

Modulation der physiologischen Zellfunktion in intestinalen porcinen Epithelzellen (IPEC) durch das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Anne-Kathrin Diesing; geb. Hegewald

geb. am 26.12.1982 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter

Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf

eingereicht am: 23.4.2012

verteidigt am: 15.11.2012

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	10
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 VORBETRACHTUNG	11
1.2 DIE EPITHELIALE BARRIERE UND ZELL-ZELL-KONTAKTE	12
1.3 DAS MYKOTOXIN DEOXYNIVALENOL (DON)	16
1.3.1 Bedeutung und Vorkommen von DON in der Praxis	16
1.3.2 Systemische und epitheliale Wirkung von DON im Schwein	20
1.3.3 Wirkung von DON auf zellulärer Ebene.....	23
1.4 DAS INTESTINALE EPITHELZELLKULTURMODELL	25
1.5 ZIELSTELLUNG.....	28
2 MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1 ALLGEMEINES	29
2.2 ZELLKULTUR	29
2.2.1 Kultivierung von IPECs	29
2.2.2 Herstellung der Deoxynivalenol-Gebrauchslösung	30
2.2.3 Design der Experimente auf impermeablem Untergrund.....	31
2.2.4 Design der Experimente auf permeablem Untergrund (Membrankulturen).....	32
2.2.5 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)	33
2.3 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN VIABILITÄT	33
2.3.1 Untersuchung der Lysosomenfunktion – Neutralrot-Aufnahme	33
2.3.2 Untersuchung der Stoffwechselaktivität – MTT-Test	34
2.3.3 Zelluläre Proliferationsrate – BrdU-ELISA	34
2.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung des Zellzyklus.....	35
2.3.5 Zytotoxizitäts-Test – LDH-Aktivität.....	36
2.3.6 Apoptosenachweis – Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität	36
2.4 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN.....	37
2.4.1 RNA-Isolation und Herstellung von cDNA (Reverse Transkription).....	37
2.4.2 Amplifikation von cDNA durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	38
2.4.2.1 Allgemeiner PCR-Ansatz zur cDNA-Analyse	38
2.4.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	38
2.4.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)	38
2.4.3 Durchführung und Auswertung der Microarrays	41
2.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN (WESTERN BLOT).....	42
2.6 MIKROSKOPISCHE METHODEN	44

2.6.1	Phasenkontrastaufnahmen unfixierter IPECs	44
2.6.2	Immunfluoreszenzfärbungen	44
2.6.3	Immunzytochemischer Nachweis von BrdU und Hämatoxylin-Gegenfärbung	46
2.6.4	Elektronenmikroskopie	47
2.7	STATISTISCHE METHODEN	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	ÜBERBLICK.....	49
3.2	POLARITÄT UND INTEGRITÄT VON UNBEHANDELTEN IPEC-ZELLVERBÄNDEN <i>IN VITRO</i>	50
3.2.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung von IPEC-Zellverbänden auf impermeablem Untergrund.....	50
3.2.2	Integrität von IPEC-Zellverbänden anhand des transepithelialen elektrischen Widerstandes	52
3.3	EINFLUSS VON DON AUF DIE VIABILITÄT UND DEN METABOLISMUS VON IPECs.....	54
3.3.1	IPEC-Zellmorphologie nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund	54
3.3.2	Veränderung der IPEC-Zellanzahl nach DON-Exposition	56
3.3.3	Lysosomenfunktion von IPECs nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund	59
3.3.4	Stoffwechselaktivität von IPECs nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund	61
3.4	VERÄNDERUNG DER IPEC-PROLIFERATION NACH DON-APPLIKATION	63
3.4.1	Ermittlung der DNA-Syntheserate des IPEC-Zellverbandes.....	63
3.4.2	Ermittlung der DNA-Syntheserate auf Einzelzellniveau	65
3.5	VERÄNDERUNG DER IPEC-ZELLZYKLUSPHASEN NACH DON-APPLIKATION	68
3.6	WIRKUNG VON DON AUF DEN ZELLTOD (NEKROSE/APOPTOSE) VON IPECs.....	72
3.6.1	DON-verursachte Nekrose in IPECs.....	72
3.6.2	Apoptose-Induktion durch DON in IPECs	75
3.6.2.1	Untersuchung der Caspase-3/-7-Aktivität	75
3.6.2.2	Untersuchung der Caspase-3-Proteinexpression	78
3.7	VERÄNDERUNG DER TIGHT JUNCTION-INTEGRITÄT NACH DON-APPLIKATION	81
3.7.1	Bestimmung der Integrität des IPEC-J2-Zellverbandes nach DON-Exposition (TEER).....	81
3.7.2	Zelluläre Verteilung der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 nach DON-Einwirkung	83
3.7.3	Western Blot-Analyse der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4.....	86
3.8	WIRKUNGEN GERINGER DON-KONZENTRATIONEN ÜBER LÄNGERE ZEITRÄUME AUF IPECs	89
3.8.1	IPEC-J2-Zellanzahl nach Langzeit-DON-Exposition	89
3.8.2	Stoffwechselfunktion von IPECs nach Langzeit-DON-Exposition auf impermeablem Untergrund	90
3.8.3	Proliferationsänderung von IPECs nach Langzeit-DON-Exposition.....	91
3.8.4	Integrität des IPEC-J2-Zellverbandes nach Langzeit-DON-Exposition	93
3.9	ERGEBNISÜBERSICHT.....	95
3.10	ANALYSE DER DIFFERENZIELLEN GENEXPRESSION IN IPEC-J2-ZELLEN NACH DON-EXPOSITION AUF PERMEABLEM UNTERGRUND	96

3.10.1	Microarray-Analyse von DON-behandelten IPEC-J2-Zellen	96
3.10.2	Real-Time-PCR-Analyse ausgewählter Kandidatengene	102
4	DISKUSSION.....	107
4.1	EINFÜHRUNG	107
4.2	DIE <i>IN VITRO</i> -ZELLKULTUR ALS MODELL FÜR DIE EPITHELIALE BARRIERE.....	107
4.2.1	IPEC-1 und -J2 in der konventionellen Zellkultur	107
4.2.2	IPEC-J2 im Membrankultursystem	109
4.3	DIE TOXIZITÄT VON DON IST DOSIS- UND ZEITABHÄNGIG.....	110
4.3.1	Die DON-Konzentrationen und ihre praktische Relevanz.....	110
4.3.2	Effekte von niedrigen DON-Konzentrationen auf IPECs (impermeabler Untergrund).....	111
4.3.3	Die Toxizität niedriger DON-Konzentrationen nimmt über längere Inkubationszeiträume zu ...	113
4.3.4	Effekte von hohen DON-Konzentrationen auf IPECs (impermeabler Untergrund).....	114
4.3.4.1	DON reduziert die zelluläre Viabilität.....	114
4.3.4.2	DON führt zu einem biphasischen Proliferationsverlauf.....	115
4.3.4.3	DON verursacht Apoptose – keine Nekrose.....	117
4.3.4.4	DON zerstört die Tight Junction-Struktur	118
4.3.4.5	Die DON-Derivate DONS und DOM zeigen keine Zytotoxizität	120
4.3.5	Die Zelllinien IPEC-1 und -J2 reagieren unterschiedlich auf DON	121
4.4	DIE DON-TOXIZITÄT IST ABHÄNGIG VON DER EINWIRKUNGSRICHTUNG UND DER PERMEABILITÄT DES WACHSTUMSUNTERGRUNDES.....	122
4.4.1	DON wirkt nur von der basolateralen Zellseite zytotoxisch.....	123
4.4.2	DON zerstört die epitheliale Barriere	126
4.5	DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN IPEC-J2 NACH GERICHTETER DON-EXPOSITION (MICROARRAY-ANALYSE).....	129
4.6	AUSBLICK.....	135
5	ZUSAMMENFASSUNG	136
6	SUMMARY	138
7	LITERATURVERZEICHNIS	140
8	ANHANG	150
	DANKSAGUNG.....	163
	PUBLIKATIONEN	164
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	165

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
ABC	<i>Avidin biotin complex</i>
Abs	Absorption
ALI	<i>Air-liquid interface</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATA	<i>Alimentary toxic aleukia</i>
β -ACT	<i>β-Actin</i>
BrdU	5'-Brom-2'-Desoxyuridin
CDH1	E-Cadherin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CLDN3	Claudin-3
CYC1	Cytochrom c1
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4-,6-Diamin-2-phenylindol
DAVID	<i>Database for annotation, visualisation and integrated discovery</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DOM	De-epoxy-DON
DON	Deoxynivalenol
DONS	DON-Sulfonat
Dtl.	Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Em	Emission
Ex	Extinktion
ERK	<i>extracellular signal regulating kinase</i>
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
EU	Europäische Union
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FBN	Leibniz Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLI	Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Braunschweig
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
GLUT	Glucosetransporter
GP-AFC	Glycin-Phenylalanin-Aminofluorcoumarin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ID	Identifikationsnummer

IL	Interleukin
IPEC	<i>Intestinal porcine epithelial cell line</i>
IST	Insulin-Transferrin-Selen
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LAMP2	Lysosomen-assoziiertes Membran-Glycoprotein 2
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LIG1	DNA-Ligase 1
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NR	Neutralrot
OD	Optische Dichte
CDKN1A (p21)	Cyclin-abhängige-Kinase Inhibitor 1A
PB	<i>Phosphate buffer</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDHA1	Pyruvat-Dehydrogenase A1
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PKR	<i>DsRNA-activating protein kinase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPL10a	Ribosomales Protein 10a
RT	Raumtemperatur
SDHB	Succinat-Dehydrogenase B
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standart error of the mean</i>
SGLT-1	Natrium/Glucose-Cotransporter 1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1 Protein</i>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Ansicht einer Darmepithelzelle.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tight Junctions an der epithelialen Barriere.....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 3: Strukturformel von Deoxynivalenol.....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 4: Schema des Aufbaus von Membrankulturen mit IPECs</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 5: Beispiel eines DNA-Histogrammes mit der Einteilung in Zellzyklusphasen</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 6: Beispiel für die immunzytochemische BrdU-Färbung von IPEC-1- und -J2-Zellen</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen un behandelter IPECs auf impermeablem Untergrund</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 8: Zeitverlauf des TEER-Wertes von IPECs auf permeablem Untergrund.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 9: Morphologie von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 10: Gesamtzellzahl von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 11: Einfluss von DON auf die Gesamtanzahl von IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 12: Neutralrot-Aufnahme von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 13: Stoffwechselaktivität von IPECs nach DON-Gabe auf impermeablem Untergrund.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 14: Proliferation von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 15: Anzahl BrdU-positiver IPECs auf impermeablem Untergrund nach DON-Einwirkung</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 16: Proliferation von IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Gabe auf permeablem Untergrund</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 17: Verteilung von IPECs in den Zellzyklus-Phasen nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 18: Einfluss von gerichtet appliziertem DON auf die IPEC-J2-Zellverteilung in den Zellzyklusphasen auf permeablem Untergrund</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 19: LDH-Aktivität von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 20: LDH-Aktivität nach gerichteter DON-Applikation in IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 21: Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität von IPECs nach DON-Einwirkung auf impermeablem Untergrund</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 22: Caspase-3/7-Aktivierung in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Einwirkung auf permeablem Untergrund</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 23: Expression des Caspase-3-Proteins in IPECs nach DON-Gabe auf impermeablem Untergrund.</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 24: Western Blot der Caspase-3-Proteinexpression in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 25: Messung des TEER-Wertes von IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 26: Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 27: Darstellung der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPEC-J2-Zellen nach 72-stündiger, gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund.....</i>	<i>86</i>

Abbildung 28: Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPECs auf impermeablem Untergrund	88
Abbildung 29: Einfluss von DON auf die Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund.....	89
Abbildung 30: Gesamtanzahl von IPEC-J2-Zellen nach Langzeit-DON-Applikation auf permeablem Untergrund	90
Abbildung 31: Stoffwechselaktivität von IPECs nach Langzeit-DON-Inkubation auf impermeablem Untergrund	91
Abbildung 32: Proliferation von IPECs nach Langzeit-Behandlung mit geringen DON-Konzentrationen auf impermeablem Untergrund (BrdU-ELISA)	92
Abbildung 33: Zeitverlauf des TEER-Wertes von IPEC-J2-Zellen unter gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund	94
Abbildung 34: Anzahl der im Microarray signifikant veränderten Gene, ausgehend von 14794 Transkripten in IPEC-J2 nach gerichteter DON-Behandlung.....	97
Abbildung 35: Angabe der Schnittmenge von gleichsinnig regulierten Genen jeweils zweier DON-Behandlungsgruppen in Venn-Diagrammen.....	99
Abbildung 36: Vergleichende relative Expressionsniveaus der Stoffwechselgene aus Microarrays und qPCR..	103
Abbildung 37: Vergleichende relative Expression der Gene genetischer Informationsverarbeitung aus Microarray und qPCR.....	104
Abbildung 38: Vergleichende relative Expression der Gene zellulärer Prozesse aus Microarray und qPCR....	106
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Effekte von niedrigen DON-Konzentrationen.....	113
Abbildung 40: Schematische Darstellung der Effekte hoher DON-Konzentrationen	120
Abbildung 41: Übersicht der Unterschiede der IPEC-Reaktionen auf DON.....	122
Abbildung 42: Schema der Wirkung hoher DON-Konzentrationen auf IPEC-J2-Membrankulturen	129
Abbildung 43: Proliferation von IPEC-J2-Zellen nach 14-tägiger gerichteter Applikation geringer DON-Konzentrationen auf permeablem Untergrund.....	150
Abbildung 44: Vergleich der Neutralrot-Aufnahme nach DON- und DONS-Behandlung in IPECs.....	151
Abbildung 45: Vergleich der Wirkung von DON, DONS und DOM auf die Stoffwechselaktivität von IPECs	152
Abbildung 46: Proliferation von IPECs nach DON- und DONS-Behandlung (BrdU-ELISA).....	153
Abbildung 47: Expression des Tight Junction-Proteins ZO-1 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund	154
Abbildung 48: Expression des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund (Immunfluoreszenz).....	155
Abbildung 49: Expression des Tight Junction-Proteins Claudin-4 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund (Immunfluoreszenz).....	156
Abbildung 50: Darstellung des Tight Junction-Proteins ZO-1 in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund.....	157
Abbildung 51: Darstellung des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund (Immunfluoreszenz).....	158

<i>Abbildung 52: Darstellung des Tight Junction-Proteins Claudin-4 in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund (Immunfluoreszenz).....</i>	<i>159</i>
<i>Abbildung 53: TEER-Werte vor (0 h) und nach (72 h) gerichteter DON-Inkubation in IPEC-J2</i>	<i>160</i>
<i>Abbildung 54: Vergleich der Expression der Referenzgene GAPDH und β-Aktin in der qPCR.....</i>	<i>161</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1-1: Fusarium-Toxine und ihre Wirkung</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten Zellkulturplattenformate für Versuche auf impermeablem Untergrund</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Membrankultureinsätze für Versuche auf permeablem Untergrund.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 2-3: Allgemeines PCR-Programm.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 2-4: Primer-Sequenzen für die qPCR.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 2-5: Programm für die qPCR.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 2-6: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 2-7: Übersicht der im Western Blot eingesetzten primären Antikörper.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 2-8: Übersicht der für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 2-9: Verwendete Fluoreszenzfilter im Axiovert 200M (Carl Zeiss).....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 3-1: Ergebnisübersicht der untersuchten zellphysiologischen Parameter vergleichend auf impermeablem und permeablem Untergrund*.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabelle 3-2: Übersicht der KEGG-Stoffwechselwege der mit DAVID analysierten Gene der verschiedenen DON-Behandlungsgruppen, die signifikant hoch (+) oder herunter (-) reguliert wurden.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabelle 3-3: Übersicht der ausgewählten Zielgene für die qPCR und zugehörige KEGG-Stoffwechselwege</i>	<i>102</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Vorbetrachtung

Am Anfang des Jahres 2011 gab es in den Medien eine Nahrungsmittel-Rückrufaktion aufgrund von einer Mykotoxinkontamination. Der Hersteller Alnatura rief Spirelli der Charge L.0259 PCM B mit dem Haltbarkeitsdatum 16.09.2013 zurück. Die Teigwaren zeigten Spuren des Schimmelpilztoxins Deoxynivalenol (DON), die über dem zulässigen Grenzwert lagen (<http://www.alnatura.de/de/produkt-rueckruf-spirelli>; Stand: 02.02.2011).

Was bedeutet das für den Verbraucher, der eventuell schon das Nahrungsmittel verzehrt hat? Was sind Mykotoxine und wieso können sie nicht effektiv aus unseren Nahrungsmitteln ausgeschlossen werden? Sind auch Nutz- oder Haustiere davon betroffen? Ihre Futtermittel unterliegen nicht so strengen Kontrollen wie unsere Nahrungsmittel und die Grenzwertbestimmungen sind deutlich weiter gefasst. Nach den jüngsten Futtermittelskandalen bezüglich erhöhten Dioxingehaltes würde es nicht verwundern, weitere Toxine in grenzwertüberschreitenden Mengen in tierischen Futtermitteln zu finden. In der Tat sind in der Vergangenheit, beispielsweise bei einem Hundefutter-Hersteller, erhöhte Mykotoxinkonzentrationen nachgewiesen worden (Stiftung Warentest, Heft 09/2006). Was bedeutet das für die Tiergesundheit und gibt es wie im Fall der Dioxine eine Übertragung über tierische Lebensmittel auf den Menschen? Hier besteht Aufklärungsbedarf. Weiterführende Grundlagenforschung ist notwendig, damit die Häufigkeit von Mykotoxinkontaminationen im tierischen Futter sowie auch in menschlichen Nahrungsmitteln reduziert und die Anzeichen beginnender Erkrankungen schnell erkannt werden können.

In der landwirtschaftlichen Produktion von Nahrungs- und Futtermitteln haben Kontaminationen mit Mykotoxinen, vor allem DON, eine große wirtschaftliche Relevanz. Die Verunreinigung ist schwer vermeidbar, da die Toxinbildung schon auf dem Feld witterungsabhängig stattfindet und damit schlecht kontrollierbar ist. Der Befall mit Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* gilt weltweit als wichtigste Getreidekrankheit überhaupt. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO sind bis zu 25 % der Weltnahrungsmittelproduktion mit Mykotoxinen belastet. In Europa sind ca. 20 % der Getreideernten kontaminiert, was zu beträchtlichen wirtschaftlichen Schäden führt. DON hat dabei die größte praktische Bedeutung, da es das häufigste und in relevanten Konzentrationen auf Getreide vorkommende Mykotoxin ist (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 2001; Hussein and Brasel 2001).

Insbesondere die Gesundheit und damit die Leistungsfähigkeit landwirtschaftlicher Nutztiere werden dadurch beeinträchtigt. Darüber hinaus kann es auch zur Gefährdung des Menschen durch die Aufnahme mykotoxinhaltiger, pflanzlicher Lebensmittel kommen (Pestka and Smolinski 2005), wie am Fall der Nudel-Rückrufaktion zu sehen war.

Nach oraler Aufnahme passieren die Nahrungsbestandteile einschließlich enthaltener Mykotoxine den Magen-Darm-Trakt. Die intestinalen Epithelzellen bilden hierbei die Schleimhautbarriere als definierte Grenze zwischen Darminhalt und Organismus. Von der korrekten Funktion der intestinalen Barriere hängen im Wesentlichen der Abbau und die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen sowie die Abwehr von Schadstoffen und infektiösen Organismen ab.

Im Gegensatz zu weit verbreiteten Nagetiermodellen ist das Hausschwein (*Sus scrofa*) als Modelltier für die Erforschung des Verdauungssystems (z.B. metabolische Funktionen, Transportvorgänge und Resorption von Nahrungsbestandteilen) hervorragend geeignet (Walters et al. 2011). Zwar weist der Gastrointestinaltrakt einige anatomische Unterschiede im Vergleich zum Menschen auf, aber die physiologischen Charakteristika sind bei Mensch und Schwein gleich (Swindle and Smith 1998). Da beide Spezies natürlicherweise eine ähnliche Mischkost aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsbestandteilen (omnivore Diät) zu sich nehmen, erfüllen die Enterozyten weitgehend gleiche Aufgaben.

1.2 Die epitheliale Barriere und Zell-Zell-Kontakte

Die Darmschleimhaut (Mukosa) ist aus einem einschichtigen hochprismatischen Zylinderepithel (*Lamina epithelialis*), einer Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*) und einer glatten Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*) aufgebaut. Als intestinale Barriere repräsentiert das Darmepithel eine sehr wichtige Grenze zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Alle Epithelien, so auch das Darmepithel, sind durch permanent aufrecht erhaltene Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions) und der daraus resultierenden zellulären Polarität charakterisiert. Im Rahmen der Verdauungsfunktion werden niedermolekulare Substanzen selektiv permeabel an der intestinalen Barriere aufgenommen (Aminosäuren, Fettsäuren, Monosaccharide), gleichzeitig werden Makromoleküle und Mikroorganismen am Eindringen in den Organismus gehindert.

Die Vergrößerung der Darmoberfläche wird durch Ausstülpungen (Zotten) und Einstülpungen (Krypten) erreicht, was u.a. die Effektivität der Nährstoffresorption erhöht. Die differenzierten Darmepithelzellen, auch Enterozyten genannt, sind mitotisch inaktiv. Die Zellerneuerung

findet durch Stammzellen in den Krypten statt. Die neu gebildeten Zellen wandern innerhalb von zwei bis drei Tagen zur Zottenspitze und differenzieren sich in dieser Zeit (van der Flier and Clevers 2009). Intestinale Epithelzellen exprimieren mit zunehmender Differenzierung verschiedene Enzyme, die unterschiedliche digestive und absorptive Funktionen haben (Rodriguez-Boulan and Salas 1989). Ausdifferenzierte Enterozyten erfüllen für ca. drei bis fünf Tage ihre Funktion, bevor sie absterben und an der Spitze der Zotte abgestoßen werden. Zellen, die den Zell-Matrix-Kontakt verloren haben, gehen automatisch in den programmierten Zelltot (Apoptose) über, was als Anoikis bezeichnet wird (Frisch and Ruoslahti 1997). Der kontinuierliche Verlust apoptotischer Zellen ins Darmlumen (sogenanntes *shedding*) wird durch Zellerneuerung in den Krypten ausgeglichen (Karam, 1999).

Die schematische Darstellung einer Darmepithelzelle ist in Abb. 1 gezeigt. Der Abbau, die Aufnahme und der Transport von Ionen und Nährstoffen erfolgen hochselektiv und stellen die Hauptaufgaben der intestinalen Epithelzellen dar. Durch den polaren Aufbau der Zellen kann ein apikales und ein basolaterales Kompartiment voneinander unterschieden werden (Rodriguez-Boulan and Powell 1992). Auf der apikalen Seite sind die Enterozyten mit einem Schleim (Mucus) aus Kohlenhydratfilamenten (Glykokalyx) bedeckt. Er dient zum Schutz vor Pathogenen und vor Selbstverdauung durch abgesonderte Verdauungsenzyme. Die apikale Zelloberfläche ist mit dem Bürstensaum (Mikrovilli) versehen, welcher der weiteren Vergrößerung der Kontaktfläche und der hydrolytischen Spaltung von Molekülen dient. Die in die apikale Membran integrierten Bürstensaumenzyme wie Peptidasen, Disaccharidasen, alkalische Phosphatase und ATPasen sowie Transportsysteme (Carrier und Symporter) erlauben einen effektiven und selektiven Nährstoffabbau und -resorption aus dem Darmlumen und die Übergabe in den Blutstrom bzw. die Lymphe (Simons and Fuller 1985). Die Kohlenhydratverdauung findet im Darm beispielsweise durch die Bürstensaumenzyme Maltase, Laktase, Sucrase und die Aufnahme durch den Natrium-Glukose-Symporter (SGLT1) statt. Proteine werden von Proteasen und Peptidasen in Peptide und Aminosäuren aufgespalten und durch den membranständigen Transporter PEPT1 transportiert (Daniel 2004). Ein charakteristisches mit Aktinfasern des Bürstensaumes assoziiertes Strukturprotein ist Villin, welches auch als Enterozyten-Differenzierungsmarker gilt (Hodin et al. 1997). Auf der basolateralen Seite dominieren in der Membran Transporter für Nährstoffe wie Aminosäuren und Monosaccharide. Beispielsweise wird apikal von den Zellen aufgenommene Glukose durch den basolateral membranständigen Natrium-Glukose-Symporter GLUT2 aktiv ins Blut abgegeben. Weiterhin erfolgt von der basolateralen Seite die

Versorgung mit Sauerstoff aus dem Blutstrom für die Zellatmung (Rodriguez-Boulan and Salas 1989; Rodriguez-Boulan and Powell 1992; Swindle and Smith 1998). Weiterhin fungiert das Darmepithel als eine wichtige Barriere zum Schutz vor Pathogenen und Toxinen und nimmt durch Synthese antibakterieller Peptide sowie Produktion von Zytokinen und Chemokinen an der angeborenen Immunantwort teil (Oswald 2006; Pitman and Blumberg 2000).

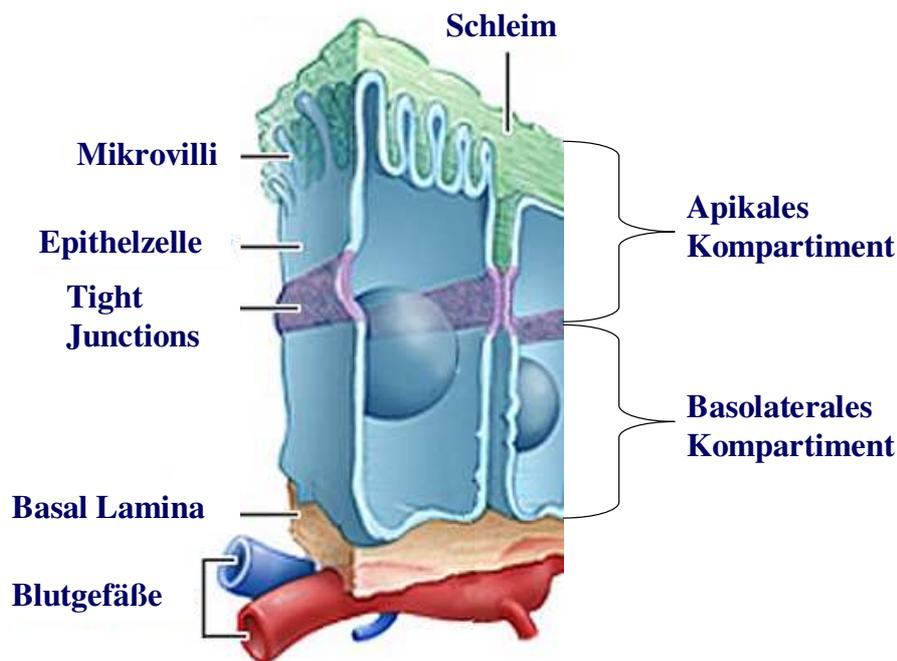


Abbildung 1: Schematische Ansicht einer Darmepithelzelle

(Quelle: <http://www.biologie.uni-erlangen.de/mpp/LEHRE/pages/Sem-1/TightJunction-01.html>, Stand: 2.2.2011)

Von entscheidender Bedeutung für die epitheliale Barrierefunktion sowie für die Enterozytenpolarität sind die interzellulären Verbindungen der Tight- und Adherens-Junctions (Yu and Yang 2009). Ist die Integrität der Verbindungsproteine gestört, verliert der Epithelzellverband über weite Bereiche seine Barrierefunktion und die Permeabilität des Epithels ist erhöht, was zu gastrointestinalen Funktionsstörungen führen kann (Arrieta et al. 2006). Adherens-Junctions (auch *Zonula adhaerens*) sind direkt unterhalb der Tight Junctions liegende Adhäsionsverbindungen, die aus Transmembranproteinen der Familie der Cadherine bestehen. Sie verbinden über Ankerproteine (z.B. Catenine) das Aktin-Zytoskelett zweier Zellen und verstärken damit Zell-Zell-Verbindungen (Geiger et al. 1985; Niessen 2007). Die apikal liegenden Tight Junctions (auch *Zonula occludens*) bestehen aus einem verzweigten Netz von Transmembran- und Stützproteinen, die innerhalb einer sowie zwischen benachbarten Plasmamembranen eng verbunden sind (siehe Schema in Abb. 2). Auf diese Weise begrenzen

Tight Junctions den interzellulären Raum und bilden eine parazelluläre Barriere, welche den Stofftransport über das Epithel selektiv kontrollierbar macht. Dadurch wird die parazelluläre Diffusion von Molekülen und Ionen bis zu einer Größe von ca. 600 Da zwischen den Zellen reguliert. Weiterhin trennen Tight Junctions den apikalen vom basolateralen Membranpool, indem sie den lateralen Austausch von apikalen Membranproteinen auf die basolaterale Seite und umgekehrt verhindern. Es werden zwei Membranbereiche unterschiedlicher Proteinzusammensetzung geschaffen, die entscheidend für die epitheliale Polarität sind (Simons and Fuller 1985). Die wichtigsten integralen Membranproteine der Tight Junctions sind die Familie der Claudine, JAM-1 (*junctional adhesion molecule*) sowie das Occludin (siehe Abb. 2). Unter den über 20 verschiedenen Claudin-Proteinen spielen Claudin-3 und -4 eine besondere Rolle für den interzellulären Zusammenhalt. Die variable Stoffdurchlässigkeit der Diffusionsbarriere ist abhängig von der Zusammensetzung der Claudine. Claudine und Occludin assoziieren mit intrazellulären Stützproteinen, den ZO-Proteinen (ZO-1/2/3 von *Zonula occludens*), die diese korrekt positionieren und die Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett bilden (Harhaj and Antonetti 2004; Niessen 2007; Yu and Yang 2009).

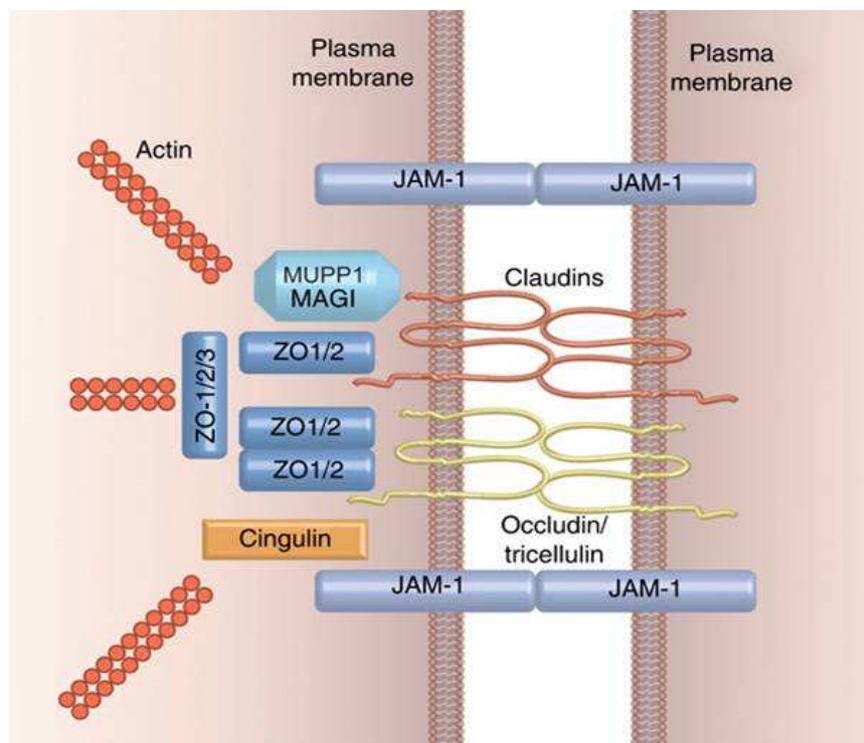


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tight Junctions an der epithelialen Barriere

(Quelle: (Niessen 2007); <http://www.nature.com/jid/journal/v127/n11/images/5700865f2.jpg>, Stand: 14.2.2011)

1.3 Das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON)

Schimmelpilze bilden auf nährstoffreichem Untergrund (z. B. Nutzgetreide) unter für sie günstigen klimatischen Bedingungen teilweise giftige sekundäre Stoffwechselprodukte aus, die als Mykotoxine bezeichnet werden. Diese Toxine werden produziert, um Nahrungskonkurrenten (z.B. Insekten oder Mikroorganismen) fernzuhalten. Durch die Verfütterung und Verarbeitung der befallenen Ernteprodukte gelangen die Toxine in die Nahrungskette und können für Tier und Mensch gesundheitsgefährdend sein (Pestka and Smolinski 2005). Eine durch Mykotoxine hervorgerufene Erkrankung wird als Mykotoxikose bezeichnet. Die teilweise hochtoxischen Mykotoxine sind schwer zerstörbar, da sie resistent gegen Hitze und andere Umwelteinflüsse sowie Bearbeitungsprozesse sind (Wolf and Bullerman 1998). Im Folgenden wird eine Literaturübersicht über das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) gegeben, wobei die Konzentrationen zur Vergleichbarkeit grundsätzlich in ng/ml angegeben werden.

1.3.1 Bedeutung und Vorkommen von DON in der Praxis

Eines der bedeutendsten Mykotoxine ist Deoxynivalenol (DON), welches vorrangig durch die weltweit verbreiteten Phytopathogene *Fusarium graminearum* und *culmorum* gebildet wird (Ueno 1985). Sie gehören taxonomisch zu den Schlauchpilzen (*Ascomyceten*) und bilden neben DON noch eine Reihe von weiteren *Fusarium*-Toxinen, die in Tab. 1-1 aufgelistet sind.

Tabelle 1-1: *Fusarium*-Toxine und ihre Wirkung

Toxinname	Wirkung
A- und B-Trichothecene	
- Deoxynivalenol (DON)	enterotoxisch
- Nivalenol (NIV)	hämorrhagisch
- T-2-Toxin	dermatotoxisch
Zeralenon (ZEA)	Wirkung als Östrogen, Aborte und Infertilität verursachend
Fumonisine	kanzerogen, teratogen
Moniliformin	gastroenteritisch, hämorrhagisch
Fusarin C	mutagen
Fusarinsäure (FA)	nur schwach toxisch

DON wurde 1973 erstmalig isoliert (Yoshizawa and Morooka 1975) und aufgrund seiner erbrechenauslösenden Wirkung bei Schweinen als Vomitoxin beschrieben (Vesonder et al. 1973). DON, auch 12,13-Epoxy-3,4,15-trihydroxy-trichothec-9-en-8-on (siehe Abb. 3) genannt, gehört zu den Trichothecenen, die eine Familie von eng verwandten Mykotoxinen aus verschiedenen Pilzgattungen mit ähnlichen strukturellen Merkmalen darstellen.

Diese Sesquiterpenoide haben eine Doppelbindung an der Position C-9,10, ein 12,13-Epoxidring (verantwortlich für die Ribotoxizität) und eine Anzahl an Hydroxyl- und Acetoxygruppen gemeinsam (Pestka and Smolinski 2005; Rocha et al. 2005; Sudakin 2003). Die häufig in Getreide vorkommenden Trichothecene können abhängig von der funktionellen Gruppe in Verbindungen vom weniger polaren Typ A (z. B. T-2-Toxin, hoch toxisch) und vom stärker polaren Typ B (z. B. Deoxynivalenol und Nivalenol) eingeteilt werden (Ueno 1985). Ein typisches Merkmal der B-Trichothecene ist die Doppelbindung an C-9,10 und eine konjugierte Carbonylgruppe an C-8 (Krska et al. 2001). DON ist chemisch und physikalisch sehr stabil und wird erst bei hohen pH-Werten (ab pH 10) und Temperaturen (ab 170 °C) abgebaut (Wolf and Bullerman 1998).

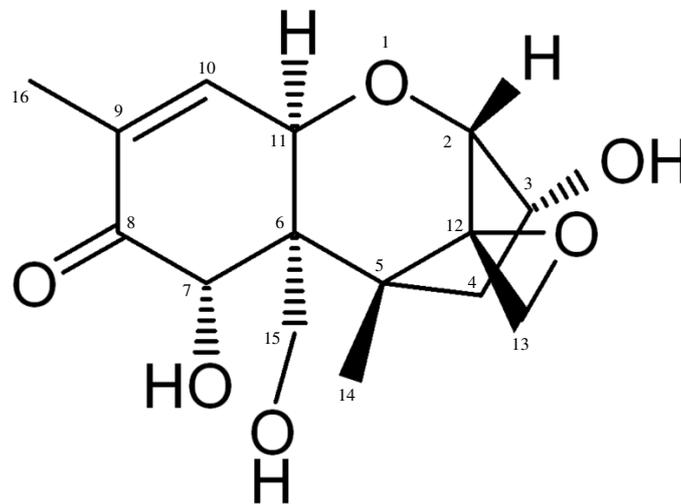


Abbildung 3: Strukturformel von Deoxynivalenol

Physikalisch-chemische Eigenschaften von DON: Summenformel: $C_{15}H_{20}O_6$, Molekulargewicht: 296,6 g/mol, Schmelzpunkt: 151-153 °C, Absorptionsmaximum: 218 nm; löslich in Ethanol, Methanol und Acetonitril

Die DON-produzierenden Fusarien kommen vor allem in den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre vor und bevorzugen als Wachstumsgrundlage Getreidekörner von Weizen, Hafer, Roggen, Gerste und Mais (Larsen et al. 2004; Moss 2003; Sudakin 2003). Häufige Niederschläge und hohe Luftfeuchtigkeit sowie milde Temperaturen während der Getreideblüte begünstigen das Fusarien-Wachstum, sodass der Befall auf dem Feld (Ährenfäulnis) zu massiven landwirtschaftlichen Ertragseinbußen führen kann (Pestka 2007). Im Wesentlichen hängen also die Fusarien- und damit die Mykotoxinbelastung von den klimatischen Bedingungen während der Getreideblüte ab, wodurch es von Jahr zu Jahr zur Bildung sehr unterschiedlicher Toxinmengen kommt. Es wurde gezeigt, dass Getreideprodukte aus konventionellem Landbau stärker mit DON belastet sind als Öko-Produkte (Klinglmayr et al. 2010;

Pussemier et al. 2006; Schneewis et al. 2005). Bereits während des Getreideanbaus können jedoch vorbeugende Maßnahmen getroffen werden, um die Mykotoxinbelastung im Erntegut zu minimieren. So sollte Folgendes vermieden werden: Mais als Vorfrucht sowie Einsatz von Stickstoffdünger und Fungiziden während der Blütezeit. Wohingegen darauf geachtet werden sollte, dass die Bodenbearbeitung mit dem Pflug stattfindet (Untergraben von Pilzsporen) und eine Weizensorte mit geringer Fusarien-Anfälligkeit gewählt wird (Beyer et al. 2006). Eine trockene Lagerung in den Getreidesilos verhindert nach der Ernte eine weitere Toxinbildung auf befallenen Körnern. Durch seine Stabilität übersteht DON die Bearbeitungsprozesse von Getreide weitgehend unbeschadet und kann bei der Lebensmittelherstellung nicht signifikant reduziert werden. Lediglich durch gutes Sieben in müllereitechnischen Prozessen ist es möglich, befallenes Erntegut auszusortieren, da es leichter ist als gesundes. In Backwerk konnte beim Prozess des Backens nur eine minimale Verringerung der Toxinmenge erreicht werden (Ragab et al. 2005; Wolff 2005).

Besonders von den Folgen des Mykotoxins DON betroffen ist die Spezies Hausschwein (*Sus scrofa*), die vor allem getreidereiches Futter zu sich nimmt und gleichzeitig am sensitivsten auf DON reagiert (Pestka 2007). Rinder werden allgemein als unempfindlich gegenüber Mykotoxinen angesehen, da durch mikrobielle Umsetzungen im Vormagensystem eine Entgiftung (siehe S. 20) stattfindet (Pestka 2007). Hühner sind ebenfalls unempfindlicher gegenüber DON als Schweine, wobei die kritischen DON-Konzentrationen im Futter aber durchaus im erhöhten, praxisrelevanten Bereich liegen.

Für das Hausschwein geht die Gefahr des Mykotoxins vor allem von seiner chronischen Toxizität aus, welche sich durch Nahrungsverweigerung und Entzündungen des Magen-Darm-Traktes äußert (Pestka 2007). Eine akute Vergiftung (ab ca. 3 mg DON/kg Futter) hingegen geht mit Erbrechen und Durchfall einher. Die verminderte Wachstumsrate, bedingt durch die beeinträchtigte Futteraufnahme und der damit verbundene wirtschaftliche Schaden, stellt ein ernstzunehmendes landwirtschaftliches Problem dar (Hussein and Brasel 2001; Pestka 2007; Rotter et al. 1996). Zu einer Übertragung (*carry-over*) in Fleischprodukte kommt es jedoch nicht, da hochkontaminiertes Getreide zur Futterverweigerung der Tiere führt und DON im Tierkörper sehr schnell aufgenommen und über den Urin wieder ausgeschieden wird. Für den Menschen besteht ausschließlich ein Risikopotenzial durch den übermäßigen Verzehr kontaminierter Getreideprodukte (Pestka and Smolinski 2005).

Beim Menschen verursacht eine akut toxische Dosis DON in Lebensmitteln (über 3 mg/kg) Übelkeit, Erbrechen und Diarrhöe, eine Nierenschädigung sowie eine Suppression des Immunsystems (Pestka and Smolinski 2005). Die chronische DON-Exposition wird mit dem erhöhten Auftreten von Ösophaguskarzinomen in Zusammenhang gebracht (Pestka and Smolinski 2005). In den Industriestaaten kommen durch DON oder andere Trichothecene ausgelöste Mykotoxikosen allerdings nicht mehr vor, da es strenge Nahrungsmittelkontrollen gibt und keine einseitige Ernährung von Getreideprodukten erfolgt. Das Auftreten von Mykotoxikosen wurde besonders am Ende des 19. und Anfang bis Mitte des 20. Jahrhunderts nach extremen Witterungsbedingungen oder Hungersnöten beschrieben, vor allem in Russland, Asien und Indien. In Russland trat 1913 nach dem Verzehr von überwintertem Getreide ein Krankheitsbild auf, die sogenannte *alimentary toxic aleukia* ATA. Diese Erkrankung ging einher mit Erbrechen, Diarrhöe, Hämorrhagien, Schock und führte sogar bis hin zum Tode (Pestka and Smolinski 2005). Für einen weiteren Ausbruch von ATA in Russland zu Zeiten des Zweiten Weltkrieges wurde allerdings vorrangig das T-2-Toxin verantwortlich gemacht (Mirocha and Pathre 1973). Ein Ausbruch im asiatischen Raum vor kürzerer Zeit erlaubte die Untersuchung des kontaminierten Getreides bei der neben Spuren anderer Trichothecene besonders DON in Konzentrationen von 3 – 93 mg/kg Getreide gemessen wurde (Schoental 1985; Pestka and Smolinski 2005; Bryden 2007; Hussein and Brasel 2001; Richard 2007). Zur Reduzierung der DON-Exposition des Menschen wurden von der europäischen Union Höchstwerte von 750 µg/kg für Getreideerzeugnisse, 500 µg/kg für Brot und Gebäck und 200 µg/kg für Kindernahrung festgelegt (EU-Kommission 2006). Wie allerdings vor kurzem anhand des Nachweises des im Urin ausgeschiedenen, glucuronidierten DON-Metaboliten gezeigt wurde, war bei der Mehrheit Erwachsener Engländer eine erhöhte tägliche DON-Exposition nachzuweisen (Turner et al. 2008). Dieser Urin-Biomarker verdeutlichte die Problematik, dass der von der EU festgelegte, zulässige Grenzwert der täglichen Gesamt-DON-Aufnahme von 1 mg/kg Körpergewicht sogar überschritten wurde (EU-Kommission 2006; Turner et al. 2008). Auch gelangen ab und an Meldungen an die Öffentlichkeit, bei denen eine Kontrolle die Überschreitung des zulässigen Grenzwertes offenbart wie im oben angeführten Fall der kontaminierten Spirelli. Da die Grenzwerte zur Sicherheit unter der krankheitsverursachenden DON-Dosis liegen und damit ein moderater Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel nicht unmittelbar zu einer Mykotoxikose führt, ist jedoch besonders auf Abwechslung bei der Nahrungszusammenstellung zu achten, damit es zu keinem chronischen, gesundheitsschädlichen Effekt durch den Genuß Weizen-haltiger Speisen kommt.

Da mykotoxinbelastetes Getreide ein gesundheitliches Risikopotenzial darstellt und ein Befall durch Schimmelpilze auf dem Feld nicht ausgeschlossen werden kann, wird intensiv an Entgiftungsmaßnahmen von DON geforscht. Detoxifikationsmittel z. B. absorptiv wirkende Substanzen können kontaminiertem Futter beigemischt werden, mit dem Ziel eine Mykotoxikose zu verhindern. Sie sind bislang aber entweder wirkungslos (Tonminerale, Hefezellwandbestandteile mit Enzymen) oder werden nur im Labormaßstab untersucht, da der finanzielle Aufwand noch zu hoch ist. Eine sehr erfolgsversprechende Methode ist die Reduktion der DON-Konzentration durch die feuchte Behandlung mit Natrium-Metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Dadurch wird ein sulfoniertes DON-Derivat (DON-Sulfonat, DONS) gebildet, welches nicht mehr über die toxischen Eigenschaften von DON verfügt (Beyer et al. 2010; Young et al. 1987). Es konnte nachgewiesen werden, dass in kontaminiertem Getreide nach längerer feuchter Lagerung zusammen mit Natrium-Metabisulfit der größte Teil von DON zu DONS umgesetzt wurde (Dänicke et al. 2010). Kürzlich wurde mittels gepulstem Licht auch erstmals ein nicht-thermischer Prozess zum Abbau von DON eingesetzt (Moreau et al. 2011).

Ein natürlich vorkommendes, durch Darmbakterien entgiftetes Stoffwechselprodukt von DON ist de-epoxy-DON (DOM). DOM fehlt die 12,13-Epoxid-Gruppe, die für die Hemmung der Proteinbiosynthese und damit für den zytotoxischen Effekt von DON zuständig ist (Awad et al. 2010; Dänicke et al. 2004a; Rotter et al. 1996). Die mikrobielle Bildung von DOM in den Vormägen von Rindern und ähnlichen Tierarten (Ruminanten) ist der Grund, warum diese weitgehend resistent gegenüber DON sind (Dänicke et al. 2004a). Bei den monogastrischen Schweinen und Menschen ist der mikrobielle Abbau von DON im Magen-Darm-Trakt allerdings vernachlässigbar (Eriksen et al. 2003).

1.3.2 Systemische und epitheliale Wirkung von DON im Schwein

Da Schweine als besonders sensitiv gegenüber dem Mykotoxin gelten und DON-Konzentrationen im Futter hoch genug sind, um sich negativ auf die Tiergesundheit auszuwirken, wurde von der EU für sie ein Grenzwert von höchstens 0,9 mg DON/kg Futter festgelegt (Dänicke et al. 2004b). In geringen Futterkonzentrationen (unter 1 mg/kg) oder chronisch verabreicht, verursacht DON eine verminderte Futteraufnahme und Gewichtszunahme (Wachstumsverzögerung) sowie eine Störung des Immunsystems und damit eine erhöhte Infektanfälligkeit der Tiere (Pestka 2010; Rotter et al. 1994). Hohe DON-Konzentrationen im Futter (bis zu 10 mg/kg) verursachen akut toxische Effekte in Schweinen, die besonders durch Erbrechen und Durchfall gekennzeichnet sind; daher auch der Beiname Vomitoxin (Young et al.

1983). Chronischen, nicht auf den ersten Blick ersichtlichen Mykotoxikosen kommt bei der praktischen Fütterung durch relevante DON-Futterkonzentrationen von 1 – 2 mg/kg größere Bedeutung zu als den akuten Intoxikationen. Die auftretende Nahrungsverweigerung kann als Folge des veränderten Verhältnisses von Dopamin und Serotonin (erhöhte Serotoninausschüttung) im Gehirn angesehen werden (Prelusky 1996). Neben der Wirkung von DON auf das Darmepithel stellen Zellen des Immunsystems (Makrophagen und Lymphozyten) ein weiteres Ziel des Mykotoxins dar. Durch Inhibierung der Lymphozytenproliferation und Hemmung der Makrophagenaktivität wirkt es immunsuppressiv (Pestka 2008; Rocha et al. 2005).

DON gelangt durch orale Aufnahme mit der Nahrung in den porcinen Organismus, kommt im Duodenum in den Kontakt mit der epithelialen Zelloberfläche (primärer Wirkungsort) und wird innerhalb kurzer Zeit resorbiert (Goyarts and Dänicke 2006; Prelusky et al. 1988). Versuche *in vivo* haben eine schnelle und nahezu vollständige systemische Aufnahme von DON gezeigt. Das Mykotoxin erschien schon 15 min nach der oralen Aufnahme im Blutserum und erreichte nach 4,1 h die Höchstkonzentration, die danach wieder abfiel (Dänicke et al. 2004a; Goyarts and Dänicke 2006). Der größte Toxin-Anteil (45–68 %) wird über den Urin ausgeschieden (Prelusky et al. 1988). Als Metabolit konnte das in der Leber gebildete, glucuronidierte DON im Serum und Urin nachgewiesen werden (Eriksen et al. 2003). Da DON nach weniger als zwei Stunden aus dem Magen verschwindet, wird es wahrscheinlich mit der flüssigen Phase und nicht mit dem festen Nahrungsbrei transportiert (Dänicke et al. 2004a). Weiterhin zeigten Untersuchungen der verschiedenen Darmsegmente, dass die DON-Absorption vor allem im oberen Teil des Gastrointestinaltraktes (Magen bis proximales Jejunum) stattfindet. Nach der Passage des Magens und proximalen Jejunums war DON fast vollständig absorbiert (Dänicke et al. 2004a). Daher spielt die im Colon stattfindende mikrobielle De-Epoxydierung (Detoxifizierung) von DON bei Schweinen nur eine untergeordnete Rolle (Dänicke et al. 2004a). Die schnelle Aufnahme des Toxins im oberen Darmtrakt und dessen Transport mit dem Blutstrom führen zu einer DON-Exposition der Enterozyten von der basolateralen Seite (sekundärer Wirkungsort). Das verursachte eine Beeinträchtigung des enterozytischen Zellstoffwechsels und der intestinalen Morphologie der hinteren Darmabschnitte, die zwar von der apikalen Seite mit sehr geringen Konzentrationen des Mykotoxins in Berührung kamen, aber dennoch merklich geschädigt wurden (Dänicke et al. 2004a; Goyarts and Dänicke 2006).

Auch die Aufnahme niedermolekularer Nahrungsbestandteile wird durch DON reduziert, darauf könnte die mangelnde Gewichtszunahme von exponierten Schweinen zurückzuführen sein. In humanen Darmepithelzellen (HT-29-D4) wurde *in vitro* ab DON-Konzentrationen von 3000 ng/ml selektiv der Transport von Glukose und Galaktose behindert (Maresca et al. 2002). DON wirkt auch auf membranständige Monosaccharid- und Aminosäure-Transporter der intestinalen Epithelzellen. Der D-Glucose/D-Galaktose-Natrium-abhängige Transporter SGLT1 sowie der D-Fruktose-Transporter GLUT5 wurden in ihrer Aktivität gehemmt. Andere aktive oder passive Nährstofftransporter wurden dagegen weniger beeinflusst (Goyarts et al. 2006; Dänicke et al. 2006; Awad et al. 2007; Maresca et al. 2002).

In vitro wurde nachgewiesen, dass ein aktiver DON-Transport von der basolateralen zur apikalen Seite der Epithelzellen existiert, der einer einfachen Diffusion von apikal nach basolateral entgegenwirkt (Sergent et al. 2006; Tep et al. 2007; Videmann et al. 2007). Durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands humaner intestinaler Caco-2-Zellen wurde gezeigt, dass höhere DON-Konzentrationen die epitheliale Zellintegrität stören, da die Tight Junctions nicht mehr intakt sind (Sergent et al. 2006). Auf hohe DON-Konzentrationen (3000 ng/ml) reagieren humane (Caco-2) und porcine (IPEC-1) Enterozyten mit Zelltod und dem Verlust der Integrität der epithelialen Barriere (Pinton et al. 2009; Pinton et al. 2010). Zusätzlich wurde eine veränderte Claudin-3- und -4-Expression bei DON-Konzentrationen von bis zu 9000 ng/ml über 48 h beobachtet (Pinton et al. 2009). Morphologische Veränderungen, Zellablösungen, erhöhte LDH-Aktivität und Apoptose wurden von extrem hohen, *in vivo* nicht vorkommenden Konzentration von 30 µg/ml auf die humanen Kolonkarzinomzellen HT-29-D4 verursacht (Maresca et al. 2002). Bis jetzt wurden erst wenige Effekte von geringen DON-Konzentrationen auf Epithelzellen beschrieben, obwohl diese durch die verstärkt auftretende chronische Exposition viel relevanter sind. Bekannt ist, dass DON in humanen Epithelzellen einen Arrest der G2/M-Phase des Zellzyklus in einem Konzentrationsrahmen zwischen 250 und 1000 ng/ml verursacht (Yang et al. 2008), was zur Hemmung der Zellproliferation führt. In geringen Dosen von 150 ng/ml wirkt DON genotoxisch und verursacht DNA-Schäden (Bony et al. 2006). In jejunalen Explantaten von abgesetzten Ferkeln wurden morphologische Veränderungen (reduzierte Villus-Länge bei DON 300 ng/ml), einhergehend mit Enterozyten-Lyse bei DON-Konzentrationen von 1500 ng/ml beobachtet (Kolf-Clauw et al. 2009).

1.3.3 Wirkung von DON auf zellulärer Ebene

Die Effekte von DON auf die Zellphysiologie sind komplex und abhängig von der applizierten DON-Konzentration sowie vom untersuchten Zelltyp. Die meisten toxikologischen Studien zu DON-Effekten wurden an den sehr sensitiv reagierenden Immunzellen durchgeführt, da das Toxin schnell ins Blut aufgenommen wird und mit diesen in Berührung kommt (Dänicke et al. 2004a; Goyarts and Dänicke 2006). In vielen Arbeiten wurde die immunsuppressive Wirkung von DON auf Lymphozyten und Makrophagen erforscht. Beispielsweise bewirkten in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 niedrige DON-Konzentrationen von 250 ng/ml die Phosphorylierung von MAPKs, was schließlich zur Apoptoseinduktion (Aktivierung von Caspase-3 und DNA-Fragmentierung) führte (Zhou et al. 2005). Da aber beim Eintritt in den Magen-Darm-Trakt das intestinale Epithel die erste Barriere für das Toxin darstellt, ist es von entscheidender Bedeutung dessen Reaktion auf das Mykotoxin besser zu verstehen. Erst in jüngerer Zeit sind *in vitro*-Studien an Epithelzellen durchgeführt worden. Im Vergleich zu zellulären Bestandteilen des Immunsystems stellen sich Reaktionen auf DON in Epithelzellen oft erst nach längerer Inkubation und hohen Konzentrationen ein, die *in vivo* meist nicht erreicht werden. Beispielsweise wurde eine verringerte Proteinbiosyntheserate *in vitro* an humanen proximalen tubulären Nierenepithelzellen (RPTEC) mit ca. 3000 ng/ml DON gezeigt (Königs et al. 2007).

Die DON-Toxizität beruht wahrscheinlich auf der Hemmung der Proteinbiosynthese, die auf die Inhibierung der mRNA-Translation auf ribosomaler Ebene zurückzuführen ist (Rotter et al. 1996). Daher sind besonders Gewebe mit hohem Proteinstoffwechsel und erhöhter Zellteilungsrate, wie Dünndarmgewebe, Leber und Zellen des Immunsystems, von DON-Intoxikationen betroffen. Weiterhin behindert DON die Nukleinsäuresynthese und führt zu Genotoxizität wie an humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 gezeigt wurde (Bony et al. 2006). Trichothecene treten schnell durch die Zellmembran (ca. 5 bis 30 min), binden an eukaryotische Ribosomen (60S-UE) und inhibieren die Translation durch Interaktion mit der Peptidyltransferase (Liao et al. 1976; Ueno 1985). Die Trichothecene hemmen den Translationsprozess an unterschiedlichen Stellen. Während T-2-Toxin und Nivalenol die Initiationsphase blockieren, inhibiert DON die Elongationsphase. An murinen Erythroleukemia-Zellen wurde die Bindung von DON an Ribosomen und die Inhibierung der Translation beschrieben (Ehrlich and Daigle 1987). Die Epoxidgruppe von DON ist Voraussetzung für die Bindung an die große 60S-Untereinheit der Ribosomen. Dadurch kommt es zu ribosomalen

Konformationsänderungen und in der Elongationsphase wird die Peptidyltransferase gehemmt (Feinberg and McLaughlin 1989). Infolge der blockierten RNA-Synthese werden in der sogenannten *ribotoxic stress response* (ribotoxische Stressantwort) Signalkaskaden angeschaltet, die über die Induktion von Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen (z.B. für die Apoptose) aktivieren (Laskin et al. 2002). Diese ribotoxische Stressantwort beruht wahrscheinlich auf der Induzierung und Aktivierung intrazellulärer RNasen in deren Folge es zur Degradation der 28S ribosomalen RNA (rRNA) kommt, die ihre Funktionen bei der Aminoacyl-Transfer-RNA-Bindung, der Peptidyltransferase-Aktivität und der ribosomalen Translokation während der Translation nicht mehr ausüben kann (Li and Pestka 2008). Neben dem translations-inhibierenden Effekt von DON werden als zentraler Signaltransduktionsweg der Zelle mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) durch DON aktiviert, die auch eine wichtige Rolle bei der Proteintranslation ausüben (Bae and Pestka 2008; Zhou et al. 2005). Als Folge der DON-Wirkung vermittelt die Doppelstrang-RNA (dsRNA)-aktivierte Proteinkinase (PKR) die Phosphorylierung der MAPKs p38 sowie JNKs (c-Jun N-terminalen Kinasen) und ERKs (extrazelluläre signalregulierte Kinasen) (Shifrin and Anderson 1999; Zhou et al. 2005), die u. a. zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose regulieren (Shi and Gaestel 2002; Shvartsman et al. 2009). Der Ablauf ist folgender: DON bindet erst ans Ribosomen, dann wird p38 ans Ribosom rekrutiert, daraufhin wird p38 phosphoryliert und vermittelt die weitere Signaltransduktion (Bae et al. 2010; Bae and Pestka 2008). Damit übt das Ribosomen als Gerüst eine zentrale Rolle in der *ribotoxic stress response* aus (Bae and Pestka 2008). Die Wirkung von DON ist immunmodulatorisch, da über den MAPK-Weg die gesteigerte Expression von Genen für die Immunantwort (z. B. Induktion von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α), Entzündungsvorgänge (Cyclooxygenase-2, COX-2) und Apoptose aktiviert wird (Moon and Pestka 2003; Pestka 2007). Durch die Induktion des entzündungsfördernden Zytokins IL-8 wird außerdem der NF- κ B-Weg aktiviert (Maresca et al. 2008; Moon et al. 2007). Eine weitere Untersuchung an murinen Makrophagen zeigt, dass die DON-Exposition ER-Stress verursacht, daraufhin das Protein GRP78/Bip (Chaperon im ER) degradiert und die Genexpression des proinflammatorischen IL-6 induziert wird (Shi et al. 2009). Die Untersuchungen zum veränderten mRNA-Muster von epithelialen Zellen nach DON-Einwirkung sind bislang nicht in umfassendem Maße durchgeführt worden. Lediglich eine Microarray-Studie wurde an DON-exponierten humanen Hepatomazellen durchgeführt (Nielsen et al. 2009). Um die epithelialen Reaktionen nach DON-Intoxikation auf molekularer Ebene zu verstehen, ist weiterer Forschungsbedarf notwendig.

