

Sojabohnenprotein P34: Aufreinigung, Verdauung und epithelialer Transport im enteralen Zellkulturmodell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

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

von Dipl. troph. Eva Sewekow

geboren am 17.11.1980 in Berlin

Gutachter: Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter
PD Dr. Sven Dänicke

eingereicht am: 17. April 2008
verteidigt am: 17. Oktober 2008

für Frieda

I Inhaltsverzeichnis

II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1	LITERATURÜBERSICHT	7
1.1	Die intestinale Schleimhaut: Zellen, Darmimmunsystem und Antigenaufnahme	7
1.1.1	Epithel, Enterozyten und Antigentransport	9
1.1.1.1	Barrierefunktion des Epithels	9
1.1.1.2	Entwicklung des Intestinum	10
1.1.1.3	Endozytosemechanismen	10
1.1.1.4	Antigentransport und enterozytäre Rezeptoren	12
1.1.1.5	Antigenpräsentation	13
1.1.1.6	Zytokinproduktion	14
1.1.2	M-Zellen im FAE	14
1.1.3	Dendritische Zellen Epithel-nah	15
1.2	Das Allergen P34 der Sojabohne als Beispielantigen	15
1.2.1	Allergene	15
1.2.2	Sojaallergie und Sojabohnenallergene	16
1.2.2.1	Das Protein P34	17
1.2.3	Verändern der Allergenität von Proteinen	19
1.2.4	Die Verdauung von Proteinen im Gastrointestinaltrakt	20
2	ZIELSTELLUNG	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Material	23
3.1.1	Protein P34	23
3.1.2	Wasser, Puffer, Salze	23
3.2	Methoden	23
3.2.1	P34-Aufreinigung	23
3.2.1.1	Zentrifugationsprotokoll	23
3.2.1.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	24
3.2.1.3	HIC-Phasenauswahlexperimente	24
3.2.1.4	Chromatographische Separation	24
3.2.1.5	P34-Antikörperserum	25
3.2.2	Zellkultur	25
3.2.2.1	Kultur von IPEC-Zellen	26
3.2.2.2	Herstellen von PBMCs	26
3.2.2.3	MoDCs	27
3.2.2.4	Versuche Zellkultur	27
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	29
3.2.3.1	Aufkonzentrieren von Proteinproben	29
3.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	30
3.2.3.3	Nachweis der Glykosylierung	30
3.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli 1970	30

3.2.3.5	Blotten von Acrylamidgelen und Immunfärbung	31
3.2.3.6	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	31
3.2.3.7	RNA-Isolation mit Trizol	31
3.2.3.8	Reverse Transkription	32
3.2.3.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
3.2.4	Färbeprotokolle	33
3.2.4.1	Elektronenmikroskopie von IPEC-J2 und P34	33
3.2.4.2	Immunfärbung auf Zellen	34
3.2.4.3	Cytospots	34
3.2.4.4	Histologische Färbung	34
3.2.5	Weitere Methoden	35
3.2.5.1	Dichtegradientenultrazentrifugation	35
3.2.5.2	MTT-Test	36
3.2.5.3	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	36
3.2.5.4	<i>In vitro</i> Verdauung nach Boisen und Miller	37
3.2.5.5	In Gel Verdau und Massenspektrometrie	37
3.2.5.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie	38
4	RESULTATE	39
4.1	P34 Aufreinigung	39
4.1.1	Zentrifugationsprotokoll	39
4.1.2	Auswahl der HIC-Phase	40
4.1.3	Säulenvergrößerungsschritte	41
4.1.4	Identifikation von P34	45
4.1.5	P34-Antikörperserum	45
4.2	P34 passiert die Verdauung <i>in vitro</i>	46
4.3	P34-Antikörper im Serum von Schweinen	47
4.4	Proteinaufnahme in und Durchtritt durch die Enterozyten	48
4.4.1	Abhängigkeit der Oberflächenbindung von P34 von der Glykosylierung	50
4.4.2	<i>Caveolae</i> -vermittelte Endozytose	53
4.4.3	Abhängigkeit der Endozytose von der Zeit, der P34 Konzentration und dem Alter der IPEC-J2 Zellen	55
4.4.4	Transzytose von P34	62
4.5	Zytokinexpression von Epithelzellen nach Inkubation mit P34	63
4.6	Immunmodulatorische Wirkung von P34 auf PBMCs und MoDCs	65
4.6.1	Dendritische Zellen (MoDCs)	65
4.6.2	Stoffwechselaktivität von PBMCs	66
5	DISKUSSION	69
5.1	Aufreinigung von P34	69
5.2	P34 erreicht die intestinalen Epithelzellen <i>in vitro</i>	72
5.3	P34 Endozytose in Enterozyten und Transzytose durch Enterozyten	75
5.3.1	Endozytosemechanismus für P34	75
5.3.2	Abhängigkeit der P34 Endozytose von der Zeit, der Konzentration und dem Alter der IPEC-J2 Zellen	78
5.3.3	Oberflächenbindung	79

	INHALTSVERZEICHNIS	3
5.3.4	Transzytose	81
5.4	Epitheliale Zytokine nach Inkubation mit P34	82
5.5	Wirkung von P34 auf Immunzellen und antigenpräsentierende Zellen	84
5.5.1	Stoffwechselaktivität von PBMCs	84
5.5.2	Antigenendozytose und -präsentation durch MoDCs	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	87
7	LITERATURVERZEICHNIS	89
III	ANHANG	107
	1. Puffer und Lösungen	107
	2. Filter für die Fluoreszenzmikroskopie	110
	3. Masse von P34	111
	4. P34-Lagerung	112
IV	DANKSAGUNG	113
V	LEBENS LAUF	115

II Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>antigen presenting cell</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Caco-2	<i>human colon adenocarcinoma cell line-2</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Con A	Concanavalin A
Ctx	Choleratoxin
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2'-Deoxynucleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanner</i>
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
Gly m Bd	<i>Glycine max band</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEC-1, -J2	<i>intestinal porcine epithelial cell line -1, -J2</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte colony- stimulating factor</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	<i>magnetic cell sorting and separation</i>
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
MCP-1	<i>monocyte chemoattractand protein-1</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC I / II	<i>major histocompatibility complex class I / II</i>
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MoDC	<i>monocyte derived dendritic cell</i>
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PB	Phosphatpuffer
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS-Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEPT1	Peptidtransporter 1

PI	Propidiumiodid
PNGase A / F	<i>Peptide-N-Glycosidase A / F</i>
PP	Peyersche Plaques
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg Einheit
SDS	Sodiumdodecylsulfat
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SS	Schweineserum
SV 40	Simian Virus 40
SWC	<i>swine workshop cluster</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th1 / Th2	T-Helferzelle 1 / 2
TJ	<i>tight junctions</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF- α	<i>tumour necrosis factor alpha</i>

1 Literaturübersicht

Die intestinale Schleimhaut hat eine große Oberfläche, die permanent Kontakt zu Nahrungsantigenen hat. Sie muss Nährstoffe und Abbauprodukte enzymatischer Verdauung absorbieren und als Barriere gegen nicht erwünschte Antigene dienen. Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit dem Sojabohnenallergen P34, dessen Verdauung und dessen Transport durch das Dünndarmepithel. Daher wird in der folgenden thematischen Einführung zunächst zusammengefasst wie die intestinale Schleimhaut aufgebaut ist und wie Antigene diese passieren können. Im zweiten Teil der Einleitung wird das Allergen P34 der Sojabohne als Beispielantigen vorgestellt.

1.1 Die intestinale Schleimhaut: Zellen, Darmimmunsystem und Antigenaufnahme

Die Dünndarmschleimhaut besteht aus einschichtigem Epithel, einer Bindegewebsschicht und eigener Muskulatur. Sie ist umgeben von einer Ring- und einer Längsmuskulatur, die durch zwei Nervengeflechte innerviert und versorgt werden sowie dem Mesenterium, was für Aufhängung und Versorgungsleitung nötig ist. Die Schleimhaut des Dünndarms ist primär auf die Nährstoffabsorption ausgerichtet (Snoeck et al. 2005, Schneeman 2002). Die Oberfläche ist dafür durch Falten, Zotten (Villi) und den Bürstensaum der Enterozyten (Mikrovilli) vergrößert. Das Epithel der Zotten (Villus-epithel) besteht zum Zwecke der Aufnahme aus der Nahrung stammender Substanzen aus absorptiven Epithelzellen (Enterozyten), Becherzellen und enteroendokrinen Zellen (Neutra et al. 2001). Die Endprodukte enzymatischer Verdauung erreichen die Enterozyten über den Verdauungstrakt. Membranständige Transportproteine transportieren die Nährstoffe genauso wie Vitamine, Mineralstoffe und Elektrolyte aktiv in die Enterozyten. Es findet auch passiver Transport wie die Diffusion lipophiler Moleküle statt (transzellulär). Und es passieren wasserlösliche kleine hydrophile Moleküle die *Tight Junctions* zwischen den Enterozyten (parazellulär, Cummings et al. 2004).

