Aus dem Institut für Anatomie

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Einfluss von Deoxynivalenol und *E.coli*-Lipopolysaccharid auf die Expression von ZO-1 und β-Catenin im Dünndarm des Schweins

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Leslie Raja Klunker

aus Halle (Saale)

Magdeburg 2013

Bibliographische Beschreibung

Klunker, Leslie Raja:
Einfluss von Deoxynivalenol und *E.coli*-Lipopolysaccharid auf die Expression von ZO-1 und β-Catenin im Dünndarm des Schweins. - 2013. - 59 Bl., 28 Abb., 9 Tab., 5 Anl.

Kurzreferat

Gegenstand der Arbeit war es, den in der Literatur diskutierten interaktiven Effekt von Deoxynivalenol (DON) und Lipopolysacchariden (LPS) auf die epitheliale Barriere des porcinen Dünndarms zu untersuchen. Als Bestandteile des apikalen Junktionskomplexes wurden die Proteine *Zonula occludens-1* (ZO-1) und β-Catenin fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Kastrierte Schweine (26 $\pm$ 4 kg) erhielten über einen Zeitraum von 37 Tagen restriktiv entweder ein Kontrollfutter (KON) oder ein kontaminiertes Futter mit 3,1 mg DON / kg Futter (DON). Am Tag 37 bekamen die Kontrolltiere für eine Stunde entweder 100 µg / kg Lebendmasse (LM) DON (KON_DON), 7.5 µg / kg LM LPS (KON_LPS), eine Kombination beider Substanzen (KON_DON+LPS) oder 0,9 % NaCl (KON_KON) infundiert. Die DON-gefütterten Tiere bekamen über eine einstündige Infusion 7.5 µg / kg LM LPS (DON_LPS) oder 0,9 % NaCl (DON_KON) verabreicht. Die Schlachtung erfolgte 3,25 h nach Beginn der Infusion. Die Analysen ergaben für ZO-1 ein differenziertes räumliches Verteilungsmuster im Epithel mit einer apikalen und zytosolischen Komponente. Die apikale ZO-1-Struktur wies eine geringere Ausprägung im mittleren Jejunum der KON_DON-Gruppe im Vergleich zu den LPS-behandelten Tieren auf. Zudem bewirkte die systemische LPS-Gabe im Duodenum, proximalen und mittleren Jejunum eine Umverteilung von ZO-1 nach apikal. Dieser Effekt war unabhängig von DON. Die Kontrolltiere wiesen eine stärkere basolaterale Akkumulation von β-Catenin auf, wohingegen die Proteinverteilung in der KON_DON-Gruppe keine Unterschiede zeigte. In dieser Studie konnte kein synergistischer Effekt von DON und LPS nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter

β-Catenin, Apikaler Junktionskomplex, Deoxynivalenol, Dünndarm, *E.coli*-Lipopolysaccharid, Schwein, ZO-1

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **IV**

Tabellenverzeichnis **V**

Abkürzungsverzeichnis **VI**

1 Einführung **1**

1.1 Allgemeine Einführung . . . 1
1.2 Deoxynivalenol . . . 3
1.2.1 Vorkommen und Bedeutung von DON . . . 3
1.2.2 Epidemiologische Aspekte . . . 5
1.2.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften von DON . . . 5
1.2.4 Metabolisierung und systemische Wirkung von DON im Schwein . . . 6
1.2.5 Wirkung von DON auf zellulärer und molekularer Ebene . . . 7
1.3 Lipopolysaccharide . . . 8
1.3.1 Vorkommen und Aufbau von LPS . . . 8
1.3.2 Systemische Wirkung von LPS . . . 10
1.3.3 Wirkung von LPS auf zellulärer und molekularer Ebene . . . 10
1.4 Der Dünndarm des Schweins . . . 12
1.4.1 Allgemeiner histologischer Aufbau . . . 13
1.4.2 Unterscheidung der Dünndarmabschnitte . . . 14
1.5 Die epitheliale Barriere im Dünndarm . . . 15
1.5.1 Zonula occludens . . . 15
1.5.2 Zonula adhaerens . . . 17
1.5.3 Einfluss von DON und LPS auf die epitheliale Barriere . . . 19
1.6 Zielstellung . . . 21

2 Material und Methoden **22**

2.1 Ethische Grundlagen . . . 22
2.2 Versuchstiere und Tierhaltung . . . 22
2.3 Versuchsaufbau . . . 22
2.4 Gewebeentnahme . . . 24
2.5 Gewebeaufbereitung . . . 24
2.6 Gewebeanalyse . . . 25
2.6.1 Auswertung der apikalen ZO-1-Verteilung . . . 25
2.6.2 Auswertung der ZO-1-Verteilung im Epithel . . . 27
2.6.3 Auswertung der β-Catenin-Verteilung im Epithel . . . 27

2.7 Statistik . . . 29
2.7.1 Apikale ZO-1-Verteilung (Score) . . . 29
2.7.2 ZO-1-Verteilung im Epithel . . . 29
2.7.3 β-Catenin-Verteilung im Epithel . . . 29

3 Ergebnisse **30**
3.1 Die Wirkung von DON und LPS auf die apikale Expression von ZO-1 . . . 30
3.2 Die Wirkung von DON und LPS auf die ZO-1-Verteilung im Epithel . . . 30
3.3 Die Wirkung von DON auf die β-Catenin-Verteilung im Epithel . . . 40

4 Diskussion **42**
4.1 Einleitung . . . 42
4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse . . . 43
4.3 ZO-1 weist ein differenziertes Verteilungsmuster auf . . . 43
4.4 Die Wirkung von DON auf die epitheliale Barriere des Dünndarms . . . 46
4.4.1 Die Wirkung von DON auf die apikale ZO-1-Expression ist abhängig von der Applikationsroute . . . 46
4.4.2 DON zeigt keinen Einfluss auf die ZO-1-Verteilung im Epithel . . . 50
4.4.3 DON ändert die zytoplasmatische β-Catenin-Verteilung im Epithel . 50
4.5 Die Wirkung von LPS auf die epitheliale Barriere des Dünndarms . . . 51
4.5.1 LPS zeigt keinen Einfluss auf die apikale ZO-1-Expression . . . 51
4.5.2 LPS ändert die ZO-1-Verteilung im Epithel . . . 53
4.6 Die Wirkung von DON und LPS auf die epitheliale Barriere des Dünndarms 55
4.6.1 DON und LPS zeigen keinen interaktiven Effekt auf die apikale ZO-1-Expression . . . 55
4.6.2 DON und LPS zeigen keinen synergistischen Effekt auf die ZO-1-Verteilung im Epithel . . . 56
4.7 Ausblick . . . 58

5 Zusammenfassung **59**

Literaturverzeichnis **60**

Anhang **73**

A Futterzusammenstellung **74**

B Protokoll zur operativen Anlage der Jugularis-Katheter **75**

C Protokoll zur Herstellung der Infusionslösungen **77**

D Protokoll zur Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten **79**

E Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung **81**

Danksagung **84**

Lebenslauf **85**

Veröffentlichungen **87**

Eidesstattliche Erklärung **88**

Abbildungsverzeichnis

1.1 *Fusarium*-assoziierte Getreidekrankheiten 4
1.2 Grundstruktur der Trichothecene 5
1.3 Schematische Struktur von LPS 9
1.4 LPS-vermittelte Aktivierung peripherer Makrophagen 12
1.5 Unterscheidung der Dünndarmabschnitte beim Schwein 15
1.6 Schematische Darstellung polarisierter Enterozyten 16
1.7 Cadherin-Catenin-Komplex 18

2.1 Versuchsdesign 23
2.2 Entnahmestellen der Gewebeproben 24
2.3 Unterteilung der Dünndarmzotte 26
2.4 Beurteilung der apikalen ZO-1-Expression 26
2.5 Analyse der ZO-1-Verteilung im intestinalen Epithel 27
2.6 Analyse der β-Catenin-Verteilung im Epithel des mittleren Jejunums 28

3.1 Ausprägung der apikalen ZO-1-Struktur im Dünndarmepithel 31
3.2 Räumliche Verteilung von ZO-1 im Duodenum 32
3.3 Räumliche Verteilung von ZO-1 im proximalen Jejunum 33
3.4 Räumliche Verteilung von ZO-1 im mittleren Jejunum 34
3.5 Räumliche Verteilung von ZO-1 im proximalen Ileum 35
3.6 Räumliche Verteilung von ZO-1 im terminalen Ileum 36
3.7 Schema zur Toxin-Wirkung auf die ZO-1-Verteilung 38
3.8 Räumliche Verteilung von ZO-1 im Dünndarmepithel 39
3.9 Beispiel für die β-Catenin-Expression 40
3.10 Räumliche Verteilung von β-Catenin im Dünndarmepithel 41

4.1 Verteilung von Claudinen im Dünndarm von Mäusen 44
4.2 Schematischer Aufbau einer Membrankultur 49

E.1 Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung, Schritt 1 81
E.2 Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung, Schritt 2 82
E.3 Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung, Schritt 3 83

Tabellenverzeichnis

1.1 EU-Richtwerte für DON-Gehalt in Futtermitteln 4
1.2 EU-Höchstwerte für DON-Gehalt in Lebensmitteln 4
1.3 Einteilung der Trichothecene 6

2.1 Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung 25
2.2 Filter für die Fluoreszenzmikroskopie 25
2.3 ZO-1-Score 26

A.1 Zusammenstellung und Analyse der Futtermischungen 74

C.1 Beispiel für die Berechnung der LPS-Infusionslösung 78

D.1 Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung, Herstellerangaben 79

Abkürzungsverzeichnis

AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
AJ	Adherens Junction
AJK	Apikaler Junktionskomplex
AK	Antikörper
ATA	*Alimentary toxic aleukia*
CD	*Cluster of differentiation*
DAPI	4-,6-Diamin-2-phenylindol
DOM	De-epoxy-deoxynivalenol
DON	Deoxynivalenol
E.coli	*Escherichia coli*
ERK	*Extracellular signal regulating kinase*
EU	Europäische Union
F	*Fusarium*
FLI	Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Braunschweig
FSR	Fraktionelle Syntheserate
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GIT	Gastrointestinaltrakt
GlcN	Glucosamin
GLUT	Glukosetransporter
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HCl	Chlorwasserstoff
Hep	Heptosen
Hex	Hexosen
HPLC	*High performance liquid chromatography*
IL	Interleukin
IPEC	*Intestinal porcine epithelial cell line*
JAM	*Junctional adhesion molecule*
JNK	*C-Junc N-terminal kinase*
Kdo	2-Keto-3-desoxy-octonsäure
KON	Kontrolle
LBP	LPS-bindendes Protein
LM	Lebendmasse
LOI	*Line of interest*
LPS	Lipopolysaccharid

MAGUK	*Membrane-associated gyanulate kinase*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
mCD14	*Membrane* CD14
MD-2	*Myeloid differentiation protein 2*
NaCl	Natriumchlorid
NOAEL	*No-observed adverse effect level*
OP	Operation
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
PB	*Phosphate buffer*
ppm	*Parts per million*
PRR	*Pattern recognition receptor*
R	Ratio
sCD14	*Soluble* CD14
SGLT-1	Natrium/Glukose-Kotransporter 1
TEER	*Transepithelial electrical resistance*
TJ	Tight Junction
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V.
ZO-1	*Zonula occludens-1* Protein

1 Einführung

1.1 Allgemeine Einführung

Im April 2011 informierte die Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) über einen Rückruf für die Produkte „Ziegler Käsetaler“ und „Ziegler Paprikataler“ mit den Mindesthaltbarkeitsdaten 28.10.2011, 28.12.2011 und 28.02.2012. Die Produkte seien wegen Überschreitung der von der Europäischen Union (EU) vorgeschriebenen Grenzwerte für Deoxynivalenol (DON) als unsicher einzustufen (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, 2011). Trotz moderner Verarbeitungstechniken in der Lebens- und Futtermittelherstellung und strenger Kontrollen treten immer wieder ähnliche Fälle auf.
DON, als eines der am häufigsten nachgewiesenen Mykotoxine in der europäischen Getreideproduktion, wird nur unzureichend während der Verarbeitungsschritte des Getreides degradiert (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001; Sugita-Konishi et al., 2006). Das Mykotoxin gehört zur Familie der Trichothecene und wird als sekundärer Metabolit hauptsächlich von den Schimmelpilzen *Fusarium* (*F*) *graminearum* und *F. culmorum* gebildet, die im Besonderen Weizen, Gerste und Mais kontaminieren. Durch die Weiterverarbeitung von kontaminiertem Getreide zu Nahrungs- und Futtermitteln entsteht eine gesundheitliche Gefährdung von Mensch und Tier. Bei Menschen ruft der übermäßige Verzehr Symptome hervor, die von Übelkeit und Erbrechen bis hin zum schweren Krankheitsbild der „*alimentary toxic aleukia*“ (ATA) reichen (Bryden, 2007; Richard, 2007). Bei Nutztieren führt die akute Exposition gegenüber DON zu verminderter Futteraufnahme, Erbrechen und Durchfall. Über einen längeren Zeitraum verursacht die chronische Exposition eine veränderte Immunfunktion, Inappetenz und eine mangelnde Gewichtszunahme. Folglich entstehen hohe ökonomische Verluste in der Landwirtschaft (Pestka, 2007; Döll und Dänicke, 2011). Neben Mykotoxinen können Pathogen-assoziierte Muster, wie Lipopolysaccharide (LPS), in Futtermitteln enthalten sein. Als Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien kommt LPS ubiquitär vor. Es ist hauptverantwortlich für die toxischen Manifestationen schwerer Gram-negativer Infektionen. Als Endotoxin ruft es ausgeprägte inflammatorische Reaktionen hervor, die bis zum lebensbedrohlichen Krankheitsbild der Sepsis führen können (Schletter et al., 1995). Durch die Anwesenheit der fakultativ pathogenen Kommensalen im Gastrointestinaltrakt steht der Organismus in permanentem Kontakt mit LPS. Die intestinale Epithelschicht stellt die erste Barriere gegenüber Toxinen wie DON und LPS dar. Zwischen benachbarten Enterozyten bildet der apikale Junktionskomplex (AJK), bestehend aus Tight Junction (TJ) und Adherens Junction (AJ), durch Trennung der apikalen und basolateralen Domäne eine polarisierte

Epithelzellschicht (Rodriguez-Boulan und Powell, 1992). Die Differenzierung der beiden Domänen ist die Voraussetzung für eine effektive epitheliale Barriere, die zum einen die Absorption von Nährstoffen ermöglichen und zum anderen den Übertritt von Pathogenen verhindern soll. *In vitro*-Experimente an Kulturen mit intestinalen Epithelzelllinien belegten eine schädigende Wirkung von DON auf die parazelluläre Permeabilität. Die Schädigung resultierte in einer Zeit- und Dosis-abhängigen Erhöhung der Translokation von LPS (Pinton et al., 2009). An Mäusen konnte gezeigt werden, dass LPS die Toxizität von Trichothecenen verstärkt (Zhou et al., 1999).
Grundlagenforschungen, wie diese, sind notwendig, um pathogenetische Zusammenhänge zu erkennen und die Basis für therapeutische Ansätze zu schaffen. Im Rahmen des aktuellen Forschungsprojektes soll der in der Literatur diskutierte interaktive Effekt von DON und LPS an Schweinen, als empfindlichste Spezies gegenüber DON, erforscht werden. Gegenstand der vorliegenden Promotion ist es, die Toxin-Wirkungen auf die epitheliale Barriere des Dünndarms zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden die Proteine *Zonula occludens-1* (ZO-1) und β-Catenin als Bestandteile des AJK im porcinen Dünndarm analysiert.

1.2 Deoxynivalenol

Deoxynivalenol ist ein natürlich vorkommendes Mykotoxin. Es gehört zur Familie der Trichothecene, einer Gruppe sekundärer Metabolite mit chemisch ähnlicher Struktur, die von den Schimmelpilzen *Fusarium, Mycothecium, Stachybotrys, Trichoderma, Trichothecium, Verticimonosporium* und *Cephalosporium* gebildet werden (Ueno, 1985). Der konkrete Nutzen der Sekundärmetabolite für die Pilze ist nicht eindeutig geklärt, da sie nicht essenziell für das Pilzwachstum und deren Vermehrung sind (Desjardins et al., 1993). Im Jahr 1949 isolierten Freeman und Morrison (1949) aus *Trichothecium roseum* das erste Trichothecen, welches der Gruppe ihren Namen verlieh. Mittlerweile wurden über 180 verschiedene Trichothecene erforscht und charakterisiert (Grove, 2007). DON wurde in Japan aus *Fusarium*-befallener Gerste isoliert und erstmals im Jahr 1972 in der Literatur erwähnt (Morooka et al., 1972). Etwa zeitgleich beschrieben Vesonder et al. (1973) in den USA das gleiche Pilzgift und nannten es „Vomitoxin“, da es bei den Versuchstieren Erbrechen hervorrief.

1.2.1 Vorkommen und Bedeutung von DON

Jährlich sind etwa 25 % der Nutzpflanzen weltweit durch Mykotoxine befallen (CAST, 2003). Im Vergleich zu anderen Trichothecenen, wie z. B. dem T-2-Toxin, ist DON weniger toxisch. Dennoch ist dieses Pilzgift von besonderer Bedeutung, da es eines der am häufigsten nachgewiesenen Trichothecene in der europäischen Getreideproduktion darstellt (Rotter et al., 1996; FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001). Es wird hauptsächlich von den Schimmelpilzen *F. graminearum* und *F. culmorum* gebildet und kontaminiert bevorzugt Weizen, Gerste und Mais. Auf den Feldern wird der Mykotoxinbefall des Getreides durch die ausgedehnte Nutzung der Direktsaat bei gleichzeitig einseitiger Fruchtfolge, z. B. mit mehrjährigem, wiederholtem Maisanbau, begünstigt (McMullen et al., 1997). Des Weiteren begünstigen klimatische Bedingungen, wie hohe Feuchtigkeit während der Blüte und niedrige Temperaturen, den Befall durch *Fusarium subspecies* und die Synthese giftiger Metabolite (Rotter et al., 1996). Die unsachgemäße Lagerung des Getreides bei relativ hoher Feuchtigkeit (>15 %) kann zum erneuten Auskeimen der langfristig lebensfähigen Sporen führen (Bennett und Richard, 1996). Die phytotoxischen Eigenschaften von DON bewirken ein vermindertes Pflanzenwachstum und die Hemmung von Jungpflanzen (Bruins et al., 1993). DON ist typischerweise mit den in Abb. 1.1 dargestellten Getreidekrankheiten „Weißährigkeit“ (englisch „*head blight*“ oder „*scab*“, Perkowski et al. 1996; Wiersma et al. 1996) und „Rotkolbenfäule“ (englisch „*red ear rot*“, Miller 1994), die zu Ernteeinbußen und ökonomischen Verlusten führen, assoziiert. Darüber hinaus entsteht durch die Weiterverarbeitung von kontaminiertem Getreide zu Futter- und Nahrungsmitteln eine gesundheitliche Gefährdung von Tier und Mensch. DON wird aufgrund seiner hohen Thermostabilität nur unwesentlich während Produktionsschritten, wie Mahlprozessen und Erhitzen, degradiert (Sugita-Konishi et al., 2006). Aus den genannten Gründen wurden von der EU-Kommission (2006a,b) Richtwerte für DON in Futter- (Tab. 1.1) und Höchstgehalte für DON in Lebensmitteln (Tab. 1.2) festgelegt. Zur besseren

(a) Getreidekrankheit „Weißährigkeit“

(b) Getreidekrankheit „Rotkolbenfäule“

Abbildung 1.1: *Fusarium*-assoziierte Getreidekrankheiten. Stand: 12.03.2013
a) Quelle: University of Kentucky, College of Agriculture
b) Quelle: Ministry of Agriculture and Food

Erzeugnis	**Richtwert (mg / kg)**
Getreideerzeugnisse	2
Maisnebenprodukte	3
Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine	0,9

Tabelle 1.1: Von der EU-Kommission (2006a) festgelegte Richtwerte für DON in Futtermitteln, ausgehend von einem Feuchtegehalt von 12 %.

Erzeugnis	**Höchstgehalt (µg / kg)**
Lebensmittelerzeugnisse und trockene Teigwaren	750
Brot und feine Backwaren	500
Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	200

Tabelle 1.2: Von der EU-Kommission (2006b) festgelegte Höchstgehalte für DON in Lebensmitteln.

Abschätzung der Mykotoxin-Exposition entwickelten Turner et al. (2008) einen Biomarker für DON im Urin. Die Probanden waren Engländer im Alter von 19-64 Jahren und wurden entsprechend der Menge des Getreidekonsums in drei Gruppen (gering, mittel, hoch) eingeteilt. Es konnte gezeigt werden, dass in 296 von 300 Urin-Proben (98,7 %) DON nachweisbar war. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Mehrheit der englischen Bevölkerung dem Pilzgift ausgesetzt sei. Ferner gingen sie davon aus, dass Einzelpersonen den von der EU festgelegten Höchstwert für die tägliche DON-Aufnahme von 1 mg / kg Körpergewicht überschreiten könnten. Im Gegensatz zur DON-Exposition durch den Verzehr getreidehaltiger Lebensmittel besteht für den Menschen keine Gefahr durch tierische Produkte, wie Milch, Eier und Fleisch, da DON in Nutztieren verstoffwechselt wird und nicht bioakkumuliert (Pestka, 2007).

1.2.2 Epidemiologische Aspekte

In den Zeiten von Hungersnöten, Kriegen und sonstigen Katastrophen führte der übermäßige Verzehr von Mykotoxin-kontaminiertem Getreide zur Ausbildung von Mykotoxikosen. Das Krankheitsbild mit dem Namen „*alimentary toxic aleukia*“ wurde erstmals 1913 in Ost-Sibirien nach dem Verzehr von überwintertem Getreide beschrieben. Die Erkrankten wiesen gastrointestinale Symptome, wie Übelkeit und Erbrechen, zudem Leukopenie, Hämorrhagien und Schockzustände auf. Im schlimmsten Fall führte die Erkrankung bis zum Tod (Pestka und Smolinski, 2005). In den 1930er und späten 1940er Jahren der früheren Sowjetunion traten erneut ATA-Epidemien auf. Nachfolgende Analysen zeigten, dass es sich bei dem verursachenden Toxin hauptsächlich um das Mykotoxin T-2 aus der Gruppe A der Trichothecene handelte (Joffe, 1978). Im 20. Jahrhundert wurden insbesondere im asiatischen Raum gehäuft ATA-ähnliche Symptome mit vorwiegend gastrointestinalen Störungen dokumentiert. Der Verzehr von *Fusarium*-befallenen Getreideprodukten bewirkte in Japan und Korea bei den Betroffenen Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. In China im Zeitraum von 1960 bis 1980 kam es wiederholt nach Ingestion von verschimmeltem Getreide zu Nahrungsmittelvergiftungen, die die Einwirkung von Mykotoxinen vermuten lassen (Yoshizawa, 1983; Pestka und Smolinski, 2005). Anlässlich zahlreicher Intoxikationen mit Schimmelpilzen veröffentlichten Li et al. (2002) Getreideanalysen von 1998/1999 aus Puyang, einer Stadt im Nordosten der chinesischen Provinz Henan. Die Proben wurden auf Trichothecene und Zearalenone untersucht. DON, als vorrangiges Toxin, wurde in 30 von 31 Proben (Mittelwert 2,85 ppm) nachgewiesen.

1.2.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften von DON

Trichothecene sind stabile, nicht flüchtige, zyklische Sesquiterpene mit geringen Molekülmassen (ca. 200-500 Da). Allen gemeinsam ist, wie in Abb. 1.2 dargestellt, der sogenannte Trichothecen-Kern mit einer Doppelbindung zwischen C_9 / C_{10} und dem Epoxidring zwischen C_{12}/C_{13}. Nach Desjardins et al. (1993) und Sudakin (2003) ist der Epoxidring entscheidend für die toxikologischen Eigenschaften der Trichothecene. Anhand der funktionellen Substituenten teilte Ueno (1977) die Trichothecene in vier Gruppen ein (Tab. 1.3).

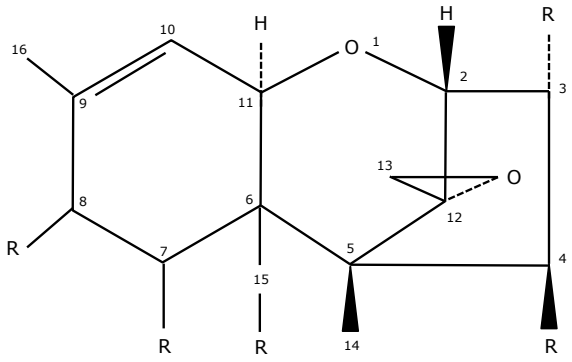


Abbildung 1.2: Grundstruktur der Trichothecene.

Gruppe	Funktionelle Substituenten (R)	Toxine
A	Hydroxylgruppen, Karbonsäuren	T-2, HT-2, Diacetoxyscirpenol
B	Ketogruppe C_8	Deoxynivalenol, Nivalenol
C	Zweiter Epoxidring C_7/C_8 oder C_9/C_{10}	Crotocin, Baccharin
D	Makrozyklischer Ring C_4/C_{15}	Satratoxin, Roridin A

Tabelle 1.3: Einteilung der Trichothecene, mit den für sie kennzeichnenden funktionellen Substituenten, in die Gruppen A-D.

DON, mit der Summenformel $C_{15}H_{20}O_6$, wird der Gruppe B zugeordnet. Das Toxin besitzt Hydroxylgruppen an C_3, C_7, C_{15} und eine Ketogruppe an C_8. Das relative Molekulargewicht beträgt 296,32 und der Schmelzpunkt liegt bei 151-153 °C. DON löst sich in polaren Lösungsmitteln, wie Wasser, Ethanol, Methanol und Acetonitril (Ueno, 1985).

1.2.4 Metabolisierung und systemische Wirkung von DON im Schwein

Durch die Weiterverarbeitung von *Fusarium*-befallenem Getreide zu Futtermitteln kann DON in hohen Konzentrationen bei Tieren Mykotoxikosen hervorrufen. Insbesondere das Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) als Monogastrier gilt als empfindlichste Spezies, gefolgt von Mäusen und Ratten. Geflügel und Wiederkäuer hingegen sind relativ unempfindlich (Prelusky et al., 1994). Aus *in vivo*-Versuchen wurde das *no-observed adverse effect level* (NOAEL) für DON abgeleitet. Dieser Wert gibt die höchste Dosis, bei der noch kein schädlicher Effekt auftritt, an. Er beträgt für Schweine $0,03 - 0,12$ mg / kg Lebendmasse (LM)/Tag und für Nager $0,1 - 0,15$ mg / kg LM/Tag (Pestka, 2007).
Beim Schwein wird DON nach peroraler Aufnahme rasch absorbiert und kann innerhalb von 15 Minuten im Plasma nachgewiesen werden (Goyarts und Dänicke, 2006). Das Toxin unterliegt nur einer geringen Metabolisierung. Zum einen wird es in der Leber mit Glukuronsäuren konjugiert, zum anderen durch die mikrobielle Flora im Intestinum entgiftet. Durch die Aufspaltung des Epoxidringes, der für die toxikologischen Effekte von DON entscheidend ist, entsteht De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1). DON und seine Metaboliten werden zum Großteil über den Urin (zu 95 % in freier Form) und in geringen Mengen über die Faeces (zu 97 % als DOM-1) ausgeschieden (Dänicke et al., 2004a). Goyarts und Dänicke (2006) analysierten die Bioverfügbarkeit von DON aus natürlich kontaminiertem Weizen beim Schwein. Ihre Untersuchungen ergaben, dass DOM-1 nur in den Exkrementen von Schweinen nachgewiesen werden konnte, die DON-kontaminiertes Futter über einen Zeitraum von sechs Wochen erhielten. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Fütterungsgruppe, die das Toxin über vier Wochen aufnahm, war kein DOM-1 nachweisbar. Die Autoren erwogen, dass die Fähigkeit zur De-epoxydation erworben werden könne und durch die Anwesenheit von Trichothecenen hervorgerufen werde. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass DON nach oraler Aufnahme sehr schnell im proximalen Anteil des Dünndarms resorbiert wird und somit die mikrobielle Entgiftung, die hauptsächlich im Dickdarm erfolgt, nur unwesentlich zur Detoxifizierung von DON beiträgt (Eriksen et al., 2003; Dänicke et al., 2004b).

Erfolgt eine akute Exposition mit dem Mykotoxin, werden beim Schwein verstärkte Salivation, verminderte Futteraufnahme bis hin zur vollständigen Futterverweigerung, zudem Erbrechen und Durchfall hervorgerufen. Von höherer praktischer Relevanz ist jedoch die chronische Exposition. Sie resultiert in veränderten Immunfunktionen mit erhöhter Infektanfälligkeit, Inappetenz und verminderter Gewichtszunahme und führt demzufolge zu hohen ökonomischen Verlusten in der Landwirtschaft (EFSA, 2004; Pestka, 2007; Döll und Dänicke, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass die anorektischen Effekte von DON über eine erhöhte Ausschüttung von Serotonin im Gehirn ausgelöst werden (Prelusky, 1996).

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) stellt die erste Barriere für Nahrungskontaminanten und folglich einen potenziellen Angriffspunkt für Toxine, wie DON, dar. Das Mykotoxin ruft morphologische Veränderungen hervor und stört die Funktion des Darmtraktes. An jejunalen Explantaten von Ferkeln konnten Dosis-abhängige Veränderungen beobachtet werden, die sich durch verkürzte und aneinander liegende Zotten, Lyse von Enterozyten und Ödembildung darstellten (Kolf-Clauw et al., 2009). Bracarense et al. (2011) zeigten bei Schweinen, die DON-kontaminiertes Futter über einen Zeitraum von 35 Tagen erhielten, ebenfalls Veränderungen der intestinalen Architektur in Form von verkürzten jejunalen Zotten. In einem weiteren DON-Fütterungsversuch mit Schweinen konnte eine Zunahme der Kryptentiefe im Jejunum, jedoch keine Veränderungen der Zottenlänge nachgewiesen werden (Dänicke et al., 2012b). Des Weiteren wurde in *in vitro*-Versuchen an humanen Darmepithelzellen (HT-29-D4) gezeigt, dass DON intestinale Transporter, wie z. B. SGLT1 und GLUT5, inhibiert und die Nährstoffaufnahme beeinflusst (Maresca et al., 2002). Gegenstand weiterer Untersuchungen sind die toxischen Effekte von DON auf die Zellintegrität und parazelluläre Permeabilität, die im Kapitel 1.5.3 ausführlicher dargestellt werden.

1.2.5 Wirkung von DON auf zellulärer und molekularer Ebene

Als Hauptwirkmechanismus vieler Trichothecene wird die Hemmung der Proteinsynthese auf zellulärer Ebene diskutiert. Die Bindung des Toxins an die Peptidyltransferase der ribosomalen 60S-Untereinheit in eukaryotischen Zellen bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms und dessen Inaktivierung (Ueno, 1985; Ehrlich und Daigle, 1987). Es kommt zur Inhibition der Translation, die je nach Toxin zu einem anderen Zeitpunkt erfolgt. Nivalenol hemmt die Elongationsphase, wohingegen DON die Initiationsphase der Translation blockiert. Es wird davon ausgegangen, dass insbesondere Gewebe mit gesteigertem Proteinstoffwechsel und hoher Teilungsrate durch Trichothecene beeinträchtigt werden. Schädigende Wirkungen von DON auf stark proliferierende Zellen wurden bisher für porcine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Goyarts et al., 2006a), Splenozyten (Tiemann et al., 2006), Endometriumzellen (Tiemann et al., 2003) und intestinale Epithelzellen (Diesing et al., 2011a) beschrieben.
Trichothecene als Inhibitoren der Translation binden an eukaryotische Ribosomen und führen zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Infolge dessen kommt es zur Initiierung der sogenannten „ribotoxischen Stressantwort“, einer Abfolge von Signaltransduktionswegen (Iordanov et al., 1997; Shifrin und Anderson, 1999). Der MAPK-Signalweg umfasst mehrstufige Signalkaskaden, die regulatorisch auf Zellwachs-

tum, Differenzierung, Apoptose und Inflammation einwirken (Dong et al., 2002; Krens et al., 2006). Über die Aktivierung dieser Signalkaskaden bewirkt DON unter anderem die gesteigerte Expression des entzündungsfördernden Enzyms Cyclooxygenase-2 sowie die gesteigerte Synthese von Zytokinen, z. B. Interleukin-(IL)-1, IL-6 und Tumornekrose-Faktor-(TNF)-α (Moon und Pestka, 2003; Pestka, 2010). Darüber hinaus zeigten Yang et al. (2000) an einem *in vitro*-Modell mit RAW264.7 Makrophagen und U937 Monozyten, dass die Trichothecen-vermittelte Zytotoxizität und Apoptose eng mit der Aktivierung von MAPKs zusammenhängen. An einem *in vitro*-Modell mit humanen Caco-2-Zellen (Zelllinien eines Dickdarm-Karzinoms) konnten Sergent et al. (2006) nachweisen, dass DON die intestinale Zellproliferation hemmt und die MAPKs p38, ERK und JNK aktiviert. Die Autoren schlussfolgerten, dass DON über die Aktivierung von MAPKs entzündliche Prozesse im Darm hervorruft.