1.4 Das intestinale Epithelzellkulturmodell

Zur Analyse zellphysiologischer Mechanismen werden je nach Fragestellung *in vivo* oder *in vitro*-Methoden angewendet. *In vivo* gewonnene Ergebnisse sind zwar am überzeugendsten, jedoch müssen dafür Tierversuche stattfinden, die genehmigungspflichtig und langwierig sowie ethisch fraglich sind. Die *in vitro*-Zellkultivierung weist neben ethischer Vertretbarkeit dank schneller Ergebnisgenerierung, geringer Kosten und hoher Reproduzierbarkeit erhebliche Vorteile gegenüber Tierversuchen auf. Detaillierte Untersuchungen der zellulären Funktion und Stoffwechselfvorgänge *in vitro* setzen allerdings die Existenz eines repräsentativen Zellkulturmodells voraus. Wie andere Epithelzellen auch weisen Enterozyten aufgrund ihrer Verbindung durch Tight Junctions deutliche funktionelle und strukturelle Unterschiede zwischen der apikalen und basolateralen Seite auf (Rodriguez-Boulan and Powell 1992). Die Simulation dieser Polarität ist für die Analyse der Funktion der intestinalen Barriere im Zellkulturmodell daher essenziell. Untersuchungen des intestinalen Epithels *in vitro* wurden bisher in der Literatur meist an humanen tumorösen intestinalen Epithelzelllinien beschrieben wie zum Beispiel Caco-2, HT-29 und Colo25. Viele Studien nutzten das Caco-2-Zellkulturmodell zur Untersuchung der intestinalen Barriere (Pinton et al. 2009; Sambuy et al. 2005). Zwar bilden die Caco-2-Zellen nach langer Kultivierungszeit (21 d) ein überwiegend einschichtiges, polares Epithel, doch ihr tumoröser Ursprung macht sie für die Erforschung der Physiologie des Gastrointestinaltraktes zu einem eher ungeeigneten Zellkultursystem. Tumorzellen sind gekennzeichnet durch eine abnormale Zellproliferation, spontane Differenzierungsvorgänge und eine unvollständige Ausprägung von Enterozytenmarkern. Es wurde beschrieben, dass Zellen tumorösen Ursprungs im Gegensatz zu primären Epithelzellen ein völlig anderes Genexpressionsmuster zeigen beispielsweise in Bezug auf Wachstumsfaktoren, Zellzyklus und Apoptose (Al Moustafa et al. 2002). Als nicht tumoröse, humane Kolon-Epithelzelllinie ist nur NCM460 bekannt, die allerdings nicht vollständig adherente Zellverbände bildet (Moyer et al. 1996). Es existiert eine untransformierte intestinale Epithelzelllinie aus dem Dünndarm der Ratte, IEC6, die aufgrund ihrer Abstammung aus Kryptenzellen in Zellkultur vermehrbar ist (Quaroni et al. 1979). Sie bildet zwar einen adherenten Zellverband aus, aber aufgrund geringerer Tight Junction-Expression erreicht sie keine hundertprozentige Konfluenz und es fehlt die Polarisierung (Quaroni et al. 1979). Als porcines intestinales Zellkulturmodell sind ileale IPI-2I-Epithelzellen beschrieben, die auch nicht-tumorös sind, aber für die Immortalisierung

transfiziert wurden (Kaeffer et al. 1993). Als nicht-tumoröse und untransfizierte porcine Epithelzelllinien sind als etabliertes Zellkulturmodell nur die in dieser Arbeit verwendeten IPEC-1- und J2-Zellen bekannt (Gonzalez-Vallina et al. 1996; Schierack et al. 2006; Berschneider 1989).

Hausschweine gelten als die empfindlichste Spezies gegenüber DON (Pestka 2007) und sind gleichzeitig durch den ähnlichen Aufbau des Magen-Darm-Traktes ein geeignetes Modellsystem für die humane DON-Intoxikation. Die Enterozyten sind besonders exponiert, da das aufgenommene Toxin von der apikalen (Darmlumen) oder basolateralen (vaskulären) Seite auf die Zellen wirken kann (Dänicke et al. 2004a). Daher eignen sich porcine Enterozyten bestens als Kandidaten zur Untersuchung von DON-Effekten an der intestinalen Barriere. Als passendes Zellkulturmodell wurden die polarisierten porcinen intestinalen Epithelzelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 (*intestinal porcine epithelial cell line*) verwendet. Beide Zelllinien (im Folgenden IPECs genannt) wurden aus dem Dünndarm von neugeborenen Ferkeln (12 h alt) des Hausschweins (*Sus scrofa*) isoliert, ohne bekannte genetische Manipulation. IPEC-J2 wurde ausschließlich aus dem Jejunum gewonnen, wohingegen IPEC-1 aus Bereichen des Jejunums und Ileums stammt und damit eine mehr distal gelegene epitheliale Zellfraktion des Darmes darstellt (Berschneider 1989; Gonzalez-Vallina et al. 1996; Schierack et al. 2006). Wie vor kurzem gezeigt wurde, sind IPEC-1- und -J2-Zellen ein vielversprechendes Zellkulturmodell für das Studium der intestinalen Barriere, da sie ihre epitheliale Herkunft beibehalten haben, wie auch die genetische und physiologische Ausstattung sowie die Empfindlichkeit gegenüber toxischen Substanzen (Mariani et al. 2009; Pinton et al. 2009).

Bei den meisten *in vitro*-Modellen zur Analyse der epithelialen Barriere werden die Epithelzellen nur auf dem impermeablen Untergrund der konventionellen Plastik-Zellkulturplatten angezogen und beziehen ausschließlich von der apikalen Seite ihre Nährstoffversorgung. Diese Zellkultivierungsmethode ist gut geeignet für einen ersten Überblick der zellulären Reaktion auf toxische Substanzen wie DON und ermöglicht die Vergleichbarkeit mit der Literatur. Die Bedingungen entsprechen aber nicht der natürlichen Situation der Epithelzellen, da sie von der apikalen und basolateralen Zellseite mit Nährstoffen versorgt werden (Rodriguez-Boulan and Powell 1992; Sambuy et al. 2005). Insbesondere die Sauerstoffversorgung der Zellen findet durch den Blutstrom über die basolaterale Seite statt. Die Anzucht der Epithelzellen auf Zellkultureinsätzen mit porösen Membranen ermöglicht ein Wachstum *in vitro* unter annähernd physiologischen Bedingungen (siehe Abb. 4).

Dank des permeablen Untergrundes wird die zelluläre Polarität gesichert und durch das neu gewonnene basolaterale Flüssigkeitsreservoir wird die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Zellseite ermöglicht (Fey-Lamprecht et al. 2000). Mithilfe dieser Membrankultur kann die epitheliale Barriere sehr gut imitiert werden.

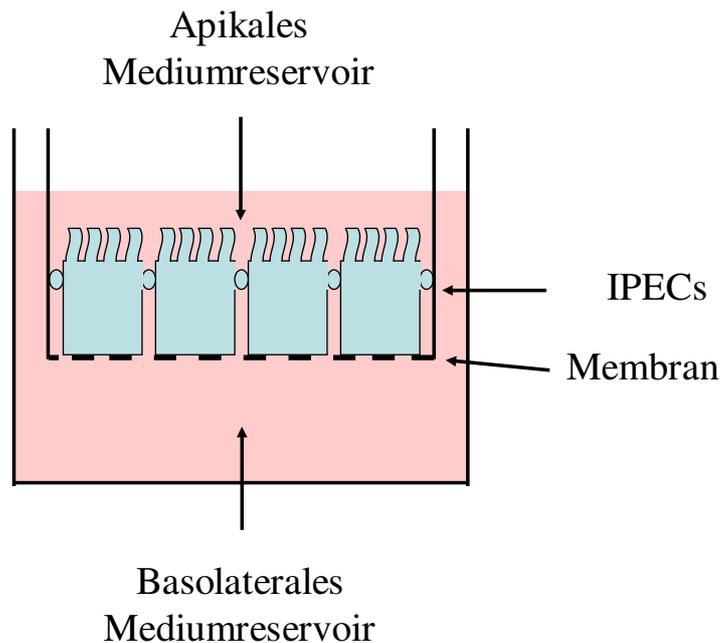


Abbildung 4: Schema des Aufbaus von Membrankulturen mit IPECs

Das apikale (vom Membrankultureinsatz) sowie basolaterale Mediumreservoir (von der Zellkulturplatte) werden durch eine unbeschichtete Membran (1 μm Poren) getrennt, auf der die Zellen wachsen.

1.5 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit sollte sich mit der Wirkung des auf Getreide vorkommenden Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) auf die Physiologie der intestinalen Barriere der sensibelsten Nutztierspezies des Hausschweins *in vitro* beschäftigen.

Die genetisch unveränderten polarisierten porcinen Epithelzelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 sollten als intestinales Zellkulturmodell verwendet und mithilfe von zwei unterschiedlichen Kultivierungsmethoden angezogen werden. Für die Versuche zur Ermittlung der zytotoxischen Eigenschaften des Mykotoxins und zur Vergleichbarkeit mit der Literatur sollten beide Zelllinien mittels konventioneller Zellkulturtechnik auf impermeablem Untergrund kultiviert werden. Weiterführende Analysen zur Zellphysiologie nach DON-Exposition sollten nur mit IPEC-J2 an einem Modell durchgeführt werden, welches die intestinalen Barriere *in vivo* sehr gut nachstellt. Dafür wurden Membrankultureinsätze gewählt, die ein Wachstum der IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund gewährleisten und dadurch eine physiologische Kompartimentierung der Zellen in eine apikale und basolaterale Domäne ermöglichen. Dadurch konnte DON richtungsspezifisch (von apikal oder basolateral) auf die Zellen appliziert werden, da die Enterozyten *in vivo* DON aus Richtung Darmlumen (apikal) sowie aus Richtung Blutstrom (basolateral) ausgesetzt sind. Es sollte zudem untersucht werden, ob sich die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber dem Mykotoxin in Abhängigkeit von der Einwirkungsrichtung (apikal/basolateral) ändert und damit auf der Permeabilität des Wachstumsuntergrundes (Platte/Membran) beruht.

Zwei verschiedene Konzentrationen des Mykotoxins wurden appliziert, da es in der landwirtschaftlichen Praxis entweder zu akuten Reaktionen, verursacht durch hohe Toxin-Dosen oder zu chronischen Erkrankungen, hervorgerufen durch geringe DON-Konzentrationen, kommt. Es sollte untersucht werden, ob die geringen DON-Konzentrationen (200 ng/ml) ein anderes Muster der zellulären Reaktion im intestinalen Epithel verursachen als die hohen Toxin-Konzentrationen (2000 ng/ml).

Weiterhin sollte eine Genexpressionsanalyse durchgeführt werden, um grundlegende Erkenntnisse zum molekularen Wirkmechanismus von DON in Abhängigkeit der richtungsspezifischen (apikalen und basolateralen) Applikation zu gewinnen. Es sollte Klarheit über die Frage geschaffen werden, welche zellulären Stoffwechselwege von DON auf der Ebene der Transkription reguliert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeines

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Herstellern Roth und Sigma-Aldrich aus Deutschland (Dtl.) bezogen. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen diente Reinst-Wasser aus einem Millipore-System (EASYpure RF, Dtl.). Das Autoklavieren der dafür benutzten Flaschen (Jena Glas, Dtl.) erfolgte in einem Dampfsterilisator (Typ 400, Varioklav H&P GmbH, Dtl.). Die verwendeten Reagenzien und Pufferzusammensetzungen werden im jeweiligen Kapitel des Methodenteils beschrieben.

2.2 Zellkultur

Zur Einhaltung der Sterilität erfolgten alle Arbeiten unter einer Sterilbank (*Laminar Flow* von Thermo Electron Corporation, USA). Als Zellkulturmodell des Darmepithels dienten die untransformierten, nicht karzinogenen Epithelzelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 (*intestinal porcine epithelial cell lines*) aus dem Schwein (Berschneider 1989). Kürzlich wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (aus dem Institut für Anatomie, Magdeburg) in die deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aufgenommen und eingehend untersucht (Steube et al. 2011). Dabei wurde der porcine Ursprung nach 22 Jahren der Kultivierung und die Mykoplasmenfreiheit bestätigt (Steube et al. 2011). IPEC-1 (DSMZ-Nr. ACC705) stammt aus einer Mischkultur von Zellen des Ileums und Jejunums (Gonzalez-Vallina et al. 1996), während IPEC-J2 (DSMZ-Nr. ACC701) ausschließlich jejunalen Ursprungs ist (Berschneider 1989; Rhoads et al. 1994; Schierack et al. 2006). Die Kultivierung der Zellen erfolgte – zur Simulation der porcinen Körpertemperatur – bei 39 °C im Inkubator (Nunc, Dtl.) und einer Atmosphäre mit 95 % Humidität und 5 % CO₂.

2.2.1 Kultivierung von IPECs

Als Nährmedium diente ein Gemisch aus *Dulbecco's modified eagle* Medium (DMEM) und Ham's F-12 im Verhältnis von 1:1 (PAN-Biotech, Dtl.), welches mit folgenden Zusätzen zu Vollmedium komplettiert wurde: 5 % fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 1 % Insulin-Transferrin-Selen (ITS), 16 mM HEPES (alle PAN-Biotech) sowie 5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor* EGF; BD Biosciences, Dtl.). Bei serumfreiem Medium wurde der Anteil an FCS durch DMEM entsprechend ersetzt.

Das Auftauen von in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Zellen (ca. 2 bis 4×10^6 Zellen/ml) erfolgte direkt im 39°C warmen Wasserbad mit anschließender Überführung der Zellen in eine Zellkulturplastikflasche (25 cm^2 Kulturfläche; Nunc) mit $7,5\text{ ml}$ des vorgewärmten Vollmediums. Die Zellen wurden 6 h inkubiert und nicht adherente Zellen durch Mediumwechsel entfernt. Die erste Passage fand bei Konfluenz des Zellverbands statt – nach 24 bis 48 h . Zur regelmäßigen Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen-Kontamination diente eine PCR an den Überständen (Venor[®] GeM Mycoplasma Detection Kit, Minerva Biolabs, Dtl.).

Zur Zellkulturerhaltung erfolgte alle 3 bis 4 d eine Zellpassage, maximal aber 20 -mal (IPEC-1: Passagen 103 – 123 ; IPEC-J2: Passagen 78 – 98). Dazu wurden die Zellen in 5 ml warmem PBS (*phosphate buffered saline*, 137 mM Natriumchlorid, $2,7\text{ mM}$ Kaliumchlorid und 12 mM Phosphat, $\text{pH } 7,4$) gewaschen, mit 2 ml Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) für 10 min (IPEC-J2) bzw. 20 min (IPEC-1) bis zur Ablösung inkubiert und anschließend in 3 ml warmem Vollmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt ($300 \times g$, 10 min , Raumtemperatur; RT) fand die Aufnahme der Zellen in 2 ml frischem Vollmedium und die Bestimmung der Zelldichte von $10\ \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer statt. Es wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahl $\times 10^5/\text{ml}$ bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in $7,5\text{ ml}$ Vollmedium mit einer Dichte von $0,6 \times 10^5/\text{ml}$ (IPEC-1) bzw. $0,5 \times 10^5/\text{ml}$ (IPEC-J2) in Zellkultur-Plastikflaschen (25 cm^2 , Nunc). Die Zellen bildeten ca. 4 d nach der Aussaat einen konfluenten Zellverband und wurden ab diesem Zeitpunkt für Experimente genutzt.

Zur Langzeit-Konservierung diente ein in 10 -Vol.-%-DMSO (Roth) und 90 -Vol.-%-FCS (PAN-Biotech) resuspendiertes Pellet von 4×10^6 Zellen. Die Suspension wurde langsam in einer Isopropanol-Einfrierbox (Thermo Fischer Scientific, USA) bei -80°C über Nacht eingefroren und dann zur dauerhaften Lagerung in den Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.2 Herstellung der Deoxynivalenol-Gebrauchslösung

Das DON-Lyophilisat (D0156; Sigma-Aldrich) wurde in absolutem Ethanol ($99,6\%$; Roth) zu einer $0,2\text{ mg/ml}$ Stamm-Lösung aufgelöst und Arbeitsverdünnungen (0 bis 4000 ng/ml) für jedes Experiment in frischem Vollmedium angesetzt, für einen Teil der Versuche auch in serumfreiem Medium. Zur Kontrolle erfolgte stets das Mitführen einer Probe mit der Endkonzentration von 1% Ethanol, die der Ethanol-Konzentration der am häufigsten genut-

zen 2000 ng/ml DON-Verdünnung entspricht, wobei die jeweiligen Ergebnisse nie signifikant von der Kontrolle abwichen (Beispiel siehe Abb. 44 und 45 im Anhang).

Zusätzlich fand in einigen Tests DON-Sulfonat (DONS) sowie de-epoxy-DON (DOM) Verwendung (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Herrn Prof. Dr. Dr. Dänicke, FLI Braunschweig). Die Konzentrationen dieser Substanzen beliefen sich auf 0 – 800 ng/ml sowie 2000 ng/ml. Sie waren gelöst in 0,9%igem NaCl. Daher diente 0,9%iges NaCl als Vergleichskontrolle, diese Ergebnisse wichen nie signifikant von der Mediumkontrolle ab (Beispiel siehe Abb. 44 und 45; im Anhang).

2.2.3 Design der Experimente auf impermeablem Untergrund

Die Aussaat der Zellen erfolgte auf konventionellen Zellkulturplastikplatten unterschiedlicher Größen wie in der folgenden Tabelle 2-1 gezeigt. Die Zellen wurden für 4 d bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert, dann das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die in Voll- bzw. serumfreiem Medium frisch hergestellten DON-Verdünnungen für die Versuche appliziert (0, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000 und 4000 ng/ml; DON gelöst in Ethanol, 1 % Ethanol als Vergleichskontrolle). Die Dauer der Inkubation belief sich immer auf 24, 48 sowie 72 h; lediglich bei Versuchen zur Untersuchung der Apoptose wurden zusätzliche frühere Zeitpunkte analysiert: 6, 8, 12 und 16 h.

Für die Untersuchung von chronischer DON-Belastung der Darmepithelzellen dienten Langzeitversuche über 14 d mit geringen DON-Konzentrationen (0, 100, 200, 300, 400 und 500 ng/ml), appliziert auf konfluente Zellverbände (4 d) in 96-Well-Mikrotiterplatten. Um die Zellen über den langen Zeitraum optimal mit Nährstoffen zu versorgen, wurden die DON-Verdünnungen in Vollmedium alle 3 bis 4 d erneuert.

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten Zellkulturplattenformate für Versuche auf impermeablem Untergrund

Plattenformat	Hersteller	Zellaussaat:		Volumen/ Well	Verwendung für:
		IPEC-1	IPEC-J2		
96-Well-Mikrotiterplatten	Nunc, Dtl.	$0,6 \times 10^5/\text{ml}$	$0,5 \times 10^5/\text{ml}$	100 μl	- Versuche zur Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose
8-Kammer-Objekträger (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System)	Nunc, Dtl.	$0,6 \times 10^5/\text{ml}$	$0,5 \times 10^5/\text{ml}$	500 μl	- Immunfluoreszenz-Färbungen - Hellfeldaufnahmen der Zellmorphologie
6-Well-Zellkulturplatten	TPP, Schweiz	$1,2 \times 10^5/\text{ml}$	$1,0 \times 10^5/\text{ml}$	2 ml	- Isolierung von Proteinen/mRNA - Zellzyklusanalyse im FACS

2.2.4 Design der Experimente auf permeablem Untergrund (Membrankulturen)

Zur Untersuchung des Verhaltens der Zellen unter Bedingungen, die der natürlichen Nährstoffversorgung von Epithelzellen im Darm näherkommen, wurden unbeschichtete Zellkultureinsätze mit einer PET-Membran und einem Porendurchmesser von 1 μm verwendet (Thin-Certs™ der Firma Greiner Bio-one, Dtl.). Auf ihnen ausgesäte Zellen konnten eine typische epitheliale Polarität aufbauen, mit einer oberen, d. h. apikalen (luminalen) und unteren, d. h. basolateralen (vaskulären) Seite. Für diese Versuche kamen ausschließlich IPEC-J2-Zellen zur Verwendung, da sie einer Reinkultur jejunalen Ursprungs entsprechen und charakteristische enterozytische Merkmale wie die Expression des Strukturproteins Villin und der typischen mukosalen Enzyme aufweisen (Nossol et al. 2011; Schierack et al. 2006). Die Zellen wurden immer in das obere (apikale) Kompartiment der Membrankultureinsätze ausgesät. In das untere (basolaterale) Kompartiment wurde die entsprechende Menge an Medium gegeben (siehe Tabelle 2-2). Nach vier Tagen und Konfluenz des Zellverbandes (TEER über 1 $\text{k}\Omega/\text{Well}$, siehe 2.2.5) erfolgte die DON-Applikation. Die größeren 6-Well-Membran-kultureinsätze erreichten den TEER-Schwellenwert erst nach 7 d, weswegen die DON-Exposition erst ab diesem Tag stattfand. Die in Voll- bzw. serumfreiem Medium angesetzten DON-Konzentrationen (0, 200, 500, 2000 oder 4000 ng/ml) wurden entweder in das apikale oder basolaterale Kompartiment gegeben und die anschließende Inkubation erfolgte für 24, 48 und 72 h. Für die Versuche zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde die Inkubationszeit verkürzt (2, 4, 6, 8 h und 24 h). Zur Imitierung von chronischer DON-Belastung des Darmepithels dienten Langzeitversuche über 14 d mit geringen DON-Konzentrationen (0, 100, 200, 300, 400 und 500 ng/ml), appliziert auf konfluente Zellverbände (4 d) in 24-Well-Membrankultureinsätzen, wobei die DON-Verdünnungen alle 3 bis 4 d erneuert wurden.

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Membrankultureinsätze für Versuche auf permeablem Untergrund

Format der Membrankultureinsätze	Fläche:	Zellaussaat IPEC-J2:	Volumen apikal/ basolateral:	Dauer bis Konfluenz:	Verwendung für:
24-Well-Einsätze	0,3 cm^2	$1,0 \times 10^5/\text{ml}$	250 μl / 1 ml	4 d	- Versuche zur Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose
12-Well-Einsätze	1 cm^2	$1,0 \times 10^5/\text{ml}$	1 ml/ 2 ml	4 d	- Immunfluoreszenz-Färbungen - TEER-Messung
6-Well-Einsätze	4,5 cm^2	$2,0 \times 10^5/\text{ml}$	2 ml/ 3 ml	7 d	- Isolierung von Proteinen oder mRNA - Zellzyklusanalyse im FACS

2.2.5 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER, *transepithelial electrical resistance*) stellt die bioelektrische Potenzialdifferenz von Epithelzellen dar. Verantwortlich dafür sind die Beschaffenheit, Anzahl und Anordnung der Tight Junctions. Somit stellt der TEER-Wert ein Maß für die Integrität des Zellverbandes dar. Die TEER-Messung konnte mit dem Messgerät (*Millicell electrical resistance system*; Millipore, Dtl.) direkt an allen Membrankultureinsätzen durchgeführt werden. Dafür wurde die Elektrode vor der Benutzung für 30 min unter UV-Licht (UV-Lampe von Kendro Laboratory Products, Dtl) in 70%igem Ethanol sterilisiert und dann für 15 min in Medium äquilibriert. Zwischen den Messungen wurde die Elektrode jeweils wieder durch eine Reihe von 70%igem Ethanol, Ampuwa-Wasser (Fresenius Kabi GmbH, Dtl.) und Voll- bzw. serumfreiem Medium gereinigt. Der Eigenwiderstand der Membrankultureinsätze betrug ca. 0,11 k Ω /Well. Ein Zellverband wurde ab einem TEER von über 1 k Ω /Well (Schwellenwert) als konfluent betrachtet (Schierack et al. 2006). Ab Konfluenz wurden die Zellkulturen für die Experimente mit DON-Applikation verwendet; gewöhnlich nach 4 d (24- und 12-Well-Einsätze), maximal nach 7 d (6-Well-Einsätze).

2.3 Methoden zur Untersuchung der zellulären Viabilität

Die Messungen der zellulären Viabilität (Lysosomenfunktion durch Neutralrot-Aufnahme, Stoffwechselaktivität im MTT-Test), der Proliferation (BrdU-ELISA) sowie der Zytotoxizität (Nekrose im LDH-Test und Apoptose im Caspase-3/7-Glo[®]-Test) wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Tests wurden jeweils als Triplikate in mindestens drei unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einem Plattenlesegerät (*ELISA reader CM Tecan Sunrise[™]*; Tecan, Schweiz). Nur bei den beiden Zytotoxizitätstests war es möglich, diese von dem 96-Well-Platten-Format auch auf 24-Well-Membrankultureinsätze (vom Durchmesser ähnlich) zu adaptieren. Aufgrund der benötigten erhöhten Zellzahlmenge bei der Durchflusszytometrie wurden dafür die in etwa gleichgroßen 6-Well-Platten bzw. 6-Well-Membrankultureinsätze verwendet.

2.3.1 Untersuchung der Lysosomenfunktion – Neutralrot-Aufnahme

Bei diesem colorimetrischen Test wird die zelluläre Viabilität anhand des Vermögens der Zellen zur Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot (NR) aus dem Medium in die Lysosomen quantifiziert. Hierfür wurden Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten angezogen und mit DON behan-

delt, wobei die DON-Verdünnungen aufgrund der Empfindlichkeit des Tests in serumfreiem Medium hergestellt wurden. Neutralrot (N2889; Sigma-Aldrich) wurde in 100 µl Aliquots (1:40-Verdünnung der 0,33%igen Lösung in serumfreiem Medium) zu den Zellen gegeben, für 3 h inkubiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und entfärbt (1 % Essigsäure, 50 % Ethanol). Die aufgenommene Menge an Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge (OD) von 546 nm (Referenz 650 nm) im Plattenlesegerät gemessen. Sie ist proportional zur zellulären Viabilität.

2.3.2 Untersuchung der Stoffwechselaktivität – MTT-Test

Der colorimetrische MTT-Test dient zur quantitativen Bestimmung der zellulären Stoffwechselaktivität. Er basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, Sigma-Aldrich), welches von lebenden Zellen unter der Beteiligung des zytoplasmatischen Reduktionsäquivalentes NADH (und teilweise auch von mitochondrialem Succinat) zum blau-violetten Farbstoff Formazan reduziert wird (Liu et al. 1997; Mosmann 1983). Die Menge des gebildeten Farbstoffs kann spektrophotometrisch bestimmt werden und entspricht der Glykolyserate der Zellen, daher sind Farbintensität und Zellvitalität proportional. Die Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten angezogen und mit DON behandelt. Für den Test wurden zum jeweiligen Zeitpunkt zu den 100 µl DON-Verdünnung pro Well 10 µl MTT-Lösung (0,5 mg/ml) gegeben und für weitere 3 h inkubiert. Nach der mikroskopisch sichtbaren kristallinen Formazan-Bildung wurde in jedes Well 100 µl Lysispuffer (0,01 N HCl, 10 % SDS) gegeben und die Platte für 3 h im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der OD bei 570 nm (Referenz 650 nm) im Plattenlesegerät.

2.3.3 Zelluläre Proliferationsrate – BrdU-ELISA

Der colorimetrische BrdU-ELISA (Roche, Dtl.) quantifiziert die Proliferationsrate vitaler Zellen, indem der Einbau des Thymidinanalogons 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) in replizierte DNA während der S-Phase des Zellzyklus immunzytochemisch detektiert wird. Hierzu wurden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten angezogen, mit DON behandelt und während der letzten 6 h der Inkubation mit BrdU versetzt. Die BrdU-Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 650 nm) im Plattenlesegerät gemessen.

2.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung des Zellzyklus

Die Analyse der Zellzyklusphasen nach DON-Behandlung erfolgte am Durchflusszytometer (FACS; *fluorescence activated cell sorter*) anhand der Messung des zellulären DNA-Gehaltes. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert in die DNA und ermöglicht damit die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen (einfacher/doppelter Chromosomensatz). Der Zellzyklus beinhaltet neben der Teilungsphase (Mitose-Phase) auch die Interphase, die sich in Präsynthesephase G1 (bzw. auch Ruhephase G0), Synthesephase S und Postsynthesephase G2 unterteilt. Die Phasen G1 bzw. G0 sind durch einfachen Chromosomensatz gekennzeichnet, in der S-Phase wird der Chromosomensatz neu synthetisiert und liegt in der G2-Phase als verdoppelter Chromosomensatz vor. Bei Apoptoseaktivierung durch Caspase-3 werden Nukleasen im Zellkern aktiv, welche die DNA fragmentieren, was als Prä-G1-Population im Histogramm sichtbar ist (Darzynkiewicz et al. 1992). Bei der durchflusszytometrischen Detektion der PI-Fluoreszenz (Ex: 488 nm, Em: 600 nm) entsteht ein DNA-Histogramm (X-Achse: PI-Fluoreszenzintensität, entspricht DNA-Gehalt; Y-Achse: Zellzahl), welches beispielhaft mit den Zellzyklusphasen PräG1, G0/G1, S und G2/M für unbehandelte IPECs in Abb. 5 dargestellt ist. Dieses Raster wurde für alle Messungen verwendet, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Es wurden jeweils 20.000 Ereignisse gezählt, die für die Auswertung im Ergebnisteil in prozentualen Anteilen in den einzelnen Zellzyklusphasen dargestellt wurden.

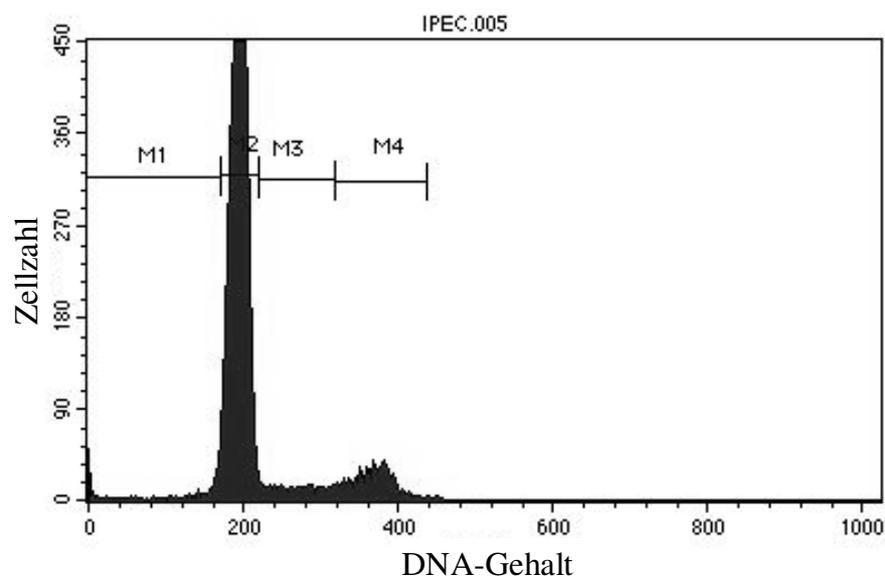


Abbildung 5: Beispiel eines DNA-Histogrammes mit der Einteilung in Zellzyklusphasen

Die FACS-Analyse mit PI-Färbung wurde an 7 d kultivierten, 1 d vor der Messung in serumfreiem Medium synchronisierten IPEC-1-Zellen durchgeführt. M1 = PräG1, gibt apoptotische Zellen mit DNA-Bruchstücken an, M2 = G0/G1-Zellen mit einfachem Chromosomensatz, M3 = S, in der Synthese befindliche Zellen und M4 = G2/M-Zellen mit doppeltem Chromosomensatz, die in die Mitose gehen.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die beiden Zelllinien in 6-Well-Platten oder in 6-Well-Membrankultureinsätzen bis zur Konfluenz angezogen (Platten 4 d, Membranen 7 d) und nach einer 24-stündigen Synchronisation des Zellzyklus mit serumfreiem Medium mit den angegebenen DON-Konzentrationen behandelt. Nach der jeweiligen DON-Exposition (24, 48 und 72 h) wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert und in PBS resuspendiert. Die Fixierung in absolutem Ethanol sowie die Färbung mit PI (0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich) erfolgte nach dem Protokoll von Chen und Donovan (2004) direkt in FACS-Röhrchen (BD Becton Dickinson, Deutschland). Die Messung erfolgte an einem FACS Calibur-Durchflusszytometer (BD Becton Dickinson) mit der zugehörigen CellQuest Pro[®] Software.

2.3.5 Zytotoxizitäts-Test – LDH-Aktivität

Die zytotoxische Wirkung von DON, d. h. der durch DON vermittelte Verlust der zellulären Membranintegrität (Nekrose), wurde anhand der Aktivität des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) in einem colorimetrischen Test untersucht (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}; Roche). LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat, wobei Reduktionsäquivalente zunächst auf NAD und dann durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion auf den im Reagenz enthaltenen Farbstoff übertragen werden. Durch Zugabe eines Stopp-Puffers wird die Reaktion beendet. Das gemessene Signal ist proportional zur Menge an freigesetzter LDH und damit zur Anzahl geschädigter Zellen. Dafür wurden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten oder in 24-Well-Membrankultureinsätzen angezogen und 24, 48, oder 72 h mit DON behandelt. Die DON-Verdünnungen wurden in serumfreiem Medium hergestellt, da das Testsystem sehr empfindlich ist und im Serum enthaltenes LDH die Ergebnisse verfälschen könnte. Die LDH-Aktivität in 100 µl der Zellkulturüberstände (bzw. im apikalen Kompartiment bei Membrankulturen) wurde bei einer optischen Dichte von 492 nm (Referenz 650 nm) im Plattenlesegerät gemessen.

2.3.6 Apoptosenachweis – Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität

Die Aktivität der zellulären Caspasen 3 und 7 wurde mithilfe des sensitiven luminometrischen Caspase-Glo[®]-3/7-Tests (Promega, Dtl.) gemessen. Diese beiden Proteasen gehören zur Gruppe der Effektor-Caspasen und sind essenziell für die Ausführung des programmierten Zelltods (Apoptose). Das im Kit enthaltene luminogene Caspase-3/7-Substrat (Z-DEVD-Amino-luciferin) wird von den Caspasen proteolytisch gespalten, Aminoluciferin freigesetzt und kann somit in der Reaktion mit der enthaltenen thermostabilen Ultra-GlowTM-Luciferase

Licht erzeugen. Das resultierende Lumineszenz-Signal ist direkt proportional zur enzymatischen Caspase-3/7-Aktivität der Probe. Der Test wurde mit DON behandelten Zellen in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten sowie auf 24-Well-Membrankultureinsätzen durchgeführt. Im Falle der Membrankulturen wurden die Membranen nach der DON-Behandlung abgezogen und mit dem Testreagenz in 24-Well-Platten inkubiert. Dann wurden die Überstände der lysierten Zellen in eine weißwandige 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Caspase-3/7-Aktivität im Luminometer (Infinite M 200, Tecan) bei einer Integrationszeit von 500 ms gemessen.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation und Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Die Isolation von RNA aus Epithelzellen erfolgte mit TRIzol[®] (Invitrogen, Dtl.). Die in 6-Well-Platten oder 6-Well-Membrankultureinsätzen angezogenen und behandelten Zellen wurden unter dem Abzug in 500 µl Trizol aufgenommen und bei –80 °C gelagert. Für die RNA-Isolation wurden die Zellen mit einer Spritze und 21G-Kanüle (Omnifix-F1, 1 ml, Braun, Dtl.) homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Unterschichten mit Chloroform (100 µl), mischen und 5-minütigem Inkubieren wurde das Gemisch zentrifugiert (12000 g, 15 min, 4 °C). Danach befand sich die RNA in der wässrigen Phase, die abgenommen und mit 250 µl Isopropanol während einer 10-minütigen Inkubation und Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4 °C) gefällt wurde. Die RNA wurde in 75%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (7500 g, 5 min, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde vollständig getrocknet und in RNase-freiem Wasser (Fermentas, Dtl.) aufgenommen. Die Proben wurden bei –80 °C gelagert. Zur Messung der RNA-Konzentration bei 260 und 280 nm wurde ein Photometer (SmartSpec 3000, BioRad, Dtl.) verwendet.

Die Transkription der isolierten zellulären mRNA (1 µg/µl) in cDNA erfolgte mithilfe der reversen Transkriptase und Hexamer-Primern aus dem Kit *Revert Aid First Strand cDNA Synthese* (Fermentas) nach Herstellerangaben in einem Volumen von 20 µl. Die Reaktion lief in einem ThermalCycler TC1 von Biometra (Dtl.) ab. Danach wurde das Endvolumen mit Ampuwa-Wasser (Fresenius Kabi GmbH) auf 100 µl eingestellt und diese cDNA für PCR-Analysen eingesetzt.

2.4.2 Amplifikation von cDNA durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

2.4.2.1 Allgemeiner PCR-Ansatz zur cDNA-Analyse

Eine qualitative Aussage zur Expression bestimmter mRNAs wurde mithilfe der konventionellen PCR (Polymerase-Kettenreaktion) an entsprechender cDNA gewonnen. Die 25- μ l-PCR-Ansätze enthielten jeweils 12,5 μ l Mastermix (2 x Fast Start PCR Mix, Roche), 2,5 μ l je Primer in einer Konzentration von 2 pmol/ μ l, 2,5 μ l Template-DNA (0,1 μ g cDNA; aus Reverser Transkription, siehe 2.4.1) sowie 5 μ l steriles Wasser. Die eingesetzten Primer wurden mit dem frei zugänglichen Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>; Stand 21.03.2012) abgeleitet und von dem Hersteller MWG-Biotech (Dtl.) synthetisiert. Die Amplifikation erfolgte im Mastercycler von Eppendorf (Dtl.) nach dem in Tab. 2-3 dargestellten Programm.

Tabelle 2-3: Allgemeines PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1) Anfangsdenaturierung	95 °C	5 min
2) Denaturierung *	94 °C	30 s
3) Annealing (je nach optimaler Schmelztemperatur für das jeweilige Primerpaar) *	55 – 60 °C	30 s
4) Elongation *	72 °C	10 s je 100 bp Fragmentlänge, mindestens 30 s
5) Schlusselongation	72 °C	5 min

* Die Schritte 2 bis 4 wurden 34-mal wiederholt (35 Zyklen).

2.4.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Von den PCR-Produkten wurden 10 μ l mit 2 μ l Ladepuffer (24 % Glycerin, 20 % Bromphenolbau) versetzt und in einem 1%igen Agarosegel (Promega, Dtl.) in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0) elektrophoretisch aufgetrennt (100 V, 45 min). Zur Anfärbung der DNA-Banden enthielt das Agarosegel 0,2 μ g/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich). Als Größenmarker (3 μ l) diente der *Mass Ruler™ DNA ladder – low range* (Fermentas). Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht am Auswertungssystem Alpha-Ease® FC Imaging System (Alpha Innotech, Kanada).

2.4.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Zur quantitativen Analyse der mRNA-Expression von potenziellen Kandidatengenen DON-regulierter Schlüsselmechanismen (Tab. 2-4) wurde die Methode der qPCR genutzt. Unter Verwendung der fluoreszierenden Farbstoffe Fluorescein und SYBR® Green wurde nach dem

angegebenen Protokoll des Mastermixes Maxima™ SYBR® Green/Fluorescein (Fermentas) vorgegangen. Fluorescein diente als Referenz zum Nullabgleich aller Proben (interner Standard). SYBR® Green interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Dadurch korreliert die Stärke des Fluoreszenzsignals direkt mit der amplifizierten DNA-Menge. Anhand der während der qPCR produzierten cDNA wurde der Schwellenwert-Zyklus (C_t) ermittelt. Der C_t -Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem das Produktsignal einen festgelegten Schwellenwert übersteigt, d. h. ab diesem Zyklus hebt sich das Probensignal vom Hintergrund ab. Eine Schmelzkurvenbestimmung diente dem Nachweis der Fragmentlängen und damit der Amplifikationsspezifität. Vor der eigentlichen Analyse der Ziel-DNA wurde die Effizienz jedes verwendeten Primerpaares getestet, um die geeignete Temperatur für die qPCR-Reaktion herauszufinden (Tab. 2-4). Anhand der IPEC-J2-Kontroll-cDNA wurden durch serielle Verdünnung (6-stufige Verdünnungsreihe 1000, 200, 40, 8, 1,6, 0,32) Standardkurven für jedes zu untersuchende Primerpaar bestimmt. An deren Steigung wurde die für die qPCR geeignete Temperatur und beste Effizienz jedes Primerpaares ermittelt, die dann für die einzelnen Reaktionen an der Proben-cDNA genutzt wurde (Tab. 2-4).

Als Referenzgene wurde zwei Kandidaten getestet, die oft für qPCR-Analysen verwendet werden, das Glykolyse-Enzym GAPDH und das Zytoskelettprotein β -Aktin. Von beiden Genen wurden qPCR-Tests durchgeführt, um sicher zu gehen, dass das Referenzgen nicht von der DON-Behandlung beeinflusst wird (siehe Anhang Abb. 54). Beide Gene wurden nicht durch die DON-Behandlung reguliert. Es wurde sich für β -Aktin als Referenzgen entschieden. Dieses wurde bei allen qPCR-Analysen mitgeführt, wodurch die Expressionsergebnisse jedes Zielgens auf β -Aktin normiert werden konnten.

Die Auswertung der relativen Expressionsunterschiede zwischen DON-behandelten und un-behandelten Proben, bezogen auf das mitgeführte Referenzgen β -Aktin erfolgte nach der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl 2001). Die cDNA von unbehandelten IPEC-J2-Zellen diente als sogenannter Kalibrator, auf den die DON-behandelten Proben bezogen wurden (Relativer Wert des Zielgen-Expressionslevels als 1 gesetzt). Der so ermittelte RQ-Wert (*relative quantification*) gibt die relativen Expressionsunterschiede einer DON-Behandlungsgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabelle 2-4: Primer-Sequenzen für die qPCR

Zielgen	Genname	Primer <i>sense</i> (5'-3') und <i>anti-sense</i> (5'-3')	Produkt in bp	Tempera- tur in °C	Effizienz in %
PDHA1	Pyruvat-Dehydrogenase (Citrat-Zyklus)	ACCCGATCATGCTTCTCAAG TAGCAAACCTGTGCAGCATCC	117	54,0	96,7
SDHB	Succinat-Dehydrogenase (Ox. Phosphorylierung und Citrat-Zyklus)	ACTGGATGGGCTGTACGAGT GTGCATCATCCAGCGATAGG	127	55,7	96,7
CYC1	Cytochrom <i>c</i> 1 (Oxidative Phospho- rylierung)	CTACCATGTCCCAGGTAGCC AAAGCAAGCCCATCATCATC	117	54,7	96,7
RPL10a	Ribosomales Protein 10a (60-S-Untereinheit des Ribosoms)	TGCCTTTTTGGCTTCAGAAT ACTTTGGCCACCATGTTCTC	120	54,5	99,0
LIG1	DNA-Ligase 1 (DNA-Replikation)	CTTCGCTTCCCCTCGGTTTAT GTGCCTTGCTGGTTCTGAAT	119	54,0	100,2
LAMP2	Lysosomen-assoziiertes Membran- Glykoprotein 2 (Lysosomen)	TTTGTTTCTGAGTGTTTTTCATGT AATCAAACCCAGGCCACAG	120	54,0	96,7
CDKN1A (P21)	Cyclin-abhängige-Kinase Inhibitor 1 (Zellzyklus)	TCATTGCACITTTGAACAGCAG TCCGAAAGACAACAACCTCC	129	54,0	99,3
CLDN3	Claudin-3 (Tight Junction)	GTCCATGGCCTGGAGAT GATCTGCGCTGTGATAATGC	130	58,7	99,5
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	ACCCAGAAGACTGTGGATGG TTGAGCTCAGGGATGACCTT	125	54 – 58,7	96,8 – 100,8
ACTB	β-Aktin (Zytoskelett)	GATGAGATTGGCATGGCTTT CACCTTCACCGTTCCAGTTT	122	54 – 58,7	96,7 – 100,3

Die qPCR-Primer wurden anhand der im Microarray verwendeten porcinen *expressed sequence tags* (EST) mithilfe des frei zugänglichen bioinformatischen Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>; Stand 21.03.2012) abgeleitet und von dem Hersteller MWG-Biotech synthetisiert. Die jeweiligen PCR-Ansätze von 25 µl wurden in Triplikaten durchgeführt, mit 12,5 µl Maxima Mastermix, 0,5 µl UNG (Uracil-DNA-Glycosilase), je 2,5 µl Primer einer Konzentration von 3 pmol/µl, 1 µl mit 60 ng Template-cDNA (aus Reverser Transkription, siehe 2.4.1) sowie 6,5 µl RNase-freiem Wasser. Die Reaktion wurde im Real-Time-PCR-Gerät iCycler von BioRad nach dem in Tabelle 2-5 aufgelisteten Programm durchgeführt.

Tabelle 2-5: Programm für die qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1) Nullabgleich für Fluorescein	95 °C	90 s	× 1
2) Anfangsdenaturierung	95 °C	5 min	× 1
3) Denaturierung	95 °C	30 s	} × 40
4) Annealing/Elongation (je nach optimaler Temperatur X für das Primerpaar, aus Tab.2-4)	X °C	60 s	
5) Schmelzkurve	95 °C	45 s	× 1
	50 °C	30 s	× 1
(jeweils Temperatursteigerung um 0,5 °C)	50 °C+0,5 °C	30 s	× 90

2.4.3 Durchführung und Auswertung der Microarrays

Mithilfe der Microarray-Analyse sollte das Genexpressionsprofil von IPEC-J2-Zellen nach 72-stündiger, gerichteter DON-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle analysiert werden. Diese wurde Dank der Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Klaus Wimmers am FBN in Dummerstorf durchgeführt. Folgende DON-Behandlungsgruppen wurden verwendet: apikale bzw. basolaterale Applikation von 200 und 2000 ng/ml DON über 72 h auf konfluenten Zellverbänden in 6-Well-Membrankultureinsätzen. Das Expressionsprofil der Zellen wurde mithilfe des schweinespezifischen Genchips *GeneChip® Porcine Genome Array* (Affymetrix, USA) analysiert. Dieser Array enthält 24123 Sonden (*Probe Sets*), welche die Transkripte von 20201 *Sus scrofa* Genen repräsentieren. Bei der Annotation des Arrays wurden 82 % der Transkripte 11265 verschiedenen Schweinegenen zugeordnet (Tsai, 2006).

Die Isolation der Gesamt-RNA der IPEC-J2-Zellen erfolgte mithilfe von TRIzol® (siehe 2.4.1). Die Aufreinigung der RNA-Proben erfolgte mit dem RNeasy® Kit (Qiagen, Dtl.), woran sich eine Quantifizierung der RNA-Menge mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab, Dtl.) anschloss. Der Arbeitsablauf der RNA-Weiterbehandlung und Durchführung des Microarrays wurde durch den Forschungsbereich Molekulargenetik des FBN Dummerstorf unter Prof. Dr. Klaus Wimmers vollzogen. Die Fragmentierung und die Markierung der RNA wurden mit dem *GeneChip® Terminal Labeling Kit* (Affymetrix) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Präparation der biotinylierten Antisense-RNA für die Hybridisierung wurden 500 ng der Gesamt-RNA jeder Probe eingestezt. Nach der Hybridisierung, dem Waschen und dem Scannen des Arrays erfolgte die erste Datenanalyse mit der Affymetrix-GCOS-1.3-Software durch den Abgleich auf ein Zielsignal von 500. Daraufhin standen die Rohdaten zur Verfügung, gemeinsam mit einer Zusammenfassung der in der Analyse enthaltenen *Probe Set*-Identifizierungen, Qualitätsmessungen der Hybridisierung, der relati-

ven Expressionswerte und einer qualitativen Bewertung der *Probe Sets* (anwesend, abwesend oder marginal) für jeden einzelnen Array. Die bioinformatische Analyse der Microarray-Daten erfolgte ebenfalls durch das FBN Dummerstorf in drei Schritten: (A) Qualitätskontrolle aller Arrays, (B) Vorprozessierung aller Arrays (Hintergrund-Korrektur, Normalisierung, Zusammenfassung der *Probe Sets*) und (C) Identifizierung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene (Diesing et al. 2012). Die erhaltenen Microarray-Daten wurden in einer öffentlich zugänglichen Datenbank (GEO, *gene expression omnibus*) hinterlegt.

Zur Identifizierung von DON-regulierten Genen, wurden die Werte der mRNA-Transkripte der DON-Behandlungsgruppen auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Wenn das Niveau der Transkripte dieser Gruppen signifikant über dem der unbehandelten Kontrolle lag, wurde von hochregulierten Genen gesprochen, wenn es darunter lag, von herunterregulierten Genen. Die Weiterbearbeitung der erhaltenen signifikant differenziell exprimierten Gene erfolgte mithilfe von DAVID (*database for annotation, visualization and integrated discovery*; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>; Stand 21.03.2012). Dies ist ein frei zugängliches bioinformatisches Programm zur funktionellen Annotation differentiell exprimierter Gene und gibt die biologische Information zusammen mit grafischen Übersichten der biochemischen Stoffwechselwege (KEGG) an (Huang et al. 2009; Dennis et al. 2003). KEGG (*kyoto encyclopedia of genes and genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>; Stand 21.03.2012) stellt ebenfalls eine frei zugängliche Datenbank dar, die Informationen über Strukturen von Stoffwechselwegen und der funktionalen Hierarchie biologischer Systeme enthält. DAVID wurde zur systematischen Analyse der humanen Affymetrix-Codes (IDs) der signifikant hoch- und herunterregulierten Gene genutzt, um diese in KEGG-Stoffwechselwegen einzuordnen.

2.5 Proteinbiochemische Methoden (Western Blot)

Zur Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Proteine des zellulären Gesamtprotein-gemisches wurden mithilfe spezifischer Antikörper Immunoblots (Western Blots) durchgeführt. Die beiden Zelllinien wurden in 6-Well-Platten bzw. IPEC-J2 in 6-Well-Membrankultureinsätzen bis zur Konfluenz angezogen und für 24, 48 und 72 h mit DON behandelt. Für die Untersuchung der zellulären Apoptose anhand der Caspase-3-Expression (DON-Applikation auch für 2, 4, 6, 8, 12, oder 16 h) wurde die Positivkontrolle Staurosporin (1 μ M, appliziert für 6 h) eingesetzt, da diese Substanz DNA-Fragmentierung verursacht (Bertrand et al. 1994). Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Gesamtzellproteine wie folgt gewonnen: In jedes Well wurden 350 μ l SDS-Ladepuffer (1 M Tris pH 6,8; 1 % Glyce-

rol, 10 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, frisch versetzt mit 0,05 % β -Mercaptoethanol) gegeben, die Platte für 10 min auf Eis geschwenkt und anschließend die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und zusammen mit dem vorgefärbten Molekularmassenmarker (*Page RulerTM prestained protein ladder* (15-170 kDa) SM1811, Fermentas) mittels einer Glasspritze auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. In Tab. 2-6 ist die Gel-Zusammensetzung dargestellt. Das Proteingemisch wurde in der Gelelektrophorese erst bei 80 V 5 min gesammelt und dann bei 160 V für 60 min nach Molekularmassen aufgetrennt (Elektrophorese-Kammer Mini ProteanTM und Spannungsgerät von Biorad).

Tabelle 2-6: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

Reagenzien	Sammelgel	Trenngel (10 %)
Acrylamidlösung (Rotiphorese 29:1; Roth)	0,79 ml	4 ml
1,5 M Tris/HCl (Sigma-Aldrich)	0,93 ml; pH 6,8	3 ml, pH 8,8
destilliertes Wasser	3,48 ml	4,75 ml
10 % SDS (Roth)	50 μ l	120 μ l
TEMED (Roth)	5 μ l	6 μ l
10 % APS (Fluka)	50 μ l	120 μ l

Danach erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf eine 0,45- μ m-Nitrocellulosemembran (Whatman, Dtl.) mittels Semi-Dry-Blot (Halbtrockenzelle von BioRad). Der Reihenfolge nach wurden Filterpapier (*Extra Thick Blot Paper*, BioRad), Membran, Gel und wieder Filterpapier in Transferpuffer (48 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 Vol.-% Methanol) equilibriert, übereinander gelegt und die Proteine bei 15 V für 70 min transferiert. Die auf der Membran fixierten Proteine wurden mithilfe des BM Chemiluminescence Western Blotting Kit *mouse/rabbit* (Roche) nach Herstellerangaben detektiert. Nach der Absättigung der Membran mit Blocking-Lösung (im Kit enthalten) für 1 h bei RT erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen primären Antikörper über Nacht bei 4 °C (Tab. 2–7). Die Waschschritte wurden dreimal mit 0,1 % TBS-Tween (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl) durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit dem im Kit enthaltenen sekundären Antikörper für 2 h bei RT. Nach der ersten Entwicklung wurde der Blot gestrippt. Die gebundenen Antikörper wurden bei 50 °C für 30 min in Stripping-Puffer (7,58 g Tris, 20 g SDS, 7 ml β -Mercaptoethanol, pH 6,8) entfernt, der Blot gewaschen und zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge mit Anti-GAPDH und dem zugehörigen sekundären Antikörper beladen. Zur Visualisierung wurde das Alpha-Ease[®] FC Imaging System (Alpha Innotech) verwendet.

Tabelle 2-7: Übersicht der im Western Blot eingesetzten primären Antikörper

Antikörper	Spezifikation	Hersteller	Verdünnung	Molekulare Masse in kDa
Anti-ZO-1	Kaninchen IgG, polyklonal	Zymed, USA	1:500	225
Anti-Claudin-3	Kaninchen IgG, polyklonal	Invitrogen, Dtl.	1:1000	22
Anti-Claudin-4	Maus IgG1, monoklonal	Invitrogen, Dtl.	1:1000	22
Anti-Caspase-3	Kaninchen IgG, polyklonal	Cell Signaling, USA	1:1000	35 (Pro Caspase-3) 17 (gespaltene Caspase-3)
Anti-GAPDH	Maus IgG1, monoklonal	Cell Signaling, USA	1:2000	37

2.6 Mikroskopische Methoden

2.6.1 Phasenkontrastaufnahmen unfixierter IPECs

Die IPEC-1- und -J2-Zellen wurden in 8-Kammer-Objektträgern (Lap-TekTM, Nunc) bis zur Konfluenz (4 d) angezogen. Dann erfolgte die DON-Applikation (siehe 2.2.3) und der Objektträger wurde nach 24, 48 und 72 h direkt mikroskopiert, dann bis zu 72 h weiterinkubiert. Die Aufnahmen mit Phasenkontrast erfolgten an einem Axiovert-200 M-Fluoreszenzmikroskop von Carl Zeiss (Dtl.) mit dazugehöriger AxioVision-Software und Kamera AxioCam MRm.

2.6.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Zellen wurden in 8-Kammer-Objektträgern (Lap-TekTM, Nunc) oder Membrankultureinsätzen bis zur Konfluenz (4 d) angezogen. Nach der jeweiligen DON-Exposition wurden die Zellen fixiert: 30 min in absolutem Ethanol (Roth) bei 4 °C, anschließend für 90 s in vorgekühltem Aceton (-20 °C, Roth) bei RT. Die Waschschrte wurden jeweils dreimal für 5 min in 0,1 M PB durchgeführt. Auch die Verdünnung der Lösungen erfolgte in 0,1 M PB. Dann wurden die Zellen mit 1 % Ziegen Serum (normal goat serum, NGS; Axxora, Dtl.) blockiert. Die verwendeten primären und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper sind in Tab. 2–8 dargestellt. Die angegebenen Verdünnungen wurden in Antikörper-Verdünnungspuffer (1 % BSA, 0,1 % Natrium-Azid, 0,9 % NaCl) angesetzt.

Tabelle 2-8: Übersicht der für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezifikation	Hersteller	Verdünnung
Anti-ZO-1	Kaninchen IgG, polyklonal	Zymed	1:100
Anti-Claudin-3	Kaninchen IgG, polyklonal	Invitrogen	1:100
Anti-Claudin-4	Maus IgG1, monoklonal	Invitrogen	1:100
Anti-Caspase-3	Kaninchen IgG, polyklonal	Cell Signaling	1:100
Anti-Kaninchen IgG Alexa 488	Esel IgG, polyklonal	Invitrogen	1:200
Anti-Maus IgG1 Texas Red	Ziege IgG, polyklonal	Biozol	1:100

Die Zellkerne wurden mit einer 1:10-Verdünnung von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Partec) 5 min gegengefärbt. Zur Erhaltung der Fluoreszenz wurden die Zellen mit Eindeckmedium – bestehend aus Vectashield (Vector Laboratories, USA) und Glycerol (Sigma-Aldrich) zu gleichen Teilen sowie 2 % DABCO (Sigma-Aldrich) – eingedeckt und die Deckgläschen am nächsten Tag mit Nagellack am Objektträger befestigt. Die Membranen wurden zur Mikroskopie der apikalen wie auch der basolateralen Seite zwischen zwei Deckgläsern eingedeckt. Die visuellen Auswertungen sowie die Zellzählung erfolgten an einem inversen Axiovert-200 M-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) mit der dazugehörigen Axiovision-Software und Kamera (AxioCam MRm); die Filter sind in Tab. 2–9 dargestellt.

Tabelle 2-9: Verwendete Fluoreszenzfilter im Axiovert 200M (Carl Zeiss)

Farbstoff	Anregung in nm	Emission in nm
DAPI	359 – 371	397
Alexa 488	450 – 490	515 – 565
Texas Red	540 – 522	690

2.6.3 Immunzytochemischer Nachweis von BrdU und Hämatoxilin-Gegenfärbung

Zur immunzytochemischen Detektion der Proliferationsrate wurde, wie im ELISA, der BrdU-Einbau während der letzten 6 h der Inkubation genutzt. Die Zellanzucht erfolgte in 8-Kammer-Objektträgern oder 24-Well-Membrankultureinsätzen. Nach der jeweiligen DON- und BrdU-Exposition wurden die Zellen fixiert: 30 min in absolutem Ethanol bei 4 °C, anschließend für 90 s in Aceton bei RT. Die nach jedem Schritt zwischengeschalteten Waschschriffe wurden jeweils ein- bis dreimal in 0,05 % TBS/Tween (10 % TBS, pH 7,6; 0,05 % Tween) durchgeführt. Die Verdünnung der Lösungen erfolgte in 0,05 % TBS/Tween; die Antikörper wurden in Antikörper-Verdünnungspuffer angesetzt. Die Blockierung erfolgte in 1 % NGS für 15 min. Im nächsten Schritt erfolgte die Denaturierung der zellulären DNA, um sie für den Anti-BrdU-Antikörper zugänglich zu machen. Die DNA der auf Objektträgern gewachsenen Zellen wurde in Küvetten mit Formamid in einem 70 °C warmen Wasserbad denaturiert. Die Schritte umfassten 30 s in Formamid mit 0,5 % von 1 M NaOH, ein Spülschritt in TBS/Tween und 15 min in Formamid mit 0,5 % von 0,15 M Trinatriumcitrat. Die Membranen mit darauf gewachsenen Zellen wurden mit einer Pinzette von den Einsätzen abgelöst, in die jeweiligen Kavitäten der Kulturplatten zurückgelegt und die zelluläre DNA mit 2 M HCl bei 37 °C für 30 min denaturiert, anschließend in 0,1 M Natriumborat (pH 8,5) zweimal für 5 min neutralisiert. Im Falle der Membrankulturen konnte die Denaturierung nicht wie bei den Objektträgern in Formamid erfolgen, da sich die Membran darin auflöst. Daher wurde hierfür HCl und Borat verwendet. Die folgenden Schritte liefen wieder gleich ab für Objektträger und Membranen. Nach 30 min bei 4 °C in 0,05 % TBS/Tween wurde mit dem primären Anti-BrdU-Antikörper (monoklonal, aus der Maus, Verdünnung 1:100; BD Pharmingen) sowie mit dem sekundären, biotinylierten Anti-Maus-IgG1-Antikörper (aus der Ziege, Verdünnung 1:50; Southern Biotech) für 30 min bei RT inkubiert. Zur Signalverstärkung erfolgte die Bindung von Biotin an den AB-Komplex (*avidin biotin complex*, ABC), der aus Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase besteht. Dieses ABC-Reagenz (ABC-Kit Elite, Vector Laboratories) verblieb für 60 min bei RT im Ansatz. Als Substrat der Peroxidase (Nachweisreaktion von gebundenem BrdU) wurde Diaminobenzidin-Lösung zugegeben (DAB, 0,05 mg/ml, frisch versetzt mit 0,015 % H₂O₂). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämatoxilin (Merck, Dtl.) genutzt, welches für 1 bis 2 min einwirkte und mit Wasser zum Bläuen ab gespült wurde. Die Objektträger und die

zwischen Deckgläschen gelegten Membranen wurden mit Vectashield und Nagellack versiegelt. Die Aufnahmen erfolgten mit 20-facher Vergrößerung an einem Axioplan-2-Mikroskop (Carl Zeiss) mit Farbkamera (Spot RT Digitalkamera inklusive Spot-Advanced-Software; Diagnostic Instruments). Die braunen, immungefärbten BrdU-positiven und blauen, gegengefärbten BrdU-negativen Zellkerne wurden mithilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ (NIH) ausgezählt (siehe Beispiel in Abb. 6).

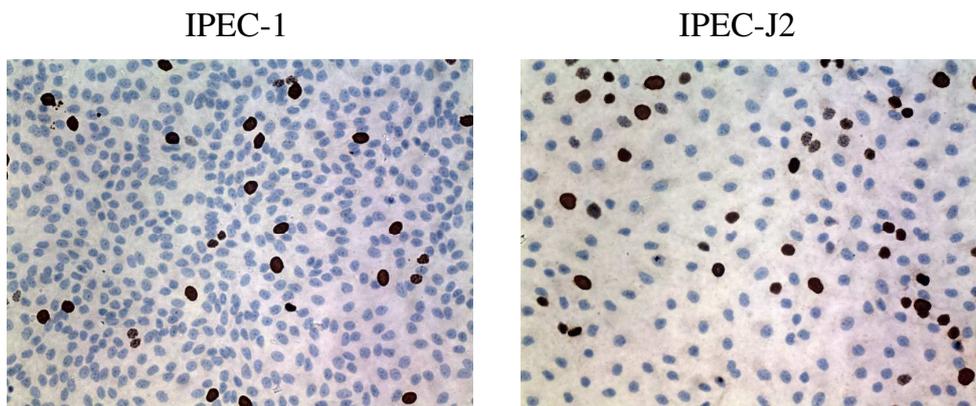


Abbildung 6: Beispiel für die immunzytochemische BrdU-Färbung von IPEC-1- und -J2-Zellen

Die 5 d auf 8-Kammer-Objektträgern gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen (unbehandelte Kontrollzellen) wurden 6 h vor Versuchsende mit BrdU beladen. Die BrdU-Färbung erfolgte immunzytochemisch, nicht proliferierende Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. BrdU-positive Zellkerne sind braun, BrdU-negative Zellkerne blau gefärbt. 20-fache Vergrößerung

2.6.4 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie erfolgte die Aussaat mit $1,2 \times 10^5$ /ml (IPEC-1) bzw. $1,0 \times 10^5$ /ml (IPEC-J2) Zellen in speziell dafür vorgesehenen Lumox[®]-Schalen (Sarstedt, Dtl.) mit einem Durchmesser von 50 mm und einem 25 μ m dicken Folienboden. Die Zellen wurden für 2, 4, 7 und 10 d angezogen. Dann wurden sie mit einem Gemisch aus 0,5 % Paraformaldehyd (PFA) und 0,5 % Glutaraldehyd (in 0,1 M PB, pH 7,4) über Nacht bei 4 °C fixiert, mit 0,1 M PB gewaschen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das weitere Protokoll entsprach der normalen Aufarbeitung von Proben für die Elektronenmikroskopie, was freundlicherweise von Frau Dr. Heidrun Faber-Zuschratter durchgeführt wurde: Fixierung für 1 h in Osmiumtetroxid (1 % in 0,1 M PB, Science Service, Dtl.), Waschen in 0,1 M PB, Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 – 99 Vol.-%) sowie Behandlung für 1 h mit 1%iger Uranylacetatlösung (in 70%igem Ethanol). Dann wurden die Zellen auf den Lumox[®]-Membranen mit Durcupan (Epon-Araldit-Gemisch; Fluka, Schweiz) zwischen zwei Folien flach eingebettet und für 2 – 3 d bei 70 °C im Ofen auspolymerisiert.