Die Funktion der Dünndarmschleimhaut beschränkt sich nicht nur auf die Nährstoffabsorption. Die intestinale Schleimhaut muss ebenfalls zwischen invasiven Pathogenen und unschädlichen Nahrungsantigenen, wichtigen Makromolekülen (wie Wachstumsfaktoren) sowie kommensalen Bakterien differenzieren (Snoeck et al. 2005, Mowat 2003). Einerseits kann die Barrierefunktion des Epithels die Menge an übertretenden Antigenen limitieren (Snoeck et al. 2005), andererseits realisiert die Schleimhaut in bestimmten Bereichen den schnellen Transport unprozessierter Antigene durch spezialisierte Zellen (M-Zellen, *microfold cells*) zu lymphatischen Geweben / Lymphfollikeln (Gebert et al. 2000, Salminen et al. 1998). Hierdurch kann eine permanente immunologische Überwachung des Darmlumens realisiert werden (Snoeck et al. 2005).

Die M-Zellen liegen im Bereich des Follikel-assoziierten Epithels (FAE). Hier befinden sich kaum Becherzellen oder enteroendokrine Zellen (Neutra et al. 2001). Das Follikel-assoziierte Epithel liegt oberhalb von lymphatischem Gewebe im Darm und wölbt sich wie eine Kuppel ins Darmlumen (*Dome*). Die Aggregate lymphatischen Gewebes der Submukosa werden auch Peyersche Plaques (PP) genannt. Beim Menschen gibt es etwa 200 Peyersche Plaques im Dünndarm. Sie sind am häufigsten im Ileum, aber auch im Jejunum und Duodenum zu finden (Gebert et al. 2000). Zusammen mit den mesenterialen Lymphknoten zählen sie zu den organisierten Geweben des Darmimmunsystems (GALT *gut associated lymphoid tissue*). Die in der Lamina propria und dem Epithel verteilten Lymphozyten (Lamina propria Lymphozyten und intraepitheliale Lymphozyten) sind die Effektoren des Darmimmunsystems (Ganusov und De Boer 2007, Mowat 2003, Rothkötter et al. 1999). Beispielsweise sind beim 14 Monate alten Schwein $7 \cdot 10^9$ intraepitheliale und Lamina propria Lymphozyten je Meter Dünndarm zu finden (Rothkötter et al. 1994).

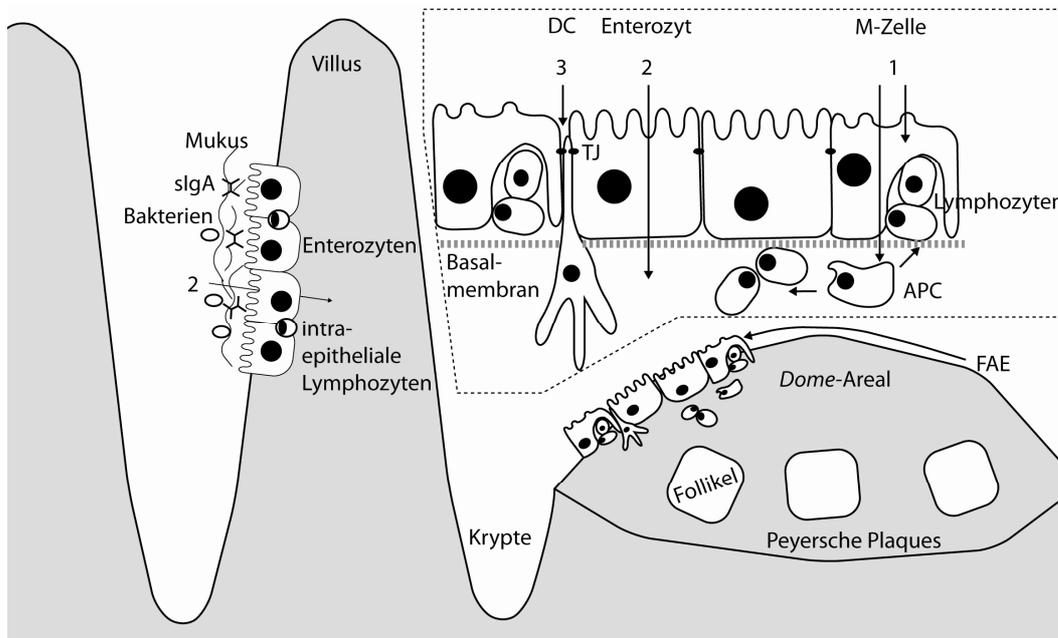


Abbildung 1: Wege des Antigens durch das Epithel, Darstellung von Villusepithel und Follikel-assoziiertem Epithel (FAE): die Wege sind **1.** Transport durch die M-Zelle, **2.** Transzytose durch den Enterozyten und **3.** Aufnahme durch den Dendriten einer Dendritischen Zelle. Dendritische Zellen befinden sich als antigenpräsentierende Zellen auch im Villus. Die Zellen sind beispielhaft dargestellt und entsprechen zueinander nicht ihren natürlichen Größenverhältnissen. (Abkürzungen: TJ – *tight junction*, sIgA – sekretorisches Immunglobulin A, APC – *antigen presenting cell*, DC – *dendritic cell*). Die Abbildung wurde adaptiert nach Niedergang und Kweon (2005), Mowat (2003) und Nagler-Andersohn (2001).

Die Sensibilisierung durch ein unbekanntes Allergen geschieht, indem es durch die Darmschleimhaut, vor allem die M-Zellen, absorbiert wird, anschließend durch Immunzellen prozessiert und dann dem Immunsystem präsentiert wird (Helm et al. 2003, Gebert et al. 2000). Ob Allergene bzw. Antigene hauptsächlich über die M-Zellen Peyerscher Plaques transportiert werden ist unbekannt, denn Enterozyten sind ebenfalls aktiv an deren Transport beteiligt (siehe Heyman 2005). Neben den Enterozyten und M-Zellen kommen auch Dendritische Zellen für die Aufnahme luminaler Antigene in Frage

(siehe Abbildung 1). In den folgenden Abschnitten werden die Aufnahme- bzw. Transportmechanismen besprochen. Da sich diese Arbeit dem enterozytären Transport widmet, befasst sich der Hauptteil des Textes mit dem Villusepithel und den Enterozyten.

1.1.1 Epithel, Enterozyten und Antigentransport

Das Epithel besteht aus absorbierenden polarisierten Zellen, den Enterozyten. Sie sind miteinander durch *Tight Junctions* verbunden (Heyman 2001). Die luminale (apikale) Oberfläche ist mit Mikrovilli besetzt, es liegt ihr im Intestinum eine Mukusschicht aus Glykoproteinen auf (Mowat 2003). Auf der serosalen (basolateralen) Zelleseite grenzen die Zellen an die Basalmembran. Die Enterozyten haben Nährstoffabsorptionsfunktion. Ihre weiteren Funktionen sind vielfältig: Sie transportieren Antigene, präsentieren diese (in einigen Spezies) und sind Sensoren ihrer Umgebung durch Rezeptoren für bakterielle und virale Produkte an ihrer lumenwärtigen Zelloberfläche (Cummings et al. 2004, siehe Abschnitte 1.1.1.4-1.1.1.5). Sie sind durch die Produktion von Zytokinen aktiv an immunologischen Reaktionen im Darm beteiligt. Ob und wie Antigene und Allergene das Epithel passieren, hängt von dessen Barrierefunktion, der intestinalen Reife und der Transportfunktion ab.

1.1.1.1 Barrierefunktion des Epithels

Die Erreichbarkeit der normalen Enterozytenoberfläche ist limitiert. Sezerniertes Immunglobulin A, eine Mukusschicht und die intestinale Mikroflora beeinflussen Zugang und somit Aufnahme luminaler Antigene (Oswald 2006, Cummings et al. 2004, Heyman 2001), verhindern sie aber nicht gänzlich (MacDonald und Monteleone 2005). Die Mikroflora scheint die Absorption positiv zu beeinflussen (Heyman et al. 1986). Das Eindringen von Pathogenen ist durch die Epithelbarriere erschwert (Stokes et al. 2004, Shah und Walker 2002), ist aber invasiven (Cossart und Sansonetti 2004) sowie penetrierenden Bakterien (Niedergang und Kweon 2005) möglich. Barriere- und Transportfunktion des Epithels können durch Neurotransmitter, Hormone, Proteasen, Zytokine, zelluläre Bestandteile, bakterielle und nichtbakterielle Xenobiotika reguliert bzw. verändert werden. Letztere haben einen Einfluss auf die Epithelfunktionen durch zum Beispiel die Proteolyse von Ionenkanälen und *Tight Junction* Komplexen, das Erhöhen der Membranpermeabilität oder das Hoch- und das Herunterregulieren von Zellsignalsystemen (Lewis et al. 1995, Neutra und Kraehenbuhl 2005). Obwohl der parazelluläre Transport von Antigenen durch das Vorhandensein von *Tight Junctions* nicht möglich ist (Kraehenbuhl et al. 1997), so kann dieser nach Zerstörung der *Tight Junctions* auftreten (Neutra et al. 2001). Die *Tight Junctions* lassen die Passage nur kleiner Makromoleküle zu: 500 Dalton (siehe Heyman 2005) bis 780 Dalton (Pappenheimer et al. 1994).

