Roques, M. Berger, X. Boulenc, Y. Berger, und G. Fabre.** (1998). Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res.* **15**:726-733.
- Groulx, J. F., D. Gagne, Y. D. Benoit, D. Martel, N. Basora, und J. F. Beaulieu.** (2011). Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biology* **30**:195-206.
- Gruenert, D. C., W. E. Finkbeiner, und J. H. Widdicombe.** (1995). Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am. J Physiol* **268**:L347-L360.
- Günzel, D., Zakrzewski, S.S., Schmid, Th., Pangalos, M., Wiedenhoef, J., Blasse, C., Ozboda, Ch. und S.M. Krug.** (2012). From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedances spectroscopy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1257**:142-151
- Hagemann, P. und K. Rosenmund.** (1989). *Histotechnik. Ergänzungsheft zu: Laboratoriumsmedizin, ein Lehrbuch für medizinisch-technische Assistentinnen.* 3., völlig neu bearb. Auflage, Stuttgart, Hirzel Verlag, ISBN 3-7776-0446-1
- Hall, P. A., P. J. Coates, B. Ansari, und D. Hopwood.** (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**:3569-3577.
- Halleux, C. und Y. J. Schneider.** (1991). Iron absorption by intestinal epithelial cells: 1. CaCo2 cells cultivated in serum-free medium, on polyethyleneterephthalate microporous membranes, as an in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**:293-302.
- Harris, S. L. und A. J. Levine.** (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* **24**:2899-2908.
- Harrison, D.D. und H. L. Webster** (1969) *Exp. Cell Res.* **55**:257-260
- Hashimoto, Y. und T. Komuro.** (1988). Close relationships between the cells of the immune system and the epithelial cells in the rat small intestine. *Cell Tissue Res.* **254**:41-47.
- Hatta, K., A. Nose, A. Nagafuchi, und M. Takeichi.** (1988). Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol* **106**:873-881.
- Haverson, K., S. Shinga, C. R. Stokes und M. Bailey.** (2000). Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology* **101**:492-500.

Heath, J. K., S. J. White, C. N. Johnstone, B. Catimel, R. J. Simpson, R. L. Moritz, G. F. Tu, H. Ji, R. H. Whitehead, L. C. Groenen, A. M. Scott, G. Ritter, L. Cohen, S. Welt, L. J. Old, E. C. Nice, und A. W.

Hedemann, M. S., E. Kristiansen, und G. Brunsgaard. (2002). Morphology of the large intestine of the pig: haustra versus taenia. *Ann. Anat.* **184**:401-403.

Hemmings, W. A. und E. W. Williams. (1978). Transport of large breakdown products of dietary protein through the gut wall. *Gut* **19**:715-723.

Hershberg, R. M., D. H. Cho, A. Youakim, M. B. Bradley, J. S. Lee, P. E. Framson, und G. T. Nepom. (1998). Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* **102**:792-803.

Hilgers, A. R., R. A. Conradi, und P. S. Burton. (1990). Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research* **7**(9): 902-910

Hodin, R. A., A. Shei, und S. Meng. (1997). Transcriptional activation of the human villin gene during enterocyte differentiation. *J Gastrointest. Surg.* **1**:433-438.

Holton, J. L., T. P. Kenny, P. K. Legan, J. E. Collins, J. N. Keen, R. Sharma, und D. R. Garrod. (1990). Desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins) show N-terminal similarity to calcium-dependent cell-cell adhesion molecules. *J Cell Sci* **97 (Pt 2)**:239-246.

Honda, R., Yasuda, H. (1999). Association of p19ARF with MDM2 inhibits ubiquitin ligase activity of MDM2 for tumor-suppressor p53. *The EMBO Journal.* **18**:22-27.

Hotz, H. G., T. Foitzik, J. Rohweder, J. D. Schulzke, M. Fromm, N. S. Runkel, und H. J. Buhr. (1998). Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis: early changes and therapeutic implications. *J Gastrointest Surg.* **2**:518-525.

Houde, M., C. Asselin, J. F. Beaulieu, und N. Rivard. (2000). Involvement of p38 MAP kinase in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **118**:A552.

Huber, D., M. S. Balda, und K. Matter. (2000). Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **275**:5773-5778.

Huber, M. D. und L. Gerace. (2007). The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. *Journal of Cell Biology* **179**:583-584.

Iliev, I. D., I. Spadoni, E. Mileti, G. Matteoli, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, D. Foschi, F. Caprioli, G. Viale, und M. Rescigno. (2009). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* **58**:1481-1489.

Iwasaki, A. und B. L. Kelsall. (1999). Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *Am J Physiol* **276**:G1074-G1078.

Iype, P. T. (1971). Cultures from adult rat liver cells. I. Establishment of monolayer cell-cultures from normal liver. *J Cell Physiol* **78**:281-288.

Izawa, I., M. Nishizawa, K. Ohtakara, K. Ohtsuka, H. Inada, und M. Inagaki. (2000). Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *J Biol Chem* **275**:34521-34527.

James, R., T. Erler, und J. Kazenwadel. (1994). Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* **269**:15229-15237.

Jiang, P., W. Du, K. Heese und M. Wu. (2006). The Bad Guy Cooperates with Good Cop p53: Bad is transcriptionally Up-Regulated by p53 and forms a Bad/p53 Complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **26(23)**:9071-9082.

Jin, T. R., D. K. Y. Trinh, F. Wang, und D. J. Drucker. (1997). The caudal homeobox protein *cdx-2/3* activates endogenous proglucagon gene expression in InR1-G9 islet cells. *Molecular Endocrinology* **11**:203-209.

Johansson, S. M., C. Admyre, A. Scheynius, und S. Gabrielsson. (2008). Different types of in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes. *Immunology* **123**:491-499.

Johnstone, C. N., N. C. Tebbutt, H. E. Abud, S. J. White, K. L. Stenvers, N. E. Hall, S. H. Cody, R. H. Whitehead, B. Catimel, E. C. Nice, A. W. Burgess, und J. K. Heath. (2000). Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**:G500-G510.

Jumarie, C. und C. Malo. (1991). Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* **149**:24-33

Kaefter, B. Bottreau, P. Velge, und P. Pardon. (1993). Epithelioid and fibroblastic cell lines derived from the ileum of an adult histocompatible miniature boar (d/d haplotype) and immortalized by SV40 plasmid. *Eur J Cell Biol.* **62(1)**:152-162.

-
- Kansagra K., B. Stoll, C. Rognerud, H. Niinikoski, C. N. Ou, R. Harvey, D. Burrin.** (2003). Total parenteral nutrition adversely affects gut barrier function in neonatal piglets, *Am. J. Physiol.* **285**:G1162–G1170.
- Karam, S. M.** (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *In* . Bioscience.
- Karasuyama, H. und F. Melchers.** (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* **18**:97-104.
- Kawabata, S., J. Usukura, N. Morone, M. Ito, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi, und M. Amano.** (2004). Interaction of Rho-kinase with myosin II at stress fibres. *Genes to Cells* **9**:653-660.
- Keefe, D. M. K., J. Brealy, G. J. Goland und A. G. Cummins.** (2000). Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut* **47**:632-637
- Kiliaan, A. J., P. R. Saunders, P. B. Bijlsma, M. C. Berin, J. A. Taminiu, J. A. Groot, und M. H. Perdue.** (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* **275**:G1037-G1044.
- Kim, H. S. You, J. Farris, L. K. Foster und D. N. Foster.** (2001). Post-transcriptional inactivation of p53 in immortalized murine embryo fibroblast cells. *Oncogene* **20**:3306-3310.
- Kim, J. W., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, und C. V. Dang.** (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* **3**:177-185.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey u. J. R. Hassell.** (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**, 312
- Kleinman, H. K. und G. R. Martin.** (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* **15**:378-386.
- Koch, P. J., Walsh M. J.; Schmelz M., Goldschmidt M. D., Zimbelmann R. und Franke W. W.** (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *European Journal of Cell Biology* **53(1)** :1-12.
- Komai, M. und S. Kimura.** (1979). Effects of restricted diet and intestinal flora on the life span of small intestine epithelial cells in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **25**:87-94.
- Komuro, T.** (1985). Fenestrations of the basal lamina of intestinal villi of the rat. Scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res.* **239**:183-188.