1.3 Lipopolysaccharide

Vor über hundert Jahren erzielte der deutsche Bakteriologe und Hygieniker Richard Pfeiffer mit Hitze-inaktivierten *Vibrio cholerae* pathophysiologische Wirkungen an Meerschweinchen (Pfeiffer, 1892). Mit diesen Untersuchungen gelang es ihm, hitzestabile Bestandteile der Bakterien von den hitzelabilen Exotoxinen abzugrenzen. Pfeiffer prägte den Ausdruck des „endotoxischen Prinzips“, da er annahm, das Gift stamme aus dem Inneren der Bakterienzelle und werde nach deren Lyse freigesetzt. Heutzutage werden die Begriffe Endotoxin und Lipopolysaccharid synonym verwendet. Die Bezeichnung Lipopolysaccharid leitet sich von den beiden Hauptkomponenten Lipid und Polysaccharid her, die bei der Untersuchung der toxischen Bestandteile Gram-negativer Bakterien isoliert werden konnten (Shear und Turner, 1943).

1.3.1 Vorkommen und Aufbau von LPS

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran, die durch den periplasmatischen Raum voneinander getrennt sind. Die äußere Membran stellt eine asymmetrische Doppelschicht, mit Phospholipiden im inneren und Lipopolysacchariden im äußeren Anteil, dar. LPS ist essentiell für die Eigenschaften der äußeren Membran als Permeabilitätsbarriere und die Vitalität der Bakterien (Sperandeo et al., 2009). Eine Bakterienzelle umfasst ungefähr $3{,}5 \,\mathrm{x}\, 10^6$ LPS auf einer Fläche von $4{,}9\,\mu\mathrm{m}^2$ (Rietschel et al., 1994). Das LPS Gram-negativer Bakterien, dessen Struktur in Abb. 1.3 schematisch veranschaulicht wird, besteht aus einem hydrophilen Heteropolysaccharid und einem zur inneren Phospholipidschicht zugewandten Lipid-Anteil, dem Lipid A. Bei der Vermehrung oder Lyse der Bakterien kommt es zur Freisetzung dieser toxischen Bestandteile. Für den in der vorliegenden Arbeit erstellten Versuchsaufbau wurde das LPS von *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet. Diese Stäbchen-Bakterien, aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, sind fakultativ anaerob und kommen ubiquitär im Boden, Wasser und in Fäkalien vor. Sie gehören, als Kommensalen, zur physiologischen Darm-

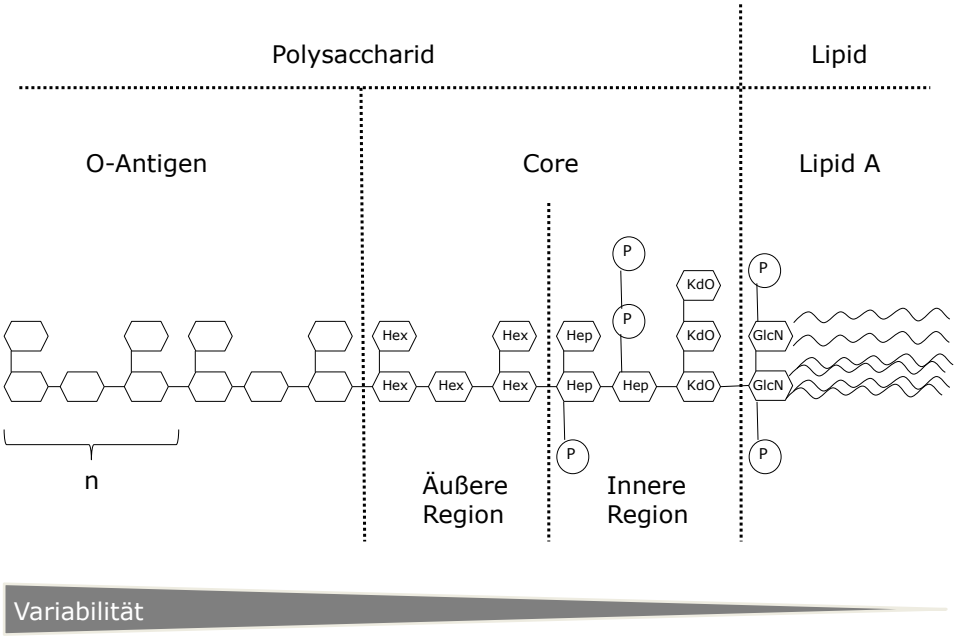


Abbildung 1.3: Schematische Struktur eines enterobakteriellen Lipopolysaccharids. Die Sechsecke stellen Zuckereinheiten dar. Der Lipid A-Teil ist aus einem biphosphorylierten Disaccharid aus Glucosaminen (GlcN) und meist sechs Fettsäuren aufgebaut. Der kovalent an das Lipid A gebundene Polysaccharid-Anteil enthält in der inneren Region des Core 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (Kdo) sowie Heptosen (Hep) und weitere Phosphatgruppen. Die äußere Region des Core besteht vorwiegend aus Hexosen (Hex). Das O-Antigen ist aus **n** sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten aufgebaut. Modifizierte Darstellung nach Alexander und Rietschel (2001).

flora von Menschen, Säugetieren und Vögeln und sind fakultativ pathogen. Bei den *Enterobacteriaceae* kann das Heteropolysaccharid in einen Kernzuckerbereich (Core) und ein O-Antigen unterteilt werden (Rietschel et al., 1994). Die drei LPS-Regionen sind kovalent miteinander verknüpft. Ihre strukturelle Variabilität nimmt vom Lipid A über den Kernzuckerbereich zum O-Antigen zu (Wilkinson, 1996). Das Lipid A ist amphiphil und besitzt einen hydrophoben Anker in der Phospholipidschicht sowie einen hydrophilen Anteil als Bindeglied zum Kernzuckerbereich. Es ist entscheidend für die biologische Aktivität und stellt das endotoxische Zentrum von LPS dar (Galanos et al., 1985). Dem Lipid A schließt sich der Kernzuckerbereich an, der wiederum in eine innere und äußere Region unterteilt werden kann. Ein entscheidender Bestandteil der inneren Region ist die 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (Kdo). Gemeinsam mit dem Lipid A bildet Kdo die minimale LPS-Struktur, die für die Lebensfähigkeit Gram-negativer Bakterien notwendig ist (Helander et al., 1988). Für die serologische Spezifität der Erreger ist das O-Antigen charakteristisch, das aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten besteht. Die Biosynthese von LPS findet in unterschiedlichen Kompartimenten der Bakterienzelle statt und wurde ausführlich von Raetz (1990) dargestellt. Im Anschluss wird das synthetisierte LPS über verschiedene Transportmechanismen zur äußeren Membran transportiert, eingehend beschrieben von Sperandeo et al. (2009).

1.3.2 Systemische Wirkung von LPS

Die Wirkung von LPS im Körper von Säugetieren, unter besonderer Betrachtung von Mensch und Schwein, ist ambivalent. LPS gilt als ein vielversprechendes, immunologisch wirksames Adjuvans, da es in niedrigen Konzentrationen durch Stimulation des Immunsystems eine erhöhte Abwehr gegen Infektionen erzielen und die Entstehung von Malignomen vermindern kann (Rietschel et al., 1994; Schletter et al., 1995).
Im Gegensatz zu den nutzbringenden Effekten ist LPS hauptverantwortlich für die toxischen Manifestationen schwerer Gram-negativer Infektionen und ruft ausgeprägte inflammatorische Reaktionen hervor. Hohe Konzentrationen des Endotoxins in der Blutbahn bewirken pathophysiologische Reaktionen, wie Fieber, Leukozytose oder Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotension, disseminierte intravasale Gerinnung und Multiorganversagen (Schletter et al., 1995). Diese Symptome charakterisieren das Krankheitsbild der schweren Sepsis, das mit einer hohen Letalität einhergeht. Bone definierte 1989 die Sepsis als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.). Einen entscheidenden Risikofaktor für das Ausmaß der Sepsis stellt die Infektionsquelle dar (Brun-Buisson et al., 1996). In mehreren humanen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mortalität bei Patienten mit Bakterieämie durch pulmonale oder gastrointestinale Infektionen signifikant höher war als bei solchen mit Urosepsis und Katheter-assoziierten Bakterieämien (Munford, 2006).

Der Gastrointestinaltrakt, als häufige Infektionsquelle, soll in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden. Durch die Anwesenheit der fakultativ pathogenen Kommensalen steht der Organismus in permanentem Kontakt mit LPS. Täglich gelangen geringe Mengen Gram-negativer Bakterien aus dem Magen-Darm-Trakt in die Blutbahn, was als bakterielle Translokation bezeichnet wird (Roth et al., 1997). Unter physiologischen Bedingungen wird dieser Vorgang durch eine effektive epitheliale Barriere limitiert. Schädigende Einflüsse durch Noxen, Ischämie, Entzündungen und Traumata führen zur Störung der epithelialen Barriere des Magen-Darm-Traktes und demzufolge zu einer gesteigerten bakteriellen Translokation. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit akut entzündlichen Darmerkrankungen oder nach chirurgischen Eingriffen bei Patienten mit *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* gehäuft zur systemischen Endotoxinämie kam (Colin et al., 1979; Palmer et al., 1980; Deitch, 1994). Weitere Ausführungen zum Aufbau und der Bedeutung der epithelialen Barriere folgen in Kapitel 1.5.

1.3.3 Wirkung von LPS auf zellulärer und molekularer Ebene

Durch den Eintritt Gram-negativer Bakterien bzw. die Freisetzung von LPS in die Blutbahn werden humorale und zelluläre Komponenten des Immunsystems aktiviert. Das Komplementsystem, als humorale Komponente, kann sowohl über den klassischen als auch über den alternativen Weg aktiviert werden. Es trägt zur Chemotaxis und verbesserten Opsonierung der Antigene bei. Die Stimulation der zellulären Komponenten, vor allem von Monozyten bzw. Makrophagen, führt zur Produktion von inflammatorischen Mediatoren

und kostimulatorischen Molekülen, die notwendig sind für die erworbene Immunantwort. Insbesondere die Ausschüttung der Fieber-auslösenden Zytokine IL-1β, IL-6 und die Sekretion des TNF-α führen zu komplexen sekundären Reaktionen. Diese umfassen unter anderem die Stimulation der Leber zur gesteigerten Produktion von Akute-Phase-Proteinen, die Aktivierung von Lymphozyten und die verstärkte hämatopoetische Aktivität im Knochenmark (Whetton und Spooncer, 1998; Suffredini et al., 1999). Unter physiologischen Bedingungen führt die kontrollierte Freisetzung der entzündungsfördernden Botenstoffe zur lokalen Begrenzung von Infektionen. Im Gegensatz dazu kann unter pathologischen Bedingungen, wie im Falle einer Endotoxinämie, die dysregulierte Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren schädliche Ausmaße annehmen und zum septischen Schock, multiplen Organversagen und Tod führen (Alexander und Rietschel, 2001). Die LPS-vermittelte Aktivierung der zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems am Beispiel peripherer Makrophagen und die Sekretion inflammatorischer Mediatoren werden in Abb. 1.4 schematisch dargestellt.

Gelangt LPS in die Blutbahn, wird es an das LPS-bindende Protein (LBP) gebunden. LBP ist ein glykosyliertes Plasmaprotein, dessen Konzentration bei Akute-Phase-Reaktionen deutlich ansteigt. Es besitzt eine hohe Affinität zu LPS und führt es dem Glykoprotein *cluster of differentiation* (CD) 14 zu, welches die Lipid A-Komponente des LPS bindet (Tobias et al., 1997). CD14 wird an der Oberfläche von myeloischen Zellen, wie Monozyten bzw. Makrophagen, und Granulozyten exprimiert. Es ist durch einen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker an der Zelloberfläche fixiert und wird als mCD14 (*membrane* CD14) bezeichnet (Wright et al., 1990). Zudem zirkuliert es in freier Form als sCD14 (*soluble* CD14) im Plasma und aktiviert z. B. Endothelzellen, die CD14-negativ sind (Pugin et al., 1993). Da beide CD14-Formen keine zytoplasmatische Domäne aufweisen, ist für die Aktivierung einer Zellantwort das Zusammenwirken mit einem Rezeptorkomplex notwendig. LPS interagiert mit dem Komplex aus Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) und dem akzessorischen *myeloid differentiation protein* 2 (MD-2). Toll-like-Rezeptoren gehören zur Gruppe der *pattern recognition receptors* (PRRs). Sie erkennen Pathogene und Pathogen-assoziierte Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) wie LPS und bewirken die Initiierung der frühen Immunantwort. Je nach Zelle und Stimulierbarkeit durch Pathogene werden unterschiedliche TLRs differenziert. Der TLR4 nimmt bei der Aktivierung mononukleärer Zellen, wie Monozyten bzw. Makrophagen, durch LPS eine zentrale Rolle ein (Poltorak et al., 1998). Nach der Interaktion von LPS mit dem Komplex TLR4*MD-2 kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und Anlagerung von Adapterproteinen an die zytoplasmatische Domäne des TLR4 (Dauphinee und Karsan, 2006). Infolge dessen werden komplexe intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die unter anderem zur Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen. NF-κB transloziert in den Zellkern, um dort die Transkription proinflammatorischer Zytokine zu induzieren (Chen, 2005). Des Weiteren gilt LPS als potenter Aktivator des MAPK-Signalwegs in humanen Monozyten und intestinalen Epithelzellen (Sweet und Hume, 1996; Cario et al., 2000) und greift folglich regulatorisch in Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Inflammation ein (vgl. Kapitel 1.2.5).

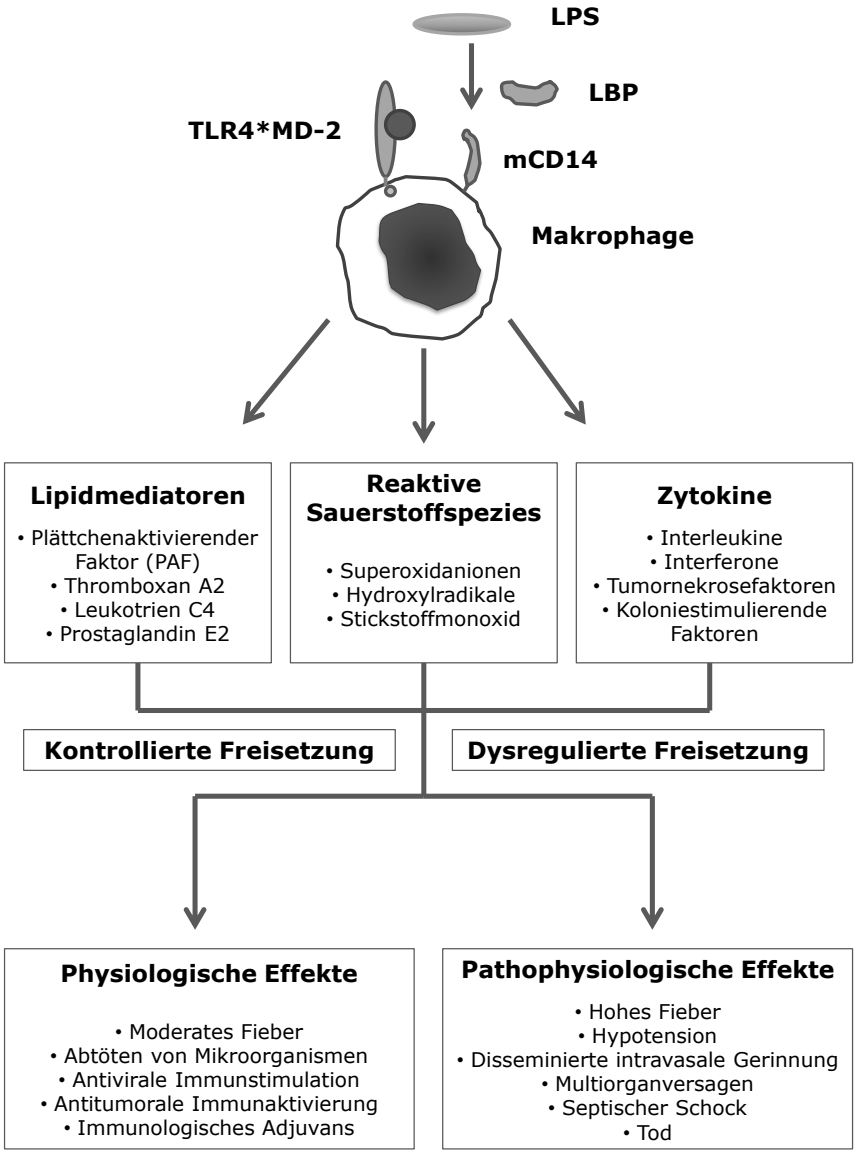


Abbildung 1.4: Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch LPS-vermittelte Stimulation peripherer Makrophagen. LPS wird im Plasma von LBP gebunden und zum mCD14-Protein transferiert, welches durch einen GPI-Anker an der Zelloberfläche von Makrophagen fixiert ist. Zur Initiierung intrazellulärer Signalkaskaden und Produktion inflammatorischer Mediatoren erfolgt die Interaktion mit dem Rezeptorkomplex TLR4*MD-2. Unter pathologischen Voraussetzungen kann eine unkontrollierte Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren zum lebensbedrohlichen Krankheitsbild der schweren Sepsis führen. Modifizierte Abbildung nach Alexander und Rietschel (2001).

1.4 Der Dünndarm des Schweins

Im Dünndarm (*Intestinum tenue*) finden Verdauung und Resorption von Nährstoffen statt. Die enzymatische Aufspaltung der Nahrung erfolgt zum einen im Darmlumen, vor allem durch die Enzyme des exokrinen Pankreas, und zum anderen am Bürstensaum der Enterozyten. Die aufgespalteten Moleküle werden durch die Enterozyten resorbiert und über den

Pfortaderkreislauf zur Leber bzw. im Fall der Lipide über das Lymphsystem zum *Ductus thoracicus* transportiert. Die nicht resorbierbaren Inhaltsstoffe werden durch die Darmperistaltik in den Dickdarm befördert.
Der Dünndarm beginnt jenseits des Magenpförtners und endet an der *Plica ileocaecalis* mit der Einmündung in den Dickdarm. Er besteht von proximal nach distal aus den drei Abschnitten Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Hüftdarm), deren Übergänge fließend sind.

1.4.1 Allgemeiner histologischer Aufbau

Die Darmwand ist in den drei Abschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum grundsätzlich gleich aufgebaut. Sie gliedert sich in folgende fünf Schichten:

- *Tunica mucosa* (Mucosa): Schleimhaut
- *Tela submucosa* (Submucosa): Bindegewebeschicht
- *Tunica muscularis* (Muscularis): Muskelschicht
- *Tela subserosa* (subseröse Schicht): Bindegewebeschicht
- *Tunica serosa* (Serosa): Peritoneum

Die Oberfläche der Schleimhaut wird durch sogenannte Kerckring-Falten (*Plicae circulares*), Krypten und Zotten und durch Mikrovilli erheblich vergrößert, wodurch eine effektivere Nährstoffresorption ermöglicht wird. Die Mucosa wird wiederum in drei Teilschichten untergliedert:

- *Lamina epithelialis mucosae*: einschichtiges hochprismatisches Zylinderepithel
- *Lamina propria mucosae*: Bindegewebeschicht
- *Lamina muscularis mucosae*: Schleimhautmuskelschicht

Die Epithelschicht der Zotte setzt sich aus Enterozyten und Mukus-produzierenden Becherzellen zusammen. Erstere stellen den Hauptanteil dar und besitzen an ihrer apikalen Oberfläche zum Darmlumen einen aus Mikrovilli bestehenden Bürstensaum, welcher zum Schutz vor Verdauungsenzymen und Pathogenen von einer Glykoproteinschicht (Glykokalix) überzogen ist. Im Bürstensaum der Enterozyten sind Verdauungsenzyme, z. B. Disaccharidasen und Peptidasen, und Transportsysteme integriert, die die weitere Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen und deren Resorption ermöglichen. Die Krypte wird von Stammzellen, undifferenzierten sekretorischen Zellen und enteroendokrinen Zellen ausgekleidet. Beim Menschen treten außerdem Paneth-Körnerzellen auf, die beim Schwein bisher nicht sicher nachgewiesen werden konnten (Liebich, 2009). Entsprechend der Zellverteilung werden zwei funktionell verschiedene Kompartimente der Schleimhaut unterschieden. An der Zotte erfolgen die Nährstoffresorption und die Schleimsekretion, wohingegen in der Krypte die Zellerneuerung, endokrine und parakrine Sekretion zur *Lamina propria* und exokrine Sekretion von Makromolekülen, z. B. Lysozym und Defensinen, in das Darmlumen stattfinden

(Le Shen, 2009). Die Epithelschicht des Dünndarms unterliegt einer ständigen Zellerneuerung, die von den Stammzellen der Krypten ausgeht. Die undifferenzierten Epithelzellen wandern entlang der vertikalen Achse von der Krypte bis zur Zottenspitze. Nach Überschreiten des basalen Drittels sind sie strukturell ausdifferenziert, die Verdauungsfunktion beginnt. Ab der Zottenmitte entwickeln sich die resorptiven Eigenschaften, die die volle Ausprägung an der Zottenspitze erreichen (Pond und Mersmann, 2001). Nach einer durchschnittlichen Lebensdauer von 1-3 Tagen werden die Enterozyten an der Zottenspitze in das Darmlumen abgeschilfert. Von der Epithelschicht wird die *Lamina propria* durch eine Basalmembran getrennt. Sie besteht vor allem aus kollagenem und zu einem geringeren Anteil aus elastischem Bindegewebe. Die *Lamina propria* ist reich an Blut- und Lymphgefäßen, Lymphfollikeln und freien Zellen, die der Immunabwehr dienen. Ihr schließt sich die *Lamina muscularis mucosae* an, die sich aus einer dünnen Schicht glatter Muskelzellen zusammensetzt. Sie dient der Eigenmotilität der Schleimhaut und grenzt diese von den darunterliegenden Schichten ab.
Die Submucosa als zweite Schicht der Darmwand besteht aus lockerem Bindegewebe mit kollagenen und elastischen Fasern. In ihr verlaufen größere Blut- und Lymphgefäße und der *Plexus submucosus*. Die Submucosa dient der Versorgung der Schleimhaut.
Die Muscularis zeigt einen zweischichtigen Aufbau mit einer inneren Ring- und einer äußeren Längsmuskelschicht. Dazwischen befindet sich ein schmaler Bindegewebszug, der den *Plexus myentericus* enthält. Die Muscularis sorgt für die Peristaltik des Darms.
Auf die Muskularis folgt eine Bindegewebeschicht, die *Tela subserosa*. Das Darmrohr wird von außen von Peritoneum überzogen.

1.4.2 Unterscheidung der Dünndarmabschnitte

Das Duodenum wird durch die Brunner'schen Drüsen (*Glandulae duodenales*) charakterisiert und kann gut von den beiden Dünndarmabschnitten Jejunum und Ileum abgegrenzt werden. Die *Glandulae duodenales* sind tubuloalveoläre Drüsen, die mukoiden Schleim sezernieren. Ihre Drüsenendstücke liegen in der Submucosa. Von dort ziehen die Drüsengänge zu den Krypten, in denen sie münden. Im Duodenum sind die *Plicae circulares* deutlich ausgeprägt. Die Zotten sind regelmäßig, relativ breit und liegen dicht beieinander. Das Epithel weist vereinzelt Becherzellen auf.
Das Jejunum besitzt schlanke *Plicae circulares* und fingerförmige, schlanke Zotten, die im Vergleich zum Duodenum länger sind und weniger dicht liegen. In der Mucosa (*Lamina propria*) und Submucosa befinden sich einzelne Lymphfollikel und diskrete Ansammlungen mehrerer Follikel, die die *Noduli lymphatici aggregati* bilden. Die sogenannten Peyer-Platten wölben sich kuppelartig in das Darmlumen vor. Die Zahl der Becherzellen nimmt im Vergleich zum Duodenum zu.
Das Ileum ist durch eine deutlich reduzierte Faltenbildung der Schleimhaut (*Plicae circulares*) und eine stärker ausgeprägte Muscularis gekennzeichnet. Die Zotten sind kürzer, weniger dicht und breiter als im Jejunum. In der Mucosa und Submucosa treten vermehrt Peyer-Platten auf, die das histologische Bild dominieren. Im Bereich der Peyer-Platten (Domes) sind keine Zotten und Krypten ausgebildet. Gegenüber den proximalen

Dünndarmabschnitten ist die Anzahl der Becherzellen und intraepithelialen Lymphozyten erhöht. In Abb. 1.5 wird die Unterscheidung der Dünndarmabschnitte noch einmal zusammengefasst.

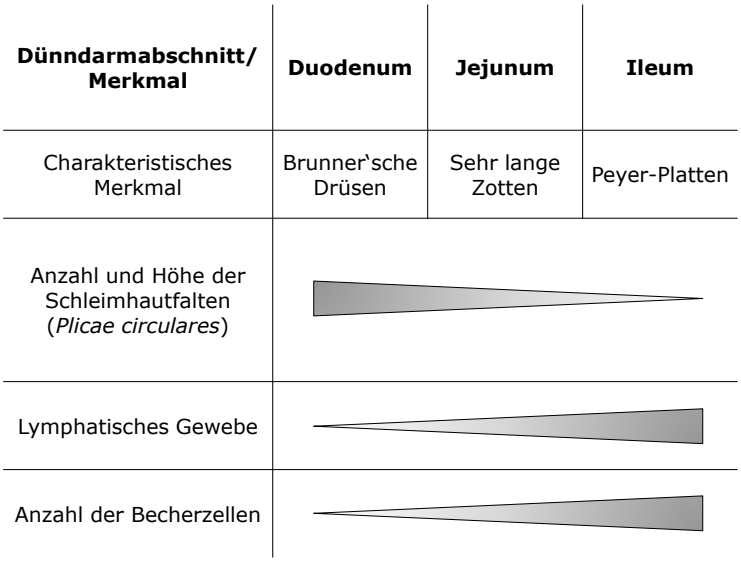


Abbildung 1.5: Unterscheidung der Dünndarmabschnitte beim Schwein.

1.5 Die epitheliale Barriere im Dünndarm

Die primäre Aufgabe der Enterozyten besteht in der Resorption von Ionen und Nährstoffen. Zur Erfüllung dieser Funktion steht die Epithelschicht in permanentem Kontakt mit dem Darmlumen bzw. der Umwelt. Um den Übertritt der in der Nahrung enthaltenden Pathogene aus dem Lumen in tiefer liegende Schichten zu verhindern und dennoch die Resorption zu ermöglichen, ist die Ausbildung einer selektiv permeablen Barriere erforderlich. Die Plasmamembran der Enterozyten weist eine asymmetrische Zusammensetzung aus Proteinen und Lipiden auf, wodurch zwei Domänen differenziert werden können. Die Unterscheidung der apikalen und basolateralen Domäne führt zu einem polaren Aufbau des Enterozyten (Rodriguez-Boulan und Powell, 1992). Die strukturelle und funktionelle Unterteilung wird durch interzelluläre Kontakte, die Tight und Adherens Junctions, die den apikalen Junktionskomplex bilden, ermöglicht. In Abb. 1.6 wird der polare Aufbau einer Epithelzelle dargestellt. Im Folgenden werden die Proteine ZO-1 als TJ- und β-Catenin als AJ-Protein ausführlicher beschrieben.

1.5.1 Zonula occludens

Die *Zonula occludens*, auch Tight Junction genannt, liegt von den Zell-Zell-Kontakten TJ, AJ, Desmosomen und Gap Junctions am weitesten apikal und erfüllt im Allgemeinen zwei wichtige Aufgaben:

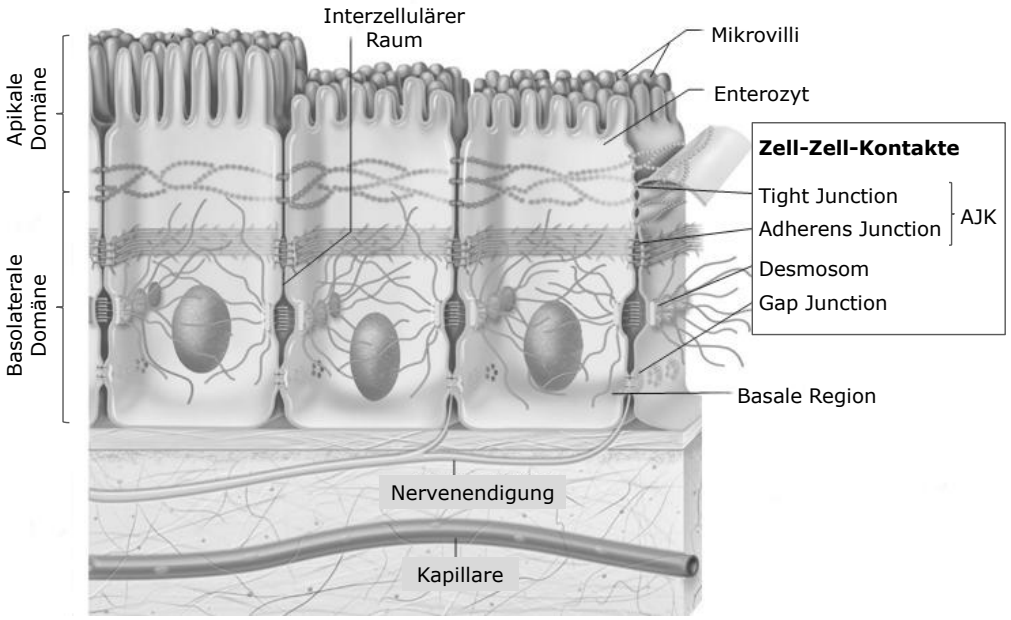


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung polarisierter Enterozyten. Benachbarte Zellen sind durch Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden. Die TJ-Proteine bilden zusammen mit den subapikal gelegenen AJ-Proteinen den apikalen Junktionskomplex. Durch Trennung der apikalen und basolateralen Domäne entsteht eine polarisierte Epithelzellschicht. Die Desmosomen verbinden die Intermediärfilamente benachbarter Zellen. Die Gap Junctions dienen der Zellkommunikation durch den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen. Modifizierte Darstellung nach Antranik (2011).

- Sie führt, wie unter Kapitel 1.5 angesprochen, im Sinne einer Barriere zu einer strukturellen und funktionellen Abgrenzung der apikalen und basolateralen Domäne (*fence function*) und ist entscheidend für den polaren Aufbau von Epithel- bzw. Endothelzellen (Dragsten et al., 1982).
- Sie bildet einen engen Verschlusskontakt zwischen den Plasmamembranen benachbarter Epithel- bzw. Endothelzellen. Dadurch bewirkt sie den Aufbau einer parazellulären Barriere (*barrier function*), die eine notwendige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung von Gradienten und einen gerichteten Stofftransport darstellt (Diamond, 1977).

Die Dichtigkeit der epithelialen Barriere variiert je nach Gewebe von „*tight*“ bis „*leaky*“ um den Faktor 10^5 (Van Itallie und Anderson, 2006). Claude und Goodenough (1973) ordneten die Permeabilität der epithelialen Barriere im Dünndarm als „*intermediate*“ ein. In Zellkulturen wird die TJ-Permeabilität über zwei gängige Größen wiedergegeben: den parazellulären Tracer-Fluss oder den transepithelialen elektrischen Widerstand (*transepithelial electrical resistance*, TEER). Letzterer stellt ein Maß für die TJ-Integrität dar. In einer intakten Epithelschicht korreliert der TEER invers mit dem Fluss von kleinen Tracer-Molekülen durch die parazelluläre Barriere (Mitic und Anderson, 1998).