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden Teile ausgestanzt und vertikal auf Leerblöckchen aufgeklebt. An einem Ultracut S Ultramikrotom (Reichert-Jung, Dtl.) wurden Semidünnschnitte (0,5 – 2 μm) angefertigt und mit Toluidinbal gefärbt. Im Folgenden wurden Ultradünnschnitte (50 – 80 nm) hergestellt, auf mit Formvar beschichteten Grids gesammelt und mit Uranylacetat (2%ig) und Citrat (0,1%ig) nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte an einem LEO 906 E Elektronenmikroskop von Carl Zeiss mit einer digitalen BioScan-Kamera von Gatan (Dtl.).

2.7 Statistische Methoden

Alle Daten wurden mittels ANOVA analysiert und die p-Werte (Signifikanzen) mit einem Post Hoc-Test nach Dunnett mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 17.0, berechnet. Die Mittelwerte (\pm *standard error of the mean*; SEM) repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche (96-Well-Mikrotiterplatten: Triplikate, sonstige Plattenformate und Membrankultureinsätze: Einzelansätze), die an verschiedenen Zellpassagen wiederholt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen DON-behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle sind wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Die statistische Analyse des Microarrays wurde freundlicherweise durch den Forschungsbereich Molekulargenetik des FBN Dummerstorf unter Prof. Dr. Klaus Wimmers durchgeführt (Diesing et al. 2012).

3 ERGEBNISSE

3.1 Überblick

Im Folgenden wird die Wirkung des Mykotoxins DON auf die Enterozyten des Schweins *in vitro* beschrieben. Zur Ermittlung von Wachstum, Lebensfähigkeit (Viabilität), Proliferation, Stoffwechselaktivität und Apoptose der Enterozyten in Abhängigkeit von ansteigenden DON-Konzentrationen wurden verschiedene colorimetrische, lumineszente, proteinbiochemische und immunzytochemische Tests durchgeführt. Die Reaktionen wurden an konventionell angezüchteten, auf impermeablen Untergrund (Plastik-Zellkulturplatten) gewachsenen Zellen der beiden porcinen intestinalen Epithelzelllinien IPEC-1 und -J2 (im Folgenden IPECs) untersucht. Das Mykotoxin konnte dabei ausschließlich apikal auf die Zellen in jedes Well gegeben werden. Zur genaueren Analyse der DON-Wirkung auf die intestinale Barriere wurden Versuche auf permeablem Untergrund (Membranzellkultureinsätze) durchgeführt, wobei aus versuchstechnischen Gründen eine Beschränkung auf die rein jejunale Epithelzelllinie IPEC-J2 erfolgte. IPEC-J2 weist Enterozyten-typischere Eigenschaften als IPEC-1 auf wie z. B. die Produktion des Differenzierungsmakers Villin (Nossol et al. 2011). Daher wurde diese Zelllinie als Modell für die epitheliale Barriere gewählt. Die Verwendung von Membranzellkultureinsätzen gewährleistete die Ausdifferenzierung der apikalen und basolateralen Domäne der polarisierten IPEC-J2-Epithelzellen. Damit wurde auch die Methode der DON-Applikation verbessert, da das Mykotoxin von apikal (luminale Seite) oder basolateral (vaskuläre Seite) auf die Zellen einwirken konnte. Der Unterschied im Verhalten der polarisierten Zellkultur auf apikale bzw. basolaterale DON-Gabe konnte somit untersucht werden. Der Konzentrationsrahmen des Toxins beinhaltete niedrige DON-Konzentrationen wie sie meistens in der landwirtschaftlichen Praxis vorkommen als auch hohe Konzentrationen, um eine akute Toxin-Reaktion auszulösen. Die zellulären Reaktionen wurden stets über einen Zeitverlauf von 24, 48 bis hin zu 72 h betrachtet. Bei bestimmten Fragestellungen (zelluläre Apoptose) wurden auch frühere Zeitpunkte einbezogen. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die DON-Derivate DON-Sulfonat (DONS) und de-epoxy-DON (DOM) im Gegensatz zu DON keine toxikologischen Reaktionen *in vivo* verursachen (Dänicke et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob dies für die Zellkultur von IPEC-1 und -J2 *in vitro* bestätigt werden kann. Dabei wurde in verschiedenen Tests die Wirkung von DON und seinen Derivaten auf die Zellviabilität verglichen. DONS

stellt ein inaktives, sulfoniertes DON-Derivat dar und DOM ein DON-Metabolit ohne Epoxid-Gruppe, die für die zytotoxischen Effekte verantwortlich ist. Da nur sehr wenig DOM zur Verfügung stand, konnte mit dieser Substanz lediglich der metabolische MTT-Test durchgeführt werden. Vor Beginn der DON-Experimente wurden die korrekte Polarisierung der Zellen und die Integrität des Zellverbandes für beide Zellkulturmodelle nachgewiesen.

3.2 Polarität und Integrität von unbehandelten IPEC-Zellverbänden *in vitro*

Die natürlichen Bedingungen, bei denen das in der Nahrung enthaltene Mykotoxin auf die Darmbarriere trifft, sollten bei den durchzuführenden Versuchen *in vitro* so genau wie möglich nachgestellt werden. Daher war es von großer Bedeutung, dass die polarisierte epitheliale Zellkultur aus einem konfluenten Zellverband mit komplett ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten besteht. Ausdifferenzierte Epithelzellen leben *in vivo* ca. drei Tage. Deshalb sollten die Versuche *in vitro* mit DON-Applikation innerhalb von 72 Stunden nach Ausdifferenzierung der Epithelzellkultur stattfinden. Als Zeichen der Differenzierung galt die Existenz von apikalen Mikrovilli-Strukturen sowie von Tight Junctions, welche gleichzeitig für die zelluläre Polarität verantwortlich sind.

3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung von IPEC-Zellverbänden auf impermeablem Untergrund

Konventionell auf impermeablem Untergrund kultivierte IPECs formen nach zwei bis vier Tagen homogene Zellverbände. Die Konfluenz dieser Zellverbände auf Zellkulturplatten wurde mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen (siehe 2.6.4) verschiedener Altersstadien (zwei, vier, sieben und zehn Tage) der IPECs verifiziert (Abb. 7). Deutlich sind bei allen untersuchten Zeitpunkten und in beiden Zelllinien die Tight Junction-Strukturen zwischen aneinandergrenzenden Zellen zu erkennen, wobei die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auf den Zellkulturplatten schon nach zwei Tagen nachweisbar war. Zusätzlich waren enterozytenspezifische Mikrovilli-Strukturen der apikalen Membran nur in IPEC-J2-Zellen vermehrt zu finden. IPEC-1-Zellen bildeten unabhängig vom Alter nur vereinzelt Mikrovilli aus. Da alle Marker der Epitheldifferenzierung spätestens am Tag vier ausgebildet waren, wurde an diesem Tag mit den Experimenten begonnen.

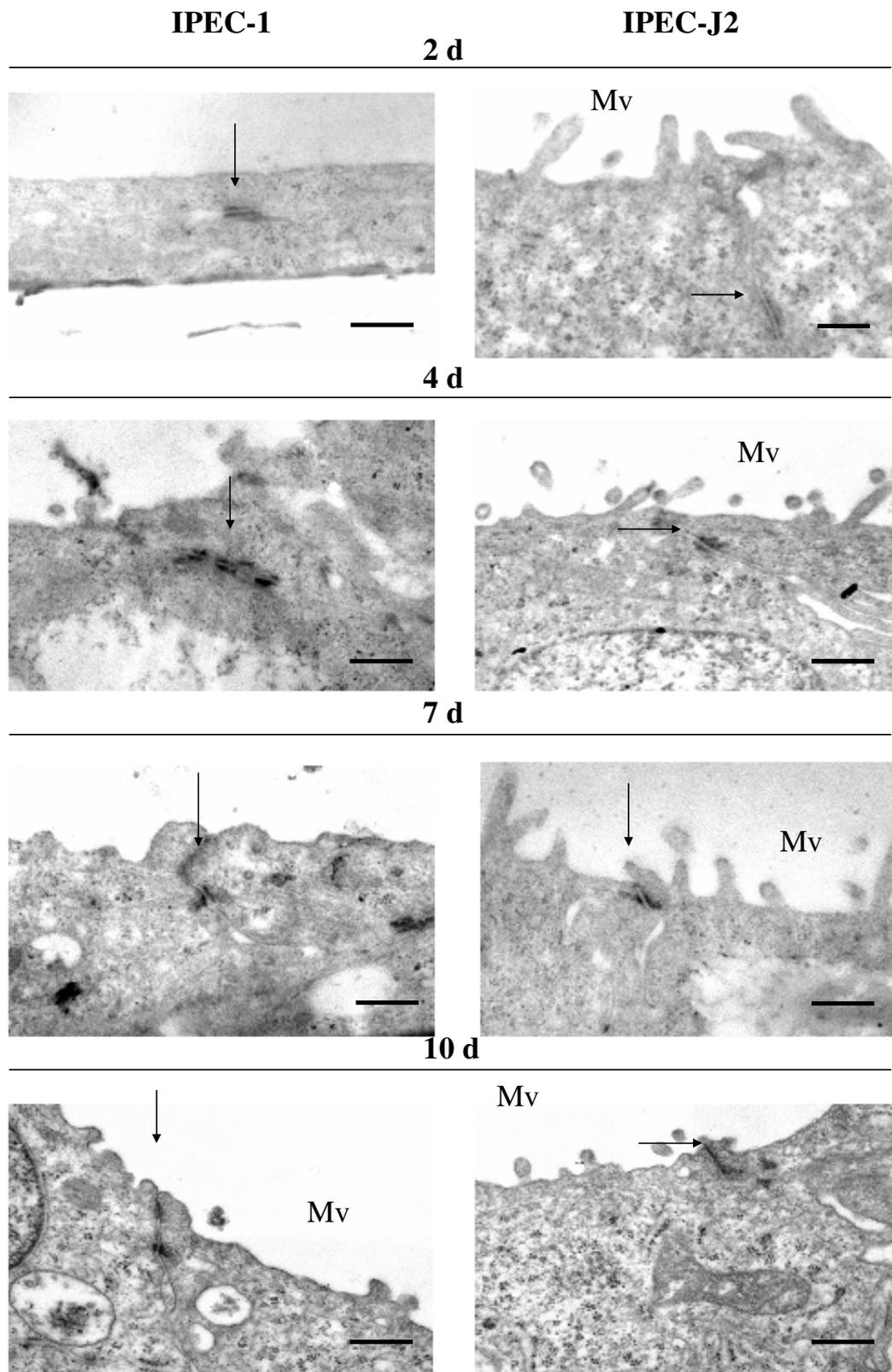
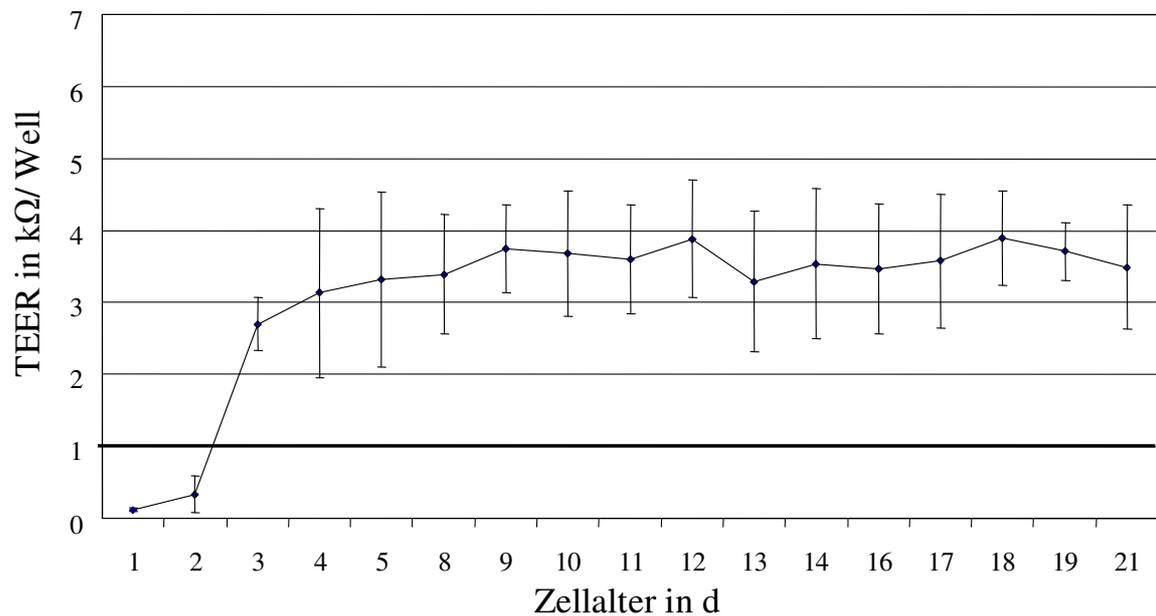


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen unbehandelter IPECs auf impermeablem Untergrund. Die auf impermeablem Untergrund (Lumox®-Folienboden-Schalen) für 2, 4, 7 und 10 d in Vollmedium konfluent gewachsenen IPECs wurden fixiert und für die Elektronenmikroskopie weiterbehandelt. Es sind Tight Junctions (Pfeile) und Mikrovilli (Mv) im Querschnitt abgebildet. Die Skalierung entspricht 0,5 µm.

3.2.2 Integrität von IPEC-Zellverbänden anhand des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Membrankultureinsätze bieten den Vorteil, einen polarisierten Zellverband unter vollständiger Ausbildung des apikalen und basolateralen Kompartimentes anziehen zu können sowie Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands zu ermöglichen (TEER, siehe 2.2.5). Diese Messung lässt die indirekte Beurteilung des konfluenten Zustandes und der Tight Junctions des Zellverbandes zu. Daher war es nicht nötig, auf Membranen kultivierte Zellen einer aufwendigen elektronenmikroskopischen Untersuchung zu unterziehen. Die Integrität von IPEC-1- und -J2-Zellverbänden auf Membrankultureinsätzen wurde über einen Zeitraum von 22 Tagen verfolgt (Abb. 8). Es zeigte sich ein Anstieg des TEER-Wertes auf über $1 \text{ k}\Omega/\text{Well}$ innerhalb der ersten drei Tage, der während des gesamten Untersuchungszeitraumes über diesem kritischen Schwellenwert blieb. Da Epithelzellen *in vivo* ca. drei Tage für ihre Ausdifferenzierung auf dem Weg von der Krypte zur Zotte benötigen (siehe 1.2), sollten die in den Versuchen verwendeten Zellen zwar ausdifferenziert, aber nicht zu alt sein. Daher wurde die Zellkultur ab einem TEER-Wert von $1 \text{ k}\Omega/\text{Well}$ und ab Tag vier als ausdifferenziert, konfluent und ausreichend mit Tight Junctions ausgestattet angesehen. Die Bestimmung der TEER-Werte diente als Kontrolle für die Intaktheit der Zellverbände auf permeablem Untergrund, bevor mit den Versuchen begonnen wurde. Bei einem Wert von über $1 \text{ k}\Omega/\text{Well}$ (an Tag vier) wurde wie bei den Zellkulturen auf impermeablem Untergrund die DON-Applikation gestartet, wobei der TEER-Wert täglich weiter verfolgt wurde. Eine Ausnahme bildeten die auf 6-Well-Membrankultureinsätzen angezogenen Zellen. Aufgrund ihrer größeren Fläche waren sie erst nach sieben Tagen konfluent mit einem TEER-Wert von über $1 \text{ k}\Omega/\text{Well}$ (siehe Abb. 53). Im Weiteren wurde sich für die Versuche auf Membrankultureinsätzen auf IPEC-J2-Zellen beschränkt, da diese neben adäquaten Mikrovilli-Strukturen ursprünglichere enterozytische Eigenschaften zeigten (siehe 4.2.1).

IPEC-1



IPEC-J2

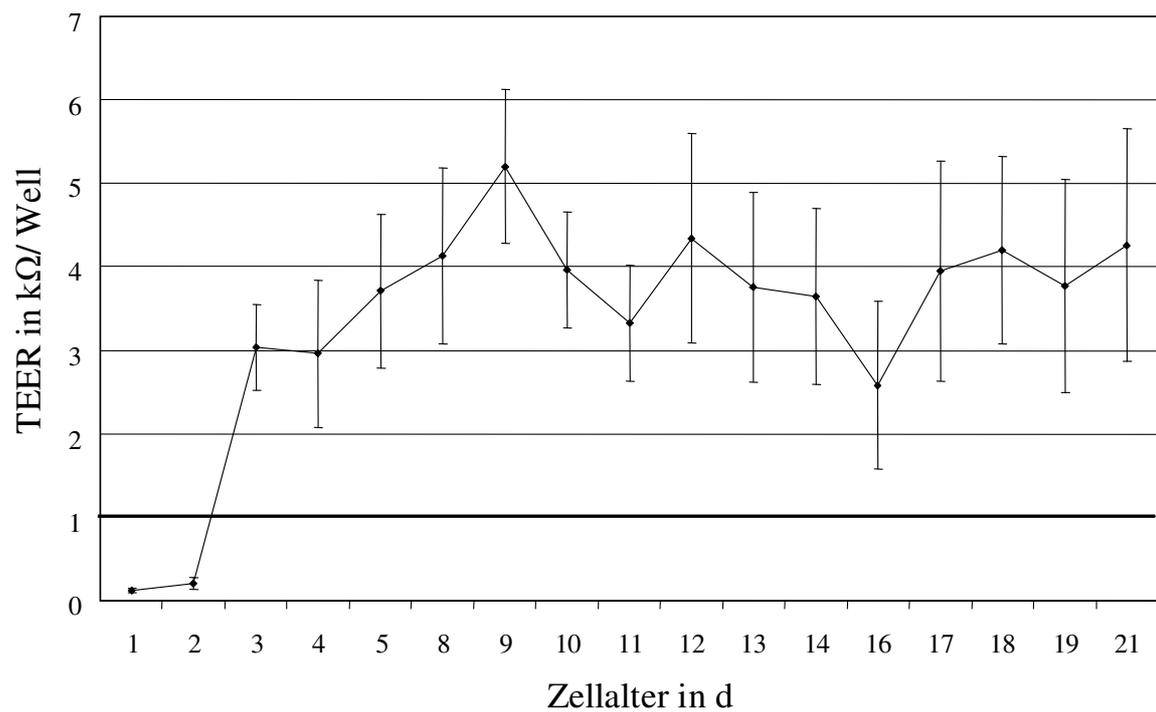


Abbildung 8: Zeitverlauf des TEER-Wertes von IPECs auf permeablem Untergrund

Die auf 12-Well-Membrankultureinsätzen ausgesäten IPEC-1- und -J2-Zellen wurden über eine Zeitspanne von 22 d in Vollmedium inkubiert. Die gemessenen TEER-Werte sind in $k\Omega/\text{Well}$ angegeben, wobei ein Well einer Fläche von ca. 1 cm^2 entspricht. Nach 3 d überschritten beide Zelllinien den Schwellenwert von $1 \text{ k}\Omega/\text{Well}$ (Markierung). Die Messpunkte repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ($\pm \text{SEM}$).

3.3 Einfluss von DON auf die Viabilität und den Metabolismus von IPECs

3.3.1 IPEC-Zellmorphologie nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund

Zur Einschätzung des zytotoxischen Effekts von niedrigen und hohen DON-Konzentrationen (0, 200, 2000 ng/ml) auf konfluente Zellverbände von IPEC-1 und -J2 auf impermeablem Untergrund wurde eine lichtmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie durchgeführt (siehe 2.6.1). Beide Zelllinien zeigen nach DON-Exposition ein in etwa gleiches Schädigungsmuster (Abb. 9). Die kleineren, ebenmäßiger angeordneten IPEC-1-Zellen, sowie die größeren, unregelmäßig geformten IPEC-J2-Zellen reagierten nur auf höhere Konzentrationen des Mykotoxins (2000 ng/ml). Sie wiesen nach 24 h kleinere Löcher im Zellverband auf. In beiden Zelllinien ist die großflächige Zerstörung des Zellverbandes nach 48 h erkennbar. Es sind viele abgelöste, tote Zellen zu finden. Nach 72 h sind in beiden Zelllinien neben Anhäufungen abgestorbener Zellen nur noch vereinzelt lebende Zellinseln sichtbar. Bei der Gabe von 200 ng/ml DON ist in beiden Zelllinien morphologisch kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle feststellbar.

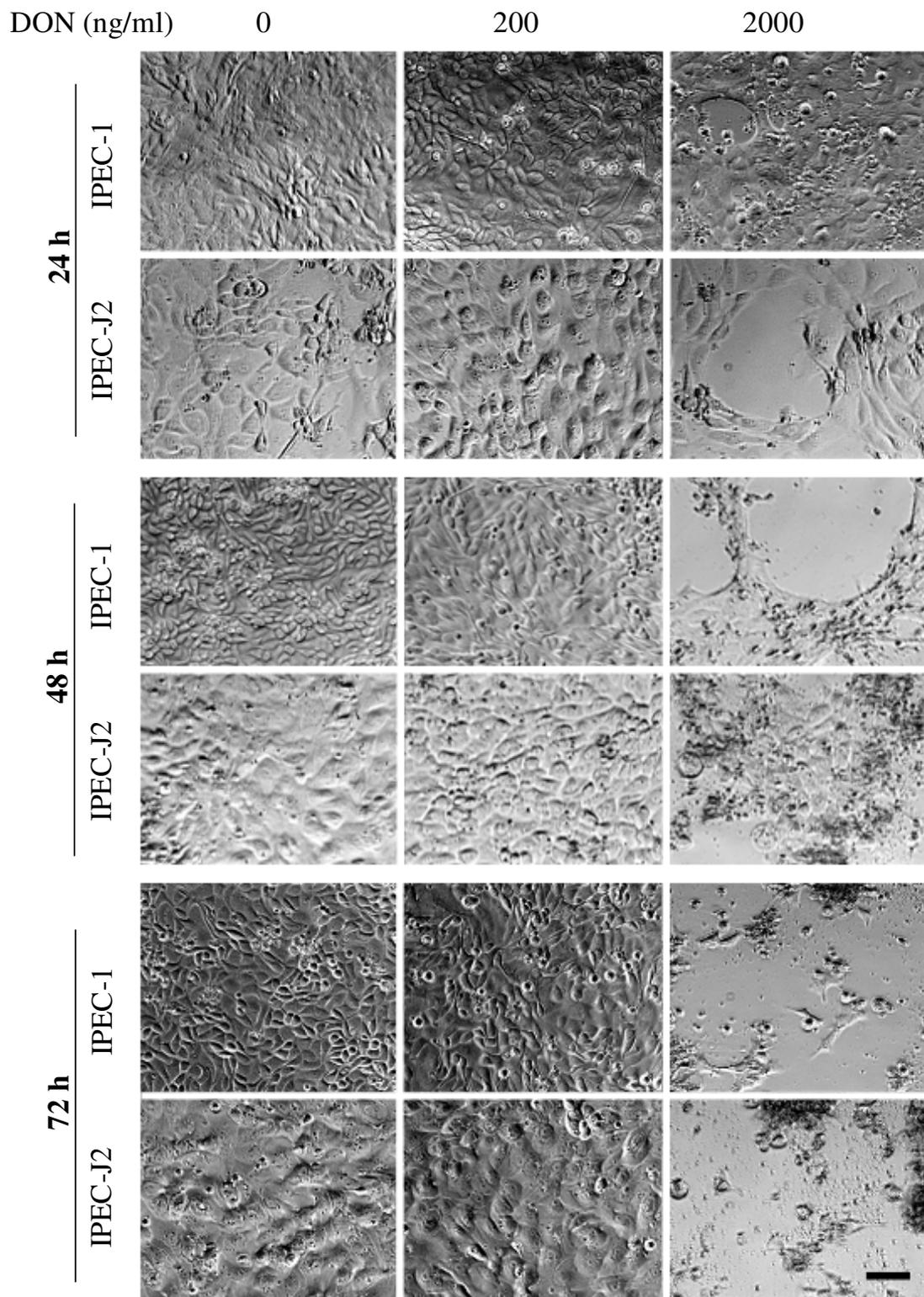


Abbildung 9: Morphologie von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert und die Zellmorphologie mikroskopisch aufgenommen (Hellfeld, 20-fache Vergrößerung). Der Balken entspricht 20 μm .

3.3.2 Veränderung der IPEC-Zellanzahl nach DON-Exposition

Zur Zellzahlbestimmung wurde hier die Methode der Zellkernfärbung mit Hämatoxin gewählt, die auch für die Auszählung nach der immunzytochemischen BrdU-Färbung Anwendung fand (siehe 2.6.3). Damit ist die Auszählung fixierter und spezifisch angefärbter Zellkerne auf impermeablem wie auch auf permeablem Untergrund möglich.

Die erhaltenen Gesamtzellzahlen von IPEC-1- und -J2-Zellen auf konventionellen Zellkulturplatten nach DON-Gabe (0, 200 oder 2000 ng/ml) sind in Abb. 10 dargestellt. In beiden Zelllinien ist bei 2000 ng/ml eine Zellzahlabnahme erkennbar. Im Falle von IPEC-1 wird sie schon nach 24 h signifikant und bleibt es über die weiteren Zeitpunkte. Während die Zellabnahme bei IPEC-J2 erst nach 48 h signifikant wird. Die geringe DON-Konzentration von 200 ng/ml zeigt in IPEC-J2 eine leichte Zunahme der Zellzahl, aber keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle.

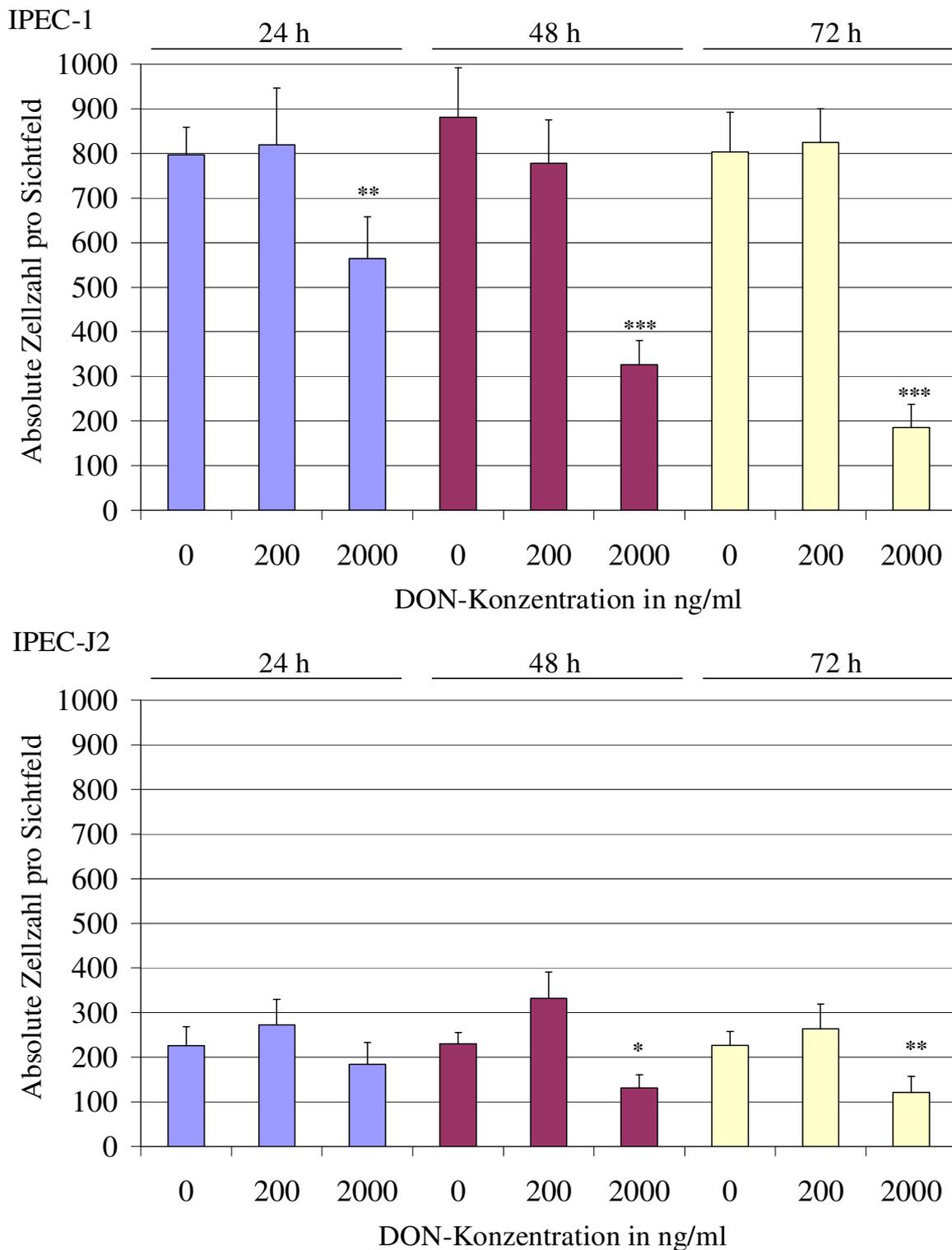


Abbildung 10: Gesamtzellzahl von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Die Hämatoxilin-gefärbten Zellkerne wurden mikroskopisch aufgenommen und drei repräsentative Sichtfelder ausgezählt. Jede Säule stellt den Mittelwert der Gesamtmenge aller Zellen pro Sichtfeld von fünf unabhängigen Experimenten dar (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Zellzählung von IPEC-J2-Zellen auf Membrankultureinsätzen erzielt werden. Die Auswertung der Hämatoxilin-Kernfärbung von IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund ist in Abb. 11 dargestellt. Bei dieser Zellzählung wurde deutlich, dass die hohe DON-Konzentration 2000 ng/ml, appliziert von apikal, keinen Effekt auf die Viabilität der Epithelzellen hat, wohingegen die Applikation der gleichen Konzentration von basolateral nach 72 h Inkubation zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl führt. Im Vergleich zur konventionellen Zellkultur fällt auf, dass die Zellen auf permeablem Untergrund nach apikaler Exposition gar nicht auf DON reagierten und nach basolateraler Exposition erst einen Tag später. Die apikale oder basolaterale Gabe der niedrigen DON-Konzentration 200 ng/ml zeigte keine signifikanten Unterschiede der Zellanzahl verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

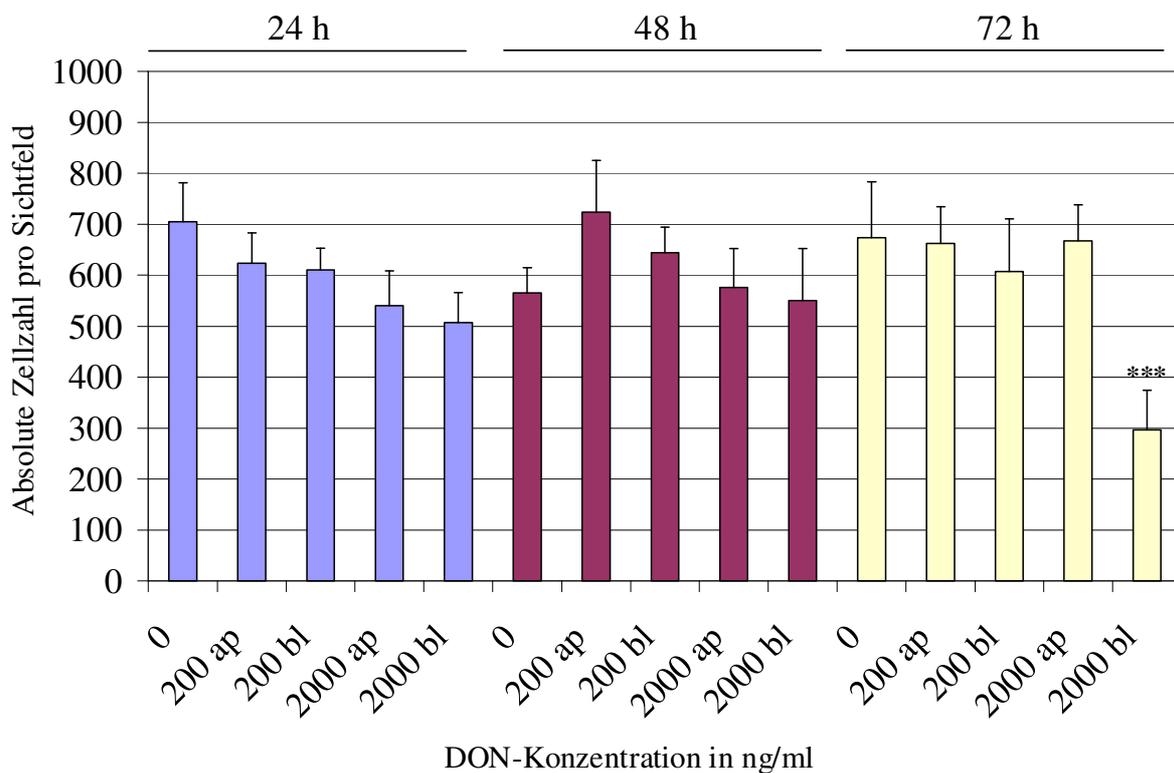


Abbildung 11: Einfluss von DON auf die Gesamtanzahl von IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) auf die Zellen appliziert wurde, inkubiert. Die Hämatoxilin-gefärbten Zellkerne wurden mikroskopisch aufgenommen und drei repräsentative Sichtfelder ausgezählt. Jede Säule stellt den Mittelwert der Gesamtmenge aller Zellen pro Sichtfeld von vier unabhängigen Experimenten dar (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.3.3 Lysosomenfunktion von IPECs nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund

Im Rahmen der Viabilitätsuntersuchung wurde der sehr sensitive Neutralrot-Test (siehe 2.3.1) für die Untersuchung der Wirkung von DON auf die Lysosomenfunktion herangezogen. Die Aufnahme des Farbstoffes Neutralrot in die Lysosomen ist ein Indikator für die Viabilität von Zellen, da dieser nur bei intakter Zellmembran eingeschleust werden kann.

Abb. 12 verdeutlicht die Neutralrot-Aufnahme in IPEC-1- und -J2-Zellen nach Inkubation mit einem Spektrum von niedrigen und hohen DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) auf impermeablem Untergrund. Besonders hervorzuheben ist bei diesem Test, dass er sehr sensitiv die Veränderung der Zellviabilität schon nach der Behandlung mit niedrigen DON-Konzentrationen anzeigt. Das war bei den vorhergehenden Methoden erst bei hohen Konzentrationen der Fall. Bei der Konzentration von 200 ng/ml sinkt die Neutralrot-Aufnahme in IPEC-J2-Zellen bereits nach 24 h signifikant ab. Sie bleibt über die gesamten Inkubationszeiten und höheren DON-Konzentrationen signifikant vermindert, wobei ab 48 h schon 100 ng/ml DON zur signifikanten Reduktion führen. In IPEC-1 ist dies ab der Konzentration von 300 ng/ml nach 24 h der Fall. Auch in dieser Zelllinie verschiebt sich nach 48 h die signifikante Verminderung der Neutralrotaufnahme hin zu der geringeren Konzentration von 200 ng/ml DON. In diesem Test reagiert IPEC-J2 sensitiver auf DON.

Der Neutralrot-Test eignete sich nicht zur Adaption auf Membrankulturen, da der Farbstoff auch nach mehrmaligem Waschen in den Poren der Membran verblieb und die Ergebnisse verfälschte.

Da der Neutralrot-Test die DON-verursachten, zellulären Veränderungen sehr sensitiv anzeigt, wurde dieser auch im Hinblick auf den Vergleich von DON und seinem inaktiven Derivat DONS durchgeführt (Abb. 44, Anhang). In diesem Test wurde ersichtlich, dass DONS in beiden Zelllinien keine Änderungen der Neutralrotaufnahme in die Lysosomen verursacht.

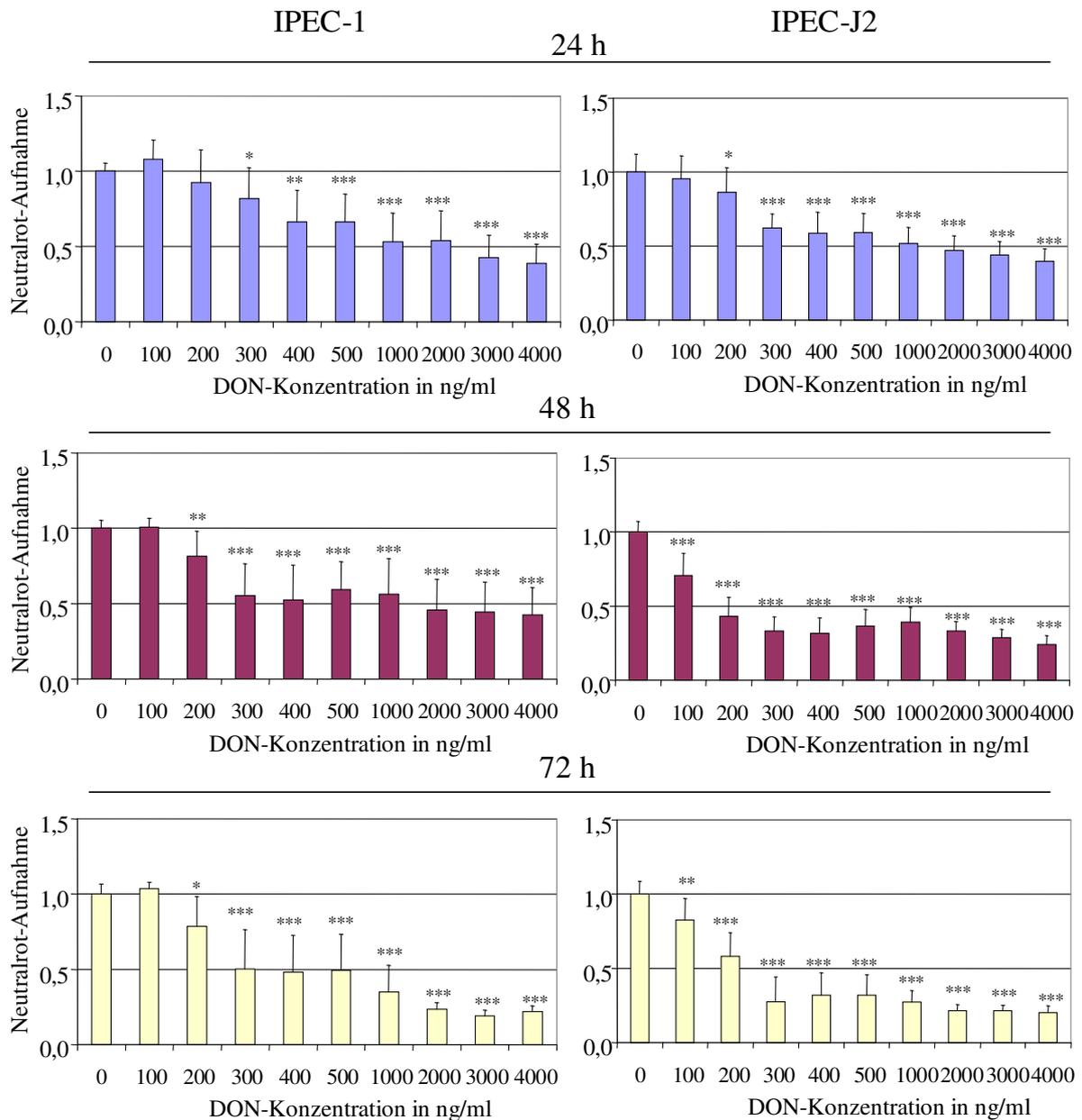


Abbildung 12: Neutralrot-Aufnahme von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit steigenden DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) in serumfreiem Medium inkubiert. Der aufgenommene Neutralrot-Farbstoff wurde bei einer Absorption von 546 nm gemessen und auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Jede Säule repräsentiert relative Mittelwerte fünf unabhängiger, in Triplikaten durchgeführter Experimente (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.3.4 Stoffwechselaktivität von IPECs nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund

Der MTT-Test gibt die mitochondriale Reduktionskapazität, also die Stoffwechselaktivität von Zellen an. Mithilfe des Reduktionsäquivalentes NADH wird der Farbstoff MTT in einer Farb-reaktion zu blauem Formazan reduziert und entspricht daher der Glykolyserate der Zellen (siehe 2.3.2).

Die relative Stoffwechselaktivität der mit einem Spektrum an niedrigen und hohen DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) behandelten IPEC-1- und -J2-Zellen wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt. Die Applikation von 400 ng/ml oder höheren DON-Konzentrationen reduzierte die Stoffwechselaktivität beider Zelllinien schon nach 24 h und für die gesamte Dauer der Inkubation signifikant. Bei IPEC-1 reichte nach 72 h Inkubation bereits die Dosis von 300 ng/ml DON für die signifikante Reduktion des MTT-Signals aus. Vereinzelt führte schon die Gabe von 100 ng/ml DON zu einer reduzierten Stoffwechselaktivität, so bei IPEC-1 nach 48 und 72 h und bei IPEC-J2 nach 24 h. Allerdings war das nie der kritische Wert, ab dem auch die nächst höheren DON-Konzentrationen ein signifikant reduziertes Signal zeigten.

Mehrere Versuche, die Messung der MTT-Reduktion auf permeablem Untergrund zu etablieren, scheiterten, da der Farbstoff in den Poren der Membran verblieb und zu verfälschten Ergebnissen führte.

Da die Messung der Stoffwechselaktivität auch ein sensitiver Test zur Detektion der DON-Wirkung ist, wurde er auch zu Bestimmung der Toxizität von DONS und DON auf IPECs genutzt. Abb. 45 (Anhang) stellt den Vergleich von DON, DONS und DOM im MTT-Test dar. Nach 48-stündiger DON-Einwirkung verursachte das Toxin eine dosisabhängige Verringerung der Viabilität von IPEC-1- und -J2-Zellen. Diese wurde signifikant bei einer DON-Konzentration von 400 ng/ml, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Das bestätigt die oben gezeigten MTT-Analysen. Weder DONS- noch DOM-Gabe resultierte in einem signifikanten toxischen Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in diesem Konzentrationsrahmen.

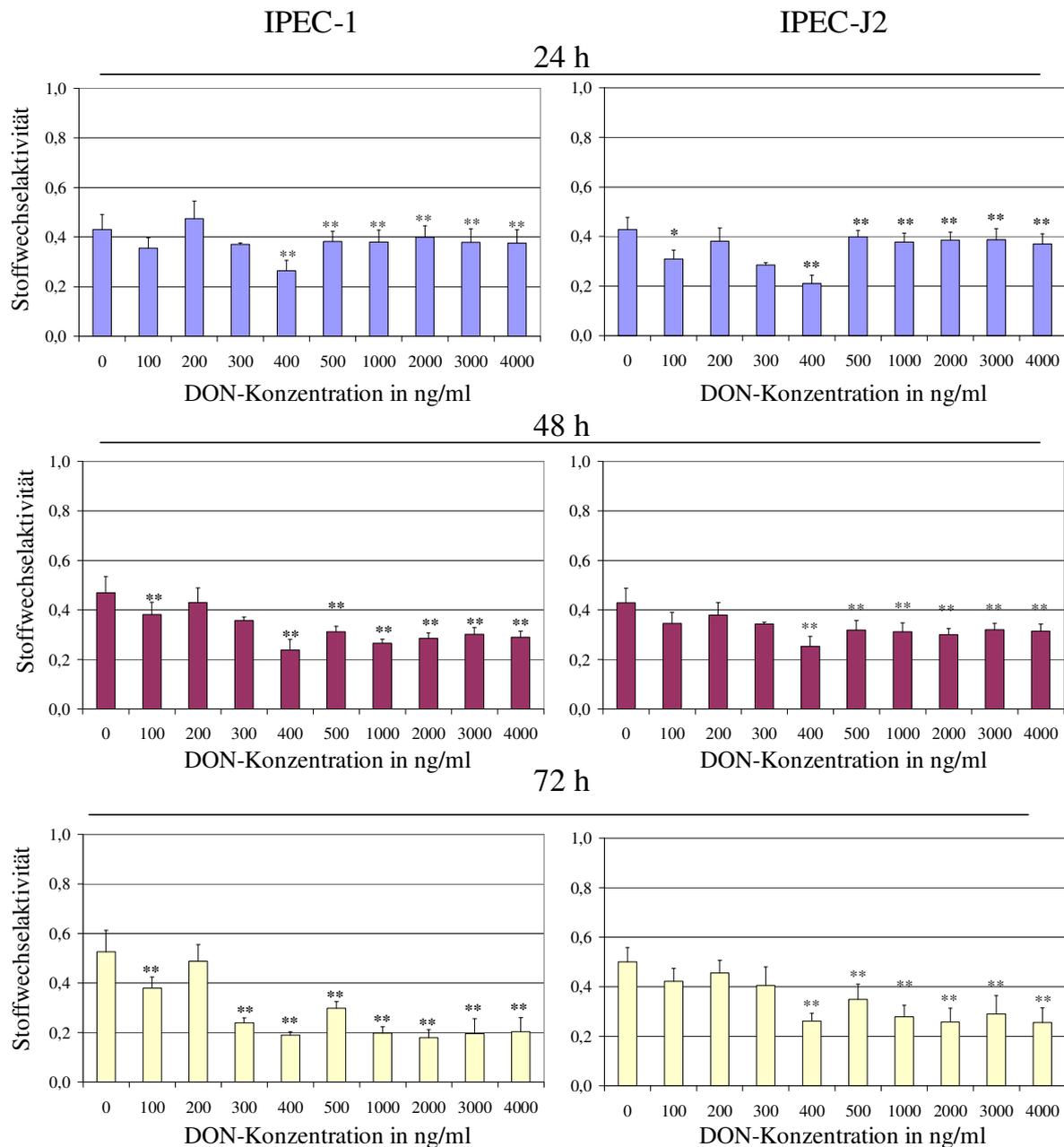


Abbildung 13: Stoffwechselaktivität von IPECs nach DON-Gabe auf impermeablem Untergrund

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit steigenden DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Im MTT-Test wurde die Reduktionkapazität bei einer Absorption von 450 nm gemessen und in absoluten Werten dargestellt. Jede Säule repräsentiert die Mittelwerte von mindestens fünf unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.4 Veränderung der IPEC-Proliferation nach DON-Applikation

Die Effekte von DON auf die DNA-Syntheserate und damit die Zellproliferation wurden mithilfe des Thymidinanalogons BrdU (5'-Brom-2'-Desoxyuridin) untersucht, welches während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA integriert wird und damit die replizierte DNA anfärbbar macht.

3.4.1 Ermittlung der DNA-Syntheserate des IPEC-Zellverbandes

Abb. 14 stellt die mit dem BrdU-ELISA (siehe 2.3.3) ermittelte Proliferationsrate in Antwort auf das Spektrum niedriger und hoher DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) von IPEC-1- und -J2-Zellen auf impermeablem Untergrund dar. Eine signifikante Verringerung des BrdU-Einbaus in IPEC-1 wurde mit der Applikation von DON 2000 bis 4000 ng/ml nach allen untersuchten Zeitpunkten detektiert. Eine Dosierung von 1000 ng/ml DON reduzierte in dieser Zelllinie nach 48 und 72 h den BrdU-Einbau signifikant. Bei IPEC-J2 war der BrdU-Einbau erst nach 72 h und DON-Konzentrationen von über 2000 ng/ml signifikant reduziert. Bei diesem Test reagierte IPEC-1 sensitiver als IPEC-J2.

Mittels dieses Testsystems wurde ein biphasischer Proliferationsverlauf in Antwort auf niedrigere und höhere DON-Konzentrationen entdeckt. Im Gegensatz zum reduzierten BrdU-Einbau, der für hohe DON-Konzentrationen um 2000 ng/ml beobachtet wurde, trat im niedrigen Konzentrationsrahmen (um 200 ng/ml) dagegen ein signifikant erhöhter BrdU-Einbau auf. Bei 48- und 72-stündiger Inkubation von IPEC-1 mit 200 ng/ml DON war dieser zu beobachten sowie auch in IPEC-J2 nach 72 h.

Es wurde versucht, diesen BrdU-ELISA auch auf Membrankulturen anzuwenden. Dieses Verfahren ergab allerdings gegensätzliche Ergebnisse, daher konnte das Testsystem auf Membrankultureinsätzen nicht angewendet werden.

Da die Messung der Proliferationsaktivität sehr gut geeignet ist, um Wirkungen toxischer Substanzen zu testen, wurde sie auch für das DON-Derivat DONS angewendet. Abb. 46 stellt den Vergleich von DON und DONS im BrdU-ELISA dar. Während die hohe DON-Konzentration von 2000 ng/ml schon nach 24 h einen signifikanten Abfall der Proliferationsrate beider Zelllinien bewirkte, war kein signifikanter Einfluss der geringen oder hohen DONS-Konzentration gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Eine Proliferationsaktivierung wurde nicht festgestellt.

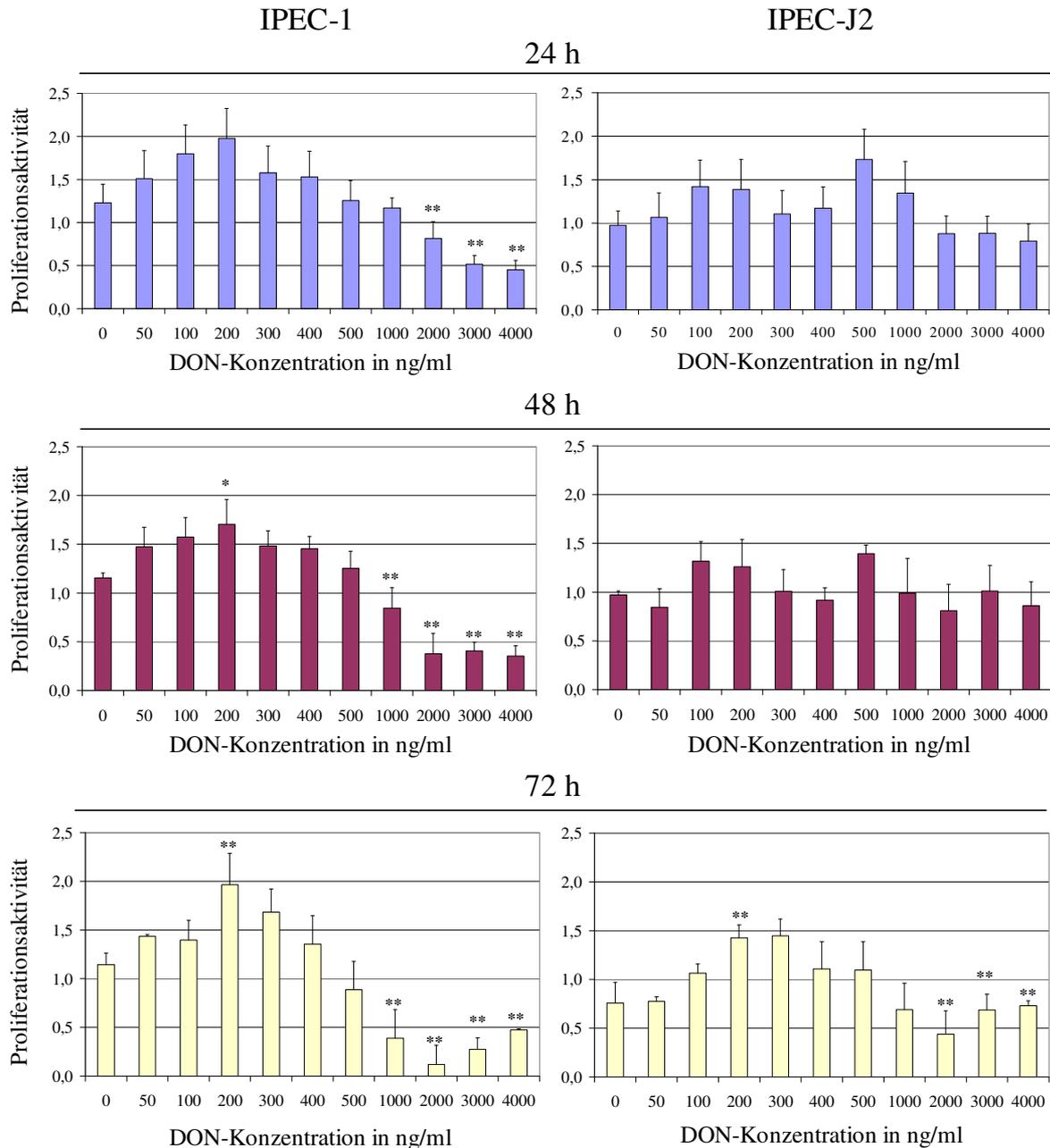


Abbildung 14: Proliferation von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit steigenden DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Der Einbau von BrdU in die DNA wurde mittels BrdU-ELISA bei einer Absorption von 570 nm gemessen und absolute Werte dargestellt. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von mindestens vier unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.4.2 Ermittlung der DNA-Syntheserate auf Einzelzellniveau

Da der BrdU-ELISA auf Membrankultureinsätzen nicht anwendbar war (siehe oben), wurde eine zweite Methode der BrdU-Detektion durch Immunzytochemie gewählt (siehe 2.6.3). Diese ermöglicht die mikroskopische Auswertung der DNA-Syntheseaktivität und damit der Proliferationsrate auf Einzelzellniveau. Vergleichend zu den konventionell auf impermeablem Untergrund angezüchteten Zellen von IPEC-1 und -J2 wurde dieser Nachweis zur Untersuchung der DON-Wirkung auf die Proliferation von IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund genutzt.

Die immunzytochemisch gefärbten Zellverbände wurden mikroskopiert und die Gesamtanzahl sowie die BrdU-positiven Zellen pro Sichtfeld ausgezählt. Die auf die Zellzahlen bezogenen, relativen Proliferationsraten beider Zelllinien nach DON-Behandlung (0, 200 oder 2000 ng/ml) auf impermeablem Untergrund sind in Abb. 15 dargestellt. Bei IPEC-1 wurde mit beiden untersuchten DON-Konzentrationen und schon nach 24 h ein signifikanter Anstieg der relativen Proliferationsrate (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle) beobachtet. Das steht im Gegensatz zu den vorher gezeigten Daten des BrdU-ELISAs, in dem hohe DON-Konzentrationen einen signifikanten Proliferationsabfall bewirkten. IPEC-J2 zeigte zwar eine leichte Proliferationserhöhung bei der geringen und eine Verringerung bei der hohen DON-Konzentration, diese waren jedoch nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

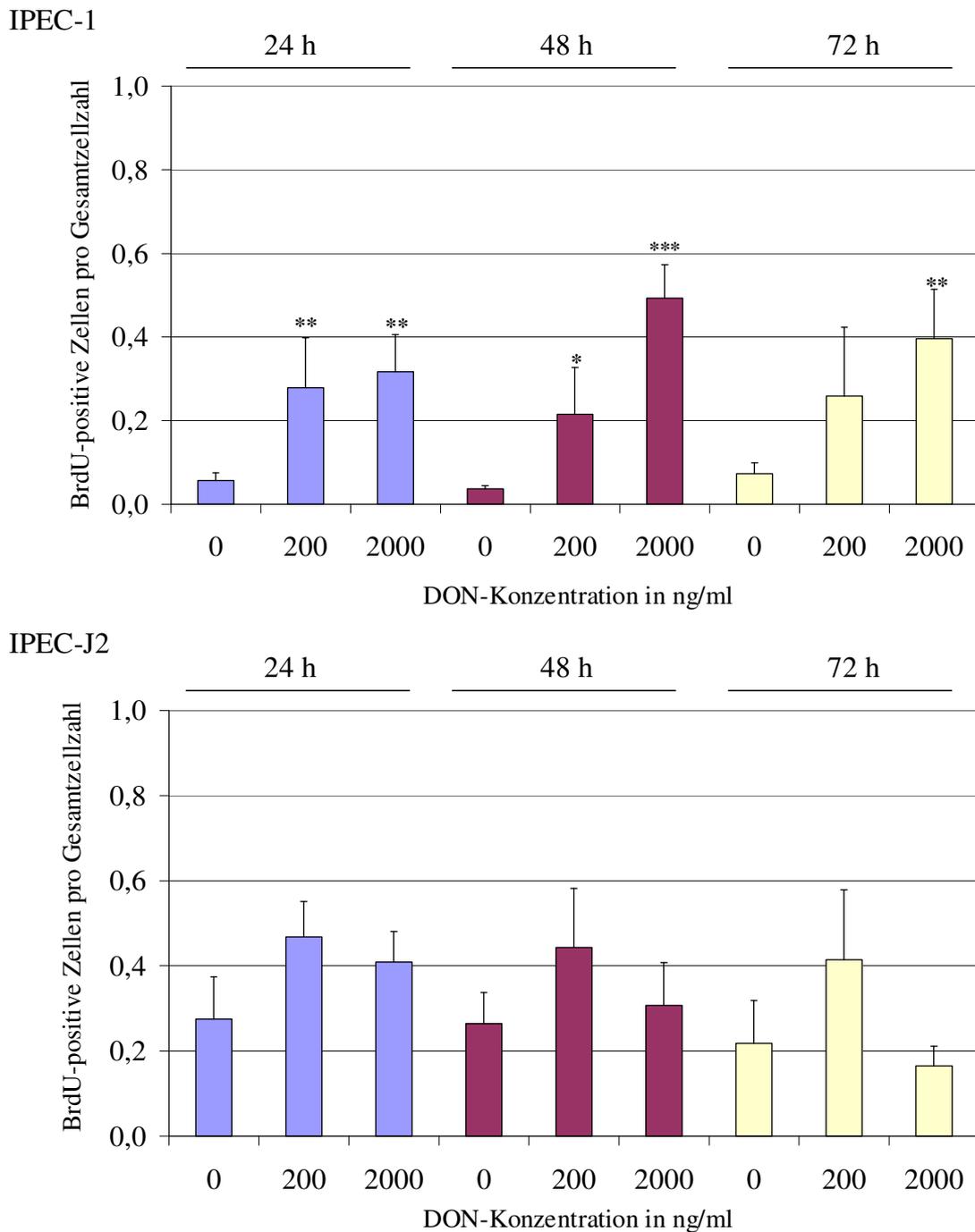


Abbildung 15: Anzahl BrdU-positiver IPECs auf impermeablem Untergrund nach DON-Einwirkung

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) und während der letzten 6 h mit BrdU in Vollmedium inkubiert. Nach immunzytochemischer Färbung BrdU-positiver Zellen erfolgte eine mikroskopische Auswertung mit Zellzählung von jeweils drei verstreut gelegenen Sichtfeldern. Jede Säule repräsentiert relative, auf die Gesamtzellzahl bezogene Mittelwerte BrdU-positiver Zellen von fünf unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Zwar musste der immunzytochemische Nachweis von BrdU auf Membrankultureinsätze angepasst werden (da Formamid die Membran auflöste, erfolgte die DNA-Denaturierung in HCl-Borat), gleichzeitig ermöglichte dieses System aber die direkte Beobachtung der DNA-Synthese im Zellverband. Die erhaltene Proliferationsrate der auf permeablem Untergrund gewachsenen IPEC-J2-Zellen in Antwort auf gerichtete DON-Behandlung (0, 200 oder 2000 ng/ml) ist in Abb. 16 gezeigt. Bei apikaler DON-Applikation jeglicher Konzentration konnte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle bei der DNA-Synthese verzeichnet werden. Allerdings wurde ein signifikanter Anstieg der relativen Proliferationsrate (bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle) nach 48 und 72 h Inkubation mit DON 2000 ng/ml, appliziert von der basolateralen Seite, beobachtet. Das widerspricht den erhobenen Befunden von auf der Platte gewachsenen IPEC-J2-Zellen, die nach Gabe hoher DON-Konzentrationen proliferativ gehemmt waren, geht aber einher mit den IPEC-1-Daten.