-
- Komuro, T. und Y. Hashimoto.** (1990). Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). *Arch Histol. Cytol.* **53**:1-21.
- Krawetz, R. J., X. Li, und D. E. Rancourt.** (2009). Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *Bioessays* **31**:336-343.
- Krug, S. M. (2009).** Tricellulin und seine Funktion in der trizellulären Tight Junction von Epithelzellen. Dissertation, Freie Universität, Berlin
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J. K., Huber, O., Schulzke, J. D. und M. Fromm (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* **20**: 3713-3724
- Kucharzik, T., N. Luger, K. W. Schmid, M. A. Schmidt, R. Stoll, und W. Domschke.** (1998). Human intestinal M cells exhibit enterocyte-like intermediate filaments. *Gut* **42**:54-62.
- Kurokawa, M., K. Lynch, und D. K. Podolsky.** (1987). Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **142**:775-782.
- Laboisse, C. L., A. Jarry, C. Bouhanna, D. Merlin, und G. Vallette.** (1994). Intestinal-Cell Culture Models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2**:36-38.
- Laird, D. W.** (1996). The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **28(4)**:311-318.
- Lal-Nag, M. und P. J. Morin.** (2009). The claudins. *Genome Biol* **10**:235.
- Lamont, J. T.** (1992). Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **664**:190-201
- Laukoetter, M. G., P. Nava, und A. Nusrat.** (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **14**:401-407.
- Le Ferrec, E., C. Chesne, P. Artusson, D. Brayden, G. Fabre, P. Gires, F. Guillou, M. Rousset, W. Rubas, und M. L. Scarino.** (2001). In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern. Lab Anim* **29**:649-668.
- Leary, H. L. Jr und Lecce J. G.** (1979). The preferential transport of immunoglobulin G by the small intestine of the neonatal piglet. *J. Nutr.* **109(3)**:458-466.

-
- Leary, H. L. Jr. und J. G. Lecce.** (1976). Uptake of Macromolecules by Enterocytes on Transposed and Isolated Piglet Small Intestine. *J. Nutr.* 419-427.
- Leung, T., X. Q. Chen, E. Manser, und L. Lim.** (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology* **16**:5313-5327.
- Lewis, K. und D. M. McKay.** (2009). Metabolic stress evokes decreases in epithelial barrier function. *Ann. N. Y. Acad Sci* **1165**:327-337.
- Liang, C. C., A. Y. Park, und J. L. Guan.** (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* **2**:329-333.
- Loeffler, M., A. Birke, D. Winton, und C. Potten.** (1993). Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt. *J Theor. Biol* **160**:471-491.
- Loeffler, M., T. Bratke, U. Paulus, Y. Q. Li, und C. S. Potten.** (1997). Clonality and life cycles of intestinal crypts explained by a state dependent stochastic model of epithelial stem cell organization. *Journal of Theoretical Biology* **186**:41-54.
- Loewenstein, W. R.** (1987). The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* **48**:725-726.
- Lorentz, O., I. Duluc, A. De Arcangelis, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, und J. N. Freund.** (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *Journal of Cell Biology* **139**:1553-1565.
- Lu, J., Ho, C.-T., Ghai, G. and Chen, K. Y.** (2001). Resveratrol analog, 3,4,5,4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. *Carcinogenesis* (2001) **22 (2)**: 321-328.
- MacLeod, R. J., P. Lembessis und J. R. Hamilton.** (1992). Differences in Ca²⁺-mediation of hypotonic and Na⁺-regulatory volume decrease in suspension of jejunal enterocytes. *The Journal of Membrane Biology* **130**:23-31
- Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein und T. Jacks.** (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & Development* **9**:935-944.
- Madara, J. L.** (1987). Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *The American Physiological Society*. C171-C175.

-
- Maiuri, L., R. Troncone, M. Mayer, S. Coletta, A. Picarelli, M. De Vincenzi, V. Pavone und S. Auricchio.** (1996). In vitro Activities of A-Gliadin-Related Synthetic Peptides Damaging Effect on the Atrophic Coeliac Mucosa and Activation of Mucosal Immune Response in the Treated Coeliac Mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **31(3)**:247-253
- Majmundar, A. J., W. H. J. Wong, und M. C. Simon.** (2010). Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell* **40**:294-309.
- Makala, L. H., Y. Nishikawa, N. Suzuki, und H. Nagasawa.** (2004). Immunology. Antigen-presenting cells in the gut. *J Biomed Sci* **11**:130-141.
- Mallegol, J., G. van Niel, und M. Heyman.** (2005). Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cells Mol Dis.* **35**:11-16.
- Mandel, L. J., R. Bacallao, und G. Zampighi.** (1993). Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* **361**:552-555.
- Mandel, L. J., R. B. Doctor, und R. Bacallao.** (1994). ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. II. Internalization of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and E-cadherin. *J Cell Sci* **107 (Pt 12)**:3315-3324.
- Maquat, L. E. und G. G. Carmichael.** (2001). Quality Control of mRNA Function. *Cell* **104**:173-176.
- Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D. und M. A. Brito** (2011). A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Europ J cell Bio* **90**: 787-796
- Marsh, M. N. und J. S. Trier.** (1974). Morphology and cell proliferation of subepithelial fibroblasts in adult mouse jejunum. I. Structural features. *Gastroenterology* **67**:622-635.
- Marshman, E., C. Booth, und C. S. Potten.** (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* **24**:91-98.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. und E. Dejana** (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cll Biol.* **142**:117-127
- Masui, M., M. Yoneda, und T. Kominami.** (2001). Nucleus: cell volume ratio directs the timing of the increase in blastomere adhesiveness in starfish embryos. *Development Growth & Differentiation* **43**:295-304.

-
- Mathan, M., J. A. Hermos, und J. S. Trier.** (1972). Structural features of the epithelio-mesenchymal interface of rat duodenal mucosa during development. *J Cell Biol* **52**:577-588.
- McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, R. D. Lynch, und E. E. Schneeberger.** (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *Journal of Cell Science* **109**:2287-2298.
- McDougall, W. A.** (1971). Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. *J Periodontal Res.* **6**:89-99.
- Medzhitov, R. und A. Janeway Jr.** (2002). Decoding the Pattern of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**:298-300
- Mènard, D.** (1989). Growth-promoting factors and the development of the human gut., p. 123-149. *In* E. Lebenthal (ed.), *Human Gastrointestinal Development*. Raven Press, New York.
- Miranda, d. C., C. Bonnefont-Rebeix, D. Rigal, und L. Chabanne.** (2006). "Dendritic cells in different animal species: an overview". *Pathol Biol (Paris)* **54**:85-93.
- Mitic, L. L., C. M. Van Itallie, und J. M. Anderson.** (2000). Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions - I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**:G250-G254.
- Möritz, C.** (2006). **Das Tumorsuppressor-Homologe p63 als Modulator des Wnt-Signalweges.** Dissertation, Philipps-Universität, Marburg
- Moll, R., I. Moll, und W. Wiest.** (1982)a. Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation* **23**:170-178.
- Moll, R. und W. W. a. S. D. L. Franke.** (1982)b. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**:11-24.
- Moll, R., R. Levy, B. Czernobilsky, P. Hohlweg-Majert, G. Dallenbach-Hellweg, und W. W. Franke.** (1983). Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract. *Lab Invest* **49**:599-610.
- Mooseker, M. S. und L. G. Tilney.** (1975). Organization of an actin filament—membrane complex. *The Journal of Cell Biology* **67**:725-743.