Die TJ sind aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut, die grob in Transmembran- und Stützproteine eingeteilt werden können. Wichtige Vertreter der Transmembranproteine sind Occludin, *junctional adhesion molecules* (JAMs) und die aus über 20 Proteinen bestehende Claudin-Familie. Zu den Stützproteinen zählen ZO-1, -2 und -3. Die ZO-Proteine gehören zur Familie der sogenannten *membrane-associated gyanulate kinase-like proteins* (MAGUK-Proteine, Anderson et al. 1995; Kim 1995). Diese sind mit der Plasmamembran assoziiert und vermitteln über ihre Domänen strukturelle und funktionelle Verbindungen zu den integralen Membranproteinen, Signalwegen und dem Aktin-Zytoskelett (Fanning et al., 1998).

Zonula occludens 1 ZO-1, mit einer Molekülmasse von 225 kDa, wurde als erstes ZO-Protein identifiziert (Stevenson et al., 1986). Als Gerüstprotein ist es essenziell für die räumliche Anordnung von transmembranären TJ-Proteinen, wie den Claudinen (Simons und Fuller, 1985; Itoh et al., 1999; Krause et al., 2008) und Occludin (Schmidt et al., 2004). Des Weiteren interagiert es homo- bzw. heterotypisch mit ZO-1, -2 oder -3 (Wittchen et al., 1999) und den Aktin-Filamenten als Bestandteil des Zytoskeletts (Fanning et al., 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass ZO-1 mit Transkriptionsfaktoren interagiert. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass ZO-1 an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt ist (Balda, 2003; Bauer et al., 2010). In einem *in vitro*-Versuch an subkonfluenten Epithelzellen wiesen Gottardi et al. (1996) ZO-1 im Zellkern nach. In konfluenten Monolayern konnte durch Schädigung der Zell-Zell-Kontakte ebenfalls eine Akkumulation im Zellkern provoziert werden. Ergänzend zu den *in vitro*-Untersuchungen analysierten die Autoren ZO-1 entlang der vertikalen Achse von Hunde-Darmzotten. TJ-gebundenes ZO-1 konnte von der Krypte bis zur Zottenspitze nachwiesen werden, wohingegen eine nukleäre Akkumulation nur in den Enterozyten der Zottenspitze aufgezeigt werden konnte. Dies ließe sich durch den bevorstehenden Zelltod und den damit verbundenen dynamischen Änderungen der TJ erklären. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Lokalisation von ZO-1 im Zellkern invers mit dem Ausmaß und/oder dem Reifegrad der Zell-Zell-Kontakte zusammenhänge. Neben Epithelzellen wird ZO-1 außerdem in Zellen wie Fibroblasten und kardialen Myozyten exprimiert, die keine TJ ausbilden. In diesem Fall zeigt ZO-1 an den Zellkontakten eine gemeinsame Lokalisation mit den AJ-Proteinen aus der Familie der Cadherine (Itoh et al., 1993).

1.5.2 Zonula adhaerens

Die Zonula adhaerens, auch Adherens Junction genannt, liegt subapikal des TJ-Komplexes und hat folgende Aufgaben:

- Sie bildet einen Adhäsionsgürtel, der die Epithel- bzw. Endothelzellen bandartig umgibt. Über diesen wird die interzelluläre Zelladhäsion vermittelt. Als Bestandteil des AJK trägt die *Zonula adhaerens* zur Zellpolarität bei und ist entscheidend für die Ausbildung und Aufrechterhaltung komplexer Gewebe (Wang und Margolis, 2007).
- Sie aktiviert über assoziierte Proteine Signaltransduktionswege, die regulatorisch auf Zellproliferation und -differenzierung einwirken (Gregorieff und Clevers, 2005).

Die über die AJ vermittelte Zelladhäsion wird im Wesentlichen durch Cadherine, einer Familie membranständiger Glykoproteine, realisiert. Cadherine bilden Ca^{2+}-abhängige homophile trans-Interaktionen, in denen sie identische Cadherin-Moleküle der benachbarten Zelle binden. Anschließend bilden sie entlang der Zellperipherie Reißverschluss-artige Strukturen, die eine feste Zell-Zellverbindung bewirken (Cavallaro und Dejana, 2011). Die Cadherin-Familie besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die in mehr als zehn Untergruppen unterteilt werden (Menger und Vollmar, 1996). Die Benennung der verschiedenen Cadherine orientiert sich an den entsprechenden Geweben, aus denen sie erstmalig isoliert wurden. Am bekanntesten ist das E-Cadherin, welches den klassischen Cadherinen angehört und als wichtigstes interzelluläres Adhäsionsmolekül in Epithelzellen gilt (Takeichi, 1990). Es besitzt fünf Domänen (EC1-EC5) im extrazellulären Bereich mit Bindungsstellen für Ca^{2+} und benachbarte Cadherin-Moleküle, eine Transmembrandomäne zur Verankerung in der Zellmembran und eine zytoplasmatische Domäne, die der Interaktion mit intrazellulären Proteinen dient (Nagar et al., 1996). Über diese Interaktionen werden intrazelluläre Signalwege aktiviert und das Aktin-Zytoskelett moduliert, was eine notwendige Voraussetzung für die Morphogenese des Gewebes darstellt (Cavallaro und Dejana, 2011). An die zytoplasmatische Domäne binden Catenin-Proteine, deren Name sich aus dem Lateinischen *catena*, Kette bedeutend, herleitet. Sie umfassen α-, β- und γ-Catenin, auch Plakoglobin genannt, und δ- bzw. p120-Catenin (Cavallaro und Dejana, 2011). Der Aufbau der *Zonula adhaerens* wird schematisch in Abb. 1.7 dargestellt.

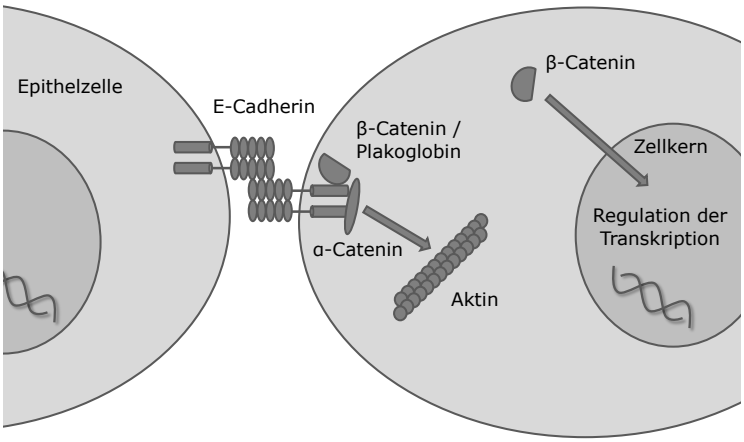


Abbildung 1.7: Der Cadherin-Catenin-Komplex. Schematisch dargestellt sind benachbarte Epithelzellen, die über zwei E-Cadherin-Moleküle in trans-Position miteinander verbunden sind. An die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin binden α- und β-Catenin bzw. Plakoglobin. α-Catenin interagiert mit dem Aktin-Zytoskelett. β-Catenin liegt neben der gebundenen Form als Cadherin-freie Form im Zytosol vor. Nach Translokation in den Zellkern agiert es als Koaktivator des Wnt-Signalweges, welcher die Zellproliferation und -differenzierung reguliert. Modifizierte Darstellung nach Starzinski-Powitz et al. (1999).

β-Catenin Das Protein β-Catenin bindet direkt an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin. Anschließend kann α- an β-Catenin binden und mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren (Herrenknecht et al., 1991). Demzufolge stellt β-Catenin eine Verbindung zwischen dem transmembranären E-Cadherin und dem Zytoskelett her. Neben der Funktion als Verbindungsprotein liegt β-Catenin als Cadherin-freie Form im Zytosol vor und agiert als obligater Koaktivator des Wnt-Signaltransduktionsweges (Daugherty und Gottardi, 2007). Über diesen werden Zellproliferation und -differenzierung reguliert (Gregorieff und Clevers, 2005). Bei Abwesenheit des Wnt-Signals wird das zytosolische β-Catenin durch Phosphorylierung über den *destruction complex* inaktiviert und für die Ubiquitin-abhängige Degradierung markiert. Bei Anwesenheit des Wnt-Signals wird der *destruction complex* destabilisiert und der Abbau von β-Catenin verhindert. Es kommt zur Akkumulation von zytosolischem β-Catenin und zur Translokation in den Zellkern. Dort bindet β-Catenin an Transkriptionsfaktoren und moduliert die Gentranskription (Xu und Kimelman, 2007; Cavallaro und Dejana, 2011). Der Wnt-Signalweg reguliert im Gastrointestinaltrakt das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und -differenzierung. Die Epithelschicht des Dünndarms unterliegt einer steten Zellerneuerung. Diese geht von den Stammzellen der Krypten aus, in denen der Wnt-Signalweg aktiviert ist. Bei Ausbleiben der Wnt-Stimulation differenzieren sich die Enterozyten und wandern entlang der vertikalen Achse von der Krypte bis zur Zottenspitze (Pinto und Clevers, 2005). Dort werden sie im Rahmen der Apoptose in das Darmlumen abgeschilfert (vgl. Kapitel 1.4.1). Fehlregulationen des Signalweges können zur Akkumulation von β-Catenin im Zytosol und Zellkern führen. Infolgedessen wird das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung zu Gunsten der Proliferation verschoben und die Entstehung von Tumorgewebe begünstigt (Morin, 1999; Pinto und Clevers, 2005).

1.5.3 Einfluss von DON und LPS auf die epitheliale Barriere

Die Epithelschicht des Magen-Darm-Traktes steht in permanentem Kontakt mit der Umwelt. Um den Übertritt von Pathogenen und Pathogen-assoziierten Mustern, wie DON und LPS, in tiefer liegende Schichten zu verhindern, bedarf es einer intakten epithelialen Barriere. An einem *in vitro*-Modell mit humanen Caco-2-Zellen konnte eine schädigende Wirkung von DON auf die epitheliale Zellintegrität gezeigt werden (Sergent et al., 2006). In einem weiteren Versuch an Caco-2-Zellen wurde nach Applikation von DON durch Messung des TEER eine erhöhte parazelluläre Permeabilität nachgewiesen (Van de Walle et al., 2010). Die Mykotoxin-Gabe bewirkte in diesem Versuch eine verminderte Expression von Claudin-4, das als TJ-Protein entscheidend zur epithelialen Barriere beiträgt. Diesing et al. (2011a) untersuchten an Schweine-Epithelzelllinien (IPEC-J2) die Wirkung von DON auf die Zellviabilität und -integrität in Abhängigkeit von der Applikationsrichtung. Die Verabreichung von basolateral, als Modell für die systemische Einwirkung, hatte die Störung der Zellintegrität und die verminderte Expression von ZO-1 und Claudin-3 zur Folge, wohingegen die Epithelzellen scheinbar resistent gegenüber der apikalen Gabe erschienen. Pinton et al. (2009) zeigten in einem *ex vivo*-Versuch an Proben des mittleren Jejunums aus porcinen Explantaten, dass die parazelluläre Permeabilität durch die Einwirkung von DON erhöht

wurde. Des Weiteren konnte *in vivo* im Jejunum von heranwachsenden Schweinen eine Reduktion der Claudin-4-Expression durch DON nachgewiesen werden. Die Versuchstiere erhielten über eine Dauer von fünf Wochen ein DON-kontaminiertes Futter (2, 85 mg / kg Futter). Zudem demonstrierten die Autoren in humanen (Caco-2) und porcinen (IPEC-1) Enterozyten eine Abnahme der TJ-Integrität, insbesondere für die Proteine Claudin-3 in Caco-2-Zellen und Claudin-4 in beiden Zelllinien, und damit eine Zunahme der parazellulären Permeabilität nach DON-Applikation. Die Expression der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin war hingegen unverändert. Die Modulation der parazellulären Permeabilität durch DON führte zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Erhöhung der Translokation von *E.coli*-Lipopolysaccharid (Pinton et al., 2009).
Die Schädigung der epithelialen Barriere durch LPS ist bis jetzt nur unzureichend verstanden. Walker und Porvaznik (1978) konnten einen Einfluss durch LPS von *Salmonella typhi* auf Enterozyten des Ileums aufzeigen. Sie injizierten Mäusen 0, 8 mg LPS intraperitoneal und beurteilten das Ileum mit der Freeze-Fracture-Technik. Die Autoren beschrieben im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Diskontinuität des TJ-Komplexes. Moriez et al. (2005) implantierten Ratten einen Katheter in das proximale Colon und injizierten über diesen eine Sepsis-auslösende LPS-Dosis von *E.coli*-Bakterien. Die elektronenmikroskopische Auswertung ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant erhöhten Anteil an geöffneten TJs. In einem *in vitro*-Versuch wurde die intestinale Epithelzelllinie SCBN mit *E.coli*-LPS inkubiert. Die Ergebnisse waren eine erhöhte Apoptose und eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität. Die TJ-Integrität war gestört, was mit einer aberranten perizellulären ZO-1-Färbung einherging. Zudem wiesen die beeinflussten Zellen einen Pool an intrazytoplasmatischem ZO-1 auf (Chin et al., 2006). In einer aktuellen Untersuchung von Kraus et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass die Applikation von *Porphyromonas gingivalis*-LPS in einer verminderten Zellviabilität und erhöhten Proliferation von Primärzellen der humanen Mundschleimhaut resultierte.
Zusammenfassend legt die Literaturrecherche einen Einfluss der beiden Toxine auf die epitheliale Barriere nahe. Die Beurteilung erfolgte zumeist über die Messung der parazellulären Permeabilität oder über die Analyse der TJs, nicht aber der AJs. Ferner wird in der Literatur diskutiert, dass die Kombination von DON und LPS die alleinige Wirkung der Toxine verstärkt. Es wird davon ausgegangen, dass in natürlichen Futtermitteln eine sogenannte „Leitflora“ aus Gram-negativen und -positiven Bakterien und Mykotoxinen vorhanden ist (Kamphues, 1986). Roth et al. (1997) zeigten, dass eine Endotoxin-Exposition die Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien und anderen Giften steigert. An Mäusen konnte belegt werden, dass sich die mittlere letale Dosis bei gleichzeitiger Exposition von LPS und dem Trichothecen T-2 verringert (Tai und Pestka, 1988). Islam und Pestka (2006) injizierten Mäusen LPS intraperitoneal und wiesen eine höhere Empfindlichkeit der Tiere auf die anschließende orale DON-Exposition nach. In weiteren Untersuchungen an Mäusen wurde ebenfalls ein synergistischer Effekt der beiden Toxine beschrieben (Tai und Pestka, 1988; Taylor et al., 1991; Zhou et al., 1999).

1.6 Zielstellung

Gegenstand der Promotion ist es, die Hypothese eines interaktiven Effektes von DON und LPS auf die epitheliale Barriere des Dünndarms zu untersuchen. In der Literatur gibt es zu dieser Fragestellung überwiegend Daten aus *in vitro*-, jedoch nur wenige aus *in vivo*-Versuchen, die zumeist an Nagern durchgeführt wurden. Anspruch der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, die Hypothese des interaktiven Effektes durch *in vivo*-Untersuchungen am Dünndarm zu prüfen. Als Versuchstiere dienen Schweine, da sie die sensibelste und am stärksten betroffene Spezies gegenüber DON darstellen. Für die Beurteilung der epithelialen Barriere sollen die Proteine ZO-1 und β-Catenin, als Bestandteile des apikalen Junktionskomplexes, untersucht werden.

Ziele der vorliegenden Promotion sind:

- die Untersuchung des Verteilungsmusters von ZO-1 und β-Catenin entlang der Dünndarmachse bzw. im intestinalen Epithel,
- die Untersuchung der alleinigen Wirkung von DON bzw. LPS auf die epitheliale Barriere,
- die Untersuchung der DON-Wirkung auf die epitheliale Barriere in Abhängigkeit von der Applikationsrichtung,
- die Untersuchung des interaktiven Effektes von DON und LPS in Abhängigkeit von der Exposition.

2 Material und Methoden

2.1 Ethische Grundlagen

Sämtliche Tierversuche wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt, von der Bezirksregierung Braunschweig, Niedersachsen, genehmigt und entsprechen der Europäischen Richtlinie für Tierversuche (Aktenzeichen 33.14-42502-04-037 / 08).

2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 48 männliche, kastrierte Schweine einer Zweirassenkreuzung (Deutsche Landrasse x Piétrain) mit einer Lebendmasse von 26 ± 4 kg zu Beginn des Versuches. Im Verlauf mussten neun Tiere aus dem Versuch ausscheiden, da sie aufgrund von gesundheitlichen Beeinträchtigungen und Infektionen mit Medikamenten behandelt und folglich für untauglich befunden wurden. Die Tierhaltung, Schlachtung und Gewebeentnahme erfolgten im Institut für Tierernährung des Friedrich-Löffler-Institutes (FLI) in Braunschweig. Die Tiere wurden in Gemeinschaftsbuchten und ab Versuchstag 27 einzeln in an die Tiergröße angepasste Stoffwechselkäfige untergebracht. Wasser wurde *ad libitum* und das entsprechende Futter restriktiv bereitgestellt. Die Tiere erhielten, gemäß der Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE), eine Futtermischung auf der Basis von Weizen, Gerste und Soja (vgl. Anhang A). Für die Versuchsgruppen, die *Fusarium*-kontaminiertes Futter erhielten, wurde der Weizenanteil durch eine mit natürlichem DON kontaminierte Weizencharge ausgetauscht. Diese wurde in das Futter eingemischt, bis 3,1 mg DON / kg Futter enthalten waren.

2.3 Versuchsaufbau

Die 48 Versuchstiere wurden, unter Berücksichtigung einer gleichmäßigen Verteilung der Lebendmasse, in sechs Gruppen eingeteilt:

- KON_KON (n=6)
- KON_DON (n=6)
- KON_DON+LPS (n=7)
- KON_LPS (n=6)
- DON_KON (n=6)

- DON_LPS (n=8)

Die erste Abkürzung kennzeichnet die Fütterungsphase, auch als chronische Phase bezeichnet. Die zweite Abkürzung nimmt Bezug auf die Infusionsphase, die die akute Phase darstellt. In Klammer wird die Anzahl **n** der Tiere einer Gruppe nach Ausscheiden der neun beeinträchtigten Versuchstiere angegeben.
In der ersten, chronischen Phase erhielten die Tiere restriktiv zweimal täglich 500 g entweder eines Kontrollfutters (KON) oder eines *Fusarium*-kontaminierten Futters mit 3,1 mg Deoxynivalenol / kg Futter (DON) über einen Zeitraum von 37 Tagen. Nach 35 Versuchstagen erhielten die Versuchstiere unter sterilen, operativen Bedingungen Venenverweilkatheter beidseits in die *Vena jugularis externa* (Goyarts et al., 2006b). Die Durchführung (vgl. Anhang B) erfolgte in Vollnarkose mittels Infusion. Zunächst wurden die Jugularvenen freipräpariert, die Katheter eingeführt und durch Naht fixiert. Im Anschluss wurde die Haut untertunnelt und die Katheter am Nacken herausgeführt. Ein Katheter diente für die Blutentnahmen und der andere für die Gabe von Infusionen.

Nach einer Genesungszeit von zwei Tagen begann die zweite, akute Phase des Versuches. Die Tiere, die das Kontroll-Futter erhielten, bekamen über die Dauer von einer Stunde entweder 100 µg / kg LM DON (DON), 7.5 µg / kg LM LPS (Escherichia coli O111:B4) (LPS), eine Kombination beider Substanzen (DON+LPS) oder 0,9 % NaCl (KON) infundiert. Die Tiere, die das *Fusarium*-kontaminierte Futter erhielten, bekamen über eine einstündige Infusion 7.5 µg / kg LM LPS (Escherichia coli O111:B4) (LPS) oder 0,9 % NaCl (KON) verabreicht. Die Schlachtung erfolgte 3,25 h nach Beginn der Infusion. Die Infusionslösungen wurden nach Protokoll (vgl. Anhang C) angefertigt. Das Versuchsdesign und die zeitlichen Abläufe sind in Abbildung 2.1 zusammengefasst.

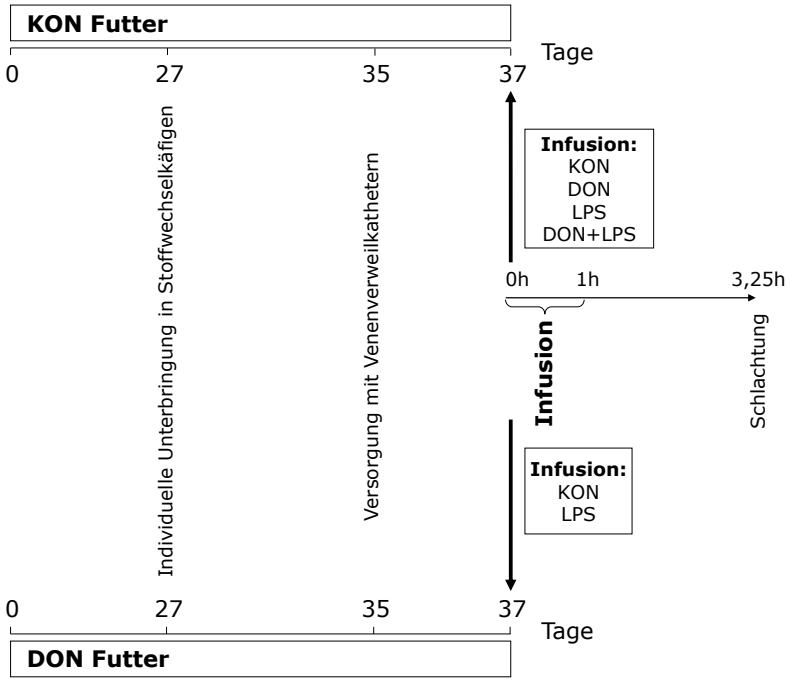


Abbildung 2.1: Versuchsdesign.

2.4 Gewebeentnahme

Unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere erfolgte die Eröffnung des Abdomens, die Entnahme des Darmes und die Trennung von Dünn- und Dickdarm. Die Gewebeproben wurden von fünf unterschiedlichen Dünndarmabschnitten entlang der proximo-distalen Achse entnommen (Abb. 2.2): Duodenum 5 cm distal vom Pylorus, proximales Jejunum 10-20 cm distal von der *Flexura duodenojejunalis*, mittleres Jejunum bei 50 % zwischen proximalem Jejunum und proximalem Ileum, proximales Ileum 5-10 cm distal vom Beginn der *Plica ileocaecalis* und terminales Ileum 5 cm proximal von der Ileocaecal-Klappe. Direkt nach der Entnahme wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren (196°C) und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Gewebeaufbereitung erfolgte im Institut für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

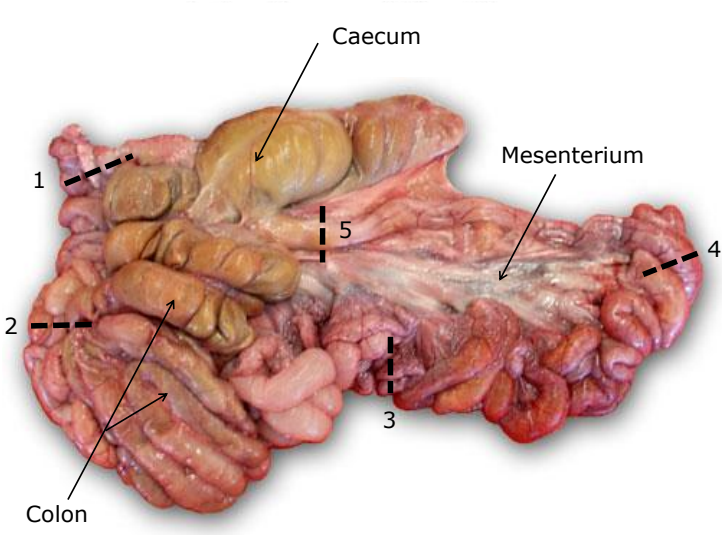


Abbildung 2.2: Entnahmestellen der Gewebeproben, Beispielbild. Dargestellt sind Anteile des porcinen Dünn- und Dickdarmes. Die gestrichelten Linien kennzeichnen ungefähr die Bereiche, aus denen Proben folgender Dünndarmabschnitte entnommen wurden: Duodenum (1), proximales Jejunum (2), mittleres Jejunum (3), proximales Ileum (4), terminales Ileum (5). Modifizierte Darstellung nach Khalil (2008).

2.5 Gewebeaufbereitung

Es wurden 5 µm dicke Kryoschnitte auf einem Leica CM3050S Kryotom (Nußloch) angefertigt. Jeder fünfte Anschnitt wurde für die Immunfluoreszenz auf einen Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgetragen (drei Anschnitte / Objektträger). Die Anschnitte enthalten die Mucosa bis einschließlich der *Lamina muscularis mucosae*. Die Objektträger wurden beschriftet und die Anschnitte mit einem PAP-Pen-Stift umkreist. Anschließend erfolgte die Immunfärbung nach Protokoll (vgl. Anhang D). Die Kryoschnitte wurden zunächst in Methanol-Aceton fixiert und mit 0,3 % Triton permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Schnitte

mit Esel- bzw. Ziegen-Serum blockiert. Die verwendeten primären und die fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper sind in Tabelle 2.1 angegeben. Die Färbung der Zellkerne erfolgte in einer 1:10-Verdünnung mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Im Anschluss wurden die Anschnitte mit Eindeckmedium und Deckglas versehen.

Antikörper	**Spezifikation**	**Verdünnung**	**Hersteller**
Anti-ZO-1	Kaninchen IgG, polyklonal	1:100	Invitrogen
Anti-β-Catenin	Maus IgG_1, monoklonal	1:1500	Abcam
Anti-Kaninchen IgG Alexa 488	Esel IgG, polyklonal	1:200	Invitrogen
Anti-Maus IgG_1 TexasRed	Ziege IgG, polyklonal	1:200	Biozol

Tabelle 2.1: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und β-Catenin.

2.6 Gewebeanalyse

Die Mikroskopie und die Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurden an einem aufrechten Mikroskop (Zeiss AxioImager.Z2), ausgestattet mit einer AxioCam MRm Kamera (12-bit, Zeiss, Deutschland), durchgeführt und mit der Axiovision Software (AxioVs40 Version 4.8.2.0) bzw. ImageJ (National Institute of Health, Version 1.42q) ausgewertet. Die verwendeten Fluoreszenzfilter sind in Tab. 2.2 aufgelistet. Die Fluoreszenzbilder von ZO-1 und β-Catenin wurden in 100- bzw. 400-facher Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von $0,8\,s$ bzw. $1,5\,s$ aufgenommen. Die Auswertung der apikalen und intrazellulären ZO-1-Verteilung erfolgte für alle Gruppen entlang der proximo-distalen Achse des Dünndarms. Die Analyse der intrazellulären Verteilung von β-Catenin wurde für das mittlere Jejunum der Gruppen KON_ KON und KON_ DON durchgeführt. Die Auswahl des mittleren Jejunums der beiden Gruppen erfolgte aufgrund der zuvor ermittelten Ergebnisse der apikalen ZO-1-Verteilung (vgl. Kapitel 3.1).

	Farbstoff	**Anregung in nm**	**Emission in nm**
ZO-1	Alexa 488	450-490	515-565
β-Catenin	TexasRed	522-540	690
Zellkerne	DAPI	359-371	397

Tabelle 2.2: Verwendete Filter für die Fluoreszenzmikroskopie am Zeiss AxioImager.Z2.

2.6.1 Auswertung der apikalen ZO-1-Verteilung

Die ZO-1-Expression der apikalen Domäne, als Indikator für TJ-gebundenes ZO-1, wurde entlang der gesamten Zotte beurteilt. Je Anschnitt wurden zwei Zotten ausgewertet. Die Zotte wurde zu diesem Zweck in fünf Regionen unterteilt (Abb. 2.3). Die Zottenspitze wurde mit Hilfe einer horizontalen Linie, annähernd entlang der Basalmembran der Enterozyten der Zottenspitze verlaufend, definiert. Die Seiten der Zotte wurden in vier etwa gleich große Regionen unterteilt. Alle fünf Regionen wurden mit Hilfe eines Score-Systems,

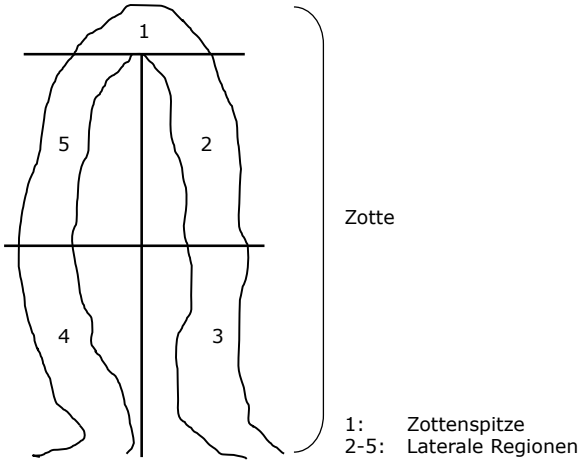


Abbildung 2.3: Skizze einer Dünndarmzotte. Für die Bewertung der ZO-1-Expression wurde die Zotte in fünf Regionen unterteilt.

wie in Tabelle 2.3 zusammengefasst, beurteilt. Zur Veranschaulichung der Auswertung ist ein Beispiel in Abb. 2.4 dargestellt.

Score / Region	**ZO-1-Expression**
1	vollständig vorhanden
2	teilweise vorhanden
3	nicht vorhanden

Tabelle 2.3: Definition des ZO-1-Scores.

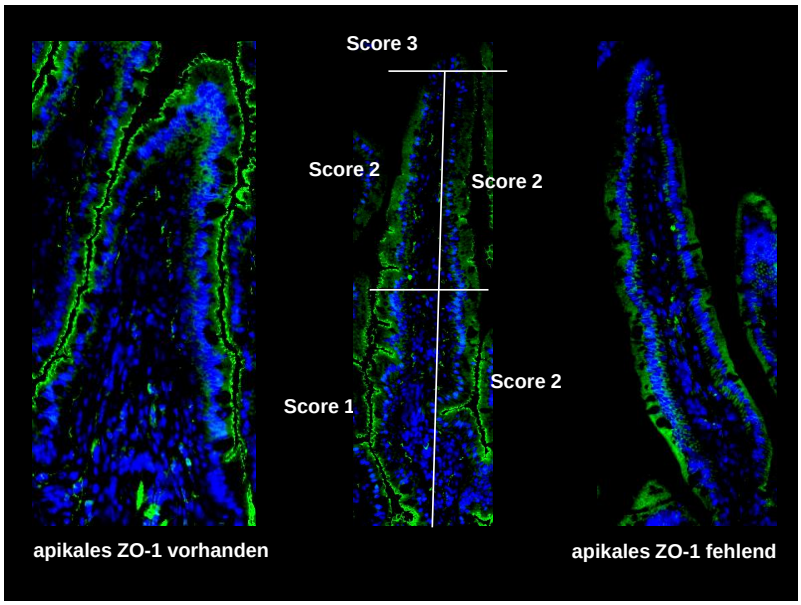


Abbildung 2.4: Ein Beispiel für die Beurteilung der apikalen ZO-1-Expression. Die Zotten wurden in fünf Regionen unterteilt und anschließend mit Hilfe des definierten Score-Systems bewertet. ZO-1 (Alexa 488) ist grün, die Zellkerne (DAPI) sind blau gefärbt. Die Präparate wurden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop betrachtet und in 100-facher Vergrößerung fotografiert.

2.6.2 Auswertung der ZO-1-Verteilung im Epithel

Für die Messung der ZO-1-Expression im Epithel wurden einzelne Enterozyten ausgewählt. Voraussetzung für die Auswahl war die eindeutige Sichtbarkeit der gesamten Zelle von apikal bis basolateral ohne Überlappung mit benachbarten Zellen. Zur Objektivierung der ZO-1-Verteilung wurde mit Hilfe des Programms ImageJ die Fluoreszenzintensität von apikal nach basolateral entlang einer sogenannten *line of interest* (LOI) gemessen. Über den Befehl „Plot Profile“ des Programms wurde eine Grafik mit den ermittelten Fluoreszenzintensitäten erstellt. Die Wertepaare dieser Grafik wurden unter Verwendung von Excel (Microsoft Office Excel 2007 SP3 MSO) in einen XY-Graphen aufgetragen (Abb. 2.5). Die apikalen $\approx 7,7\,\mu m$ der LOI wurden als apikale und der Rest als zytosolische Domäne definiert. Die maximalen Intensitäten der beiden Domänen wurden zueinander ins Verhältnis (Ratio, R) gesetzt ($F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zytosol}$). Bei einem Ratio von $R = 1$ war die ZO-1-Fluoreszenzintensität in beiden Regionen gleich verteilt, während bei $R > 1$ eine Umverteilung nach apikal stattgefunden hat. Zum besseren Verständnis sind die einzelnen Arbeitsschritte im Programm ImageJ anhand eines Beispieles im Anhang E veranschaulicht.