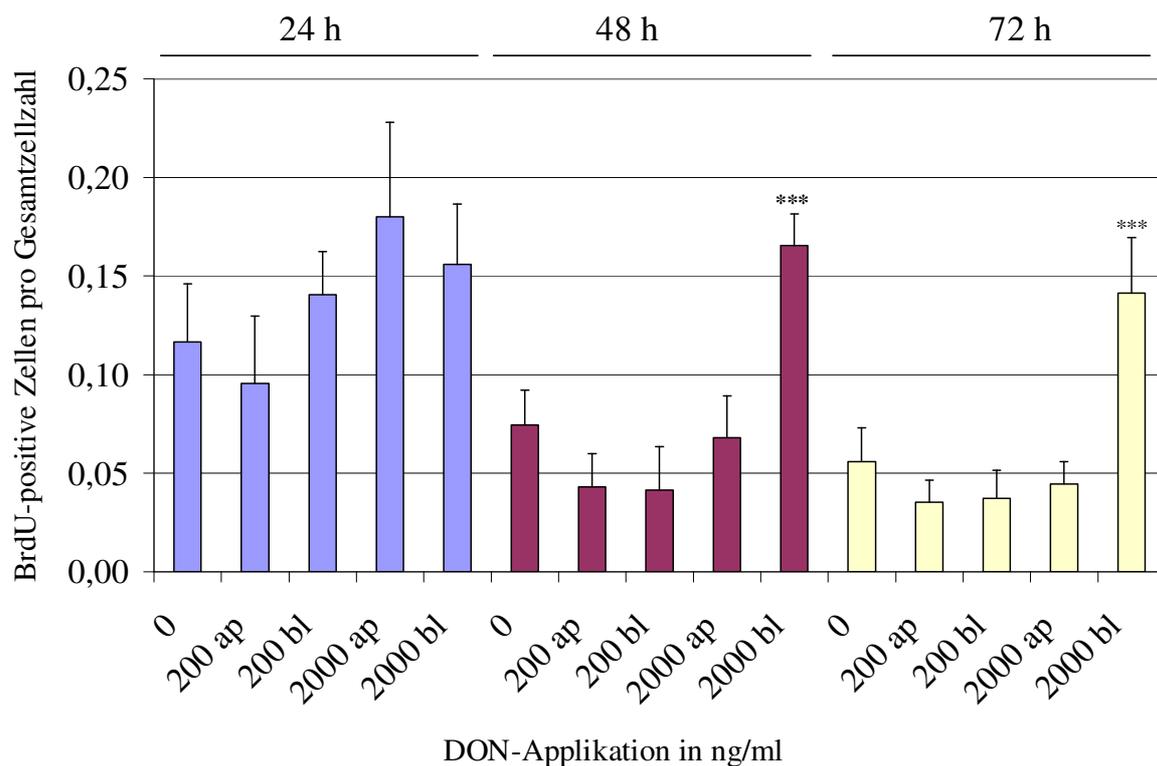


Abbildung 16: Proliferation von IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Gabe auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml) und während der letzten 6 h mit BrdU in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Nach immunzytochemischer Färbung BrdU-positiver Zellen erfolgte eine mikroskopische Auswertung von jeweils drei verstreut gelegenen Sichtfeldern. Jede Säule repräsentiert auf die Gesamtzellzahl bezogene Mittelwerte BrdU-positiver Zellen von vier unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.5 Veränderung der IPEC-Zellzyklusphasen nach DON- Applikation

Da es sowohl zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation beider Zelllinien im BrdU-ELISA kam als auch zu einer Proliferationssteigerung in der BrdU-Immunzytochemie, sollte genauer untersucht werden wie die DON-Exposition den Zellzyklusfortschritt beeinflusst. Die Phasen des Zellzyklus wurden mithilfe des Zellkernfarbstoffs Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer analysiert (siehe 2.3.4). Damit konnte die in den Zellen enthaltene DNA den Zellzyklusphasen G0/G1 (normaler Chromosomensatz), S (normaler Chromosomensatz mit unterschiedlichen Anteilen neu synthetisierter DNA in proliferierenden Zellen) und G2/M (doppelter Chromosomensatz) zugewiesen werden. Neben der G0/G1-Population stellt sich außerdem noch eine Zellpopulation dar, die als PräG1-Phase bezeichnet wird und fragmentierte DNA apoptotischer Zellen anzeigt. Neben der Proliferationsuntersuchung gibt diese Analyse also gleichzeitig Aufschluss über ablaufende Apoptose in den Zellen.

Die prozentualen Änderungen der Zellverteilung in den Zellzyklusphasen als Antwort auf DON-Applikation (0, 200 und 2000 ng/ml) in IPEC-1 und -J2 auf impermeablem Untergrund wurden in Abb. 17 dargestellt. Eine 24-stündige Inkubation mit geringer (200 ng/ml) oder hoher (2000 ng/ml) DON-Konzentrationen veränderte die Verteilung der Zellzyklusphasen in beiden Zelllinien nicht im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 h zeigten sich für IPEC-1-Zellen, die der hohen DON-Konzentration ausgesetzt wurden, eine signifikante Erhöhung des Prozentsatzes der Zellen in der PräG1-, S- und G2/M-Phase sowie eine signifikante Erniedrigung in der G0/G1-Phase. Im Gegensatz dazu war bei der gleichen Behandlung von IPEC-J2-Zellen lediglich ein signifikanter Abfall des Zellanteils in der G0/G1-Phase sichtbar. Die größten Unterschiede des zellulären DNA-Gehaltes wurden für den Zeitpunkt 72 h gefunden. IPEC-1-Zellen zeigten einen starken Anstieg der PräG1-Population, was auf Zelltod mit degradierter DNA hinweist. Dieser Anstieg konnte zu keinem Zeitpunkt bei IPEC-J2 detektiert werden. In beiden Zelllinien fiel nach 72-stündiger, hoher DON-Dosierung die Zellanzahl in der G0/G1-Phase signifikant ab. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Erhöhung in der G2/M-Phase, jedoch weitaus deutlicher für IPEC-J2. Der Anteil an Zellen in der S-Phase erhöhte sich für keine andere Bedingung außer für 48-stündige hohe DON-Konzentration in IPEC-1-Zellen.

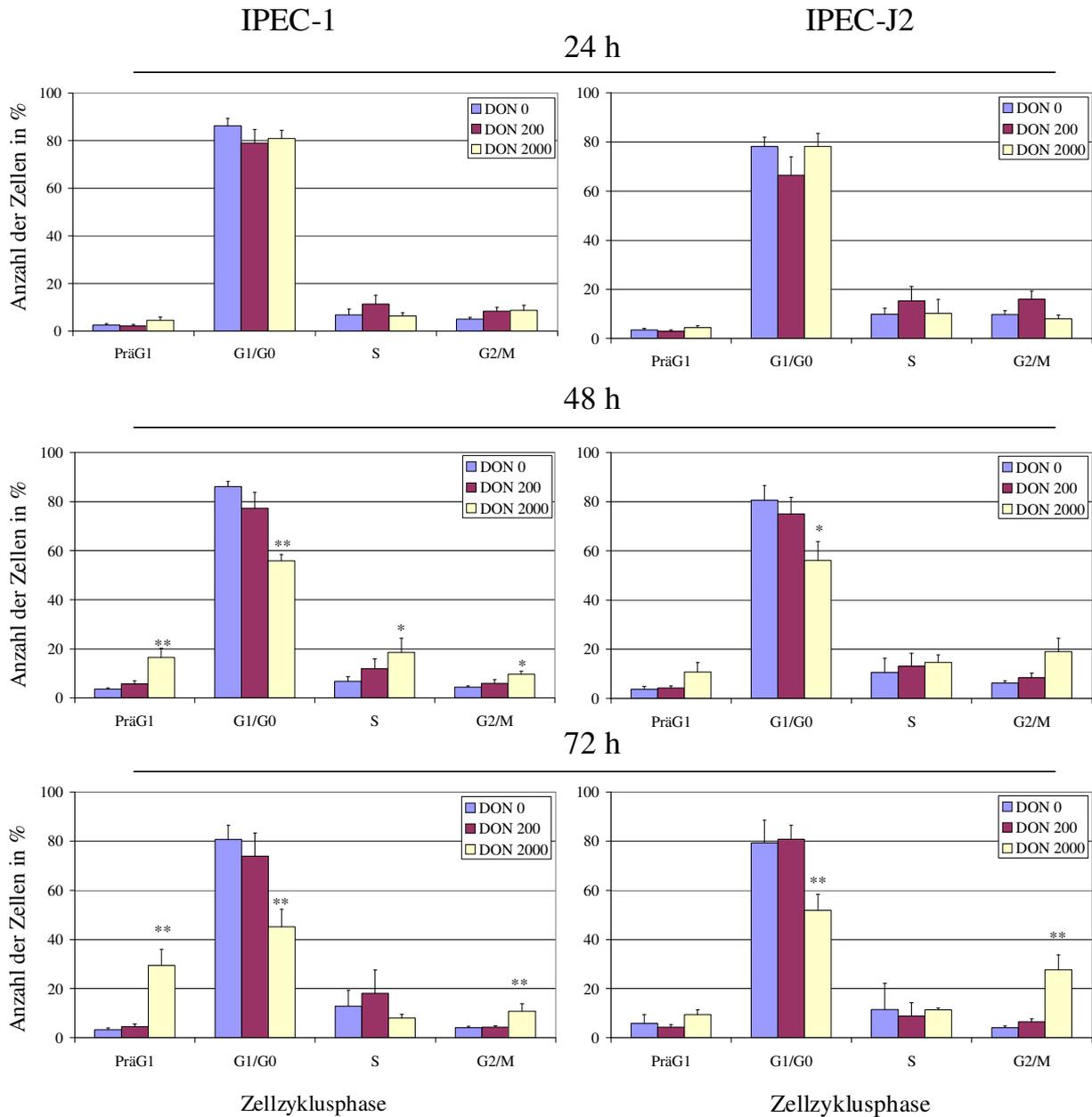


Abbildung 17: Verteilung von IPECs in den Zellzyklus-Phasen nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 6-Well-Plastikplatten 4 d konfluent gewachsenen und 1 d mit serumfreiem Medium synchronisierten IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde das Signal von Propidiumiodid genutzt, um den DNA-Gehalt der Zellen in PräG1-, G0/G1-, S- oder G2/M-Phase einzuordnen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der prozentualen Verteilung der DNA in den vier Phasen von vier unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Die durchflusszytometrische Analyse konnte problemlos an Membrankultureinsätzen durchgeführt werden, da die Zellen vor der PI-Färbung vom permeablen Untergrund trypsiniert werden konnten. Bei der Zellzyklusanalyse von IPEC-J2 auf permeablem Untergrund wurde deutlich, dass die Richtung der DON-Applikation eine wesentliche Rolle bei der Wirkung des Mykotoxins spielt (Abb. 18). Im Gegensatz zu den Befunden auf impermeablem Untergrund veränderte sich der DNA-Gehalt der Zellen bei apikaler DON-Gabe im Untersuchungszeitrahmen nicht. Er entsprach der unbehandelten Kontrolle. Die basolaterale Applikation von 2000 ng/ml DON resultierte dagegen in einem signifikanten Abfall des DNA-Gehaltes in der G0/G1-Phase nach 48 h und 72 h, was wiederum mit den Ergebnissen der konventionellen IPEC-J2-Kultur übereinstimmt. Im Widerspruch zu dem Verhalten der IPEC-J2-Zellen auf impermeablem Untergrund stand hier der signifikante Anstieg der fragmentierten DNA der PräG1-Phase nach 72 h. Obwohl eine starke Erhöhung der Zellen der G2/M-Phase nach 72 h DON-Behandlung sichtbar wurde, konnte ein G2/M-Arrest der IPEC-J2-Zellen, wie er auf der Platte detektiert wurde, auf permeablem Untergrund nicht mit statistischer Signifikanz validiert werden.

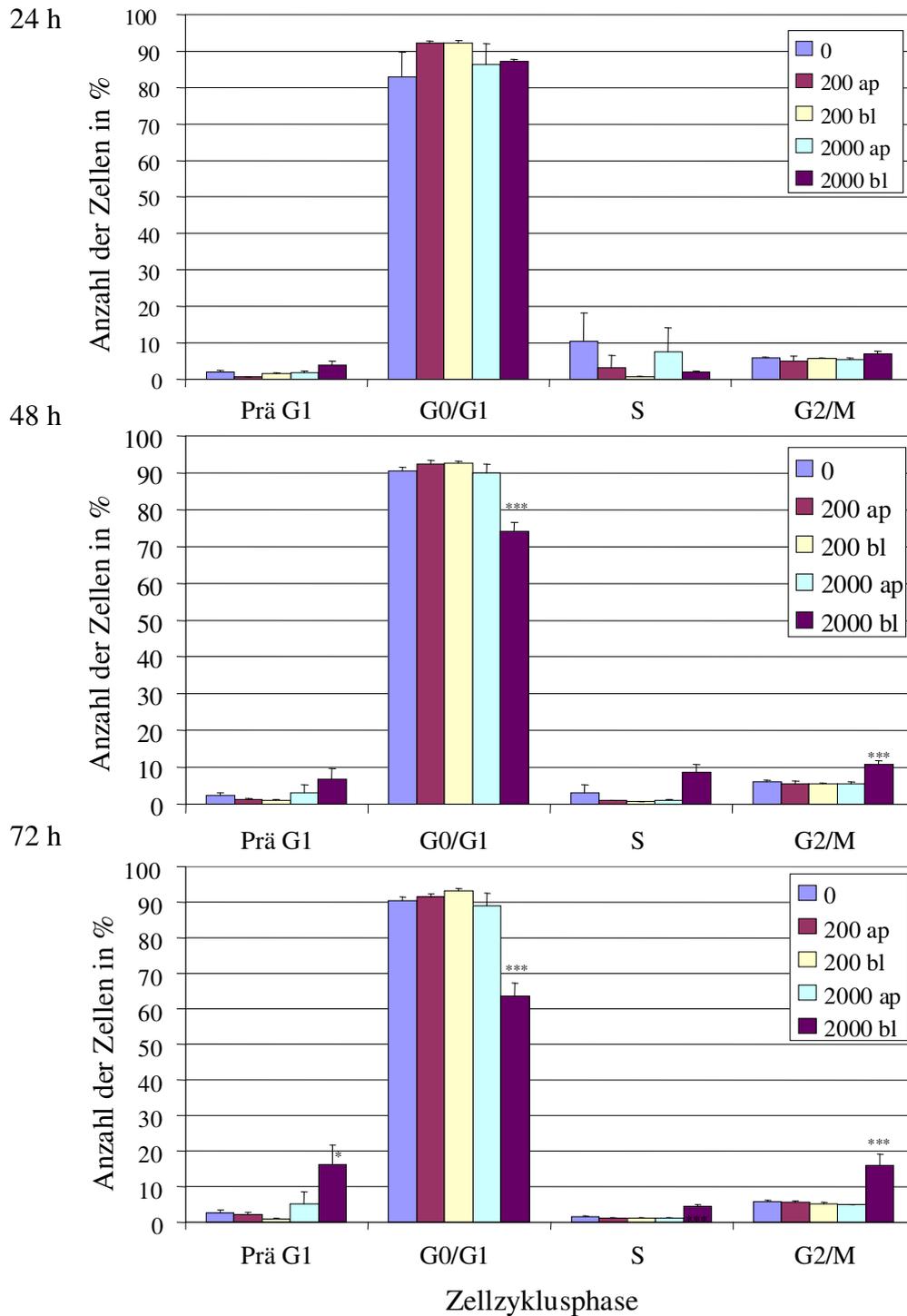


Abbildung 18: Einfluss von gerichtet appliziertem DON auf die IPEC-J2-Zellverteilung in den Zellzyklusphasen auf permeablem Untergrund

Die auf 6-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde das Signal von Propidiumiodid genutzt, um den DNA-Gehalt der Zellen in PräG1-, G0/G1-, S- oder G2/M-Phase einzuordnen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der prozentualen Verteilung der DNA in den vier Phasen von fünf unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.6 Wirkung von DON auf den Zelltod (Nekrose/Apoptose) von IPECs

Der Zelltod kann entweder durch Nekrose oder Apoptose erfolgen. Nekrose wird durch extreme Abweichung der physiologischen Bedingungen verursacht und ist charakterisiert durch die Zerstörung der Zellmembran, woraufhin zytosolische Proteine in den extrazellulären Raum austreten. Die Apoptose hingegen ist unter normalen physiologischen Bedingungen oder auch als Reaktion auf äußere Einflüsse genetisch vorprogrammiert. Apoptose ist gekennzeichnet durch den exakt gesteuerten Verlauf in Signalwegen, wobei spezifische Proteasen (Caspasen; *cystine dependent aspartate specific protease*) aktiviert werden und in deren Folge die Zerteilung der DNA in Fragmente charakteristischer Länge erfolgt. Hierbei schrumpfen die Zellen bei intakt bleibender Zellmembran (es treten also keine Enzyme aus wie bei der Nekrose). Die Zellmembran wird jedoch ausgestülpt und bildet Blasen, die als apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) sichtbar werden.

3.6.1 DON-verursachte Nekrose in IPECs

In intakten Zellen befindet sich das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH, oxidiert Laktat zu Pyruvat) im Zytoplasma. Verursachen z. B. toxische Substanzen eine Nekrose und damit die Permeabilisierung der zellulären Membran, wird LDH aus der Zelle nach außen freigesetzt. Dies ist durch die colorimetrische Detektion der enzymatischen LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand quantifizierbar (siehe 2.3.5).

Die LDH-Freisetzung der mit einem Spektrum von niedrigen und hohen DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) behandelten IPEC-1- und -J2-Zellen auf impermeablem Untergrund wurde in Abb. 19 dargestellt. Die gemessenen Werte wurden auf die unbehandelte Kontrolle bezogen und sind hier als relative Werte angegeben. Obwohl eine dramatische Abnahme der Zellanzahl nach DON-Behandlung verzeichnet wurde (siehe 3.3.2), d. h. dass Zellen abgestorben sind, gab es nur einen sehr schwachen Anstieg der LDH-Freisetzung. Jegliche Applikation von niedrigen oder höheren DON-Konzentrationen im untersuchten Inkubationszeitrahmen (24 bis 72 h) verursachte keine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung und damit keine DON-induzierte Nekrose in beiden Zelllinien.

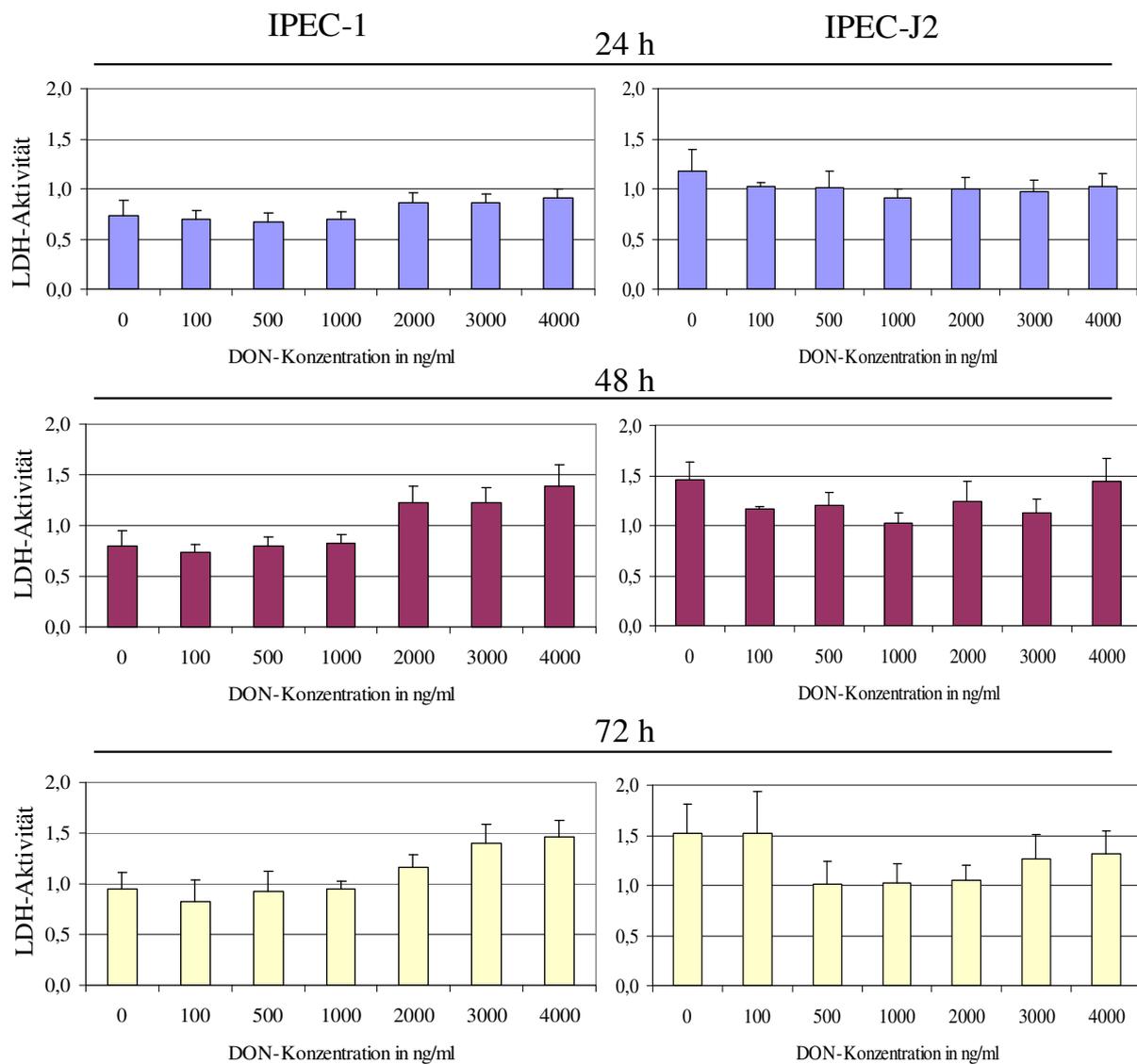


Abbildung 19: LDH-Aktivität von IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit steigenden DON-Konzentrationen (0 bis 4000 ng/ml) in serumfreiem Medium inkubiert. Die LDH-Aktivität der Überstände wurde mittels colorimetrischem LDH-Test bei einer Absorption von 492 nm gemessen. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von drei unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM).

Da die Messung der LDH-Freisetzung im Zellkulturüberstand erfolgte, war dieser Test sehr gut auf Membrankulturen anwendbar. Die LDH-Freisetzung DON-behandelter (0, 200 und 2000 ng/ml) IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund sind in Abb. 20 dargestellt. Auch unter diesen Bedingungen konnte trotz abnehmender Zellzahlen (siehe 3.3.2) keine Erhöhung der LDH-Freisetzung ins umgebene Medium verzeichnet werden. Weder bei apikaler noch basolateraler DON-Gabe im untersuchten Zeitrahmen kam es zu einer erhöhten Nekrose. Neben den hier untersuchten apikalen Überständen wurden auch die basolateralen Überstände getestet, auch darin war keine LDH-Erhöhung detektierbar (Daten nicht gezeigt).

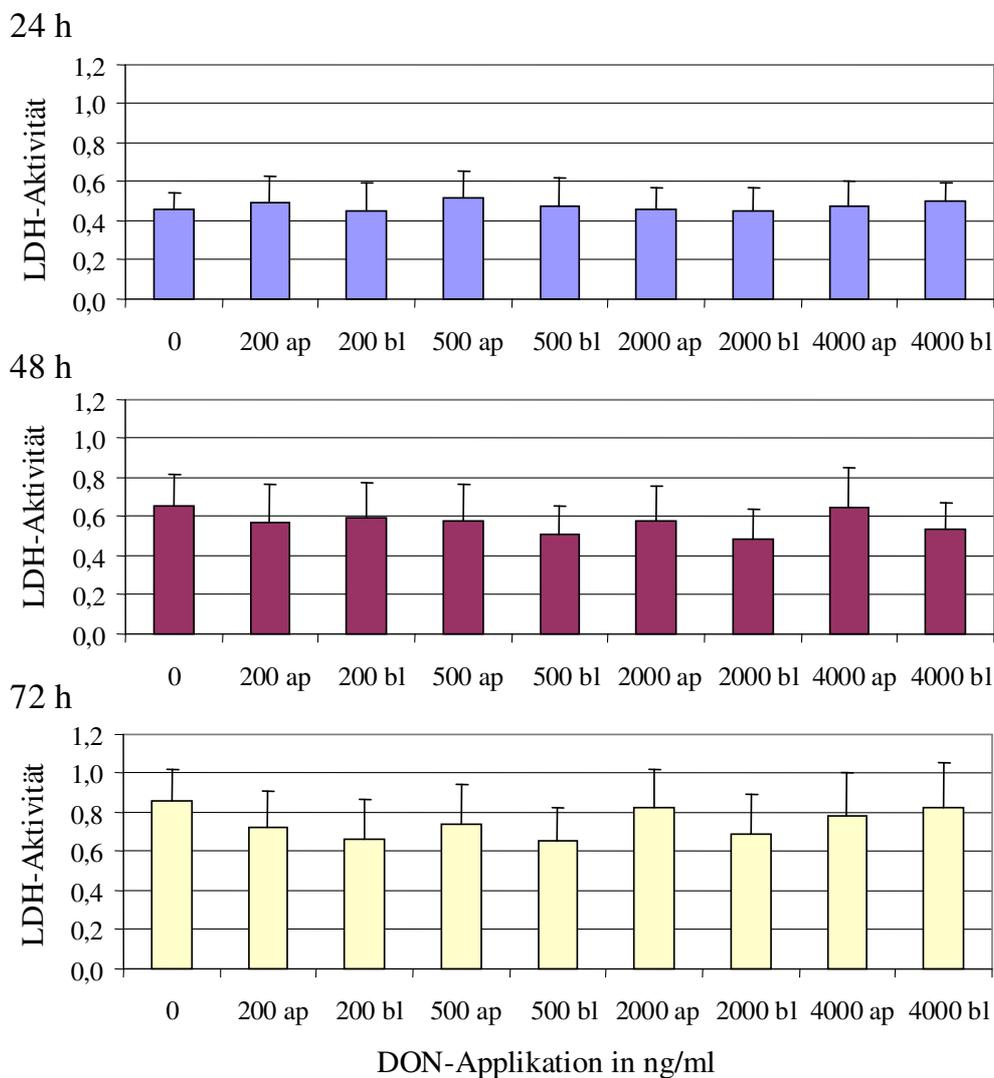


Abbildung 20: LDH-Aktivität nach gerichteter DON-Applikation in IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund. Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200, 500, 2000 oder 4000 ng/ml) in serumfreiem Medium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die Detektion der LDH-Freisetzung erfolgte mittels LDH-Test an Überständen des apikalen Kompartiments bei einer Absorption von 492 nm. Jede Säule repräsentiert die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten (+ SEM).

3.6.2 Apoptose-Induktion durch DON in IPECs

Die Caspasen-3 und -7 gehören zur Gruppe der primären Effektor-Caspasen und stellen Schlüsselenzyme bei der Auslösung der Apoptose dar (Spaltung von nukleärer DNA sowie von anti-apoptotischen Proteinen). Die Aktivierung der Caspasen-3 und -7 erfolgt durch Spaltung aus deren Vorläuferformen durch Initiator-Caspasen wie Caspase-8 (wird durch Rezeptor-vermittelte Apoptose über Fas-Ligand oder TNF- α aktiviert) oder Caspase-9 (ihrerseits durch mitochondriale Schädigung und freigesetztes Cytochrom *c* aktiviert).

3.6.2.1 Untersuchung der Caspase-3/-7-Aktivität

Der luminometrische Test zur Messung der Enzymaktivität von Caspase-3 und -7 (beide schneiden proteolytisch Substrate mit der Z-DEVD-Erkennungsstelle) ist sehr sensitiv und das Lumineszenzsignal ist direkt proportional zur Menge aktivierter Caspasen (siehe 2.3.6). Die basale Caspase-3/7-Aktivität der Zellen ohne DON-Behandlung wurde immer auf 1 gesetzt. Die DON-Behandlungen wurden auf diesen Ausgangswert bezogen und als relative Werte dargestellt.

Im konventionellen Zellkulturmodell auf impermeablem Untergrund wurden beide Zelllinien auf DON-vermittelte Apoptose (Konzentrationen 0, 200, 2000 ng/ml) hin untersucht (siehe Abb. 21). Der Test ergab eine starke, signifikante Erhöhung des Caspase-3/7-Signals im Vergleich zur Kontrolle nach 6 h und 8 h Inkubation mit 2000 ng/ml DON in beiden Zelllinien. Nach 24 h Behandlung mit 2000 ng/ml DON war das Aktivitätssignal wieder bis zum Kontrollwert reduziert. In IPEC-1 wurde noch einmal ein leichter signifikanter Anstieg der Caspase-3/7-Enzymaktivität nach 72 h detektiert. Die Applikation von 200 ng/ml DON führte zu keiner erhöhten Enzymaktivität unter allen getesteten Bedingungen und in beiden Zelllinien. Auffallend war, dass das Signal der Caspase-3/7-Aktivität in IPEC-1 stärker war als in IPEC-J2. Die mitgeführte Positivkontrolle (Staurosporin, 1 μ M für 6 h) zeigte in beiden Zelllinien ein gleichmäßig stark erhöhtes Apoptosesignal.

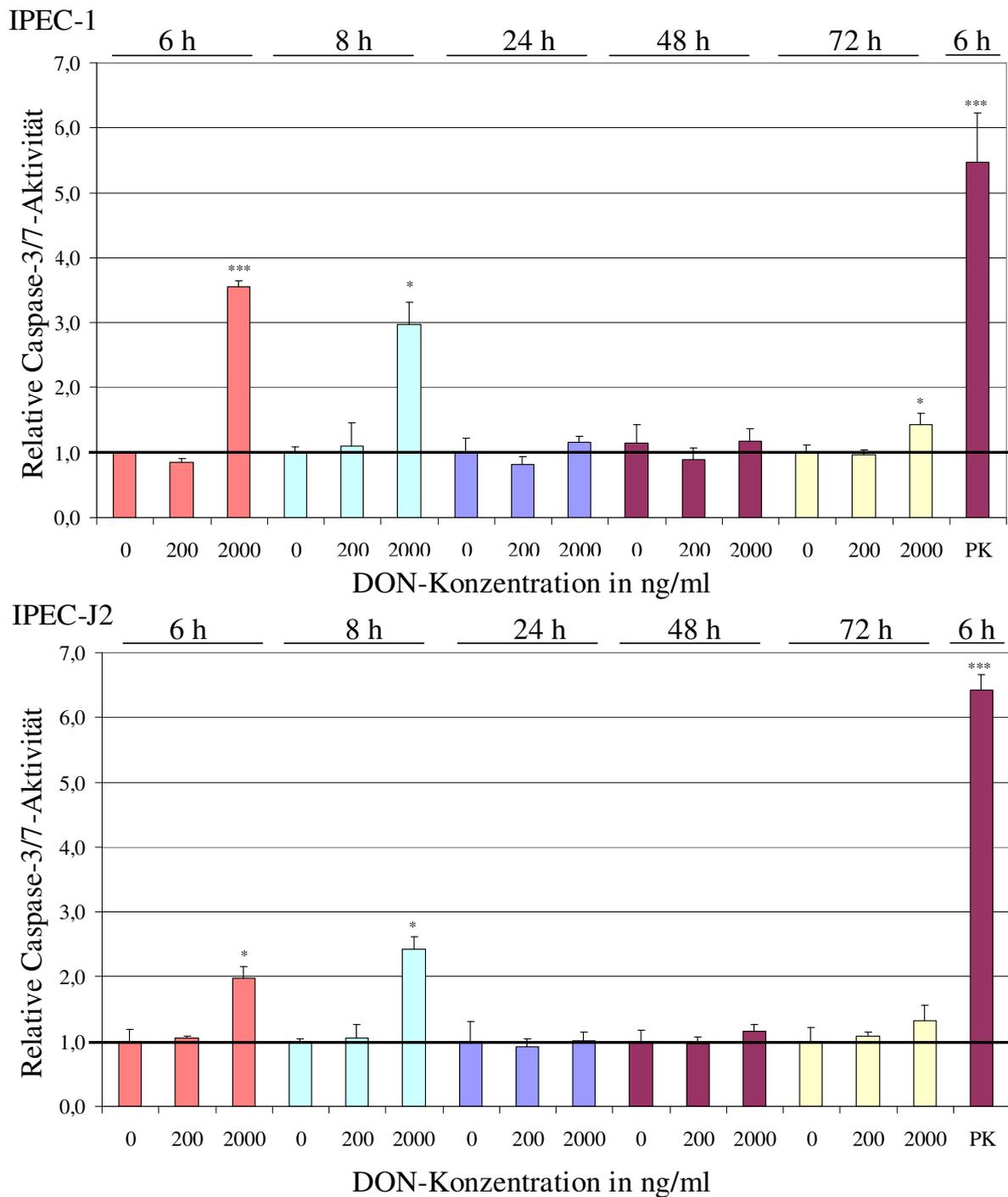


Abbildung 21: Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität von IPECs nach DON-Einwirkung auf impermeablem Untergrund

Die auf 96-Well-Multititerplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 6, 8, 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde mittels Lumineszenz-Test im Plattenlesegerät (Luminometer) quantifiziert (Caspase-3/7-Glo-Test). Als Positivkontrolle (PK) der Caspase-3/7-Aktivität wurde Staurosporin (1 μ M, für 6 h appliziert) verwendet. Die ermittelte Aktivität wurde auf die unbehandelte Kontrolle (Markierung) bezogen und als relativer Wert dargestellt. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Da für diesen Apoptose-Test die Zellen lysiert wurden, konnte die Suspension von IPEC-J2-Zellen der Membrankultureinsätze zur Detektion verwendet werden. Wie oben für das konventionelle Zellkulturmodell gezeigt, trat die Caspase-3/7-Aktivität besonders nach kurzer Inkubationszeit auf, daher erfolgte eine Beschränkung auf die Zeitpunkte 6 h und 24 h. Die Caspase-3/7-Aktivität der DON-behandelten Zellen (0, 200, 2000 ng/ml) wurde relativ zu der unbehandelten Kontrolle in Abb. 22 dargestellt. Auffallend war, dass nach 6 h Inkubation mit DON 2000 ng/ml von basolateral die Caspase-3/7-Aktivierung signifikant anstieg. Diese fiel nach 24 h wieder ab und war bei keiner anderen Behandlung zur unbehandelten Kontrolle signifikant verändert. Die mitgeführte Positivkontrolle Staurosporin bewirkte eine sehr starke, signifikante Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität. Die Apoptose-Induktion auf Membranen erfolgt wie bei der konventionellen Zellkultur innerhalb kurzer Zeit (6 h), aber im Gegensatz zum impermeablen Untergrund nicht nach apikaler, sondern nur nach basolateraler Gabe von hohen DON-Konzentrationen.

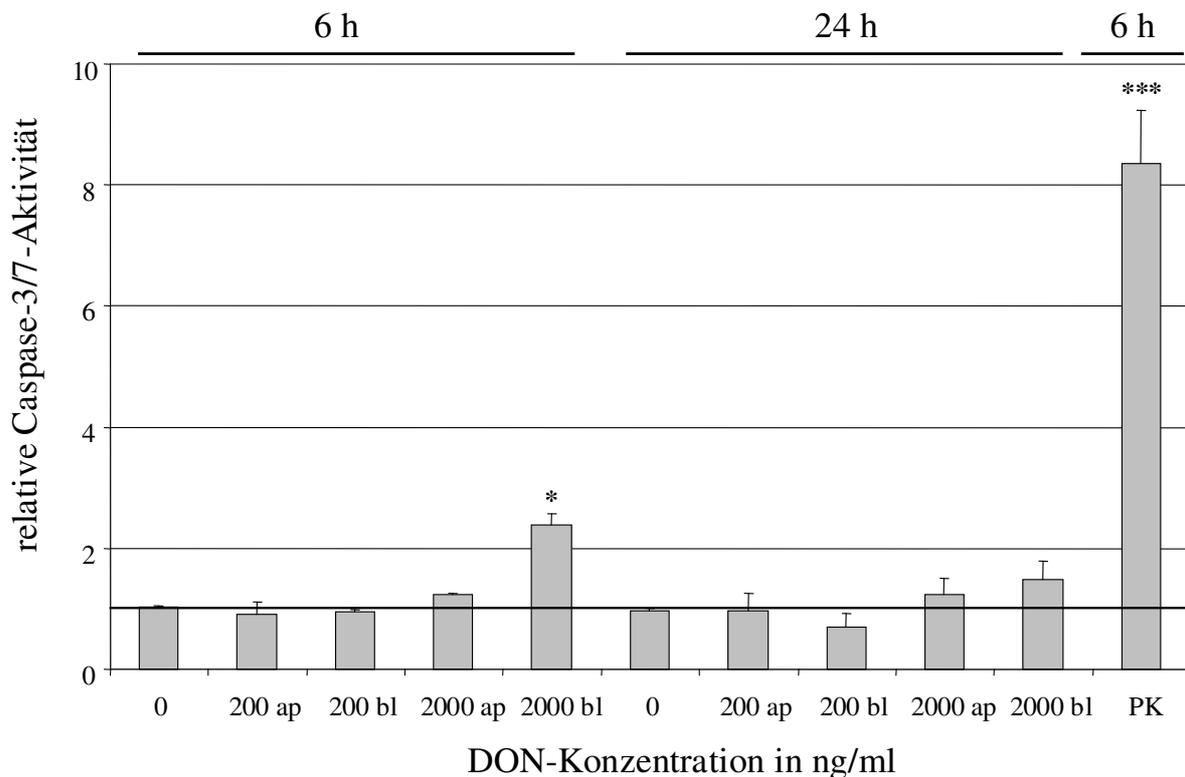


Abbildung 22: Caspase-3/7-Aktivierung in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Einwirkung auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 6 h bzw. 24 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde. Mittels Caspase-3/7-Glo-Test erfolgte am Plattenlesegerät (Luminometer) die Quantifizierung der Caspase-3/7-Aktivität. Als Positivkontrolle (PK) der Caspase-3/7-Aktivität wurde Staurosporin (1 μ M, für 6 h appliziert) verwendet. Die ermittelte Aktivität wurde auf die unbehandelte Kontrolle (Markierung) bezogen und als relativer Wert dargestellt. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.6.2.2 Untersuchung der Caspase-3-Proteinexpression

Die Expression des Apoptose-ausführenden Caspase-3-Proteins wurde mittels Immunoblot-Verfahren (siehe 2.5) analysiert. Das Enzym liegt als inaktive Vorstufe (Pro-Caspase-3) in der Zelle vor und wird daher immer detektiert, wohingegen die aktive Form als kleineres Spaltprodukt nur bei Apoptose-Induktion detektiert werden kann.

Aus IPEC-1- und -J2-Zellen, die auf impermeablem Untergrund angezogen und DON-Einfluss ausgesetzt waren, wurden Proteine isoliert und mittels Immunoblot-Verfahren detektiert. Dabei wurden die im Aktivitätstest (3.6.2.1) erhaltenen Daten bestätigt (Abb. 23).

Das gespaltene Caspase-3-Fragment (19 kDa) war nach 6 h und 8 h Inkubation mit DON 2000 ng/ml in IPEC-1 detektierbar. Nach längerer Inkubationszeit (12, 16, 24 h) war das Signal nur eingeschränkt nachzuweisen. Das aktive Caspase-3-Fragment zeigte in IPEC-J2 generell eine schwächere Bandenintensität im Vergleich zu IPEC-1. Es wurde aber in beiden Zelllinien zu den gleichen Zeitpunkten detektiert. Auch die Bandenintensität der mitgeführten Positivkontrolle (1 μ M Staurosporin für 6 h) war in IPEC-J2 schwächer als in IPEC-1.

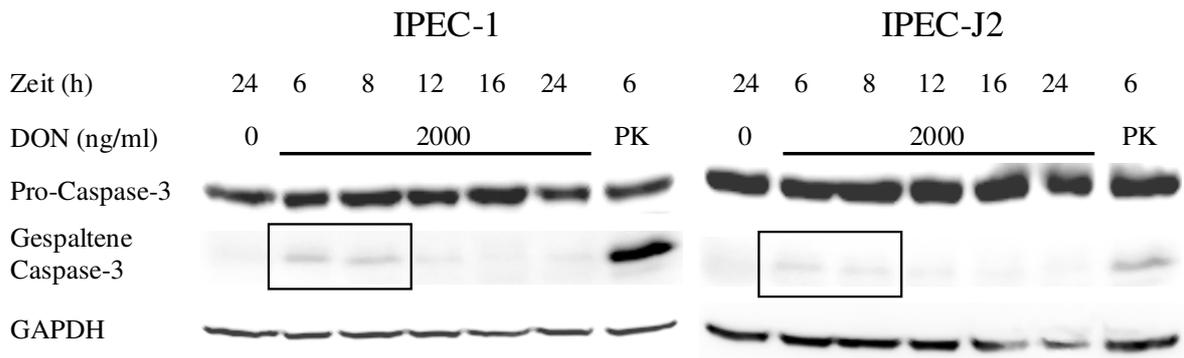


Abbildung 23: Expression des Caspase-3-Proteins in IPECs nach DON-Gabe auf impermeablem Untergrund

Die auf 6-Well-Plastikplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 6, 8, 12, 16 oder 24 h mit DON (0 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Die Proteinexpressionen der inaktiven Pro-Caspase-3 (35 kDa), der durch Spaltung aktivierten Caspase-3 (19 kDa) sowie der Ladekontrolle GAPDH (37 kDa) wurden mittels Western Blot detektiert. Als Positivkontrolle (PK) der Apoptose-Induktion wurde Staurosporin (1 μ M für 6 h appliziert) verwendet. Die rechteckige Markierung stellt die Caspase-3-Spaltprodukte DON-behandelter Proben dar. Die Abbildung stellt repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Wiederholungen dar.

Der Immunoblot wurde ebenfalls nach gerichteter DON-Behandlung von auf permeablem Untergrund angezogenen IPEC-J2-Zellen durchgeführt (Abb. 24). Bei allen Behandlungsbedingungen zeigte das inaktive Pro-Caspase-3-Protein ein Signal. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Ergebnissen der konventionellen Kultur konnte kein aktives Caspase-3-Protein detektiert werden, unabhängig von der Richtung der DON-Exposition. Die Expression des glykolytischen *house-keeping*-Proteins GAPDH blieb bei allen Zeiten und Behandlungen konstant. Mit Staurosporin als Positivkontrolle wurde zwar die Expression der aktiven Caspase-3 induziert, aber das Signal war, wie schon für IPEC-J2 der konventionellen Zellkultur oben beschrieben, auch unter diesen Bedingungen sehr schwach.

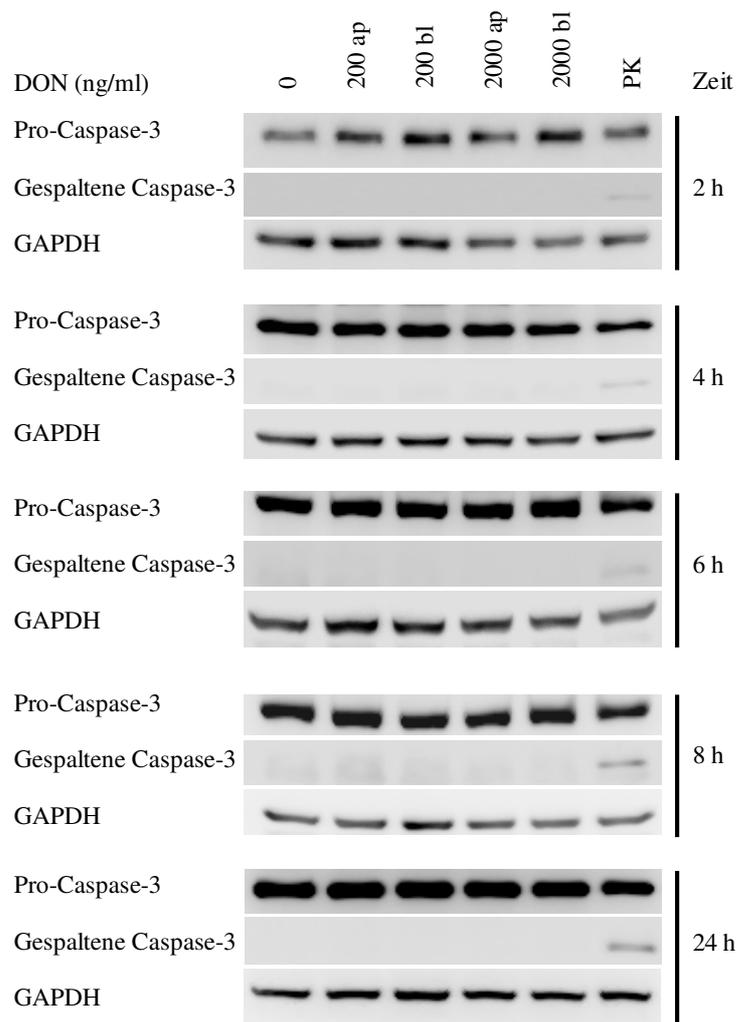


Abbildung 24: Western Blot der Caspase-3-Proteinexpression in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund

Die auf 6-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 2, 4, 6, 8, 24 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die Detektion der Proteinexpressionen der inaktiven Pro-Caspase-3 (35 kDa), der durch Spaltung aktivierten Caspase-3 (19 kDa) sowie der Ladekontrolle GAPDH (37 kDa) erfolgte mittels Western Blot. Als Positivkontrolle (PK) der Apoptose-Induktion wurde Staurosporin (1 μ M für 6 h appliziert) verwendet. Die Abbildung stellt repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Wiederholungen dar.

3.7 Veränderung der Tight Junction-Integrität nach DON-Applikation

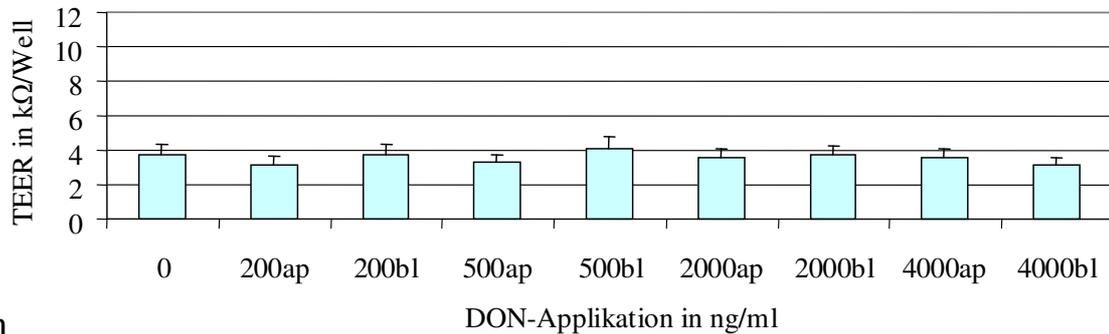
Die Integrität des Zellverbandes wurde mittels transepithelialelektrischen Widerstand (TEER) gemessen und war sehr gut durch die Darstellung der Tight Junction-Proteine (Immunoblot und Immunfluoreszenz) verifizierbar. Durch DON verursachte Störungen der Tight Junction-Protein-Verteilung in den Zellen konnten so dargestellt werden.

3.7.1 Bestimmung der Integrität des IPEC-J2-Zellverbandes nach DON-Exposition (TEER)

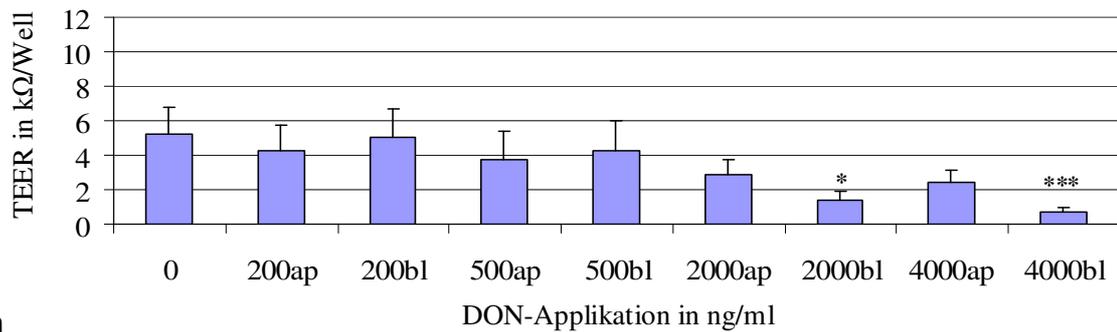
Aufgrunde der Messung des elektrischen Widerstandes an der Membran ist dieser Test technisch nur an Membrankulturen durchführbar. Hierfür wurde nur die Zelllinie IPEC-J2 verwendet (Abb. 25). Wie schon oben beschrieben, blieb der TEER-Wert von unbehandelten Zellkulturen während der gesamten experimentellen Dauer konstant über 1 k Ω /Well (siehe 3.2.2). Die DON-Gabe (0 bis 4000 ng/ml) von apikal ließ den TEER-Wert über den gesamten Untersuchungszeitraum selbst mit der höchsten Konzentration von 4000 ng/ml, nicht unter 1 k Ω /Well absinken. Die basolaterale Applikation der gleichen DON-Konzentration führte dagegen schon nach 24 h zu einem signifikantem Abfall des TEER-Wertes auf unter 1 k Ω /Well. Nach weiterer Verringerung war dieser nach 72 h aufgrund der geringen Rest-Zellzahl fast beim Eigenwiderstand der Membran (ca. 0,11 k Ω /Well) angelangt war. Mit der DON-Konzentration von 2000 ng/ml von basolateral war gleichermaßen ein signifikanter TEER-Abfall bei 72 h zu verzeichnen.

Um die Integrität des Zellverbandes nach DONS-Gabe zu überprüfen, wurde der TEER-Wert in Membrankulturen beider Zelllinien gemessen. Eine bis zu 72-stündige Inkubation mit DONS ließ im Gegensatz zur Inkubation mit gleichen DON-Konzentrationen keinen erkennbaren Abfall der Tight Junction-Integrität oder Zerstörung des Zellverbandes erkennen (Daten nicht gezeigt).

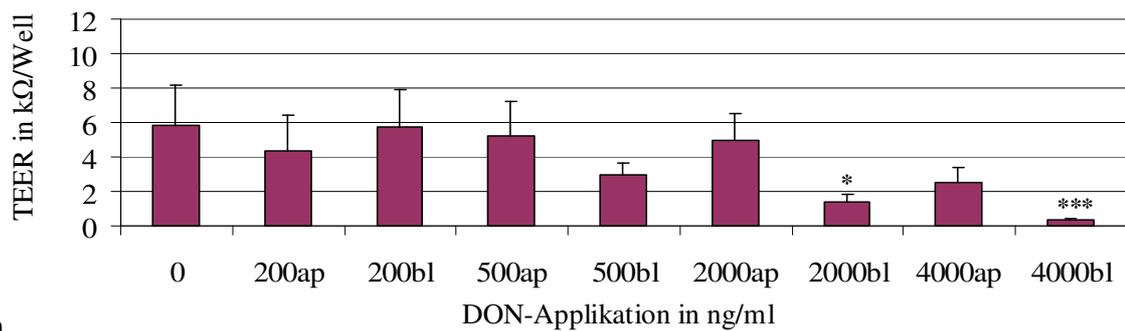
0 h



24 h



48 h



72 h

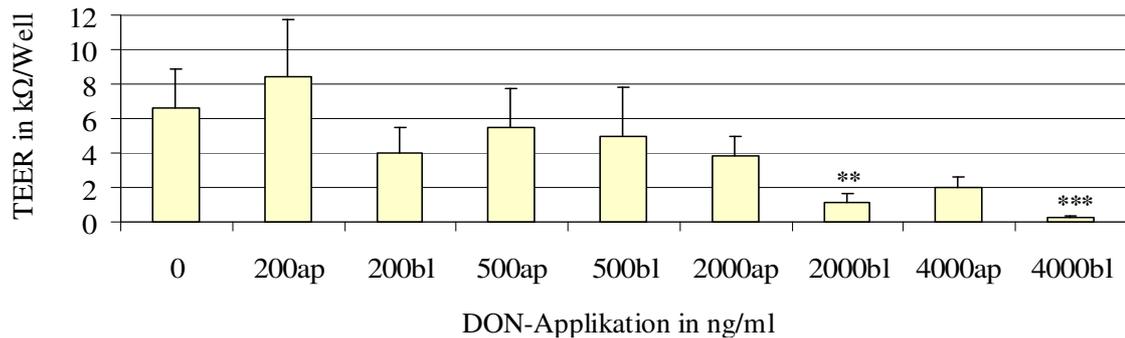


Abbildung 25: Messung des TEER-Wertes von IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200, 500, 2000 oder 4000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal oder basolateral appliziert wurde, inkubiert. Die gemessenen TEER-Werte sind in kΩ/Well (entspricht einer Fläche von 0,3 cm²) angegeben. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.7.2 Zelluläre Verteilung der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 nach DON-Einwirkung

Die zelluläre Verteilung von ZO-1, Claudin-3 und -4, Proteine des Tight Junction-Komplexes, wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht.

In IPEC-1- und -J2-Zellen (kultiviert auf impermeablem Untergrund) wurden die Tight Junctions durch die Immunfluoreszenzfärbung des Proteins ZO-1 an den Grenzen zwischen den einzelnen Zellen sichtbar (Abb. 26). Die Zellen wiesen charakteristische „Pflasterstein“-Struktur (IPEC-1) oder längliche, unregelmäßigere Strukturen (IPEC-J2) auf, die man sehr gut an der unbehandelten Kontrolle, aber auch an den mit 200 ng/ml DON behandelten Zellen, sehen konnte. Die niedrige DON-Konzentration veränderte das ZO-1-Verteilungsmuster auch nach 72-stündiger Inkubation nicht. Die Applikation von 2000 ng/ml DON für 72 h führte zu der vollständigen Auflösung der ZO-1-Struktur an den Zellgrenzen beider Zelllinien.

Die Claudin-3-Verteilung beider Zelllinien auf impermeablem Untergrund entsprach der von ZO-1, die Tight Junctions waren an den Zellrändern erkennbar (Abb. 26). Hier war nach 72 h Inkubation mit der hohen DON-Konzentration 2000 ng/ml in beiden Zelllinien die gänzliche Auflösung der Strukturen zu sehen. Die apikale Applikation und/oder die niedrige DON-Konzentration (200 ng/ml) verursachten keine Störung.

Bei der Analyse der Claudin-4-Expression beider Zelllinien auf impermeablem Untergrund ergab sich eine starke Abschwächung des Fluoreszenzsignals nach 72 h mit der hohen DON-Konzentration 2000 ng/ml in beiden Zelllinien (Abb. 26). Bei apikaler Gabe oder der niedrigen DON-Konzentration von 200 ng/ml war kein Unterschied erkennbar.

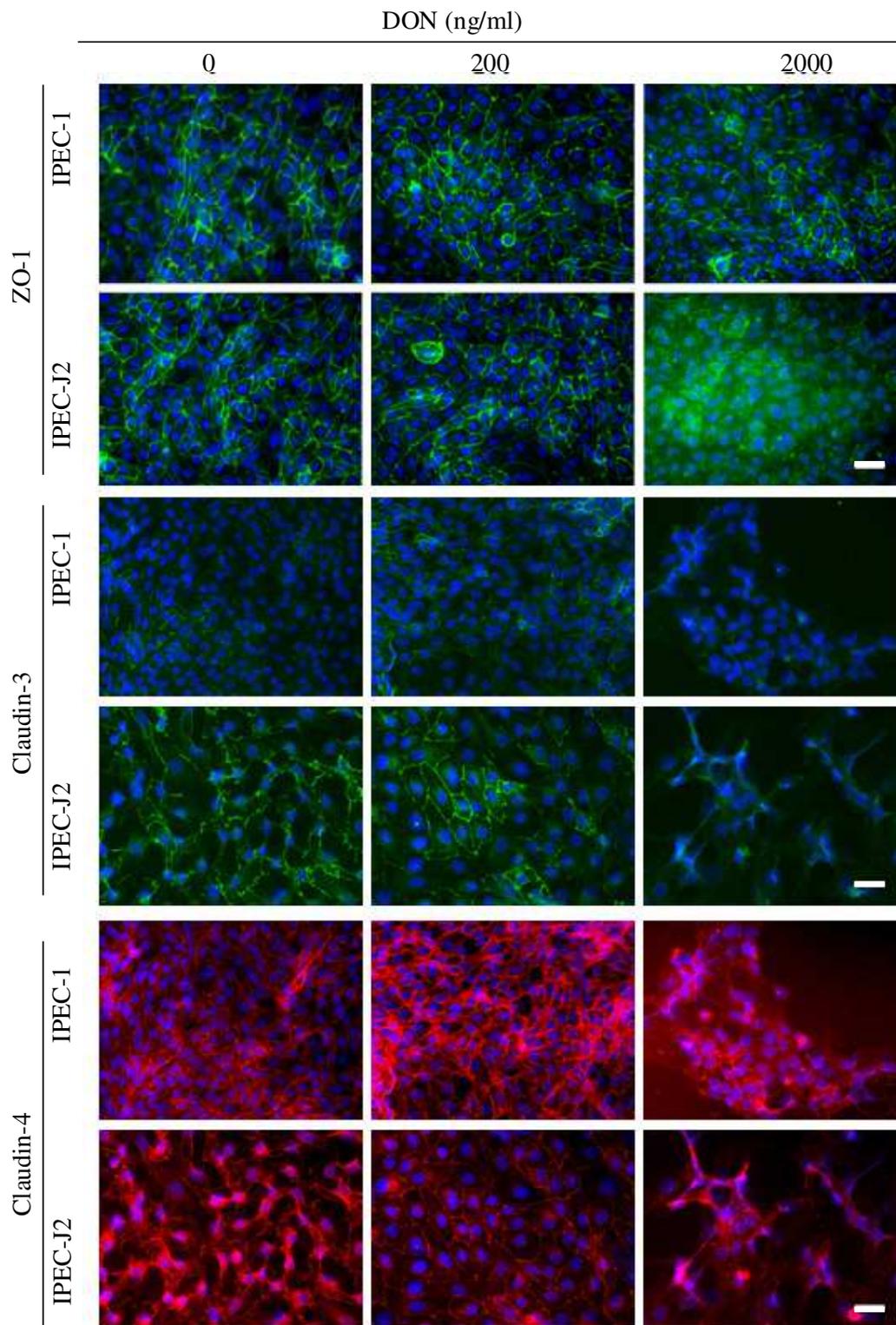


Abbildung 26: Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 72 h mit DON 0, 200 oder 2000 ng/ml in Vollmedium inkubiert. Die Verteilung der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 20-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von drei unabhängigen Wiederholungen, die unter gleicher Belichtungszeit aufgenommen wurden. Maßstabsbalken: 10 μ m

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde auch für die auf permeablem Untergrund angezogenen und einer gerichteten DON-Applikation (0 oder 2000 ng/ml) ausgesetzten IPEC-J2-Zellen durchgeführt. Bei keinem der drei untersuchten Tight Junction-Proteine (ZO-1, Claudin-3 und -4) war nach apikaler DON-Applikation eine Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektierbar.

Wie bei den Zellen auf impermeablem, war ZO-1 auf permeablem Untergrund ebenfalls kontinuierlich um jede einzelne Epithelzelle als Zellbegrenzung zu sehen (Abb. 27). Für ZO-1 konnte keine Veränderung des Verteilungsmusters nach 72 h Inkubation um die Zellen beobachtet werden, unabhängig von der Richtung der DON-Applikation. Allerdings waren bei der hohen DON-Konzentration zu diesem Zeitpunkt fast keine Zellen mehr auf der Membran sichtbar, nur kleine umrandete Zellinseln waren zu finden.

Interessanterweise zeigte die DON-Richtung im Gegensatz zu ZO-1 eine sehr viel gravierendere Wirkung auf die Claudin-3-Verteilung (Abb. 27). Unter apikalen Behandlungsbedingungen ist dieses Protein als kontinuierliche Linie um die Zellen sichtbar und wird nach 72 h mit DON 2000 ng/ml von basolateral gänzlich zerstört.

Auch die Verteilung von Claudin-4 war als Zellumrandung erkennbar (Abb. 27). Sie verschwand nach 72 h Inkubation mit der hohen DON-Konzentration 2000 ng/ml von basolateral. Die apikale DON-Gabe hatte auch hier keinen sichtbaren Einfluss.