- Mowat, A. M.** (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol* **3**:331-341.
- Moyer, P. M., P. S. Dixon, A. L. Culpepper und J. B. Aust** (1990). Colon cancer cells. In vitro propagation and characterization of normal, preneoplastic and neoplastic colonic epithelial cells. ed. Moyer and Poste, Chap. 5, Academic Press Inc., New York.
- Mukherjee, T. M. und A. W. Williams.** (1967). A comparative study of the ultrastructure of the microvilli in the epithelium of small and large intestine of mice. *The Journal of Cell Biology* **34**:447-461.
- Musch, M. W., M. M. Walsh-Reitz, und E. B. Chang.** (2006). Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**:G222-G231.
- Nagafuchi, A., Y. Shirayoshi, K. Okazaki, K. Yasuda, und M. Takeichi.** (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* **329**:341-343.
- Neumann, F. R. und P. Nurse.** (2007). Nuclear size control in fission yeast. *Journal of Cell Biology* **179**:593-600.
- Neutra, M. a. L. D.** (1989). Differentiation of intestinal cells *in vitro*. In: *Functional epithelial cells in culture*. New York: Alan R. Liss 363-398.
- Niedergang, F. und M. N. Kweon.** (2005). New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol.* **13**:485-490.
- Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, und H. C. Reinecker.** (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**:254-258.
- Nishizono, H., K. Hokazono und M. Inoue.** (1995). Early lesions of the colonic mucosa possibly developing into ulcers of ulcerative colitis – A transmission and scanning electron microscopic study. *Med. Elektron. Microsc.* **28 (1)**:23-32
- Nossol, C., A.-K. Diesing, N. Walk, H. Faber-Zuschratter, R. Hartig, A. Post, J. Kluess, H.-J. Rothkötter, S. Kahlert.** (2011). Air–liquid interface cultures enhance the oxygen supply and trigger the structural and functional differentiation of intestinal porcine epithelial cells (IPEC). *Histochem Cell Biol* **136(1)**:103-115.
- Odedra, R. M., C. A. Hart, J. R. Saunders, B. Getty, W. S. van de, S. H. Sorensen, H. Embaye, und R. M. Batt.** (1996). Growth and propagation of normal rat intestinal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol Anim* **32**:107-115.

-
- Oney, I., I. A. Kurnaz, und M. L. Kurnaz.** (2005). Cytoplasmic-to-nuclear volume ratio affects AP-1 complex formation as an indicator of cell cycle responsiveness. *FEBS Lett.* **579**:433-440.
- Ootani, A., K. Fujimoto, S. Toda, und H. Sugihara.** (2001). An air-liquid interface promotes the differentiation of gastric surface mucous cells (GSM06): Reconstruction of the gastric surface epithelial layer in three-dimensional collagen gel culture. *Gastroenterology* **120**:A301.
- Ootani, A., X. N. Li, E. Sangiorgi, Q. T. Ho, H. Ueno, S. Toda, H. Sugihara, K. Fujimoto, I. L. Weissman, M. R. Capecchi, und C. J. Kuo.** (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nature Medicine* **15**:1-U140.
- Oswald, I. P.** (2006). Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet. Res.* **37**:359-368.
- Owens, R. B.** (1976). Selective cultivation of mammalian epithelial cells. *Methods Cell Biol.* **14**, 341 - 355
- Paillet, R., F. Laval, J.-C. Audonnet, C. Andreoni und V. Juillard.** (2001). Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology* **102**:396-404
- Pang, K. Y., W. A. Walker, und K. J. Bloch.** (1981). Intestinal uptake of macromolecules. Differences in distribution and degradation of protein antigen in control and immunised rats. *Gut* **22**:1018-1024.
- Pappenheimer, J. R., C. E. Dahl, M. L. Karnovsky, und J. E. Maggio.** (1994). Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **91**:1942-1945.
- Patel, J. R. D. J. a. M. V. I.** (1985). A comparison of the susceptibility of three human gut tumour-derived differentiated epithelial cell lines, primary monkey kidney cells and human rhabdomyosarcoma cell line to 66-prototype strains of human enteroviruses. *Journal of Virological Methods* **12**:209-216.
- Perreault, N. und J.-F. Beaulieu** (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **245**, 34 – 42
- Pestka, J. J. und A. T. Smolinski.** (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ. Health B Crit Rev* **8**:39-69.
- Peterson, M. D. und M. S. Mooseker.** (1993). An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBE cells. *J Cell Sci* **105 (Pt 2)**:445-460.

-
- Pickartz, S.** (2002). **Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung boviner Darmepithelzellen.**
- Pinto, D. und H. Clevers.** (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* **306**:357-363.
- Pinto, M. Robine-Leon S. Appay M. D. Kedinger M. Triadou N. Dussaulx E. Lacroix B. Simon-Assmann P. Haffer K. Fogh J. & Zweibaum A.** (1983). Enterocyte like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47**:323-330.
- Pinton, P., J.-P. Nougayrede, J.-C. Del Rio, C. Moreno, D. Marin, L. Ferrier, A.-P. Bracarense, M. Kolf-Clauw und I. Oswald** (2009). The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* **137**(1):41-48.
- Pond, W. G. und H. J. Mersmann.** (2001). *Biology of the domestic pig.* Cornell University Press, ISBN 0-8014-3468-9
- Quaroni, A., J. Wands, R. L. Trelstad, und K. J. Isselbacher.** (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* **80**:248-265.
- Quaroni, A.** (1985). Development of fetal rat intestine in organ and monolayer culture. *J Cell Biol* **100**:1611-1622.
- Quaroni, A., D. Calnek, E. Quaroni, und J. S. Chandler.** (1991). Keratin expression in rat intestinal crypt and villus cells. Analysis with a panel of monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **266**:11923-11931.
- Quaroni, A. und J. Hochman.** (1996). Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**:3-52.
- Rojas, M., F. Ascencio und P. L. Conway.** (2002). Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(5):2330-2336
- Raul, F., P. Simon, M. Kedinger und K. Haffen.** (1977). Intestinal enzymes activities in isolated villus and crypt cells during post-natal development of the rat. *Cell Tissue Res.* **176**:167-178
- Reggio, H., E. Coudrier, und D. Louvard.** (1982). Surface and cytoplasmic domains in polarized epithelial cells. *Prog. Clin Biol Res.* **91**:89-105.
- Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold, und P. Ricciardi-Castagnoli.** (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp. Med.* **188**:2175-2180.

Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina, und P. Ricciardi-Castagnoli. (2001). Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* **204**:572-581.

Rimoldi, M., M. Chieppa, M. Vulcano, P. Allavena, und M. Rescigno. (2004). Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1029**:66-74.

Rimoldi, M., M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena, und M. Rescigno. (2005)a. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature Immunology* **6**:507-514.

Rimoldi, M. und M. Rescigno. (2005). Uptake and presentation of orally administered antigens. *Vaccine* **23**:1793-1796.

Rimoldi, M., M. Chieppa, P. Larghi, M. Vulcano, P. Allavena, und M. Rescigno. (2005)b. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood* **106**:2818-2826.

Robine, S., C. Huet, R. Moll, C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier, A. Zweibaum, und D. Louvard. (1985). Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc. Natl Acad Sci U. S. A* **82**:8488-8492.