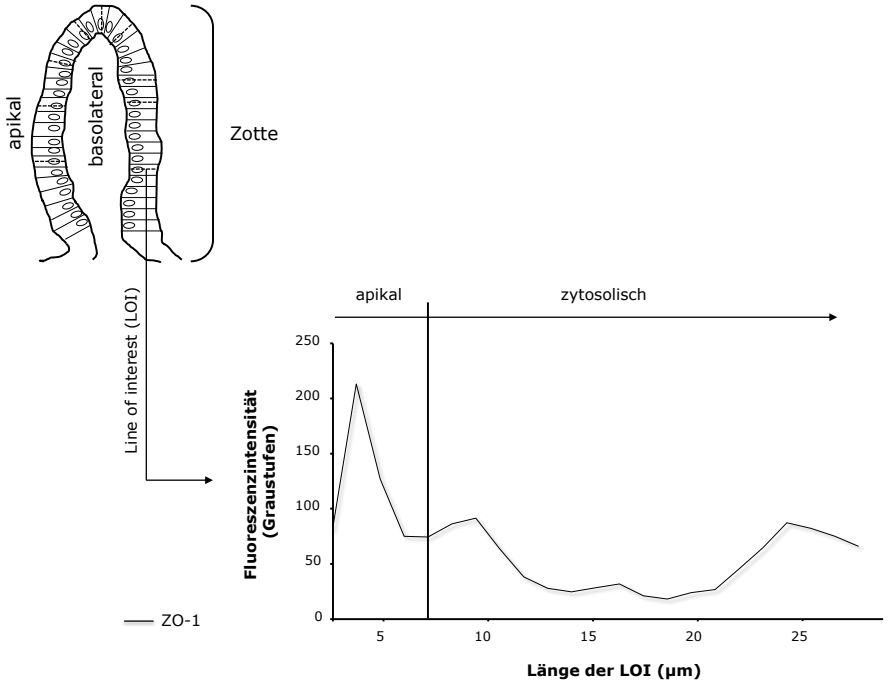


Abbildung 2.5: Analyse des Verteilungsmusters von ZO-1 im intestinalen Epithel anhand eines Beispiels. Die *line of interest* (LOI) wurde durch einzelne Enterozyten von apikal nach basolateral gezogen und die ermittelten Fluoreszenzintensitäten in einen XY-Graphen aufgetragen. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von ZO-1 wurde zwischen der apikalen und zytosolischen Domäne kalkuliert.

2.6.3 Auswertung der β-Catenin-Verteilung im Epithel

Die Fluoreszenzbilder von β-Catenin wurden mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, Version 1.42q) analysiert. Einzelne Enterozyten des mittleren Jejunums

aus den Gruppen KON_KON und KON_DON wurden für die Auswertung ausgewählt. Voraussetzung für die Auswahl war die eindeutige Sichtbarkeit der gesamten Zelle von apikal bis basolateral ohne Überlappung mit benachbarten Zellen. Für die Analyse der Fluoreszenzintensität der Zellkerne (DAPI) und von β-Catenin wurde die LOI von apikal nach basolateral durch die Zelle gezogen. Hierzu musste die Linie sowohl durch das Zytoplasma als auch durch den Zellkern verlaufen. Anschließend wurden mit Hilfe des Programms ImageJ die Intensitäten entlang der LOI ermittelt. Über den Befehl „Plot Profile“ des Programms wurde eine Grafik mit den Fluoreszenzintensitäten erstellt. Die Zahlenwerte dieser Grafik wurden unter Verwendung von Excel (Microsoft Office Excel 2007 SP3 MSO) in einen XY-Graphen aufgetragen (Abb. 2.6). In Bezug auf die DAPI-Fluoreszenzkurve wurden folgende drei Zellareale definiert: apikales Zytoplasma, Zellkern, basolaterales Zytoplasma. Die β-Catenin-Fluoreszenzkurve gibt Aufschluss über die räumliche Verteilung von β-Catenin im Enterozyten. Für eine bessere Objektivierbarkeit wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von β-Catenin aus dem Zellkern und den beiden zytoplasmatischen Arealen kalkuliert (apikales Areal: $F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zellkern}$ bzw. basolaterales Areal: $F_{Ratio} = F_{Basolateral}/F_{Zellkern}$).

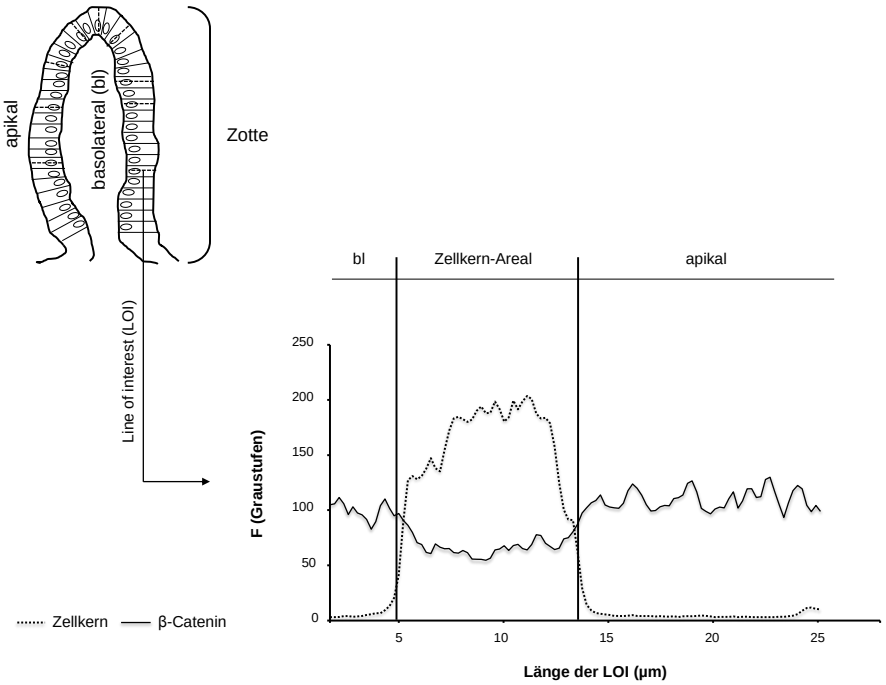


Abbildung 2.6: Analyse der β-Catenin-Verteilung im Epithel des mittleren Jejunums anhand eines Beispiels. Die *line of interest* (LOI) wurde durch einzelne Enterozyten von apikal nach basolateral gezogen und die ermittelten Fluoreszenzintensitäten vom Zellkern (DAPI) und β-Catenin in einen XY-Graphen aufgetragen. Mit Hilfe der DAPI-Kurve wurde das Zellkern-Areal identifiziert und die drei verschiedenen Zellregionen ermittelt: apikales Zytoplasma, Zellkern-Areal, basolaterales Zytoplasma. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von β-Catenin wurde zwischen dem Zellkern und den beiden zytoplasmatischen Arealen kalkuliert.

2.7 Statistik

2.7.1 Apikale ZO-1-Verteilung (Score)

Für die Auswertung der apikalen ZO-1-Scores wurde ein nicht-parametrisches Testverfahren gewählt, da keine natürlichen Zahlenwerte vorlagen und keine tatsächliche Normalverteilung erzielt werden konnte. Es wurden ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test und ein Dunn's Post Hoc-Test (GraphPad Prism Version 3.00 für Windows) durchgeführt. Je Tier gab es für jeden Darmabschnitt 30 Messwiederholungen, die sich wie folgt zusammensetzten: je Darmabschnitt drei Anschnitte, je Anschnitt zwei Zotten, je Zotte fünf Regionen ($3 \times 2 \times 5 = 30$). Alle Daten wurden in Form von Boxplots zur Veranschaulichung des Minimal- und Maximalwertes, Medians, unteren und oberen Quartils dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden durch verschiedene Buchstaben angezeigt ($P < 0{,}001$).

2.7.2 ZO-1-Verteilung im Epithel

Die statistische Auswertung der Fluoreszenzverteilung von ZO-1 erfolgte mit dem Programm SAS (Version 9.0, SAS Institute, USA). Die Daten wurden mit der Prozedur „Mixed" mit „Versuchsgruppe", „Darmabschnitt" und ihrer Interaktion als feste Faktoren berechnet. Für jedes Tier wurden pro Darmabschnitt 15 Messungen erhoben und durch den Befehl „Repeated" in der statistischen Verarbeitung berücksichtigt. Die Messwiederholungen setzten sich wie folgt zusammen: je Darmabschnitt drei Anschnitte, je Anschnitt eine Zotte, je Zotte fünf Zellen ($3 \times 1 \times 5 = 15$). Zur Kalkulierung der Unterschiede zwischen den festen Faktoren (Methode der kleinsten Quadrate) wurde der *adjusted* Tukey-Kramer Post Hoc-Test durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben und signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen durch verschiedene Buchstaben angezeigt ($P < 0{,}05$).

2.7.3 β-Catenin-Verteilung im Epithel

Die Daten wurden mit Hilfe eines nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test (GraphPad Prism Version 3.00 für Windows) ausgewertet. Die Werte für das mittlere Jejunum wurden zwischen den Gruppen KON_KON und KON_DON, und den Verhältnissen (apikal vs. basolateral) in jeder Versuchsgruppe berechnet. Je Tier gab es 27 Messwiederholungen, die sich wie folgt zusammensetzten: drei Anschnitte des mittleren Jejunums, je Anschnitt eine Zotte, je Zotte neun Enterozyten ($3 \times 1 \times 9 = 27$). Alle Daten wurden in Form von Boxplots zur Veranschaulichung des Minimal- und Maximalwertes, Medians, unteren und oberen Quartils abgebildet und signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den errechneten Verhältnissen durch verschiedene Buchstaben angezeigt ($P < 0{,}05$).

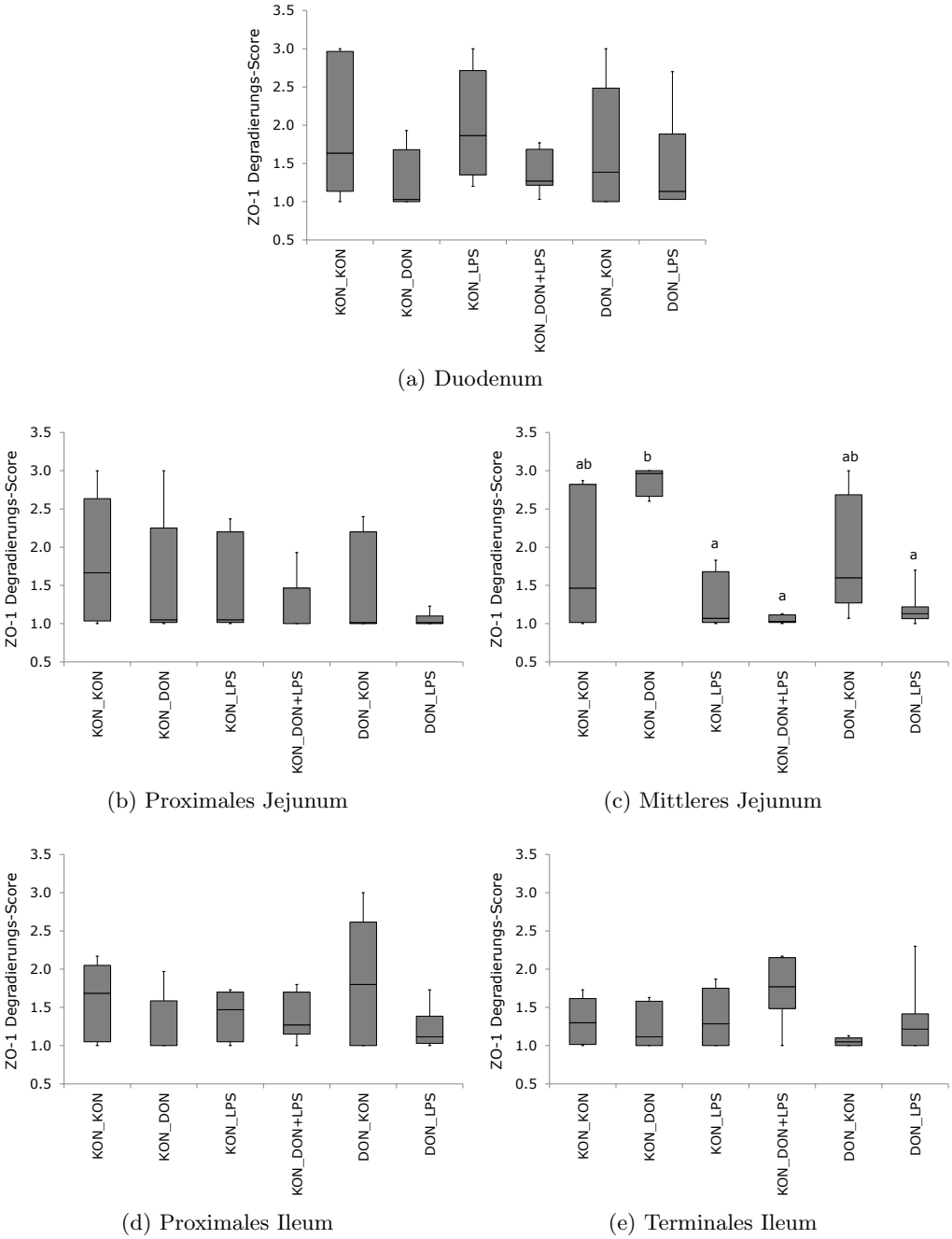
3 Ergebnisse

3.1 Die Wirkung von DON und LPS auf die apikale Expression von ZO-1

Die apikale Expression von ZO-1, als Indikator für TJ-gebundenes ZO-1, wurde entsprechend des zuvor festgelegten Score-Systems analysiert. Im mittleren Jejunum der Gruppe KON_DON zeigte sich im Vergleich zu den LPS-behandelten Tieren (KON_LPS, KON_DON+LPS, DON_LPS) eine geringere Ausprägung der apikalen ZO-1-Struktur ($P < 0{,}001$). In den Gruppen KON_KON und DON_KON des mittleren Jejunums zeichnete sich ebenfalls eine verminderte Expression ab, die jedoch nicht statistisch signifikant war. In den übrigen Darmabschnitten und Versuchsgruppen konnten keine Veränderungen der ZO-1-Struktur nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots in Abb. 3.1 zusammengefasst.

3.2 Die Wirkung von DON und LPS auf die ZO-1-Verteilung im Epithel

In der qualitativen Betrachtung der Epifluoreszenzbilder, dargestellt in Abb. 3.2 bis Abb. 3.6, wies ZO-1 in der Kontrollgruppe (KON_KON) sowohl ein apikales als auch ein zytosolisches ZO-1-Signal in den drei oberen Darmabschnitten Duodenum, proximales und mittleres Jejunum auf. In den beiden Ileum-Abschnitten hingegen zeigte ZO-1 lediglich eine apikale Expression. Des Weiteren konnte eine starke Beeinflussung durch LPS verzeichnet werden. In allen Tieren, die LPS systemisch über Infusion erhielten (KON_LPS, KON_DON+LPS, DON_LPS), war der zytosolische ZO-1-Anteil in den oberen drei Darmabschnitten stark vermindert. In den Ileum-Abschnitten hingegen war keine qualitative Änderung ersichtlich. Die alleinige Gabe von DON (DON_KON, KON_DON) führte in keinem Darmabschnitt zu einer Änderung der ZO-1-Verteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON).



(a) Duodenum

(b) Proximales Jejunum

(c) Mittleres Jejunum

(d) Proximales Ileum

(e) Terminales Ileum

Abbildung 3.1: Ausprägung der apikalen ZO-1-Struktur im Dünndarmepithel, Vergleich der Versuchsgruppen je Darmabschnitt. Das Vorhandensein der apikalen ZO-1-Expression wurde entlang der Zottenachse in fünf Dünndarmabschnitten analysiert. Die Beurteilung erfolgte anhand eines definierten Score-Systems (1: ZO-1-Expression vollständig vorhanden, 2: teilweise vorhanden, 3: nicht vorhanden, vgl. Tabelle 2.3 auf Seite 26). Zur statistischen Auswertung wurden ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis und ein Dunn‘s Post Hoc-Test durchgeführt. Die Daten sind in Form von Boxplots zur Veranschaulichung des Minimal- und Maximalwertes, Medians, unteren und oberen Quartils abgebildet. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen werden durch verschiedene Buchstaben angezeigt ($P < 0,001$).

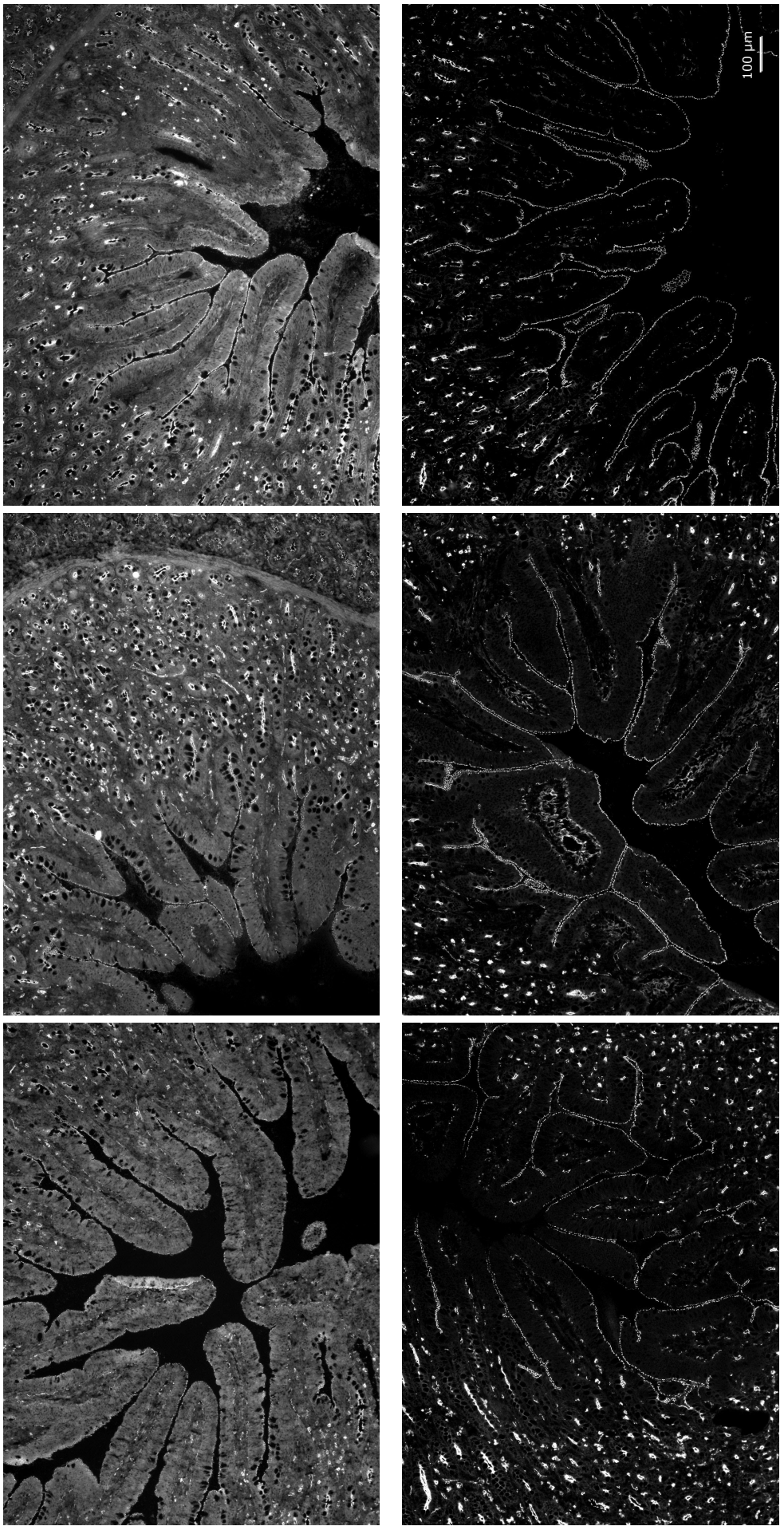


Abbildung 3.2: Räumliche Verteilung von ZO-1 im Duodenum, Epifluoreszenzbild. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wiesen sowohl ein apikales als auch ein zytosolisches ZO-1-Signal auf. Die alleinige Gabe von DON, intravenös oder oral, bewirkte keine Änderung des Signals. Die Gabe von LPS, allein oder in Kombination mit DON, führte zu einer Umverteilung von ZO-1. Es konnte lediglich ein apikales ZO-1-Signal verzeichnet werden.

Abbildung 3.3: Räumliche Verteilung von ZO-1 im proximalen Jejunum, Epifluoreszenzbild. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wiesen sowohl ein apikales als auch ein zytosolisches ZO-1-Signal auf. Die alleinige Gabe von DON, intravenös oder oral, bewirkte keine Änderung des Signals. Die Gabe von LPS, allein oder in Kombination mit DON, führte zu einer Umverteilung von ZO-1. Es konnte lediglich ein apikales ZO-1-Signal verzeichnet werden.

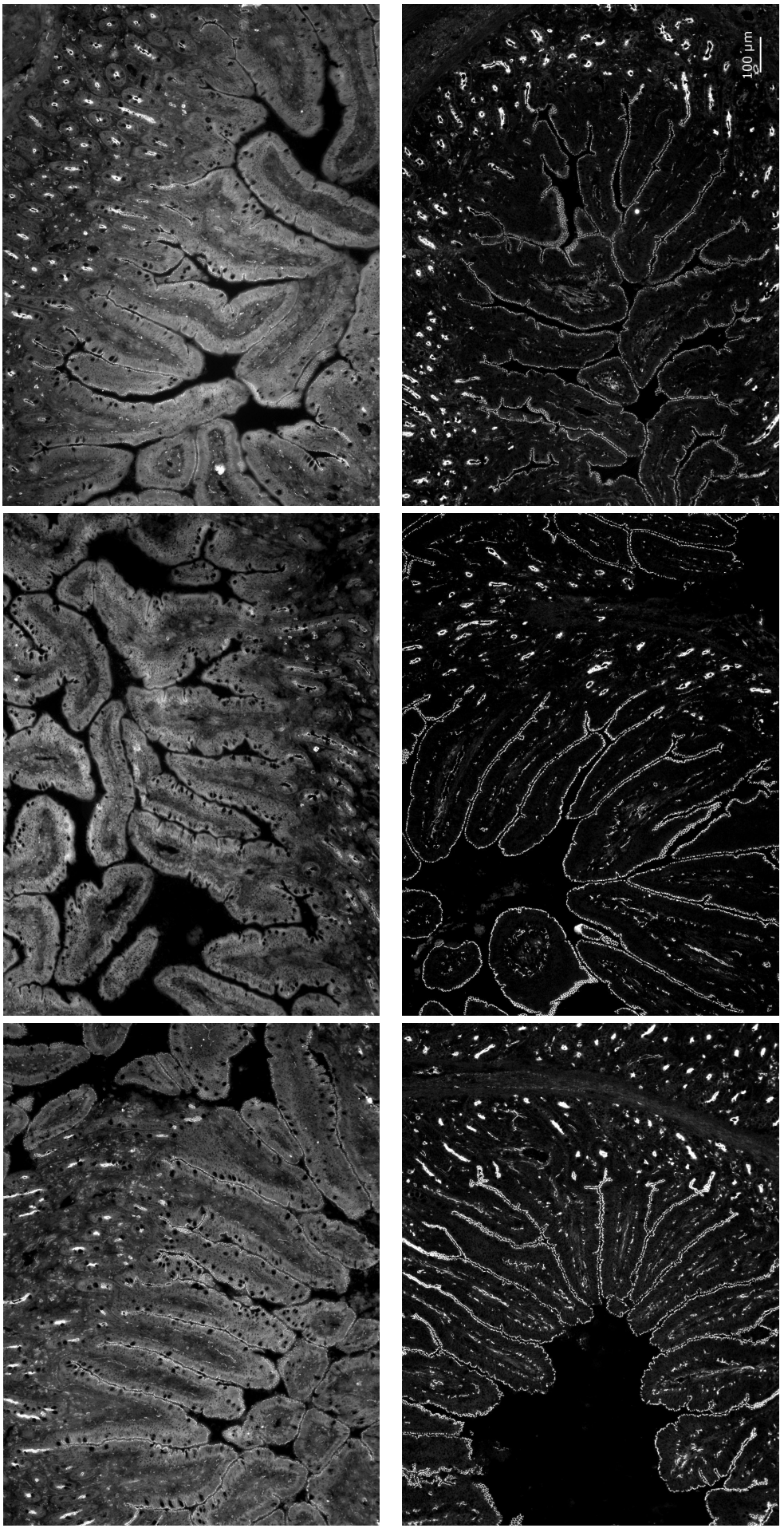
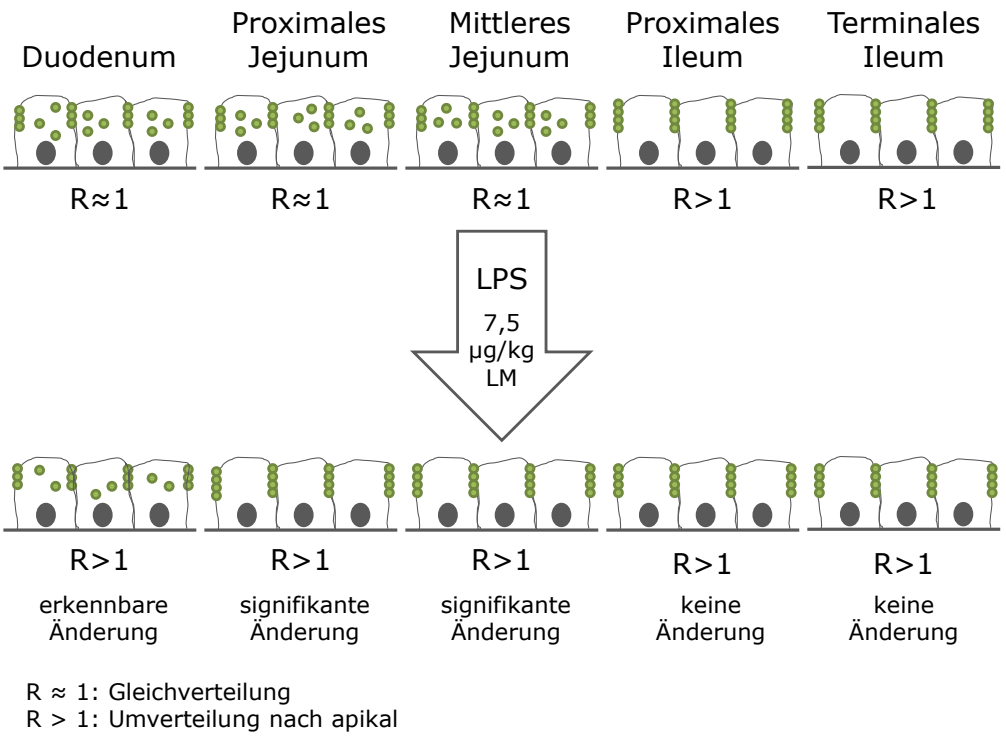


Abbildung 3.4: Räumliche Verteilung von ZO-1 im mittleren Jejunum, Epifluoreszenzbild. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wiesen sowohl ein apikales als auch ein zytosolisches ZO-1-Signal auf. Die alleinige Gabe von DON, intravenös oder oral, bewirkte keine Änderung des Signals. Die Gabe von LPS, allein oder in Kombination mit DON, führte zu einer Umverteilung von ZO-1. Es konnte lediglich ein apikales ZO-1-Signal verzeichnet werden.

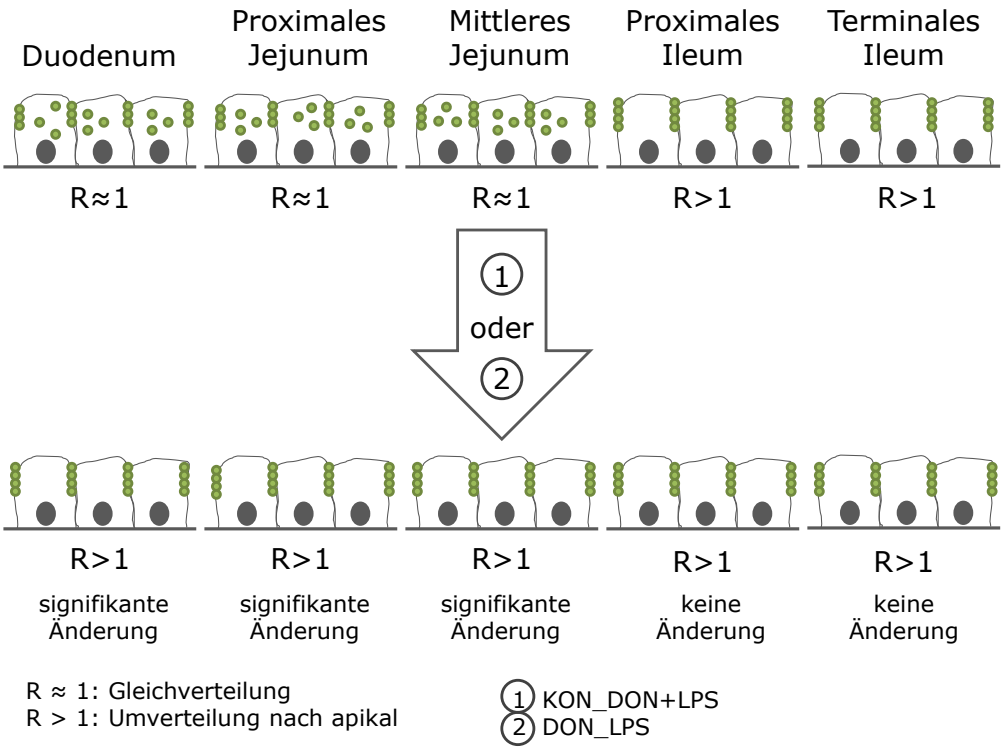
Abbildung 3.5: Räumliche Verteilung von ZO-1 im proximalen Ileum, Epifluoreszenzbild. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wiesen ein apikales ZO-1-Signal auf. Die Applikation von DON, LPS oder einer Kombination beider Toxine bewirkte keine qualitative Veränderung der ZO-1-Verteilung.

Abbildung 3.6: Räumliche Verteilung von ZO-1 im terminalen Ileum, Epifluoreszenzbild. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wiesen ein apikales ZO-1-Signal auf. Die Applikation von DON, LPS oder einer Kombination beider Toxine bewirkte keine qualitative Veränderung der ZO-1-Verteilung.

Zur Objektivierung der ZO-1-Verteilung im Epithel wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der apikalen und der zytosolischen Domäne zueinander ins Verhältnis (Ratio) gesetzt ($F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zytosol}$). In der quantitativen Auswertung konnte die zuvor qualitativ beschriebene Verteilung von ZO-1 in der Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom Darmabschnitt bestätigt werden. Des Weiteren ergaben die Messungen einen starken Einfluss durch LPS. Im Duodenum kam es in den Gruppen mit kombinierter Toxingabe (KON_DON+LPS, DON_LPS) zu einer signifikanten Umverteilung von ZO-1 nach apikal im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON) und den DON-Gruppen (KON_DON, DON_KON). Die alleinige Gabe von LPS (KON_LPS) zeigte in diesem Darmabschnitt keinen statistischen Unterschied zur Kontrolle. In den beiden Jejunum-Abschnitten bewirkte die systemische Gabe von LPS (KON_LPS, KON_DON+LPS, DON_LPS), wie zuvor qualitativ beschrieben, eine signifikante Umverteilung von ZO-1 nach apikal. Im proximalen Ileum war keine Änderung zu verzeichnen. Im terminalen Ileum zeigten die Versuchsgruppen mit alleiniger DON-Gabe (KON_DON, DON_KON) im Vergleich zu denen mit kombinierter Toxingabe (KON_DON+LPS, DON_LPS) eine signifikant stärkere Anreicherung von ZO-1 in der apikalen Domäne. Die alleinige Exposition mit LPS (KON_LPS) führte zu keiner Änderung der ZO-1-Verteilung im Vergleich zur Kontrolle. Die Wirkung von LPS, allein oder in Kombination mit DON, ist in den Abb. 3.7 schematisch veranschaulicht. Die Gabe von DON (KON_DON, DON_KON) bewirkte in keinem Darmabschnitt eine Änderung der ZO-1-Verteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind unter Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung in Abb. 3.8 dargestellt.