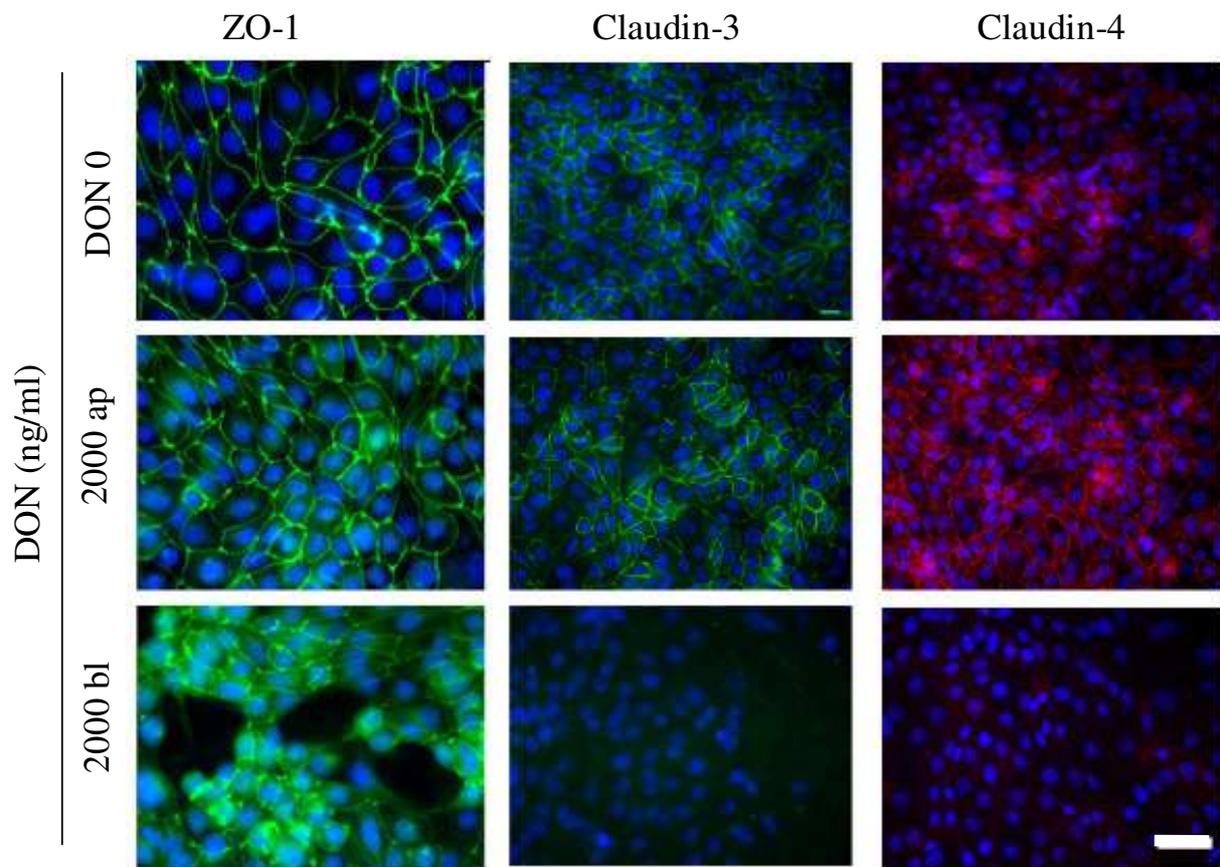


Abbildung 27: Darstellung der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPEC-J2-Zellen nach 72-stündiger, gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund

Die auf 12-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 72 h mit DON (2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die zelluläre Expression der Tight Junction-Protein ZO-1, Claudin-3 und -4 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 40-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert, die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente und wurden unter gleicher Belichtungszeit in der Mitte einer jeden Membran aufgenommen. Maßstabsbalken: 50 μ m

3.7.3 Western Blot-Analyse der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4

Um die Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 zu untersuchen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde das *house keeping*-Proteins der Glykolyse, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), mitgeführt.

Die Ergebnisse der auf impermeablem Untergrund mit DON inkubierten IPEC-1- und -J2-Zellen sind in Abb. 28 zusammengestellt. Für ZO-1 wurde im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ein leichter Rückgang der Proteinmenge in beiden Zelllinien nach der Behandlung mit DON 2000 ng/ml beobachtet. Im Gegensatz zu dem drastischen Effekt von

2000 ng/ml DON, der in der Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.7.2) zu verzeichnen war, verhielt sich die Reduzierung der ZO-1-Menge ab 48 h in der Protein-Expression moderat. Wie auch in der Immunfluoreszenz gesehen, reduzierte die Applikation von 200 ng/ml DON das Signal im Western Blot nicht. Der Immunoblot von Claudin-3 zeigte das vollständige Verschwinden der Proteinbande schon nach 24 h Inkubation mit der hohen DON-Konzentration in beiden Zelllinien an. Das geht mit der Immunfluoreszenzfärbung einher. Die Claudin-4-Proteinexpression reduzierte sich merklich im Zeitverlauf mit der hohen DON-Konzentration in beiden Zelllinien, jedoch nicht so stark wie im Falle von Claudin-3. Bei beiden Claudin-Proteinen war wie in der Immunfluoreszenz keine Verringerung der Bandenintensität bei niedrigeren DON-Konzentrationen in den IPECs erkennbar. Das als Ladekontrolle mitgeführte GAPDH verringerte sich in IPEC-J2-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit der hohen DON-Konzentration leicht. Allerdings wurden schon in der Immunfluoreszenz nur noch vereinzelte Zellinseln gesehen und bei der Zellzahlbestimmung gezählt, sodass diese verminderte Bandenintensität auf den verringerten Gesamtproteingehalt der Probe und nicht auf direkten DON-Einfluss zurückzuführen ist.

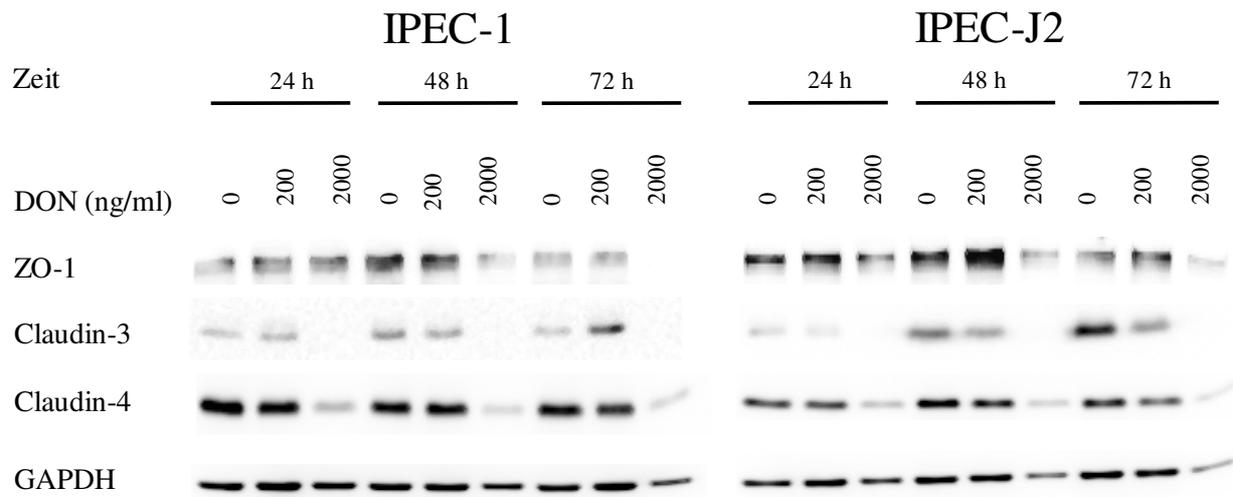


Abbildung 28: Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPECs auf impermeablem Untergrund

Die auf 6-Well-Plastikplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Die Proteinexpressionen von ZO-1 (225 kDa), Claudin-3 und -4 (beide 22 kDa) sowie der Ladekontrolle GAPDH (37 kDa) wurden mittels Immunoblot detektiert. Die Abbildung stellt repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Wiederholungen dar.

Die Untersuchung der Expression der drei Tight Junction-Proteine im Western Blot erfolgte auch nach gerichteter DON-Applikation für IPEC-J2-Zellen, die auf permeablem Untergrund angezogen worden waren (Abb. 29). Bei allen drei untersuchten Tight Junction-Proteinen war wie in der Immunfluoreszenz (siehe 3.7.2) keine Verringerung der Bandenintensität bei apikaler DON-Gabe erkennbar. Für ZO-1 wurde nach basolateraler Applikation von DON 2000 ng/ml keine Signaländerung detektiert. Der Immunoblot von Claudin-3 zeigte das vollständige Verschwinden der Proteinbande schon nach 24 h Inkubation mit der hohen DON-Konzentration von basolateral im Gegensatz zu apikaler DON-Gabe an. Die Claudin-4-Proteinexpression reduzierte sich kaum merklich im Zeitverlauf mit der hohen DON-Konzentration von basolateral.

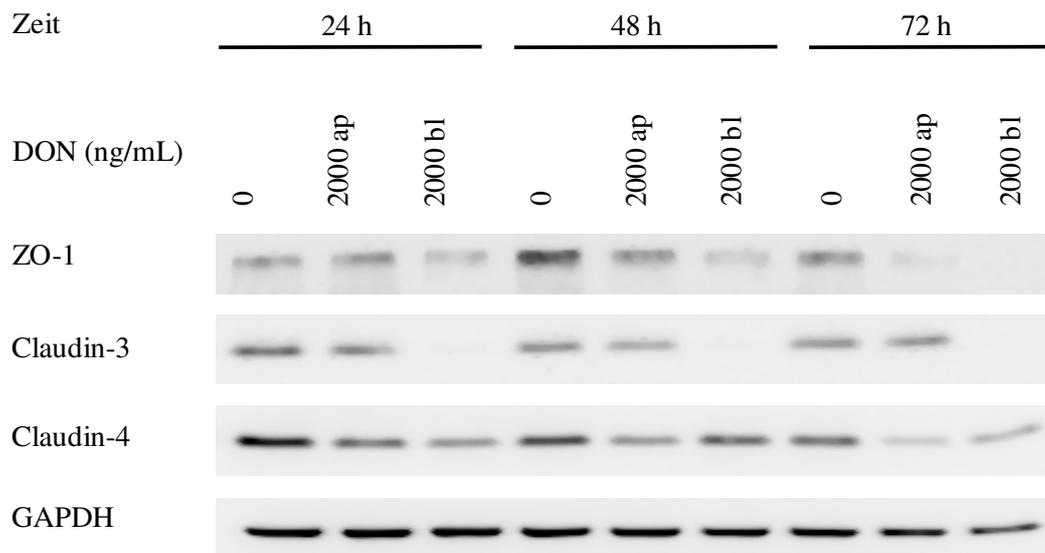


Abbildung 29: Einfluss von DON auf die Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 in IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund

Die auf 6-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well); wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (0 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die Proteinexpressionen von ZO-1 (225 kDa), Claudin-3 und -4 (beide 22 kDa) sowie der Ladekontrolle GAPDH (37 kDa) wurden mittels Immunoblot detektiert. Die Abbildung stellt repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Wiederholungen dar.

3.8 Wirkungen geringer DON-Konzentrationen über längere Zeiträume auf IPECs

Da in der landwirtschaftlichen Praxis die Tiere oft über längere Zeiträume chronisch mit geringen DON-Konzentrationen im Futter belastet sind, wurde im Folgenden untersucht wie sich die geringen DON-Konzentrationen, die in der 72 h-Kultur *in vitro* fast keinen Effekt zeigten, über einen längeren Zeitraum von 14 Tagen auf die IPECs auswirkten.

3.8.1 IPEC-J2-Zellanzahl nach Langzeit-DON-Exposition

Für die Untersuchung der Zellzahl nach 14-tägiger DON-Applikation wurden die Zellen auf permeablem Untergrund mit gerichteter DON-Applikation angezogen. Die Zellkerne wurde mit Hämatoxilin angefärbt, um die Zellzahl direkt und ohne Verluste bestimmen zu können (siehe 2.6.3). Die durchschnittlichen Gesamtzellzahlen nach Langzeit-DON-Applikation sind in Abb. 30 dargestellt. Die Anzahl der Zellen auf den Membranen sank bei der basolateral einwirkenden Konzentration von 200 ng/ml DON leicht ab, signifikant wurde die reduzierte Zellanzahl aber erst ab 500 ng/ml DON von basolateral. Alle analysierten DON-Konzentrationen, die von apikal gegeben wurden, verursachten keine Zellzahlabnahme.

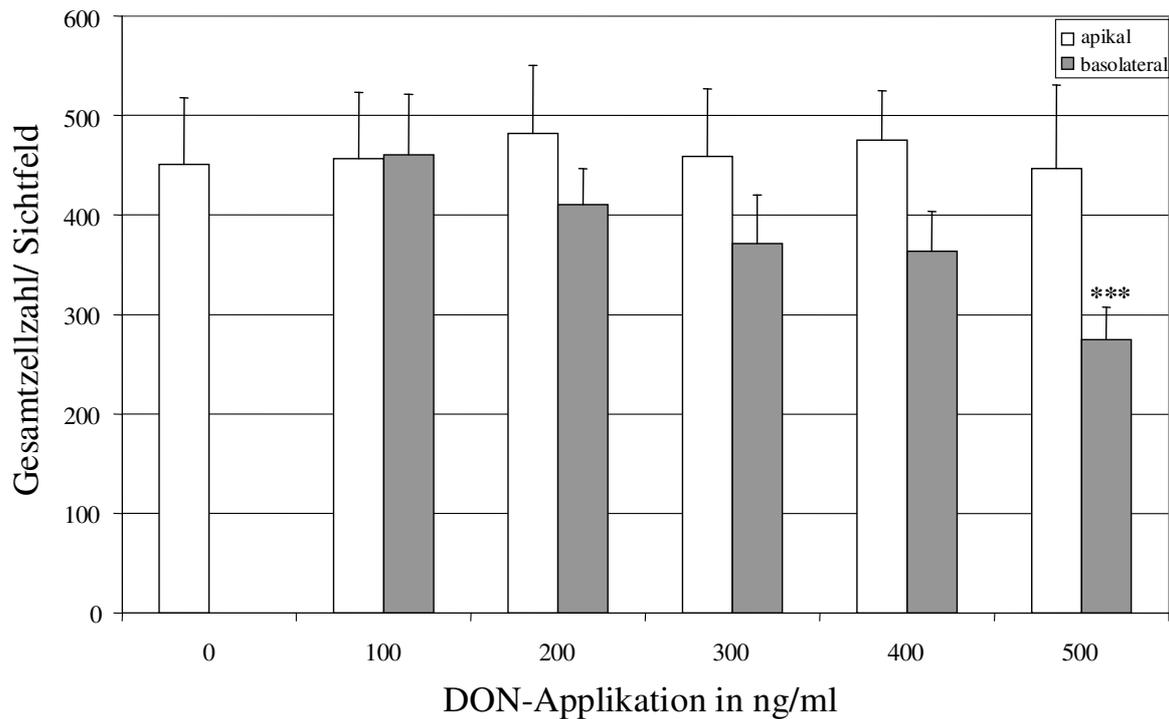


Abbildung 30: Gesamtanzahl von IPEC-J2-Zellen nach Langzeit-DON-Applikation auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen wurden für 14 d mit DON (0 bis 500 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Es erfolgte eine mikroskopische Auswertung mit Auszählung der Hämatoxylin-gefärbten Zellkerne drei repräsentativer Sichtfelder. Jede Säule stellt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten dar (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.8.2 Stoffwechselfunktion von IPECs nach Langzeit-DON-Exposition auf impermeablem Untergrund

Konfluente Zellverbände beider Zelllinien auf impermeablem Untergrund wurden mit geringen DON-Konzentrationen (0 - 500 ng/ml) über 14 Tage inkubiert und auf die Stoffwechselaktivität hin untersucht (Abb. 31). Die Exposition von 200 – 500 ng/ml DON für 14 Tage schwächte das MTT-Signal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant ab. Konzentrationen unter 200 ng/ml hatten keinen signifikanten Effekt auf die zelluläre Stoffwechselaktivität.

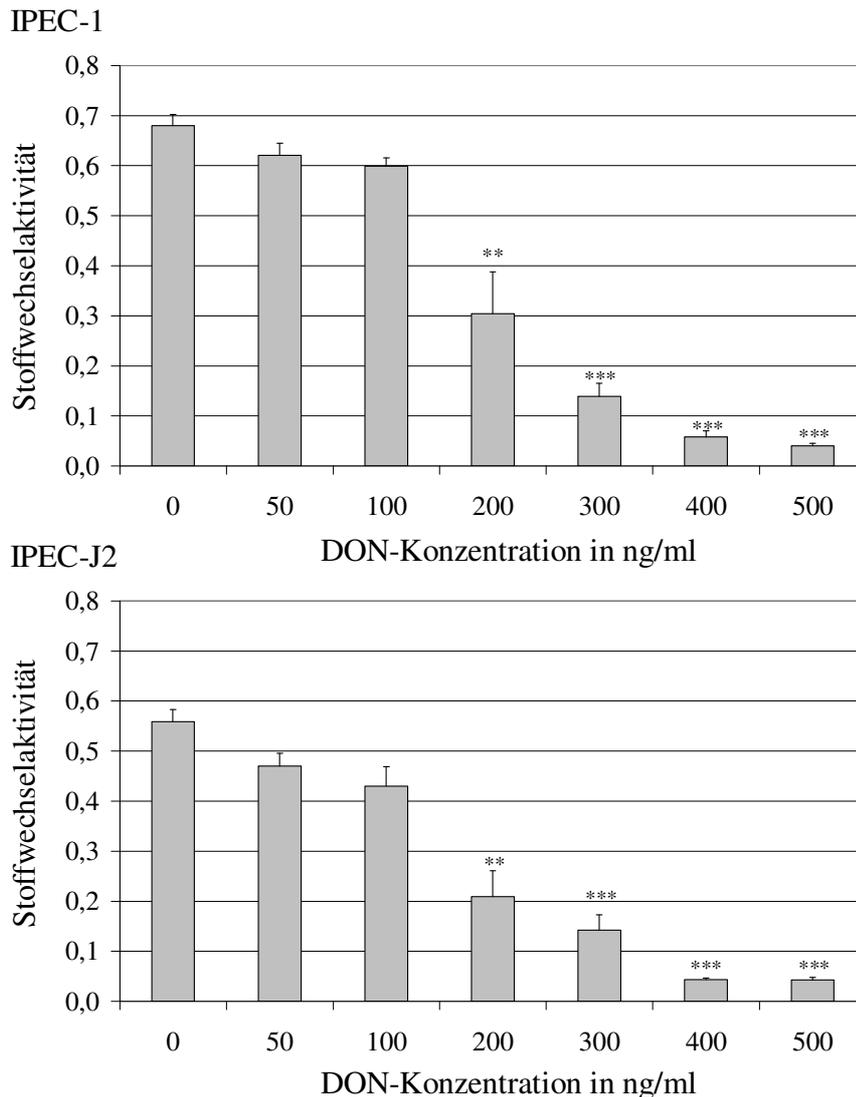


Abbildung 31: Stoffwechselaktivität von IPECs nach Langzeit-DON-Inkubation auf impermeablem Untergrund

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 14 d mit geringen DON-Konzentrationen (0 bis 500 ng/ml) in Vollmedium inkubiert, die alle 3 d gewechselt wurden. Die Reduktion von MTT wurde nach Lyse des Formazan-Farbstoffs bei einer Absorption von 450 nm gemessen. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von drei unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.8.3 Proliferationsänderung von IPECs nach Langzeit-DON-Exposition

Konfluente Zellverbände beider Zelllinien auf impermeablem Untergrund wurden mit geringen DON-Konzentrationen über den längeren Zeitraum von 14 Tagen mittels BrdU-ELISA auf die Änderung der Proliferationsrate geprüft (Abb. 32). Die Kapazität des BrdU-Einbaus war nach der Applikation von 300 ng/ml oder mehr signifikant reduziert. Wie schon für die kurzzeitige Einwirkung geringer DON-Konzentrationen beschrieben (siehe 3.4.1), wurde auch hier beobachtet, dass die niedrigen DON-Konzentrationen (50 und 100 ng/ml) einen leichten

Anstieg der zellulären Proliferation im Vergleich zur Kontrolle auslösen, der allerdings nicht signifikant war.

An IPEC-J2-Membrankulturen wurden auch immunzytochemische BrdU-Färbungen auf Einzelzellniveau durchgeführt. Allerdings zeigte die gerichtete DON-Exposition über die längere Zeit keine signifikanten Änderungen der Proliferationsrate (Abb. 43, siehe Anhang).

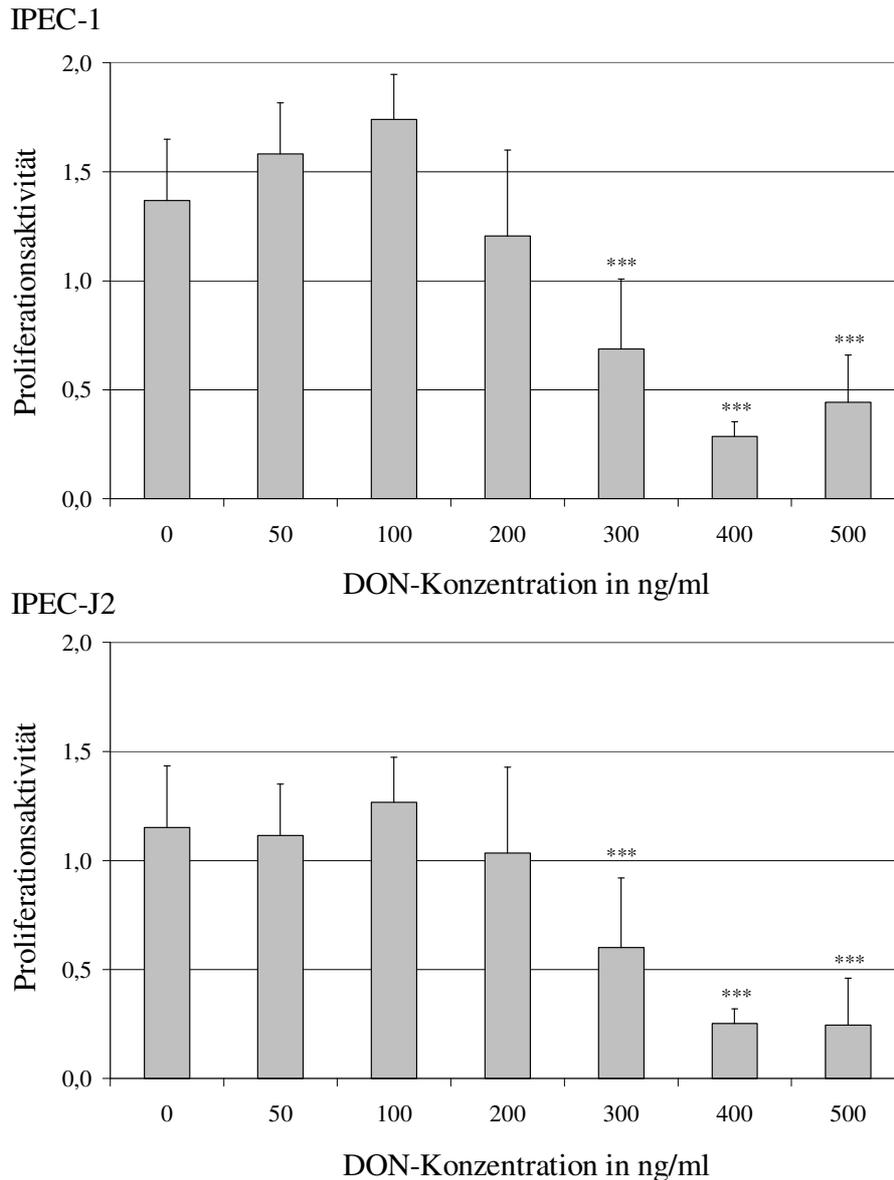


Abbildung 32: Proliferation von IPECs nach Langzeit-Behandlung mit geringen DON-Konzentrationen auf impermeablem Untergrund (BrdU-ELISA)

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 14 d mit steigenden DON-Konzentrationen (0 bis 500 ng/ml) in Vollmedium inkubiert, die alle 3 d gewechselt wurden. Der Einbau von BrdU (für 6 h gegeben) wurde mittels BrdU-ELISA bei einer Absorption von 570 nm gemessen. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von drei unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.8.4 Integrität des IPEC-J2-Zellverbandes nach Langzeit-DON-Exposition

Die Untersuchung der Tight Junction-Integrität nach längerer Inkubation (14 Tage) mit geringen DON-Dosen (0 bis 500 ng/ml) von apikal oder basolateral wurde an IPEC-J2-Zellen auf permeablem Untergrund durchgeführt (Abb. 33). Vor der DON-Applikation (Tag 0) sowie täglich während der 14-tägigen DON-Inkubation wurde die Integrität des Zellverbandes überprüft, indem der TEER-Wert gemessen wurde. Bei apikaler Applikation hatte lediglich die Konzentration von 500 ng/ml ab Tag 8 einen signifikanten, negativen Effekt auf die Tight Junction-Integrität, während bei basolateraler Gabe schon eine Konzentration von 300 ng/ml (Tag 14) eine signifikante Reduktion, also die Zerstörung der Integrität des Epithelzellverbandes verursachte. DON 400 ng/ml von basolateral hat ab Tag 7 und DON 500 ng/ml schon ab Tag 3 eine signifikante Verminderung des TEER-Wertes zur Folge.

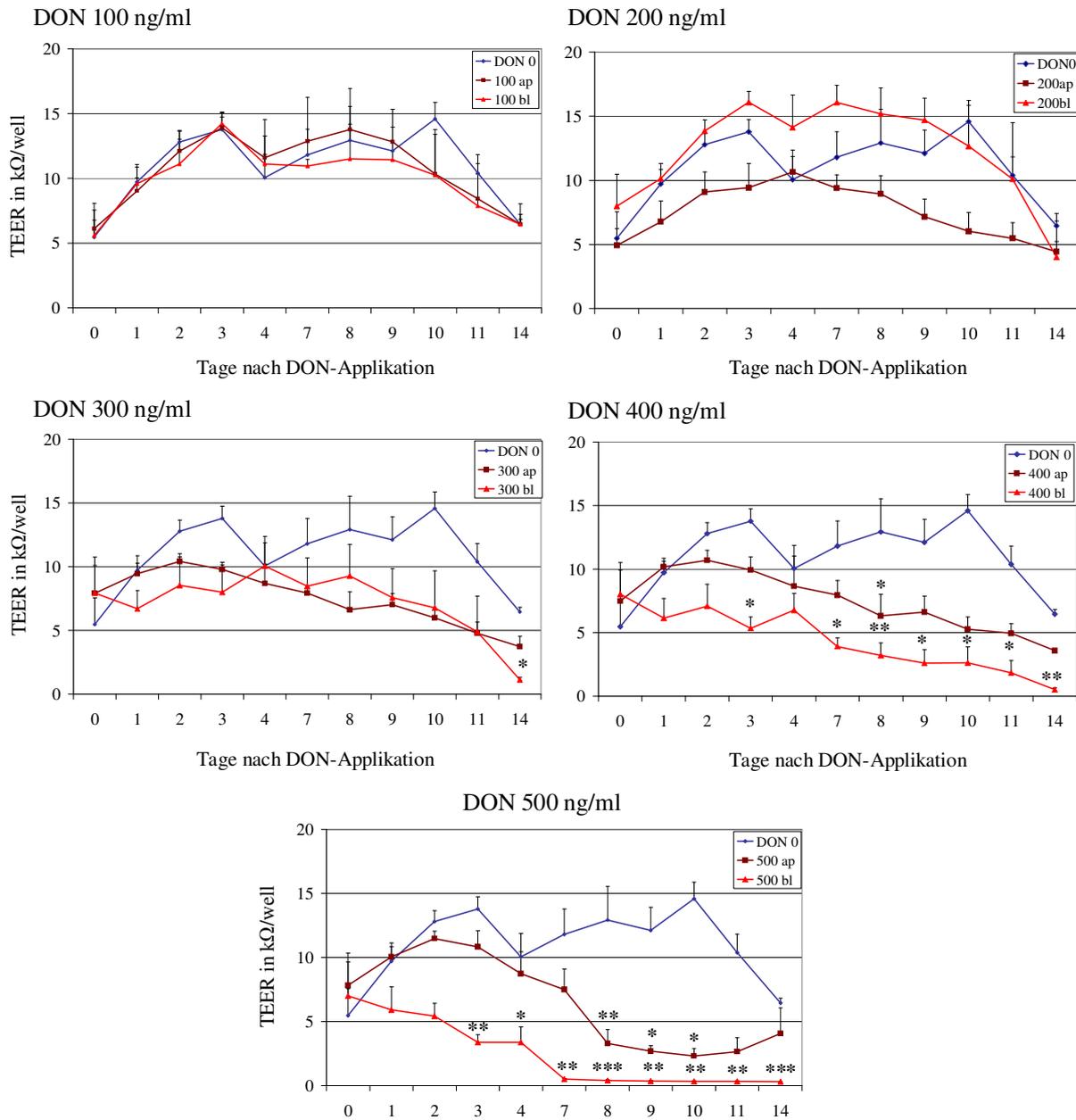


Abbildung 33: Zeitverlauf des TEER-Wertes von IPEC-J2-Zellen unter gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen ausgesäten IPEC-J2-Zellen wurden nach Konfluenz (4 d, entspricht Tag 0) mit steigenden DON-Konzentrationen (0 bis 500 ng/ml) für 14 Tage in Vollmedium inkubiert. Die Applikation erfolgte entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl). Die gemessenen TEER-Werte sind in $k\Omega/\text{Well}$ (entspricht einer Fläche von $0,3 \text{ cm}^2$) angegeben. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.9 Ergebnisübersicht

Um einen Überblick über die beschriebenen DON-Wirkungen auf die IPECs zu erhalten, wurden die untersuchten zellphysiologischen Parameter in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 3-1).

Tabelle 3-1: Ergebnisübersicht der untersuchten zellphysiologischen Parameter vergleichend auf impermeablem und permeablem Untergrund*

Untersuchter Parameter	Wirkung von DON (ng/ml) auf IPEC-1 und -J2 impermeabler Untergrund		Wirkung von DON (ng/ml) auf IPEC-J2 permeabler Untergrund	
	IPEC-1	IPEC-J2	apikal	basolateral
Zellviabilität				
Zellmorphologie (Hellfeld)	X ab 24 h 2000	X ab 24 h 2000		n. d.
Zellzahlbestimmung (Hämatoxilin)	↓ ab 24 h 2000	↓ ab 48 h 2000	↔	↓ ab 72 h 2000 bl
Neutralrot-Aufnahme	↓ ab 24 h 300 + 48 h 200	↓ ab 24 h 200 + 48 h 100		n. d.
Stoffwechselaktivität (MTT-Test)	↓ ab 24 h 400 + 72 h 300	↓ ab 24 h 400		n. d.
Proliferationsaktivität	biphasisch	biphasisch		
-BrdU-ELISA	↑ ab 48 h 200 ↓ ab 24 h 2000 + 48 h 1000	↑ bei 72 h 200 ↓ ab 72 h 2000		n. d.
-BrdU-Immunzytochemie	↑ ab 24 h 200 ab 48 h	↔ ab 48 h	↔	↑ ab 48 h 2000 bl ab 48/ 72 h
Analyse des Zellzyklus (FACS)	PräG1↑, G0/G1↓, S↑, G2/M↑	G0/G1↓, G2/M↑		PräG1↑, G0/G1↓, S↑, G2/M↑
Zelltod				
- Nekrose				
-LDH-Freisetzung	↔	↔	↔	↔
- Apoptose				
-Caspase-3/7-Aktivität	↑ bei 6, 8 + 72 h 2000	↑ bei 6 + 8 h 2000	↔	↑ bei 6 h 2000 bl
-Caspase-3-Expression (Western Blot)	↑ bei 6 + 8 h 2000	↑ bei 6 + 8 h 2000	↔	↔
Tight Junction-Integrität				
Konfluenz (TEER-Messung)		n. d.	↔	↓ ab 24 h 4000 bl + 72 h 2000 bl
TJ-Proteine (Immunfluoreszenz)				
-ZO-1, Claudin-3 und -4	X ab 24/ 48 h 2000	X ab 24/ 48 h 2000	↔	X ab 24 h 2000 bl
Expression TJ-Proteine (Western Blot)				
-ZO-1, Claudin-3 und -4	Claudin-3+4: X ab 24 h 2000 ZO-1: X ab 48 h 2000	Claudin-3+4: X ab 24 h 2000 ZO-1: X ab 48 h 2000	↔	Claudin-3: X ab 24 h 2000 bl ZO-1: ↔
Langzeit-DON-Wirkung				
Stoffwechselaktivität (MTT-Test)	↓ nach 14 d 200	↓ nach 14 d 200		n. d.
Proliferation (BrdU-Einbau)	↓ nach 14 d 300	↓ nach 14 d 300	↔	↓ ab 300 ab 7 d 500 bl, 8 d 400 bl, 10 d 300 bl
TJ-Integrität (TEER-Messung)		n. d.	ab 8 d 500	
Wirkung von DON-Derivaten				
Stoffwechselaktivität (MTT-Test)	↔	↔		n. d.
Lysosomenfunktion (Neutralrot)	↔	↔		n. d.
Proliferation (BrdU-ELISA)	↔	↔		n. d.

*Angaben sind Inkubationszeiten in h, bzw. d und DON-Konzentrationen in ng/ml

Signifikante oder deutlich sichtbare Schädigung (X), signifikante Abnahme (↓), signifikanter Anstieg (↑), ↔ = kein Effekt, n.d. = nicht durchgeführt, TJ = Tight Junction

3.10 Analyse der differentiellen Genexpression in IPEC-J2-Zellen nach DON-Exposition auf permeablem Untergrund

Die Analyse der Genexpression DON-behandelter IPEC-J2-Zellen hatte zum Ziel, eine Liste von Kandidatengen zu erstellen, die in Antwort auf die Toxin-Einwirkung differentiell exprimiert werden. Diese Daten sollten Aufschluss über DON-vermittelte zelluläre Reaktionen liefern. Die Genexpressionsprofile wurden nach 72 h Inkubationszeit mit richtungsspezifisch appliziertem DON geringer (200 ng/ml) oder hoher Konzentration (2000 ng/ml) mittels Microarray-Analyse erstellt und in der qPCR verifiziert. Die vier DON-Behandlungsgruppen (200 apikal, 200 basolateral, 2000 apikal und 2000 basolateral) wurden auf die unbehandelte Kontrolle bezogen, um signifikante Unterschiede festzustellen.

3.10.1 Microarray-Analyse von DON-behandelten IPEC-J2-Zellen

Vor der Durchführung der Microarray-Analyse wurde der IPEC-J2-Zellverband auf Konfluenz und Tight Junction-Integrität vor und nach 72-stündiger DON-Inkubation mittels TEER-Messung überprüft (Abb. 53, siehe Anhang). Um genügend mRNA isolieren zu können, wurden die Versuche auf 6-Well-Membrankultureinsätzen durchgeführt. Die Behandlung mit 2000 ng/ml DON von basolateral über 72 h zeigte einen signifikanten Abfall des TEER-Wertes unter den kritischen Schwellenwert, was die Zerstörung der Tight Junction-Verbindungen des Zellverbandes anzeigte. Die Kulturen der anderen drei DON-Behandlungsgruppen (200 ng/ml von apikal und basolateral sowie 2000 ng/ml von apikal) zeigten vor (Startpunkt 0 h) genauso wie nach 72 h Behandlung einen intakten Zellverband mit TEER-Werten über dem kritischen Schwellenwert von 1 k Ω /Well. Diese auf 6-Well-Membrankultureinsätzen erhaltenen Resultate stehen im Einklang mit den TEER-Ergebnissen der 24-Well-Membrankultureinsätze (siehe 3.7.1). Auch auf den kleineren Membrankultureinsätzen sank der TEER mit Konzentrationen von 2000 ng/ml DON von basolateral nach 72 h signifikant ab.

Die auf mRNA-Niveau erhobene Microarray-Analyse zeigte ein gänzlich anderes Reaktionsmuster der DON-Behandlungsgruppen als die funktionalen TEER-Messungen. Auf den genutzten Microarray-Chips waren 14794 relevante Transkripte vorhanden (annotiert und nicht-annotiert). Die Datenanalyse des Expressionsprofils ergab signifikante Unterschiede der Transkriptexpression (hoch- und herunterregulierte Gene) zwischen den vier DON-Behandlungsgruppen und der unbehandelten Kontrolle (Abb. 34). Im Gegensatz zu der phy-

siologischen epithelialen Integrität (stabiler TEER) waren die stärksten Effekte auf mRNA-Expressionsniveau mit DON 200 ng/ml von basolateral (2539 veränderte Gene) und 2000 ng/ml von apikal (3589 veränderte Transkripte) zu finden. Die apikale Applikation von DON 200 ng/ml verursachte zehnfach geringere Veränderungen (267 veränderte Gene) als die basolaterale Applikation. Die einzige Behandlungsgruppe mit signifikanter Abnahme des TEER-Wertes (Zusammenbruch der epithelialen Integrität), DON 2000 ng/ml von basolateral ging bemerkenswerterweise nicht mit einer starken Änderung der Genexpression (669 veränderte Gene) einher. Außer in der letztgenannten Behandlungsgruppe wurde der größte Anteil an Transkripten nach DON-Behandlung intakter Zellverbände hochreguliert.

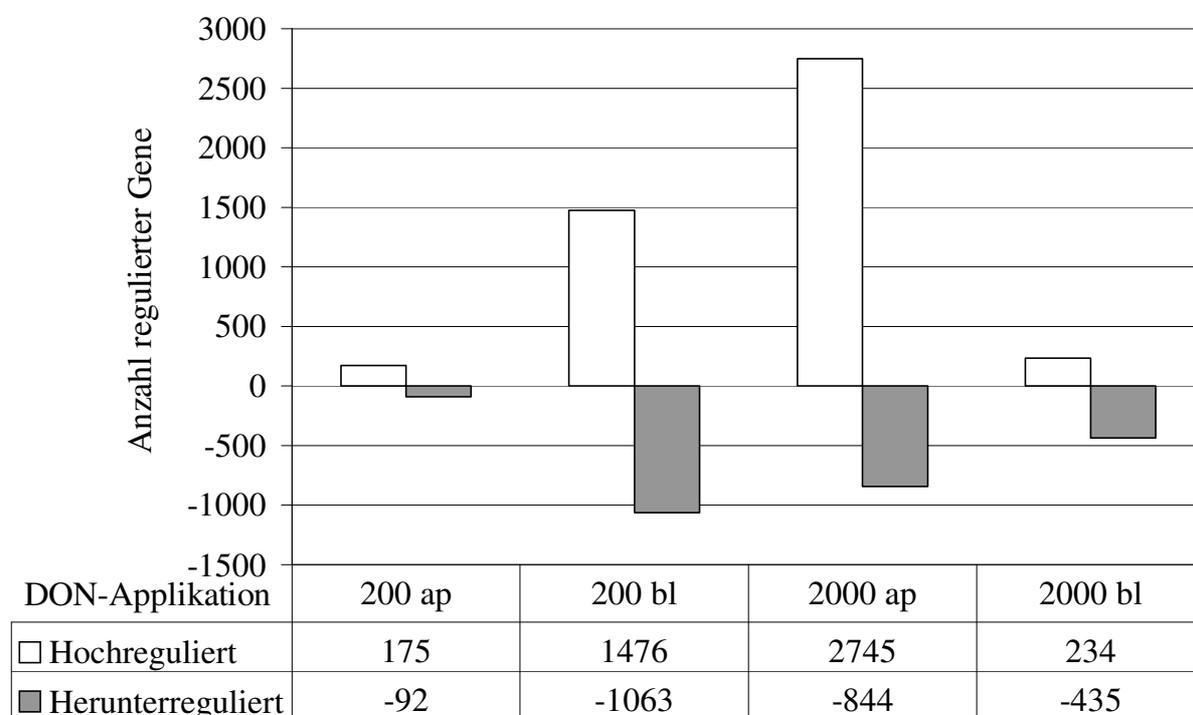


Abbildung 34: Anzahl der im Microarray signifikant veränderten Gene, ausgehend von 14794 Transkripten in IPEC-J2 nach gerichteter DON-Behandlung

Die Säulen zeigen signifikant veränderte Gene in IPEC-J2, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 72 h richtungsspezifischer DON-Applikation (apikal (ap) oder basolateral (bl)) hoch- oder herunterreguliert wurden. Die Microarray-Analyse beinhaltete drei unabhängige Experimente.

Bei der Zusammenfassung der differenziell exprimierten Gene wurde die Schnittmenge der identischen Gene gebildet, die in jeweils zwei DON-Behandlungsgruppen reguliert wurden. Abbildung 35 A–E zeigt diese als Venn-Diagramme. Die basolaterale Applikation der geringen DON-Konzentration führte im Vergleich zu apikaler Exposition zu einer zehnfachen Erhöhung der regulierten Gene. Fast die Hälfte der signifikant regulierten Gene der niedrigen DON-Konzentration von apikal (123 von 267) wurde auch bei Einwirkung von basolateral

gefunden (Abb. 35 A). Ein ähnliches Reaktionsmuster zeigte sich bei apikaler DON-Applikation. Von 267 Genen waren 122 bei beiden DON-Konzentrationen zu finden (Abb. 35 C). Die Schnittmenge der in beiden Applikationsgruppen der hohen DON-Konzentration regulierten Gene liegt bei 411 (Abb. 35 B). Die basolaterale DON-Einwirkung ergab für die geringe und die hohe Konzentration eine Übereinstimmung in 397 Genen (Abb. 35 D). Die beiden Gruppen mit den meisten regulierten Genen (200 ng/ml von basolateral mit 2539 und 2000 ng/ml von apikal mit 3589) zeigten eine Übereinstimmung in 1513 regulierten Genen (Abb. 35 D).

Zur Strukturierung der gewonnenen Daten wurde mittels des bioinformatischen Programmes DAVID eine funktionelle Clusteranalyse durchgeführt. Die humanen Annotationen der nach DON-Behandlung signifikant hoch- oder herunterregulierten Gene wurden separat in die Datenbank geladen. Die Analyse der gefilterten Gene zeigte eine biochemische Einteilung in relevante KEGG-Stoffwechselwege, die in den vier DON-Behandlungsgruppen verschiedenartig reguliert wurden (Tab. 3-2). Bemerkenswert war, dass in allen vier Behandlungsgruppen einheitlich, unabhängig von der DON-Wirkungsrichtung oder -Konzentration die biochemischen Stoffwechselwege des Spliceosoms hoch- und von Ribosomen herunterreguliert wurden. Keine weiteren Stoffwechselwege wurden so gleichsinnig von DON beeinträchtigt wie diese beiden. Die meisten regulierten Gene wurden in den Gruppen DON 200 ng/ml von basolateral sowie 2000 ng/ml von apikal gefunden. Neben dem Spliceosom und dem Ribosom wurden in beiden Gruppen der Citratzyklus, der Folat-Biosyntheseweg, die Lysosomen und die fokale Adhäsion beeinträchtigt (siehe Abb. 35 E). Die basolaterale Applikation beider Konzentrationen zog neben Spliceosom und Ribosomen mit der Wirkung auf die Ubiquitinvermittelte Proteolyse, das Proteasom, den RNA-Abbau, die fokale Adhäsion und die Tight Junctions die meisten betroffenen Stoffwechselwege nach sich (Abb. 35 C). Die richtungsspezifische Applikation der hohen Konzentration wirkte sich neben Spliceosom und Ribosomen noch auf die Endozytose und fokale Adhäsion aus (Abb. 35 D). Die apikale Gabe beider Konzentrationen oder die richtungsspezifische Gabe von 200 ng/ml DON führte zu keiner anderen gleichsinnigen Beeinträchtigung als auf Spliceosom und Ribosomen (Abb. 35 A und B).

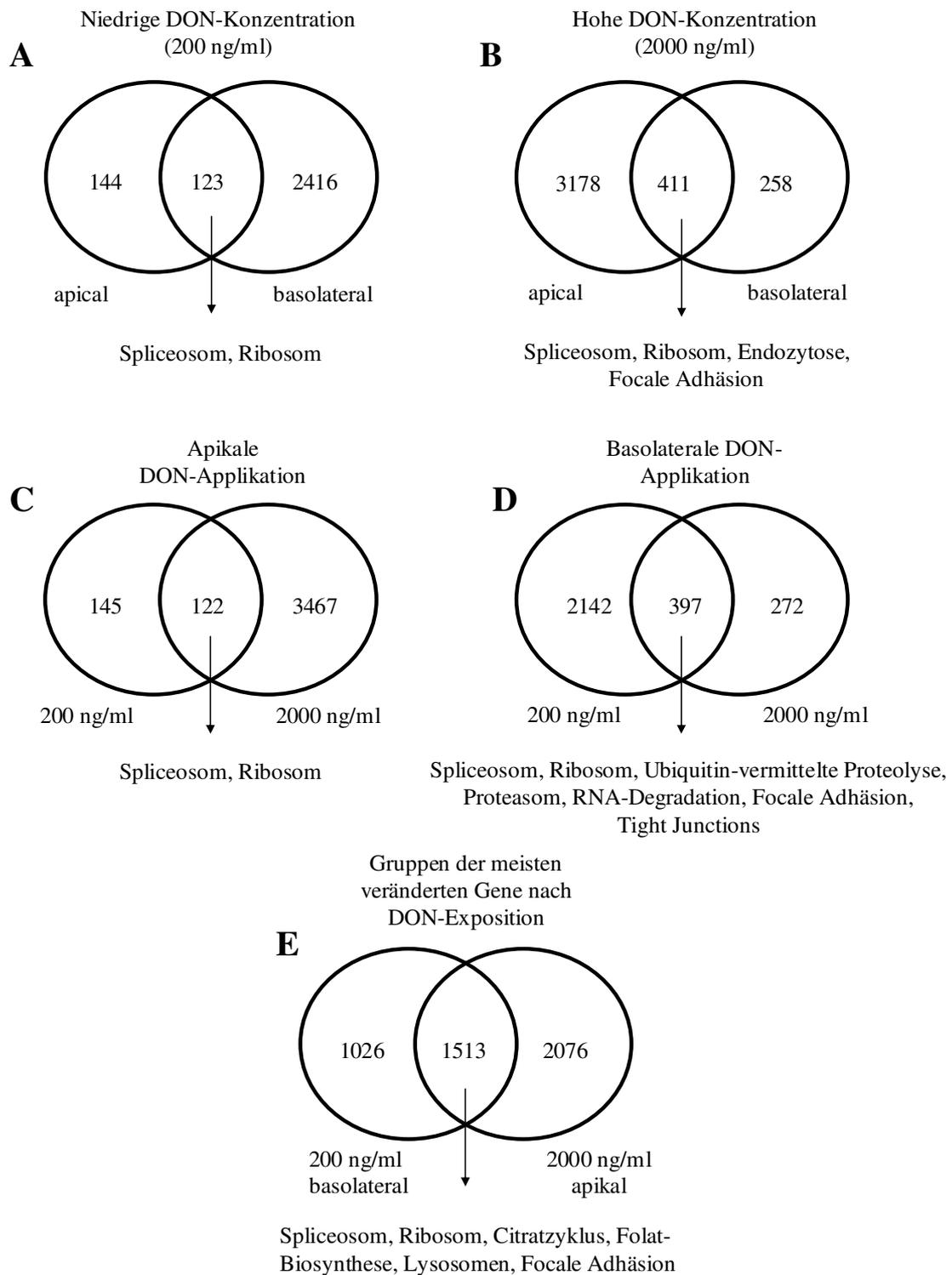


Abbildung 35: Angabe der Schnittmenge von gleichsinnig regulierten Genen jeweils zweier DON-Behandlungsgruppen in Venn-Diagrammen

Anzahl und Schnittmenge der signifikant regulierten Gene der: A) niedrigen DON-Konzentration 200 ng/ml von apikal und basolateral, B) hohen DON-Konzentration 2000 ng/ml von apikal und basolateral, C) apikalen DON-Einwirkungsrichtung mit 200 und 2000 ng/ml, D) basolateralen DON-Einwirkungsrichtung mit 200 und 2000 ng/ml, E) Gruppen mit den meisten regulierten Genen 200 ng/ml basolateral und 2000 ng/ml apikal. Gleiche KEGG-Stoffwechselwege der Schnittmengen sind angegeben und mit einem Pfeil markiert.

Bei Betrachtung der veränderten Stoffwechselwege unabhängig von der DON-Konzentration oder -Einwirkungsrichtung (Tab. 3-2) fällt auf, dass neben den essenziellen biochemischen Stoffwechselwegen des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung auch die Synthesewege von Nukleotiden, Aminosäuren, Glycanen, Cofaktoren und Vitaminen beeinträchtigt wurden. Wie schon im MTT-Test gesehen (siehe 3.3.4), wurde auch hier die gravierende Wirkung von DON auf den Metabolismus der Zellen unterstrichen. Durch die DON-Exposition wurde weiterhin die genetische Informationsverarbeitung beeinflusst, da Transkription, Translation, Verarbeitung der RNA (Ubiquitinierung, Proteasom, RNA-Abbau) sowie die DNA-Replikation und -Reparatur betroffen sind. DON verursachte eine Hochregulation von Genen der Signaltransduktion (in den Signalwegen von ErbB, Wnt, TGF-beta und Jak-STAT). Besonders stark wirkt DON auch auf die Gesamtheit der zellulären Prozesse: Transport und Katabolismus, Zellbeweglichkeit, Zellwachstum und -tod sowie die Zellkommunikation über Tight und Adherens Junction-Verbindungen wurden signifikant verändert.

In Tab. 3-2 ist weiterhin die Anzahl der Gene, die in speziellen KEGG-Stoffwechselwegen hoch- oder herunterreguliert sind, für die jeweiligen DON-Behandlungsgruppen angegeben. Die Gewichtung der in den einzelnen Stoffwechselwegen enthaltenen Gene nach der jeweiligen Toxin-Behandlung wird so verdeutlicht. In allen Behandlungsgruppen war die größte Anzahl an Genen im Rahmen des Ribosoms herunter- und des Spleiceosoms sowie der oxidativen Phosphorylierung hochreguliert.

Tabelle 3-2: Übersicht der KEGG-Stoffwechselwege der mit DAVID analysierten Gene der verschiedenen DON-Behandlungsgruppen, die signifikant hoch (+) oder herunter (-) reguliert wurden.

In Klammern ist die Anzahl der regulierten Gene des jeweiligen Stoffwechselweges angegeben.

KEGG-Stoffwechselwege		200 ap	200 bl	2000 ap	2000 bl	
Metabolismus	Kohlenhydrat-Metabolismus	Citratzyklus		+ (9)	+ (11)	
		Pentosephosphatweg				- (3)
		Fruktose- und Mannose-Metabolismus				- (3)
	Energie-Metabolismus	Oxidative Phosphorylierung		+ (43)	+ (52)	+ (9)
	Nucleotid-Metabolismus	Pyrimidin-Metabolismus			+ (4)	
	Aminosäure-Metabolismus	Arginin- und Prolin-Metabolismus	+ (3)			
		Glutathion-Metabolismus			- (6)	
	Glycanbiosynthese und -metabolismus	N-Glycan-Biosynthese			- (6)	
		Glycosaminoglycan Biosynthese			- (15)	
		Glycosaminoglycan-Degradation		- (8)		
	Vitamin-Metabolismus	Folat-Biosynthese		- (4)	- (3)	
Genetische Informationsverarbeitung	Transkription	RNA-Polymerase			+ (11)	+ (6)
		Basale Transkriptionsfaktoren			+ (9)	
		Spliceosom	+ (5)	+ (39)	+ (63)	+ (17)
	Translation	Ribosom	- (5)	- (25)	- (17)	- (8)
		Aminoacyl-tRNA Biosynthese			+ (11)	
	Faltung, Sortierung und Degradation	Protein-Export			+ (4)	
		SNARE-Interaktionen im vesikulären Transport			+ (10)	
		Ubiquitin-vermittelte Proteolyse		+ (17)	+ (37)	+ (18)
		Proteasom		+ (18)	+ (24)	+ (16)
	Replikation and Reparatur	RNA-Degradierung		+ (9)	+ (21)	+ (7)
DNA-Replikation			- (6)			
Umwelt-Infoverarb.	Signaltransduktion	ErbB Signalweg			+ (17)	
		Wnt Signalweg			+ (30)	
		TGF-beta Signalweg	+ (4)			
		Jak-STAT Signalweg	+ (5)			
Signalmoleküle und Interaktion	ECM-Rezeptor-Interaktion			- (8)		
Zelluläre Prozesse	Transport and Katabolismus	Endozytose			+ (37)	+ (13)
		Lysosom		- (18)	- (10)	
	Zellbeweglichkeit	Regulation des Aktin-Zytoskelettes		+ (25)		
	Zellwachstum und -tod	Zellzyklus			- (11)	
	Zellkommunikation	Fokale Adhäsion		+ (28)	+ (40)	+ (13)
		Adherens Junction			+ (21)	+ (8)
		Tight Junction		+ (21)	+ (31)	+ (11)
Gap Junction				- (9)		

3.10.2 Real-Time-PCR-Analyse ausgewählter Kandidatengene

Um den Microarray zu validieren, sollte zur exakten mRNA-Quantifizierung von ausgesuchten Kandidatengenen eine quantitative Real-Time-PCR-Analyse (qPCR) durchgeführt werden. Aus einigen der im Microarray signifikant veränderten KEGG-Stoffwechselwegen (Metabolismus, genetische Informationsverarbeitung und zelluläre Prozesse), die vorzugsweise in der Literatur schon mit DON in Verbindung gebracht wurden, fand eine Auswahl an Genen statt (Tab. 3-3). Für die qPCR wurden die Proben von zwei Microarray-Versuchen und drei neu durchgeführten, äquivalenten DON-Experimenten (DON 0, 200 und 2000 ng/ml, appliziert von apikal und basolateral auf 6-Well IPEC-J2-Membrankulturen) genutzt.

Tabelle 3-3: Übersicht der ausgewählten Zielgene für die qPCR und zugehörige KEGG-Stoffwechselwege

KEGG-Stoffwechselwege		Protein	Gen	
Metabolismus	Kohlenhydrat-Metabolismus	Citratzyklus	Pyruvat-Dehydrogenase	PDHA1
	Energie-Metabolismus	Oxidative Phosphorylierung	Succinat-Dehydrogenase	SDHB
			Cytochrom C1	CYC1
Genetische Informationsverarbeitung	Translation	Ribosom	Ribosomales Protein L10a (60S UE)	RPL10a
	Replikation und Reparatur	DNA-Replikation	DNA-Ligase 1	LIG1
Zelluläre Prozesse	Transport und Katabolismus	Lysosom	Lysosomen-assoziiertes Membran-Glycoprotein 2	LAMP2
	Zellwachstum und -tod	Zellzyklus	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1	CDKN1
	Zellkommunikation	Tight Junction	Claudin-3	CLDN3

Die relativen Expressionswerte des Microarrays sowie die in der qPCR ermittelten RQ-Werte wurden für Gene des Stoffwechsels (Abb. 36), der genetischen Informationsverarbeitung (Abb. 37) und der zellulären Prozesse (Abb. 38) verglichen. Beide Methoden der mRNA-Quantifizierung zeigten gleiche Trends hinsichtlich der Hoch- und Herunterregulierung der betreffenden Transkripte. Die sensitivere Methode der qPCR konnte jedoch nicht alle signifikanten Änderungen der DON-Behandlungsgruppen aus dem Microarray bestätigen. Oft setzte die Signifikanz erst bei der nächsten DON-Behandlungsgruppe oder gar nicht ein. In der Behandlungsgruppe 200 ng/ml von apikal konnte bei beiden Methoden für kein untersuchtes Gen eine signifikante Expressionsänderung detektiert werden.

Die Gene der zellulären Energiegewinnung (Metabolismus) wurden nach DON-Behandlung im Microarray generell hochreguliert (Abb. 36). In der qPCR konnte für das Citratzyklusgen PDHA1 keinerlei signifikante Erhöhung detektiert werden. Die Gene der oxidativen

Phosphorylierung (SDHB und CYC1) wurden im Microarray bei 200 ng/ml basolateral und 2000 ng/ml apikal signifikant hochreguliert, was sich in der qPCR zugunsten der gerichtet applizierten (apikal und basolateral) hohen DON-Konzentration (2000 ng/ml) verschob. Die drei Stoffwechselgene zeigten im Microarray eine signifikante Expressionserhöhung für die Behandlungsgruppe 200 ng/ml basolateral, die mittels qPCR nicht bestätigt werden konnte.

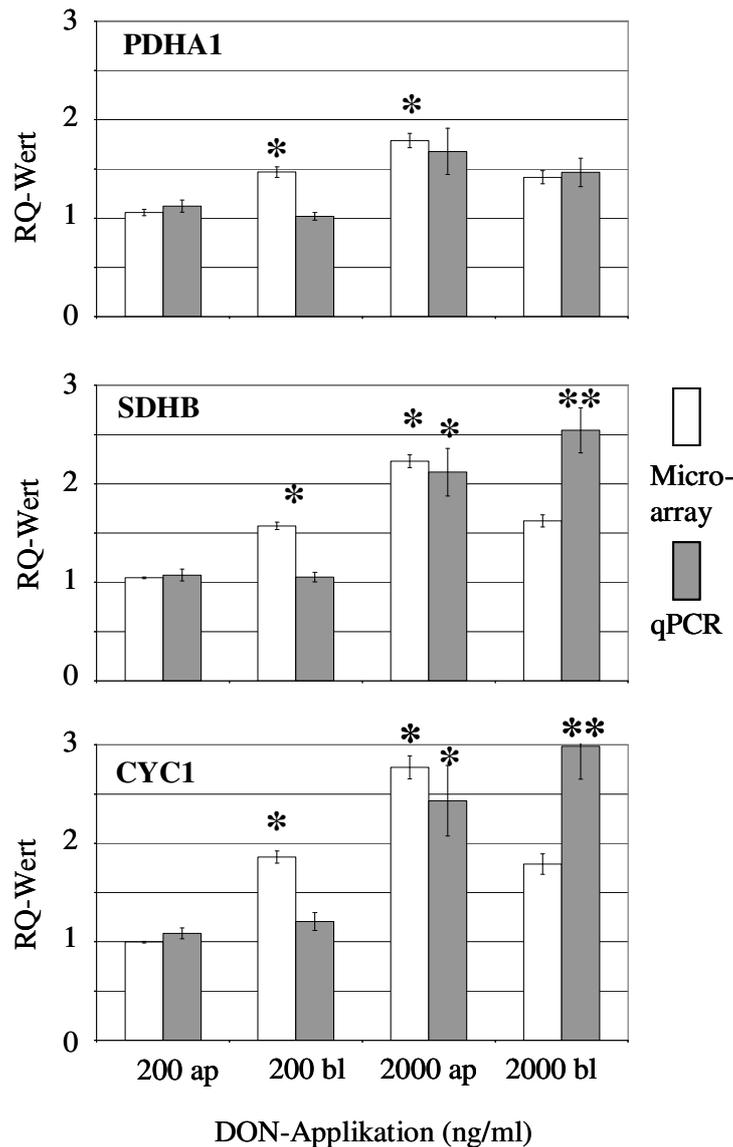


Abbildung 36: Vergleichende relative Expressionsniveaus der Stoffwechselgene aus Microarrays und qPCR

Darstellung der im Microarray erhaltenen relativen Expressionsdaten und die in der qPCR ermittelte relative Quantifizierung (RQ-Werte) der Stoffwechselgene PDHA1 (Citratzyklus), SDHB und CYC1 (beide oxidative Phosphorylierung) bezogen auf das Referenzgen β -ACT und die unbehandelte Kontrolle. Die IPEC-J2-Zellen wurden für 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml, appliziert von apikal (ap) oder basolateral (bl)) behandelt. Mittelwerte von drei (Microarray) bzw. fünf (qPCR) unabhängigen Experimenten (SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Für die Gene RPL10A (ribosomales Protein der 60S-Untereinheit) und LIG1 (DNA-Ligase) der genetischen Informationsverarbeitung konnten die signifikanten Microarraydaten für 200 ng/ml basolateral und 2000 ng/ml apikal per qPCR bestätigt werden und für RPL10A noch die Behandlung 2000 ng/ml basolateral hinzugefügt werden (Abb. 37). In beiden Fällen war die Genexpression signifikant herunterreguliert.

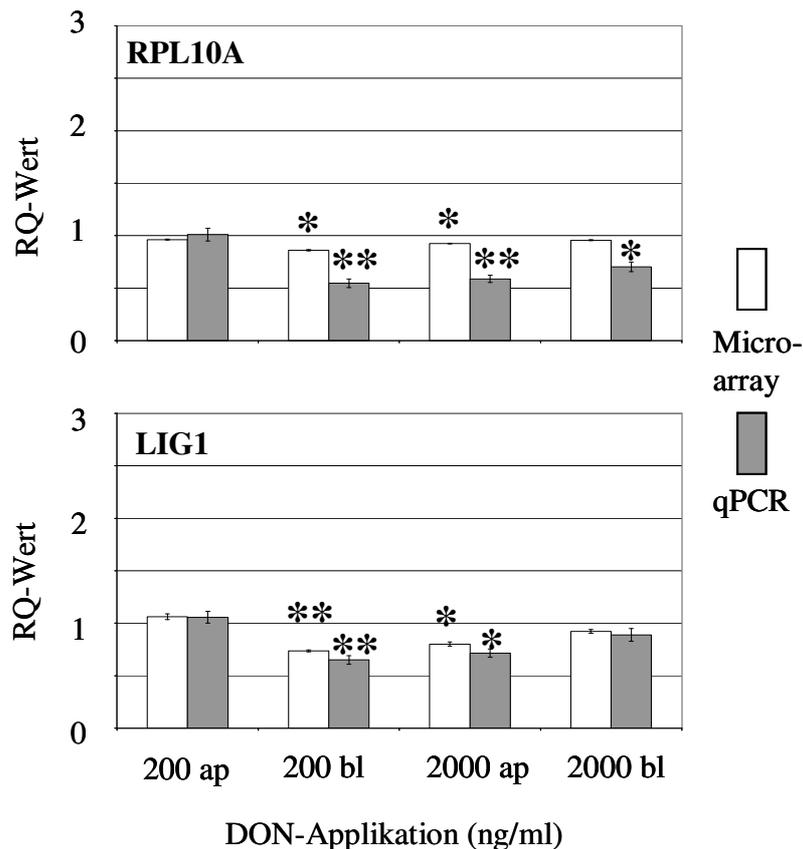


Abbildung 37: Vergleichende relative Expression der Gene genetischer Informationsverarbeitung aus Microarray und qPCR

Darstellung der im Microarray erhaltenen relativen Expressionsdaten und die in der qPCR ermittelte relative Quantifizierung (RQ-Werte) folgender Gene der genetischen Informationsverarbeitung: RPL10A (Ribosom 60S-UE) und LIG1 (DNA-Replikation) bezogen auf das Referenzgen β -ACT und die unbehandelte Kontrolle. Die IPEC-J2-Zellen wurden für 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml, appliziert von apikal (ap) oder basolateral (bl)) behandelt. Mittelwerte von drei (Microarray) bzw. fünf (qPCR) unabhängigen Experimenten (SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Die Gene der zellulären Prozesse zeigten widersprüchliche Ergebnisse der Genexpression im Vergleich von Microarray und qPCR auf (Abb. 38). Für das lysosomale Gen LAMP2 wurde der herunterregulierende Trend bestätigt und beide Methoden stimmten für 200 ng/ml basolateral und 2000 ng/ml apikal überein. Wie bei RPL10A konnte eine signifikante Herunterregulation für 2000 ng/ml von basolateral als Ergebnis der qPCR-Analyse hinzugefügt werden. Das Zellzyklus-Gen CDKN1A (P21) zeigte im Microarray als Antwort auf 200 ng/ml DON von basolateral eine Erhöhung der Genexpression, die sich in der qPCR erst in Antwort auf 2000 ng/ml von apikal zeigte. Für das Gen der zellulären Kommunikation (CTNNB1) konnte im Microarray eine signifikante Expressionserhöhung bei 200 ng/ml von basolateral detektiert werden, die sich in der qPCR nicht bestätigte. Das essenzielle Tight Junction-Gen Claudin-3 (CLDN3) offenbarte eine Hochregulation für 200 ng/ml von basolateral im Microarray, was sich in der qPCR nicht bestätigen konnte. Hingegen deutete die Expressionstendenz der qPCR in Richtung Herunterregulation, die für 2000 ng/ml von basolateral signifikant wurde.