Robine, S., F. Jaisser, M. CohenTanoudji, C. Antony, G. Pehau, E. Ferrary, L. Ouelbani, F. ElMarjou, M. A. C. deBeauregard, C. Babinet, und D. Louvard. (1996). Villin knock-out impairs colonic brush border assembly and clathrin distribution. *Molecular Biology of the Cell* **7**:3156.

Robine, S. und D. Louvard. (2000). In vivo, villin is required for the reorganization of actin microfilaments and cellular plasticity. *M S-Medecine Sciences* **16**:268-269.

Rocha, S. (2007). Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends in Biochemical Sciences* **32**:389-397.

Rodewald, R. (1970). Selective antibody transport in the proximal small intestine of the neonatal rat. *J Cell Biol* **45**:635-640.

Rodewald, R. (1973). Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *J Cell Biol* **58**:189-211.

Rothen-Rutishauser, B., A. Braun, M. Gunthert, und H. Wunderli-Allenspach. (2000). Formation of multilayers in the caco-2 cell culture model: a confocal laser scanning microscopy study. *Pharm Res.* **17**:460-465.

- Rothkoetter, H. J.** (2009). Anatomical particularities of the porcine immune system--a physician's view. *Dev Comp Immunol.* **33**:267-272.
- Royds, J. A., S. K. Dower, E. E. Qwarnstrom und C. E. Lewis.** (1998). Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *J. Clin Pathol: Mol Pathol* **51**:55-61.
- Rubio-Aliaga, I. und H. Daniel.** (2008). Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica* **38**:1022-1042.
- Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda, und S. Tsukita.** (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* **141**:397-408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. und S. Tsukita.** (2000). Complex phenotype of mic lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* **11**:4131-4142.
- Sambuy, Y., I. Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stammati, und F. Zucco.** (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* **21**:1-26.
- Sanchez, C., N. Domenech, J. Vazquez, F. Alonso, A. Ezquerra, und J. Dominguez.** (1999). The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *Journal of Immunology* **162**:5230-5237.
- Sandig, M., R. Bissonnette, C. H. L. Liu, G. Tomaszewski, und E. Wang.** (1994). Characterization of 57 Kda Statin As A True Marker for Growth Arrest in Tissue by Its Disappearing from Regenerating Liver. *Journal of Cellular Physiology* **158**:277-284.
- Santini, S. M, C. Lapenta, L. Santodonato, G. D'Agostino; F. Belardelli und M. Ferrantini.** (2009). INF-alpha in the generation of dendritic cells for cancer immunotherapy. In: *handbook of experimental pharmacology: Dendritic cells.* **188**:296-313
- Sato, T., R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters, und H. Clevers.** (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**:262-265.
- Sato, T., J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering, und H. Clevers.** (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**:415-418.

Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin, und L. H. Wieler. (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**:293-305.

Schneeberger, E. E. und R. D. Lynch. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C1213–C1228.

Scholten, R. H., van der Peet-Schwering CM, L. A. den Hartog, M. Balk, J. W. Schrama, und M. W. Verstegen. (2002). Fermented wheat in liquid diets: effects on gastrointestinal characteristics in weanling piglets. *J Anim Sci* **80**:1179-1186.

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature review* **3**:721-732.

Semenza, G. L. (2004). Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* **5**:405-406.

Shale, M. und S. Ghosh. (2009). How intestinal epithelial cells tolerise dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. *Gut* **58**:1291-1299.

Simmons, N. L. (1982). Cultured monolayers of MDCK cells: a novel model system for the study of epithelial development and function. *Gen. Pharmacol.* **13**:287-291.

Sinaasappel, M., M. van Iterson, und C. Ince. (1999). Microvascular oxygen pressure in the pig intestine during haemorrhagic shock and resuscitation. *J Physiol* **514 (Pt 1)**:245-253.

Smithson, K. W., D. B. Millar, L. R. Jacobs und G. M. Gray. (1981). Intestinal diffusion barrier: Unstirred water layer or membrane surface mucous coat? *Science* **214**:1241-1244

Söhl, G. und K. Willecke. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* **62**:228-232.

Steinert, P. M. (1993). Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol.* **100**:729-734.

Stern, M. und W. A. Walker. (1984). Food proteins and gut mucosal barrier I. Binding and uptake of cow's milk proteins by adult rat jejunum in vitro. *Am. J Physiol* **246**:G556-G562.

Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, und D. A. Goodenough. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**:755-766.

-
- Stevenson, B. R. and D. L. Paul.** (1989). The molecular constituents of intercellular junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**:891.
- Stewart, W. W.** (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* **14**:741-759.
- Störstrand, F. S.** (1968). A simple and rapid method to prepare dispersions of columnar epithelial cells from the rat intestine. *J. Ultrastruct. Res.* **22**:424-424
- Storch, J., Y. X. Zhou, und W. S. Lagakos.** (2008). Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine. *J Lipid Res.* **49**:1762-1769.
- Sugimoto, M., M.-L. Kuo, M. F. Roussel, und Ch. J. Sherr.** (2003). Nucleolar Arf Tumor Suppressor Inhibits Ribosomal RNA Processing. *Molecular Cell* **11**:415–424.
- Suh, E. R. und P. G. Traber.** (1994). A Caudal-Related Homeodomain Protein (Cdx-3) Activates Transcription Via An Intestine-Specific Regulatory Element in the Sucrase-Isomaltase (Si) Gene Promoter. *Gastroenterology* **106**:A274.
- Summerfield, A. und K. C. McCullough.** (2009). The porcine dendritic cell family. *Dev. Comp Immunol* **33**:299-309.
- Sun, Z. W., X. D. Wang, X. M. Deng, R. Wallen, L. Gefors, E. Hallberg, und R. Andersson.** (1997). The influence of circulatory and gut luminal challenges on bidirectional intestinal barrier permeability in rats. *Scand. J Gastroenterol* **32**:995-1004.
- Szentkuti, L. und K. Lorenz.** (1995). The thickness of the mucus layer in different segments of the rat intestine. *Histochemical Journal* **27**:466-472.
- Takahashi G. W., D. F. Andrews, M. B. Lilly, J. W. Singer und M.R. Alderson.** (1993). Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* **81**:357364
- Takehara, T., T. Teramura, Y. Onodera, R. Kakegawa, N. Fukunaga, M. Takenoshita, N. Sagawa, K. Fukuda, und Y. Hosoi.** (2008). Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 promotes survival of cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Molecular Human Reproduction* **14**:627-634.
- Taupin, D. und D. F. Podolsky.** (1999). Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* **116**:1072-1080.

-
- Taylor, C. T., S. J. Lisco, C. S. Awtrey, und S. P. Colgan.** (1998). Hypoxia inhibits cyclic nucleotide-stimulated epithelial ion transport: role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **284**:568-575.
- Taylor, C. T. und S. P. Colgan.** (2007). Hypoxia and gastrointestinal disease. *J Mol Med.* **85**:1295-1300.
- Tchao, R.** (1989). Epithelial cell interaction in air-liquid interface culture. *In Vitro Cell Dev. Biol* **25**:460-465.
- Thomson, A. B., C. Schoeller, M. Keelan, L. Smith, und M. T. Clandinin.** (1993). Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Can J Physiol Pharmacol.* **71**:531-555.
- Tian, J. Q. und A. Quaroni.** (1999). Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol* **276**:C1245-C1258.
- Treisman, R.** (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol* **8**:205-215.
- Tsukita, S. und M. Furuse.** (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes to Cells* **3**:569-573.
- Udall, J. N., K. Pang, L. Fritze, R. Kleinman, und W. A. Walker.** (1981). Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res.* **15**:241-244.
- van der Flier, L. G. und H. Clevers.** (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol* **71**:241-260.
- Van Itallie, C. M. und J. M. Anderson.** (2004)a. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda.)* **19**:331-338.
- Van Itallie, C. M. und J. M. Anderson.** (2004)b. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc. Am Thorac. Soc.* **1**:38-41.
- van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, und M. Heyman.** (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* **121**:337-349.
- Verhey, K. J. und J. W. Hammond.** (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:765-777.