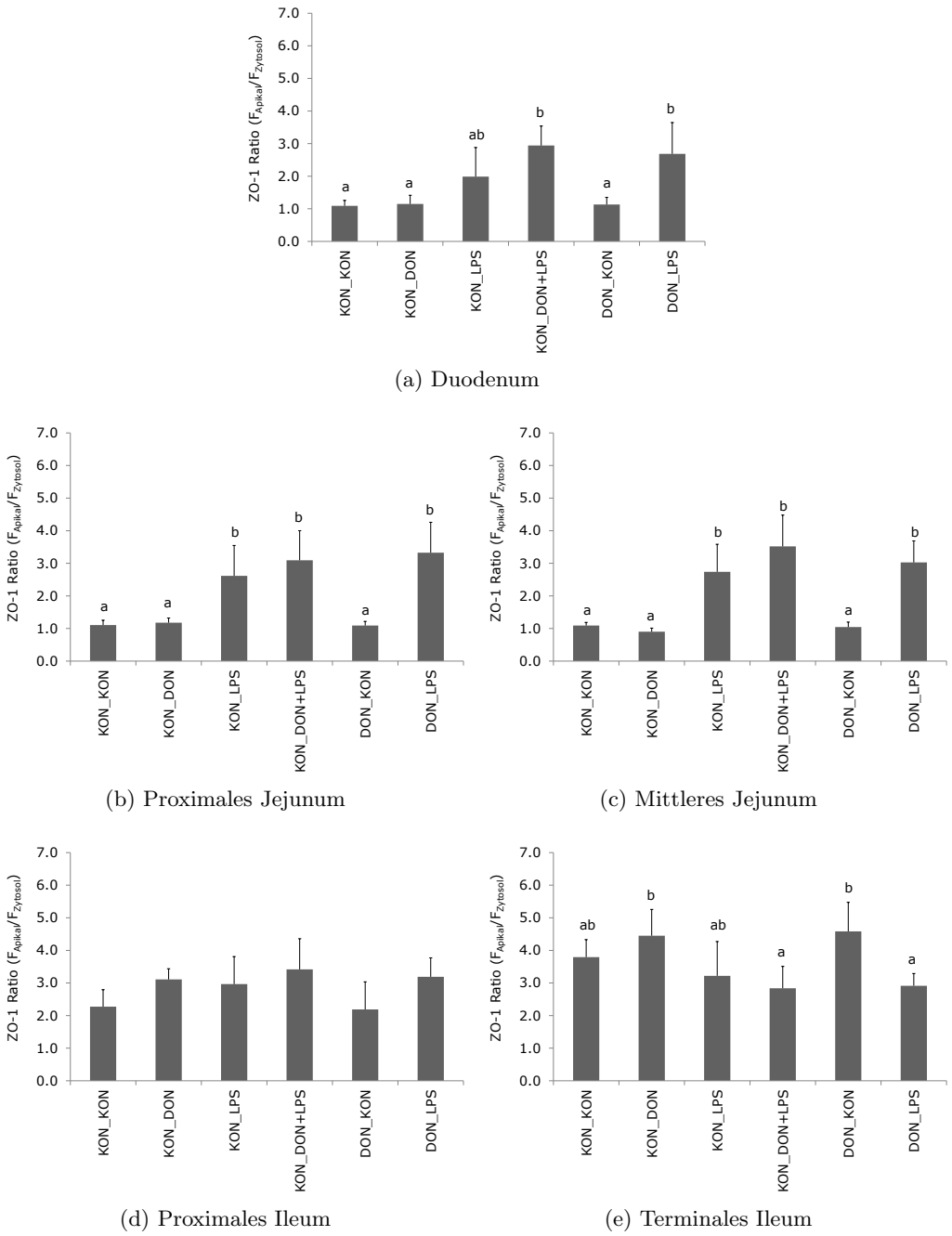


(a) LPS



(b) LPS und DON

Abbildung 3.7: Schema zur Toxin-Wirkung auf die ZO-1-Verteilung im intestinalen Epithel. Die ZO-1-Fluoreszenzintensitäten der apikalen und der zytosolischen Region wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt ($F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zytosol}$). Das TJ-Protein ist grün dargestellt. Die obere Zellreihe entspricht der Kontrollgruppe, die untere im Panel (a) der KON_LPS-Gruppe, im Panel (b) der Gruppen nach kombinierter Toxin-Exposition (KON_DON+LPS, DON_LPS).



(a) Duodenum

(b) Proximales Jejunum

(c) Mittleres Jejunum

(d) Proximales Ileum

(e) Terminales Ileum

Abbildung 3.8: Räumliche Verteilung von ZO-1 im Dünndarmepithel, Vergleich der Versuchsgruppen je Darmabschnitt. Zur Bestimmung der ZO-1-Verteilung im Epithel wurde die Fluoreszenzintensität in einzelnen Enterozyten von apikal nach basolateral gemessen. Die ermittelten Intensitäten wurden zueinander ins Verhältnis (Ratio) gesetzt ($F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zytosol}$). Bei $R = 1$ ist die ZO-1-Fluoreszenzintensität in beiden Regionen gleich verteilt, bei $R > 1$ hat eine Umverteilung nach apikal stattgefunden. Die Daten wurden mit der Prozedur „Mixed“ (Programm SAS) mit „Versuchsgruppe“, „Darmabschnitt“ und ihrer Interaktion als feste Faktoren berechnet. Zur Kalkulierung der Unterschiede zwischen den festen Faktoren wurde der *adjusted* Tukey-Kramer Post Hoc-Test durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben und signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen durch verschiedene Buchstaben angezeigt ($P < 0{,}05$).

3.3 Die Wirkung von DON auf die β-Catenin-Verteilung im Epithel

Für die Auswertung von β-Catenin, als Adherens Junction Protein, wurden einzelne Enterozyten des mittleren Jejunums aus den Gruppen KON_KON und KON_DON ausgewählt und durch Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (Abb. 3.9). Ausgangspunkt für die

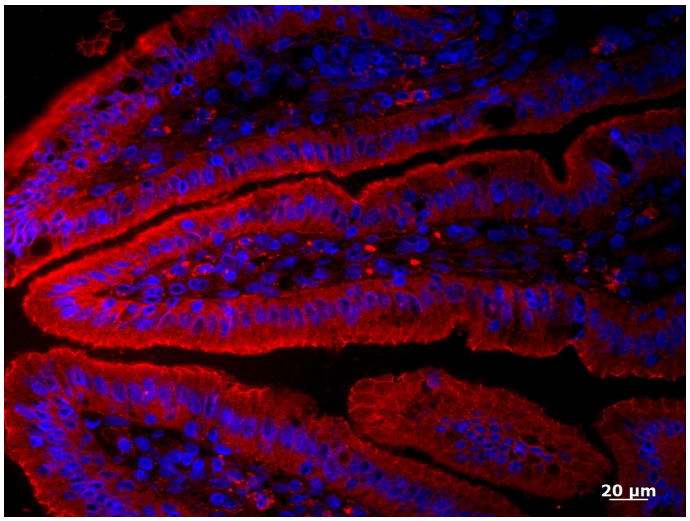


Abbildung 3.9: Ein Beispiel für die β-Catenin-Expression in einer jejunalen Zotte, repräsentativ für alle analysierten Proben. Die Beurteilung der β-Catenin-Verteilung im Epithel erfolgte für das mittlere Jejunum der Gruppen KON_KON und KON_DON. β-Catenin (TexasRed) ist rot, die Zellkerne (DAPI) sind blau gefärbt. Die Präparate wurden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop betrachtet und in 400-facher Vergrößerung fotografiert.

Auswahl dieses Darmabschnittes waren die zuvor erfolgten Auswertungen der apikalen ZO-1-Expression (vgl. Kapitel 3.1). Diese ergaben eine geringere Ausprägung ($P < 0{,}001$) der apikalen ZO-1-Struktur im mittleren Jejunum der Gruppe KON_DON im Vergleich zu den LPS-behandelten Tieren (KON_LPS, KON_LPS+DON, DON_LPS). Ziel war es deshalb, das mittlere Jejunum auf eine mögliche Änderung der β-Catenin-Expression nach intravenöser DON-Applikation (KON_DON) im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON) zu untersuchen. Für die Auswertung der β-Catenin-Expression wurde jeder Enterozyt in drei Regionen unterteilt. Die zytosolischen Regionen befanden sich apikal und basolateral vom Zellkern, die dritte Region bildete der Zellkern selbst. Für eine bessere Objektivierbarkeit wurde jeweils das Verhältnis (Ratio) zwischen den Fluoreszenzintensitäten von β-Catenin der zytolischen Region und dem Zellkern kalkuliert (apikale: $F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zellkern}$ bzw. basolaterale Region: $F_{Ratio} = F_{Basolateral}/F_{Zellkern}$). Die Auswertungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- (KON_KON) und der Experimentalgruppe (KON_DON). Allerdings konnte in der Kontrollgruppe (KON_KON) eine signifikant höhere Anreicherung ($P < 0{,}05$) von β-Catenin im basolateralen im Vergleich zum apikalen Bereich nachgewiesen werden. Dahingegen zeigten die Ratios in der Gruppe KON_DON keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots in Abb. 3.10 zusammengefasst.

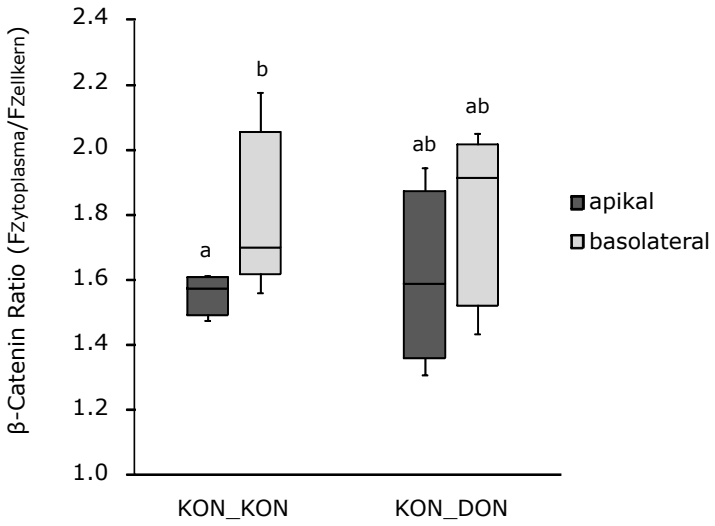


Abbildung 3.10: Räumliche Verteilung von β-Catenin im Epithel des mittleren Jejunums der Gruppen KON_KON und KON_DON. Zur Bestimmung der β-Catenin-Verteilung wurde die Fluoreszenzintensität in einzelnen Enterozyten von apikal nach basolateral gemessen. Es wurde das Verhältnis der Intensitäten von β-Catenin aus dem Zellkern und den beiden zytoplasmatischen Arealen kalkuliert (apikales Areal: $F_{Ratio} = F_{Apikal}/F_{Zellkern}$ bzw. basolaterales Areal: $F_{Ratio} = F_{Basolateral}/F_{Zellkern}$). Zur statistischen Auswertung wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Daten sind in Form von Boxplots zur Veranschaulichung des Minimal- und Maximalwertes, Medians, unteren und oberen Quartils abgebildet. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den errechneten Verhältnissen werden durch verschiedene Buchstaben angezeigt ($P < 0{,}05$).

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Der Gastrointestinaltrakt bietet eine große Angriffsfläche für Erreger und Toxine. Eine essenzielle Funktion des intestinalen Epithels besteht in der Ausbildung einer selektiv permeablen Barriere. Diese soll die Absorption von Nährstoffen ermöglichen und dennoch den Organismus vor dem Übertritt toxischer Substanzen, wie DON und LPS, schützen. Eine notwendige Voraussetzung für die Erfüllung dieser Anforderungen stellt der polare Aufbau der Enterozyten dar. Dieser wird durch den AJK, der aus Tight und Adherens Junction-Proteinen aufgebaut ist, gewährleistet. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Hypothese eines interaktiven Effektes von DON und LPS auf die epitheliale Barriere des Dünndarms durch *in vivo*-Untersuchungen zu prüfen. Für deren Durchführung dienten Schweine als Versuchstiere, da sie unter den Nutz- und Versuchstieren als empfindlichste Spezies gegenüber DON gelten (Prelusky et al., 1994). Zudem sind sie im anatomischen Aufbau ihres GIT und in ihrer Physiologie dem Menschen sehr ähnlich. Aus den genannten Gründen werden Schweine als ein geeignetes Modell angesehen (Tumbleson und Schook, 1996). Tierversuche sind in der Öffentlichkeit hinsichtlich ihrer ethischen Vertretbarkeit stark umstritten. Dennoch leisten sie einen wesentlichen Beitrag zum Erkenntnisgewinn, da „(...) die Komplexität eines Organismus, also das Zusammenwirken von Organen und Geweben, (...) nicht vollständig durch künstliche Systeme ersetzt werden“ kann (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2004). Unter künstlichen Systemen werden insbesondere *in vitro*-Untersuchungen an Zelllinien verstanden, die eine Annäherung an die *in vivo*-Situation darstellen. Am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät Magdeburg wurde im Rahmen einer abgeschlossenen Dissertation der Einfluss von DON auf die epitheliale Barriere durch *in vitro*-Untersuchungen erforscht (Diesing, 2012). Grundlage bildeten zwei intestinale porcine Epithelzelllinien (IPECs), die aus dem Dünndarm von neugeborenen Ferkeln gewonnen wurden. Die Zellen der Linie IPEC-J2 wurden ausschließlich aus dem Jejunum, die der IPEC-1 weiter distal aus Jejunum und Ileum entnommen. Komplementär sollten in der vorliegenden Arbeit *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt werden. Im Dünndarm findet der Hauptanteil der Verdauung und der Resorption von Nährstoffen statt. Die Permeabilität der epithelialen Barriere ist in diesem Darmabschnitt größer als im Dickdarm (Krug, 2009), in dem im Wesentlichen die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten erfolgt. Es wird davon ausgegangen, dass DON nach oraler Aufnahme sehr schnell im proximalen Anteil des Dünndarms resorbiert wird (Dänicke et al., 2004b) und folglich der Dünndarm die Eintrittspforte für das Mykotoxin darstellt.

4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

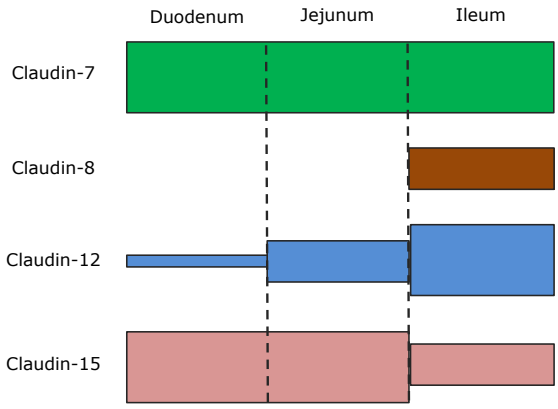
Zur Beurteilung der epithelialen Barriere wurden das TJ-Protein ZO-1 und das AJ-Protein β-Catenin untersucht. Zunächst sollte die apikale ZO-1-Expression, als Indikator für TJ-gebundenes ZO-1, analysiert werden. Die intravenöse Gabe von DON (KON_DON), im Sinne einer akuten Exposition von basolateral, bewirkte im mittleren Jejunum eine deutliche Änderung der apikalen ZO-1-Struktur im Vergleich zu den LPS-behandelten Tieren. Hinsichtlich dieser verminderten Expression sollte das mittlere Jejunum ergänzend auf eine mögliche Änderung der β-Catenin-Expression nach intravenöser DON-Applikation (KON_DON) untersucht werden. Die Auswertungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll-(KON_KON) und der Experimentalgruppe (KON_DON). Allerdings konnte in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Anreicherung von β-Catenin im basolateralen im Vergleich zum apikalen zytosolischen Bereich nachgewiesen werden.
In der qualitativen Betrachtung der Immunfluoreszenzbilder fiel auf, dass das Verteilungsmuster von ZO-1 entlang der proximo-distalen Achse erheblich variierte. In der Kontrollgruppe (KON_KON) wiesen die Darmabschnitte Duodenum, proximales und mittleres Jejunum ein apikales und ein zytosolisches ZO-1-Signal auf, wohingegen in den beiden Ileum-Abschnitten nur ein apikales Signal zu sehen war. Die LPS-Exposition bewirkte in den drei oberen Abschnitten eine Umverteilung von ZO-1 nach apikal, in den Ileum-Abschnitten konnte keine qualitative Veränderung der ZO-1-Verteilung festgestellt werden. DON allein (DON_KON, KON_DON) bewirkte in keinem Darmabschnitt eine Änderung der ZO-1-Verteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON). Zur Objektivierung der deskriptiven Ergebnisse wurde die ZO-1-Verteilung im Epithel durch Messungen der Fluoreszenzintensitäten und durch die relativen Fluoreszenzintensitäten quantifiziert. Die zuvor für die Kontrollgruppe (KON_KON) qualitativ beschriebene Verteilung von ZO-1 in Abhängigkeit vom Darmabschnitt konnte quantitativ belegt werden. Des Weiteren konnte in den drei oberen Darmabschnitten, mit Ausnahme der Gruppe KON_LPS im Duodenum, die Umverteilung von ZO-1 durch LPS bestätigt werden. Wie zuvor qualitativ beschrieben, war in den beiden Ileum-Abschnitten nach LPS-Exposition keine Änderung zu verzeichnen. Die alleinige Gabe von DON (DON_KON, KON_DON) führte in keinem Darmabschnitt zu einer Änderung der ZO-1-Verteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON).

4.3 ZO-1 weist ein differenziertes Verteilungsmuster auf

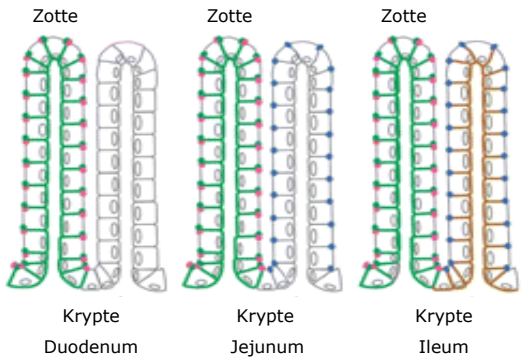
Bei der Betrachtung der Epifluoreszenzbilder, die für die Auswertung der apikalen ZO-1-Expression angefertigt wurden, fiel eine abweichende ZO-1-Verteilung zwischen den Darmabschnitten bzw. Versuchsgruppen auf. Diese Beobachtung gab Anlass für die quantitative Auswertung der ZO-1-Verteilung in den Enterozyten entlang der proximo-distalen Achse des porcinen Dünndarms. Zu diesem Zweck wurden die apikale und zytosolische Fluoreszenzintensität von ZO-1 ins Verhältnis gesetzt. Die Untersuchungen ergaben für die Kontrollgruppe (KON_KON) ein deutliches Verteilungsmuster entlang der proximo-distalen

Achse. Die Darmabschnitte Duodenum, proximales und mittleres Jejunum wiesen eine Gleichverteilung ($R \approx 1$) von ZO-1 zwischen der apikalen und zytosolischen Region auf, wohingegen in den beiden Ileum-Abschnitten das apikale ZO-1 ($R > 1$) überwog. Nach dem jetzigen Kenntnisstand liegen keine weiteren *in vivo*-Daten zur ZO-1-Verteilung entlang der proximo-distalen Achse des porcinen Dünndarms vor.

Rahner et al. (2001) untersuchten die Verteilung der Proteine Claudin-2 bis -5 im GIT von Ratten. Claudine gehören zu den transmembranären TJ-Proteinen und werden als „Rückgrat" der TJ bezeichnet. Sie tragen wesentlich zu den Barriere-Eigenschaften, insbesondere der Größen- und Ladungsselektivität, bei (Fujita et al., 2006; Van Itallie und Anderson, 2006). Die Analyse von Rahner et al. (2001) ergab für die einzelnen Dünndarmabschnitte ein ähnliches Verteilungsmuster der Claudin-Proteine. Jedoch konnten zusätzlich Unterschiede entlang der Krypten-Zotten-Achse aufgezeigt werden. Dieses Ergebnis sei vereinbar mit den Unterschieden im parazellulären Transport, die von Binder (1998) entlang der vertikalen Achse beschrieben wurden. Des Weiteren wiesen die Autoren eine laterale, von den TJ entfernte, Lokalisation der Claudine nach. Sie zogen einen Protein-Pool in Betracht. Aus diesem könnten über einen physiologischen Stimulus Proteine zu den TJ rekrutiert und eine schnelle Änderung der parazellulären Transporteigenschaften gewährleistet werden. Möglicherweise besäßen Claudin-Proteine neben der Barrierefunktion weitere Aufgaben, die nicht mit den TJ assoziiert seien. In einem weiteren Versuch an Mäusen studierten Fujita et al. (2006) ebenfalls die Verteilung von Claudin-Proteinen entlang des Darms. Die Auswertungen der Immunfluoreszenz und des Western Blots ergaben ein distinktes Verteilungsmuster, welches in Abb. 4.1 veranschaulicht ist. Die Forschungsgruppe um Fujita konnte ebenfalls eine laterale und basale Lokalisation der TJ-Proteine (Claudin-7, -8, -12,



(a) Expression der Claudine



(b) Schematische Verteilung der Claudine

Abbildung 4.1: Verteilung von Claudinen im Dünndarm von Mäusen. Vier Proteine aus der Claudin-Familie (Claudin-7, -8, -12, -15) zeigen ein differenziertes Verteilungsmuster entlang des murinen Dünndarms. Modifizierte Abbildung nach Fujita et al. (2006). **(a)** Relative Expressionslevel der Claudine im Duodenum, Jejunum und Ileum, ermittelt durch Western Blot-Analysen und dargestellt durch die Höhe der Balken. **(b)** Schematische Verteilung der Claudine. Die Farben stimmen mit den TJ-Proteinen aus Panel (a) überein. Die Punkte und Linien entsprechen den Lokalisationen der Claudin-Proteine an den TJ und der basolateralen Membran.

-15) in den Epithelzellen nachweisen. Genau wie Rahner et al. (2001) gingen die Autoren von einem extrajunktionalen Speicher der TJ-Proteine aus. In einer aktuellen Studie führten Markov et al. (2010) einen direkten Vergleich zwischen der segmentalen Expression von Claudin-Proteinen und den Barriere-Eigenschaften des intestinalen Epithels durch. Als Versuchstiere dienten Ratten, deren Dünndarm in die Abschnitte Duodenum, proximales Jejunum und Ileum unterteilt wurde. Die Untersuchungen ergaben, dass das TJ-Protein Occludin apikal am Haftkomplex lokalisiert war, wohingegen die Claudin-Proteine neben der apikalen zusätzlich eine subjunktionale Lokalisation aufwiesen. Es konnte sowohl eine Segment-spezifische als auch eine differenzierte Expression der Claudine entlang der vertikalen Achse aufgezeigt werden. Die Autoren teilten die TJ-Proteine in zwei Gruppen ein: dichte (*„tightening“*) und Permeabilitäts-vermittelnde Claudine. Die Abschnitte Jejunum und Ileum waren vorrangig durch die Expression von Permeabilitäts-vermittelnden, das Duodenum durch *„tightening“* Claudine gekennzeichnet. Dieser Unterschied könne durch den häufigen Kontakt des Duodenums mit saurem Mageninhalt erklärt werden (Markov et al., 2010).

Es wird deutlich, dass sich die Analysen der TJ-Expression entlang der proximo-distalen Achse des Darmes auf Versuche an Nagetieren konzentrieren. Im Mittelpunkt dieser Studien stehen zumeist Proteine aus der Claudin-Familie, deren Expression in den unterschiedlichen Spezies variiert. Insgesamt fehlen Daten zum Verteilungsmuster von ZO-1, das als Gerüstprotein für die Anordnung unter anderem von Claudin-Proteinen (Simons und Fuller, 1985; Itoh et al., 1999; Krause et al., 2008) essenziell ist. Kullik et al. (2013) untersuchten im Rahmen der vorliegenden Studie die fraktionelle Syntheserate der Proteine (FSR, % Proteinsynthese / Tag) im intestinalen Epithel. Die Syntheseraten wurden mit Hilfe der Stabilisotopen-Analytik ermittelt und ergaben für die Kontrollgruppe entlang der Dünndarmachse unterschiedliche Werte: im Duodenum und Jejunum betrug die FSR ungefähr 70 %, wohingegen die FSR im Ileum bei ca. 50 % lag. Davon ausgehend, dass der Proteintransfer von ZO-1 vom Zytosol (Golgi-Apparat) zum TJ-Komplex konstant stattfindet und die ZO-1-Synthese in ihrer Ausprägung mit der Synthese der übrigen zellulären Proteine übereinstimmt, kann angenommen werden, dass in den drei oberen Abschnitten des Dünndarms mehr ZO-1 synthetisiert wird. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass der Proteintransfer von ZO-1 entlang der proximo-distalen Achse des Dünndarms variiert. Durch einen schnelleren Transfer im Ileum würde neu synthetisiertes ZO-1 sogleich in den TJ-Komplex integriert werden. Beide Überlegungsansätze könnten einen extrajunktionalen Speicher in den drei oberen Abschnitten bzw. einen Mangel an zytosolischem ZO-1 im Ileum erklären.

4.4 Die Wirkung von DON auf die epitheliale Barriere des Dünndarms

4.4.1 Die Wirkung von DON auf die apikale ZO-1-Expression ist abhängig von der Applikationsroute

In der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren DON oral oder intravenös verabreicht. Dementsprechend erreichte das Toxin in Abhängigkeit von der Applikationsroute die intestinale Epithelschicht von apikal über das Darmlumen bzw. von basolateral über den Blutstrom. Die orale Applikation erfolgte mit 3, 1 mg natürlichem DON / kg Futter. Dies entspricht einer Konzentration, die die von der EU (2006) festgelegten Richtwerte für DON in Futtermitteln um mehr als das Dreifache überschreitet (vgl. Tab. 1.1). Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 37 Tagen mit DON gefüttert, was die chronische Exposition darstellen sollte. Die akut toxische Exposition wurde durch eine einstündige Infusion mit 100 µg DON / kg LM nachgestellt. Die Tiere wurden 3,25 h nach Beginn der Infusion geschlachtet. In der klinischen Untersuchung, durchgeführt von Kullik et al. (2013), zeigten die DON-infundierten Versuchstiere Emesis als typisches Symptom. Beide Expositionsformen können unter natürlichen Bedingungen bei Hausschweinen auftreten, wobei die chronische Exposition von größerer praktischer Relevanz ist. Sie führt bei Tieren zu Inappetenz mit verminderter Gewichtszunahme. In einer Fütterungsstudie untersuchten Dänicke et al. (2012b) die freiwillige Futteraufnahme von Schweinen. Die Tiere bekamen *ad libitum* ein *Fusarium*-kontaminiertes (≈ 3 mg DON/ kg Futter) und ein *Fusarium*-freies Futter über einen Zeitraum von zehn Wochen angeboten. Die Schweine zeigten mit fortschreitender Versuchsdauer ein vermeidendes Verhalten gegenüber dem Toxin-haltigen Futter. Die freiwillige Aufnahme des kontaminierten Futters sank von 20 % in den ersten fünf Wochen auf 7 % in den folgenden fünf Wochen. Um in dem vorliegenden Versuchsaufbau sicherzustellen, dass alle Versuchstiere die gleiche Futtermenge in kurzer Zeit verzehrten, wurde das Futter restriktiv verabreicht, so dass die Problematik der Inappetenz ausgeschaltet werden konnte.

Das TJ-assoziierte ZO-1 wurde entsprechend des zuvor definierten Score-Systems analysiert. In der Kontrollgruppe konnten keine Unterschiede entlang der proximo-distalen Achse des Dünndarms aufgezeigt werden. Die chronische Exposition durch das DON-haltige Futter (DON_KON) bewirkte keine Änderung der apikalen ZO-1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. In einem zuvor durchgeführten *in vivo*-Versuch analysierten Dänicke et al. (2012b) die ZO-1-Expression im Jejunum und Ileum von Schweinen. Die Versuchstiere erhielten über eine Dauer von zehn Wochen eine vergleichbare Mykotoxin-Konzentration (≈ 3 mg DON/ kg Futter). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten die Autoren keinen Effekt nach chronischer DON-Exposition nachweisen. Die Analyse der apikalen ZO-1-Expression ergab keinen Unterschied zwischen den beiden Dünndarmabschnitten der Experimental- und denen der Kontrollgruppe. Nach dem jetzigen Kenntnisstand liegen keine weiteren *in vivo*-Daten zur Wirkung von DON auf die porcine ZO-1-Expression im Dünndarm vor.