In vitro Studien zeigten, dass das Mycotoxin Fumonisin B1 den transepithelialen Widerstand (Indikator der Dichte des Epithels) von konfluent gewachsenen einschichtigen intestinalen Epithelzellen des Schweines (IPEC-1) vermindert (Bouhet et al. 2004). Das proinflammatorische Zytokin Interferon gamma ($IFN\gamma$) erhöht die Proteinaufnahme (Koda et al. 2003) und den Proteinfluss über die Epithelzellbarriere, nicht aber das intrazelluläre Prozessieren (Terpend et al. 1998). Das „löchrige Epithel“ kann mit der durch $IFN\gamma$ induzierten Makropinozytose von *Tight Junction* Proteinen erklärt werden

(Bruewer et al. 2005). Auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzte grenzflächenaktive Substanzen erhöhen die *Tight Junction* Permeabilität bei Caco-2 Zellen für Allergene (Mine und Zhang 2003). Die Permeabilität der Membranbarriere erhöhen weiterhin Zytokine wie die Interleukine (IL) IL-1 β , IL-4 und IL-13 (Snoeck et al. 2005). TNF- α induziert sogar den Zusammenbruch der Epithelbarriere (Mullin und Snock 1990). Für die Allergieentwicklung scheint jedoch die Modifikation der epithelialen Barriere nicht ausschlaggebend zu sein. Der veränderte Antigentransport, der auftritt durch Allergie induzierte entzündliche Reaktionen im Darm, ist eher die Konsequenz als der Grund einer nahrungsvermittelten Sensibilisierung (Heyman 2005).

1.1.1.2 Entwicklung des Intestinum

Zwei Reifefaktoren spielen für die Antigenaufnahme eine Rolle: zunächst die Reife des Darmes kurz nach der Geburt und schließlich die kontinuierlich vorhandenen Unterschiede der Antigenaufnahme entlang der Krypten-Villus-Achse. Enterozyten werden aus proliferierenden Stammzellen in der Mitte der Krypten gebildet und differenzieren sich auf dem Weg zum Villus (McCracken und Lorenz 2001). Die Absorption von Antigenen in die unreifen Kryptenzellen ist im Vergleich zu den reifen Zellen der Villi erhöht (Heyman 2001).

Kurz nach der Geburt sind die intestinale Barriere und das Immunsystem wenig entwickelt (Brandtzaeg 2002). Bis zwei Tage nach der Geburt findet die massive unregulierte Endozytose von intraluminalen Makromolekülen wie Immunglobuline, Hormone, Wachstumsfaktoren aus dem Kolostrum statt (Zaloga und Siddiqui 2004, Pacha 2000). Maternale Immunglobuline zum Beispiel werden über den Fc-Rezeptor (siehe Abschnitt 1.1.1.4) transportiert und sind wichtig für die Immunfunktion des Neugeborenen (Sanderson und Walker 1993). Beim Schwein findet kurz danach das sogenannte „*Gut Closure*“ statt (Rothkötter et al. 2005, Stokes et al. 2004, Sangild 2003). Obwohl beim Menschen dieses Phänomen nicht vorkommt, wurde mit Hilfe des α -Lactalbumin gezeigt, dass die Absorption von Makromolekülen mit zunehmendem postnatalen Alter absinkt (Axelsson et al. 1989). Mit dem Absetzen von Ferkeln (McCracken et al. 1995) oder dem Beginn der Beikost bei kleinen Kindern, erreichen erneut teilweise verdaute Nahrungsproteine das Darmimmunsystem. Eine erhöhte Prävalenz, Nahrungsmittelallergien in der Kindheit zu entwickeln, wird unter anderem auch mit der Unreife des Darmimmunsystems und der Darmbarriere erklärt (Salminen et al. 1998). Die Kriterien der Entwicklung des Darmes sind zum Beispiel die Darmmorphologie (Kryptentiefe und Villushöhe), die der Reife des Darmimmunsystems zum Beispiel die Verteilung und Menge von Muzin sekretierenden Becherzellen, die Fläche Peyerscher Plaques, die Menge an B- und T-Lymphozyten und die Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellen im GALT (siehe zum Beispiel Helm et al. 2007).

1.1.1.3 Endozytosemechanismen

Der folgende Abschnitt fasst mögliche Endozytosemechanismen zusammen und beschäftigt sich mit der *Caveolae*-vermittelten Endozytose und der Clathrinvesikel-Endozytose genauer. Beide Mechanismen wurden für das Protein P34 und die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 angenommen (Weangripinaval et al. 2006).

Die Endozytose ist der aktive vesikuläre Transport von Makromolekülen in die Zelle (Conner und Schmid 2003). Es geht ihr ein Selektionsmechanismus an der Zelloberfläche voraus (Mayor und Pagano 2007). Die Endozytose ist die Basis für die Nährstoffaufnahme, die Eliminierung apoptotischer Zellen, den Pathogeneintritt, die Rezeptorregulation, die synaptische Übertragung die Antigenpräsentation (Marsh und McMahon 1999). Bei den Endozytosemechanismen wird unterschieden zwischen Phagozytose und Pinozytose. Erstere ist die Aufnahme von großen Partikeln wie Bakterien und ist auf spezialisierte Säugerzellen wie Makrophagen, Monozyten und Neutrophile reduziert (Conner und Schmid 2003, Snoeck et al. 2005). Die Pinozytose beschreibt eher das „Zelltrinken“ (die Aufnahme löslicher Bestandteile) und ist unterteilt in Makropinozytose, *Caveolae*-vermittelte, Clathrin-abhängige und von beiden unabhängige Transportmechanismen. Die Makropinozytose ebenso wie die Phagozytose können nur durch das aktinabhängige Umbauen des Zellgerüsts realisiert werden. Sehr große Vesikel werden geformt (Mayor und Pagano 2007, Conner und Schmid 2003). Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Endozytosemechanismen und ihre zellulären Ziele.

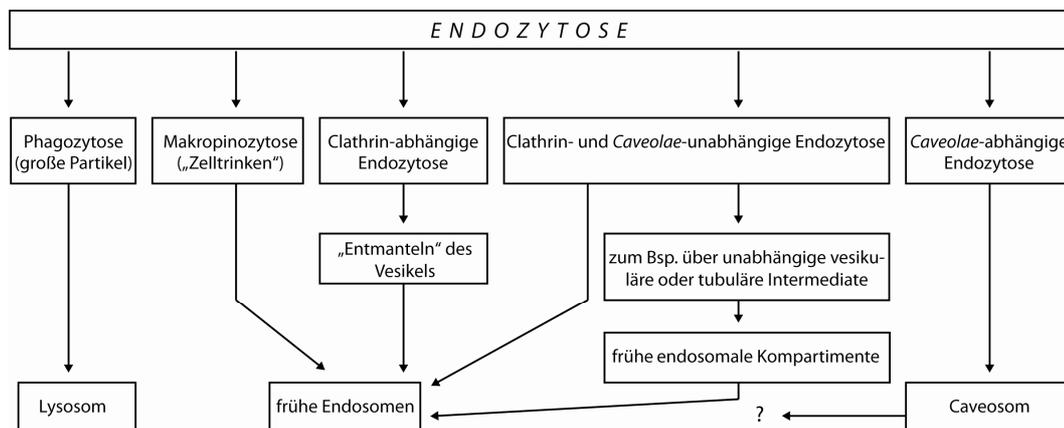


Abbildung 2: Einteilung der Endozytosemechanismen: das zelluläre Aktingerüst wird großflächig umgebaut bei der Phagozytose und Makropinozytose. Mit diesen beiden Mechanismen verglichen, sind die gebildeten Vesikel der anderen Endozytosemechanismen sehr viel kleiner. Clathrin-, *Caveolae*- und davon auch unabhängige Mechanismen benötigen die GTPase Dynamin für das Formen von Vesikeln. Andere, von Dynamin unabhängige Mechanismen, benötigen kleine GTPasen zum Bsp. der Rho-Familie oder Arf-Familie (Mayor und Pagano 2007). Die Übersicht wurde modifiziert nach Mayor und Pagano (2007) und Soldati und Schliwa (2006).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist konstitutiv in allen Säugerzellen vorhanden und der am besten beschriebene Endozytoseweg (Conner und Schmid 2003). Sie ist abhängig von dem „Mantelprotein“ Clathrin und ist wichtig für die Zellhomöostase, die Zellkommunikation, kontrolliert Signalmoleküle der Oberfläche und Protonenpumpen. Ungefähr zwei Prozent der Plasmamembranfläche sind Clathrin-beschichtete Einstülpungen (*coated pits*), wovon jede Fläche bis zu 1000 Rezeptoren unterbringen kann. Kurz nach dem durch Clathrin vermittelten Abschnüren verlieren die Vesikel ihren Mantel aus Clathrinproteinen (und anderen Mantelproteinen) und fusionieren schließlich mit frühen Endosomen (siehe Abbildung 2). Die endosomalen Kompartimente, in denen die Liganden verteilt werden, reichen von der Peripherie der Zelle bis in die zellkernnahen Regionen und sind sehr oft nah dem Golgi-Apparat. Beispiele für diesen Endozytose-

mechanismus sind die Aufnahme von Cholesterol über den LDL-Rezeptor und die von Transferrin über seinen Rezeptor (Alberts et al. 2008, Conner und Schmid 2003).