- Versantvoort, C. H. M., R. C. A. Ondrewater, E. Duizer, J. J. M. Van de Sandt, A. J. Gilde, und J. P. Groten.** (2002). Monolayers of IEC-18 cells as an in vitro model for screening the passive transcellular and paracellular transport across the intestinal barrier: comparison of active and passive transport with the human colon carcinoma Caco-2 cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**:335-344.
- Vincentini, O., C. Ciotta, M. Bignami, A. Stammati, und F. Zucco.** (1996). Normal rat intestinal cells IEC-18: Characterization and transfection with immortalizing oncogenes. *Cytotechnology* **21**:11-19.
- Walzer, C., M. Benathan und E. Frenk.** (1989). Thermolysin treatment: a new method for dermo-epidermal separation. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 78 – 81
- Wang, E. und S. L. Lin.** (1986). Disappearance of statin, a protein marker for non-proliferating and senescent cells, following serum-stimulated cell cycle entry. *Exp. Cell Res.* **167**:135-143.
- Watanabe, K., M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, und Y. Sasai.** (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **25**:681-686.
- Watson, C. J., M. Rowland, und G. Warhurst.** (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **281**:C388-C397.
- Watt, F. M. und B. L. Hogan.** (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**:1427-1430.
- Wei, Y.H.** (1998). Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* **22(2)**:55-67.
- Welch, W. J. und J. P. Suhan.** (1985). Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J Cell Biol* **101**:1198-1211.
- Wenger, R. H.** (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* **16**:1151-1162.
- Westergaard, H. und J. M. Dietschy.** (1967). Delineation of the dimensions and permeability characteristics of the two major diffusion barriers to passive mucosal uptake in the rabbit intestine. *The Journal Clinical Investigation* **54**:718-732

Westphal, J. K., M. J. Dorfel, S. M. Krug, J. D. Cording, J. Piontek, I. E. Blasig, R. Tauber, M. Fromm, und O. Huber. (2010). Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**:2057-2068.

Wilson, F. A. und J. M. Dietschy. (1974). The intestinal unstirred layer: Its surface area and effect on active transport kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta* **363**:112-126.

Willecke, K., H. Hennemann, E. Dahl, S. Jungbluth, und R. Heynkes. (1991). The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* **56**:1-7.

Wong, R. C. B., A. Pebay, L. T. V. Nguyen, K. L. L. Koh, und M. F. Pera. (2004). Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**:883-889.

Yamamoto, Y., M. Ibusuki, Y. Okumura, T. Kawasoe, K. Kai, K. Iyama und H. Iwase. (2008). Hypoxia-inducible factor 1 α is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **110**:465-475

Yin, Y. Ch. W. Stephen, M. G. Luciani und R. Fähræus. (2002). p53 stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nature Cell Biology* **4**:462-467.

Yokoyama, F., Y. Sakata, A. Ootani, T. Fujise, T. Kakimoto, S. Amemori, R. Shiraishi, T. Kuroki, S. Tsunada, R. Iwakiri, und K. Fujimoto . (2007). Differentiation of gastric surface mucous cells (GSM06) induced by air-liquid interface is regulated partly through mitogen-activated protein kinase pathway. *J Gastroenterol. Hepatol.* **22**:2310-2315.

You, Y., E. J. Richer, T. Huang, und S. L. Brody. (2002). Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *Am. J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**:L1315-L1321.

Zegers, M. M. und D. Hoekstra. (1998). Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem J* **336 (Pt 2)**:257-269.

Zoumpoulou, G., E. Tsakalidou, J. Dewulf, B. Pot, und C. Grangette. (2009). Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int J Food Microbiol.* **131**:40-51.

Zucker, R. M. und K. B. Whittington. (1983). Glutathione mediated lysis of HL-60 cells. *Res. Commun. Chem Pathol Pharmacol.* **39**:321-331.

Zweibaum, A., M. Laburthe, E. Grasset und D. Louvard (1991). The use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function, p. 223-255. *In* Handbook of Physiology: The gastrointestinal system. American Physiological Society.

Zwerschke, W., S. Mazurek, P. Stöckel, E. Hütter, E. Eigenbrodt und P. Jansen-Dürr. (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem. J.* **376**:403–411.

Herstellerverzeichnis

Reagenzien, Medium und Puffer

ABC-Reagenz (ABC-Elite)

Agar

Agarose

Aktin (Western Blot)

anti-BRDU

BCIP

BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (mouse/rabbit)

BSA

CD152 (CD80/86; Klon: 5K109)

CD16 (Klon: G7)

CD172a (Klon:74-22-15)

CD3 (Klon: PPT3)

CD4 (Klon: 74-12-4)

CD40

CD8

Cell wash

Chloroform

CK18 (Cy90)

Claudin-3

Claudin-4

Colchizin

Collagen I

Collagenase

DAPI

Deoxynivalenol

DEPC-Wasser

Dexamethasone

DMEM ohne Phenolrot

Hersteller

Vector Laboratories, USA

Sigma Aldrich, Deutschland

Sigma Aldrich, Deutschland

Cell Signaling, Deutschland

BD Pharmingen, Deutschland

Sigma, Deutschland

Roche, Deutschland

Roth, Deutschland

Ancell, Deutschland

AbD Serotec, Deutschland

BD Pharmingen, Deutschland

Biozol, Deutschland

VMRD, Deutschland

Hybridoma-Überstände

Hybridoma-Überstände

BD Pharmingen, Deutschland

Roth, Deutschland

Sigma Aldrich, Deutschland

Invitrogen, Deutschland

Invitrogen, Deutschland

Sigma Aldrich, Deutschland

Sigma, Deutschland

Roche, Deutschland

Partec, Deutschland

Sigma, Deutschland

Roche, Deutschland

Sigma, Deutschland

PAN, Deutschland

DMEM/HAMs F12	PAN, Deutschland
DMF	Sigma, Deutschland
donkey-anti rabbit IgG APC	Invitrogen, Deutschland
D-Sorbitol	Sigam, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deutschland
Durcupan ACM	Fluka, Schweiz
DyLight	Thermoscientific, Deutschland
EDTA	Biochrom, Deutschland
EGF	BD Bioscience, Deutschland
Ethanol, Aceton	Roth, Deutschland
Fast Start Master Mix	Roche, Deutschland
FCS	PAN, Deutschland
Ficoll Paque Plus	Schweden
FITC-Phalloidin (Aktin, IF)	Sigma Aldrich, Germany
GAPDH	Cell signaling, USA
Giemsa	Merck, Deutschland
Glucose	Sigma, Deutschland
Glutaraldehyd	Serva, Deutschland
GM-CSF	Biosource, Deutschland
goat anti-mouse IgG1, Biotin-gelabelt	Southern Biotech, Deutschland
goat anti-mouse MACS microbeads	Miltenyi Biotech, Deutschland
goat-anti mouse IgG1 FITC/PE	Biozol, Germany
goat-anti mouse IgG1 Texas RED	Biozol, Deutschland
goat-anti mouse IgG2a APC	Biozol, Germany
goat-anti mouse IgG2b FITC/PE	Biozol, Germany
H ₂ PO ₄	Roth, Deutschland
HBSS	Biochrom, Deutschland
Heparin (Lequemin, N25 000)	Roche, Deutschland
HEPES	PAN, Deutschland
HPO ₄	Roth, Deutschland
IL-4	Biosource, Deutschland
ITS	PAN, Deutschland
Kalziumchlorid	Sigma, Deutschland
Lipopolysaccharide (<i>E. coli</i>)	Sigma, Deutschland