Bracarense et al. (2011) studierten in einem *in vivo*-Versuch die Wirkung von DON auf die Expression von Occludin im porcinen Ileum. Als Versuchstiere dienten fünf Wochen alte Ferkel, die über einen Zeitraum von 35 Tagen eine Mykotoxin-Konzentration von 3,0 mg gereinigtem DON / kg Futter erhielten. Die Western Blot-Analysen ergaben für das Ileum eine signifikante Reduktion der Occludin-Expression. Des Weiteren quantifizierten die Autoren in dieser Studie die Expression von Genen, die proinflammatorische Zytokine kodieren. Sie wiesen im Ileum erhöhte Werte für TNF-α und IL-1β nach. Die Autoren nahmen an, dass die erhöhte Zytokin-Expression nach DON-Applikation zur Schädigung der TJ beitrug. Bracarense et al. (2011) zogen in ihrer Argumentation *in vitro*-Studien an Caco-2-Zellen heran, in denen ein Zusammenhang zwischen klinisch relevanten Konzentrationen von TNF-α und IL-1β und einer erhöhten TJ-Permeabilität beschrieben wurden (Ye et al., 2006; Al-Sadi et al., 2008).
Für die bessere Vergleichbarkeit von *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen sei angemerkt, dass 0,3 mg DON/ kg Futter circa einer Konzentration von 300 ng/mL bzw. 1 µM entsprechen (Kolf-Clauw et al., 2009; Pinton et al., 2009; Diesing, 2012). Die genaue Vergleichbarkeit der *in vivo*- und *in vitro*-Versuche gestaltet sich dennoch schwierig. Bei den *in vivo*-Experimenten wird, wie in dem vorliegenden Versuchsaufbau, zumeist ein natürliches, mit DON kontaminiertes Material eingesetzt, wohingegen in den *in vitro*-Experimenten vorrangig gereinigtes DON verwendet wird. Es muss berücksichtigt werden, dass natürlich kontaminiertes Getreide neben DON meist weitere Fusarientoxine und ihre Metaboliten enthält. Zudem korreliert die *in vivo* absorbierte DON-Menge nicht zwingend mit jener, die von den Zellen der Zellkulturen aufgenommen wird (Pinton et al., 2010).
In einem *ex vivo*-Versuch an porcinen Explantaten aus Proben des mittleren Jejunums zeigten Pinton et al. (2009), dass DON die intestinale Barriere beeinflusst. Die Exposition mit dem Mykotoxin (20 µM, 50 µM) bewirkte eine Zunahme der parazellulären Permeabilität. Des Weiteren führten die Autoren zu dieser Fragestellung einen *in vivo*-Versuch an heranwachsenden Schweinen durch. Die Versuchstiere erhielten über eine Dauer von fünf Wochen ein DON-kontaminiertes Futter (2,85 mg / kg Futter). Die Western Blot-Analysen des Jejunums ergaben eine Reduktion der Claudin-4-Expression. In einem *in vitro*-Versuch an humanen (Caco-2) und porcinen (IPEC-1) Enterozyten demonstrierten Pinton et al. (2009) eine Abnahme des TEER, wodurch eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität und folglich eine Schädigung der TJ angezeigt wurde. Die Reduktion des TEER war in beiden Zelllinien Zeit- und Dosis-abhängig und ging nicht mit einem erhöhten Zelltod einher. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte nach 48-stündiger DON-Einwirkung (30 µM) eine verminderte Expression für die Proteine Claudin-3 in Caco-2-Zellen und Claudin-4 in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Trotz der hohen DON-Konzentrationen war die immunhistochemische Färbung der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 unverändert. Pinton et al. (2009) schlussfolgerten, dass das alleinige Vorhandensein von ZO-1 und Occludin nicht ausreichend sei für den parazellulären Verschluss im intestinalen Epithel. Sie stellten die Hypothese auf, dass DON die Expression von TJ-Proteinen, wie z. B. Claudin-4, über die Aktivierung der MAPKs reduziere und dadurch die Barriere-Funktion im Darm beeinflusse. Ein Jahr später veröffentlichte die Forschungsgruppe um Pinton Ergebnisse eines *in vitro*-Versuches an IPEC-1-Zellen (Pinton et al., 2010). Zunächst wiesen die Autoren

nach, dass eine einstündige Inkubation der Zellen mit 30 µM DON die Aktivierung der MAPK p44 / 42 ERK bewirkte. Des Weiteren führte DON (30 µM, 48 h) zu einem Anstieg der parazellulären Permeabilität. Dieser konnte durch Vorbehandlung der IPEC-1-Zellen mit dem MAPK-Inhibitor U0126 verhindert werden. Zudem konnte die durch DON hervorgerufene verminderte Claudin-4-Expression durch Zugabe des MAPK-Inhibitors teilweise wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse stützen die zuvor von den Autoren aufgestellte Hypothese und lassen die Beteiligung eines MAPK-abhängigen Mechanismus in der Reduktion der Barrierefunktion durch DON annehmen.
Van de Walle et al. (2010) inkubierten Caco-2-Zellen mit DON-Konzentrationen von 0, 50, 500 und 5000 ng/mL für einen Zeitraum von 24 h. Die Mykotoxin-Applikation rief eine Konzentrations-abhängige Reduktion der gesamten Proteinmenge und simultan eine Zunahme der parazellulären Permeabilität hervor. Die Western Blot-Analysen ergaben für Claudin-4 eine Konzentrations-abhängige Reduktion, wohingegen die Expression von Occludin unverändert war. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Pinton et al. (2009) überein. Eine Beteiligung der MAPKs ERK1 / 2 und JNK konnten die Autoren jedoch nicht nachweisen. Van de Walle et al. (2010) nahmen an, dass DON eher durch Hemmung der Protein-Neusynthese als durch einen verstärkten Abbau oder eine Delokalisierung die Reduktion der Claudin-4-Expression hervorrufen würde.
Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pinton et al. (2009) ergaben die *in vitro*-Untersuchungen von Diesing et al. (2011b) eine massive Schädigung der ZO-1-Struktur nach DON-Exposition. Zellen der Linien IPEC-J2 und IPEC-1 wurden auf impermeablem Untergrund gezüchtet und mit DON inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit einer DON-Konzentration von 2000 ng/mL zeigten beide Zelllinien eine geschädigte ZO-1-Struktur, wobei die IPEC-J2-Zellen empfindlicher auf das Mykotoxin reagierten als die IPEC-1-Zellen. Die Inkubation mit 200 ng/mL DON hingegen hatte keine Auswirkungen auf die Struktur des TJ-Proteins. Im Kontrast zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Mikroskopie war die ZO-1-Schädigung im Western Blot im Vergleich zur Kontrolle moderat. In einem weiteren Versuch dieser Forschungsgruppe wurden IPEC-J2-Zellen auf einem permeablen Untergrund, wie in Abb. 4.2 veranschaulicht, gezüchtet (Diesing et al., 2011a). Die Zellen dieses Modells unterschieden sich von denjenigen Zellen, die auf einem impermeablen Untergrund wuchsen, durch eine ausgeprägtere hochprismatische Morphologie. Die IPEC-J2-Zellen wurden von apikal im Sinne einer luminalen Exposition mit 2000 ng/mL DON inkubiert. In der Immunfluoreszenz und im Western Blot konnte keine Schädigung der ZO-1-Struktur nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis, welches laut der Autoren durch den permeablen Untergrund sehr gut mit der *in vivo*-Situation vergleichbar sei, stimmt mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Entgegen der apikalen Exposition wies die basolaterale Gabe, die ein Modell für die systemische Exposition über den Blutweg darstellen sollte, im Western Blot nach 72 h bei einer Konzentration von 2000 ng/mL DON eine deutliche Abnahme der ZO-1-Expression auf. In der Immunfluoreszenz hingegen konnte keine Änderung der ZO-1-Lokalisation nachgewiesen werden. Die Autoren nahmen an, dass die Diskrepanz der Ergebnisse – eine verminderte Expression bei unveränderter Lokalisation – durch die aufgetretenen Lücken in der Zellschicht, die mit einem erhöhten Zelltod einhergingen, erklärt werden könnte. Folglich sei durch den Zellverlust eine Reduktion von

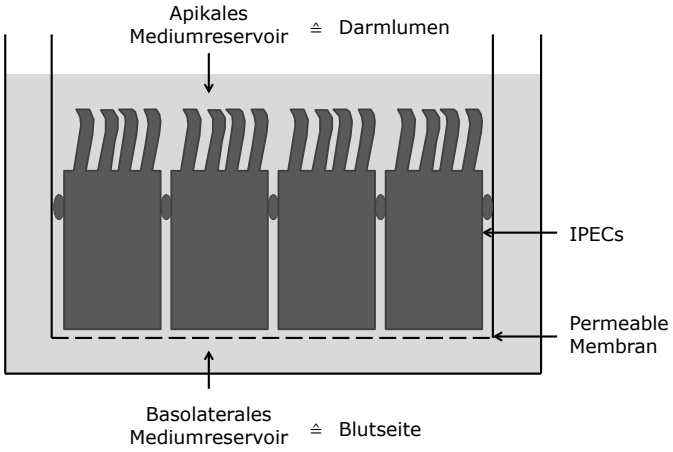


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau einer Membrankultur. Die Zellen wachsen auf einem permeablen Untergrund, weisen einen polaren Aufbau auf und können sowohl durch das apikale als auch durch das basolaterale Mediumreservoir inkubiert werden. Modifizierte Darstellung nach Diesing (2012).

ZO-1 im Western Blot nachzuweisen. Die übrig gebliebenen Zellinseln hingegen zeigten in der Immunfluoreszenz eine intakte ZO-1-Struktur. Im gleichen Versuch analysierten Diesing et al. (2011a) die Claudin-3-Expression. Bereits nach 24 h konnte bei einer Konzentration von 2000 ng/mL DON sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western Blot eine starke Reduktion der Claudin-3-Expression nachgewiesen werden. Diese trat jedoch nur nach basolateraler, nicht nach apikaler Exposition auf. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass DON einen stärkeren Einfluss auf die Claudin-3-Expression und -struktur im Vergleich zu ZO-1 ausübte. Diese Erkenntnisse stimmen weitgehend mit denen von Pinton et al. (2009) überein und könnten mit der exponierteren Lage der transmembranären TJ-Proteine im Vergleich zu ZO-1 zusammenhängen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Epithelzellen resistent gegenüber der apikalen DON-Exposition zu sein schienen. Nach basolateraler Gabe, im Sinne einer systemischen Exposition, konnte eine Schädigung der TJ-Proteine ZO-1 und Claudin-3 durch DON aufgezeigt werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Empfindlichkeit der porcinen intestinalen Epithelzellen gegenüber DON abhängig von der Applikationsroute sei (Diesing et al., 2011a). Diese Hypothese kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im mittleren Jejunum konnte eine stark verminderte ZO-1-Expression nach intravenöser, akuter Mykotoxin-Exposition (KON_DON) im Vergleich zu den LPS-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bewirkte die orale, chronische Exposition (DON_KON) weder in diesem noch in einem anderen Darmabschnitt einen Effekt auf die apikale ZO-1-Struktur. Aufgrund der hohen Streuung in der Kontroll- und der DON_KON-Gruppe, wie in Abb. 3.1 auf Seite 31 deutlich erkennbar, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zur KON_DON-Gruppe aufgezeigt werden.

Ferner diskutierten Diesing et al. (2011a) für die *in vivo*-Situation einen Reabsorptions-Mechanismus für DON aus dem Blutstrom. Sie nahmen an, dass DON im oberen Anteil des Dünndarms absorbiert werde und weiter distal über den Blutstrom von der basalen Seite an die Epithelzellen gelange. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Dänicke

et al. (2012b) gestützt. Die Forschungsgruppe konnte im distalen Dünndarm Effekte von DON auf die intestinale Morphologie nachweisen, obwohl das Mykotoxin beim Schwein nach peroraler Aufnahme sehr schnell (innerhalb von 15 Minuten) und fast vollständig ($91{,}5 \pm 27{,}4\,\%$) im proximalen Anteil des Dünndarms absorbiert wird (Goyarts und Dänicke, 2006). Anhand der Literaturrecherche und den eigenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Applikationsroute einen entscheidenden Einflussfaktor darstellt. Dieser Aspekt sollte in weiteren *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von DON berücksichtigt werden.

4.4.2 DON zeigt keinen Einfluss auf die ZO-1-Verteilung im Epithel

Die alleinige Gabe von DON (DON_KON, KON_DON) führte in keinem Darmabschnitt zu einer Änderung der ZO-1-Verteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON). Die im Rahmen derselben Studie durchgeführten Analysen der Leber-Morphologie und -Funktion und die Messungen der FSR ergaben weder nach oraler noch nach intravenöser Applikation von DON eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Stanek et al., 2012; Kullik et al., 2013). In einer weiteren *in vivo*-Studie untersuchten Dänicke et al. (2006) ebenfalls mit Hilfe der Stabilisotopen-Analytik die FSR im Dünndarm von Schweinen. Die Versuchstiere erhielten über einen Zeitraum von vier Wochen ein *Fusarium*-kontaminiertes Futter mit einer Dosis von $5,7\,\mathrm{mg}$ DON / kg Futter. Die Tiere einer anderen Versuchsgruppe, die dem Mykotoxin akut ausgesetzt wurde, bekamen $53\,\mu\mathrm{g}$ DON / kg LM einmalig als Bolus infundiert. Die Gabe von DON bewirkte, unabhängig von der Applikationsrichtung, im Ileum eine signifikante Reduktion der FSR im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Autoren erwogen, dass in diesem Darmabschnitt die hohe Dichte an Peyer-Platten ursächlich sein könnte (Dänicke et al., 2006). Kullik et al. (2013) erklärten die abweichenden Ergebnisse durch die Unterschiede im Versuchsaufbau. Die Zeitintervalle zwischen der intravenösen Mykotoxin-Gabe, der Stabilisotopen-Analytik und der Schlachtung sei länger gewesen als in dem vorherigen Versuch von Dänicke et al. (2006). Dadurch seien im vorliegenden Versuch vor und während der Proteinsynthese-Messung geringere DON-Konzentrationen in den Geweben erreicht worden. Des Weiteren sei die DON-Dosis der Fütterungsgruppe im vorliegenden Versuchsdesign nur in etwa halb so groß gewesen, wodurch die fehlenden DON-Effekte erklärt werden könnten. Die Messungen der FSR lassen schlussfolgern, dass DON in der verabreichten Dosierung und dem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Proteinsynthese im porcinen Dünndarm zeigt (Kullik et al., 2013). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den vorliegenden Ergebnissen zur ZO-1-Verteilung im Epithel. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Messungen der FSR alle Proteine der Gewebeproben erfassten.

4.4.3 DON ändert die zytoplasmatische β-Catenin-Verteilung im Epithel

Im Hinblick auf die geschädigte ZO-1-Struktur im mittleren Jejunum erfolgte die β-Catenin-Auswertung exemplarisch für diesen Darmabschnitt nach intravenöser DON-Applikation (KON_DON) im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON_KON). Es wurde das Verhältnis

zwischen der Fluoreszenzintensität von β-Catenin von beiden zytoplasmatischen Regionen (apikal bzw. basolateral) und dem Zellkernareal analysiert. Weder das Ratio der apikalen noch das der basolateralen Region zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Allerdings variierte die Verteilung im Zytoplasma: die Kontrolltiere wiesen eine signifikante Akkumulation des AJ-Proteins im basolateralen im Vergleich zum apikalen Zytoplasma auf, wohingegen die DON-infundierten Tiere eine homogenere Verteilung aufzeigten. In dieser Gruppe (KON_DON) konnte kein Unterschied in der β-Catenin-Akkumulation zwischen den beiden zytoplasmatischen Regionen nachgewiesen werden. Demzufolge bewirkte DON nach systemischer Applikation eine Änderung der zytoplasmatischen β-Catenin-Verteilung. Möglicherweise geht diese mit einer Verschiebung des intrazellulären Protein-Transportes von β-Catenin einher. Die Änderung der β-Catenin-Verteilung in den Enterozyten zu einem homogeneren Muster nach intravenöser DON-Applikation bedarf weiterer Untersuchungen. Diese sollten unter anderem die übrigen Dünndarmabschnitte und die orale Toxin-Applikation einbeziehen. Nach dem jetzigen Kenntnisstand liegen keine Studien vor, die die gewonnenen Erkenntnisse über die β-Catenin-Verteilung im mittleren Jejunum von Schweinen bestätigen oder widerlegen könnten.
In einem *in vivo*-Versuch untersuchten Bracarense et al. (2011) die Wirkung von DON auf die E-Cadherin-Expression. Das AJ-Protein ist ein membranständiges Glykoprotein, an dessen zytoplasmatische Domäne β-Catenin bindet (Näthke et al., 1994). Als Versuchstiere dienten für den genannten Versuch fünf Wochen alte Ferkel, die über einen Zeitraum von 35 Tagen eine Mykotoxin-Konzentration von $3,0\,\mathrm{mg}$ gereinigtem DON / kg Futter erhielten. Bracarense et al. (2011) wiesen zunächst mit Hilfe von Western Blot-Analysen eine Reduktion der E-Cadherin-Expression im Ileum nach. Daraufhin führten sie immunhistochemische Analysen für die Abschnitte Jejunum und Ileum durch. Die Beurteilung erfolgte entweder als „normal“ mit homogener, starker Färbung der basolateralen Membran oder als „abgeschwächt“ mit heterogener, schwacher Färbung. Die Auswertungen ergaben für beide Darmabschnitte eine signifikante Reduktion der E-Cadherin-Expression. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass DON einen potenziellen Effekt auf die AJ im porcinen Dünndarm zeigt.

4.5 Die Wirkung von LPS auf die epitheliale Barriere des Dünndarms

4.5.1 LPS zeigt keinen Einfluss auf die apikale ZO-1-Expression

Die Epithelzellschicht des GIT steht durch das Vorhandensein der fakultativ pathogenen Kommensalen in permanentem Kontakt mit LPS. Naik et al. (2001) isolierten humane Epithelzellen aus Caco-2-Kulturen, fetalen Darm-Explantaten und Dünndarmresektaten. Sie untersuchten die Zellen auf die Expression des TLR4, welche nicht nachgewiesen werden konnte. Die Autoren gingen davon aus, dass das Fehlen des LPS-Rezeptorkomplexes auf intestinalen Epithelzellen zum Schutz vor Überstimulation diene. In einer *in vitro*-

Studie an einer intestinalen Mäuse-Epithelzelllinie (m-IC$_{cl2}$) konnten Hornef et al. (2002) nachweisen, dass sowohl CD14 als auch TLR4 exprimiert wurde. Nach LPS-Inkubation ($0,1 - 10\,\mu g\,/\,mL$, 12 h) wiesen die Zellen eine gesteigerte Transkription und ein verstärktes Oberflächensignal für CD14 auf. Die Immunfärbung von TLR4 ergab ein intrazelluläres Signal im Bereich des Golgi-Apparates. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die Vorbehandlung der Zellen mit niedrigen LPS-Konzentrationen ($0,001\,\mu g\,/\,mL$) zur Hemmung der nachfolgenden Zellaktivierung und folglich zu einer Toleranzentwicklung führte. Die Forschungsgruppe bezeichnete die Internalisierung und Kolokalisierung von LPS an den intrazellulären TLR4 als obligatorischen Schritt für den Prozess der Endotoxin-Erkennung in intestinalen Epithelzellen. Wassef et al. (2004) gelang es, beim Schwein ebenfalls das Vorhandensein des TLR4 im Dünndarmepithel nachzuweisen. Die *in vivo*-Untersuchungen ergaben sowohl eine zytosolische als auch eine luminale Expression des Rezeptors. Diese Ergebnisse zeigen, dass die intestinalen Epithelzellen nicht nur permanent mit luminalem LPS in Kontakt stehen, sondern auch fortwährend über den TLR4 mit dem Endotoxin interagieren. Zudem unterliegt die individuelle LPS-Belastung erheblichen Schwankungen (Ganey und Roth, 2001). Sie ist abhängig von vielen Faktoren, wie der Umwelt, vorbestehenden Infektionen und Bedingungen, die einen Übertritt von LPS aus dem GIT in den systemischen Kreislauf begünstigen oder hemmen. Aus den genannten Gründen wurde im vorliegenden Versuchsaufbau den Tieren LPS ausschließlich intravenös im Sinne der systemischen Infektion verabreicht. Die Tiere bekamen $7,5\,\mu g$ LPS / kg LM innerhalb einer Stunde infundiert und wurden 3,25 h nach Beginn der Infusion geschlachtet.

Die intravenöse Applikation von LPS (KON_LPS) führte zu keiner Änderung der apikalen ZO-1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis stimmt mit denen von Chin et al. (2006) überein. Ihre *in vitro*-Untersuchungen ergaben, dass die basolaterale Exposition mit LPS zu keiner Änderung der epithelialen Barriere-Funktion führte. Die Autoren inkubierten die intestinale Epithelzelllinie SCBN mit *E.coli*-LPS in Konzentrationen von $10 - 50\,\mu g/mL$. Die Messungen der epithelialen Permeabilität, ermittelt durch den transepithelialen Übertritt von markiertem Dextran, ergaben nach apikaler Applikation ($50\,\mu g/mL$) eine signifikante Zunahme nach 2 h und 24 h. Diese ging mit einer gestörten TJ-Integrität einher, die sich durch eine diskontinuierliche perizelluläre ZO-1-Färbung darstellte. Im Gegensatz dazu bewirkte die basolaterale Exposition keine Änderung der epithelialen Permeabilität, die jedoch ausschließlich durch Tracer-Messungen beurteilt wurde. Chin et al. (2006) schlussfolgerten, dass die apikale Exposition mit hohen LPS-Konzentrationen direkt zur Apoptose der Zellen und folglich zu einem Zusammenbruch der epithelialen Integrität führe.

Die intestinale Epithelschicht unterliegt einer ständigen Zellabschürfung und -erneuerung. Unter physiologischen Umständen kann die Barrierefunktion während dieses Vorgangs aufrechterhalten werden. Pathologische Zustände, wie der septische Schock, können zu einem großen Zellverlust und dem Zusammenbruch der Barriere führen (Marchiando et al., 2011). In der klinischen Untersuchung der vorliegenden Studie wiesen alle Versuchstiere mehr als ein Sepsis-typisches Symptom, wie z. B. Fieber, Tachykardie, Dyspnoe, Emesis oder gerötete Konjunktiven, auf. Die rektale Temperatur stieg innerhalb von 3 h nach Infusionsbeginn von 38,6 - 38,8°C auf 39,7 - 40,3°C an (Kullik et al., 2013). Die Sepsis ist durch

eine generalisierte Störung der Hämodynamik gekennzeichnet. Sie führt zu einem reduzierten Herzzeitvolumen mit kompensatorischer Tachykardie. Durch die sympathoadrenerge Reaktion kommt es zur Zentralisation mit bevorzugter Perfusion von Vitalorganen, wie Herz und Gehirn (Schuchert, 2009). Der Darm spielt in diesem Krankheitszustand eine besondere Rolle. Er wird als „Motor des Multiorganversagens“ verstanden (Carrico et al., 1986; Marshall et al., 1993). Die Minderperfusion des Gastrointestinaltraktes resultiert in Epithelnekrosen und Störungen der Barrierefunktion. Folglich kommt es zu einer vermehrten Translokation von Bakterien und ihren Toxinen. Der GIT kann im Sinne eines „undrained abscess“ das septische Krankheitsbild verstärken (Marshall et al., 1993). Kullik et al. (2013) nahmen an, dass sich die Tiere des gemeinsamen Versuches zum Zeitpunkt der FSR-Messungen bzw. der Schlachtung (3,25 h nach Beginn der Toxin-Infusion) in der dekompensierten, hypodynamen Phase der Sepsis befanden. Die Analyse der apikalen ZO-1-Struktur nach systemischer LPS-Exposition ergab die Integrität des TJ-Proteins. Entsprechend dieses Ergebnisses kann angenommen werden, dass die LPS-Infusion zum Zeitpunkt des Schlachtens keine ausgeprägten Epithelnekrosen im Intestinum hervorgerufen hatte. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen Stanek et al. (2012), die im Rahmen derselben Studie die Leber-Morphologie untersuchten. In der KON_LPS-Gruppe konnten keine nekrotischen Veränderungen nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Nekrosen erst später in der chronologischen Abfolge der Sepsis auftreten würden. Sætre et al. (2001) injizierten Schweinen 1,7 µg *E.coli*-LPS / kg LM und entnahmen vor, während und nach Beendigung der Infusion Biopsien aus der Leber. Erst nach sechs Stunden konnten nekrotische Areale nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurden die Versuchstiere bereits 3,25 h nach Beginn der Infusion geschlachtet, wodurch das Fehlen von Nekrosen erklärt werden kann.
In der detaillierten Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass die intravenöse Applikation von LPS bzw. DON im mittleren Jejunum zu entgegengesetzten Ergebnissen führte. Das Mykotoxin bewirkte in diesem Darmabschnitt eine deutlich verminderte ZO-1-Expression, die nach intravenöser LPS-Applikation nicht nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigten die LPS-behandelten Tiere homogenere ZO-1-Werte als die Kontrolltiere. Diese entgegengesetzten Ergebnisse der Gruppen KON_LPS und KON_DON müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da zwar beide Gruppen im mittleren Jejunum signifikant unterschiedlich zueinander waren, sich jedoch nicht von der Kontrollgruppe unterschieden. Das wiederum könnte durch die hohe Streuung in der Kontrollgruppe erklärt werden.

4.5.2 LPS ändert die ZO-1-Verteilung im Epithel

In der Kontrollgruppe wiesen die drei oberen Dünndarmabschnitte Duodenum, proximales und mittleres Jejunum eine Gleichverteilung ($R \approx 1$) von ZO-1 zwischen der apikalen und zytosolischen Region auf, wohingegen in den beiden Ileum-Abschnitten das apikale ZO-1 ($R > 1$) überwog. Die systemische Gabe von LPS führte in den beiden Jejunum-Abschnitten zu einer signifikanten Umverteilung von ZO-1 nach apikal im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese fand ebenfalls im Duodenum statt, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Insgesamt wiesen alle fünf Darmabschnitte der Gruppe KON_LPS eine

überwiegend apikale Akkumulation von ZO-1 auf ($R > 1$). Dieses Ergebnis, schematisch veranschaulicht in Abb. 3.7a auf Seite 38, stimmt mit der Analyse des TJ-assoziierten ZO-1 überein, die für dieselbe Versuchsgruppe eine intakte Integrität des TJ-Proteins ergab. In Synopsis der Ergebnisse der apikalen ZO-1-Struktur und des Verteilungsmusters in den Enterozyten wäre denkbar, dass bei LPS-Exposition eine Umverteilung der TJ-Proteine, aus einem zytosolischen Speicher nach apikal, zur Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Barriere-Eigenschaften beitragen könnte. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass LPS indirekt über die Hemmung der Proteinsynthese regulatorisch auf die ZO-1-Verteilung einwirke. Die Messungen der FSR ergaben für alle Darmabschnitte nach intravenöser LPS-Applikation (KON_LPS) eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kullik et al., 2013). Dennoch gibt keiner der beiden Erklärungsansätze Aufschluss über die besondere Empfindlichkeit des Jejunums. Diese sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zu gegensätzlichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen kamen Morita et al. (2012) in einer aktuellen *in vitro*-Studie. Sie untersuchten die funktionellen und morphologischen Änderungen der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin nach LPS-Exposition. Die Zellen der intestinalen Epithelzelllinie T84 wurden von apikal mit 10, 100 oder 300 µg/mL *E.coli*-LPS inkubiert. Die Barrierefunktion wurde durch Messungen des TEER beurteilt, die Expression der TJ-Proteine mittels Western Blot und konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Die Gabe von LPS (10, 100, 300 µg/mL) führte nach 6 h zu einer Dosis-abhängigen Abnahme des TEER. Nach 24 h konnte bei den Zellen, die mit einer niedrigen LPS-Konzentration (10 µg/mL) inkubiert wurden, ein Wiederanstieg des TEER bis zum Erreichen des Kontrollniveaus verzeichnet werden. Die Western Blot-Analysen ergaben zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede der Expressionslevel, wohingegen die Mikroskopie für beide TJ-Proteine nach LPS-Applikation (300 µg/mL, 6 h) eine diskontinuierliche Färbung aufzeigte. Die Autoren erklärten das Erreichen der TEER-Ausgangswerte bei niedrigen LPS-Konzentrationen durch einen möglichen „Erholungs"-Mechanismus. Dieser sei im Sinne der Toleranzentwicklung denkbar. Hohe LPS-Konzentrationen (300 µg/mL) hingegen würden zu Änderungen der TJ-Lokalisation führen. Eine Änderung der ZO-1-Verteilung, aus dem TJ-Komplex heraus mit Akkumulation im Zytosol, wurde aufgrund der gleichbleibenden Expressionslevel geschlussfolgert und als ursächlich für die Abnahme des TEER erklärt (Morita et al., 2012). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den eigenen Hypothesen wäre die bereits angesprochene Umverteilung der TJ-Proteine aus einem zytosolischen Speicher nach apikal ebenfalls denkbar. Dadurch könnte bei niedrigen bis moderaten LPS-Konzentrationen die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Barriere-Eigenschaften gewährleistet werden. Hohe LPS-Konzentrationen hingegen könnten zu Beeinträchtigungen des intrazellulären Proteintransfers zum TJ-Komplex und folglich zur Dysfunktion der epithelialen Barriere führen. Dies ist jedoch spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ähnliche Ergebnisse wie von Morita et al. (2012) konnten bereits bei einer geringeren LPS-Konzentration (50 µg/mL) erzielt werden (Chin et al., 2006). Die intestinale Epithelzelllinie SCBN wurde von apikal mit dem Endotoxin inkubiert. Nach 2 h konnte eine diskontinuierliche ZO-1-Färbung nachgewiesen werden. In betroffenen Zellen, die kein apikales ZO-1

mehr aufwiesen, konnte eine zytosolische Akkumulation des TJ-Proteins aufgezeigt werden. Die Vorbehandlung der Zellkulturen mit einem Caspase-3-Inhibitor verhinderte die LPS-induzierten Pathologien. Die kontinuierliche ZO-1-Färbung blieb aufrechterhalten. Die Autoren schlussfolgerten, dass LPS über die Aktivierung der Caspase-3 die Störung der TJ-Integrität bewirke. Caspasen sind ausschlaggebende Mediatoren des programmierten Zelltods. Als intrazelluläre Proteasen katalysieren sie die Spaltung vieler Schlüsselproteine und bewirken die Apoptose (Porter und Jänicke, 1999).
Beide Forschungsgruppen zeigten, dass *in vitro* die apikale LPS-Exposition zur Störung der ZO-1-Integrität führte. Morita et al. (2012) nahmen eine zytosolische ZO-1-Akkumulation an, Chin et al. (2006) wiesen jene nach. Diese Schlussfolgerungen bzw. Ergebnisse stimmen nicht mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Möglich wären zum einen unterschiedliche Mechanismen des Endotoxins in Abhängigkeit von der Applikationsrichtung und zum anderen die bereits induzierte Apoptose, wie im Fall der zuletzt beschriebenen Studie.
Marchiando et al. (2011) applizierten hohe Dosen von TNF-α ($7,5\,\mu g$ intraperitoneal) und induzierten eine gesteigerte Zellabschürfung und Apoptose im Dünndarmepithel von Mäusen. Gegenstand dieser Untersuchung war es, die Umverteilung der TJ und die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion zu untersuchen. Nach Zytokin-Applikation wurde der Dünndarm der Versuchstiere eröffnet und die Mucosa durch konfokale Mikroskopie visualisiert. Die Untersuchungen ergaben eine Umverteilung von ZO-1 und Occludin vom AJK zur lateralen Membran. Wenige Minuten bevor der Zellkern nach apikal wanderte, bildeten die TJ-Proteine einen „Trichter“ um die apoptotische Zelle. Marchiando et al. (2011) beschrieben diese außergewöhnliche Plastizität der TJ-Struktur als essenziell für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion.

4.6 Die Wirkung von DON und LPS auf die epitheliale Barriere des Dünndarms

4.6.1 DON und LPS zeigen keinen interaktiven Effekt auf die apikale ZO-1-Expression

Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den in der Literatur beschriebenen interaktiven Effekt der Toxine DON und LPS in Abhängigkeit von der Expositionsrichtung (apikal vs. basolateral) bzw. der Dauer (akut vs. chronisch) zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Applikation der beiden Toxine variiert. Die DON_LPS-Gruppe sollte Hinweise auf eine mögliche Sensibilisierung oder Toleranzentwicklung durch die vorangegangene chronische Mykotoxin-Exposition geben. Die KON_DON+LPS-Gruppe sollte Aussagen über potenzielle interaktive Effekte ermöglichen, die bei gleichzeitiger systemischer Zirkulation auftreten und zur Beeinflussung der Toxikokinetik- und -dynamik des jeweils anderen Toxins führen könnten. Eine aktuelle Studie von Dänicke et al. (2012a) gibt Hinweise darauf, dass die Toxikokinetik einen potenziellen Einflussfaktor in der Interaktion beider Toxine darstellt. Die Autoren untersuchten die Eliminierungskinetik von DON aus dem porcinen Plasma bei alleiniger ($100\,\mu g$ DON / kg / h) oder kombinierter Toxin-

Applikation mit LPS (7,5 µg / kg / h). Die Endotoxin-Exposition rief bei den Versuchstieren eine Akute-Phase-Reaktion hervor, die klinisch durch Symptome des endotoxämischen Schocks apparent wurde. Die Untersuchungen ergaben nach der einstündigen Infusion eine signifikant höhere, maximale DON-Konzentration in der Gruppe mit kombinierter Toxin-Gabe (DON+LPS). Das Verteilungsvolumen und die Plasma-Clearance von DON waren signifikant niedriger in der DON+LPS-Gruppe im Vergleich zur DON-Gruppe. Ursächlich für die höheren DON-Konzentrationen in den endotoxämischen Schweinen könnte einerseits eine hämodynamisch hervorgerufene, längere Persistenz von glukuronidiertem DON oder andererseits eine veränderte Glukuronidierungs-Aktivität sein. Die Autoren zogen beide Möglichkeiten in Betracht (Dänicke et al., 2012a). Diese Studie verdeutlicht, dass die in diesem Versuchsaufbau gleichzeitig durchgeführte, systemische Applikation von DON und LPS als sinnvoll erachtet werden kann.
Das TJ-assoziierte ZO-1 wurde entsprechend des zuvor definierten Score-Systems analysiert. In der Kontrollgruppe konnten keine Unterschiede entlang der proximo-distalen Achse des Dünndarms aufgezeigt werden. Die kombinierte Toxin-Gabe (KON_DON+LPS, DON_LPS) führte zu keiner Änderung der apikalen ZO-1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit kombinierter Toxin-Exposition nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der alleinigen Toxin-Applikation (DON_KON, KON_DON, KON_LPS) kann ein interaktiver Effekt der beiden Toxine auf die apikale ZO-1-Struktur ausgeschlossen werden. Nach dem jetzigen Kenntnisstand gibt es keine vergleichbaren *in vivo*-Daten, die diese Annahme untermauern oder widerlegen könnten.