Zu den weitaus weniger verstandenen Endozytosemechanismen gehört die *Caveolae*-vermittelte Endozytose. *Caveolae* sind Flächen in der Zellmembran von 60–80 nm Durchmesser (Parton und Simons 2007). Sie sind beteiligt an der Endozytose, der Transzytose, dem Cholesteroltransport und der Cholesterolhomöostase, der kalzium-abhängigen Signalübertragung und der positiven sowie negativen Regulation der durch Ras-, NO- und G-Protein gekoppelten Rezeptor- und Wachstumsfaktorsignaltransduktion (Parton und Simons 2007, van Deurs et al. 2003). *Caveolae* scheinen sich von sogenannten *Lipid Rafts* abzuschneiden. Das sind Flächen der Zellmembran, die reich an Cholesterin, Glykosphingolipiden und Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Membranproteinen sind. Sie sind mit dem Aktinskelett der Zelle assoziiert, in Hefen konnte das Protein Filamin als Bindungspartner für Caveolin-1 ausgemacht werden (van Deurs et al. 2003, Stahlhut und van Deurs 2000). Caveolin-1 spielt die Rolle des Regulators, welches die *Caveolae* an der Membran stabilisiert und das endozytierende Potential der *Raft / Caveolae* Domänen reduziert (Nabi und Le 2003). Es ist mit der Plasmamembran, an das trans-Golgi-Netzwerk, Endosomen und Caveosomen assoziiert (Pelkmans und Helenius 2002, van Deurs et al. 2003). Die *Caveolae* und *Raft*-vermittelte Endozytose ist abhängig von Dynamin und benötigt Cholesterol. Die Ligandenspezifität und Morphologie der vesikulären Intermediate ist ähnlich. Nach dem Abtrennen von der Zellmembran geben sie ihren Vesikelinhalt an Zellkompartimente ab, die Endosomen ähneln oder transportieren ihn zur gegenüberliegenden Seite der polarisierten Zelle (Transzytose). Einige Viren treten in die Zelle über *Caveolae* und bewegen sich über endosomenartige Zellkompartimente zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), von wo aus der Infektionszyklus beginnt. Durch die *Caveolae*-vermittelte Endozytose gelangen SV40 (*Simian Virus 40*), Cholera toxin (Ctx) und Albumin in die Zelle (Pelkmans und Helenius 2002). Das Caveosom ist ein endosomales Kompartiment. Es ist negativ für Marker des Clathrin-abhängigen Endozytoseweges wie EEA1 (*early endosome antigen 1*, dem Marker für frühe Endosomen) und internalisiertes Transferrin. Es hat einen neutralen luminalen pH-Wert und scheint an den Sortiervorgängen in der Zelle beteiligt zu sein (Parton und Simons 2007, Pelkmans und Helenius 2002).

1.1.1.4 Antigentransport und enterozytäre Rezeptoren

Die Enterozyten können Proteine (zum Beispiel Antigene und Immunglobuline) transportieren (Transzytose). Am Anfang des Transportes steht meist die Rezeptorbindung an der lumenwärtigen (für zum Beispiel maternale Immunglobuline) oder basolateralen Membran (für zum Beispiel sIgA). Ein beschriebener Rezeptor ist der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn). Er dient als Antigenrezeptor und beschleunigt die Aufnahme und das Prozessieren von Antigenen im Vergleich zur Flüssigphasendozytose (Hershberg und Mayer 2000). Der Rezeptor bindet maternales Immunglobulin G (Stirling et al. 2005). Ein anderer Rezeptor ist CD23 (FcεRII). Dabei handelt es sich um einen Rezeptor niedriger Affinität für Immunglobulin E (IgE), der für die Allergenaufnahme zuständig ist. Bei Ratten, die sensitiv für die Meerrettichperoxidase (HRP *horse radish peroxidase*) sind, ist CD23 hochreguliert. Eine vermehrte Aufnahme von HRP in die Rattenenterozyten kann durch einen CD23 Antikörper verhindert werden (Yang et al. 2000). Der

Rezeptor kann bei sensitiven Tieren den schnellen Transport vollständiger Allergene induzieren (Bevilacqua et al. 2004). Interleukin 4 (IL-4) scheint den IgE / CD23-vermittelten transepithelialen Antigentransport bei sensitiven Mäusen durch Hochregulierung des CD23 Rezeptors zu steigern (Tu et al. 2005, Yu et al. 2001). Der Rezeptor CD23a ist beim Menschen exprimiert und funktioniert in Anwesenheit von IgE als Antigenfangmechanismus, der in der Lage ist, subepitheliale Mastzellen zu aktivieren (Li et al. 2006). Beide Rezeptoren (FcRn und CD23) werden über Clathrin-beschichtete Vesikel internalisiert (Li et al. 2006, Montagnac et al. 2005).

Die apikal befindlichen *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) binden antigene bakterielle Produkte wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) der bakteriellen Zellwand (Niedergang und Kweon 2005, Akira et al. 2001). Sie gehören zusammen mit den *Pattern Recognition Receptors* (PRR) zu den Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte Moleküle (*PAMPs*, *Pathogen-associated molecular patterns*) erkennen und sind wichtig für die angeborene Immunität. Zu der Gruppe der PRR gehören auch NOD1 und NOD2 sowie Lektine (Shao et al. 2005). Die Zellen sind durch diese Rezeptoren Sensoren ihrer Umgebung (Cummings et al. 2004).

Antigene werden ebenso von exosomenartigen Vesikeln transportiert, die aus endosomalen Kompartimenten abstammen. Sie wurden in den Epithelzelllinien HT29 und T84 gefunden und werden apikal und basolateral freigesetzt. Sie sind 30-90 nm groß, durch das Zytokin IFN γ stimulierbar und enthalten unter anderem MHC I und II (*major histocompatibility complex class I / II*) Moleküle (van Niel et al. 2006, van Niel et al. 2001). Über diese Vesikel können auch Antigene präsentiert werden (van Niel et al. 2003). Die Exosomen könnten Peptidinformation zu Immunzellen bringen, die unterhalb der Basalmembran liegen, durch das Passieren von Poren in dieser. Der direkte Kontakt antigenpräsentierender Enterozyten (siehe auch folgender Abschnitt 1.1.1.5) mit T-Zellen *in vivo* ist vermutlich durch die Basalmembran eingeschränkt (Heyman 2005).

Die Gruppe um Martine Heyman (Heyman et al. 1982) hat früh zwei funktionelle Wege durch das Epithel für den Antigentransport propagiert. Der Hauptweg beschreibt den Antigenabbau in Lysosomen, der Nebenweg den Transport des intakten Proteins (Heyman et al. 1986, Heyman et al. 1982). Terpend und Kollegen zeigten, dass das Prozessieren von HRP in HT29-19A Zellen zu 10 % intaktem Protein, 40 % Peptiden und 50 % Aminosäuren während der Transzytose führte (Terpend et al. 1998). Die Hälfte des transportierten Proteins ist so möglicherweise noch Immunzellen präsentierbar (Heyman 2005, Heyman 2001). Die Transzytose wurde für verschiedenste Proteine gezeigt: zum Beispiel die von den Pankreasenzymen Amylase und Lipase in duodenale Enterozyten von Ratten, die basolateral den Interstitialraum und das Blut erreichten (Cloutier et al. 2006).

1.1.1.5 Antigenpräsentation

Epithelzellen können als nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen agieren. Sie präsentieren bakterielle Antigene auf sogenannten nicht-klassischen MHC I Molekülen wie CD1d, die dann als Adhäsionsmoleküle oder kostimulierende Faktoren bei der Interaktion mit T-Zellen fungieren (Shao et al. 2005). Für einige Spezies (Mäuse, Ratten und Mensch) ist bekannt, dass Epithelzellen Antigene auf MHC II Oberflächenmolekülen präsentieren (Hershberg und Mayer 2000). Die Expression von MHC II Molekülen ist

auf die basolaterale Seite der Epithelzelle reduziert (Hershberg 2002, Hershberg et al. 1998). Es werden keine kostimulierenden Rezeptoren in Abwesenheit einer Entzündung exprimiert, um T-Zellen zu aktivieren. Das spielt bei der Toleranzinduktion eine Rolle (Mowat 2003). In Anwesenheit des Zytokins Interferon präsentieren Epithelzellen Antigene über MHC II Moleküle (Hershberg und Mayer 2000). Der Grund liegt möglicherweise in einer durch Interferon induzierten modulierten Endozytose. MHC II positive späte Endosomen, die als Kompartiment des Antigenprozessierens gelten, werden angesteuert (Buning et al. 2005).