Lucifer Yellow CH Dipotassium salt	MP Biomedicals, Frankreich
Magnesiumsulfat	Sigma, Deutschland
Marker (MassRuler® DNA Ladder)	Fermentas, Deutschland
MHCII DQ (Klon: K274.3G8)	Biozol, Deutschland
MHCII DR	Hybridoma-Überstämme
Na ₂ HPO ₄	Roth, Deutschland
Narcofen	Merial, Deutschland
Nitroblau-Tetrazolium	Sigma, Deutschland
NGS	Axxora, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Deutschland
Occludin (Klon: OC-3F10)	ZYMED Laboratories, USA
Osmiuntetroxid	Science Service, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Deutschland
PBS ⁻	Biochrom, Deutschland
PEN/STREP	Sigma, Deutschland
Prestained Protein Ladder (SM1811)	Fermentas, Deutschland
Primer	MWG, Deutschland
qRT-PCR Maxima™ SYBR GREEN qPCR Master Mix	Fermentas, Deutschland
ReverdAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Deutschland
Rho-Kinase-Inhibitor	Selleck, USA
Schweineserum	PAN, Deutschland
SDS	Roth, Deutschland
Sucrose	Sigma, Deutschland
TRIS-HCl	Roth, Sigma
Trisodiumcitrat	Roth, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Sigma, Deutschland
Tween®	Serva, Deutschland
Uranylacetat	Plano, Deutschland
Vectashield	Vector Laboratories, USA
Villin-1 (Klon: ID2C3)	Millipore, Germany
ZO-1	ZYMED Laboratories, USA

Zubehör und Geräte

12-Well-Insert	NUNC, Deutschland
15ml Falcon (Polypropylen)	Greiner bio-one, Deutschland
200M Mikroskop	ZEISS, Deutschland)
24-Well-Inserts	Greiner bio-one, Deutschland
24-Well-Platte	NUNC, Deutschland
50ml Falcon (Polypropylen)	Greiner bio-one, Deutschland
96-Well-Platte	NUNC, Deutschland
Durchflusszytometer	BD, Deutschland
Durcupan ACM	Fluka, Schweiz
ELISA-Reader	Tecan, USA
FluorChem®	Alpha Innotech, Deutschland
Glasbodenschale	MatTek, USA
Homogenisator (TURRAX)	IKA, Labortechnik, Deutschland
Icycler	BIORAD, Deutschland
Inkubator	NUNC, Deutschland
Laborzentrifuge Typ 58 10R	Eppendorf, Deutschland
LEO 906 Elektronenmikroskop	ZEISS, Deutschland)
LS Säule (LS column, midiMACS)	Miltenyi Biotec, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Roth, Deutschland
Schale (21,5 cm)	NUNC, Deutschland
Schale (3,5 cm)	NUNC, Deutschland
Schale mit gasdurchlässiger Folie, Lumox®	Sarstedt, Deutschland
SP2 konfokales Mikroskop	Leica, Ddeutschland
TEER-Messgerät (Milli-TERS)	Millipore, Deutschland
Thermocycler (Mastercycler gradient)	Eppendorf, Deutschland
Ultracut S Ultramicrotome	Leica, Ddeutschland
Zellkulturflasche	NUNC, Deutschland

1. Reagenzien, Puffer und Zellkulturmedium

Isolierung von Epithelzellen

Protokoll 1:

Citratpuffer

107mM Natrium
80mM Chlorid
27mM Citrat
21,6mM Kalium
5,6mM H₂PO₄
8 HPO₄
pH=7,2

PBS/EDTA + Glucose

9,55 g/L PBS ohne Calcium und Magnesium
1,5 mM EDTA
2 mM Glucose

Protokoll 2:

Waschpuffer

HBSS ohne Calcium und Magnesium (Biochrom, Dtl.)
0,5 mM DTT (Sigma, Dtl.)

Chelating-Puffer

27 mM Trisodium-Citrat
5 mM Na₂HPO₄
96 mM NaCl
8 mM KH₂PO₄
1,5 mM Kaliumchlorid
0,5 mM Dithiothreitol
55 mM D-Sorbitol
44 mM Sucrose

Protokoll 3:

Puffer

9,55 g/L PBS ohne Magnesium und Calcium
30 mM EDTA

Protokoll 4:

Medium

DMEM/HAMs F12
20mM HEPES (beides PAN Biotech, Aidenbach, Dtl.)
0,2% BSA (Sigma, Dtl.)
Rho-Kinase-Inhibitor

Isolierung von PBMCs

PBS/EDTA	
Stocklösung	9,55 g/L PBS ohne Magnesium und Calcium 1 g/L EDTA
Gebrauchslösung	300 ml Stocklösung 700 ml PBS/EDTA
MACS-Puffer	0,03% PBS/EDTA Vol.-1% FCS

Kultivierung von primären intestinalen Epithelzellen

Zellkulturmedium	70% DMEM/HAMs F12 30% Fibroblasten-konditioniertes Medium Vol.-5% FCS 16 mM HEPES Vol-1% ITS 5 µg/L EGF (BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.) Rho-Kinase-Inhibitor 50 µg/ml PEN/STREP
Beschichtung von Schalen	Stocklösung (Collagen I, Sigma, Deutschland) Stocklösung 1:10 verdünnt mit 30%igen Alkohol Steril filtrieren; 2 ml pro Schale Inkubation der Schalen für 2 Std. bei RT Absaugen, trocknen unter der Sterilbank Lagerung bei 4°C

Kultivierung von IPEC-Zellen

Zellkulturmedium complete	DMEM/HAMs F12 (1:1) Vol.-5% FCS 16 mM HEPES Vol.-1% ITS (alles PAN Biotech) 5 µg/L EGF (BD Bioscience)
Zellkulturmedium FCS-frei	ohne FCS (siehe oben)

Kultivierung von MoDCs

Differenzierungsmedium	DMEM ohne Phenolrot Vol.-10% Schweineserum (beides PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) 150 ng/ml GM-CSF 50 ng/ml IL-4 (beides Biosource, Solingen, Dtl.)
Erhaltungsmedium	DMEM ohne Phenolrot Vol.-10% Schweineserum (beides PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Hybridmedium	Vol.-50% Erhaltungsmedium Vol.-50% Zellkulturmedium FCS-frei