4.6.2 DON und LPS zeigen keinen synergistischen Effekt auf die ZO-1-Verteilung im Epithel

In der Kontrollgruppe wiesen die drei oberen Dünndarmabschnitte Duodenum, proximales und mittleres Jejunum eine Gleichverteilung ($R \approx 1$) von ZO-1 zwischen der apikalen und zytosolischen Region auf, wohingegen in den beiden Ileum-Abschnitten das apikale ZO-1 ($R > 1$) überwog. Die kombinierte Toxin-Gabe von DON und LPS führte in den drei oberen Abschnitten zu einer signifikanten Umverteilung von ZO-1 nach apikal im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die alleinige LPS-Exposition (KON_LPS) hingegen bewirkte lediglich in den jejunalen Darmabschnitten eine signifikante Änderung der ZO-1-Verteilung. Insgesamt wiesen alle fünf Darmabschnitte der Gruppen KON_DON+LPS und DON_LPS eine überwiegend apikale Akkumulation von ZO-1 auf ($R > 1$). Dieses Ergebnis, schematisch veranschaulicht in Abb. 3.7b auf Seite 38, stimmt mit der Analyse des TJ-assoziierten ZO-1 überein, die für dieselben Versuchsgruppen die Integrität des TJ-Proteins ergab. Entgegen der vorliegenden Ergebnisse ergaben die Messungen der FSR Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kullik et al., 2013). Die intravenöse LPS-Applikation in Kombination mit DON (KON_DON+LPS) führte zu einer starken Beeinträchtigung der Proteinsynthese im gesamten Dünndarm, wohingegen die DON_LPS-Gruppe signifikante Unterschiede lediglich im Jejunum erzielte. Im Rahmen derselben Studie untersuchten Stanek et al. (2012) die Wirkung der beiden Toxine

auf die Leber-Morphologie. Die Arbeitsgruppe definierte in diesem Zusammenhang einen histopathologischen Score, der die Beurteilung von Inflammation und Nekrosen in unterschiedlichen Ausprägungen umfasste. Die stärksten Schädigungen konnten für die Gruppen KON_LPS und KON_DON+LPS beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die DON_LPS-Gruppe keine Schädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Autoren nahmen an, dass die vorausgegangene chronische DON-Exposition zu einer abgeschwächten Immunantwort gegenüber LPS führe (Stanek et al., 2012). Zur Untermauerung dieser Annahme zogen die Autoren eine Studie von Grenier et al. (2011) heran. Darin bekamen Schweine, denen zuvor ein Mykotoxin-haltiges Futter ($3,0\,\text{mg}$ DON / kg Futter) verabreicht wurde, Ovalbumin infundiert. Die Versuchstiere, denen DON gefüttert wurde, zeigten eine abgeschwächte Immunreaktion auf die Injektion. Die Autoren führten diese auf eine verminderte Chemotaxis zurück, die durch eine erniedrigte IL-8-Expression angezeigt wurde. Dadurch seien die Rekrutierung und Migration von Antigen-präsentierenden Zellen zu lymphatischem Gewebe gestört worden (Grenier et al., 2011).
Islam und Pestka (2006) stellten die Hypothese auf, dass eine Vorbehandlung mit LPS zu einer Sensibilisierung der Versuchstiere gegenüber DON führe. Sie injizierten Mäusen $1\,\text{mg}$ LPS / kg LM intraperitoneal und verabreichten den Tieren acht Stunden später $0,5-25\,\text{mg}$ DON / kg LM *per os*. Die minimale DON-Dosis für die Zytokin-Induktion von IL-1α, IL-1β, IL-6 und TNF-α war signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe, die zuvor nicht dem Endotoxin ausgesetzt worden war. Die Vorbehandlung mit LPS führte zu einer vorzeitigen, starken Zunahme und verlängerten Dauer der Zytokin-Antwort. Die Sensibilisierung der Tiere gegenüber DON hielt etwa $24\,\text{h}$ an und trat bereits bei einer LPS-Konzentration von $50\,\mu\text{g}$ / kg LM auf. Des Weiteren wies die Forschungsgruppe bei vorangegangener Endotoxin-Exposition eine verminderte Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 durch DON nach. Dies führte zu der Annahme, dass die Aktivierung der MAPKs nicht ursächlich für die Immunantwort sei. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Sensibilisierung bliebe unklar. Denkbar wäre, dass die LPS-Vorbehandlung als primäres „Gefahrensignal“ zur Änderung des Phänotyps innerhalb des Immunsystems führe, wodurch es sensibler auf sekundäre „Gefahrensignale“ reagiere (Islam und Pestka, 2006). Die Ergebnisse von Stanek et al. (2012) und Islam und Pestka (2006) machen deutlich, dass die Reihenfolge der Toxin-Applikation einen entscheidenden Einflussfaktor darstellt. In Synopsis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist ein synergistischer Effekt der beiden Toxine auf die ZO-1-Verteilung im intestinalen Epithel auszuschließen. Die alleinige DON-Applikation führte weder nach oraler noch nach intravenöser Exposition zu einer signifikanten Änderung, wohingegen die intravenöse LPS-Exposition eine starke Wirkung auf die ZO-1-Verteilung zeigte. Diese deckt sich mit der Wirkung bei kombinierter Toxin-Gabe. Demzufolge lässt sich schlussfolgern, dass die LPS-Exposition ursächlich für die Effekte zu sein scheint. Des Weiteren konnte der LPS-Effekt nicht durch eine zuvor erfolgte, chronische DON-Exposition abgeschwächt werden.

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von DON und LPS auf die epitheliale Barriere des porcinen Dünndarms untersucht. Mittelpunkt der Untersuchungen waren die Proteine ZO-1 und β-Catenin, die als Bestandteile des AJK essenziell für die Ausbildung der epithelialen Barriere sind. In der vorliegenden Studie dienten Schweine als Versuchstiere, da sie als empfindlichste Spezies gegenüber DON gelten. Vergleichende Daten sind rar, da die Untersuchungen anderer Forschungsgruppen überwiegend an Nagetieren durchgeführt wurden. Neben den vorliegenden Ergebnissen gibt es nur wenige *in vivo*-Daten zur Verteilung von TJ-Proteinen entlang der proximo-distalen Achse des Dünndarms. Diese sollten durch Untersuchungen weiterer Proteine ergänzt werden. Die Analyse der β-Catenin-Verteilung wurde exemplarisch für das mittlere Jejunum nach intravenöser DON-Applikation durchgeführt und bedarf weiterer Untersuchungen. Diese sollten zum einen die übrigen Dünndarmabschnitte einbeziehen, um Aussagen entlang der proximo-distalen Achse zu ermöglichen, und zum anderen die orale DON-, die intravenöse LPS- und die kombinierte Toxin-Gabe umfassen. Des Weiteren ist es sinnvoll, die Applikationsrouten und die Reihenfolge der Toxine zu variieren. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde DON vor oder gleichzeitig mit dem Endotoxin verabreicht. Denkbar wäre ein ähnlicher Versuchsaufbau mit umgekehrter Reihenfolge, um weitere Aussagen zu Sensibilisierung und Toleranzentwicklung treffen zu können. Neben der Immunfluoreszenz-Mikroskopie könnten Western Blot-Analysen die Untersuchungen vervollständigen.

5 Zusammenfassung

Die intestinale Epithelschicht steht fortwährend in Kontakt mit dem Darmlumen bzw. der Umwelt und stellt eine potenzielle Eintrittspforte für im Nahrungsbrei enthaltene Erreger und Toxine dar. Neben Mykotoxinen, wie Deoxynivalenol, die durch den Verzehr von kontaminiertem Getreide aufgenommen werden, sind Lipopolysaccharide durch die Anwesenheit der fakultativ pathogenen Kommensalen permanent im Darmlumen enthalten. In der Literatur wurden für beide Toxine Effekte auf die epitheliale Barriere beschrieben. Des Weiteren konnten Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass Lipopolysaccharide die Toxizität von Trichothecenen verstärken. Ziel der Dissertation war es, die Hypothese eines interaktiven Effektes von Deoxynivalenol und Lipopolysacchariden auf die epitheliale Barriere des porcinen Dünndarms zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Bedeutung der Applikationsroute, als entscheidender Einflussfaktor, beurteilt werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Proteine ZO-1 und β-Catenin. Als Bestandteile des apikalen Junktionskomplexes sind sie essenziell für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere und tragen wesentlich zum Schutz des Organismus vor dem Eindringen von Pathogenen bei. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Score für die Bewertung der apikalen ZO-1-Struktur definiert. Des Weiteren wurde eine Methode entwickelt, die eine objektive Auswertung der ZO-1- und β-Catenin-Verteilung im Epithel ermöglicht. Nach jetzigem Kenntnisstand ist es das erste Mal, dass die Verteilung von ZO-1 in fünf Abschnitten entlang der proximo-distalen Achse des porcinen Dünndarms untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass ZO-1, als wichtiges Gerüstprotein der Tight Junction, eine differenzierte Verteilung im Epithel entlang der intestinalen Achse aufweist. Die Analyse ergab neben der apikalen, Tight Junction assoziierten Struktur eine starke zytoplasmatische Komponente im Duodenum und Jejunum. Dieses Verteilungsmuster wurde deutlich durch die intravenöse LPS-Applikation beeinflusst. Interessanterweise konnte ein Effekt auf die apikale ZO-1-Struktur ausschließlich im mittleren Jejunum nach systemischer Exposition mit Deoxynivalenol nachgewiesen werden. Zudem bewirkte die systemische Mykotoxin-Applikation in diesem Darmabschnitt eine Änderung der zytoplasmatischen β-Catenin-Verteilung zu einem homogeneren Muster.

Ein synergistischer Effekt von Deoxynivalenol und Lipopolysacchariden auf die intestinale Barriere konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die außergewöhnliche Empfindlichkeit des (mittleren) Jejunums und den zugrunde liegenden Wirkmechanismus von Deoxynivalenol und Lipopolysacchariden auf den apikalen Junktionskomplex im Dünndarm zu klären.

Literaturverzeichnis

Al-Sadi, R. ; Ye, D. ; Dokladny, K. ; Ma, Th. Y.: Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. In: *Journal of Immunology* 180 (2008), Nr. 8, S. 5653–5661

Alexander, C. ; Rietschel, E. T.: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. In: *Journal of Endotoxin Research* 7 (2001), Nr. 3, S. 167–202

Anderson, J. M. ; Fanning, A. S. ; Lapierre, L. ; Van Itallie, C. M.: Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGuKs) of the tight junction. In: *Biochemical Society Transactions* 23 (1995), Nr. 3, S. 470–475

Antranik: *Detailed Features of Epithelia*. 2011. – URL `http://antranik.org/detailed-features-of-epithelia/`. – Zugriffsdatum: 06. 06. 2013

Balda, M. S.: The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. In: *Journal of Cell Biology* 160 (2003), Nr. 3, S. 423–432

Bauer, H. ; Zweimueller-Mayer, J. ; Steinbacher, P. ; Lametschwandtner, A. ; Bauer, H. C.: The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010), Nr. 4, S. 1–11

Bennett, G. A. ; Richard, J. L.: Influence of processing on Fusarium mycotoxins in contaminated grains. In: *Food Technology* 50 (1996), S. 235–238

Binder, H. J.: Heterogeneity of intestinal transport. In: *Digestion* 59 (1998), Nr. 4, S. 392–394

Bracarense, A.-P. F. L. ; Lucioli, J. ; Grenier, B. ; Drociunas Pacheco, G. ; Moll, W.-D. ; Schatzmayr, G. ; Oswald, I. P.: Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. In: *British Journal of Nutrition* (2011), S. 1–11

Bruins, M. B. M. ; Karsaï, I. ; Schepers, J. ; Snijders, C. H. A.: Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to in vitro selection for fusarium head blight resistance. In: *Plant Science* 94 (1993), Nr. 1-2, S. 195–206

Brun-Buisson, C. ; Doyon, F. ; Carlet, J.: Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (1996), S. 617–24

Bryden, W. L.: Mycotoxins in the food chain: human health implications. In: *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16 Suppl 1 (2007), S. 95–101

Cario, E. ; Rosenberg, I. M. ; Brandwein, S. L. ; Beck, P. L. ; Reinecker, H. C. ; Podolsky, D. K.: Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. In: *Journal of Immunology* 164 (2000), Nr. 2, S. 966–972

Carrico, C. J. ; Meakins, J. L. ; Marshall, J. C. ; Fry, D. ; Maier, R. V.: Multiple-organ-failure syndrome. In: *Archives of Surgery* 121 (1986), Nr. 2, S. 196–208

CAST: *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems.* Council for Agricultural Science and Technology, 2003 (Task Force Report, No. 139). – ISBN 1-887383-22-0

Cavallaro, U. ; Dejana, E.: Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (2011), Nr. 3, S. 189–197

Chen, Z. J.: Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. In: *Nature Cell Biology* 7 (2005), Nr. 8, S. 758–765

Chin, A. C. ; Flynn, A. N. ; Fedwick, J. P. ; Buret, A. G.: The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions. In: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84 (2006), Nr. 10, S. 1043–1050

Claude, P. ; Goodenough, D. A.: Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. In: *Journal of Cell Biology* 58 (1973), Nr. 2, S. 390–400

Colin, R. ; Grandu, T. ; Lemeland, J. F. ; Hecketsweiler, P. ; Galmiche, J. P. ; Le-Grix, A. ; Geffroy, Y.: Detection of endotoxemia in patients with cryptogenic inflammatory enterocolitis. In: *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 3 (1979), S. 15–19

Dänicke, S. ; Brosig, B. ; Kahlert, S. ; Panther, P. ; Reinhardt, N. ; Diesing, A.-K. ; Kluess, J. ; Kersten, S. ; Valenta, H. ; Rothkötter, H.-J.: The plasma clearance of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) is decreased in endotoxemic pigs. In: *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012), Nr. 12, S. 4405–4411

Dänicke, S. ; Brosig, B. ; Klunker, L. R. ; Kahlert, S. ; Kluess, J. ; Döll, S. ; Valenta, H. ; Rothkötter, H.-J.: Systemic and local effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) are not alleviated by dietary supplementation of humic substances (HS). In: *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012), Nr. 3-4, S. 979–988

Dänicke, S. ; Goyarts, T. ; Döll, S. ; Grove, N. ; Spolders, M. ; Flachowsky, G.: Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. In: *Toxicology Letters* 165 (2006), Nr. 3, S. 297–311

Dänicke, S. ; Goyarts, T. ; Valenta, H. ; Razzazi, E. ; Böhm, J.: On the effects of increasing deoxynivalenol (DON) concentrations in pig feed on growth performance, utilization of nutrients and metabolism of DON. In: *Journal of Animal and Feed Sciences* 13 (2004), S. 539–556

Dänicke, S. ; Valenta, H. ; Döll, S.: On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (don) in the pig. In: *Archives of Animal Nutrition* 58 (2004), Nr. 2, S. 169–180

Daugherty, R. L. ; Gottardi, C. J.: Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. In: *Physiology* 22 (2007), S. 303–309

Dauphinee, S. M. ; Karsan, A.: Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. In: *Laboratory Investigation* 86 (2006), Nr. 1, S. 9–22

Deitch, E. A.: Role of bacterial translocation in necrotizing enterocolitis. In: *Acta Paediatrica* 83 (1994), Nr. s396, S. 33–36

Desjardins, A. E. ; Hohn, T. M. ; McCormick, S. P.: Trichothecene biosynthesis in Fusarium species: chemistry, genetics, and significance. In: *Microbiological Reviews* 57 (1993), Nr. 3, S. 595–604

Deutsche Forschungsgemeinschaft: *Tierversuche in der Forschung*. Lemmens, 2004. – URL `http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/geschaeftsstelle/publikationen/dfg_tierversuche_0300304.pdf`. – ISBN 3-932306-53-8

Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.: *Krankheitsbild Sepsis*. – URL `http://www.sepsis-gesellschaft.de/`. – Zugriffsdatum: 06. 06. 2013

Diamond, J. M.: Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. In: *Physiologist* 20 (1977), Nr. 1, S. 10–18

Diesing, A.-K.: *Modulation der physiologischen Zellfunktion in intestinalen porcinen Epithelzellen (IPEC) durch das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON)*. Magdeburg, Otto-von-Guericke-Universität, Dissertation, 2012

Diesing, A.-K. ; Nossol, C. ; Dänicke, S. ; Walk, N. ; Post, A. ; Kahlert, S. ; Rothkötter, H.-J. ; Kluess, J.: Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. In: *PloS One* 6 (2011), Nr. 2, S. e17472

Diesing, A.-K. ; Nossol, C. ; Panther, P. ; Walk, N. ; Post, A. ; Kluess, J. ; Kreutzmann, P. ; Dänicke, S. ; Rothkötter, H.-J. ; Kahlert, S.: Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. In: *Toxicology Letters* 200 (2011), Nr. 1-2, S. 8–18

Döll, S. ; Dänicke, S.: The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. In: *Preventive Veterinary Medicine* 102 (2011), Nr. 2, S. 132–145

Dong, C. ; Davis, R. J. ; Flavell, R. A.: MAP kinases in the immune response. In: *Annual Review of Immunology* 20 (2002), S. 55–72

Dragsten, P. R. ; Handler, J. S. ; Blumenthal, R.: Asymmetry in epithelial cells: is the tight junction a barrier to lateral diffusion in the plasma membrane? In: *Progress in Clinical and Biological Research* 91 (1982), S. 525–536

EFSA: Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. In: *EFSA Journal* 73 (2004), S. 1–41

Ehrlich, K. C. ; Daigle, K. W.: Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 923 (1987), Nr. 2, S. 206–213

Eriksen, G. S. ; Pettersson, H. ; Lindberg, J. E.: Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. In: *Archives of Animal Nutrition* 57 (2003), Nr. 5, S. 335–345

EU-Kommission: Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratroxin A, T-2- und HT-2- Toxin sowie von Fumonisinen in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen. In: *Amtsblatt der Europäischen Union* 229 (2006), S. 7–9

EU-Kommission: Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. In: *Amtsblatt der Europäischen Union* 354 (2006), S. 5–24

Fanning, A. S. ; Jameson, B. J. ; Jesaitis, L. A. ; Anderson, J. M.: The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 45, S. 29745–29753

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. In: *WHO Technical Report Series* 906 (2001), S. 35–42

Freeman, G. G. ; Morrison, R. I.: The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from Trichothecium roseum Link. In: *Biochemical Journal* 44 (1949), Nr. 1, S. 1–5

Fujita, H. ; Chiba, H. ; Yokozaki, H. ; Sakai, N. ; Sugimoto, K. ; Wada, T. ; Kojima, T. ; Yamashita, T. ; Sawada, N.: Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54 (2006), Nr. 8, S. 933–944

Galanos, Ch. ; Lüderitz, O. ; Rietschel, E. T. ; Westphal, O. ; Brade, H. ; Brade, L. ; Freudenberg, M. A. ; Schade, F. U. ; Imoto, M. ; Yoshimura, S. ; Kusumoto, S. ; Shiba, T.: Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. In: *European Journal of Biochemistry* 148 (1985), Nr. 1, S. 1–5

Ganey, P. E. ; Roth, R. A.: Concurrent inflammation as a determinant of susceptibility to toxicity from xenobiotic agents. In: *Toxicology* 169 (2001), Nr. 3, S. 195–208

GfE: *Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen*. DLG-Verlag Frankfurt/Main, 2006. – ISBN 3769006836

Gottardi, C. J. ; Arpin, M. ; Fanning, A. S. ; Louvard, D.: The junction-associated

protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Nr. 20, S. 10779–10784

Goyarts, T. ; Dänicke, S.: Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. In: *Toxicology Letters* 163 (2006), Nr. 3, S. 171–182

Goyarts, T. ; Dänicke, S. ; Tiemann, U. ; Rothkötter, H.-J.: Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes. In: *Toxicology in Vitro* 20 (2006), Nr. 6, S. 858–867

Goyarts, T. ; Grove, N. ; Dänicke, S.: 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. In: *Food and Chemical Toxicology* 44 (2006), Nr. 12, S. 1953–1965

Gregorieff, A. ; Clevers, H.: Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. In: *Genes & Development* 19 (2005), Nr. 8, S. 877–890

Grenier, B. ; Loureiro-Bracarense, A.-P. ; Lucioli, J. ; Pacheco, G. D. ; Cossalter, A.-M. ; Moll, W.-D. ; Schatzmayr, G. ; Oswald, I. P.: Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 55 (2011), Nr. 5, S. 761–771

Grove, J. F.: The trichothecenes and their biosynthesis. In: Herz, W. (Hrsg.) ; Falk, H. (Hrsg.) ; Kirby, G. W. (Hrsg.): *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* Bd. 88. Springer Vienna, 2007, S. 63–130. – ISBN 978-3-211-20688-1

Helander, I. M. ; Lindner, B. ; Brade, H. ; Altmann, K. ; Lindberg, A. A. ; Rietschel, E. T. ; Zähringer, U.: Chemical structure of the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae strain I-69 Rd-/b+. In: *European Journal of Biochemistry* 177 (1988), Nr. 3, S. 483–492

Herrenknecht, K. ; Ozawa, M. ; Eckerskorn, C. ; Lottspeich, F. ; Lenter, M. ; Kemler, R.: The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (1991), Nr. 20, S. 9156–9160

Hornef, M. W. ; Frisan, T. ; Vandewalle, A. ; Normark, S. ; Richter-Dahlfors, A.: Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. In: *Journal of Experimental Medicine* 195 (2002), Nr. 5, S. 559–570

Iordanov, M. S. ; Pribnow, D. ; Magun, J. L. ; Dinh, T.-H. ; Pearson, J. A. ; Chen, S. L. ; Magun, B. E.: Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. In: *Molecular and Cellular Biology* 17 (1997), Nr. 6, S. 3373–3381

Islam, Z. ; Pestka, J. J.: LPS priming potentiates and prolongs proinflammatory cytokine response to the trichothecene deoxynivalenol in the mouse. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 211 (2006), Nr. 1, S. 53–63

Itoh, M. ; Furuse, M. ; Morita, K. ; Kubota, K. ; Saitou, M. ; Tsukita, S.: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. In: *Journal of Cell Biology* 147 (1999), Nr. 6, S. 1351–1363

Itoh, M. ; Nagafuchi, A. ; Yonemura, S. ; Kitani-Yasuda, T. ; Tsukita, S.: The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. In: *Journal of Cell Biology* 121 (1993), Nr. 3, S. 491–502

Joffe, A. Z.: Fusarium poae and F. sporotrichioides as principal causal agents of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie, T. D. (Hrsg.) ; Morehouse, L. G. (Hrsg.): *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: an Encyclopaedic Handbook* Bd. 3. Marcel Dekker, 1978, S. 21–86

Kamphues, J.: Lipopolysaccharide in Futtermitteln -moegliche Bedeutung, Bestimmung und Gehalte-. In: *Uebersichten zur Tierernaehrung* 14 (1986)

Khalil, M. K.: *Small Intestines of the Pig*. 2008. – URL `http://www.onemedicine.tuskegee.edu/DigestiveSystem/Small_Instestine/Intest_Porcine.html`. – Zugriffsdatum: 07. 06. 2013

Kim, S. K.: Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling. In: *Current Opinion in Cell Biology* 7 (1995), Nr. 5, S. 641–649

Kolf-Clauw, M. ; Castellote, J. ; Joly, B. ; Bourges-Abella, N. ; Raymond-Letron, I. ; Pinton, P. ; Oswald, I. P.: Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. In: *Toxicology in Vitro* 23 (2009), Nr. 8, S. 1580–1584

Kraus, D. ; Winter, J. ; Jepsen, S. ; Jäger, A. ; Meyer, R. ; Deschner, J.: Interactions of adiponectin and lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis on human oral epithelial cells. In: *PloS One* 7 (2012), Nr. 2, S. e30716

Krause, G. ; Winkler, L. ; Mueller, S. L. ; Haseloff, R. F. ; Piontek, J. ; Blasig, I. E.: Structure and function of claudins. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (2008), Nr. 3, S. 631–645

Krens, S. F. G. ; Spaink, H. P. ; Snaar-Jagalska, B. E.: Functions of the MAPK family in vertebrate-development. In: *FEBS Letters* 580 (2006), Nr. 21, S. 4984–4990

Krug, S. M.: *Tricellulin und seine Funktion in der trizellulären Tight Junction von Epithelzellen*. Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertation, 2009

Kullik, K. ; Brosig, B. ; Kersten, S. ; Valenta, H. ; Diesing, A.-K. ; Panther, P. ; Reinhardt, N. ; Kluess, J. ; Rothkötter, H.-J. ; Breves, G. ; Dänicke,

S.: Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on tissue protein synthesis in pigs. In: *World Mycotoxin Journal* 6 (2013), Nr. 2, S. 185–197

Le Shen: Functional morphology of the gastrointestinal tract. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 337 (2009), S. 1–35

Li, F.-Q. ; Li, Y.-W. ; Luo, X.-Y. ; Yoshizawa, T.: Fusarium toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode. In: *Food Additives and Contaminants* 19 (2002), Nr. 2, S. 163–167

Liebich, H. G.: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. Schattauer Verlag, 2009. – ISBN 3794526929

Marchiando, A. M. ; Le Shen ; Graham, W. V. ; Edelblum, K. L. ; Duckworth, C. A. ; Guan, Y. ; Montrose, M. H. ; Turner, J. R. ; Watson, A. J. M.: The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. In: *Gastroenterology* 140 (2011), Nr. 4, S. 1208–1218.e1–2

Maresca, M. ; Mahfoud, R. ; Garmy, N. ; Fantini, J.: The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. In: *Journal of Nutrition* 132 (2002), Nr. 9, S. 2723–2731

Markov, A. G. ; Veshnyakova, A. ; Fromm, M. ; Amasheh, M. ; Amasheh, S.: Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. In: *Journal of Comparative Physiology B* 180 (2010), Nr. 4, S. 591–598

Marshall, J. C. ; Christou, N. V. ; Meakins, J. L.: The gastrointestinal tract. The „undrained abscess“ of multiple organ failure. In: *Annals of Surgery* 218 (1993), S. 111–119

McMullen, M. ; Jones, R. ; Gallenberg, D.: Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devasting impact. In: *Plant Disease* 81 (1997), S. 1340–1348

Menger, M. D. ; Vollmar, B.: Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research. In: *British Journal of Surgery* 83 (1996), Nr. 5, S. 588–601

Miller, J. D.: Epidemiology of Fusarium diseases of cereals. In: Miller, J. D. (Hrsg.) ; Trenholm, H. L. (Hrsg.): *Mycotoxins in grain: Compounds other than aflatoxin*. Eagan Press, 1994, S. 19–36. – ISBN 978-0962440755

Ministry of Agriculture and Food: *Diseases of Field Crops: Corn Diseases*. – URL `http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/pub811/14corn.htm`. – Zugriffsdatum: 12. 03. 2013

Mitic, L. L. ; Anderson, J. M.: Molecular architecture of tight junctions. In: *Annual Review of Physiology* (1998), S. 121–142

Moon, Y. ; Pestka, J. J.: Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 187 (2003), Nr. 2, S. 80–88

Moriez, R. ; Salvador-Cartier, C. ; Theodorou, V. ; Fioramonti, J. ; Eutamene, H. ; Bueno, L.: Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. In: *American Journal of Pathology* 167 (2005), Nr. 4, S. 1071–1079

Morin, P. J.: beta-catenin signaling and cancer. In: *BioEssays* 21 (1999), Nr. 12, S. 1021–1030

Morita, I. ; Aoyagi, K. ; Hayashi, Y. ; Shiga, H. ; Sakisaka, S.: Dysregulation of the barrier function in T84 intestinal epithelial cell monolayers through the modulation of tight junction localization by lipopolysaccharide. In: *Med. Bull. Fukuoka Univ.* 39 (2012), Nr. 2, S. 59–67

Morooka, N. ; Uratsuji, N. ; Yoshizawa, T. ; Yamamoto, H.: Studies on the toxic substances in barley infected with Fusarium spp. In: *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 13 (1972), S. 368–375

Munford, R. S.: Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. In: *Annual Review of Pathology* 1 (2006), S. 467–496

Nagar, B. ; Overduin, M. ; Ikura, M. ; Rini, J. M.: Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. In: *Nature* 380 (1996), Nr. 6572, S. 360–364

Naik, S. ; Kelly, E. J. ; Meijer, L. ; Pettersson, S. ; Sanderson, I. R.: Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 32 (2001), Nr. 4, S. 449–453

Näthke, I. S. ; Hinck, L. ; Swedlow, J. R. ; Papkoff, J. ; Nelson, W. J.: Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. In: *Journal of Cell Biology* 125 (1994), Nr. 6, S. 1341–1352

Naumann, C. ; Bassler, R.: *Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 6. Ergänzungslieferung 2006.* VDLUFA-Verlag Darmstadt, 1976. – ISBN 3-922712-94-0

Oldenburg, E. ; Bramm, A. ; Valenta, H.: Influence of nitrogen fertilization on deoxynivalenol contamination of winter wheat — experimental field trials and evaluation of analytical methods. In: *Mycotoxin Research* 23 (2007), Nr. 1, S. 7–12

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH: *Produktrückruf „Ziegler Käsetaler“ und „Ziegler Paprikataler“.* 2011. – URL `http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/produktwarnsystem/archiv-2011/produktrueckruf-ziegler-kaesetaler-und-ziegler-paprikataler/`. – Zugriffsdatum: 03. 06. 2013

Palmer, K. R. ; Duerden, B. I. ; Holdsworth, C. D.: Bacteriological and endotoxin studies in cases of ulcerative colitis submitted to surgery. In: *Gut* 21 (1980), Nr. 10, S. 851–854

Perkowski, J. ; Kiecana, I. ; Schumacher, U. ; Müller, H. M. ; Chełkowski, J. ; Goliński, P.: Head blight and biosynthesis of Fusarium toxins in barley kernels field inoculated with Fusarium culmorum. In: *European Journal of Plant Pathology* 102 (1996), Nr. 5, S. 491–496

Pestka, J. J.: Deoxynivalenol: Toxicity, mechanism and animal health risks. In: *ScienceDirect* (2007), S. 283–298

Pestka, J. J.: Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae. In: *Toxins* 2 (2010), Nr. 6, S. 1300–1317

Pestka, J. J. ; Smolinski, A. T.: Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. In: *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 8 (2005), Nr. 1, S. 39–69

Pfeiffer, R.: Untersuchungen über das Choleragift. In: *Medical Microbiology and Immunology* 11 (1892), Nr. 1, S. 393–412

Pinto, D. ; Clevers, H.: Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. In: *Experimental Cell Research* 306 (2005), Nr. 2, S. 357–363

Pinton, P. ; Braicu, C. ; Nougayrede, J.-P. ; Laffitte, J. ; Taranu, I. ; Oswald, I. P.: Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. In: *Journal of Nutrition* 140 (2010), Nr. 11, S. 1956–1962

Pinton, P. ; Nougayrède, J.-P. ; Del Rio, J.-C. ; Moreno, C. ; Marin, D. E. ; Ferrier, L. ; Bracarense, A.-P. ; Kolf-Clauw, M. ; Oswald, I. P.: The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 237 (2009), Nr. 1, S. 41–48

Poltorak, A. ; He, X. ; Smirnova, I. ; Liu, M. Y. ; van Huffel, C. ; Du, X. ; Birdwell, D. ; Alejos, E. ; Silva, M. ; Galanos, C. ; Freudenberg, M. ; Ricciardi-Castagnoli, P. ; Layton, B. ; Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (1998), Nr. 5396, S. 2085–2088

Pond, W. G. ; Mersmann, H. J.: *Biology of the domestic pig*. Comstock Pub. Associates, Cornell University Press, 2001. – ISBN 9780801434686

Porter, A. G. ; Jänicke, R. U.: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. In: *Cell Death and Differentiation* 6 (1999), Nr. 2, S. 99

Prelusky, D. B.: A study on the effect of deoxynivalenol on serotonin receptor binding in pig brain membranes. In: *Journal of Environmental Science & Health Part B* 31 (1996), Nr. 5, S. 1103–1117

Prelusky, D. B. ; Gerdes, R. G. ; Underhill, K. L. ; Rotter, B. A. ; Jui, P. Y. ; Trenholm, H. L.: Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig. In: *Natural Toxins* 2 (1994), Nr. 3, S. 97–104

Pugin, J. ; Schürer-Maly, C. C. ; Leturcq, D. ; Moriarty, A. ; Ulevitch, R. J. ; Tobias, P. S.: Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1993), Nr. 7, S. 2744–2748

Raetz, Ch. R. H.: Biochemistry of endotoxins. In: *Annual Review of Biochemistry* 59 (1990), Nr. 1, S. 129–170

Rahner, Ch. ; Mitic, L. L. ; Anderson, J. M.: Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. In: *Gastroenterology* 120 (2001), Nr. 2, S. 411–422

Richard, J. L.: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses–an overview. In: *International Journal of Food Microbiology* 119 (2007), Nr. 1-2, S. 3–10

Rietschel, E. T. ; Kirikae, T. ; Schade, F. U. ; Mamat, U. ; Schmidt, G. ; Loppnow, H. ; Ulmer, A. J. ; Zähringer, U. ; Seydel, U. ; Di Padova, F.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. In: *FASEB Journal* 8 (1994), Nr. 2, S. 217–225

Rodriguez-Boulan, E. ; Powell, S. K.: Polarity of epithelial and neuronal cells. In: *Annual Review of Cell Biology* 8 (1992), S. 395–427