1.1.1.6 Zytokinproduktion

Die Zytokine sind Mediatoren der Immun- und Entzündungsantwort (Bouhet und Oswald 2005). Auch das Dünndarmepithel ist in der Lage Zytokine wie TGF- α , IL-1, IL-10, IL-15, und IL-18 konstitutiv zu exprimieren. Diese spielen eine Rolle bei dem Einwandern von Immunzellen in die Mukosa, beim epithelialen Zellwachstum und der Homöostase (Stadnyk 2002). Andere Zytokine wie zum Beispiel IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, CCL20 und GM-CSF werden als Antwort auf eine mikrobielle Infektion hochreguliert (Jung et al. 1995, Stadnyk 2002). Mit Hilfe von Zellmodellen intestinaler Epithelzellen (Caco-2, HT-29, IPEC-1, IPEC-J2) wurde und wird die mögliche Einflussnahme von Enterozyten auf die Immunantwort durch die Zytokinproduktion *in vitro* untersucht (siehe zum Beispiel Wang et al. 2008, Bouhet et al. 2006, Roselli et al. 2006, Parathasarathy und Mansfield 2005, Schierack et al. 2006).

1.1.2 M-Zellen im FAE

Die M-Zellen befinden sich im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) (siehe auch Abbildung 1). Sie transportieren luminal Antigenen nach Oberflächenbindung zum Domeareal und den dort befindlichen verschiedenen Subpopulationen der Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen. Der Transport findet unter Umgehung des lysosomalen Systems statt (MacDonald und Monteleone 2005, Gebert et al. 2000, Mowat 2003, Neutra et al. 1996, Owen et al. 1986). Die M-Zellen unterscheiden sich von normalen Epithelzellen durch das Fehlen des Bürstensaumes, der Glykokalix und der Verdauungsenzyme (Niedergang und Kraehenbuhl 2000). Sie haben außerdem eine große basolateral liegende Membraneinstülpung. Hier befindet sich Raum für Lymphozyten (Neutra et al. 2001, Brandtzaeg 2002). Es sind viele Transportmechanismen wie die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Flüssigphasenpinozytose, die Phagozytose etc. in M-Zellen möglich (Neutra und Kraehenbuhl 2005). Chambers und andere haben herausgefunden, dass der Transport von verdauten Erdnusspeptiden durch Enterozyten vernachlässigbar ist im Vergleich zu M-Zellen *in vivo* (Chambers et al. 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Rytkonen und Kollegen in einem Zellkulturmodell mit nativen β -Lactoglobulin *in vitro* (Rytkonen et al. 2006). Der Durchtritt von HRP durch das FAE von jejunalen PP und durch das jejunale Epithel ist vergleichbar bei Kaninchen *in vitro*. Die Passage durch Peyersche Plaques ist jedoch schneller und durch weniger Proteinabbau begleitet (Ducroc et al. 1983). Die Transportkapazität der M-Zellen an sich scheint durch Bakterien induzierbar zu sein (Gebert et al. 2004).

1.1.3 Dendritische Zellen Epithel-nah

Dendritische Zellen (DCs) zählen neben B-Lymphozyten und Makrophagen zu den antigenpräsentierenden Zellen (Makala et al. 2004). Sie migrieren in Gewebe und sind ideal lokalisiert für die Antigenaufnahme an der Kontaktstelle zur Umgebung. In der Schleimhaut können DCs an verschiedensten Orten gefunden werden: in der Lamina propria, der Submucosa des Villusepithels und in T-Zellzonen von lymphatischem Gewebe (Niedergang und Kweon 2005). Die DCs auf der basolateralen Epithelseite sind wiederum ideal zur Antigenpräsentation von durch M-Zellen transportierten Antigenen lokalisiert. Über 35 % der M-Zellen jejunalen Peyerscher Plaques liegen in direkter Nachbarschaft zu DCs im subepithelialen *Dome* (Bimczok et al. 2006). Die Forschung der letzten zehn Jahre zeigte, dass DCs in der Lage sind, luminale Bakterien aufzunehmen. Sie öffnen hierfür mit ihren Dendriten die *Tight Junctions* des geschlossenen Epithels (Rescigno et al. 2001, Rimoldi et al. 2004). Durch Bildung von Occludin und Claudin-1 sind sie in der Lage, *Tight Junction* ähnliche Strukturen zu Nachbarzellen auszubilden (Rescigno et al. 2001). Ob dieser Mechanismus konstitutiv ist oder nur durch Epithelzellsignale nach Kontakt mit einem Bakterium oder Pathogen möglich ist, ist unklar (Rimoldi und Rescigno 2005). Vermutlich regulieren TLR-vermittelte Signale den Antigentransport durch das FAE zu DCs in organisierten lymphatischen Geweben (Chabot et al. 2006) und induzieren möglicherweise die Aktivierung der DCs, luminale Antigene aufzunehmen in FAE-fernen Darmregionen (Chieppa et al. 2006).

Die unreifen dendritischen Zellen nutzen verschiedene Wege der Antigenaufnahme: Makropinozytose, die Rezeptor vermittelte Endozytose über die C-Typ Lektinrezeptoren (Mannoserezeptor) oder die Fc γ -Rezeptoren Typ I und II sowie die Phagozytose (Banchereau et al. 2000).

1.2 Das Allergen P34 der Sojabohne als Beispielantigen

Ungefähr vier bis acht Prozent der Kinder und ein bis zwei Prozent der Erwachsenen sind von Nahrungsmittelallergien betroffen (Bischoff 2006, Wilson et al. 2005). Sojabohnen gehören zu den wichtigsten Nahrungsmitteln, die Allergien induzieren (Ogawa et al. 2000), vor allem bei Kindern (Seibold 2005). Im folgenden Abschnitt wird zusammengefasst welche Krankheitserscheinungen Sojabohnenallergien beim Menschen hervorrufen, welche Sojabohnenallergene es gibt und es wird das P34 vorgestellt. Neben der Struktur allergener Proteine ist auch die Verdauungsfunktion entscheidend für das Auftreten dieser im Dünndarm, weshalb auf diese am Ende des folgenden Abschnittes kurz eingegangen wird.

1.2.1 Allergene

Allergene unterscheiden sich von Antigenen, indem sie nicht durch IgG, IgM oder IgA Immunreaktionen vermitteln sondern durch die Bindung an IgE (Businco et al. 1998). Die Bindungsstellen von Antigenen und Allergenen für Immunglobuline sind Epitope, davon haben die meisten Allergene mehr als zwei (Huby et al. 2000). Ausschlaggebende

Charakteristika für die Allergenität von Proteinen sind deren Löslichkeit, Stabilität und Struktur (Helm et al. 2003). Nahrungsallergene sind meist Proteine mittlerer Größe (10-70 kDa, Lehrer et al. 1996). Wichtig für die Proteinstabilität sind Faktoren wie die Glykosylierung, Disulfidbrückenbindungen und eine kompakte Struktur (Breiteneder und Mills 2005). Sie bestimmen mögliche Epitope und sind relevant für die Resistenz solcher Proteine gegenüber Verdauungsenzymen (Breiteneder und Radauer 2004, Aalberse 2000). Die meisten Pflanzenproteinallergene sind in der Lage an Membranen und andere Fettstrukturen zu assoziieren (Breiteneder und Mills 2005) und sind funktionell meist Speicherproteine oder abwehrvermittelnde Proteine (Breiteneder und Radauer 2004). Allergene sind in der Lage, die Produktion hochaffiner Antikörper zu induzieren (Sensibilisierung) und allergische Reaktionen auslösen (Aalberse 2000). Nach erfolgter Sensibilisierung treten bei erneutem Allergenkontakt bestimmte Krankheitserscheinungen auf.

Die strukturelle Ähnlichkeit von Allergenen ist ein Problem. Kreuzallergien können ausgelöst werden (Calkhoven et al. 1987). Es reicht zum Beispiel eine allergische Immunantwort in der Nasenschleimhaut gegen Birkenpollen aus, um gegenüber kreuzreaktiven Proteinen aus dem Apfel Reaktionen in der Mundschleimhaut durch Mastzellen hervorzurufen (Aalberse und van Ree 1997). Anhand solcher Mechanismen ist auch zu erklären, dass Kinder, die eine Erdnussallergie hatten, an Soja induzierter Anaphylaxie gestorben sind (Foucard und Malmheden, I 1999).