Verwendete Primer in der PCR

Name	Funktion	Primer left	Primer right	Temp.
GAPDH	Glycerinald-3-Phos-Dehydrogenase	tccacggcacagtcaa	gcaggtcaggtccacaa	55-60°C
ZO1b	Zona occludens-1; Tight Junctions	ccgcctcctgagttgatag	tcaggaatagctccctgtgg	55-60°C
Occludin	Tight-junctions	gacgagctggaggaagactg	ctccaacctctcttgatgtg	55-60°C
β-Actin	Zytoskelett	ggacttcgagcaggagatggc	cctctacgccaacacgggtgc	55-60°C
SGLT1	Na ⁺ / Glucose-Cotransporter	acatctgtctgggctggaac	agacgtccatggtgaagagg	55-60°C
VIL-1	Villin-1	actcaaaccaggcatcgtc	tctctgaccaccactttcc	55-60°C
DR-alpha	MHCIIDR	aaagccaacctggaatcct	gagcttcaactcccagtc	55-60°C
rCX3CR1	Chemokine receptor from rattus norvegicus	gcccttagtgtagcggagac	cctctccctcgctgtgtag	60-65°C
CD209	DC-SIGN	aggagaaccaacaatcaag	gcctgtgcctattctctgc	55-60°C
CK18	Cytokeratin-18	gagcacctcagtggtcacct	ctcatggagtccaggctgat	55-60°C
Mucin-1	Mucin-1	gaagatcccaccaccagcta	actgtcttgaaggccagaa	55-60°C
claudin 3	Tight Junctions	gtccatggcctggagat	gatctgcgctgtataatgc	55-60°C
claudin 4	Tight Junctions	ccccctggactgcaatctgt	cgcaggagtctctttccata	55-60°C
TNFalpha	TNFalpha	tccaatggcagactgggtat	ccaaaatagacctgccaga	55-60°C
IFNgamma	Interferon-gamma	gaagaaaggtcagccaagcgc	gcttgatcacatccatgctcc	55-60°C
IL1b	Interleukin-1b	aaaggggacttgaagaga	ctgcttgagaggtgctgatgt	55-60°C
IL2	Interleukin-2	ttacagttgctttgaagg	ggtgagtagatgctttgaca	55-60°C
IL4	Interleukin-4	taccagcaactctgcccac	atcgctcttagcctttccaa	55-60°C
IL6	Interleukin-6	atgaactccctctccacaagc	tggtttgtctggattctttc	55-60°C
IL8	Interleukin-8	tttctgcagctctctgtgagg	ctgctgtgtgtgctctc	55-60°C
IL10	Interleukin-10	gcatccactccaacca	cttctcatcttcatcgtcat	55-60°C
IL12	Interleukin-12	gatgctggccagtagacc	tccagcacgacctcaatg	55-60°C
IL18	Interleukin 18	agggacatcaagccgtgtt	ctccacattcatcctttctttc	55-60°C

Tabelle 11: Primer für die PCR

Verwendete Primer in der qPCR

Name	Funktion	Primer left	Primer right
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phos-Dehydrogenase	accagaagactgtgga	ttgagctcagggatgacctt
Aktin	Zytoskelett	gatgagattggcatggcttt	caccttcaccgttccagttt
VIL-1	Villin-1 Bürstensaum	caccatgaccaactgaacg	tcaagaagctgccataggt
MUC4	Mucin-4	gctgacaggaagaggccata	ccccttcaactctgggtgtg
TLR4	Toll-Like-Rezeptor 4	ctggagacgactcaagaagc	agtgaaggctgtgtatcatgc
OCCL	Occludin (TJ)	tgacactctaggcaatcaggtc	gggccaatttccttatctg
VIL-2	Villin-2 (Ezrin)	cagtcgacgaaatcctgtga	ggcgcaggccaacaaggta
Espin	Espin	agaagcggaagaggaggag	acttagcgtgtccccttc
HIF1a	<i>hypoxia inducible factor</i>	tgccagaacctctgtaacc	atgtacgtggggaggagatg
p53	P53	cgaactggcatgaaaat	agaagggacaaaggacgaca
CLDN1	Claudin-1	ccagtgaagagagcctgacc	tgatgaggcgcagaagatgc
CLDN3	Claudin-3	gtccatgggctggagat	gatctgcgctgtgataatgc
CLDN7	Claudin-7	ctcactcccaggacaagagc	tttgtcggtgatagctgc
BAD	BCL-2-Antagonist	cttgcaaaaagagccgtttc	ttaaggcggaaaaactca
BCL-2	Apoptose-Regulator	atttagcctctgacctgtgg	gcagttgaggctgctttt
BAX	Apoptose-Regulator	ggtcgcgcttttctactttg	cgatctcgaaggaagtccag
LIG1	Ligase 1	cttcgcttccctcggtttat	gtgccttgctggttctgaat
MCL-1	Differenzierung	gagatgccaatggaggat	caggcctccttccctat
FAK	<i>focal adhesion factor</i>	aaagcaacagtgagccaacc	ggccacgtgcttactttgt
p21	P21	tcattgcacttgaacagcag	tccggaagacaacaactcc
CYC1	Cytochrom C	ctaccatgtcccaggtagcc	aaagcaagcccatcatcatc
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase	accgatcatgcttctcaag	tagcaactgtgcagcatcc
SDH	Succinat-Dehydrogenase	actggatgggctgtacgagt	gtcgatcatccagcgatagg
CTNN-B1	Beta-Catenin	cccgaattgacaaaattgct	tgcagacaccatctgaggag

Tabelle 12: Primer für die qRT-PCR

Durchflusszytometrie

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
primäre Antikörper		
CD3	Klon: PPT, Biozol, Deutschland	1:100
CD4	Klon: 74-12-4, VMRD, Deutschland	konz.
CD8	Hybridoma-Überstände	konz.
CD16	Klon: G7, AbD Serotec, Deutschland	1:100
CD40	Hybridoma-Überstände	1:10
CD152 (CD80/86)	Klon: 5K109, Ancell, Deutschland	1:500
CD172a	Klon: 74-22-15, Biozol, Deutschland	1:100
MHCII DQ	Klon: K274.3G8, Biozol, Deutschland	1:10
MHCII DR	Hybridoma-Überstände	1:10
sekundäre Antikörper		
goat-anti mouse IgG1 FITC/PE	Biozol, Germany	1:100
goat-anti mouse IgG2b FITC/PE	Biozol, Germany	1:100
goat-anti mouse IgG2a APC	Biozol, Germany	1:100

Tabelle 13: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Immunfärbung von Zellen

Fixierung	99,6% Ethanol (Roth, Karlsruhe, Dtl.) 30 min bei 4°C Aceton (Sigma, Deutschland), vorgekühlt auf -20°C 3 min
Waschen	0,1 M Phosphatpuffer
Blockieren	1:100 NGS in 0,1 M PB (normal goat serum, Ax-xora, Deutschland)

**Antikörperverdünnung
(AK-Verdünnungspuffer)**

Ansatz von 1 Liter	10 g BSA 1 g Na-Azid 9g NaCl
--------------------	------------------------------------

Herstellung von TBS/0,05% Tween

10x TBS

100 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

Verdünnung von TBS mit Aqua dest.

Zusatz von Vol.-0,05% Tween

Verwendete Antikörper für IF

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
primäre Antikörper		
ZO-1	ZYMED Laboratories, USA	1:100
Occludin	Klon: OC-3F10, ZYMED Laboratories, USA	1:100
Villin-1	Klon: ID2C3, Millipore, Deutschland	1:100
FITC-Phalloidin (Aktin)	Sigma Aldrich, Deutschland	1:50
CK18 (Cy90)	Sigma Aldrich, Deutschland	1:5000
Claudin-3	Invitrogen, Deutschland	1:100
Claudin-4	Invitrogen, Deutschland	1:100
sekundäre Antikörper		
goat-anti mouse IgG1 Texas RED	Biozol, Deutschland	1:200
donkey-antirabbit IgG Alexa 488	Invitrogen, Deutschland	1:200

Tabelle 14: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

Eindeckmedium

Vectashield

Western Blotting

SDS-Ladepuffer

1 M Tris base pH 6.8

Vol.-1% Glycerol

Vol.-10% SDS

Vol.-0,1% Bromophenolblau

Vol.-0,05% β -Mercaptoethanol

Vol.-1% Protease-Inhibitor

(Complete, Roche, Dtl.)