Roth, R. A. ; Harkema, J. R. ; Pestka, J. P. ; Ganey, P. E.: Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 147 (1997), Nr. 2, S. 300–311

Rotter, B. A. ; Prelusky, D. B. ; Pestka, J. J.: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). In: *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 (1996), Nr. 1, S. 1–34

Sætre, T. ; Hovig, T. ; Røger, M. ; Gundersen, Y. ; Aasen, A. O.: Hepatocellular damage in porcine endotoxemia: beneficial effects of selective versus non-selective nitric oxide synthase inhibition? In: *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 61 (2001), Nr. 7, S. 503–512

Schletter, J. ; Heine, H. ; Ulmer, A. J. ; Rietschel, E. T.: Molecular mechanisms of endotoxin activity. In: *Archives of Microbiology* 164 (1995), Nr. 6, S. 383–389

Schmidt, A. ; Utepbergenov, D. I. ; Mueller, S. L. ; Beyermann, M. ; Schneider-Mergener, J. ; Krause, G. ; Blasig, I. E.: Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2004), Nr. 11, S. 1354–1365

Schuchert, A.: Schock. In: Arasteh, K. (Hrsg.) ; Baenkler, H. (Hrsg.) ; Bieber, Ch. (Hrsg.): *Duale Reihe Innere Medizin* Bd. 2. Thieme, 2009, S. 216–224. – ISBN 978-3-13-118162-6

Sergent, T. ; Parys, M. ; Garsou, S. ; Pussemier, L. ; Schneider, Y.-J. ; Larondelle, Y.: Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects

on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. In: *Toxicology Letters* 164 (2006), Nr. 2, S. 167–176

Shear, M. J. ; Turner, F. C.: Chemical treatment of tumors; isolation of hemorrhagic-producing fraction from Serratia marcescens (Bacillus prodigious) culture filtrate. In: *Journal of the National Cancer Institute* 4 (1943), S. 81–87

Shifrin, V. I. ; Anderson, P.: Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 20, S. 13985–13992

Simons, K. ; Fuller, S. D.: Cell surface polarity in epithelia. In: *Annual Review of Cell Biology* 1 (1985), S. 243–288

Sperandeo, P. ; Dehò, G. ; Polissi, A.: The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (2009), Nr. 7, S. 594–602

Stanek, C. ; Reinhardt, N. ; Diesing, A.-K. ; Nossol, C. ; Kahlert, S. ; Panther, P. ; Kluess, J. ; Rothkötter, H.-J. ; Kuester, D. ; Brosig, B. ; Kersten, S. ; Dänicke, S.: A chronic oral exposure of pigs with deoxynivalenol partially prevents the acute effects of lipopolysaccharides on hepatic histopathology and blood clinical chemistry. In: *Toxicology Letters* 215 (2012), Nr. 3, S. 193–200

Starzinski-Powitz, A. ; Handrow-Metzmacher, H. ; Kotzian, S.: The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? In: *Molecular Medicine Today* 5 (1999), Nr. 7, S. 304–309

Stevenson, B. R. ; Siliciano, J. D. ; Mooseker, M. S. ; Goodenough, D. A.: Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. In: *Journal of Cell Biology* 103 (1986), Nr. 3, S. 755–766

Sudakin, D. L.: Trichothecenes in the environment: relevance to human health. In: *Toxicology Letters* 143 (2003), Nr. 2, S. 97–107

Suffredini, A. F. ; Fantuzzi, G. ; Badolato, R. ; Oppenheim, J. J. ; O'Grady, N. P.: New insights into the biology of the acute phase response. In: *Journal of Clinical Immunology* 19 (1999), Nr. 4, S. 203–214

Sugita-Konishi, Y. ; Park, B. J. ; Kobayashi-Hattori, K. ; Tanaka, T. ; Chonan, T. ; Yoshikawa, K. ; Kumagai, S.: Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (2006), Nr. 7, S. 1764–1768

Sweet, M. J. ; Hume, D. A.: Endotoxin signal transduction in macrophages. In: *Journal of Leukocyte Biology* 60 (1996), Nr. 1, S. 8–26

Tai, J. H. ; Pestka, J. J.: Synergistic interaction between the trichothecene T-2 toxin

and Salmonella typhimurium lipopolysaccharide in C3H/HeN and C3H/HeJ mice. In: *Toxicology Letters* 44 (1988), Nr. 1-2, S. 191–200

Takeichi, M.: Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. In: *Annual Review of Biochemistry* 59 (1990), S. 237–252

Taylor, M. J. ; Lafarge-Frayssinet, C. ; Luster, M. I. ; Frayssinet, C.: Increased endotoxin sensitivity following T-2 toxin treatment is associated with increased absorption of endotoxin. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 109 (1991), Nr. 1, S. 51–59

Tiemann, U. ; Brüssow, K-P ; Jonas, L. ; Pöhland, R. ; Schneider, F. ; Dänicke, S.: Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected immunological and histological measurements in the spleen of gilts. In: *Journal of Animal Science* 84 (2006), Nr. 1, S. 236–245

Tiemann, U. ; Viergutz, T. ; Jonas, L. ; Schneider, F.: Influence of the mycotoxins alpha- and beta-zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells. In: *Reproductive Toxicology* 17 (2003), Nr. 2, S. 209–218

Tobias, P. S. ; Soldau, K. ; Iovine, N. M. ; Elsbach, P. ; Weiss, J.: Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 30, S. 18682–18685

Tumbleson, M. E. ; Schook, L. B.: *Advances in swine in biomedical research.* New York : Plenum Press, 1996. – ISBN 0306454955

Turner, P. C. ; Rothwell, J. A. ; White, K. L. M. ; Gong, Y. ; Cade, J. E. ; Wild, C. P.: Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United kingdom. In: *Environmental Health Perspectives* 116 (2008), Nr. 1, S. 21–25

Ueno, Y.: Mode of action of trichothecenes. In: *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* 31 (1977), Nr. 4-6, S. 885–900

Ueno, Y.: The toxicology of mycotoxins. In: *Critical Reviews in Toxicology* 14 (1985), Nr. 2, S. 99–132

University of Kentucky, College of Agriculture: *Fusarium head blight.* – URL `http://news.ca.uky.edu/image/fusarium-head-blight`. – Zugriffsdatum: 12. 03. 2013

Van de Walle, J. ; Sergent, T. ; Piront, N. ; Toussaint, O. ; Schneider, Y.-J. ; Larondelle, Y.: Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 245 (2010), Nr. 3, S. 291–298

Van Itallie, C. M. ; Anderson, J. M.: Claudins and epithelial paracellular transport. In: *Annual Review of Physiology* 68 (2006), Nr. 1, S. 403–429

Vesonder, R. F. ; Ciegler, A. ; Jensen, A. H.: Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn. In: *Applied Microbiology* 26 (1973), Nr. 6, S. 1008–1010

Walker, R. I. ; Porvaznik, M. J.: Disruption of the permeability barrier (zonula occludens) between intestinal epithelial cells by lethal doses of endotoxin. In: *Infection and Immunity* 21 (1978), Nr. 2, S. 655–658

Wang, Q. ; Margolis, B.: Apical junctional complexes and cell polarity. In: *Kidney International* 72 (2007), Nr. 12, S. 1448–1458

Wassef, A. ; Janardhan, K. ; Pearce, J. W. ; Singh, B.: Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. In: *Histology and Histopathology* 19 (2004), S. 1201–1208

Whetton, A. D. ; Spooncer, E.: Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. In: *Current Opinion in Cell Biology* 10 (1998), Nr. 6, S. 721–726

Wiersma, J. V. ; Peters, E. L. ; Hanson, M. A. ; Bouvette, R. J. ; Busch, R. H.: Fusarium head blight in hard red spring wheat: cultivar responses to natural epidemics. In: *Agronomy Journal* 88 (1996), Nr. 2, S. 223–230

Wilkinson, S. G.: Bacterial lipopolysaccharides–themes and variations. In: *Progress in Lipid Research* 35 (1996), Nr. 3, S. 283–343

Wittchen, E. S. ; Haskins, J. ; Stevenson, B. R.: Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 49, S. 35179–35185

Wright, S. D. ; Ramos, R. A. ; Tobias, P. S. ; Ulevitch, R. J. ; Mathison, J. C.: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In: *Science* 249 (1990), Nr. 4975, S. 1431–1433

Xu, W. ; Kimelman, D.: Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. In: *Journal of Cell Science* 120 (2007), Nr. Pt 19, S. 3337–3344

Yang, G.-H. ; Jarvis, B. B. ; Chung, Y.-J. ; Pestka, J. J.: Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 164 (2000), Nr. 2, S. 149–160

Ye, D. ; Ma, I. ; Ma, Th. Y.: Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. In: *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (2006), Nr. 3, S. G496–504

Yoshizawa, T.: Red-mold diseases and natural occurrence in Japan. In: Ueno, Y. (Hrsg.): *Trichothecenes: chemical, biological, and toxicological aspects.* Elsevier, 1983, S. 195–209

Zhou, H. R. ; Harkema, J. R. ; Yan, D. ; Pestka, J. J.: Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). In: *Journal of Toxicology and Environmental Health* 57 (1999), Nr. 2, S. 115–136

Anhang

A Futterzusammenstellung

Inhaltsstoffe (g/kg)	KON	DON
Gerste	569	569
Weizen	190	0
Kontaminierter Weizen	0	190
Sojaextraktionsschrot	180	180
Sojaöl	30	30
Dicalciumphosphat	3,5	3,5
L-Lysin-HCl	2,5	2,5
Prämix[1]	25	25

(a)

Analysierte Zusammensetzung (%)	Analyse-Verfahren	KON	DON
Rohprotein	Dumas-Verbrennungsmethode	17,4	17,0
Rohasche	Veraschung im Muffelofen	5,7	5,4
Rohfaser	Weender-Verfahren	5,3	4,9
Rohfett	Soxhlet-Verfahren	4,8	5,2
DON (mg/kg)	HPLC	$< 0,14$	3,1

(b)

Tabelle A.1: KON=Kontrollfutter; DON=DON-kontaminiertes Futter (basierend auf ein Trockensubstanzgehalt von 88 %).
(a) Zusammenstellung der Futtermischungen für wachsende Schweine gemäß der Empfehlungen der GfE (2006). [1]Inhalt je kg Futter: Ca 6, 13 g (als $CaCO_3$); P 1, 50 g (als $Ca(H_2PO_4)_2$); Na 1, 38 g (als $NaCl$); Mg 0, 25 g (als MgO); Fe 0, 100 mg (als $FeSO_4 \cdot 7H_2O$); Cu 25 mg (als $CuSO_4 \cdot 5H_2O$); Mn 50 mg (als MnO); Zn 100 mg (als ZnO), I 1, 25 mg [als $Ca(IO_3)_2$]; Se 0, 38 mg (als Na_2SeO_3); Co 0, 50 mg (als $CoCO_3$); Vitamin A 10000 IU; Vitamin D_3 1000 IU; Vitamin E 39 mg; Vitamin B_1 0, 94 mg; Vitamin B_2 2, 50 mg; Vitamin B_6 2, 50 mg; Vitamin B_{12} 18, 75 µg; Vitamin K_3 1, 31 mg; Nicotinsäure 12, 5 mg; Pantothensäure 125 mg; Cholinchlorid 125 mg.
(b) Analyse der Futtermischungen nach den Methoden des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA, Naumann und Bassler 1976, Stand 2006). Für die Bestimmung des DON-Gehaltes wurde DON aus den Proben extrahiert und über eine DONPREP®Immunaffinitätssäule (R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) gereinigt. Anschließend wurde der Gehalt des Mykotoxins mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) analysiert. Das Verfahren, gemäß der Hersteller-Anleitung (R-Biopharm), wurde geringfügig nach Oldenburg et al. (2007) modifiziert.

B Protokoll zur operativen Anlage der Jugularis-Katheter

- Durchführung der Operation (OP) am Institut für Tierernährung des Friedrich-Löffler-Institutes (FLI) in Braunschweig, Dauer: 60-90 min
- Zur Anästhesie Gabe von:
  - 0,125 ml / kg LM Ketamin (Ursotamin®, 100 mg / mL, Serumwerk Bernburg AG, Deutschland), intramuskulär (Nacken)
  - 0,05 ml / kg LM Azaperon (Stresnil®, 40 mg / mL, Jansen, Neuss, Deutschland), intramuskulär (Nacken)
  - 0,3 ml / kg LM Thiopental (Trapanal®, 1 g / 20 mL, Inresa GmbH, Freiburg, Deutschland), intravenös (laterale Ohrvene)
- Anpassung der Dosis für Ketamin und Thiopental in Abhängigkeit von ihrer Wirksamkeit, Aufrechterhaltung der Anästhesie mit Thiopental
- Rückenlagerung und Fixierung der gestreckten Gliedmaßen
- Schaffung steriler Bedingungen
  - Rasieren und Desinfizieren des OP-Gebietes
  - Abdecken des OP-Gebietes mit sterilen Tüchern
- Freipräparation der rechten *Vena jugularis externa*, ausgehend von der *Fossa jugularis dextra*
  - Durchführung einer ≈ 5 cm langen Inzision am ventralen Hals zwischen *Angulus mandibulae* und *Manubrium sterni*
  - Dissektion der Faszien-, Fett- und Muskelschicht
  - Aufsuchen der rechten *Vena jugularis externa*
- Kanülierung der rechten externen Jugularvene mit einer sterilen Magensonde aus Polyurethan (CH 08, Länge: 60 cm, ∅ : 2,67 mm, Nutrica, Niederlande)
- Vorführen des Katheters bis ≈ 15 cm vor das Herz unter Abbindung des kranialen Anteils der *Vena jugularis*
- Untertunnelung der Haut bis zum Nacken, Ausführung des Katheters und Fixierung durch Naht

- Aufsprühen von Aluminium-Spray zur Desinfektion
- Anlage des linken Jugularvenen-Katheters analog zum rechten
- Zur Sicherstellung der Durchgängigkeit Gabe von Heparin, gelöst in isotonischer Kochsalzlösung
- Postoperative Schmerztherapie durch intramuskuläre Applikation von 1 ml Carprofen (Rimadyl®, 50 mg / mL, Pfizer)

C Protokoll zur Herstellung der Infusionslösungen

Anmischen der DON-Stammlösung

- Material:
  - DON (D0156, Sigma-Aldrich, Deutschland), 5 mg, Pulverform
  - Acetonitril
  - NaCl 0,9 %, steril
  - Sterile Gefäße
- Herstellung
  - Auflösen von 5 mg DON in 5 ml Acetonitril $\hat{=}$ Konzentration von 1 mg / mL
  - Anfertigen eines 1 ml Aliquots und Lagerung bei -20°C
  - Einengen von eines 1 ml Aliquots mit Stickstoff bis zur vollständigen Trocknung
  - Resuspendieren des nicht sichtbaren Pellets in 5 ml steriler 0,9% NaCl-Lösung, ggf. zur besseren Suspendierung für 2-3 min im Ultraschallbad $\hat{=}$ 0,2 mg / mL Stammlösung
  - Aliquotieren der Stammlösung: 10 x 100 µl und 8 x 500 µl
  - Lagerung bei -20°C

Anmischen der LPS-Stammlösung

- Material:
  - LPS (Escherichia coli O111:B4, L2630, Sigma Aldrich, Deutschland), 100 mg, Pulverform
  - NaCl 0,9 %, steril
  - Sterile Gefäße
- Herstellung:
  - Auflösen von 100 mg LPS in 50 ml 0,9 % NaCl-Lösung $\hat{=}$ Konzentration von 2 mg / mL

- Sterile Filtration
- Aliquotieren der Stammlösung
- Lagerung bei -20°C

Berechnung der individuellen, gewichtsadaptierten Infusionslösungen

- Die Verabreichung der DON-/LPS-Stammlösung erfolgte gewichtsadaptiert
- Im Zeitraum von 1 h wurden 50 ml infundiert
- Berechnung der LPS-Infusionslösung anhand eines Beispiels (Tab. C.1)

***c* LPS (µg / kg LM)**	**Menge LPS (µg)**	***V* Infusion (ml)**	***c* (µg / mL)**	***V* Stamm-lösung LPS (µl)**	***V* 0,9 % NaCl (µl)**
7,5	285	50	5,7	142,5	4857,5

Tabelle C.1: Beispiel für die Berechnung der LPS-Infusionslösung für ein Tier mit einer LM von 38 kg. c =Konzentration, V =Volumen.

D Protokoll zur Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten

- Material:
  - feuchte Kammer
  - Küvetten
  - PAP-Pen
  - 0,1 M PB
  - Antikörper (AK) (Tab.D.1)
  - Eindeckmedium, (Mowiol, Calbiochem)

Antikörper	**Spezifikation**	**Verdünnung**	**Hersteller**	**Katalog-Nr.**
Anti-ZO-1	Kaninchen IgG	1:100	Invitrogen	40-2200
Anti-β-Catenin	Maus IgG_1	1:1500	Abcam	ab22656
Anti-Kaninchen IgG Alexa 488	Esel IgG	1:200	Invitrogen	A21206
Anti-Maus IgG_1 TexasRed	Ziege IgG	1:200	Biozol	1070-07

Tabelle D.1: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und β-Catenin.

- Vorbereitung:
  - AK zentrifugieren (10 min, 12400 rpm)
  - Anmischen der AK mit AK-Verdünnungspuffer (steril filtriert, Kühlschrank)
  - Anmischen des Serums in AK-Verdünnungspuffer
  - Präparate 15-30 min auftauen lassen
  - Objektträger beschriften und Präparate mit PAP-Pen umkreisen
- Fixierung und Blockierung:
  - 2 min in Methanol-Aceton (in Küvetten) fixieren (Fixierlösung aus dem Kühlschrank, 4°C)
  - 5 min in 0,1 M PB spülen, Puffer zwischendurch wechseln
  - 5 min mit 0,3 % Triton X100 (Sigma) permeabilisieren
  - 5 min in 0,1 M PB spülen, Puffer zwischendurch wechseln

  - Präparate zum Schutz vor Austrocknung in feuchte Kammer legen
  - 10 min mit 10 % Serum blockieren
  - 5 min in 0,1 M PB spülen
- Inkubation mit dem primären AK:
  - Präparate in feuchte Kammer legen
  - Je 200 µl des jeweiligen AK auf das Präparat pipettieren
  - 2 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler stellen
  - Zweimalig 5 min in 0,1 M PB spülen
- Inkubation mit dem sekundären AK:
  - Objektträger antrocknen lassen, in feuchte Kammer legen
  - Je 200 µl des jeweiligen AK auf das Präparat pipettieren
  - 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler stellen
  - Zweimalig 5 min in 0,1 M PB spülen
- DAPI:
  - Anmischen (1 : 10) aus DAPI-Stammlösung (Partec) in 0,1 M PB
  - Je 200 µl auf das Präparat pipettieren
  - Präparate in feuchte Kammer legen
  - 5 min bei Raumtemperatur auf den Schüttler stellen
  - Zweimalig 5 min in 0,1 M PB spülen
- Eindecken und Versiegeln:
  - Objektträger gut abtropfen lassen
  - Eindeckmedium darauf geben
  - Deckglas (24 mm x 60 mm) vorsichtig darauf legen
  - In den Kühlschrank stellen (mind. 1 h)
  - Mit Nagellack Deckglas umranden, trocknen lassen
  - Lagerung im Kühlschrank

E Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung

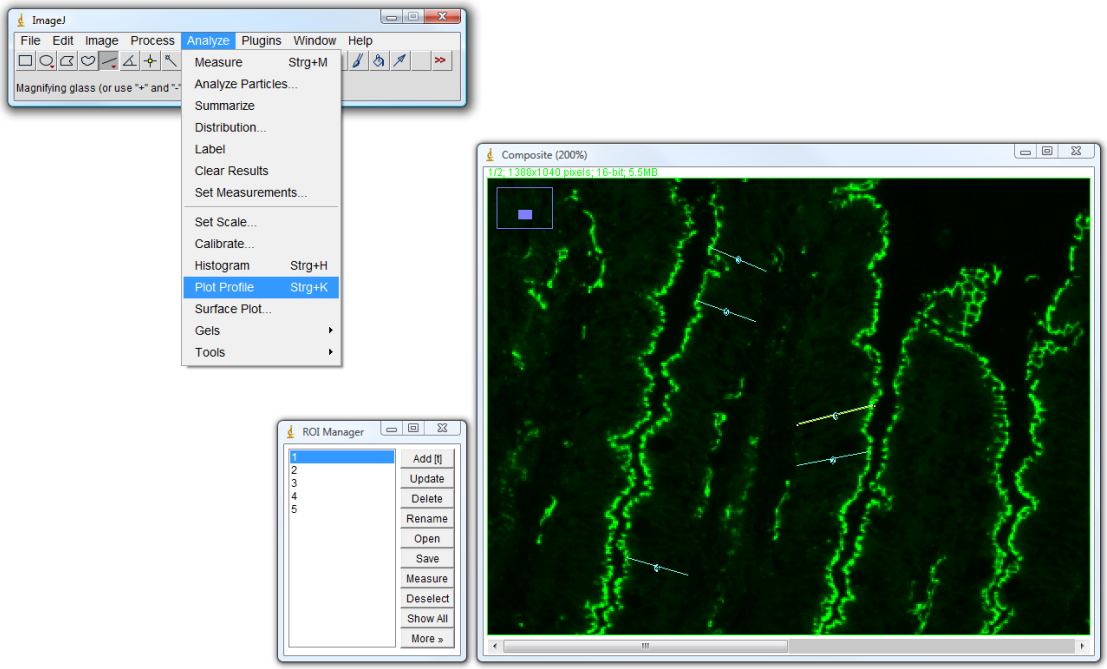


Abbildung E.1: Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung, Schritt 1. Das Epifluoreszenzbild wird in 100-facher Vergrößerung fotografiert. Für die Messung der ZO-1-Expression im Epithel wird das Programm ImageJ verwendet. Zur Objektivierung der ZO-1-Verteilung wird je eine Linie, die sogenannten *line of interest*, von apikal nach basolateral durch fünf Enterozyten derselben Zotte gezogen. Diese stellen fünf Messwiederholungen je Zotte dar und werden im „ROI Manager“ mit „1-5“ bezeichnet. Im Anschluss wird der Befehl „Plot Profile“ ausgeführt.

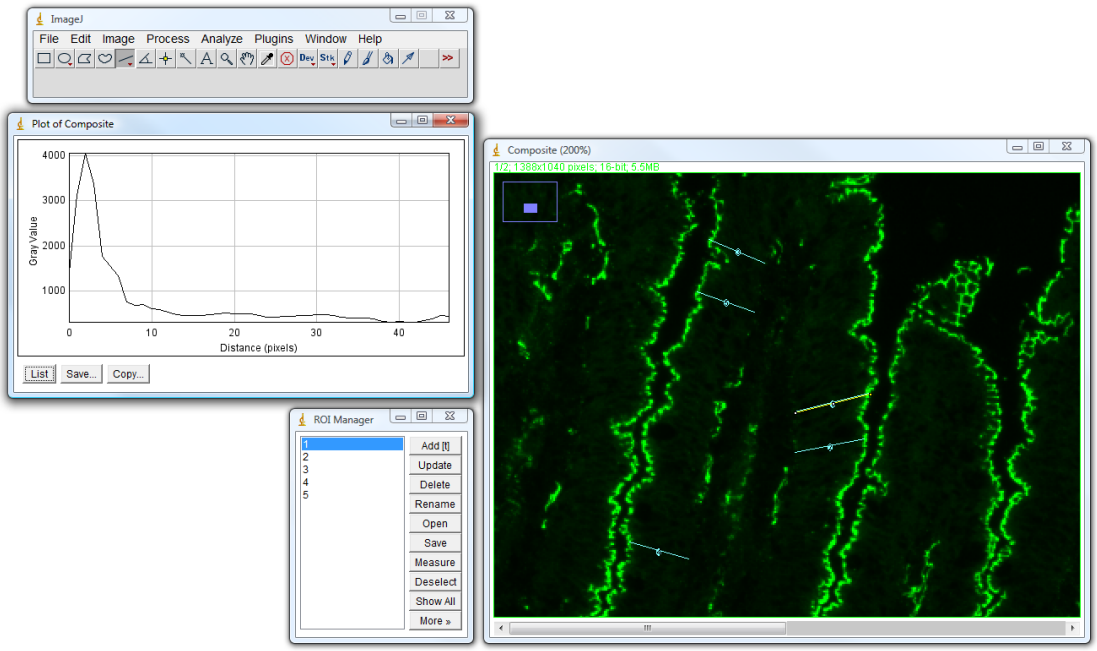


Abbildung E.2: Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung, Schritt 2. Über den Befehl „Plot Profile“ des Programms wird eine Grafik mit den Fluoreszenzintensitäten entlang der LOI „1“ erstellt. Die Intensitäten werden als Grauwerte auf der Y-Achse und die Länge der LOI ($1\,\text{Pixel} \mathrel{\hat{=}} \text{ca. } 0,74\,\mu\text{m}$) wird auf der X-Achse abgetragen. Im Anschluss wird der Befehl „List“ ausgeführt.

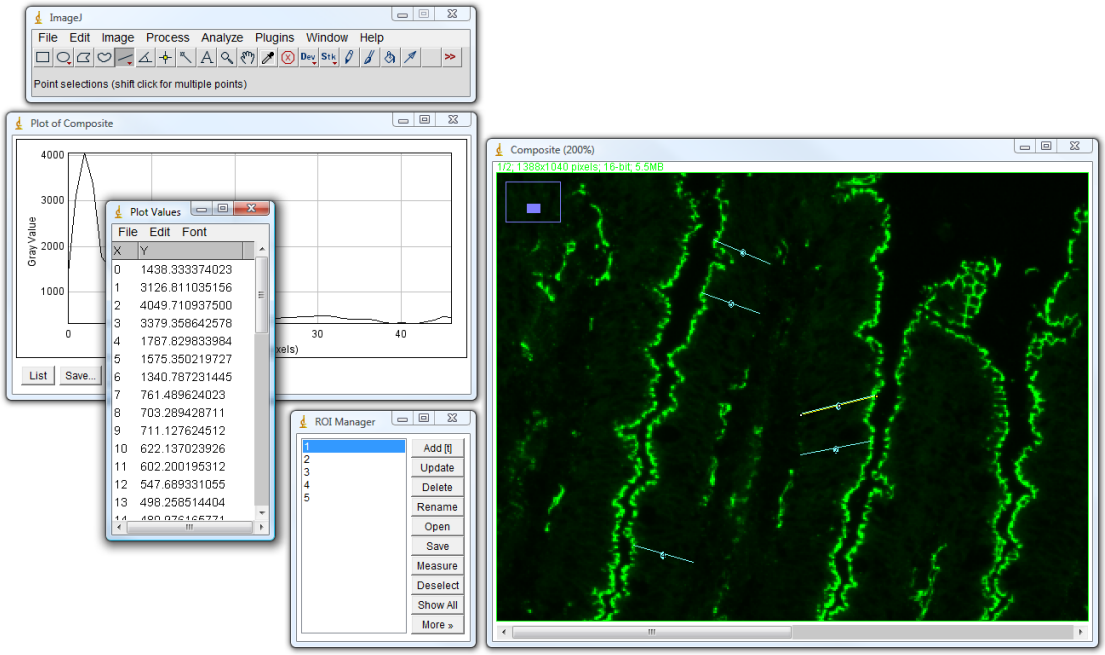


Abbildung E.3: Methode zur Auswertung der ZO-1-Verteilung, Schritt 3. Über den Befehl „List“ werden die Wertepaare dieser Grafik aufgeführt. Im Anschluss können diese unter Verwendung von Excel in einen XY-Graphen aufgetragen werden. Dieses Vorgehen wird für die anderen vier LOIs in gleicher Weise durchgeführt.

Danksagung

Der erste Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter für die Überlassung des überaus interessanten Themas, die anregenden Diskussionen sowie die Ermöglichung der im Rahmen dieser Promotion entstandenen Publikation. Recht herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Jeannette Klüß bedanken. Ihre mir zu jeder Zeit entgegengebrachte Unterstützung, die überaus aufschlussreichen Diskussionen sowie die vielen Hinweise und Ratschläge zum wissenschaftlichen Arbeiten, zur Erstellung der Publikation und Dissertation verpflichten mich zu besonderem Dank. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Stefan Kahlert für seine fachliche und technische Unterstützung. Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Sven Dänicke möchte ich mich für die konstruktive Kritik bei der Erstellung der Publikation und die Unterstützung bei statistischen Problemstellungen bedanken. Mein Dank gilt den TAs des Institutes für Anatomie, insbesondere Frau Brigitte Ketzler, für die technische Unterstützung im Labor sowie Frau Ursula Wiegand für die immer zügige Beschaffung der Literatur und den nie endenden Lesestoff.

Meiner Freundin Cassandra Stanek möchte ich ganz herzlich für die vielen aufmunternden Telefonate danken, die mir eine große Unterstützung waren und so manche Tage erheiterten.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken. Ich widme diese Arbeit meinen lieben Eltern, die mir alles ermöglicht haben. Durch ihre liebevolle Unterstützung wurde meine Studentenzeit zu einem wunderbaren Lebensabschnitt, an den ich mich mit Freuden zurückerinnern werde. Meinen lieben Geschwistern Rudyard, Lydmar und Thurid danke ich für ihre aufmunternden und anspornenden Worte sowie die ein oder andere Korrektur. Ganz herzlich möchte ich meinem Partner Danilo Briese für all seine Unterstützung danken. Durch seine technisch versierte und geduldige Hilfe hat diese Arbeit ihre Gestalt angenommen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Klunker
Vornamen	Leslie Raja
Geburtsdatum/-ort	14.02.1987 in Halle (Saale)
Nationalität	Deutsch

Beruf

seit 07/2013	Helmut-G.-Walther-Klinikum Lichtenfels, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

Promotion

01/13–09/13	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Promotionsstudentin
01/13–04/13	Medizinische Fakultät Magdeburg, Stipendiatin im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe
seit 10/10	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Promovendin am Institut für Anatomie

Studium

12/12	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/11–07/12	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg, Praktisches Jahr
08/11–12/12	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg, Weiterführung Studium der Humanmedizin
09/08–08/11	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt
09/08	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/06–09/08	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt

Schule

07/06	Allgemeine Hochschulreife
08/99–07/06	GutsMuths-Gymnasium Quedlinburg
08/97–07/99	Sekundarschule Günthersberge
08/93–07/97	Grundschule Friedrichsbrunn

Bamberg, 11. März 2014

Leslie Raja Klunker

Veröffentlichungen

Publikationen

- DÄNICKE, S. ; BROSIG, B. ; **KLUNKER, L. R.** ; KAHLERT, S. ; KLUESS, J. W. ; DÖLL, S. ; VALENTA, H. ; ROTHKÖTTER, H.-J.: Systemic and local effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) are not alleviated by dietary supplementation of humic substances (HS). In: *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012), Nr. 3-4, S. 979-988
- **KLUNKER, L. R.** ; KAHLERT, S. ; PANTHER, P. ; DIESING, A.-K. ; REINHARDT, N. ; BROSIG, B. ; KERSTEN, S. ; DÄNICKE, S. ; ROTHKÖTTER, H.-J. ; KLUESS, J. W.: Deoxynivalenol and E.coli lipopolysaccharide alter epithelial proliferation and spatial distribution of apical junction proteins along the small intestinal axis. In: *Journal of Animal Science* 91 (2012), Nr. 1, S. 276-85

Abstract

- KLUESS, J. W. ; **KLUNKER, L. R.** ; WALK, N. ; NOSSOL, C. ; KAHLERT, S. ; DÄNICKE, S. ; ROTHKÖTTER, H.-J.: The effect of mycotoxin deoxynivalenol and E.coli lipopolysaccharide on small intestinal morphology and zonula occludens-1 protein in vivo. 28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 28.09.-30.09.2011

Poster

- KLUESS, J. W. ; **KLUNKER, L. R.** ; WALK, N. ; NOSSOL, C. ; KAHLERT, S. ; BROSIG, B. ; KERSTEN, S. ; DÄNICKE, S. ; ROTHKÖTTER, H.-J.: Deoxynivalenol and LPS affect porcine small intestinal integrity along the proximo-distal axis. 34th Mycotoxin Workshop, Braunschweig, 14.05.-16.05.2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Einfluss von Deoxynivalenol und *E.coli*-Lipopolysaccharid auf die Expression von ZO-1 und β-Catenin im Dünndarm des Schweins“

im Institut für Anatomie unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. H.-J. Rothkötter und Frau Dr. med. vet. J. Klüß ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit allein und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Veröffentlichungen entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Bamberg, 11. März 2014

Leslie Raja Klunker