1.2.2 Sojaallergie und Sojabohnenallergene

Sojabohnen gehören zu den wichtigsten Nahrungsmitteln, die Allergien verursachen (Ogawa et al. 2000, Seibold 2005); gleich nach Hühnereineiweiß (Ogawa et al. 1991). Sojabohnenproteine kommen vielfältig in der Nahrung vor. Sie sind in Mehlen, Kleinkindnahrung, Proteinisolaten und Konzentraten sowie Fasern enthalten (Friedman und Brandon 2001). Die Arten der Sojaallergie lassen sich unterteilen in IgE-vermittelte Reaktionen, die respiratorische-, Haut- und gastrointestinale Symptome nach sich ziehen. Die nicht-IgE-vermittelte Sojaallergie führt zu Enterokolitis und anderen Symptomen wie Fieber, Erbrechen und Diarrhöe (Foucard und Malmheden, I 1999, Wilson et al. 2005). Die meisten klinischen Erscheinungen sind im Magendarmtrakt zu finden, während Hautläsionen kaum bekannt sind (Cantani und Lucenti 1997). Die Aufnahme von Sojabohnen kann bei kleinen Kindern zur Enteropathie mit Atrophie der Villi führen und zu einer durch Kuhmilchprotein induzierten Intoleranz (Businco et al. 1998). Die dritte Form der Sojaallergie, die der Anaphylaxie, ist kontrovers diskutiert. Soja scheint jedoch in seiner Bedeutung als Ursache der Lebensmittelanaphylaxie unterschätzt zu sein. Zu den „gefährdeten“ Personen gehören junge Menschen mit Asthma und Erdnussallergie (Foucard und Malmheden, I 1999). Bei atopischen Kindern ist eine Sojaallergie nicht allgemein üblich (Bruno et al. 1997).

Ogawa und Kollegen (1991) identifizierten die Hauptallergene aus der Sojabohne (Gly m Bd 28K, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 60K) durch das Binden von IgE-Antikörpern sensitiver Patienten mit atopischer Dermatitis an diese Proteine (siehe auch Tabelle 1). Gly m Bd 30K ist eine andere Bezeichnung für P34. Die allergenen Sojabohnenproteine sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Sojabohnenallergene (Tabelle entnommen aus Wilson et al. 2005)

Molekulargewicht des IgE-bindenden Proteins (kDa)	Name oder Proteinfraktion	Referenz
7.0	Gly m 1a; Hüllprotein	Rodrigo et al. 1990
7.5	Gly m 1b; Hüllprotein	Rodrigo et al. 1990
8.0	Gly m 2; Hüllprotein	Gonzalez et al. 1992
12-15	rGly m 3; Profilin	Rihs et al. 1999
17	2S-Globulin Fraktion	Ogawa et al. 1991
20	Kunitz Trypsin Inhibitor (2S)	Ogawa et al. 1991
18-21	Whey Fraktion	Ogawa et al. 1991
22	Glycinin G2; basische Kette von Glycinin, (11S)	Helm et al. 2000
28	Gly m Bd28K; 7S Globulin	Tsuji et al. 1997
30-34	P34, Gly m Bd 30K	Ogawa et al. 1991
29-31	Whey Fraktion	Ogawa et al. 1991
32	Sojalektin; Sojabohnenagglutinin	Metcalfe et al. 1996, Bals und Welsch 1997
33-35	7S-Globulin	Ogawa et al. 1991
35-38	7S-Globulin	Ogawa et al. 1991
35-40	Glycinin G1, saure Seitenkette Glycinin; 11S	Beardslee et al. 2000
40-41	7S Globulin	Ogawa et al. 1991
42	β -Untereinheit von β -Conglycinin	Thanh und Shibasaki 1978, Ogawa et al. 1991
47-50	7S Globulin	Ogawa et al. 1991
52-55	7S Globulin	Ogawa et al. 1991
63-67	α-Untereinheit von β-Conglycinin, Gly m Bd 60K	Rihs et al. 1999, Ogawa et al. 2000
71	α' -Untereinheit von β -Conglycinin	Rihs et al. 1999

1.2.2.1 Das Protein P34

P34 ist das wichtigste Allergen der Sojabohne für den Menschen. Über 65 % der IgE Antikörper von sojabohnensensitiven Patienten binden das P34 (Ogawa et al. 1991). Es konnten mit den Seren sojabohnensensitiver Personen 16 lineare Epitope an P34 identifiziert werden, wovon fünf dominant waren (Helm et al. 1998). Das Protein P34 hat eine siebzugprozentige Sequenzähnlichkeit zu Ara h 1, dem Hauptallergen der Erdnuss (Wilson et al. 2005).

Das Protein P34 erfüllt alle Kriterien allergener Pflanzenproteine (siehe Abschnitt 1.2.1): es ist ein Protein mittlerer Größe, mit einer Glykosylierung (Bando et al. 1996) und einem isoelektrischen Punkt im sauren Bereich bei pH 4.5 (Ogawa et al. 1993). Der Anteil von P34 am Sojabohnenprotein ist zwei bis drei Masseprozent (Kalinski et al. 1990). Die aus der Aminosäuresequenz berechnete Masse des P34 ist 28643 Dalton (Informall Database: <http://foodallergens.ifr.ac.uk/>, Aminosäuren 123-379). Als glykosyliertes Protein ist die Masse des Proteins höher und kann als Bande mit einer Größe von etwa 32 kDa in SDS-PAGE Gelen gesehen werden (Kalinski et al. 1992). Über die Funktion von P34 ist wenig bekannt. Trotz dessen enger Verwandtschaft zu den Thiolproteasen (Cys Proteasen) hat P34 keine enzymatische Funktion, da ein Cystein im aktiven Zentrum fehlt (Kalinski et al. 1990, Herman et al. 2003). Es gibt den Hinweis darauf, dass P34 ein Protektionsmechanismus für Pflanzen gegen *Pseudomonas* sein könnte. Es bindet Syringoloide. Syringoloide sind Glykolipide, die von Gram-negativen Bakterien sekretiert werden und als Induktoren von Abwehrmechanismen in bestimmten Sojabohnensorten gelten (Ji et al. 1998).

In der Pflanzenzelle wird P34 nach der Synthese in Vakuolen gespeichert, assoziiert aber an *oil bodies* in zerstörten Pflanzenzellen (Abbildung 3). Sogenannte *oil bodies* sind

Reservepartikel und Kohlenstoffquelle der Zellen mit einem Zentrum aus Triglyzeriden, umgeben von einer Schicht aus Polypeptid-enthaltenden Phospholipiden (Komatsu et al. 1992). Das Protein P34 besitzt keine Ankerregion für Membranen (Kalinski et al. 1990, Kalinski et al. 1992).

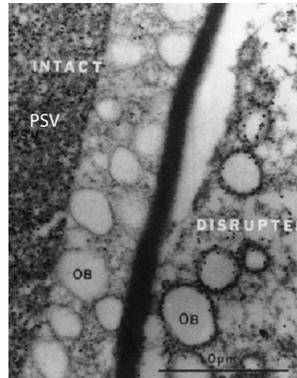


Abbildung 3: Eine intakte und eine zerstörte Pflanzenzelle sind gezeigt. P34 ist sekundär mit Goldpartikeln markiert (schwarze Punkte). Auf der linken Seite (intakte Zelle) ist P34 in den Speichervakuolen (PSV) gespeichert und nicht an *oil bodies* (OB) assoziiert, während es auf der rechten Bildseite (zerstörte Zelle) eindeutig an *oil bodies* assoziiert ist. (Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Kalinski et al. (1992) entnommen. Der Balken entspricht 1.0 µm.)

P34 wird in den Sojabohnensamen während der Samenreife akkumuliert (Herman et al. 1990, Kalinski et al. 1992). Nach der Translation werden Pre- und Prosequenz des Proteins abgespalten (insgesamt 123 Aminosäuren, Kalinski et al. 1992), danach wird das Protein (siehe oben) in Vakuolen gespeichert. Die Abspaltung eines weiteren Dekapeptides erfolgt zeitgleich mit der Proteinmobilisierung beim Keimen der Samen (Herman et al. 1990). Abbildung 4 gibt einen Überblick über das Protein.

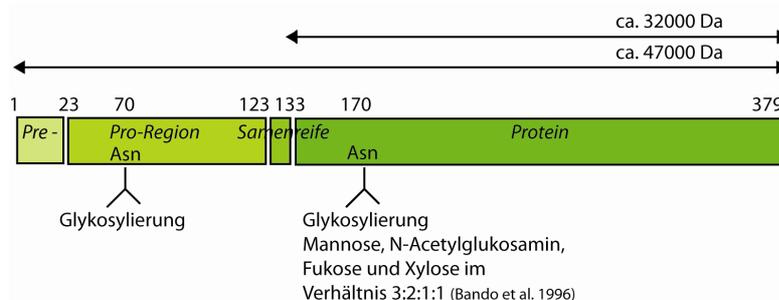


Abbildung 4: Protein P34 und seine Prozessierung in der Zelle nach Translation, überhalb des Proteinbalkens sind die Aminosäuren nummeriert. Die Farben machen verschiedene Prozessschritte am Protein kenntlich. Beide Glykosylierungen hängen an Asparaginresten des Proteins. (Die Abbildung wurde modifiziert nach Ogawa et al. 2000.)