Stripping-Puffer

7,6 g Tris base

20 g SDS

7 mL β -Mercaptoethanol in 100 mL H₂O, pH 6.8

Verwendete Antikörper für das Western Blotting

Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
primäre Antikörper		
ZO-1	ZYMED Laboratories, USA	1:1000
Occludin	ZYMED Laboratories, USA	1:1000
Villin-1	Millipore, Deutschland	1:1000
beta-Aktin	Sigma, Deutschland	1:50
CK18 (Cy90)	Sigma Aldrich, Deutschland	1:5000
Claudin-3	Invitrogen, Deutschland	1:100
Claudin-4	Invitrogen, Deutschland	1:100
sekundäre Antikörper		
BM Chemiluminescence Western Blotting Kit mouse/rabbit	Roche, Deutschland	folgend den Angaben des Herstellers

Tabelle 15: Antikörper für das Western Blotting

Herstellung von BSA-DyLight

Dialyse-Puffer

HBSS mit Magnesium und Calcium

Anfertigung von Zytospots

Für die Herstellung von Zytospots wurden die zu untersuchenden Zellen auf eine Konzentration von 50 000 Zellen/500 µl Fixierungslösung eingestellt. Der Zytospot wurde mit einer Filterkarte versehen und mit der Probe befüllt. Im Anschluss wurden die Proben mit einer Geschwindigkeit von 400g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Der Spannring und die Kammer wurden entfernt und nochmals für eine Minute zentrifugiert, um die Restflüssigkeit zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate bei Raumtemperatur (oder mit Ventilator) getrocknet und schließlich mit einer Giemsa gefärbt.

2. Filter für Fluoreszenzmikroskopie

Dapi

Anregung

359nm – 371nm

Emission

397nm

FITC

Anregung

450nm – 490nm

Emission

515nm – 565nm

TexRed

Anregung

522nm – 540nm

Emission

690nm

3. Daten

Co-Kultur

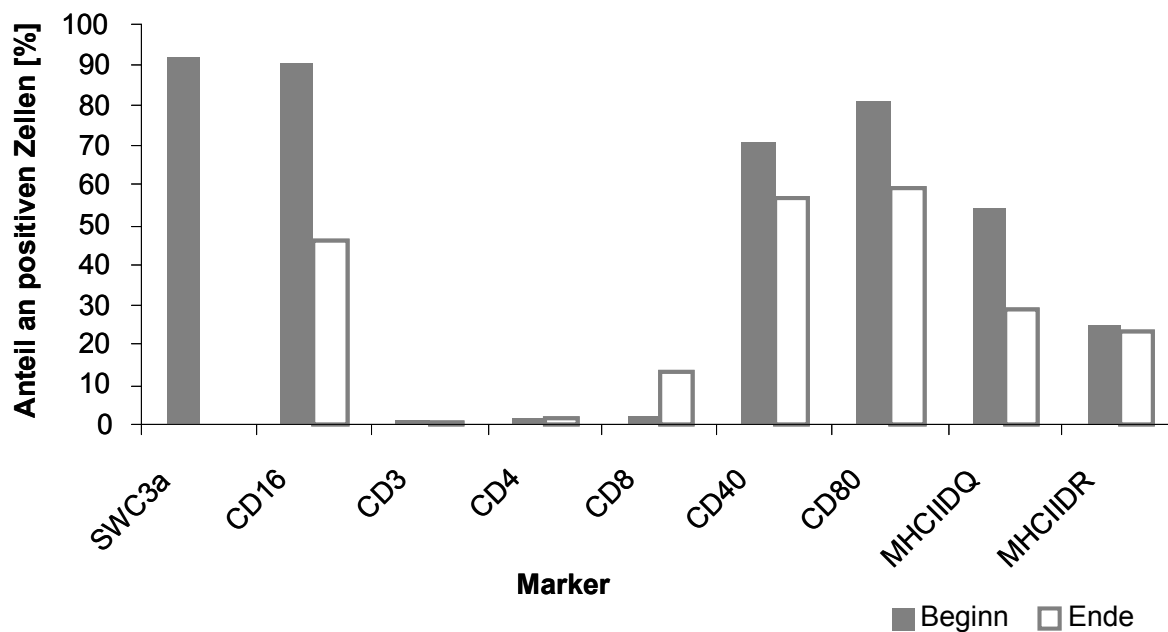


Abbildung 96: Auswertung der Durchflusszytometrie - MoDCs.

Migration von IPEC-1

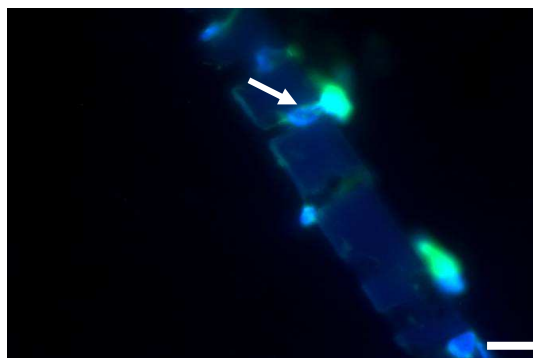


Abbildung 97: Migration von IPEC-1. Durch die Immunfluoreszenzfärbung mit anti-ZO-1 und Dapi auf in Paraffin-eingebetteten Schnitten. Auch mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte die Migration von IPEC-1 auf permeablen Untergrund (3 μm ; Greiner bione, Deutschland) nachgewiesen werden. (Balken = 20 μm)

Danksagung

Herzlich danke ich allen, die zum Entstehen dieser Doktorarbeit beitrugen und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter, der mir dieses spannende Thema zur Verfügung stellte, mich unterstützte und fachliche Probleme jeder Zeit mit mir diskutierte.

Frau Dr. Heidi Faber-Zuschratter bin ich nicht nur für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder dankbar sondern auch für die kritische Beurteilung der so gewonnenen Daten. Herrn Dr. Roland Hartig danke ich für die Erstellung der Bilder der konfokalen Mikroskopie.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Karin Fischer, Frau Stephanie Henel, Frau Margit Franke und Herrn Olaf Laddey bedanken, die mich fortwährend in meiner Arbeit als Assistentin unterstützt haben und es immer noch tun.

Ein besonderes Dankeschön gilt den technischen Assistentinnen des Labors des Instituts für Anatomie: Frau Anke Schmidt, Frau Andrea Kröber, Frau Sandra Vorwerk, Frau Anja Köppen, Frau Christine Gerlach, Frau Sybille Röhl, Frau Brigitte Ketzler und Frau Susanne Schneider. Danke für die viele Hilfe und den unermühtlichen Einsatz! Bei Frau Wiegand bedanke ich mich für die Beschaffung der vielen Literatur.

Frau Anne-Kathrin Diesing geb. Hegewald (PhD), Herr Andreas Post (PhD), Herr Dr. Stefan Kahler, Frau Nicole Walk (PhD), Herr Dr. Wolfgang D'Hanis, Dr. Sven Nullmeier, Frau Patricia Panther (PhD) und Dr. Jeannette Klüß – vielen Dank! – für tolle Zusammenarbeit; die vielen unterhaltsamen Autofahrten nach Mücheln – bewaffnet mit der kompletten Laboreinrichtung; für die Hilfe bei den zahlreichen Versuchen und Blutabnahmen; für die Unterstützung bei fachlichen Fragen und Problemen und für die vielen guten Diskussionen.

Meinen Freunden danke ich für die Anregungen, die Diskussionen, für die Hilfe und Unterstützung bei „Computerfragen“ und das „offene Ohr“ zu jeder Zeit!

Nicht zuletzt gilt mein Dank Claudia und Gerald Steinel der LPVG GmbH Mücheln für ihre Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie – vor allem meiner Mutter – welche mich in jeglicher Hinsicht nicht nur während meiner Doktorarbeit unterstützt hat und es immer noch tut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Constanze Nossol, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen benutzter Werke wurden als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Europäischen Union (7. Rahmenprogramm, Projekt „Interplay“; Nr. 227549).

Constanze Nossol

Magdeburg, 30.01.2012