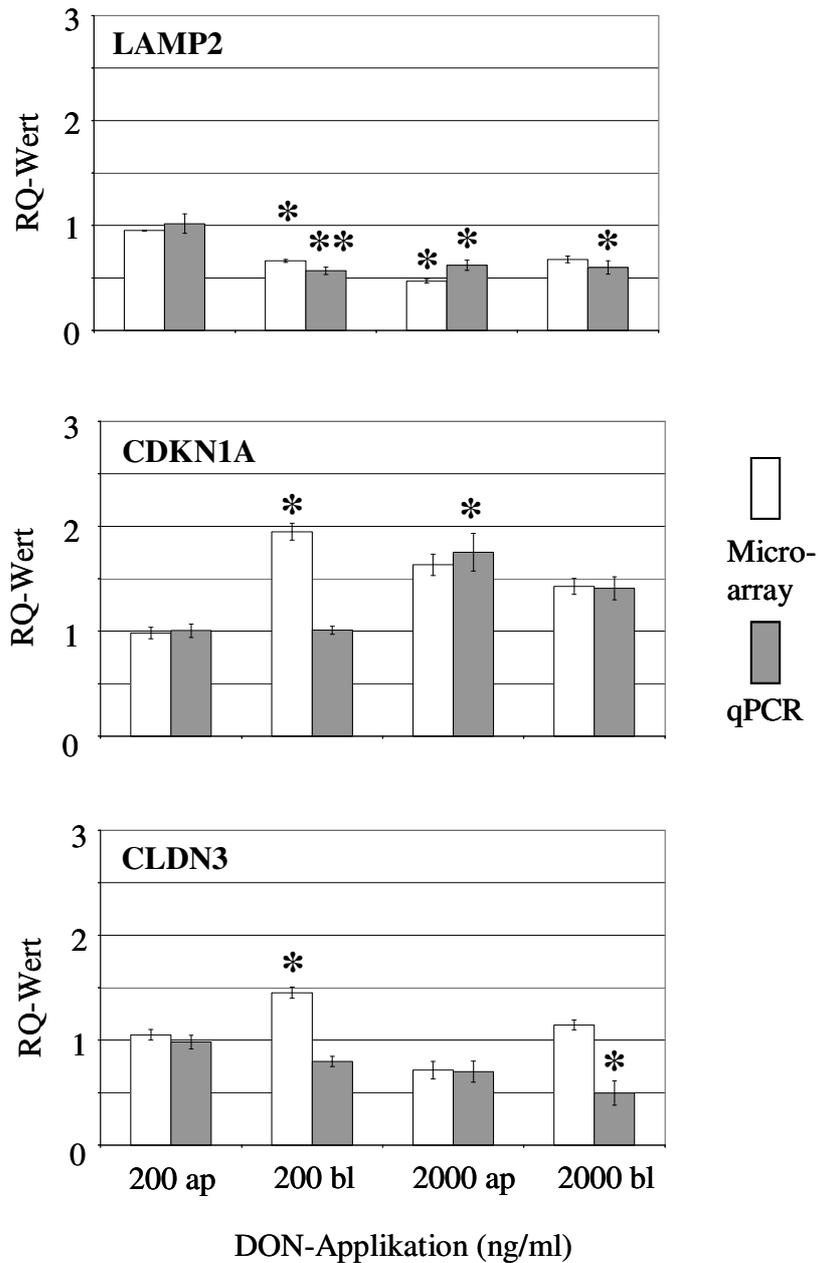


Abbildung 38: Vergleichende relative Expression der Gene zellulärer Prozesse aus Microarray und qPCR

Darstellung der im Microarray erhaltenen relativen Expressionsdaten und die in der qPCR ermittelte relative Quantifizierung (RQ-Werte) der folgenden Gene zellulärer Prozesse: LAMP2 (Lysosomen), CDKN1A (P23, Zellzyklus) und CLDN3 (Tight Junctions) bezogen auf das Referenzgen β -ACT und die unbehandelte Kontrolle. Die IPEC-J2-Zellen wurden für 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml, appliziert von apikal (ap) oder basolateral (bl)) behandelt. Mittelwerte von drei (Microarray) bzw. fünf (qPCR) unabhängigen Experimenten (SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4 DISKUSSION

4.1 Einführung

Aufgrund des häufigen Vorkommens des Schimmelpilzmetaboliten DON auf Getreidekörnern und in daraus hergestellten Futter- und Lebensmitteln wurden in dieser Arbeit die zellphysiologischen Auswirkungen des Mykotoxins auf das Hausschwein (die sensitivste Spezies) untersucht. Die in der Arbeit verwendete porcine intestinale Zellkultur (IPEC-1 und IPEC-J2) ist ein *in vitro*-Modell für die DON-Exposition der epithelialen Barriere, da sie essenzielle Eigenschaften der Situation *in vivo* nachstellt. Die applizierten Konzentrationen von 200 und 2000 ng/ml DON stellten modellhaft niedrige und hohe Dosis-Effekte des Mykotoxins dar, wie sie bei chronischer und akuter Belastung der Tiere *in vivo* auftreten könnten. Im Folgenden werden die Unterschiede der zellulären Reaktionen auf die applizierten DON-Konzentrationen diskutiert. Zur Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit der Literatur wurden alle DON-Konzentrationen nicht in μM , sondern in ng/ml angegeben, wobei auf gerade Zahlen gerundet wurde. Dabei entspricht z.B. die Konzentration von 1 μM ca. 300 ng/ml DON.

4.2 Die *in vitro*-Zellkultur als Modell für die epitheliale Barriere

Intestinale Epithelzellverbände sind gekennzeichnet durch ihre Polarität und die Ausbildung zweier abgegrenzter Kompartimente, der apikalen und basolateralen Domäne (Yu and Yang 2009). *In vivo* beziehen Enterozyten ihre Nährstoffe von der apikalen und basolateralen Zellseite (Simons and Fuller 1985). Tight Junction-Verbindungen zwischen den benachbarten Zellen stellen eine wesentliche Grundlage der Kompartimentierung dar und sind maßgebend an der Bildung der natürlichen epithelialen Barriere beteiligt (Rodriguez-Boulan and Salas 1989).

4.2.1 IPEC-1 und -J2 in der konventionellen Zellkultur

Auf impermeablem Untergrund verfügen beide IPEC-Kulturen über charakteristische morphologische Eigenschaften differenzierter Epithelzellen (Gonzalez-Vallina et al. 1996; Schierack et al. 2006; Mariani et al. 2009; Brosnahan and Brown 2012). Die hochprismatischen Zellen weisen eine typische Polarisierung auf, die auf der apikalen Seite durch deutlich ausgebildete Mikrovilli und die Sezernierung einer Mukusschicht (Schierack et

al. 2006) sowie dem spezifischen Bürstensaumenzym Alkalische Phosphatase charakterisiert ist (Diesing et al. 2011b). Weiterhin war der homogene Zellverband lückenlos dicht und blieb über längere Zeiträume intakt, was mittels Elektronenmikroskopie der Tight Junctions sowie der Expressionsanalyse der Tight Junction-Proteine ZO-1, Occludin, Claudin-3 und -4 (Immunfluoreszenz und Western Blot) im Rahmen dieser Arbeit und durch die Gruppe um Schierack bewiesen wurde (Diesing et al. 2011b; Diesing et al. 2011a; Schierack et al. 2006; Brosnahan and Brown 2012).

Beide verwendeten porcinen Zelllinien zeigten eine vergleichsweise schnelle Expression verschiedener Differenzierungsmarker. Während die humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 erst nach 30 Kultivierungstagen eine homogene Polarisierung und Differenzierung aufweisen (Sambuy et al. 2005), besitzen die IPECs ab dem Erreichen der Konfluenz (nach vier Tagen) ein gleichmäßiges Erscheinungsbild im Zellverband mit der Expression von Tight Junction-Proteinen und Bürstensaumenzymen (Diesing et al. 2011b). Da beide Zelllinien ihren Ursprung in unbehandelten, intestinalen Epithelzellen haben, könnte diese schnelle Differenzierung eine spezielle enterozytische Eigenschaft sein, da ihre Lebensdauer *in vivo* auf drei Tage beschränkt ist (Karam 1999). Die Differenzierung erfolgt ausgehend von der Krypte in Richtung Villus, begleitet von der Expression typischer Differenzierungsmarker wie z.B. des Bürstensaumproteins Villin (Hodin et al. 1997).

Es fallen jedoch Unterschiede im Vergleich beider Zelllinien auf. IPEC-1 entwickelt weniger und kleinere Mikrovilli als IPEC-J2. Das könnte auf unterschiedliche Anteile von Krypten- und Zottenzellen bei der Zellgewinnung zurückzuführen sein, da beschrieben ist, dass Enterozyten der Zotten mehr Mikrovilli bilden als Zellen der Krypten (Mukherjee and Williams 1967). Außerdem wurde gezeigt, dass IPEC-1 in der konventionellen Zellkultur das Bürstensaumprotein Villin gar nicht, IPEC-J2 dagegen permanent exprimiert (Nossol et al. 2011). Möglicherweise ist dies auch auf den Ursprung von IPEC-1 aus distaleren Darmabschnitten (Jejunum und Ileum) zurückzuführen, da Villin entlang der Darmachse in abnehmendem Maße gebildet wird (Hodin et al. 1997) und in dieser Zelllinie scheinbar verstärkt die Villindefizienten Zellen angereichert wurden. Im Vergleich wurden bei IPEC-J2 charakteristische Epithelzeleigenschaften (Mikrovilli- und Villin-Bildung) gefunden, die in IPEC-1 fehlen. Aufgrund dieser Unterschiede wurde für die Versuche im Membrankultursystem zur Darstellung der epithelialen Barriere ausschließlich die IPEC-J2-Zelllinie eingesetzt.

4.2.2 IPEC-J2 im Membrankultursystem

Obwohl sich IPEC-J2 unter konventionellen Zellkulturbedingungen auf impermeablem Untergrund differenziert und apikal polarisiert, entspricht dieses Kulturformat in wesentlichen Punkten nicht der physiologischen Situation *in vivo*. Zellen, die auf undurchlässigen Zellkulturplatten wachsen, müssen die Transporter- und Rezeptorausstattung ihrer apikalen Domäne sowie das Zytoskelett umstrukturieren, um sich der ausschließlichen Nahrungsversorgung von der apikalen Seite anzupassen (Simons and Fuller 1985). Daher können sie, zumindest basolateral, nicht vollständig polarisiert sein (Simons and Fuller 1985). Um einen ersten Überblick über die zytotoxische Wirkung von DON zu erhalten, ist die Nutzung des konventionellen Zellkultursystems sinnvoll. Die Charakteristika eines Epithelzellverbandes konnten damit jedoch nur unzureichend nachgestellt werden. Daher wurde in dieser Arbeit ein Membrankultursystem verwendet, welches die physiologischen Bedingungen *in vivo* wesentlich besser darstellt. Den IPEC-J2-Zellen wurde es dabei ermöglicht, ihre Polarität vollkommen auszubilden und die Nährstoffversorgung konnte über die apikale und basolaterale Zellseite stattfinden (Nossol et al. 2011).

Die Eigenschaften von auf permeablem Untergrund kultivierten IPEC-J2-Zellen unterschieden sich deutlich von denen des konventionellen impermeablen Zellkultursystems. Es konnte gezeigt werden, dass IPEC-J2-Zellen in der Membrankultur eine schmalere und säulenförmigere Morphologie aufweisen im Vergleich zu konventionellen Kulturen (Nossol et al. 2011). Die Zelloberfläche nimmt also zugunsten eines dichter gepackten, dickeren Epithels mit kleineren Zellkernen ab. Bei beiden Kultivierungsmethoden waren fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch Tight Junction-Proteine und Mikrovilli-Strukturen an der apikalen Zellseite nachweisbar. Allerdings war das mRNA-Expressionsniveau des Bürstensaum-Strukturproteins Villin in IPEC-J2 auf permeablem Untergrund signifikant höher als auf impermeablem Untergrund (Nossol et al. 2011). Die IPEC-J2-Morphologie ähnelt stark der Enterozyten-Morphologie *in vivo*, in der die intestinale Barriere ein einschichtiges, hochprismatisches Epithel darstellt (Shen 2009). Daher wurde das Membrankultursystem als Methode der Wahl für spezielle Untersuchungen der epithelialen Barriere verwendet.

Das in der Arbeit genutzte Membrankulturmodell könnte zukünftig noch verbessert werden. Die gängige Standardmethode, um Mukosa-produzierende Magenzellen mit optimaler Sauerstoffversorgung zu kultivieren, sind Membrankulturen, bei denen die apikale Zellseite nur von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt ist, sogenannte *air-liquid interface*-, kurz

ALI-Kulturen (Ootani et al. 2000). Auch für die IPEC-Kulturen konnte gezeigt werden, dass die ALI-Kultivierung und die resultierende Sauerstoffanreicherung eine der Situation *in vivo* gleichkommende Ausbildung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Zellen bewirken. Die polarisierte Epithelzellstruktur und -anzahl, die Expression und Verteilung des Bürstensaum-Strukturproteins Villin, die Tight Junction-Integrität, die intrazelluläre Aufnahme sowie die Proteinaufspaltung verbesserten sich signifikant (Nossol et al. 2011).

Die Integrität der epithelialen Barriere ist vor allem auf die korrekte Beschaffenheit der interzellulären Tight Junction-Strukturen zurückzuführen. Kommt es durch Störung der Tight Junction-Proteine zu erhöhter parazellulärer Permeabilität des Epithelzellverbandes, kann dies *in vitro* an einem Abfall des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) erkannt werden. Die homogene jejunale Enterozytenzellkultur IPEC-J2 blieb über längere Zeiträume intakt, da die TEER-Messung Werte von mehreren $\text{k}\Omega/\text{cm}^2$ ergab, wobei ab $1 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ von einem differenzierten Epithelzellverband ausgegangen wurde (Schierack et al. 2006). Bei *in vivo*-Analysen von Dünndarm-Explantaten in der Ussigkammer ist der TEER-Wert mit nur ca. $50 \Omega/\text{cm}^2$ deutlich geringer (Schierack et al. 2006). Diese Diskrepanz könnte sich durch das Vorkommen verschiedener Zelltypen, Immunzellen und löslicher Proteine in der epithelialen Barriere *in vivo* erklären.

4.3 Die Toxizität von DON ist dosis- und zeitabhängig

4.3.1 Die DON-Konzentrationen und ihre praktische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend zwei DON-Konzentrationen verwendet, die auch praktisch im Körper der Hausschweine vorkommen können. Die Konzentration von 200 ng/ml DON wurde als Modell für niedrige chronische Dosis-Effekte des Mykotoxins genutzt. Sie liegt im Rahmen der nach der Fütterung kontaminierten Getreides Blut von Schweinen gemessenen DON-Konzentrationen von 65 bis 325 ng/ml (Prelusky et al. 1988). Die Applikation von ca. 300 ng/ml ($1 \mu\text{M}$) DON korrespondiert mit einer relevanten Konzentration von 0,3 mg DON/kg Futter (Kolf-Clauw et al. 2009; Pinton et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass Konzentrationen von 160 bis 2000 ng/ml im Darmlumen von der apikalen Seite auf die Enterozyten einwirken können (Sergent et al. 2006). Die hohe Konzentration von 2000 ng/ml (bis maximal 4000 ng/ml) sollte akut toxische DON-Effekte nachstellen, die beim Tier Erbrechen, Nahrungsverweigerung und verringerte Gewichtszunahme verursachen. Für

diesen Konzentrationsbereich ist die hemmende Wirkung von DON auf die Proteinbiosynthese *in vitro* beschrieben (Rotter et al. 1996). Aufgrund der dramatischen *in vivo*- und *in vitro*-Reaktionen sind zytotoxische Effekte hoher DON-Konzentrationen in der Literatur detailliert beschrieben. Allerdings wurden in vielen *in vitro*-Studien unrealistisch hohe DON-Konzentrationen bis zu 9000 ng/ml (30 μ M) eingesetzt (Maresca et al. 2008; Pinton et al. 2009). Diese Dosen sind weit von den tatsächlichen Konzentrationen des Mykotoxins entfernt, sodass möglicherweise andere toxische Mechanismen eine Rolle spielen könnten, die *in vivo* nicht auftreten. Die Wirkung von geringen DON-Konzentrationen wurde dagegen bisher eher selten in der Zellkultur analysiert (Vandenbroucke et al. 2011).

4.3.2 Effekte von niedrigen DON-Konzentrationen auf IPECs (impermeabler Untergrund)

Die niedrige DON-Konzentration von 200 ng/ml verursachte nach 72-stündiger Inkubation keine toxischen Effekte in der porcinen Epithelzellkultur. Diese Befunde konnten auch von anderen Gruppen bestätigt werden, obwohl geringe DON-Konzentrationen eher selten Gegenstand der veröffentlichten Untersuchungen sind. Natürlicherweise kontaminiertes Futter hatte in Bezug auf das äußere Erscheinungsbild sowie verschiedenste hämatologische, biochemische und immunologische Parameter keinerlei Einfluss auf die untersuchten Ferkel (Accensi et al. 2006). Die im Futter vorkommende Konzentration von ca. 300 ng/ml DON wurde als Dosis ohne morphologischen Effekt auf jejunale Explantate abgesetzter Ferkel beschrieben (Kolf-Clauw et al. 2009). Niedrige, aber relevante DON-Konzentrationen von ca. 250 ng/ml hatten keine zytotoxischen Effekte in differenzierten IPEC-J2-Kulturen (Vandenbroucke et al. 2011) und humanen Caco-2-Zellen (Bony et al. 2006).

Im Gegensatz zur Applikation von hohen DON-Konzentrationen auf IPECs konnte bei der bis zu 72-stündigen Inkubation mit niedrigen DON-Konzentrationen auf impermeablem Untergrund in der vorliegenden Arbeit keine Zytotoxizität beobachtet werden (siehe Übersichtstabelle 3–1 und Schema in Abb. 39). Weder Nekrose (LDH-Assay) noch Apoptose (Caspase-3-Aktivität) war in den Zelllinien nachweisbar. Die Zellen zeigten bei der morphologischen Untersuchung im Mikroskop keine sichtbaren Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Die epitheliale Integrität wurde durch die unveränderte Expression diverser Tight Junction-Proteine in der Fluoreszenzmikroskopie sowie im Western Blot bestätigt. In beiden Zelllinien blieb die Zellzahl nach der DON-Behandlung konstant.

Dennoch gaben die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Viabilitätsassays eine Schädigung der zellulären Vitalität auf impermeablem Untergrund an. Eine erniedrigte Stoffwechselaktivität wurde mittels MTT-Test vor allem in der Zelllinie IPEC-1 nachgewiesen. Sehr deutlich zeigte der sensitive Neutralrot-Assay, dass die Lysosomen beider Zelllinien schon nach kurzer Wirkungsdauer niedriger DON-Dosen eine signifikant verringerte Farbstoffaufnahmekapazität besaßen. Die in der Arbeit durchgeführten Versuche zeigen somit, dass DON in niedrigen Konzentrationen zwar keine toxische Schädigung der Zellen nach sich zieht, aber durch Verringerung der Viabilität in die sensiblen zellulären Mechanismen eingreift. Das geht einher mit Befunden aus der kürzlich veröffentlichten Literatur. In der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde mit DON-Konzentrationen von ca. 200 ng/ml im MTT-Test auch eine reduzierte Viabilität (Sergent et al. 2006) und mit Konzentrationen von 500 ng/ml eine Verminderung der Proteinbiosynthese nachgewiesen (Van de Walle et al. 2010). In der Studie an jejunalen Explantaten abgesetzter Ferkel wurde nach der Einwirkung von ca. 300 ng/ml DON auf die Enterozyten eine signifikant verminderte Villuslänge gemessen (Kolf-Clauw et al. 2009). Mit Konzentrationen von 250 ng/ml DON wurden signifikante Änderungen der Aktivität und Expression von zellulären RNasen in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 2654.7 detektiert (Li and Pestka 2008). Im WST-8-Test resultierte die Applikation von ca. 30 ng/ml DON für 48 h in normalen humanen Lungenfibroblasten (NHLF) und von ca. 150 ng/ml für 48 h in proximalen tubulären Nierenepithelzellen (RPTEC) in einer reduzierten Viabilität (Königs et al. 2007).

Weiterhin wurde ein signifikanter, proliferationsaktivierender Effekt geringer DON-Konzentrationen mit Hilfe des BrdU-Einbaus in dieser Arbeit nachgewiesen (siehe Übersichtstabelle 3–1 und Abb. 39), besonders in IPEC-1. Bislang wurden vor allem inhibitorische Effekte von hohen DON-Konzentrationen auf die DNA-Synthese in verschiedenen Zelltypen in der Literatur beschrieben, Hinweise auf die Erhöhung der Proliferationsaktivität sind selten. *In vivo* wurde nach DON-Fütterung junger Ferkel eine Verdickung am Übergang von Ösophagus zum Magen gefunden, was für einen proliferativen Einfluss spricht (Rotter et al. 1994). Auch für Zellen des Immunsystems wurde eine Steigerung der Proliferation nach Gabe niedriger DON-Dosen beobachtet, so in porcinen Lymphozyten und Makrophagen. Interessant ist dabei, dass die Autoren schon 1986 einen konzentrationsabhängigen, biphasischen Effekt von DON auf die zelluläre Proliferationsaktivität nachgewiesen haben. Wie in dieser Arbeit für epitheliale Zellen gezeigt, haben sie bei Immunzellen eine Aktivierung durch geringe DON-Dosen (bis 0,5 ng/ml) und eine Hemmung der Proliferation durch höhere DON-Dosen

(bis 100 ng/ml) beschrieben (Miller and Atkinson 1986). Für intestinale Zellen wurde dieser biphasische DON-Effekt bislang noch nicht in der Literatur dargestellt. Lediglich für das Phytoöstrogen Genistein aus der Sojabohne wurden ähnliche Beobachtungen in humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 mit einem niedrigen und einem hohen Konzentrationsrahmen gefunden, welche gegensätzliche Effekte bei der Proliferation (aktivierend versus hemmend) auslösten (Chen and Donovan 2004).

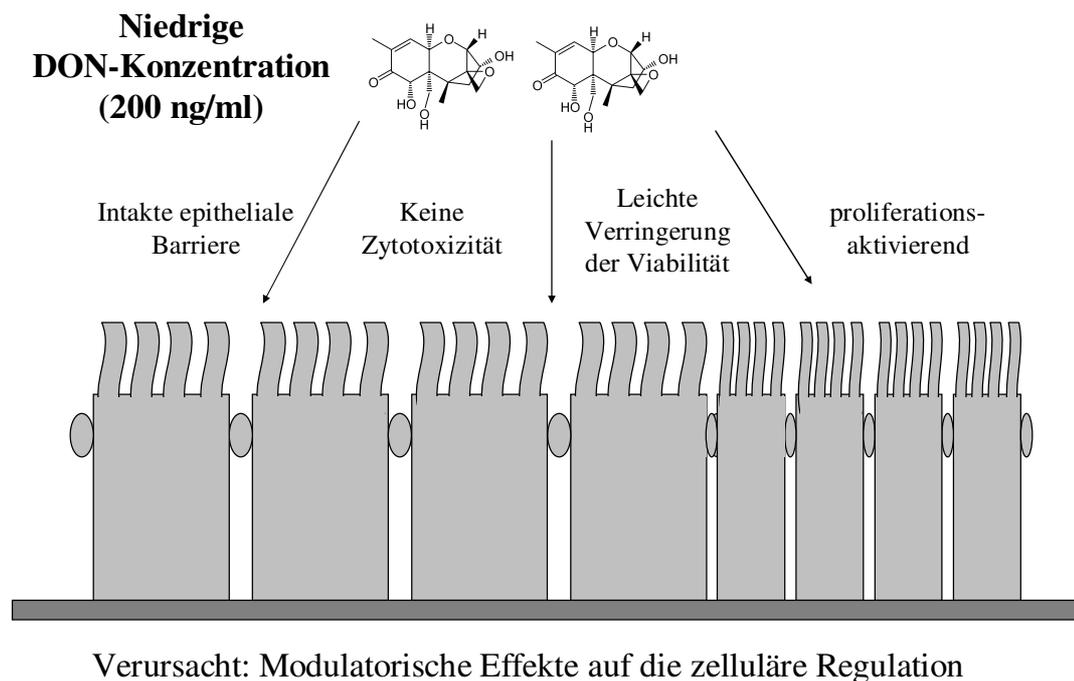


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Effekte von niedrigen DON-Konzentrationen

4.3.3 Die Toxizität niedriger DON-Konzentrationen nimmt über längere Inkubationszeiträume zu

Die Effekte geringer DON-Konzentrationen wurden auch über einen längeren Inkubationszeitraum (14 Tage) analysiert, um eine chronische Mykotoxin-Exposition der intestinalen Epithelzellen im Zellkultursystem zu simulieren. *In vivo* beeinflusst die chronische Aufnahme niedriger DON-Konzentrationen über längere Zeiträume das Wachstum und die Leistung von Schweinen negativ (Goyarts et al. 2005). In der Tat verringert die chronische Gabe niedriger DON-Konzentrationen auch im intestinalen *in vitro*-Zellkulturmodell die Viabilität und die Integrität der Zellen; wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Das Niveau der Stoffwechselaktivität (MTT-Test) in beiden Zelllinien wurde drastisch vermindert. Zwar wirkte sich die Konzentration von 500 ng/ml DON schon nach kurzer Inkubationszeit (72 h) signifikant negativ auf

beide Zelllinien aus, jedoch war nach 14-tägiger Einwirkung fast keine Stoffwechselaktivität mehr detektierbar. Auch die metabolische Reduktionskapazität der 200 ng/ml DON-Konzentration sank im Laufe der Inkubationsdauer von Kontrollniveau auf das der kurzzeitig gegebenen hohen DON-Dosen ab. Hinzu kam eine signifikante Störung der Epithelzellintegrität nach langer Inkubation mit 500 ng/ml DON, die der Schädigung von kurzzeitig applizierten hohen DON-Konzentrationen gleichkam. Weiterhin verschwand die nach kurzer Inkubationszeit detektierte, biphasische BrdU-Einbaurrate der proliferierenden Zellen. Eine Proliferationsaktivierung konnte nicht mehr signifikant detektiert werden, wohingegen die proliferationsinhibierenden Effekte der hohen Dosen erschienen. Aus der Literatur sind bisher keine *in vitro*-Studien zur chronischen DON-Exposition bekannt. Allerdings muss auch gesagt werden, dass Darmzellen *in vivo* selbst bei chronischer Mykotoxin-Aufnahme nicht ständig DON ausgesetzt sind, sondern absorptionsbedingte Schwankungen des DON-Kontaktes auftreten (Dänicke et al. 2004a), während die Zellen in den durchgeführten Versuchen über den Zeitraum von 14 Tagen permanent DON ausgesetzt waren.

4.3.4 Effekte von hohen DON-Konzentrationen auf IPECs (impermeabler Untergrund)

Wie in der landwirtschaftlichen Praxis verursachten hohe DON-Konzentrationen auch in der konventionellen Zellkultur akut toxische Effekte in den Enterozyten und ließen nur noch stark beschädigte Zellinseln zur Analyse der zellulären Strukturen zurück. Als Rahmen hoher Konzentrationen wurden in dieser Arbeit DON-Gehalte im Medium von 1000 bis 4000 ng/ml angesehen. Die Befunde bestätigen die in der Literatur gut beschriebenen Wirkungen hoher DON-Konzentrationen *in vitro*. Besonders markant war die Toxin-Wirkung in Hinblick auf die komplette Zerstörung der Tight Junction-Integrität des Epithelzellverbandes. Von anderen Autoren wurde ebenfalls diese zerstörende DON-Wirkung auf die Tight Junction-Komplexe von IPEC-1-Zellen (Pinton et al. 2010), HT-29-Zellen (Maresca et al. 2002) und Caco-2-Zellen (Sergent et al. 2006) gezeigt.

4.3.4.1 DON reduziert die zelluläre Viabilität

Schon bei der morphologischen Betrachtung der Zellen im Mikroskop fielen die mit der Zeit erheblich größer werdenden Lücken im Epithelzellverband auf (24 < 48 < 72 h), die in beiden Zelllinien ungefähr gleichmäßig stark auftraten. Die Auszählung der Zellen ergab bereits nach 24 h (IPEC-1) bzw. nach 48 h (IPEC-J2) einen signifikant drastischen Rückgang der Zellzahl.

Die verminderte Zellzahl nach 48-stündiger Inkubation mit ca. 1120 ng/ml DON wurde auch durch Tiemann et al. gezeigt, die an primären porcinen Endometrialzellen eine Trypanblaufärbung mit Zellzählung durchführten (Tiemann et al. 2003). Das wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe der sensitiven Viabilitätstests auch auf physiologischer Ebene für beide Zelllinien bestätigt. Der Neutralrot-Test detektierte eine gestörte Lysosomenfunktion nach 24 h mit hohen DON-Konzentrationen, besonders für IPEC-J2. Sowohl die sensible Reaktion dieses Testes, als auch die hochsignifikant verminderte lysosomale Aktivität ab 24 h nach Exposition mit DON-Konzentrationen ab 600 ng/ml wurde von Döll et al. an primären porcinen Hepatozyten, ebenfalls Epithelzellen, gezeigt (Döll et al. 2009). Im MTT-Test wurde eine verminderte Stoffwechselaktivität ab 24 h DON-Inkubation für die IPECs bei allen höheren DON-Konzentrationen gemessen. Der MTT-Test als Standardmethode der Viabilitätsbestimmung in Zellkulturen wurde in vielen Studien zur DON-Toxizitätsbestimmung verwendet. In humanen Caco-2-Zellen war das MTT-Signal bei ca. 3000 ng/ml DON für 24 h ebenfalls signifikant vermindert (Kouadio et al. 2005). Primäre porcine Hepatozyten zeigten nach 48 h ab einer Konzentration von 600 ng/ml signifikante MTT-Signalreduktion (Döll et al. 2009). Eine 48-stündige Applikation von bis zu 2000 ng/ml DON verminderte die im MTT-Test gemessene Viabilität der drei humanen intestinalen Epithelzelllinien HCT-116, HT-29 und Intestine-407 (Yang et al. 2008). Auf verschiedene andere Zelllinien (chinesische Hamsterovarien-Zellen CHO-K1, humane Hepatozytenkarzinomzellen HepG2 und murine Keratinozyten C5-O) wirkte 48-stündig appliziertes DON in einem ähnlichen Konzentrationsrahmen im MTT-Test hoch zytotoxisch (Cetin and Bullerman 2005).

4.3.4.2 DON führt zu einem biphasischen Proliferationsverlauf

Die DNA-Syntheserate wurde anhand des Einbaus des Thymidin-Analogons BrdU in die replizierende DNA bestimmt. Allerdings muss erwähnt werden, dass es sich bei dem konfluenten Zellverband um ausdifferenzierte Zellen handelt, die sehr viel weniger proliferieren als subkonfluente Zellen (Vandenbroucke et al. 2011). In den Kontrollen waren noch einige teilungsaktive Zellen detektierbar deren Anzahl über die Zeit in etwa konstant blieb. Interessanterweise verringerte sich die zelluläre Proliferationsrate in IPEC-J2 erst nach 72 h Exposition hoher DON-Konzentrationen im BrdU-ELISA und BrdU-Immunzytochemie (in letzterem nicht signifikant, aber eine Tendenz ist erkennbar). Der BrdU-Einbau in IPEC-J2 ist generell geringer als in IPEC-1. Die Zelllinie IPEC-1 zeigte schon nach 24 h eine Proliferationshemmung im BrdU-ELISA, wohingegen in der BrdU-Immunzytochemie zu

allen Zeitpunkten eine Erhöhung der Proliferationsrate erhalten wurde. Letzteres scheint sich zwar zu widersprechen, aber die Messmethoden der beiden Testverfahren sind sehr unterschiedlich. Im ELISA wird die Proliferationsrate als Summensignal des Wells detektiert, in der Immunzytochemie wird dagegen die Proliferationsbestimmung auf Einzelzellniveau ermöglicht. Es kann an dieser Stelle postuliert werden, dass die Proliferation der überlebenden Zellen gesteigert ist, um die durch das Absterben der Nachbarzellen entstandenen Lücken im Epithel zu füllen. Nach bakteriell verursachten Läsionen der epithelialen Barriere wurden erhöhte proliferative Antworten der umliegenden intestinalen Zellen gefunden (Terano et al. 2001). Die Gruppe um Egan beschreibt die NFκB-vermittelte Heilung und Wiederherstellung einer nach Entzündung verwundeten intestinalen Epithelzellschicht (Egan et al. 2003). Auch in IPEC-J2 wurde in Antwort auf bakterielle Invasion eine erhöhte Proliferation zur Regeneration der epithelialen Läsionen nachgewiesen (Schierack et al. 2006).

In der Literatur wurde bis jetzt nur ein proliferationshemmender Effekt hoher DON-Konzentrationen beschrieben, z.B. für humane Caco-2-Zellen (Kouadio et al. 2005), murine 3T3-Fibroblasten (Widestrand et al. 1999), humane Hep-G2-Zellen und humane Fibroblasten-ähnliche fetale Lungenzellen MRC-5 (Ivanova et al. 2006). Diese Studien *in vitro* nutzen zur Proliferationsuntersuchung vorrangig den BrdU-ELISA auf Zellkulturplatten, wobei nur Informationen der Gesamtzellpopulation erhalten werden, nicht jedoch auf Einzelzellebene. Weiterhin sind nur selten Zusammenhänge zwischen der genauen Zellzahl und der Zahl proliferierender Zellen angegeben. In einer Studie an primären porcinen Gebärmutterschleimhautzellen wurde das proliferierende Zellkern-Antigen (PCNA) als Proliferationsmarker im FACS verwendet, allerdings zeigte dieser unter 48-stündigem Einfluss von ca. 1120 ng/ml DON eine Proliferationsverminderung an (Tiemann et al. 2003). Wie schon in Abschnitt 4.3.2 beschrieben wurde, bewirkte eine geringe Dosis von 200 ng/ml DON eine Proliferationssteigerung. Da bei dieser geringen DON-Konzentration weder ein gesteigerter Zellverlust noch erhöhte Apoptose und Nekrose messbar waren, ist diese Proliferationsaktivierung als eine direkte Folge von DON anzusehen (primärer Effekt). Bei den hohen Konzentrationen (2000 ng/ml DON) dagegen wurden großflächige Löcher im Zellverband und eine verstärkte Apoptose verzeichnet, die Zell-Zell-Kontakte wurden gestört. Daher ist der auf Einzelzellniveau gelungene Proliferationsnachweis eine Folge der zytotoxischen Wirkung des Mykotoxins (sekundärer Effekt). Die Zellen proliferieren aufgrund der aufgehobenen Kontaktinhibierung, um wieder einen konfluenten Zellverband herzustellen (Terano et al. 2001). Auf Einzelzellniveau messbar verschwindet der proliferative

Effekt über ein ganzes Well betrachtet, da zu große Lücken im Zellverband entstanden sind, die insgesamt den Proliferationsrückgang erklären. Hohe DON-Konzentrationen führen also in der Gesamtheit betrachtet in beiden Zelllinien zu einer Proliferationshemmung (Abb. 40).

4.3.4.3 DON verursacht Apoptose – keine Nekrose

Die zytotoxische Wirkung von DON auf beide Epithelzelllinien konventioneller Zellkultur ist nicht auf Nekrose (LDH-Assay), sondern auf Apoptose (Caspase-3/7-Nachweis) zurückzuführen (siehe Tabelle 3–1 und Abb. 40).

Ein oft benutzter Test zur Abschätzung des nekrotischen Zelltods ist die Messung der Freisetzung zytoplasmatischer Laktat-Dehydrogenase. In dieser Arbeit waren die IPECs im LDH-Test weitestgehend insensitiv gegenüber DON-Inkubation. Es wurden nur Schwankungen der physiologisch in Zellen stattfindenden Nekrose detektiert. Das stimmt mit Angaben aus der Literatur überein. Humane Lungenfibroblasten (NHLF) waren resistent gegenüber DON-induzierter Nekrose, da sehr hohe DON-Konzentrationen bis zu 30 µg/ml während 120 h Inkubation nicht zu einer signifikanten LDH-Freisetzung führten (Königs et al. 2007). In primären humanen Hepatozyten trat LDH-Freisetzung erst nach langer Inkubationszeit auf, was auf sekundäre Nekrose zurückzuführen ist (Königs et al. 2008) oder nach 24-stündiger Inkubation mit sehr hohen DON-Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml (Mikami et al. 2004). Die vierstündige Inkubation mit sehr hohen DON-Konzentrationen von bis zu 9000 ng/ml induzierte eine Nekrose in jejunalen Explantaten von abgesetzten Ferkeln (Kolf-Clauw et al. 2009). Dies zeigt eine höhere DON-Empfindlichkeit des intakten epithelialen Zellverbandes im Vergleich zu Enterozyten allein.

Beide Zelllinien zeigten eine Caspase-3/-7-Aktivierung nach sehr kurzen Inkubationszeiten von sechs bis acht Stunden mit der hohen DON-Konzentration (2000 ng/ml). Dieser initiale Anstieg der Caspase-3-Aktivität stimmt mit Ergebnissen in humanen Kolonkarzinomzellen (HT-29) überein, die mit ca. 3000 ng/ml DON für bis zu 24 h behandelt wurden (Bensassi et al. 2009). Primäre porcine Hepatozyten zeigen ein ähnliches Caspase-3-Aktivierungsmuster nach der Applikation von ca. 10 und 100 µg/ml DON für 6 h (Mikami et al. 2004). In unterschiedlichen Zelllinien wurde nach DON-Behandlung ein Anstieg apoptotischer Zellen sowie die Beteiligung von p38 an dieser Apoptoseinduktion nachgewiesen (Baltriukiene et al. 2007). Das Niveau der Caspase-Aktivierung war bei IPEC-1 höher als bei IPEC-J2 (Western Blot),

was auch an der schwächer induzierten Positivkontrolle Staurosporin erkennbar war, die DNA-Fragmentierung verursacht (Bertrand et al. 1994).

DNA-Fragmentierung als Hinweis für Apoptose wurde auch durchflusszytometrisch bestätigt (siehe 3.5). Die IPEC-1-Zellen zeigten ab 48 h nach Gabe hoher DON-Konzentrationen in der Prä-G1-Phase des Zellzyklus einen signifikant erhöhten Gehalt an fragmentierter DNA, der auf Apoptose hinweist (Darzynkiewicz et al. 1992). IPEC-J2 zeigte dagegen keine Erhöhung fragmentierter DNA in dieser Phase. Dafür wurde in dieser Zelllinie eine Erhöhung von Zellen mit doppeltem Chromosomensatz in der G2/M-Phase detektiert. Dieser Zellzyklusarrest war bei IPEC-J2 ausgeprägter als bei IPEC-1. Der verstärkte G2/M-Arrest der IPEC-J2-Zellen deutet darauf hin, dass der G2/M-Checkpoint aufgrund von DNA-Schäden nicht passiert werden konnte. An humanen Caco-2-Zellen wurde das genotoxische Potential geringer DON-Konzentrationen (150 ng/ml) anhand von DNA-Schädigungen nachgewiesen (Bony et al. 2006). Während des Arrestes müssen erst die bestehenden DNA-Schäden repariert werden, bevor die Zellen wieder in die Mitosephase übergehen können. In IPEC-1-Zellen können vielleicht die entstandenen Schäden nicht mehr effektiv im G2/M-Arrest repariert werden, daher geht diese Zelllinie nach Gabe hoher DON-Dosen verstärkt in Apoptose über. Von der Gruppe um Yang wurde an humanen intestinalen Epithelzellen (HCT-116 und Intestine-407) gezeigt, dass eine hohe DON-Konzentration (1000 ng/ml) für 48 h deutlich die Zellproliferation durch die Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase beeinflusst. Dagegen wurde keine Erhöhung der PräG1-Phase detektiert, was im Einklang mit dem in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnis der IPEC-J2-Zellen ist. Als Grund der Arretierung wurde eine von p53 unabhängige erhöhte Genexpression von p21 beschrieben (Yang et al. 2008). Die verringerte Proliferationsrate der Zellen ist also durch den G2/M-Arrest bedingt und nicht durch direkte zytotoxische Wirkung von DON. In murinen Makrophagen wurde auch gezeigt, dass die molekularen Mechanismen dieses G2/M-Zellzyklus-Arrestes die Aktivierung von p38, MAPKs, p53 und p21 beinhalten (Zhou et al. 2005).

4.3.4.4 DON zerstört die Tight Junction-Struktur

Die drastischste Wirkung von hohen DON-Konzentrationen wurde in dieser Arbeit in Bezug auf die Tight Junction-Integrität festgestellt (siehe Abb. 40). In dieser Arbeit wurde die ganzheitliche Zerstörung des Epithelzellverbandes (TEER-Messung) sowie die vollkommene Auflösung der normalen zellulären Verteilung der Tight Junction-Proteine ZO-1, Claudin-3 und -4 als Zellbegrenzung (Immunfluoreszenz) gezeigt. Am Stärksten trat diese Strukturveränderung

und Proteindegradation bei Claudin-3 auf (in beiden Zelllinien schon nach 24 h), gefolgt von Claudin-4 (ab 24 h Abschwächung des Signals) und nach 72 h Inkubation verschwand ZO-1 gänzlich. Vergleichsweise war der Einfluss von DON auf IPEC-J2- stärker als auf IPEC-1-Zellen.

Das Protein ZO-1 ist im zytoplasmatischen Teil der *Zonula occludens* zu finden und ist essenziell für die strukturelle Organisation von Tight Junctions (Stevenson et al. 1986). Es stellt einen wichtigen Faktor bei der Bildung der weitgehend impermeablen intestinalen Barriere dar. Der Zusammenbruch dieser Verbindung führt zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität, nicht nur für Nahrungsbestandteile sondern auch für Toxine und Mikroorganismen (Turner 2006). Weiterhin interagiert ZO-1 mit Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren (Paris et al. 2008). Der Effekt von DON auf ZO-1 in epithelialen Zellkulturen IPEC-1 und Caco-2 wurde erst kürzlich analysiert (Pinton et al. 2009). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zeigten Pinton und Kollegen, dass extrem hohe DON-Konzentrationen von ca. 9000 ng/ml die ZO-1-Struktur in den untersuchten Zelllinien nicht beeinflussten. Diese hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass die ZO-1-Struktur in beiden IPEC-Zelllinien mit DON 2000 ng/ml massiv zerstört wird. Demgegenüber weist der durchgeführte Immunoblot zwar nur eine leichte Reduktion der ZO-1-Proteinmenge auf, stimmt aber zumindest von der Tendenz her mit der Proteinlokalisierung überein. Die Reduktion der Tight Junction-Proteine könnte eine direkte Konsequenz der ribosomalen Toxizität von DON sein.

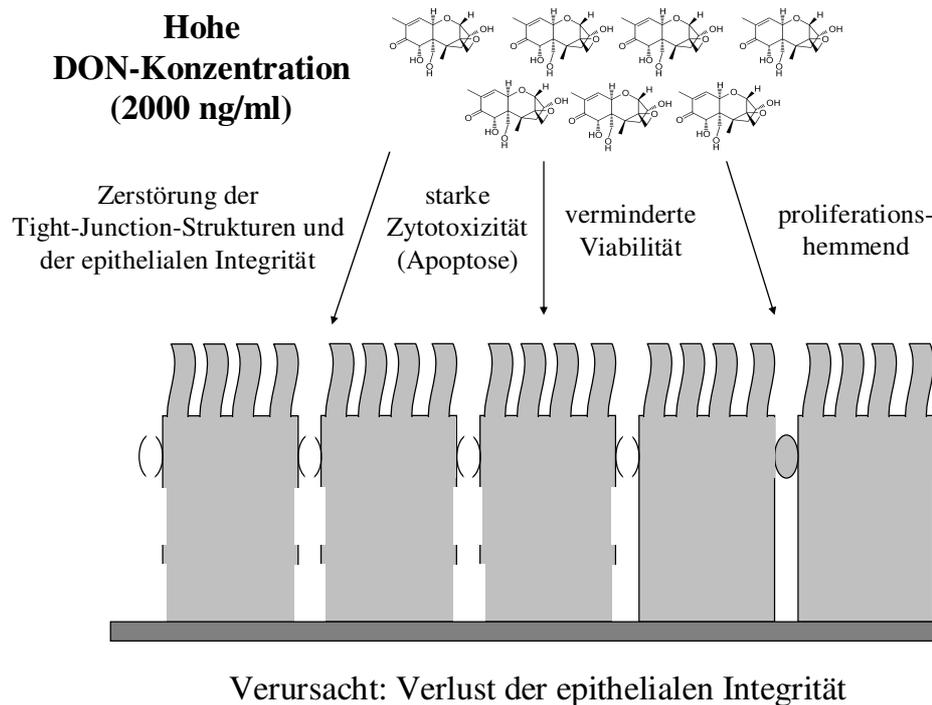


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Effekte hoher DON-Konzentrationen

4.3.4.5 Die DON-Derivate DONS und DOM zeigen keine Zytotoxizität

Die zytotoxischen Effekte von DON sind charakterisiert durch die Verringerung der zellulären Viabilität sowie der Proliferationsrate. Das ist bei den DON-Metaboliten DON-Sulfonat (DONS) und de-epoxy-DON (DOM) nicht mehr der Fall, da ihnen die toxisch wirksame Epoxyd-Gruppe fehlt. Deren fehlende Zytotoxizität konnte in dieser Arbeit im Epithelzellkulturmodell *in vitro* bestätigt werden. In einem Konzentrationsrahmen von 0 bis 800 ng/ml wurden das Mykotoxin und seine Derivate auf beide Zelllinien appliziert. Wie auch schon unter Absatz 4.3.2 und 4.3.4.1 beschrieben, reduzierte sich die Stoffwechselaktivität der IPECs mit DON-Konzentrationen von 400 ng/ml und mehr signifikant im MTT-Test. Das ist in Einklang mit den Befunden an der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, die im MTT-Test eine reduzierte Viabilität bei ca. 200 ng/ml DON anzeigte (Sergent et al. 2006). Verschiedene andere Zelllinien wiesen in dem Konzentrationsrahmen ebenso eine erhöhte Sensitivität gegenüber 48-stündiger DON-Inkubation im MTT-Test auf (Cetin and Bullerman 2005). DONS zeigte keinen Einfluss auf die Viabilität beider untersuchter Zelllinien. Auch der Metabolit DOM, dem die toxizitätsvermittelnde 12,13-Epoxydgruppe fehlt, hat *in vitro* keine zytotoxischen Eigenschaften. Das stimmt mit den Untersuchungen *in vivo* überein, bei denen DONS und DOM keinen Effekt auf die Nährstoffresorption im Darm hatten (Dänicke et al. 2010). Obwohl die mikrobielle Entgiftung von DON in DOM im porcinen Darmtrakt eher eine un-

tergeordnete Rolle spielt (Dänicke et al. 2004a), könnte die Mischung des DON-kontaminierten Futters mit Natrium-Metabisulfit, welches DON unter feuchten Bedingungen zu DON-S reduziert (siehe 1.3.1), in Zukunft eine landwirtschaftlich praktikable Entgiftungsstrategie sein.

4.3.5 Die Zelllinien IPEC-1 und -J2 reagieren unterschiedlich auf DON

Wie schon in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, sind die Zelllinien IPEC-1 und -J2 zwar beide intestinalen Ursprungs, jedoch stammt IPEC-1 aus weiter distal liegenden Darmabschnitten (Mischkultur aus Ileum und Jejunum) als IPEC-J2 (Reinkultur Jejunum). Daher verwundert es nicht, dass die Zelllinien teilweise sehr unterschiedlich auf die DON-Behandlung reagieren. In Tab 3-1 wurden die Reaktionen beider Zelllinien auf DON-Gabe vergleichend dargestellt. Im Großen und Ganzen betrachtet, zeigen die Zelllinien gleiche Tendenzen, die manchmal nur geringfügig in der DON-Konzentration oder dem Zeitpunkt der zellulären Reaktionen abweichen. Allerdings offenbaren einige Ergebnisse auch starke Diskrepanzen zwischen beiden Zelllinien (siehe Übersicht Abb. 41). Zunächst muss erwähnt werden, dass in IPEC-1 etwa viermal mehr Zellen pro Sichtfeld zählbar sind als in IPEC-J2. Obwohl morphologisch ähnliche Effekte sichtbar waren, fiel die Zellzahl in IPEC-1 sehr viel schneller und drastischer ab. Wie in Abschnitt 4.3.4.2 beschrieben, wurde in beiden Zelllinien ein biphasischer Verlauf der Teilungsrate detektiert. In IPEC-1 zeigten sich dabei aber eine frühere sowie deutlichere Proliferationssteigerung bei DON 200 ng/ml und eine zeitigere Abnahme der Proliferationsaktivität bei DON 2000 ng/ml im Vergleich zu IPEC-J2. Besonders auffällig waren die Effekte von DON auf den Zellzyklus. Die Teilungsrate der Zellen verschob sich in IPEC-J2 ganz eindeutig in Richtung G2/M-Arrest. Dieser war zwar auch in IPEC-1 zu finden, jedoch war hier zusätzlich eine sehr starke Zunahme an fragmentierter DNA zu detektieren, die auf verstärkte Apoptose der Zellen hinweist. Das geht einher mit den Daten der Caspase-3-Aktivität und -Expression. Nach DON-Applikation wie auch Inkubation mit der Positivkontrolle Staurosporin zeigten sich bei IPEC-1 eine höhere Caspase-3-Aktivität sowie ein stärkeres Proteinsignal als in IPEC-J2. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in IPEC-1 ein Signaltransduktionsweg in Richtung Apoptoseinduktion verändert ist.

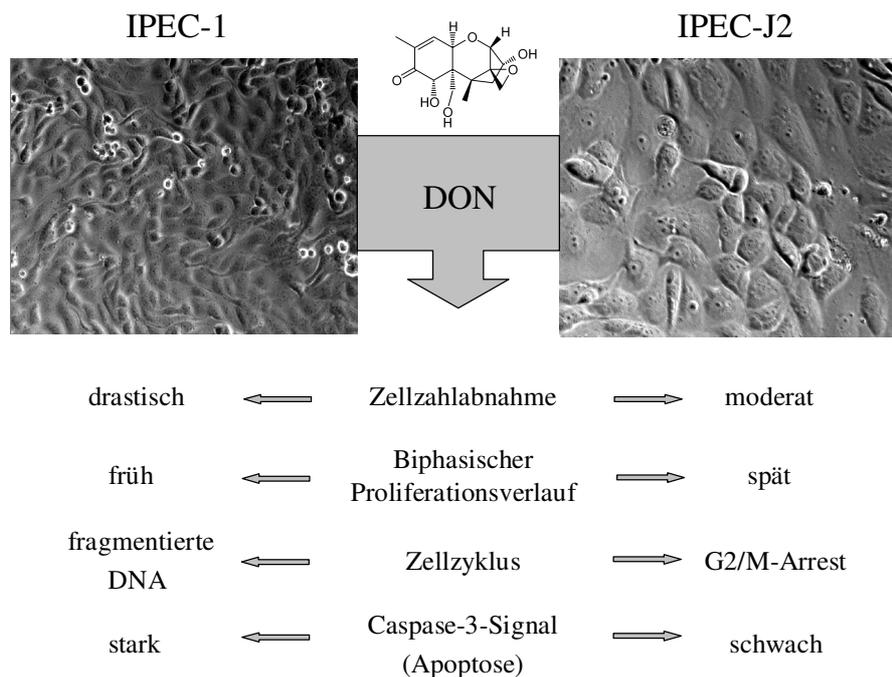


Abbildung 41: Übersicht der Unterschiede der IPEC-Reaktionen auf DON

4.4 Die DON-Toxizität ist abhängig von der Einwirkungsrichtung und der Permeabilität des Wachstumsuntergrundes

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Toxizität des Mykotoxins DON wesentlich davon abhängt, von welcher Richtung es auf die Enterozyten einwirkt. So hat im Membranzellkulturmodell die apikale Applikation keinen messbaren Einfluss auf die Integrität des IPEC-J2-Zellverbandes, wohingegen die basolaterale Gabe der gleichen hohen DON-Konzentration zur völligen Zerstörung der Tight Junctions führt (siehe Schema Abb. 42).

In früheren Studien wurden DON-Effekte nur nach apikaler Applikation auf Epithelzellen untersucht. Dieses Verfahren beruht auf der Überlegung, dass die apikale Exposition eine Folge der oralen Aufnahme des Mykotoxins ist, woraufhin es die Enterozyten nur aus dem Darmlumen erreicht. Jedoch sind die Epithelzellen DON nicht nur von der apikalen (luminalen), sondern auch von der basolateralen (serosalen/vaskulären) Seite ausgesetzt. Der luminale Kontakt findet vor allem in den proximalen Teilen des Dünndarms (Duodenum und der Beginn des Jejunums) statt, wo DON sehr schnell ins Serum aufgenommen wird (Dänicke et al. 2004a; Prelusky 1996). Während die Hauptmenge über den Harn ausgeschieden wird, kann nur ein Bruchteil des mit dem Futter aufgenommenen DONs in den distalen jejunalen Segmenten nachgewiesen werden, dessen Exkretion über den Kot erfolgt (Dänicke et al. 2004a). Dennoch treten veränderte Zellmorphologie und Stoffwechselaktivität in eben diesen

wenig-exponierten Darmregionen auf. Dort erreicht das aufgenommene DON die Enterozyten deshalb wahrscheinlich eher durch die Blutzirkulation, wo Konzentrationen von 50 bis zu 325 ng/ml DON nachgewiesen wurden (Dänicke et al. 2004a; Prelusky 1996).

Weiterhin wurden die meisten in der Literatur beschriebenen Versuche (ausgenommen die TEER-Messungen) konventionell auf impermeablen Untergrund von Plastik-Zellkulturplatten durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine überraschende Widerstands-fähigkeit der auf permeablem Untergrund gewachsenen intestinalen IPEC-J2-Epithelzellen gegenüber der Mykotoxingabe von der apikalen Seite gefunden. Im Gegensatz dazu hatte die basolaterale Applikation der gleichen DON-Konzentrationen einen eindeutigen, dosisabhängigen Effekt mit Schädigung der Integrität der epithelialen Barriere und Erhöhung des apoptotischen Zelltods. Da alle experimentellen Bedingungen bis auf die Richtung der Toxingabe gleich waren, kann geschlossen werden, dass der Wachstumsuntergrund der Zellen und die erfolgten Änderungen der Zellschichtformation eine entscheidende Rolle gespielt haben (Diesing et al. 2011a).

4.4.1 DON wirkt nur von der basolateralen Zellseite zytotoxisch

Die morphologische Beurteilung der Zellen ergab eine sehr hohe Toleranz der apikal mit DON inkubierten IPEC-J2-Zellen auf Membranen gegenüber den auf Platten gewachsenen Zellen. Die basolaterale DON-Gabe korrelierte dagegen schon eher mit dem Schädigungsmuster, welches auf Plastikplatten gefunden wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zellen durch korrektes Ausbilden ihrer Polarität und der besseren Nährstoffversorgung auf Membranen von der apikalen Applikation toxischer Stoffe weitgehend geschützt sind. Das ist im Einklang mit der Vorstellung, dass die epitheliale Barriere den Körper vor den Umwelteinflüssen schützen soll und erst eine gewisse Konzentration erreicht werden muss, um das Epithel zu schädigen.

Die Zellkernfärbung und -auszählung ergab, dass die basolaterale Gabe von DON 2000 ng/ml eine signifikante Reduktion der Zellanzahl verursacht und somit die Viabilität der Zellen vermindert. Im Gegensatz zur apikalen Gabe von DON 2000 ng/ml auf konventionellen Zellkulturplatten hat die gleiche DON-Konzentration apikal auf Membrankultureinsätzen appliziert keinen negativen Effekt auf die Zellanzahl. Die Gesamtzellanzahl war nach 48 h mit basolateralem 4000 ng/ml DON signifikant vermindert und verringerte sich noch nach 72 h DON-Exposition. Damit einhergehend wurde ein signifikanter Anstieg der Zellkernfläche nach 72 h

mit 4000 ng/ml DON von basolateral beobachtet, was als Hinweis für ablaufende Apoptose angesehen werden kann; bei geringeren Dosen konnte keine Änderung der Zellkernfläche festgestellt werden (Diesing et al. 2011a). Es wurde auch von einer signifikanten Abnahme der Gesamtzellanzahl der humanen K562 Erythroleukemie-Zelllinie in Antwort auf 300 ng/ml DON für 48 h berichtet (Wu et al. 2007). Dies waren jedoch Immunzellen, von denen bekannt ist, dass sie sensitiver auf DON reagieren als epitheliale Zelllinien (Baltriukiene et al. 2007). Eine signifikante Verminderung der Zellanzahl wurde auch an porcinen Gebärmutterepithelzellen mit hohen DON-Konzentrationen von ca. 1120 ng/ml detektiert (Tiemann et al. 2003).

Auf Einzelzellniveau zeigte IPEC-J2 nach DON-Exposition auf impermeablem Untergrund keine signifikant veränderte Proliferationsrate an. Das änderte sich nach Wachstum auf permeablem Untergrund. Nach basolateraler DON-Gabe der hohen DON-Konzentration für 48 bis 72 h erfolgte eine Antwort der Zellen mit gesteigerter Proliferation. Da nur sehr wenige Zellen auf der Membran verblieben sind und auch die gemessenen TEER-Werte ab 24 h nach basolateraler DON 2000 ng/ml Exposition die vollständige Zerstörung des Zellverbandes anzeigten, könnte diese gesteigerte Proliferationsrate durch fehlende Zell-Zell-Kontakte erklärt werden und auf die damit verbundene Aufhebung der Kontaktinhibition zurückzuführen sein. Auch in der FACS-Analyse deutete die Säule in der S-Phase nach basolateraler Applikation der hohen DON-Konzentration auf eine, zwar nicht signifikante, aber numerisch leicht erhöhte Proliferationsrate hin.

Bei Betrachtung der Zellzyklusphasen wurde auf permeablem Untergrund nach basolateraler DON-Inkubation mit 2000 ng/ml ein signifikanter Abfall des DNA-Gehaltes in der G0/G1-Phase schon nach 48 h sowie ein Anstieg der fragmentierten DNA in der PräG1-Phase nach 72 h beobachtet. Dass hohe Konzentrationen des Mykotoxins einen Zellzyklus-Arrest in epithelialen Zellen bewirken, ist bereits beschrieben (Ohtsubo et al. 1968; Yang et al. 2008). Auch der Anstieg apoptotischer Zellen in der PräG1-Phase bei gleichzeitigem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase wurde gezeigt (Ohguchi et al. 1998). Dieser Anstieg der DNA-Fragmentierung nach basolateraler Gabe der hohen DON-Konzentration spricht eher für den Übergang in Richtung Apoptose als einen Zellzyklusarrest. Caspase-3, eines der Effektorproteine der Apoptose, war zwar im Western Blot nicht nachweisbar, jedoch konnte die Aktivität mit dem hochsensitiven luminometrischen Caspase-3/7-Test nach 6 h Inkubation mit DON 2000 ng/ml von basolateral gezeigt werden. Auch in HT-29-Zellen konnte eine erhöhte Caspase-3-Aktivität nach DON-Einwirkung gemessen werden (Bensassi et al. 2009). Interes-

santerweise änderte sich die DON-bedingte Reaktion der IPEC-J2-Zellen auf permeablem im Vergleich zu impermeablem Untergrund. Bei Letzterem wurde, wie unter 4.3.4.3 beschrieben, keine signifikante Erhöhung fragmentierter DNA in der PräG1-Phase detektiert. Bei der sensitiven luminometrischen Messung der Caspase-3/7-Aktivität konnte eine leichte Erhöhung des Aktivitätsniveaus verzeichnet werden. Es könnte also vermutet werden, dass von basolateral behandelte IPEC-J2-Zellen stärker von DON beeinflusst werden, sodass sie im G2/M-Arrest weniger DNA-Schäden reparieren können und verstärkt in Apoptose übergehen müssen.