Wie in der Abbildung dargestellt, hat P34 nach seiner Prozessierung noch eine Glykosylierung. Die Glykosylierungen von Pflanzenproteinen erhöhen deren Aufnahme über Rezeptoren (Helm und Burks 2002), haben stabilisierende Effekte (Breiteneder und Mills 2005, Daniel 2004) und stellen außerdem relevante IgE-Epitope dar (van Ree 2002, Fotisch und Vieths 2001). Es werden N- und O-Glykane unterschieden. Da P34 nach der Prozessierung eine N-Glykanstruktur besitzt, wird auf diese hier näher eingegangen. N-Glykane sind an einem Asparagin der Aminosäuresequenz des jeweiligen

Proteins gebunden (siehe Abbildung 5). $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ ist die wichtigste N-Glykanstruktur vieler allergener Proteine. Sie wurde schon Anfang der 70er Jahre an Bromelain, Ovalbumin und α -Amylase studiert (Lee und Scocca 1972). Antikörper binden potentiell an N-Glykane, die hauptsächlich Mannose, Fukose, Xylose und N-Acetylglucosamin enthalten. Als Hauptepitope gelten die β -1,2 verbundene Xylose und die α -1,3 Fukose, welche beide in Säugerzellen nicht vorkommen (van Ree et al. 2000, Aalberse und van Ree 1997). Sie lösen IgE-vermittelte Immunantworten beim Menschen aus (Fotisch und Vieths 2001). Es wird jedoch nicht angenommen, dass eine einzige Glykanstruktur IgE-Moleküle kreuzvernetzen kann (Aalberse und van Ree 1997).

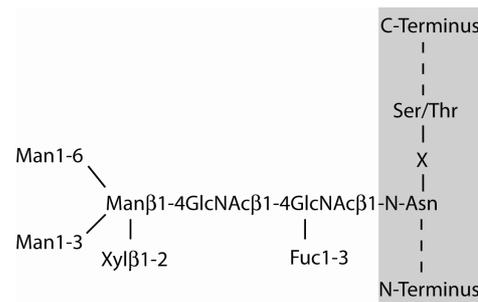


Abbildung 5: Typisches IgE-bindendes Pflanzenglykan (modifiziert nach van Ree 2002 und Hiemori et al. 2000); es gibt zwei Charakteristika dieser Glykanstrukturen: 1. das Trisaccharidgerüst und 2. die Verbindung dieser Struktur zu Asparagin folgender Sequenz: Asn-X-Ser/Thr der Aminosäurekette eines Proteins (Fotisch und Vieths 2001). Weitere Einteilungskriterien befinden sich in den Veröffentlichungen von Fotisch und Vieths (2001) und Rayon et al. (1998).

Pflanzenphysiologisch haben N-Glykane unterschiedliche Bedeutungen. Sie verhindern zum Beispiel die proteolytische Degradation oder induzieren die korrekte Faltung und biologische Aktivität des Proteins, enthalten vermutlich Zielinformation oder sind direkt beteiligt an der Zell-Zell-Information und Proteinerkennung (Rayon et al. 1998). Bei manifester Allergie sind jedoch eher Antikörper gegen Proteinstrukturen als gegen Zuckerstrukturen zu finden. Glykoproteine von Säugern sind wegen ihrer Ähnlichkeit und einer daher ausgebildeten Toleranz nicht immunogen (Aalberse und van Ree 1997).

1.2.3 Verändern der Allergenität von Proteinen

Es gibt verschiedene Herangehensweisen in der Nahrungsmittelindustrie die Allergenität von Proteinen zu mindern. Die chemische Modifikation, Extrusion, Fermentation, enzymatische Hydrolyse und das Erhitzen sind zum Beispiel solche lebensmitteltechnischen Verfahren (Wilson et al. 2005, Ogawa et al. 2000). Das Fermentieren von P34 verminderte im Gegensatz zu einer Erhitzung die Allergenität des Proteins (Tsuji et al. 1995). Das thermische Prozessieren kann jedoch auch die Allergenität von Proteinen erhöhen. Es entstehen durch die Maillardreaktion (Polysaccharidkonjugation an Proteine) glykosylierte Endprodukte. Diese stellen meist neue Epitope dar (Davis et al. 2001). Die Polysaccharidkonjugation von P34 scheint allergene Strukturen zu maskieren, verbessert außerdem die Löslichkeit, Hitzebeständigkeit und die emulgierenden Eigenschaften des Proteins (Babiker et al. 1998, Arita et al. 2001). Das thermische Denaturieren minderte nicht die IgE- und IgG-Antikörperbindung an Sojabohnen- und Erd-

nussallergene (Burks et al. 1992). Die Speicherproteine 7 S und 11 S Globuline sind außerdem recht thermostabil (Breiteneder und Mills 2005). Auch Mutationen im Genom oder das Transformieren von Pflanzen können die Allergenität von Pflanzenproteinen mindern bzw. allergene Proteine eliminieren (Wilson et al. 2005, Herman et al. 2003, Ogawa et al. 2000, Samoto et al. 1996).

1.2.4 Die Verdauung von Proteinen im Gastrointestinaltrakt

Die Proteinverdauung beginnt im Magen durch das Ansäuern und Emulgieren des Speisebreis. Die Proteasen Pepsin I und II sowie sekretierte Salzsäure vollführen die hydrolytischen Schritte (Fuller und Tome 2005, Ahnen 1991). Zu mehr als 70 % ist die Proteinverdauung bei einer Gastrektomie in Schweinen vermindert (Rivest et al. 2000). Im oberen Dünndarm kommen die Proteasen des Pankreas (Endopeptidasen wie Trypsin, Chymotrypsin und Elastase oder die Exopeptidasen Carboxypeptidase A und B) mit den Peptiden des Speisebreis in Kontakt. Sechzig bis 70 % des Gesamtstickstoffes sind dann als Oligopeptide vorhanden (Fuller und Tome 2005, Ahnen 1991). Der letzte Proteolyseschritt findet am Bürstensaum der Enterozyten durch integrale Membranproteine (Endo- und Ektopeptidasen) statt (Danielsen und Hansen 2006). Der Gehalt an diesen Enzymen steigt bei Enterozyten mit der Migration zu den Villi (Ahnen 1991). Die Endprodukte der Verdauung sind Di- und Tripeptide sowie Aminosäuren, die durch Carrier in die Enterozyten transportiert werden. Das am besten beschriebene System ist der Peptidtransporter PEPT1. Es transportiert sämtliche Di- und Tripeptide aktiv mit Hydroniumionen in die Zellen (Daniel und Kottra 2004, Andersen et al. 2006, Kim et al. 2007).

2 Zielstellung

Allergene Proteine erreichen aufgrund ihrer Eigenschaften (siehe Abschnitt 1.2.1) trotz der Verdauungsfunktion des Organismus den Dünndarm. Sie können die Epithelbarriere im FAE und Villusepithel passieren (siehe Abschnitte 1.1.1.4 und 1.1.2), durch antigenpräsentierende Zellen prozessiert und den Immunzellen präsentiert werden. In der hier vorgestellten Arbeit soll der Transport des allergenen Sojabohnenproteins P34 beschrieben werden. Es ist wie einleitend zusammengefasst (Abschnitt 1.2.2.1) für den Menschen das wichtigste Allergen der Sojabohne. Da es durch seine Eigenschaften wie die Glykosylierung und mittlere Größe ein gutes Beispielantigen ist, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, wie das Protein die Zellen des Darmimmunsystems erreicht, wie es durch Enterozyten endozytiert und transportiert wird, ob dabei die Glykosylierung eine Rolle spielt und welche Wirkung es schließlich auf Immunzellen und antigenpräsentierende Zellen hat. Für diese funktionellen Tests musste das Protein P34 zunächst aus der Sojabohne isoliert werden.

Wegen der physiologischen Ähnlichkeit zwischen Mensch und Schwein - zum Beispiel die Entwicklung bei der Geburt und der Aufbau des Gastrointestinaltrakt (Rothkötter et al. 2005) - bot es sich an, Zellen aus dem Schwein zu verwenden. Die Epithelzelllinie IPEC-J2, die für diese Arbeit verwendet wurde, entstammt dem Jejunum von Ferkeln (Berschneider 1989). Die Zellen sind ein gutes Modell, weil sie konfluente Einzelzellschichten polarisierter Enterozyten formen, apikal Mikrovilli und zueinander Desmosomen und *Tight Junctions* ausbilden. Wie im normalen Jejunum exprimieren die IPEC-J2 Zellen die *Tight Junction* Proteine Claudin-3 und -4 sowie Occludin in der apikolateralen Membran (Berschneider 1989, Schierack et al. 2006). Die IPEC-J2 Zelllinie hat eine Mukusschicht an der Oberfläche (MUC3), enthält aber keine Becherzellen (Schierack et al. 2006).