Obwohl ein drastisches Absinken der Gesamtzellzahl zu verzeichnen war, konnte auch auf permeablem Untergrund kein nekrotischer Zelltod (LDH-Test) detektiert werden. In der Literatur wurde schon beschrieben, dass DON-behandelte intestinale Epithelzellen (humane Caco-2, porcine IPEC-1) keine Nekrose aufwiesen, obwohl ein drastischer TEER-Abfall sowie verminderte Stoffwechselaktivität (MTT-Test) gemessen wurden (Pinton et al. 2009; Sergent et al. 2006). In humanen Immunzellen wurde eine signifikante Erhöhung des apoptotischen Zelltods nach 24 h DON-Exposition ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$) beschrieben, aber kein Effekt auf den nekrotischen Zelltod verzeichnet (Baltriukiene et al. 2007). Die gleiche Studie zeigte keinen Einfluss auf beide Parameter in den getesteten epithelialen Zelllinien BHK21 (Hamster-Nierenzellen) und MH-22a (Maus-Leberzellen). Einige Autoren beschreiben im Gegensatz dazu eine starke LDH-Freisetzung nach DON-Exposition, allerdings mit sehr hohen Konzentrationen von $30 \mu\text{g/ml}$ für 48 h (humane Caco-2) und $9 \mu\text{g/ml}$ für 24 h (humane HT-29) (Maresca et al. 2002; Tep et al. 2007).

Eine mögliche Erklärung für das schwache apoptotische Caspase-3-Signal und die fehlende LDH-Freisetzung in der vorliegenden Arbeit könnte sein, dass die verwendeten IPECs eher in die Anoikis als Apoptose eintreten. Unter Anoikis (gr. heimatlos) versteht man im Unterschied zur Apoptose eine Sonderform des programmierten Zelltods, mit Verlust der Zelladhäsion durch den fehlenden Kontakt zu Nachbarzellen, wie ihn Epithelzellen normalerweise haben. Dabei reißen Zell-Zell-Verbindungen ab, aber die Zellmembran der sterbenden Zellen bleibt intakt (Douma et al. 2004; Frisch and Ruoslahti 1997). Demzufolge gehen Zellen verloren (wie durch TEER-Messung und Zellzählung gezeigt), wodurch kein Apoptose-Signal detektierbar ist und es erfolgt keine LDH-Freisetzung.

4.4.2 DON zerstört die epitheliale Barriere

Eine essenzielle Funktion der intestinalen epithelialen Zellschicht ist die Bildung einer effektiven Barriere gegen die nicht-selektive Aufnahme von Nahrungsantigenen, Pathogenen und Toxinen (Arrieta et al. 2006; Yu and Yang 2009). Interzelluläre Tight Junctions stellen einen wesentlichen Bestandteil dieser intestinalen Barriere dar, deren Beschädigung zu erhöhter Permeabilität führt, messbar am Abfall des epithelialen Widerstandes. Als Indikatoren der epithelialen Integrität gelten Proteine, die essenzielle Bestandteile der Tight Junction-Komplexe sind wie das Gerüstprotein ZO-1 und die Transmembranproteine Claudin-3 und -4. Neben anderen Proteinen ermöglichen sie die interzellulären Kontakte und die Kompartimentierung in apikales und basolaterales Kompartiment. Weiterhin ist das Gerüstprotein ZO-1 essenziell für die räumliche Organisation der Claudine, welche vorrangig verantwortlich sind für die Aufrechterhaltung des epithelialen elektrischen Widerstands (Krause et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein signifikanter Einfluss von DON auf die Integrität der intestinalen Barriere wie auch die zelluläre Viabilität in Abhängigkeit von der Richtung der Applikation existiert. Besonders auffallend war der Effekt im untersuchten Parameter des epithelialen Widerstands (TEER). Unbeeinflusst durch apikale Applikation der verwendeten DON-Konzentrationen zerbrach hingegen die Integrität des Zellverbandes nach basolateraler Gabe hoher DON-Konzentrationen. Der TEER-Wert sank nach 24 h mit DON 2000 ng/ml von basolateral drastisch und irreversibel ab. Die höchste DON-Konzentration (4000 ng/ml) verursachte schon nach 24 h einen irreversiblen TEER-Abfall unterhalb des kritischen Schwellenwertes für die zelluläre Konfluenz von 1 k Ω /Well. In den porcinen und humanen intestinalen Epithelzelllinien IPEC-1, Caco-2 und HT-29 wurde auch ein dosisabhängiger, negativer Einfluss von DON auf den TEER nachgewiesen (Pinton et al. 2009; Maresca et al. 2002). In diesen Studien führte das Mykotoxin, appliziert von der apikalen Seite, zwar zu einer signifikanten Reaktion, aber der Abfall unter den Schwellenwert wurde erst bei sehr hohen Konzentrationen von bis zu 30 μ g/ml nach 72 h erreicht. Die basolaterale Applikation des Toxins wurde bisher in der Literatur nicht untersucht.

In vitro wurde gezeigt, dass ein aktiver DON-Transport von der basolateralen zur apikalen Seite der Epithelzellen existiert, der einer einfachen Diffusion von apikal nach basolateral entgegenwirkt (Sergent et al. 2006; Tep et al. 2007; Videmann et al. 2007). Durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands humaner intestinaler Caco-2-Zellen wurde gezeigt, dass DON die epitheliale Zellintegrität stört (Sergent et al. 2006). Die Störung der

epithelialen Barriere ist die Ursache für Effekte des Mykotoxins, da die Tight Junctions nicht mehr ihre Integrität besitzen.

Der Western Blot von ZO-1 zeigte im Falle der basolateralen Mykotoxin-Exposition eine Verringerung der Proteinmenge nach 48 h, welche nach 72 h gänzlich verschwand. Noch deutlicher war die basolaterale DON-Auswirkung auf Claudin-3, wo eine schwache Bande nach 24 h und gar kein Signal mehr nach 48 und 72 h detektierbar war. Das Claudin-4-Signal wurde nach 72 h abgeschwächt. Auch hier zeigte die apikale DON-Gabe keine Auswirkung auf die Proteinexpression; sie blieb auf gleichem Niveau mit der unbehandelten Kontrolle. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in der Immunfluoreszenz der drei Tight Junction Proteine wieder. Weiterhin war die Funktion der intestinalen Barriere wie durch den gemessenen TEER-Wert angezeigt, negativ beeinflusst durch den Verlust von Claudin-3 und -4. Bei apikaler DON-Gabe wurde ein Abfall der Claudin-3-Expression und damit eine Beeinträchtigung der intestinalen Barriere festgestellt, allerdings wurden höhere DON-Konzentrationen (ca. 9 µg/ml) als in dieser Arbeit verwendet (Maresca et al. 2002).

Das Proteinverteilungsmuster von ZO-1 war überraschenderweise in der Immunfluoreszenz nicht beeinträchtigt. Bei der Begutachtung der gesamten Zellschicht fielen jedoch größere Löcher im Zellverband auf, die für den Zelltod ganzer Zellgebiete sprechen und die Zerstörung des Epithels anzeigen. Das erklärt weiterhin den Abfall der Proteinmenge, der im Western Blot deutlich wurde: Obwohl die ZO-1-Struktur zwischen zwei nebeneinander liegenden Zellen unbeeinflusst blieb, verursachte der erhöhte Zellverlust eine Verringerung der Menge an ZO-1-Protein auf der gesamten Membran.

Von anderen Autoren wurde berichtet, dass DON die Expression von Claudin-3 und -4 verminderte und damit die Integrität des humanen epithelialen Caco-2-Zellverbandes zerstörte (Pinton et al. 2009; Pinton et al. 2010; Sergent et al. 2006). In der gleichen Studie wurde kein Effekt von DON auf die ZO-1-Expression nach 48-stündiger apikaler Inkubation erkannt. Obwohl sehr hohe Dosen von ca. 9 µg/ml nur von apikal verabreicht wurden, stimmen die Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit überein (Pinton et al. 2009). Vom selben Autor wurde die Beteiligung von MAP-Kinasen, im speziellen des p44/45 ERK-Signalwegs, am DON-induzierten Verlust der epithelialen Integrität als Folge der verminderten Claudin-4-Proteinexpression aufgeklärt (Pinton et al. 2010). Die stärkere Beeinflussung der Claudin-Proteine durch DON liegt höchstwahrscheinlich an ihrer exponierten extrazellulären Lage, die sie bezüglich dem parazellulären DON-Durchtritt sehr angreifbar macht. Das intrazelluläre

ZO-1-Protein ist DON gegenüber etwas geschützter gelegen und wird wahrscheinlich eher durch transzelluläres DON beeinflusst.

Nur selten werden Studien veröffentlicht, die die gerichtete Applikation einer Substanz auf die apikale und basolaterale Seite von auf Membrankultureinsätzen angezogenen Epithelzellen einbeziehen. Eine mit der vorliegenden vergleichbare toxikologische Studie wurde mit dem von *Staphylococcus aureus* produzierten α -Toxin an humanen intestinalen Epithelzellen (Caco-2) durchgeführt (Kwak et al. 2012). Die basolaterale Gabe des Toxins zerstörte die Integrität der epithelialen Barriere, gemessen am TEER-Wert und der zellulären Expression von Tight Junction-Proteinen (ZO-1 und -3, Occludin) weitaus drastischer als die apikale Applikation (Kwak et al. 2012). Von der Gruppe um Maresca wurde bestätigt, dass Caco-2-Zellen in der Tat sensitiver auf basolateral verabreichte Agenzien reagieren, in diesem Fall *E.coli* Bakterien, als auf apikal applizierte. Nach basolateraler Bakterien-Applikation erhöhte eine, hier jedoch auch nur von apikal applizierte, DON-Gabe sogar die Chemokinproduktion der Zellen signifikant (Maresca et al. 2008). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass es bei humanen Kolonepithelzellen (T84) nach basolateraler Adenosin-Applikation zu einer verstärkten Ionensekretion kam im Vergleich zu apikaler Gabe (Barrett et al. 1989). Beide Literaturstellen begründen die Wirkungsunterschiede in der sehr unterschiedlichen Ausstattung der apikalen und basolateralen Membranseite mit Rezeptorproteinen und Transportsystemen. Das trifft sicher auch auf die in dieser Arbeit untersuchten IPEC-J2-Zellen zu, die nach basolateraler DON-Gabe drastische zytotoxische Reaktionen zeigten. Nachweislich haben sie eine andere Proteinausstattung auf der apikalen und auf der basolateralen Membranseite (Simons and Fuller 1985). Weiterhin produzieren sie auf der apikalen Zellseite die schützende Mukusschicht (Schierack et al. 2006), die im hier getesteten DON-Konzentrationsrahmen die Zellen vor zytotoxischen Effekten schützt. Die fehlende Schutzschicht sowie die zahlreichen Transportsysteme auf der basolateralen Seite sind wahrscheinlich der Grund, warum die Zellen gegenüber dem Mykotoxin von basolateral viel beeinflussbarer sind.

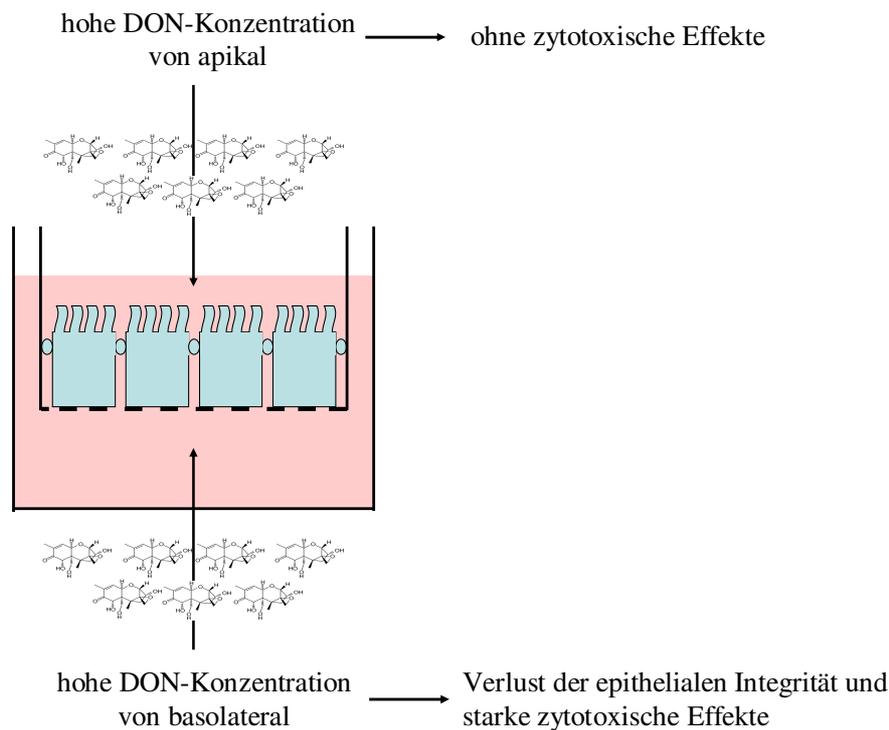


Abbildung 42: Schema der Wirkung hoher DON-Konzentrationen auf IPEC-J2-Membrankulturen

4.5 Differenzielle Genexpression in IPEC-J2 nach gerichteter DON-Exposition (Microarray-Analyse)

Die molekularen Reaktionen der epithelialen Barriere auf DON-Einwirkung sind bislang nicht in umfassendem Maße untersucht worden. Bisher wurden Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der DON-Wirkung vorwiegend an immunkompetenten Zellen wie z. B. Makrophagen durchgeführt (Zhou et al. 2005). Eine Microarrayuntersuchung der DON-Reaktion in Hepatomazellen (Nielsen et al. 2009) sowie eine auf epitheliale und immunrelevante Gene bezogene Genexpressionsstudie ist mittels qPCR an IPEC-J2 durchgeführt worden, allerdings ohne Substanz-Applikation (Mariani et al. 2009). Es fehlte eine allgemeine Übersicht der durch DON regulierten Gene und deren Einbindung in globale Stoffwechselwege. Weiterhin blieben die transkriptionalen Effekte von richtungsspezifischer DON-Applikation (entweder von apikal oder basolateral) auf die polaren Epithelzellen bisher unbeachtet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine umfassende Genexpressionsanalyse der Toxin-Reaktion von polarisiert auf permeablem Untergrund gewachsenen Enterozyten durchgeführt. Für die Untersuchung wurde IPEC-J2 ausgewählt, da diese Zellen nach eigenen Ergebnissen (siehe 4.2.1) die bessere Anpassung an die *in vivo*-Situation darstellen, was in einer

aktuellen Publikation bestätigt wurde (Brosnahan and Brown 2012). Die Microarray-Analyse wurde an vier DON-Behandlungsgruppen durchgeführt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Auf IPEC-J2-Zellen wurden für 72 h entweder DON-Konzentrationen im niedrigen (200 ng/ml) bzw. hohen Bereich (2000 ng/ml) von apikaler oder basolateraler Seite gegeben. Die niedrige Konzentration verursacht bei den funktionellen Tests keine signifikanten Verschlechterungen der zellulären Viabilität, während die hohe Konzentration eine Schädigung hervorruft. Diese Schädigung ist bei 2000 ng/ml basolateral größer im Vergleich zu 2000 ng/ml apikal (siehe 3.9). In der genomweiten Genexpressionsstudie der IPEC-J2-Zellen wurden verschiedenartig exprimierte Gene identifiziert, die sich in den vier Behandlungsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unterschieden. Um die Expressionsergebnisse des Microarrays zu verifizieren, wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qPCR) an ausgewählten Genen, die für Schlüsselenzyme biochemischer Stoffwechselwege kodieren, angeschlossen.

Als allgemeine Mechanismen der Epithelzellantwort auf DON-Exposition (unabhängig von der Einwirkungsrichtung oder Konzentration) konnten anhand der Microarray-Daten (siehe 3.10.1) die Hochregulation von Genen des Spliceosoms sowie die Herunterregulation von Genen der Ribosomen ermittelt werden. Da die ribosomale Translation durch Splice-Prozesse begleitet wird (ribosomales Splicing der mRNA), könnte die in allen Gruppen auftretende Hochregulation des Spliceosoms als eine Verteidigungsstrategie der Zellen angesehen werden, um die verminderte ribosomale Transkription und Proteinsynthese auszugleichen. Eine Ribosomeninhibierende Wirkung des Mykotoxins bestätigt die in der Literatur beschriebene Eigenschaft von DON, ribotoxischen Stress zu verursachen (Bae et al. 2010; Bae and Pestka 2008; Shifrin and Anderson 1999; Yang et al. 2008). Schon vor Jahren wurde die DON-verursachte Hemmung der Proteinbiosynthese auf ribosomaler Ebene beschrieben (Rotter et al. 1996). DON induziert oxidativen Stress und greift über die *ribotoxic stress response* in intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden ein (wie die Aktivierung des MAPK-Weges) und verursacht dadurch die Induktion von Transkriptionsfaktoren und deren Zielgenen, die z. B. zur Apoptoseaktivierung führen (Pestka 2008). Die Hochregulation der MAPKs konnte bei der Analyse der Microarray-Daten bestätigt werden, vor allem für DON 200 ng/ml von basolateral und 2000 ng/ml von apikal (Daten nicht gezeigt). Die Microarray-Daten zeigen deutlich, dass DON auch in die Signalwege von ErbB, Wnt, TGF-beta und Jak-STAT eingreift.

Eine Wirkung von DON auf die große Untereinheit der Ribosomen ist in der Literatur beschrieben (Ehrlich and Daigle 1987; Li and Pestka 2008), daher wurde das ribosomale Protein der großen 60S-Untereinheit RPL10a für die Verifizierung des Transkriptniveaus ausgewählt (Koga et al. 2003). Aufgrund der Ribotoxizität von DON wurde eine Beeinflussung der Transkription, Translation, Verarbeitung der RNA sowie der DNA-Replikation und -Reparatur postuliert und konnte im Microarray bestätigt werden. Bei der DNA-Replikation spielt die DNA-Ligase eine wesentliche Rolle. Beide Gene (RPL10a und LIG1) wurden, bestätigt durch die mRNA-Quantifizierung, nach DON-Exposition signifikant herunterreguliert. Diese Verminderung der DNA-Replikation steht im Einklang mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden, dass DON eine Proliferationshemmung (siehe 3.4.1) sowie einen Zellzyklusarrest verursacht (siehe 3.5). In der ablaufenden Mitose kann nach DON-Einwirkung scheinbar keine oder nur eine fehlerhafte Replikation der DNA durchgeführt werden; daher können die Zellzyklus-Checkpoints nicht mehr passiert werden. Da auch in der Literatur die Inhibierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase durch DON beschrieben ist und der Cyklin-abhängige Kinase-Inhibitor 1 (CDKN1A, P21) damit in Verbindung gebracht wurde (Yang et al. 2008; Gartel and Radhakrishnan 2005), fand dessen vergleichende Transkriptanalyse statt. Die durch beide Tests gezeigte mRNA-Erhöhung von p21 sowie der bewiesene Zellzyklusarrest bestätigen den von Yang et al. beschriebenen, durch stabilisierte p21-mRNA vermittelten Zellzyklusarrest (Yang et al. 2008).

Bei der Analyse der signifikant veränderten Gene fiel weiterhin auf, dass die Transkripte der genetischen Informationsverarbeitung und Proteinbiosynthese bei niedriger oder apikaler DON-Applikation überwiegend hochreguliert wurden. Dies korreliert mit der bei der Analyse des BrdU-Einbaus gemachten Feststellung, dass bei geringen Dosen eine proliferationsaktivierende DON-Wirkung nachzuweisen war (siehe 3.4.1). Durch die Toxin-vermittelte Hemmung der Proteinbiosynthese könnten die Zellen hier möglicherweise mit der erhöhten Genexpression reagieren. Bei der Untersuchung des Genexpressionsprofils der murinen Milz nach DON-Behandlung wurde eine verstärkte Expressionserhöhung einiger Gene für Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren gefunden (Kinser et al. 2004; Kinser et al. 2005). Der genaue Eingriff von DON auf die genetische Informationsverarbeitung muss aber noch weiter analysiert werden.

Wie auch schon in den vorhergehenden Untersuchungen (verminderte Reduktionskapazität im MTT-Test, siehe 3.3.4) fiel auf, dass DON eine gravierende Wirkung auf den Energiestoff-

wechsel der Zellen ausübt. Der zentrale Kreislauf des Citratzyklus (Energiegewinnung und Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesen) sowie die oxidative Phosphorylierung (Energiegewinnung mittels der mitochondrialen Atmungskette) sind vor allem in den beiden Gruppen mit den meisten regulierten Genen (DON 200 ng/ml basolateral und 2000 ng/ml apikal) betroffen. Daher wurde die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) als ein Schlüsselenzym des Citratzyklus ausgesucht, genauso wie die Succinat-Dehydrogenase (SDH), die sowohl im Citratzyklus als auch bei der oxidativen Phosphorylierung (Komplex II der mitochondrialen Atmungskette) eine wichtige Rolle spielt. Das Cytochrom *c*1 sitzt im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette (Halestrap 1982); gleichzeitig ist die Freisetzung von Cytochrom *c* ein zentraler Schritt in der Initiation der Caspase-abhängigen Apoptose (An et al. 2004). Diese Gene des zellulären Energiemetabolismus wurden im Microarray wie auch in der qPCR hochreguliert, was den erhöhten Energiebedarf der Zellen als Reaktion auf DON-Behandlung anzeigt. Die Erhöhung der Gene der oxidativen Phosphorylierung unterstreicht außerdem den durch DON-Exposition hervorgerufenen oxidativen Stress (Produktion von ROS) der Zellen (Kouadio et al. 2005; Pestka 2008). Da der Citratzyklus Ausgangspunkt für Biosynthesen ist, verwundert es nicht, dass die Synthesewege von Nukleotiden, Aminosäuren, Glycanen, Cofaktoren und Vitaminen ebenfalls beeinträchtigt sind.

DON ist aus der Literatur schon als Lysosomen-Destabilisator bekannt (Kouadio et al. 2005), daher wurde das Lysosomen-assoziierte Membran-Glycoprotein 2 (LAMP 2) verwendet (Eskelinen et al. 2003). LAMP2 fungiert als Regulator der selektiven Proteinaufnahme und -degradation (Eskelinen et al. 2003). Das lysosomale Protein wurde im Microarray signifikant herunterreguliert, was in der qPCR bestätigt wurde. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen des Neutralrot-Testes (siehe 3.3.3), der eine verminderte Lysosomenfunktion nach Applikation geringer DON-Konzentrationen anzeigte. Auch in der Literatur wurde die reduzierte lysosomale Funktion von Caco-2-Zellen nach DON-Exposition beschrieben (Kouadio et al. 2005). Welche Rolle genau die Lysosomen in Antwort auf die DON-Intoxikation spielen muss noch geklärt werden.

In den durchgeführten Experimenten wurde bereits eine starke Beeinträchtigung der Integrität der epithelialen Zellbarriere durch DON beschrieben (3.7.1). Daher wurde das in funktionellen Tests (Immunfluoreszenz und Western Blot, siehe 3.7.2 und 3.7.3) nach DON-Exposition auf Proteinebene stark verminderte Tight Junction-Gen Claudin-3 (CLDN3) in die Betrachtung einbezogen. Im Gegensatz zu der Reduktion der Proteinmenge zeigte die Analyse

der Genexpression widersprüchliche Ergebnisse an. So wurde das CLDN3-Gen im Microarray bei DON 200 ng/ml basolateral sogar hochreguliert, dagegen gab die qPCR-Quantifizierung nur eine Verminderung der mRNA-Expression bei 2000 ng/ml basolateral an. DON scheint in diesem Fall eher auf das Protein zu wirken als auf die Transkriptebene. In der Literatur wurde der Effekt von metabolischem Stress auf die Integrität und Funktion der epithelialen Barriere beleuchtet (Lewis and McKay 2009). Die physiologische Funktion der Barriere ist abhängig von einer adäquaten Energieversorgung, vorrangig durch mitochondriale ATP-Generierung. Die Konsequenzen mitochondrialer Dysfunktion beinhalten u.a. eine erhöhte parazelluläre Permeabilität der epithelialen Barriere für Mikroorganismen und führen letztendlich zu einer pathologischen Immunantwort, die eine Darmbeschädigung und -entzündung verursacht. Der hier gezeigte toxikologische Effekt von hohen DON-Konzentrationen passt in dieses Schema, da in dieser Arbeit die Degradation der Tight Junction-Strukturen nachgewiesen wurde, was eine erhöhte Permeabilität für Mikroorganismen plausibel macht.

Weiterhin wurde gezeigt, dass eines der in allen vier DON-Behandlungsgruppen gleichsinnig regulierten Gene (TRA1, *glucose regulated protein 94*, GRP94, Endoplasmin) auf mRNA-Niveau signifikant herunterreguliert wurde (Diesing et al. 2012). Dieses Chaperon des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist in die ER-Stress-Antwort eingebunden (Coe and Michalak 2009; Koch et al. 1986). In der Literatur wurde schon beschrieben, dass DON eine ER-Stress-Antwort hervorrufen kann. Demnach wirkt es auf mRNA- und Proteinebene auf das Protein GRP78 (BIP) (Shi et al. 2009; Yang et al. 2000). Die GRP78-Erhöhung wurde als Folge der DON-Toxizität über den Weg der NFκB-Aktivierung beschrieben (Yang et al. 2000). Die in der Arbeit gewonnenen Microarray-Daten zeigen bei keiner der vier Behandlungsgruppen eine signifikante Veränderung von GRP78 (Daten nicht gezeigt). Die Aktivierung von NFκB als Antwort auf ER-Stress ist bekannt und wurde auch als Reaktion auf die DON-Exposition beschrieben (Krishnaswamy et al. 2010; Moon and Pestka 2003; Moon et al. 2007). In weiterführenden Untersuchungen könnte die Proteinebene des GRP78-Proteins in DON-behandelten IPECs analysiert werden, um Aufschlüsse über die ER-Stress-Antwort in IPECs zu erhalten.

Die sensitive Methode der qPCR unterstreicht die Richtungen der Änderungen der Genexpression in Abhängigkeit der DON-Behandlung, die schon in der Microarray-Analyse erhalten wurden. Es traten geringe Differenzen der Expressionsniveaus zwischen qPCR und

Microarray auf, aber die Richtung der Regulation blieb gleich. Hier wurden unabhängige Proben für die qPCR und den Microarray genutzt, also betonen die Übereinstimmungen beider Methoden die Zuverlässigkeit der Microarray-Analyse. Der individuellen Variation zwischen den Proben und generellen technischen Unterschieden der Testsysteme im Hinblick auf Präzision, Genauigkeit und Proportionalität ist es zuzuschreiben, dass Unterschiede des Regulationsausmaßes beider Methoden auftreten. In der Literatur sind verschiedene *house keeping*-Gene für die Verwendung als Referenzgene in der qPCR und in Microarrays beschrieben. Hier wurden zwei oft genutzte Referenzgene, β -Aktin (Nielsen et al. 2009) und GAPDH (Mariani et al. 2009) ausgewählt und auf den Einfluss durch das Mykotoxin DON untersucht (siehe Abb. 54, Anhang). Vergleiche der qPCR-Expressionswerte für β -Aktin konnten keine Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen aufzeigen, da es unabhängig von der DON-Behandlung gleichmäßig exprimiert wird. Neben der hier gezeigten RNA-Ebene (siehe Abb. 54, Anhang), wurde die Expression auch auf Proteinebene untersucht (Immunfluoreszenzfärbung mit FITC-Phalloidin für β -Aktin, Daten nicht gezeigt). Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass β -Aktin auf mRNA- und Proteinebene nicht durch DON beeinflusst wird (Mariani et al. 2009; Nielsen et al. 2009; Van de Walle et al. 2010). Somit wurde bewiesen, dass β -Aktin als Referenzgen der qPCR-Analysen sehr gut geeignet ist.

Die Microarray-Analyse hat ein enormes Datenset der enterozytischen Reaktionen auf DON-Einwirkung hervorgebracht und die Auswertung der Ergebnisse als auch sich anschließende funktionale Tests werden noch eine geraume Zeit in Anspruch nehmen. Dank des Microarrays konnten bereits durchgeführte Versuche auf molekularer Ebene bestätigt und mit bekannten Daten aus der Literatur verbunden werden. Auch die molekulare Analyse der Zellreaktion *in vitro* unterstreicht die Vermutung, dass in den Blutstrom aufgenommenes DON von der basolateralen Seite *in vivo* auf die Enterozyten einwirkt und zu vielfältigen zellphysiologischen Reaktionen führt. Das Verständnis des DON-Wirkmechanismus bezüglich seiner molekularen Effekte und pathologischen Konsequenzen ist essentiell, um zukünftig angepasste Schutzmaßnahmen vor der Mykotoxin-Exposition entwickeln zu können.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) auf die Physiologie von porcinen intestinalen Epithelzellen (IPECs) untersucht. Die Versuche mit niedrigen und hohen DON-Konzentrationen wurden vergleichend auf konventionellen Zellkulturplatten (impermeabler Untergrund) und Membrankultureinsätzen (permeabler Untergrund) durchgeführt. Dabei wurde ein anderes Verhalten der Zellen nach DON-Applikation gefunden, denen es auf permeablem Untergrund ermöglicht wurde, wie unter physiologischen Bedingungen eine apikale und basolaterale Domäne auszubilden. Die apikale DON-Applikation zeigte deutlich geringere zellphysiologische Auswirkungen auf permeablem im Gegensatz zum impermeablen Untergrund. Allerdings sind die Darmzellen *in vivo* nicht permanent DON ausgesetzt, sondern es treten in Abhängigkeit der Futterkontamination und Absorption Schwankungen auf (Dänicke et al. 2004b). Daher wäre es sinnvoll, Versuche mit wechselnden niedrigen DON-Konzentrationen über eine längere Inkubationsdauer durchzuführen.

In weiteren Untersuchungen wäre es interessant, den DON-Wirkmechanismus von IPECs auf ALI-Kulturen (siehe 4.2.2) zu analysieren, da dieses System der Situation des Darmepithels *in vivo* noch näher kommt. Insbesondere die verbesserte Transporteraktivität in ALI-Kulturen könnte zur Aufklärung des Transportmechanismus von DON in die Zellen beitragen. Die Verfolgung des Mykotoxins ins Zellinnere wäre beispielsweise durch das radioaktiv markierte Isotop $^{13}\text{C}_{15}$ -DON möglich. Es ist auch ein an FITC gebundenes DON erhältlich, welches fluoreszenzmikroskopisch in der Zelle detektiert werden könnte. Zwar ist FITC gegenüber DON ein sehr großes Molekül, aber für erste Hinweise nutzbar.

Weiterhin besteht noch Aufklärungsbedarf in Bezug auf die molekularen Mechanismen der zyto- und ribotoxischen Wirkung von DON. Die Analyse des Microarrays eröffnete einen ersten Einblick in die komplexen Signaltransduktionskaskaden, die nach DON-Einwirkung in den Zellen ablaufen. Die auf molekularer Ebene nachgewiesene, differentielle Genregulation sollte in weiterführenden Studien in funktionellen Tests verifiziert werden. Vielversprechende Kandidaten wären dabei Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, des Zellzyklus und der Zellkommunikation, genauso wie ribosomale Proteine, die bei der Translation eine zentrale Rolle spielen. Neben dem ribotoxischen Effekt von DON sollte auch die zelluläre ER-Stress-Antwort auf das Mykotoxin in Epithelzellen eingehender betrachtet werden, da sie bislang nur für Immunzellen beschrieben wurde (Shi et al. 2009; Yang et al. 2000).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Modulation der physiologischen Zellfunktion in intestinalen porcinen Epithelzellen (IPEC) durch das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON)

von Anne-Kathrin Diesing

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion der porcinen intestinalen Barriere auf den Einfluss des Mykotoxins DON aus zellphysiologischer Sicht *in vitro* betrachtet. Als sensibelste Spezies gegenüber dem Getreide-kontaminierenden Mykotoxin gilt das Hausschwein, daher wurden die genetisch unveränderten, intestinalen porcinen Epithelzelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 als polarisiertes *in vitro*-Enterozytenkulturmodell verwendet. *In vivo* trifft das im Nahrungsbrei enthaltene Mykotoxin im Gastrointestinaltrakt zuerst von der apikalen Seite auf die Enterozyten. Weiterhin sind diese dem Toxin von der basolateralen Zellseite ausgesetzt, da DON nach der schnellen Aufnahme in den oberen Darmabschnitten mit dem Blutstrom transportiert wird.

Da die konventionelle Zellkultivierung der Modellierung der intestinalen Barriere nicht gerecht wurde, sind zur Annäherung an die Situation *in vivo* Membrankultureinsätze verwendet worden. Selbige gewährleisteten auf permeablem Untergrund eine physiologische Zellpolarisierung und gleichzeitig durch die Kompartimentierung eine Nährstoffversorgung von apikaler und basolateraler Zellseite. Damit wurde es möglich, das Toxin nicht nur von der apikalen, sondern auch von der basolateralen Zellseite zu applizieren.

In der landwirtschaftlichen Praxis kommt es entweder zu akuten, durch hohe Toxin-Dosen verursachten Reaktionen oder zu chronischen Krankheitserscheinungen, die meist durch geringe DON-Dosen verursacht werden. So wurden auch in dieser Arbeit die beiden Konzentrationsrahmen unterschieden. Dabei wurde festgestellt, dass hohe DON-Konzentrationen (2000 ng/ml) toxische Effekte induzieren, wohingegen niedrige Konzentrationen (200 ng/ml) modulatorische Effekte auf die zelluläre Regulation haben. Das heißt, dass hohe DON-Konzentrationen durch typische Toxizität (Apoptoseinduktion) charakterisiert sind und zur Zerstörung der Integrität der intestinalen Barriere führen, was durch die Auflösung der Tight Junction-Struktur deutlich wurde. Niedrige DON-Konzentrationen wiesen dagegen keine mit den verwendeten Methoden detektierbaren toxischen Eigenschaften auf, sondern es wurde ein unerwarteter, hier erstmalig beschriebener, proliferativer Effekt auf Enterozyten detektiert.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Reaktion der jejunalen Zelllinie IPEC-J2 auf permeablem Untergrund in Abhängigkeit von der Richtung der Toxin-Exposition dramatische Unterschiede aufweist. Bei gleicher DON-Konzentration war die basolaterale Seite der simulierten intestinalen Barriere signifikant empfindlicher als ihr apikales Gegenstück. Das zeigte sich nach basolateraler Applikation besonders im Hinblick auf die zerstörte Tight Junction-Integrität und die damit verbundene, erhöhte Apoptoserate.

Im Vergleich der beiden Kultivierungsbedingungen fiel auf, dass die apikale Applikation der hohen DON-Konzentration (2000 ng/ml) unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen hatte. Auf impermeablem Untergrund führte die hohe Toxinkonzentration zur Zerstörung des epithelialen Zellverbandes, wohingegen auf permeablem Untergrund kein sichtbarer zytotoxischer Effekt detektierbar war. Lediglich die basolaterale Gabe der gleichen DON-Konzentration führte zu der beschriebenen, gravierenden Zellschädigung.

Nach den beobachteten DON-induzierten zellphysiologischen Effekten sollte die Wirkung von gerichtet appliziertem DON auf molekularer Ebene in IPEC-J2-Zellen untersucht werden. Mittels Microarray und quantitativer Real-Time-PCR wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, welche die Stoffwechselwege aufzeigte, die von DON konzentrations- und richtungsabhängig reguliert werden (z.B. zellulärer Metabolismus, Informationsverarbeitung und Prozesse der Strukturproteine). Interessanterweise aktivierte die basolaterale Applikation der niedrigen DON-Konzentration (200 ng/ml) zehnmal mehr Transkripte als die apikale Gabe der gleichen Konzentration (2539 gegenüber 267), obwohl die Zellverbände beider Behandlungsgruppen optisch und analytisch intakt waren (TEER).

Im Gegensatz zu den Zellen, die die hohe DON-Konzentration von der basolateralen Seite erhielten, blieb die Tight Junction-Integrität auch bei der Gruppe mit hoher, apikaler DON-Behandlung intakt. Letztere zeigte aber fast sechsmal mehr veränderte Transkripte als die mit hoher Konzentration und von basolateral DON-behandelte Gruppe (3589 und 669). Die Ergebnisse verdeutlichten noch einmal, dass die gerichtete DON-Applikation von apikaler oder basolateraler Seite, signifikant verschiedene Genantworten nach sich zieht und damit die zelluläre Homöostase unterschiedlich stark beeinflusst.

6 SUMMARY

Modulation of the physiological cellular function in intestinal porcine epithelial cells (IPEC) by the mycotoxin deoxynivalenol (DON)

by Anne-Kathrin Diesing

The aim of the present work was to investigate the physiological cellular reaction of the porcine intestinal barrier on the effects of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) in vitro. Pigs appear to be the most sensitive species against the *Fusarium*-derived, cereal-contaminating mycotoxin. This was the reason for choosing the non-transformed intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2 as polarised enterocyte in vitro model system. In vivo, the mycotoxin containing feed enters the gastrointestinal system and faces the enterocytes from the mucus protected luminal site (apical exposure). Furthermore, the enterocytes are exposed to the mycotoxin from the basolateral site, as DON is absorbed in proximal intestinal sections and transported via the bloodstream to the enterocytes.

The conventional cell culture on impermeable supports was used to analyse first cellular reactions on DON application, but did not fit to the demands of the intestinal barrier model. Thus, membrane culture inserts were used for mimicking the situation in vivo. On permeable supports the cells were permitted to form the physiological polarisation accompanied by a nutritional supply from apical and basolateral site due to the compartmentalisation. That made it possible to apply the mycotoxin not only from apical but also from the basolateral cell site.

In agricultural practise, clinical symptoms in pigs occur either due to high, mostly acute, DON intoxication (vomiting) or, more frequently, due to low but chronic DON ingestion (depression of weight gain). In this work too, both DON concentration ranges were applied, resulting in the finding that high DON concentrations (2000 ng/ml) induce toxic effects, whereas low DON concentrations (200 ng/ml) modulate cellular regulation. High DON concentrations are characterised by typical cytotoxic features such as induction of apoptosis and impairment of the intestinal barrier integrity (disintegration of tight junction structure). Low DON concentrations did not lead to measurable cellular toxicity, but an unexpected, here firstly described proliferative effect on enterocytes was detected.

Moreover, this work elucidates that the reaction of the jejunal cell line IPEC-J2 on permeable supports show dramatic differences depending on the direction of toxin exposure. The basolateral site of the stimulated intestinal barrier was significantly more sensitive towards the application of the high DON concentration than their apical counterpart. This was especially apparent in the destroyed tight junction integrity and the linked increase of apoptosis upon basolateral DON application.

The comparison of both cell culture techniques gives evidence that the apical application of the high DON concentration leads to different cellular effects. On impermeable supports the high concentration damages the epithelial cell layer, whereas on permeable supports no cytotoxic effect was detectable. Only the basolateral challenge with the same DON concentration resulted in the described dramatic cellular damage.

After the observed DON-induced physiological effects on IPEC-J2 cells, the mechanism of site-directed DON application was to be examined on molecular level in this cell line. The gene expression analysis was carried out using microarrays and quantitative real time PCR to elucidate biological pathways, which are regulated by DON dependent on concentration and direction (e.g. cellular metabolism, information processing and cellular processes). Interestingly, the basolateral application of the low DON concentration (200 ng/ml) triggered ten times more genes, than the apical challenge of the same concentration (2539 versus 267), despite the visual and analytical intactness (TEER) of both cell layers.

In contrast to those cells exposed to the high DON concentration from basolateral site, the junctional integrity stayed intact in the group of high apical DON dosage. But the latter showed almost six times more changed transcripts as the high basolateral DON challenged group (3589 versus 669). These results underline the strikingly different cellular reactions on gene expression level and cellular homeostasis after site-directed DON application either from apical or basolateral site.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Accensi, F., Pinton, P., Callu, P., Abella-Bourges, N., Guelfi, J. F., Grosjean, F., and Oswald, I. P. (2006). "Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets." *J. Anim Sci.*, 84(7), 1935-1942.
- Al Moustafa, A. E., aoui-Jamali, M. A., Batist, G., Hernandez-Perez, M., Serruya, C., Alpert, L., Black, M. J., Sladek, R., and Foulkes, W. D. (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(17), 2634-2640.
- An, J., Chen, Y., and Huang, Z. (2004). "Critical upstream signals of cytochrome C release induced by a novel Bcl-2 inhibitor." *J. Biol. Chem.*, 279(18), 19133-19140.
- Arrieta, M. C., Bistriz, L., and Meddings, J. B. (2006). "Alterations in intestinal permeability." *Gut*, 55(10), 1512-1520.
- Awad, W. A., Aschenbach, J. R., Setyabudi, F. M. C. S., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J., and Zentek, J. (2007). "In Vitro Effects of Deoxynivalenol on Small Intestinal D-Glucose Uptake and Absorption of Deoxynivalenol Across the Isolated Jejunal Epithelium of Laying Hens." *Poult Sci*, 86(1), 15-20.
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Bohm, J., and Zentek, J. (2010). "Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation." *Food Addit. Contam Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 27(4), 510-520.
- Bae, H., Gray, J. S., Li, M., Vines, L., Kim, J., and Pestka, J. J. (2010). "Hematopoietic cell kinase associates with the 40S ribosomal subunit and mediates the ribotoxic stress response to deoxynivalenol in mononuclear phagocytes." *Toxicol. Sci.*, 115(2), 444-452.
- Bae, H. K., and Pestka, J. J. (2008). "Deoxynivalenol Induces p38 Interaction with the Ribosome in Monocytes and Macrophages." *Toxicol. Sci.*, 105(1), 59-66.
- Baltriukiene, D., Kalvelyte, A., and Bukelskiene, V. (2007). "Induction of apoptosis and activation of JNK and p38 MAPK pathways in deoxynivalenol-treated cell lines." *Altern. Lab Anim*, 35(1), 53-59.
- Barrett, K. E., Huott, P. A., Shah, S. S., Dharmasathaphorn, K., and Wasserman, S. I. (1989). "Differing effects of apical and basolateral adenosine on colonic epithelial cell line T84." *Am J Physiol*, 256(1 Pt 1), C197-C203.
- Bensassi, F., Golli-Bennour, E., Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., Hajlaoui, M. R., and Bacha, H. (2009). "Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells." *Toxicology*, 264(1-2), 104-109.
- 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*.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (1994). "Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine." *Exp. Cell Res.*, 211(2), 314-321.
- Beyer, M., Dänicke, S., Rohweder, D., and Humpf, H. U. (2010). "Determination of deoxynivalenol-sulfonate (DONS) in cereals by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry." *Mycotoxin research*, 26(2), 109-117.

- Beyer, M., Klix, M. B., Klink, H., and Verreet, J.-A. (2006). "Quantifying the effects of previous crop, tillage, cultivar and triazole fungicides on the deoxynivalenol content of wheat grain - a review." *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(6), 241-246.
- Bony, S., Carcelen, M., Olivier, L., and Devaux, A. (2006). "Genotoxicity assessment of deoxynivalenol in the Caco-2 cell line model using the Comet assay." *Toxicol. Lett.*, 166(1), 67-76.
- Brosnahan, A. J., and Brown, D. R. (2012). "Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations." *Vet. Microbiol.*, 156(3-4), 229-237.
- Bryden, W. L. (2007). "Mycotoxins in the food chain: human health implications." *Asia Pac. J Clin. Nutr.*, 16 Suppl 1, 95-101.
- Cetin, Y., and Bullerman, L. B. (2005). "Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay." *Food Chem. Toxicol.*, 43(5), 755-764.
- Chen, A. C., and Donovan, S. M. (2004). "Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits Caco-2BBE cell proliferation by causing G2/M cell cycle arrest." *J. Nutr.*, 134(6), 1303-1308.
- Coe, H., and Michalak, M. (2009). "Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." *Gen. Physiol. Biophys.*, 28 Spec No Focus, F96-F103.
- Dänicke, S., Goyarts, T., Döll, S., Grove, N., Spolders, M., and Flachowsky, G. (2006). "Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs." *Toxicology Letters*, 165(3), 297-311.
- Dänicke, S., Hegewald, A. K., Kahlert, S., Kluess, J., Rothkötter, H. J., Breves, G., and Doll, S. (2010). "Studies on the toxicity of deoxynivalenol (DON), sodium metabisulfite, DON-sulfonate (DONS) and de-epoxy-DON for porcine peripheral blood mononuclear cells and the Intestinal Porcine Epithelial Cell lines IPEC-1 and IPEC-J2, and on effects of DON and DONS on piglets." *Food Chem. Toxicol.*, 48(8-9), 2154-2162.
- Dänicke, S., Valenta, H., and Doll, S. (2004a). "On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig." *Arch. Anim Nutr.*, 58(2), 169-180.
- Dänicke, S., Valenta, H., Klobasa, F., Doll, S., Ganter, M., and Flachowsky, G. (2004b). "Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics." *Arch. Anim Nutr.*, 58(1), 1-17.
- Daniel, H. (2004). "Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport." *Annu. Rev. Physiol.*, 66, 361-384.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry*, 13(8), 795-808.
- Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., and Lempicki, R. A. (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." *Genome Biol.*, 4(5), 3.
- Diesing, A. K., Nossol, C., Danicke, S., Walk, N., Post, A., Kahlert, S., Rothkotter, H. J., and Kluess, J. (2011a). "Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application." *PLoS. One.*, 6(2), e17472.
- Diesing, A. K., Nossol, C., Panther, P., Walk, N., Post, A., Kluess, J., Kreutzmann, P., Danicke, S., Rothkotter, H. J., and Kahlert, S. (2011b). "Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2." *Toxicol. Lett.*, 200(1-2), 8-18.

- Diesing, A. K., Nossol, C., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Kluess, J., Walk, N., Post, A., Rothkotter, H. J., and Kahlert, S. (2012). "Gene Regulation of Intestinal Porcine Epithelial Cells IPEC-J2 Is Dependent on the Site of Deoxynivalenol Toxicological Action." *PLoS. One.*, 7(4), e34136.
- Döll, S., Schrickx, J. A., Valenta, H., Dänicke, S., and Fink-Gremmels, J. (2009). "Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures." *Toxicol. Lett.*, 189(2), 121-129.
- Douma, S., Van, L. T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van, G. E., and Peeper, D. S. (2004). "Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB." *Nature*, 430(7003), 1034-1039.
- Egan, L. J., de, L. A., Lehrman, E. D., Myhre, G. M., Eckmann, L., and Kagnoff, M. F. (2003). "Nuclear factor-kappa B activation promotes restitution of wounded intestinal epithelial monolayers." *Am. J. Physiol Cell Physiol*, 285(5), C1028-C1035.
- Ehrlich, K. C., and Daigle, K. W. (1987). "Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes." *Biochim. Biophys. Acta*, 923(2), 206-213.
- Eriksen, G. S., Pettersson, H., and Lindberg, J. E. (2003). "Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs." *Arch. Tierernahr.*, 57(5), 335-345.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." *Trends Cell Biol.*, 13(3), 137-145.
- EU-Kommission (2006). "Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln." *Amtsblatt der Europäischen Union*, 364, 5-24.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001). "Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives." *WHO Technical Report Series*, (906), 35-42.
- Feinberg, B., and McLaughlin, C. S. (1989). "Biochemical mechanism of Action of trichothecene mycotoxins." *Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiological effects*, I(Ed.V.R. Beasley, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida), 27-35.
- Fey-Lamprecht, F., Groth, T., Albrecht, W., Paul, D., and Gross, U. (2000). "Development of membranes for the cultivation of kidney epithelial cells." *Biomaterials*, 21(2), 183-192.
- Frisch, S. M., and Ruoslahti, E. (1997). "Integrins and anoikis." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9(5), 701-706.
- Gartel, A. L., and Radhakrishnan, S. K. (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." *Cancer Res.*, 65(10), 3980-3985.
- Geiger, B., Volk, T., and Volberg, T. (1985). "Molecular heterogeneity of adherens junctions." *J. Cell Biol.*, 101(4), 1523-1531.
- Gonzalez-Vallina, R., Wang, H., Zhan, R., Berschneider, H. M., Lee, R. M., Davidson, N. O., and Black, D. D. (1996). "Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1)." *Am. J. Physiol.*, 271(2 Pt 1), G249-G259.
- Goyarts, T., and Dänicke, S. (2006). "Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig." *Toxicol. Lett.*, 163(3), 171-182.

- Goyarts, T., Dänicke, S., Rothkotter, H. J., Spilke, J., Tiemann, U., and Schollenberger, M. (2005). "On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively." *J. Vet. Med. A Physiol Pathol. Clin. Med.*, 52(6), 305-314.
- Goyarts, T., Grove, N., and Dänicke, S. (2006). "Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol from naturally contaminated wheat given subchronically or as one single dose on the in vivo protein synthesis of peripheral blood lymphocytes and plasma proteins in the pig." *Food and Chemical Toxicology*, 44(12), 1953-1965.
- Halestrap, A. P. (1982). "The pathway of electron flow through ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase in the respiratory chain. Evidence from inhibition studies for a modified 'Q cycle'." *Biochem. J.*, 204(1), 49-59.
- Harhaj, N. S., and Antonetti, D. A. (2004). "Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology." *Int. J Biochem Cell Biol*, 36(7), 1206-1237.
- Hodin, R. A., Shei, A., and Meng, S. (1997). "Transcriptional activation of the human villin gene during enterocyte differentiation." *J. Gastrointest. Surg.*, 1(5), 433-438.
- Huang, d. W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nat. Protoc.*, 4(1), 44-57.
- Hussein, H. S., and Brasel, J. M. (2001). "Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals." *Toxicology*, 167(2), 101-134.
- Ivanova, L., Skjerve, E., Eriksen, G. S., and Uhlig, S. (2006). "Cytotoxicity of enniatins A, A1, B, B1, B2 and B3 from *Fusarium avenaceum*." *Toxicon*, 47(8), 868-876.
- Kaeffer, B., Bottreau, E., Velge, P., and Pardon, P. (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.
- Karam, S. M. (1999). "Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut." *Front Biosci.*, 4, D286-D298.
- Kinser, S., Jia, Q., Li, M., Laughter, A., Cornwell, P., Corton, J. C., and Pestka, J. (2004). "Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets." *J. Toxicol. Environ. Health A*, 67(18), 1423-1441.
- Kinser, S., Li, M., Jia, Q., and Pestka, J. J. (2005). "Truncated deoxynivalenol-induced splenic immediate early gene response in mice consuming (n-3) polyunsaturated fatty acids." *J. Nutr. Biochem.*, 16(2), 88-95.
- Klinglmayr, C., Nobauer, K., Razzazi-Fazeli, E., and Cichna-Markl, M. (2010). "Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection." *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 878(2), 187-193.
- Koch, G., Smith, M., Macer, D., Webster, P., and Mortara, R. (1986). "Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin." *J. Cell Sci.*, 86, 217-232.
- Koga, M., Shichijo, S., Yamada, A., Ashihara, J., Sawamizu, H., Kusukawa, J., and Itoh, K. (2003). "Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL." *Tissue Antigens*, 61(2), 136-145.

- Kolf-Clauw, M., Castellote, J., Joly, B., Bourges-Abella, N., Raymond-Letron, I., Pinton, P., and Oswald, I. P. (2009). "Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis." *Toxicol. In Vitro*, 23(8), 1580-1584.
- Königs, M., Lenczyk, M., Schwerdt, G., Holzinger, H., Gekle, M., and Humpf, H. U. (2007). "Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture." *Toxicology*, 240(1-2), 48-59.
- Königs, M., Schwerdt, G., Gekle, M., and Humpf, H. U. (2008). "Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes." *Mol. Nutr. Food Res.*, 52(7), 830-839.
- Kouadio, J. H., Mobio, T. A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S. D., and Creppy, E. E. (2005). "Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2." *Toxicology*, 213(1-2), 56-65.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J. r., and Blasig, I. E. (2008). "Structure and function of claudins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 631-645.
- Krishnaswamy, R., Devaraj, S. N., and Padma, V. V. (2010). "Lutein protects HT-29 cells against Deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: Prevention of NF-[kappa]B nuclear localization and down regulation of NF-[kappa]B and Cyclo-Oxygenase - 2 expression." *Free Radical Biology and Medicine*, 49(1), 50-60.
- Krska, R., Baumgartner, S., and Josephs, R. (2001). "The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals." *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 371(3), 285-299.
- Kwak, Y. K., Vikstrom, E., Magnusson, K. E., Vecsey-Semjen, B., Colque-Navarro, P., and Mollby, R. (2012). "The Staphylococcus aureus alpha-toxin perturbs the barrier function in Caco-2 epithelial cell monolayers by altering junctional integrity." *Infect. Immun.*
- Larsen, J. C., Hunt, J., Perrin, I., and Ruckenbauer, P. (2004). "Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report." *Toxicol. Lett.*, 153(1), 1-22.
- Laskin, J. D., Heck, D. E., and Laskin, D. L. (2002). "The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAP kinase activation in xenobiotic toxicity." *Toxicol. Sci.*, 69(2), 289-291.
- Lewis, K., and McKay, D. M. (2009). "Metabolic stress evokes decreases in epithelial barrier function." *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1165, 327-337.
- Li, M., and Pestka, J. J. (2008). "Comparative induction of 28S ribosomal RNA cleavage by ricin and the trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin in the macrophage." *Toxicol. Sci.*, 105(1), 67-78.
- Liao, L. L., Grollman, A. P., and Horwitz, S. B. (1976). "Mechanism of action of the 12,13-epoxytrichothecene, anguidine, an inhibitor of protein synthesis." *Biochim. Biophys. Acta*, 454(2), 273-284.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., and Schubert, D. (1997). "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction." *J. Neurochem.*, 69(2), 581-593.
- Maresca, M., Yahi, N., Younes-Sakr, L., Boyron, M., Caporiccio, B., and Fantini, J. (2008). "Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: Stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1 beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228(1), 84-92.

- Maresca, M., Mahfoud, R., Garmy, N., and Fantini, J. (2002). "The Mycotoxin Deoxynivalenol Affects Nutrient Absorption in Human Intestinal Epithelial Cells." *J. Nutr.*, 132(9), 2723-2731.
- Mariani, V., Palermo, S., Fiorentini, S., Lanubile, A., and Giuffra, E. (2009). "Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I." *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 131(3-4), 278-284.
- Mikami, O., Yamamoto, S., Yamanaka, N., and Nakajima, Y. (2004). "Porcine hepatocyte apoptosis and reduction of albumin secretion induced by deoxynivalenol." *Toxicology*, 204(2-3), 241-249.
- Miller, K., and Atkinson, H. A. (1986). "The in vitro effects of trichothecenes on the immune system." *Food Chem. Toxicol.*, 24(6-7), 545-549.
- Mirocha, C. J., and Pathre, S. (1973). "Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarin." *Appl. Microbiol.*, 26(5), 719-724.
- Moon, Y., and Pestka, J. J. (2003). "Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 187(2), 80-88.
- Moon, Y., Yang, H., and Lee, S. H. (2007). "Modulation of early growth response gene 1 and interleukin-8 expression by ribotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) via ERK1/2 in human epithelial intestine 407 cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362(2), 256-262.
- Moreau, M., Lescure, G., Agoulon, A., Svinareff, P., Orange, N., and Feuilleley, M. (2011). "Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation." *J. Appl. Toxicol.*
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J. Immunol. Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Moss, M. O. (2003). "Fusarial toxins: are they a cause for concern?" *Vet. J.*, 165(3), 184-185.
- Moyer, M. P., Manzano, L. A., Merriman, R. L., Stauffer, J. S., and Tanzer, L. R. (1996). "NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line." *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 32(6), 315-317.
- Mukherjee, T. M., and Williams, A. W. (1967). "A comparative study of the ultrastructure of microvilli in the epithelium of small and large intestine of mice." *J. Cell Biol.*, 34(2), 447-461.
- Nielsen, C., Lippke, H., Didier, A., Dietrich, R., and Martlbauer, E. (2009). "Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells." *Mol. Nutr. Food Res.*, 53(4), 479-491.
- Niessen, C. M. (2007). "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." *J. Invest Dermatol.*, 127(11), 2525-2532.
- Nossol, C., Diesing, A. K., Walk, N., Faber-Zuschratter, H., Hartig, R., Post, A., Kluess, J., Rothkotter, H. J., and Kahlert, S. (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.
- Ohguchi, M., Ishisaki, A., Okahashi, N., Koide, M., Koseki, T., Yamato, K., Noguchi, T., and Nishihara, T. (1998). "Actinobacillus actinomycetemcomitans toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis." *Infect. Immun.*, 66(12), 5980-5987.

- Ohtsubo, K., Yamada, M., and Saito, M. (1968). "Inhibitory effect of nivalenol, a toxic metabolite of *Fusarium nivale*, on the growth cycle and biopolymer synthesis of HeLa cells." *Jpn. J. Med. Sci Biol*, 21(3), 185-194.
- Ootani, A., Toda, S., Fujimoto, K., and Sugihara, H. (2000). "An air-liquid interface promotes the differentiation of gastric surface mucous cells (GSM06) in culture." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271(3), 741-746.
- Oswald, I. P. (2006). "Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine." *Vet. Res.*, 37(3), 359-368.
- Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C., and Bazzoni, G. (2008). "Structural organization of the tight junctions." *Biochim. Biophys. Acta*, 1778(3), 646-659.
- Pestka, J. J. (2008). "Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis." *Food Addit. Contam.*, 1-13.
- Pestka, J. J. (2007). "Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks." *Animal Feed Science and Technology*, 137, 283-298.
- Pestka, J. J., and Smolinski, A. T. (2005). "Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans." *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev.*, 8(1), 39-69.
- Pestka, J. (2010). "Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance." *Archives of Toxicology*, 84(9), 663-679.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res.*, 29(9), e45.
- Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J. P., Laffitte, J., Taranu, I., and Oswald, I. P. (2010). "Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism." *J. Nutr.*, 140(11), 1956-1962.
- Pinton, P., Nougayrede, J. P., Del Rio, J. C., Moreno, C., Marin, D. E., Ferrier, L., Bracarense, A. P., Kolf-Clauw, M., and Oswald, I. P. (2009). "The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 237(1), 41-48.
- Pitman, R. S., and Blumberg, R. S. (2000). "First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system." *J. Gastroenterol.*, 35(11), 805-814.
- Prelusky, D. B. (1996). "A study on the effect of deoxynivalenol on serotonin receptor binding in pig brain membranes." *J. Environ. Sci Health B*, 31(5), 1103-1117.
- Prelusky, D. B., Hartin, K. E., Trenholm, H. L., and Miller, J. D. (1988). "Pharmacokinetic fate of 14C-labeled deoxynivalenol in swine." *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10(2), 276-286.
- Pussemier, L., Pierard, J. Y., Anselme, M., Tangni, E. K., Motte, J. C., and Larondelle, Y. (2006). "Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat." *Food Addit. Contam.*, 23(11), 1208-1218.
- Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R. L., and Isselbacher, K. J. (1979). "Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria." *J. Cell Biol.*, 80(2), 248-265.

- Ragab, W. S. M., Drusch, S., Kuhlmann, A., and Beyer, M. (2005). "Characterizing effects of fermentation and baking on the deoxynivalenol content of rolls." *Journal of applied botany and food quality*, 79(3), 197-201.
- Rhoads, J. M., Chen, W., Chu, P., Berschneider, H. M., Argenzio, R. A., and Paradiso, A. M. (1994). "L-glutamine and L-asparagine stimulate Na⁺ -H⁺ exchange in porcine jejunal enterocytes." *Am. J. Physiol*, 266(5 Pt 1), G828-G838.
- Richard, J. (2007). "Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview." *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 3-10.
- Rocha, O., Ansari, K., and Doohan, F. M. (2005). "Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review." *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 369-378.
- Rodriguez-Boulan, E., and Powell, S. K. (1992). "Polarity of epithelial and neuronal cells." *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8, 395-427.
- Rodriguez-Boulan, E., and Salas, P. J. I. (1989). "External and internal signals for epithelial cell surface polarization." *Annual Review of Physiology*, 51, 741-754.
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B., and Pestka, J. J. (1996). "Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)." *J Toxicol. Environ. Health*, 48(1), 1-34.
- Rotter, B. A., Thompson, B. K., Lessard, M., Trenholm, H. L., and Tryphonas, H. (1994). "Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine." *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23(1), 117-124.
- Sambuy, Y., de, A., I, Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., and Zucco, F. (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 Biol. Toxicol.*, 21(1), 1-26.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., and Wieler, L. H. (2006). "Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine." *Histochem. Cell Biol.*, 125(3), 293-305.
- Schneweis, I., Meyer, K., Ritzmann, M., Hoffmann, P., Dempfle, L., and Bauer, J. (2005). "Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs." *Arch. Anim Nutr.*, 59(3), 155-163.
- Schoental, R. (1985). "Trichothecenes, zearalenone, and other carcinogenic metabolites of Fusarium and related microfungi." *Adv. Cancer Res*, 45, 217-290.
- Sergent, T., Parys, M., Garsou, S., Pussemier, L., Schneider, Y. J., and Larondelle, Y. (2006). "Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations." *Toxicol. Lett.*, 164(2), 167-176.
- Shen, L. (2009). "Functional morphology of the gastrointestinal tract." *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 337, 1-35.
- Shi, Y., and Gaestel, M. (2002). "In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance." *Biol. Chem.*, 383(10), 1519-1536.
- Shi, Y., Porter, K., Parameswaran, N., Bae, H. K., and Pestka, J. J. (2009). "Role of GRP78/BiP degradation and ER stress in deoxynivalenol-induced interleukin-6 upregulation in the macrophage." *Toxicol. Sci.*, 109(2), 247-255.

- Shifrin, V. I., and Anderson, P. (1999). "Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis." *J. Biol. Chem.*, 274(20), 13985-13992.
- Shvartsman, S. Y., Coppey, M., and Berezhkovskii, A. M. (2009). "MAPK signaling in neurons and embryos." *Fly. (Austin.)*, 3(1), 62-67.
- Simons, K., and Fuller, S. D. (1985). "Cell surface polarity in epithelia." *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1, 243-288.
- Steube, K. G., Koelz, A. L., Uphoff, C. C., Drexler, H. G., Kluess, J., and Steinberg, P. (2011). "The necessity of identity assessment of animal intestinal cell lines: A case report." *Cytotechnology*.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., and Goodenough, D. A. (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(3), 755-766.
- Sudakin, D. L. (2003). "Trichothecenes in the environment: relevance to human health." *Toxicol. Lett.*, 143(2), 97-107.
- Swindle, M., and Smith, A. (1998). "Comparative anatomy and physiology of the pig." *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 25.
- Tep, J., Videmann, B., Mazallon, M., Balleydier, S., Cavret, S., and Lecoeur, S. (2007). "Transepithelial transport of fusariotoxin nivalenol: mediation of secretion by ABC transporters." *Toxicol. Lett.*, 170(3), 248-258.
- Terano, A., Sakata-Horie, K., Shimada, T., Hiraishi, H., Yoshiura, K., Yoneda, M., Takahashi, M., and Fujimori, T. (2001). "The role of cellular migration in the repair process of gastric epithelial cells." *Life Sci.*, 69(25-26), 3083-3089.
- Tiemann, U., Viergutz, T., Jonas, L., and Schneider, F. (2003). "Influence of the mycotoxins alpha- and beta-zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells." *Reprod. Toxicol.*, 17(2), 209-218.
- Turner, J. R. (2006). "Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application." *Am. J. Pathol.*, 169(6), 1901-1909.
- Turner, P. C., Rothwell, J. A., White, K. L., Gong, Y., Cade, J. E., and Wild, C. P. (2008). "Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom." *Environ. Health Perspect.*, 116(1), 21-25.
- Ueno, Y. (1985). "The toxicology of mycotoxins." *Crit Rev. Toxicol.*, 14(2), 99-132.
- Van de Walle, J., Sergent, T., Piront, N., Toussaint, O., Schneider, Y. J., and Larondelle, Y. (2010). "Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(3), 291-298.
- van der Flier, L. G., and Clevers, H. (2009). "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium." *Annu. Rev. Physiol.*, 71, 241-260.
- Vandenbroucke, V., Croubels, S., Martel, A., Verbrugghe, E., Goossens, J., Van, D. K., Boyen, F., Thompson, A., Shearer, N., De, B. P., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2011). "The mycotoxin deoxynivalenol potentiates intestinal inflammation by *Salmonella typhimurium* in porcine ileal loops." *PLoS. One.*, 6(8), e23871.

- Vesonder, R. F., Ciegler, A., and Jensen, A. H. (1973). "Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn." *Appl. Microbiol.*, 26(6), 1008-1010.
- Videmann, B., Tep, J., Cavret, S., and Lecoeur, S. (2007). "Epithelial transport of deoxynivalenol: involvement of human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2)." *Food Chem. Toxicol.*, 45(10), 1938-1947.
- Walters, E. M., Agca, Y., Ganjam, V., and Evans, T. (2011). "Animal models got you puzzled?: think pig." *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1245(1), 63-64.
- Widestrand, J., Lundh, T., Pettersson, H., and Lindberg, J. E. (1999). "Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays." *Mycopathologia*, 147(3), 149-155.
- Wolf, C. E., and Bullerman, L. B. (1998). "Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment." *Journal of Food Protection*, 61(3), 365-367.
- Wolff, J. (2005). "Effekte von Be- und Verarbeitung auf die Deoxynivalenol- und Zearalenongehalte in Getreide und Getreideprodukten." *Mycotoxin research*, 21(4), 246-250.
- Wu, X., Murphy, P., Cunnick, J., and Hendrich, S. (2007). "Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol." *Food Chem. Toxicol.*, 45(10), 1846-1855.
- Yang, G. H., Li, S., and Pestka, J. J. (2000). "Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP by vomitoxin (Deoxynivalenol)." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 162(3), 207-217.
- Yang, H., Chung, D. H., Kim, Y. B., Choi, Y. H., and Moon, Y. (2008). "Ribotoxic mycotoxin deoxynivalenol induces G2/M cell cycle arrest via p21Cip/WAF1 mRNA stabilization in human epithelial cells." *Toxicology*, 243(1-2), 145-154.
- Yoshizawa, T., and Morooka, N. (1975). "Biological modification of trichothecene mycotoxins: acetylation and deacetylation of deoxynivalenols by Fusarium spp." *Appl. Microbiol.*, 29(1), 54-58.
- Young, J. C., Trenholm, H. L., Friend, D. W., and Prelusky, D. B. (1987). "Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs." *J. Agric. Food Chem.*, 35(2), 259-261.
- Young, L. G., McGirr, L., Valli, V. E., Lumsden, J. H., and Lun, A. (1983). "Vomitoxin in corn fed to young pigs." *J. Anim. Sci.*, 57(3), 655-664.
- Yu, Q. H., and Yang, Q. (2009). "Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier." *Cell Biol. Int.*, 33(1), 78-82.
- Zhou, H. R., Islam, Z., and Pestka, J. J. (2005). "Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol." *Toxicol. Sci.*, 87(1), 113-122.

8 ANHANG

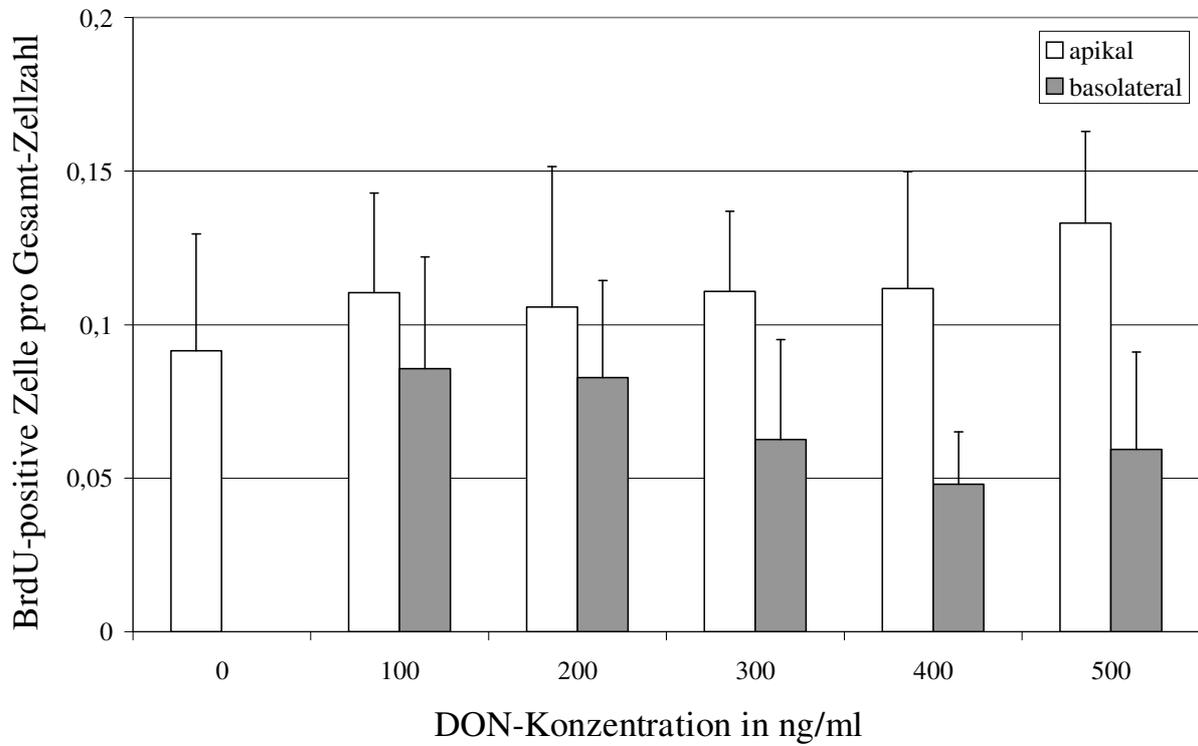
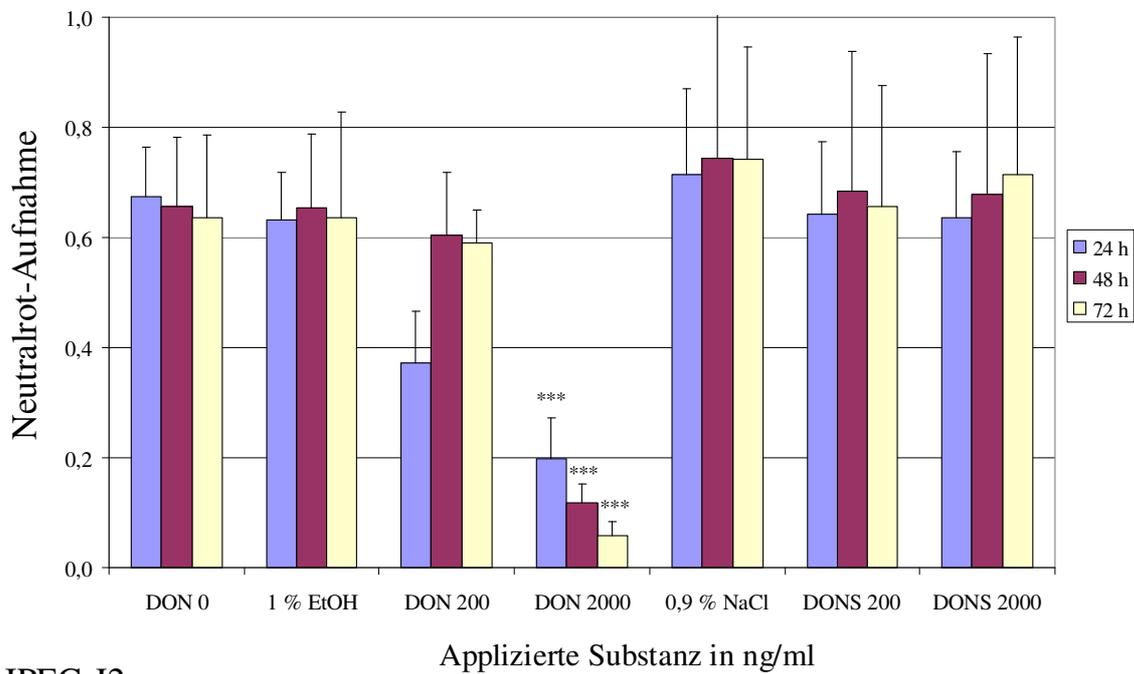


Abbildung 43: Proliferation von IPEC-J2-Zellen nach 14-tägiger gerichteter Applikation geringer DON-Konzentrationen auf permeablem Untergrund

Die auf 24-Well-Membrankultureinsätzen 4 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 14 d mit DON (0 bis 500 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal oder basolateral appliziert wurde, inkubiert. Die DON-Verdünnungen wurden alle 3 d erneuert. Während der letzten 6 h wurde BrdU appliziert. Mittels HCl-Borat-Behandlung und anschließender DAB-Färbung wurden BrdU-positive Zellkerne (braun) sichtbar gemacht, BrdU-negative Zellkerne erscheinen durch Hämatoxylin-Gegenfärbung blau (siehe 2.6.3). Es erfolgte eine mikroskopische Auswertung mit Zellzählung. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von mindestens vier unabhängigen Experimenten (+ SEM).

IPEC-1



IPEC-J2

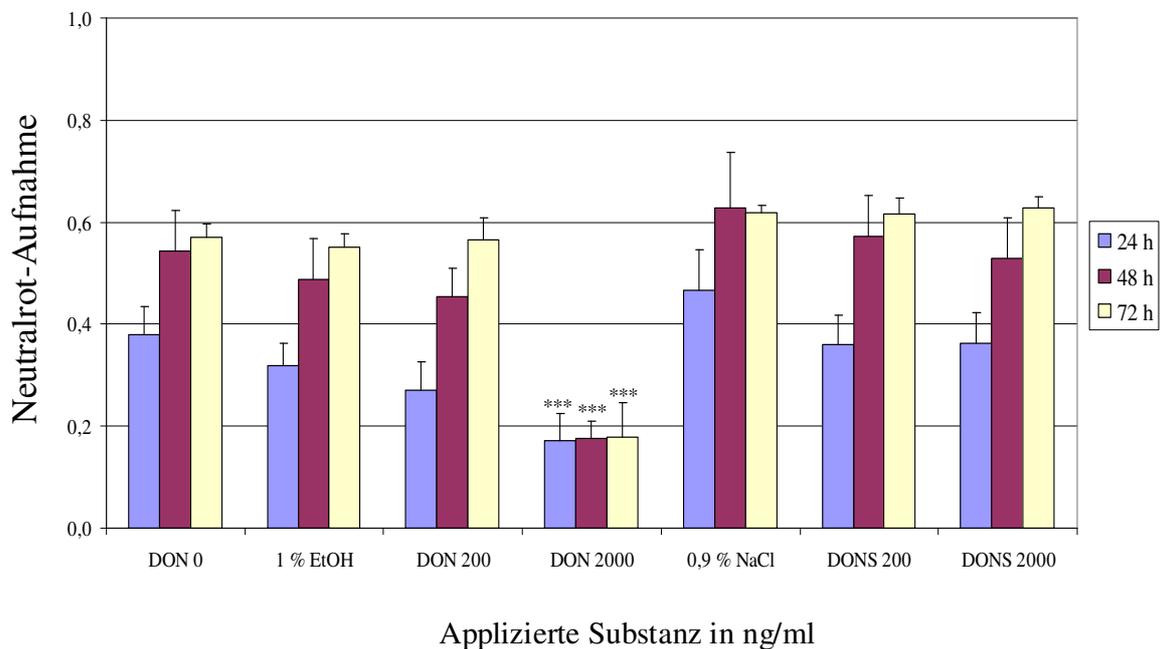
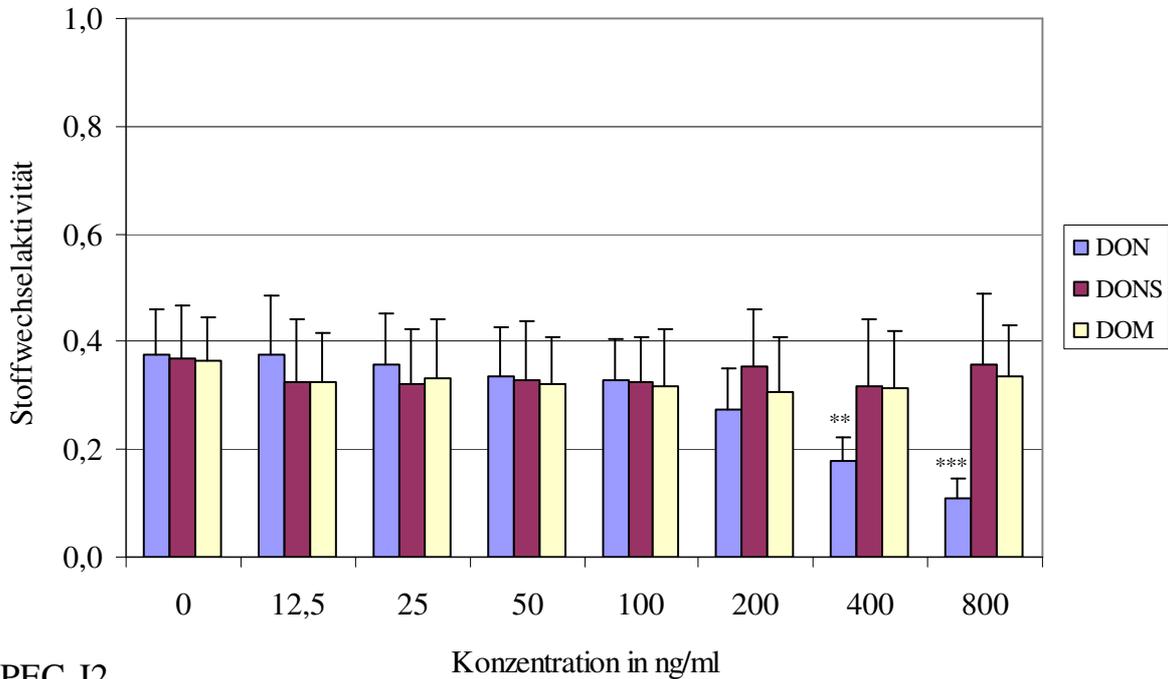


Abbildung 44: Vergleich der Neutralrot-Aufnahme nach DON- und DONS-Behandlung in IPECs

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON-Konzentrationen (0, 200, 2000 ng/ml) und DONS (0, 200, 2000 ng/ml) in serumfreiem Medium inkubiert. Am Ende des Experiments wurde Neutralrot zu den Zellen gegeben und nach einem Waschschritt der in den Zellen verbliebene Farbstoff bei einer Absorption von 546 nm gemessen. Jede Säule repräsentiert drei unabhängige, in Triplikaten durchgeführte Experimente (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

IPEC-1



IPEC-J2

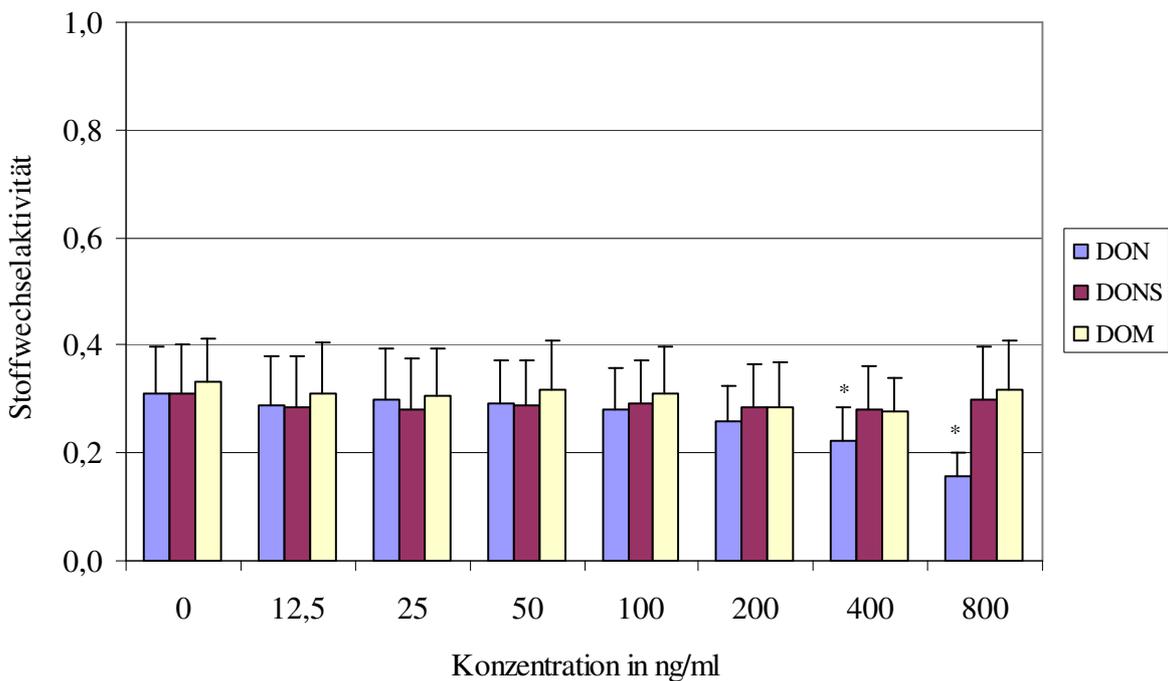
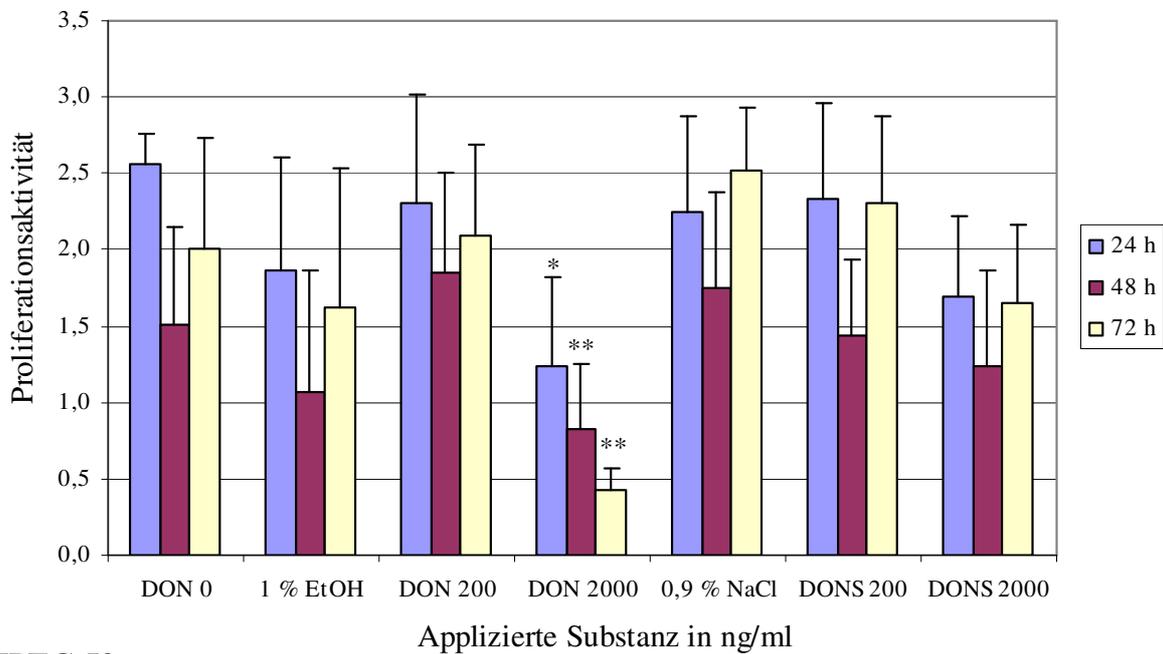


Abbildung 45: Vergleich der Wirkung von DON, DONS und DOM auf die Stoffwechselaktivität von IPECs

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden in diesem Fall nur für 48 h mit steigenden DON-, DONS- oder DOM-Konzentrationen (0 bis 800 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Die Reduktion von MTT wurde nach Lyse des Formazan-Farbstoffs bei einer Absorption von 450 nm gemessen. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von drei unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimente (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

IPEC-1



IPEC-J2

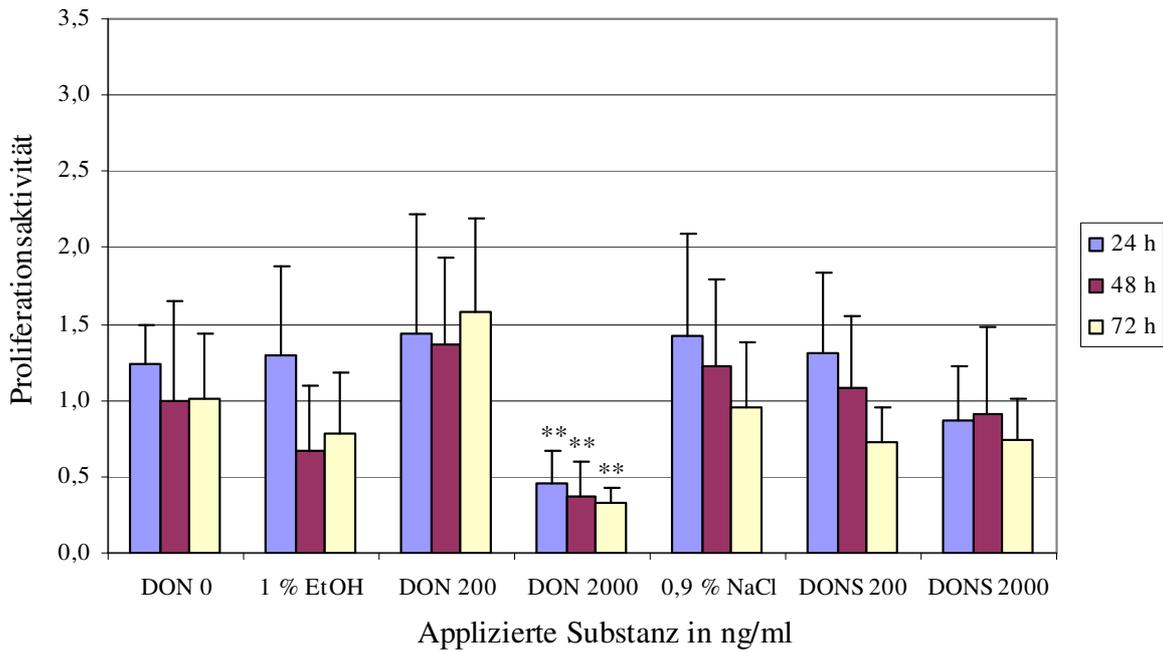


Abbildung 46: Proliferation von IPECs nach DON- und DONS-Behandlung (BrdU-ELISA)

Die auf 96-Well-Mikrotiterplatten 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit steigenden DON- oder DONS-Konzentrationen (0 bis 2000 ng/ml) in Vollmedium inkubiert. Der Einbau von BrdU (6 h gegeben) wurde mittels kommerziellem BrdU-ELISA bei einer Absorption von 570 nm gemessen. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von mindestens vier unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (+ SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

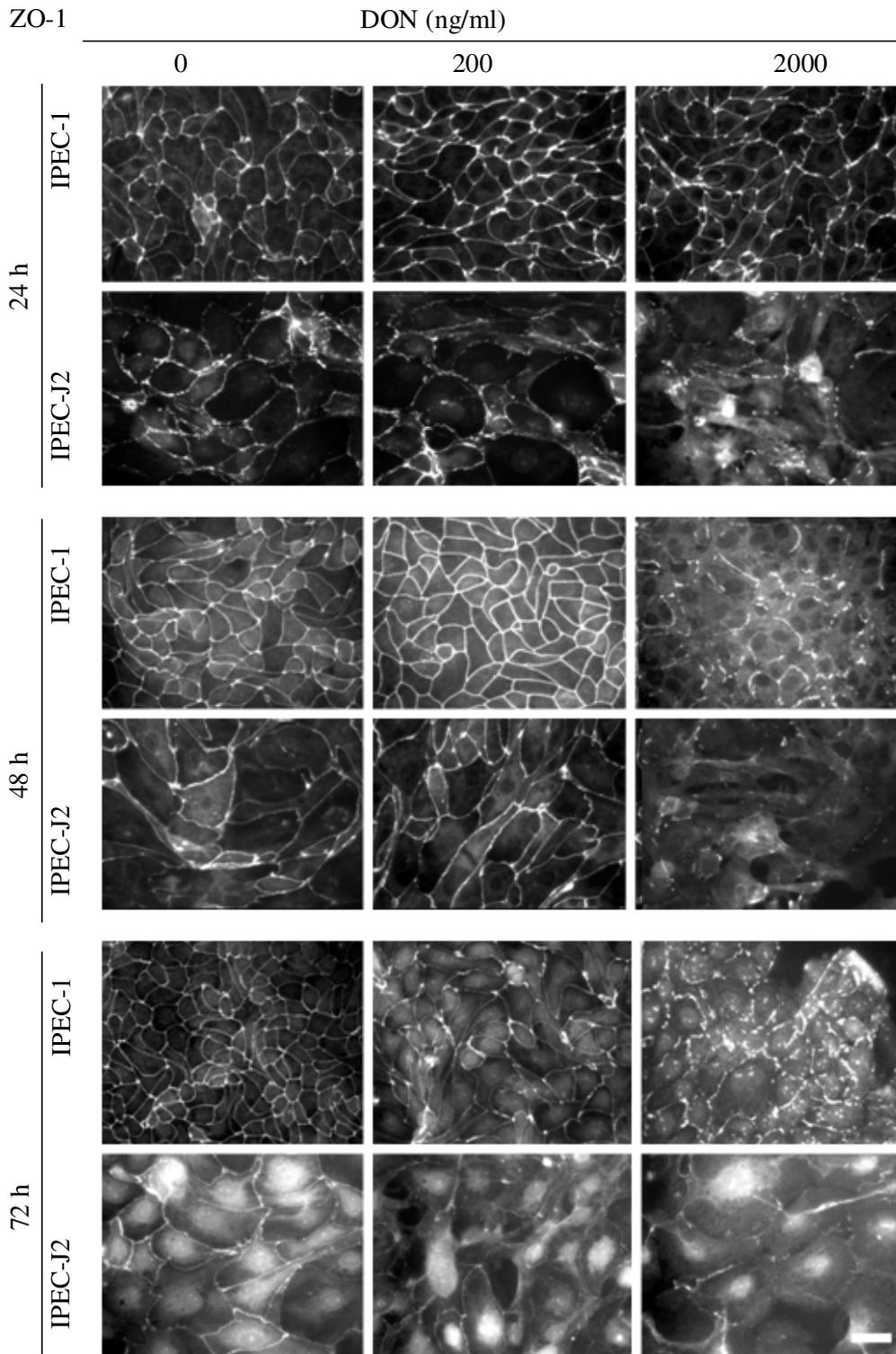


Abbildung 47: Expression des Tight Junction-Proteins ZO-1 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON 0, 200 oder 2000 ng/ml in Vollmedium inkubiert. Die Verteilung des Tight Junction-Proteins ZO-1 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 20-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert. Es handelt sich um repräsentative Aufnahmen von drei unabhängigen Wiederholungen, die unter gleicher Belichtungszeit aufgenommen wurden. Maßstabsbalken: 10 μ m

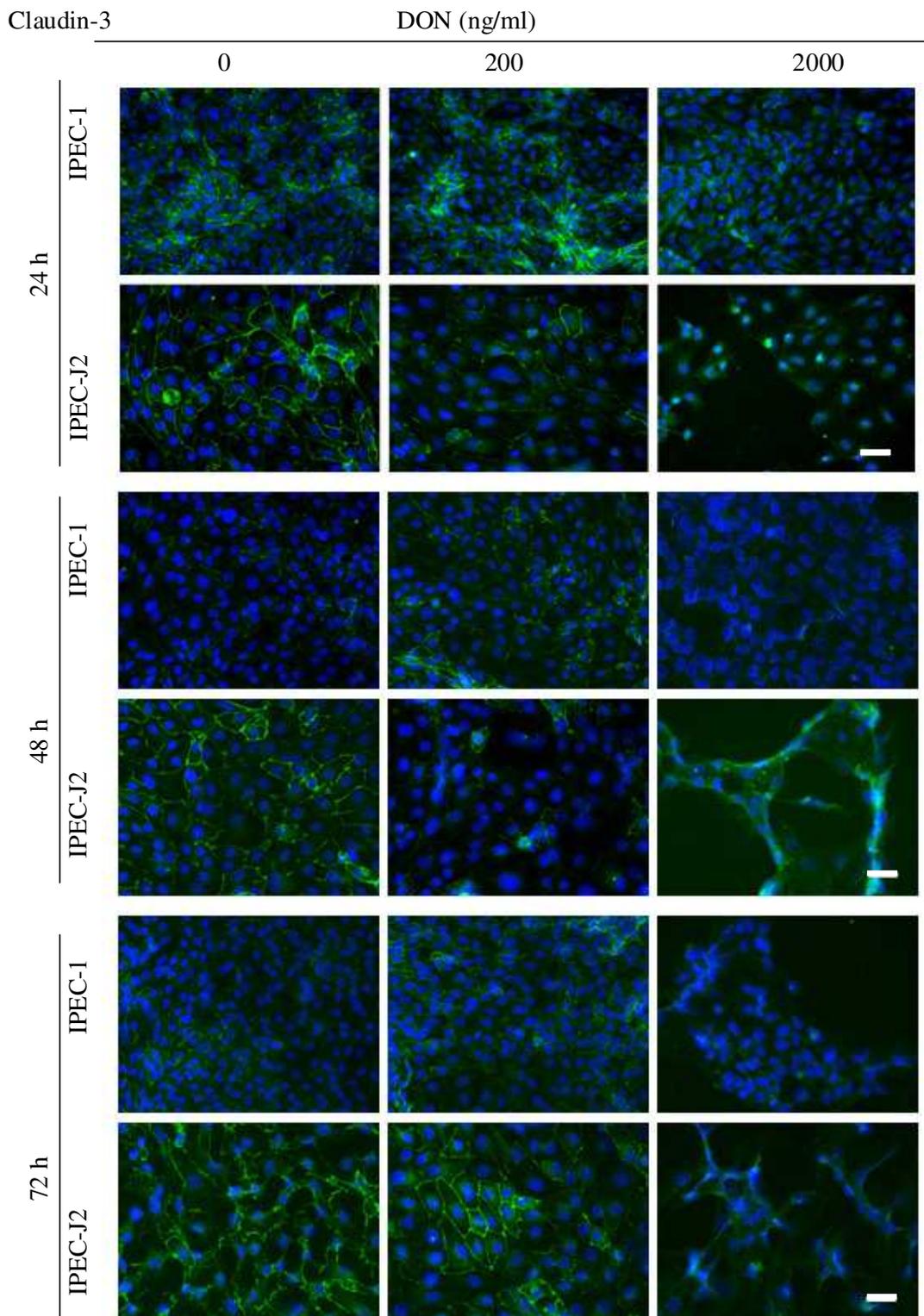


Abbildung 48: Expression des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund (Immunfluoreszenz)

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON 0; 200 oder 2000 ng/ml in Vollmedium inkubiert. Die Verteilung des Tight Junction-Proteins Claudin-3 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 20-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert. Es handelt sich um repräsentative Aufnahmen von drei unabhängigen Wiederholungen, die unter gleicher Belichtungszeit aufgenommen wurden. Maßstabsbalken: 10 μ m

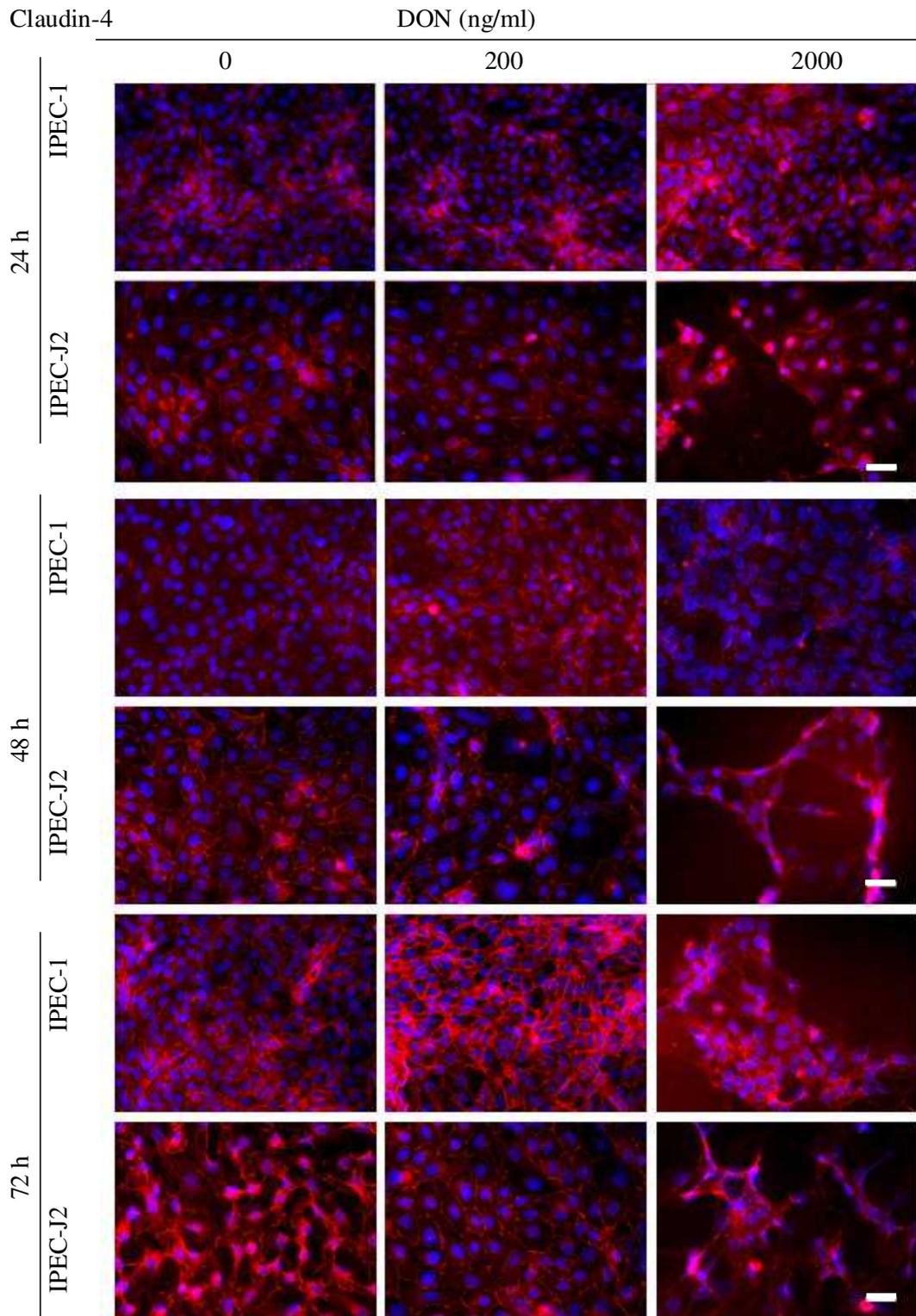


Abbildung 49: Expression des Tight Junction-Proteins Claudin-4 in IPECs nach DON-Behandlung auf impermeablem Untergrund (Immunfluoreszenz)

Die auf 8-Kammer-Objektträgern 4 d konfluent gewachsenen IPEC-1- und -J2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit DON 0, 200 oder 2000 ng/ml in Vollmedium inkubiert. Die Verteilung des Tight Junction-Proteins Claudin-4 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 20-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert. Es handelt sich um repräsentative Aufnahmen von drei unabhängigen Wiederholungen, die unter gleicher Belichtungszeit aufgenommen wurden. Maßstabsbalken: 10 μ m

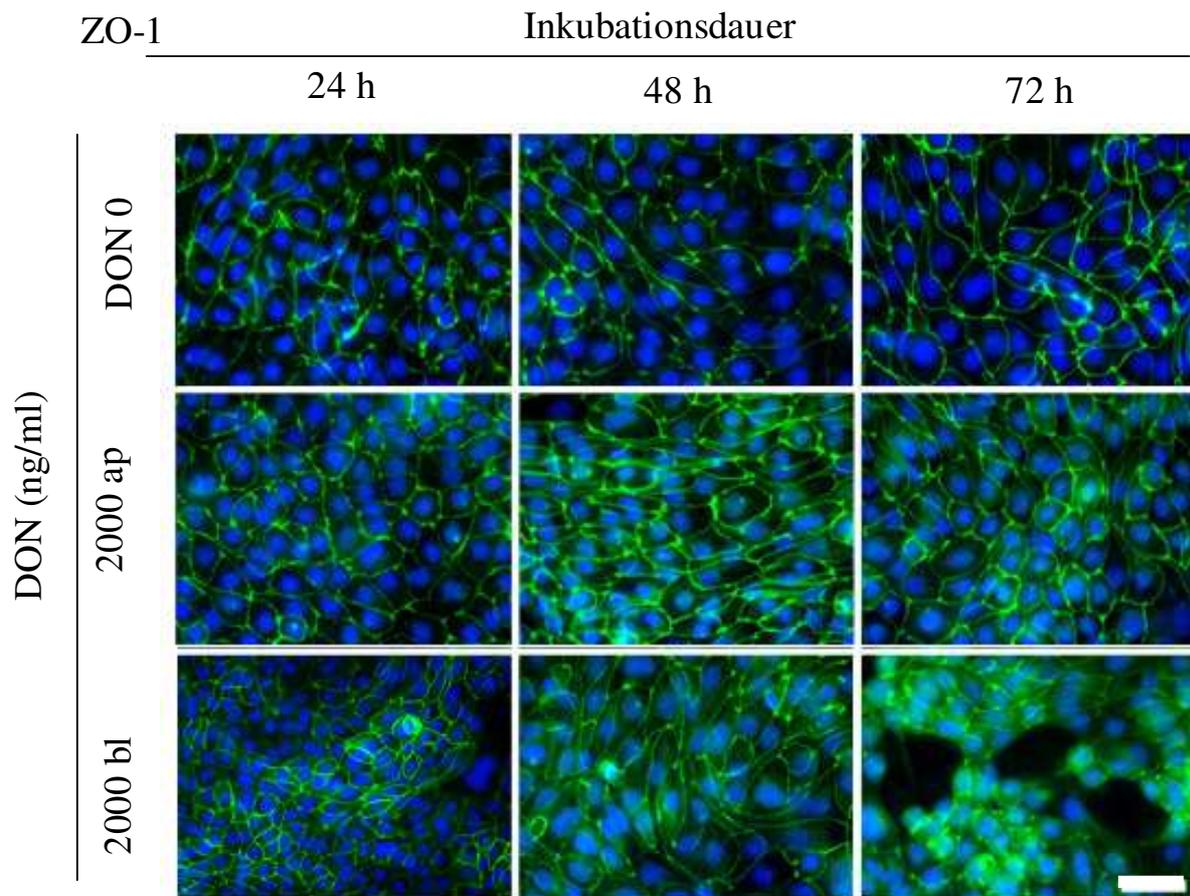


Abbildung 50: Darstellung des Tight Junction-Proteins ZO-1 in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund

Die auf 12-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die zelluläre Expression des Tight Junction-assoziierten Proteins ZO-1 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 40-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert, die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente und wurden unter gleicher Belichtungszeit in der Mitte einer jeden Membran aufgenommen. Maßstabsbalken: 50 μ m

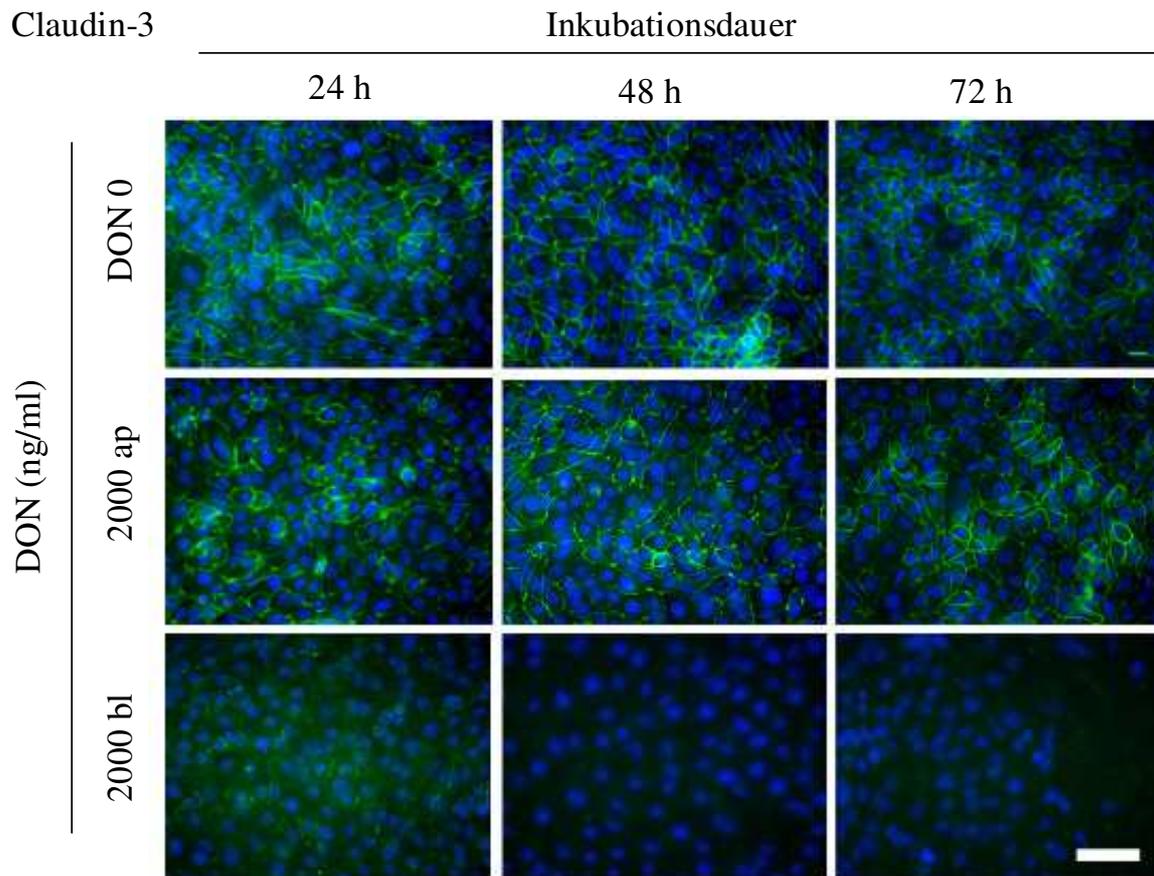


Abbildung 51: Darstellung des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund (Immunfluoreszenz)

Die auf 12-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die zelluläre Expression von Claudin-3 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 40-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert, die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente und wurden unter gleicher Belichtungszeit in der Mitte einer jeden Membran aufgenommen. Maßstabsbalken: 50 μ m

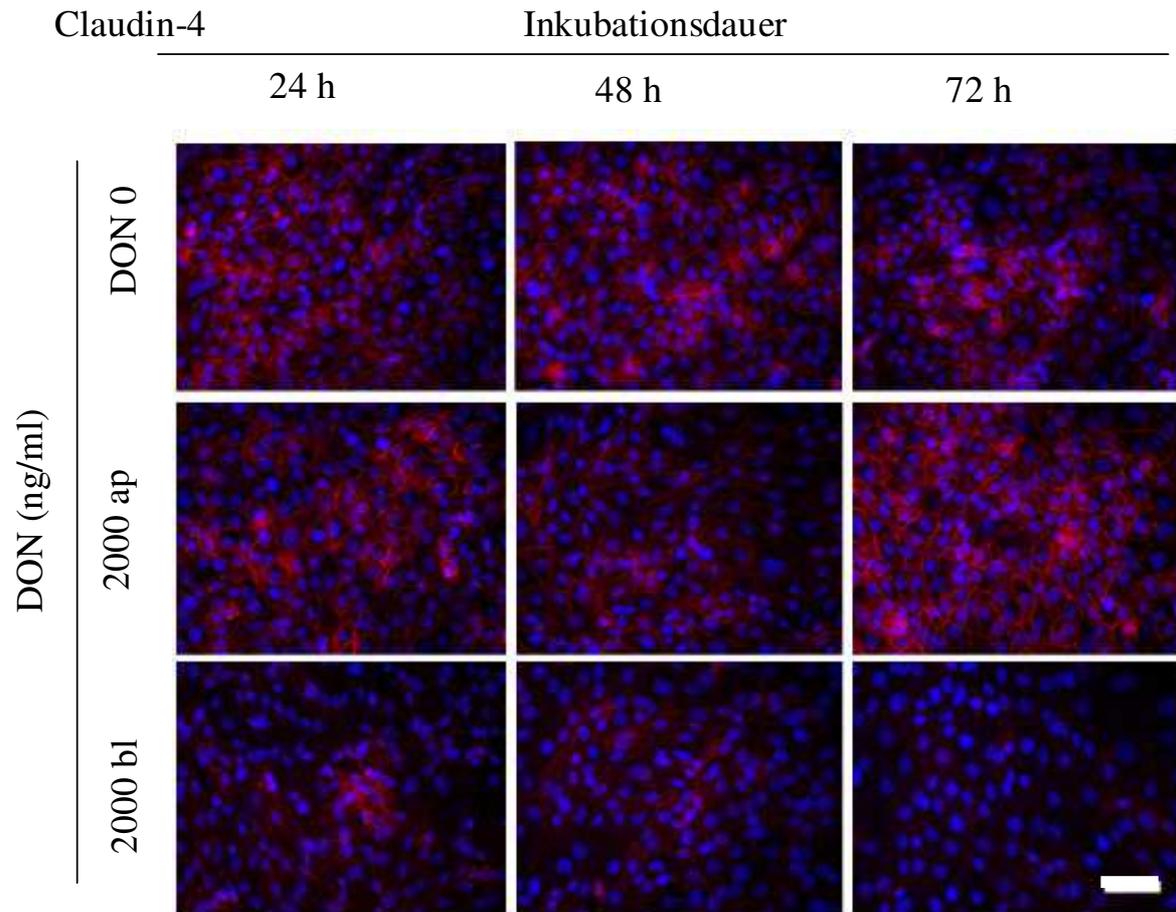


Abbildung 52: Darstellung des Tight Junction-Proteins Claudin-4 in IPEC-J2-Zellen nach gerichteter DON-Applikation auf permeablem Untergrund (Immunfluoreszenz)

Die auf 12-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 24, 48 und 72 h mit DON (2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die zelluläre Expression von Claudin-4 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bei 40-facher Vergrößerung mikroskopisch detektiert, die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente und wurden unter gleicher Belichtungszeit in der Mitte einer jeden Membran aufgenommen. Maßstabsbalken: 50 μ m

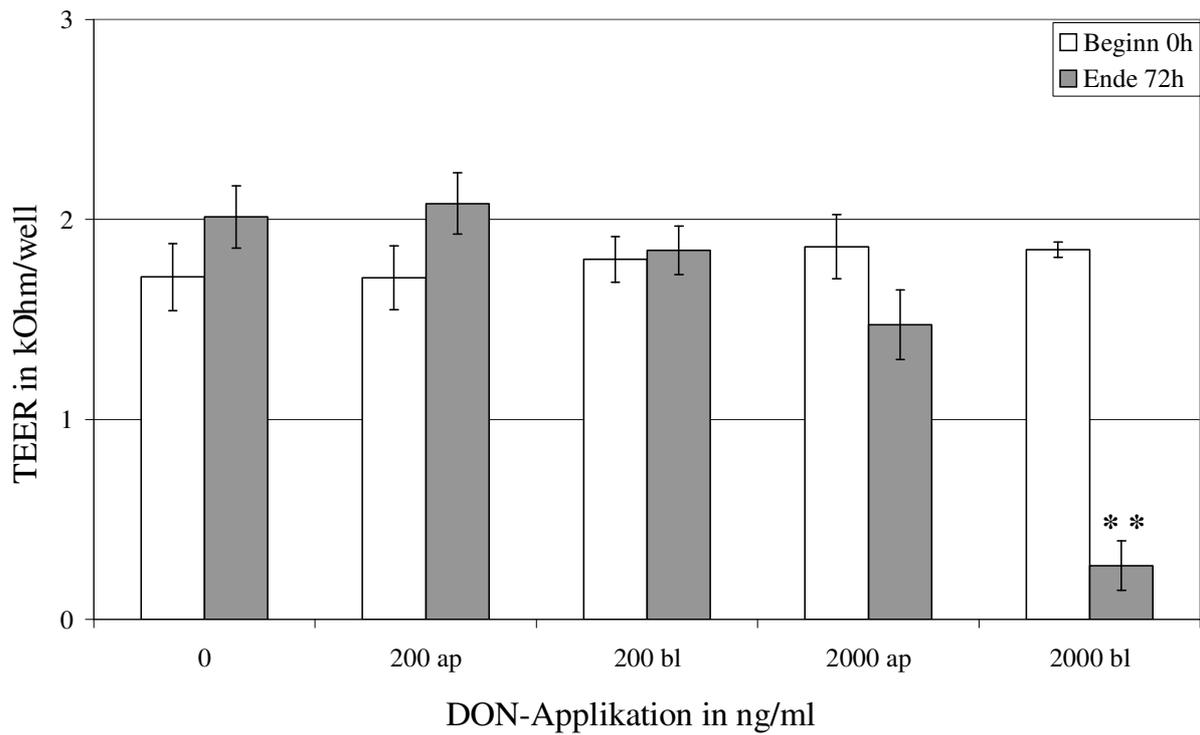


Abbildung 53: TEER-Werte vor (0 h) und nach (72 h) gerichteter DON-Inkubation in IPEC-J2

Die auf 6-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 72 h mit DON (0, 200 oder 2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Die gemessenen TEER-Werte sind in k Ω /Well (entspricht einer Fläche von 4,5 cm²) angegeben. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten (\pm SEM). Ergebnisse, die signifikant von der unbehandelten Kontrolle abweichen, sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

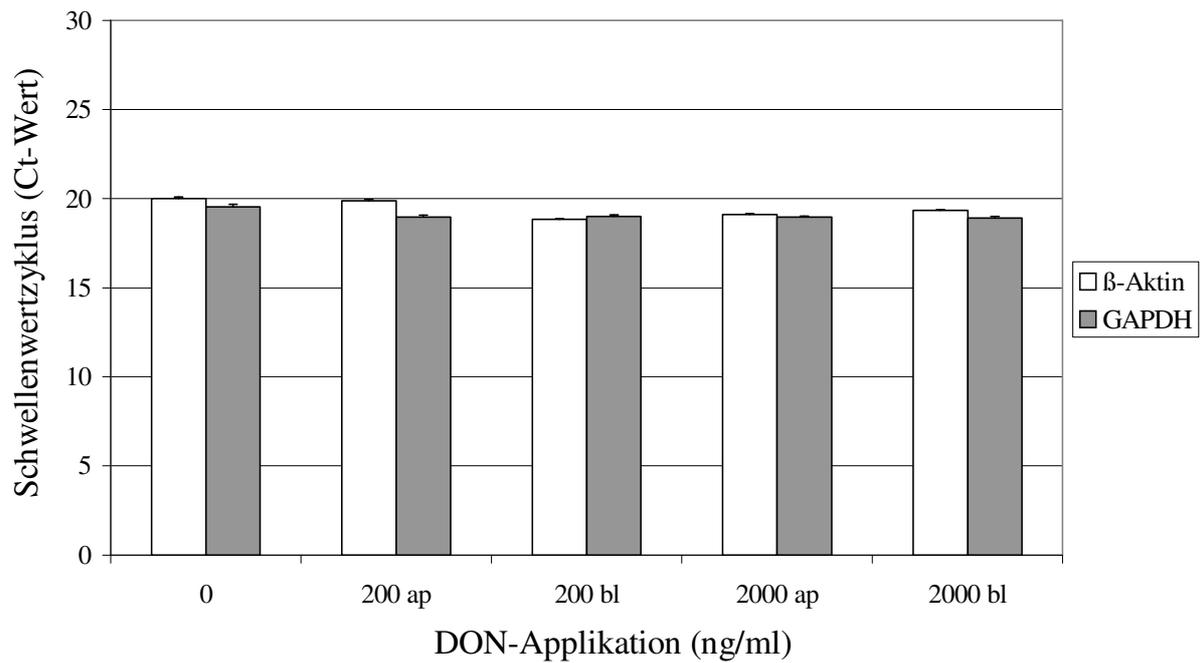


Abbildung 54: Vergleich der Expression der Referenzgene GAPDH und β -Aktin in der qPCR

Die auf 6-Well-Membrankultureinsätzen 7 d konfluent gewachsenen IPEC-J2-Zellen (TEER über 1 k Ω /Well) wurden für 72 h mit DON (0, 200 und 2000 ng/ml) in Vollmedium, welches entweder von apikal (ap) oder basolateral (bl) appliziert wurde, inkubiert. Der gemessene Schwellenwertzyklus (Ct) der Referenzgene GAPDH und β -Aktin von unbehandelten Kontrollzellen (0) und den DON-Behandlungsgruppen ist dargestellt. Jede Säule repräsentiert Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten (+ SEM).

Der Arbeit liegt eine CD bei, auf der sich ein Excel-Arbeitsblatt mit der Ergebnisübersicht der Microarray-Auswertung (Gesamtheit aller 14794 Transkripte für die IPEC-J2 Kontrolle sowie die vier DON-Behandlungsgruppen) befindet.

Microarray-Tabelle.xls

Legende zur Miroarray-Tabelle.xls

Danksagung

Diese Arbeit widme ich dem kleinen Wunder der Natur, Robert, der mich motiviert hat, die Arbeit konzentriert und zügig zu schreiben, damit ich mehr Zeit habe, die Welt mit ihm zu entdecken.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung, besonders während meiner Jugend und Studienzeit, die es mir ermöglicht hat, meinen Traum zu verwirklichen und Biologie zu studieren. Meinem Ehemann danke ich für sein grenzenloses Verständnis und dafür, dass er immer für mich da war.

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter für die Überlassung des überaus interessanten Themas der Doktorarbeit, die Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin sowie das Verständnis der Situation einer jungen Mutter bedanken.

Mein besonderer Dank gilt...

...den Wissenschaftlern der Arbeitsgruppe Mucosale Immunologie und Neuroanatomie für die nette Zusammenarbeit, das kritische Korrekturlesen und den kreativen Schaffensprozess des Publizierens.

...auch Patricia Panther und Sven Nullmeier, die das Layout des Schutzumschlages entwickelten.

...vor allem Constanze Nossol, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre, ihrer immerwährende Unterstützung, produktiven gemeinsamen Laborarbeit sowie der jahrelangen Freundschaft.

...Frau Dr. Heidi Faber-Zuschratter für die Ausführung der Elektronenmikroskopie.

...den lieben TA's des Institutes für Anatomie für ihre fachlich überaus kompetente Laborarbeit, insbesondere Anke Schmidt, Sandra Vorwerk und Anja Köppen. Sie haben auch einen wesentlichen Anteil an dem Zustandekommen der Publikationen geleistet.

...weiterhin der immer auskunftsfreudigen und allwissenden Andrea Kröber, Brigitte Ketzler für die Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen, Susanne Schneider für die Einführung in das sterile Arbeiten in der Zellkultur, Uschi Wiegand für das Beschaffen der Fachliteratur und natürlich auch allen anderen Mitarbeiter/innen des Institutes für Anatomie für die schöne Zusammenarbeit.

...den Kooperationspartnern des Instituts für Tierernährung am Friedrich-Löffler Institut (FLI) in Braunschweig, Herrn Prof. Dr. Dr. Sven Dänicke, Frau Dr. Susanne Döll, Frau Bianca Brosig, Frau Nicola Mickenausch und Frau Dr. Hanna Valenta für die konstruktive Kritik, die horizont-erweiternden Diskussionen sowie für die DON-Analytik.

...nicht zuletzt Herrn Dr. Peter Kreuzmann, Institut für Biochemie, OvGU Magdeburg für die Hilfe am Luminometer, Herrn Dr. Roland Hartig, Institut für molekulare und klinische Immunologie, OvGU Magdeburg für die Unterstützung bei den FACs-Analysen sowie Herrn Dr. Klaus Wimmers, Arbeitsgruppe Molekulare Genetik, FBL Dummerstorf für die Durchführung und Statistik der Microarrays.

PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation

Gene regulation of intestinal porcine epithelial cells IPEC-J2 is dependent on the site of deoxynivalenol toxicological action.

Diesing AK, Nossol C, Ponsuksili S, Wimmers K, Kluess J, Walk N, Post A, Rothkötter HJ, Kahlert S
PLoS One, 2012 7(4), e34136

Air-liquid interface cultures enhance the oxygen supply and trigger the structural and functional differentiation of intestinal porcine epithelial cells (IPEC).

Nossol C, **Diesing AK**, Walk N, Faber-Zuschratter H, Hartig R, Post A, Kluess J, Rothkötter HJ, Kahlert S.
Histochem Cell Biol. 2011 Jul;136(1):103-15. Epub 2011 Jun 17.

Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application.

Diesing AK, Nossol C, Dänicke S, Walk N, Post A, Kahlert S, Rothkötter HJ, Kluess J.
PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e17472.

Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2.

Diesing AK, Nossol C, Panther P, Walk N, Post A, Kluess J, Kreuzmann P, Dänicke S, Rothkötter HJ, Kahlert S.
Toxicol Lett. 2011 Jan 15;200(1-2):8-18. Epub 2010 Oct 19.

Studies on the toxicity of deoxynivalenol (DON), sodium metabisulfite, DON-sulfonate (DONS) and de-epoxy-DON for porcine peripheral blood mononuclear cells and the Intestinal Porcine Epithelial Cell lines IPEC-1 and IPEC-J2, and on effects of DON and DONS on piglets.

Dänicke S, **Hegewald AK**, Kahlert S, Klüss J, Rothkötter HJ, Breves G, Döll S.
Food Chem Toxicol. 2010 Aug-Sep;48(8-9):2154-62. Epub 2010 May 15 PMID: 20478350

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

Modulation der physiologischen Zellfunktion in intestinalen porcinen Epithelzellen (IPEC)
durch das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON)

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Projekt RO 734/3-2, finanziell unterstützt.

Magdeburg, den 23.04.2012



Dipl.-Biol. Anne-Kathrin Diesing