An diesen Zellen wurden der Mechanismus der P34-Endozytose sowie die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit dieser Endozytose mit Hilfe von FITC-markiertem Protein und der Durchflußzytometrie sowie Immunfärbungen (für Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie) untersucht. Die Separation von Zellbestandteilen über einen Sucrosedichtegradienten machte es möglich, den Endozytosemechanismus genauer zu beschreiben. Die Oberflächenbindung von P34 an die Enterozyten der IPEC-J2 Zelllinie wurde mit einem ELISA überprüft. Ob P34 überhaupt die Dünndarmepithelzellen erreichen würde, konnte mit einem *in vitro* Verdauungsmodell nachvollzogen werden. Es wurde die Existenz von P34-Antikörpern im Blut von Schweinen mit einem weiteren ELISA überprüft. Für alle funktionellen Tests wurde P34 zunächst mit Hilfe der Hydrophoben Interaktionschromatographie aufgereinigt. Die Modellzellen für die immunologischen Fragen waren periphere Blutlymphozyten (PBMCs *peripheral blood mononuclear cells*) und *in vitro* kultivierte Dendritische Zellen (MoDCs *monocyte derived dendritic cells*) aus dem Schwein. Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Methoden beschrieben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Protein P34

Das Protein P34 wurde aufgereinigt, um damit funktionelle Untersuchungen zu machen. Es wurden zwei Proteinproben unterschiedlicher Reinheit (bezüglich der Proteine) sterilfiltriert verwendet. Die nach dem Zentrifugationsprotokoll (siehe 3.2.1.1) gereinigte Probe enthielt densitometrisch ausgewertet 77 % P34 (siehe Abschnitt 4.1.1). Die mit der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) aufgereinigte P34-Probe enthielt densitometrisch ausgewertet 99 % P34. Beide Angaben beziehen sich auf den Coomassie-gefärbten Gesamtproteingehalt einer Bahn des in Abbildung 12 (Abschnitt 4.1) zu sehenden Acrylamidgels. Die verwendeten Proben werden im folgenden Abschnitt mit „77 % P34“ und „99 % P34“ bezeichnet.

3.1.2 Wasser, Puffer, Salze

Sämtliche Salze, Alkohole und Säuren wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) erworben und waren von analytischer Reinheit. Alle Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser aus einem Millipore System (EASYPure RF, Barnstead, Dtl.) hergestellt. Die für die Puffer verwendeten Flaschen und Gefäße wurden vor der Benutzung autoklaviert (Dampfsterilisator Typ 400, Varioklav H&P GmbH, Oberschleißheim, Dtl.). Die in dieser Arbeit verwendeten Pufferzusammensetzungen und Reagenzien sind im Anhang aufgeführt (Seite 107).

3.2 Methoden

3.2.1 P34-Aufreinigung

3.2.1.1 Zentrifugationsprotokoll

P34 wurde nach der Methode von Herman 1987 und Kalinski et al. (1992) isoliert (siehe Abbildung 6): Die Bohnen wurden in destilliertem Wasser über Nacht eingeweicht und am nächsten Tag mit einem Küchenstab in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6) homogenisiert. Die Masse wurde danach durch Gaze gedrückt. Das Homogenisat, welches durch die Gaze gelangt ist, wurde bis zur Zentrifugation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Sojafett (*oil body*) konnte durch das Flotieren bei der Zentrifugation (53000 g, 20 Minuten, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) des Homogenisats gewonnen werden. Anschließend wurde es in 0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl (pH 8.6) resuspendiert und erneut zentrifugiert werden. Das Resuspendieren und Zentrifugieren wurde einmal wiederholt. Der *oil body* wurde abschließend in 0.1 M Natriumcarbonat (Na_2CO_3) homogenisiert und erneut zentrifugiert, wobei das gesuchte Protein sich nun vermehrt in Lösung unterhalb des Fettes befand. Der Natriumcarbonat-überstand wurde dann in den Equilibrierungspuffer der Säule für die HIC dialysiert. Für

die Nutzung dieser Proteinprobe in Versuchen, wurde die Proteinlösung mit Polyethylenglykol (PEG, 20 g/100 mL Roth, Karlsruhe, Dtl.) in PBS (Biochrom AG, Berlin, Dtl.) aufkonzentriert.

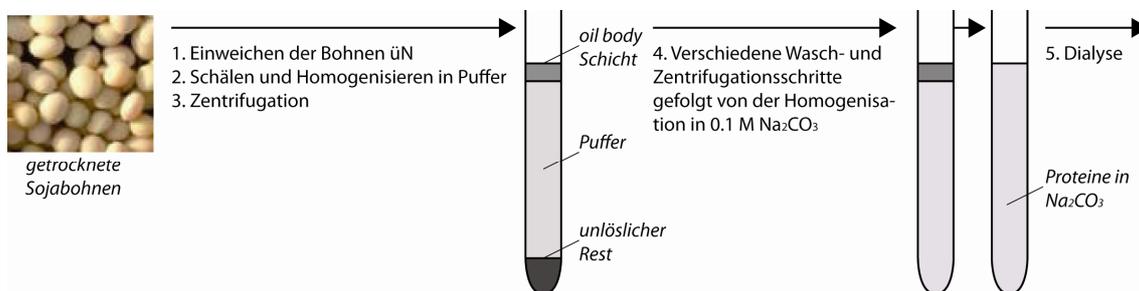


Abbildung 6: Zentrifugationsprotokoll nach Herman (1987)

3.2.1.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Separation von Proteinen aus Mischungen über deren Hydrophobizität funktioniert, weil jedes Protein eine unterschiedliche Verteilung und Anzahl hydrophober Aminosäuren hat. Bei der HIC werden verschiedene Phasen eingesetzt. Deren Hydrophobizität und die von der Phase ausgehende Stärke steigt mit dem Anstieg der Kettenlänge gebundener Alkylreste. Die Adsorption in eine Phase ist bei der HIC salzabhängig. Antichao-trope Salze unterstützen die Matrixadsorption der Proteine durch die Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen (Queiroz et al. 2001, Machold et al. 2002).

3.2.1.3 HIC-Phasenauswahlexperimente

Diese Experimente wurden mit einer Spritze durchgeführt. Jede der vorgepackten 1 mL HiTrap-Säulen (1 mL, 7 x 25 mm, gefüllt mit Phenyl Sepharose High Performance, Butyl Sepharose High Performance, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub), Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub), Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow, Butyl Sepharose 4 Fast Flow und Octyl Sepharose 4 Fast Flow, alle GE Healthcare (Uppsala, Schweden)) wurde mit Bindungspuffer equilibriert. Anschließend wurden 200 µL der Proteinmischung (1 g/L, hergestellt wie in 3.2.1.1 beschrieben) mit einer Spritze aufgetragen. Das Waschen der jeweiligen Säule erfolgte mit 15 Säulenvolumina (cv) Bindungspuffer. Die Proteine wurden mit einem Mehrstufenprozess von jeweils 9 cv 0.8 M, 0.6 M, 0.4 M, 0.2 M und 0.0 M Ammoniumsulfat in 0.05 M Phosphatpuffer (pH 6.5) eluiert. Alle erhaltenen Fraktionen aus allen Säulen wurden anschließend mit Trichloressigsäurelösung (siehe Abschnitt 3.2.3.1) aufkonzentriert und gelelektrophoretisch analysiert (siehe Abschnitt 3.2.3.4)

3.2.1.4 Chromatographische Separation

Für die Proteinaufreinigung wurden zwei unterschiedlich große Säulen mit 7.5 mL und 75 mL der Butyl Sepharose 4 FF gepackt (Lot Nummer der Phase: 7.5 mL Säule 10000941 und 75 mL Säule 10003753, erworben von GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Eine Merck Superformance Säule (10 x 150 mm) und eine Omnifit Glassäule (25 x 250 mm) wurden benutzt. Die chromatographische Aufreinigung auf den Säulen (7.5 und 75 mL) erfolgte an einer ÄKTA prime Anlage (GE Healthcare, Uppsala,

Schweden). Vor der chromatographischen Aufreinigung wurde die 7.5 mL große Säule mit wenigstens 10 cv Bindungspuffer gewaschen. 500 µL der Proteinmischung mit 705 µg totalem Proteingehalt (hergestellt siehe 3.2.1.1) wurden anschließend mit Hilfe einer Probenschleife auf die Säule geladen. P34 wurde mit einem dreistufigen Prozess eluiert: 0.6 M, 0.4 M und 0.0 M Ammoniumsulfat in 0.05 M Phosphatpuffer (pH 6.5). Der Elutionsstufenwechsel erfolgte erst, nachdem das UV Signal konstant blieb und keine Proteine mehr in dem jeweiligen Schritt eluierten. Das Herauswaschen stark gebundener Proteine aus der Säule wurde mit wenigstens 10 cv 0.05 M Phosphatpuffer und 10 cv 20 Vol.-% Ethanol nach jedem Lauf realisiert.

Es wurde versucht, den Prozess in Hinsicht auf die Pufferbedingungen und die Geschwindigkeit der Aufreinigung für die 75 mL Säule zu optimieren. Die Säule wurde zunächst mit 4 cv Bindungspuffer equilibriert (0.6 M Ammoniumsulfat in 0.05 M Phosphatpuffer, pH 6.5). Anschließend erfolgte die Injektion von 13 mg (in 5 mL Bindungspuffer) Proteinmischung (77 % P34) mit der Probenschleife. Die Proteine wurden mit einem Zwei- oder Ein-Stufengradienten (0.4 M und 0.25 M Ammoniumsulfat oder ausschließlich 0.25 M Ammoniumsulfat in 0.05 M Phosphatpuffer, pH 6.5) eluiert. Auch hier wurde erst bei einem stabilen UV Signal die Salzkonzentration im Elutionspuffer gewechselt. Auch die 75 mL Säule wurde von noch gebundenen Proteinen mit 0.05 M Phosphatpuffer und 20 Vol.-% Ethanol befreit (siehe oben).

3.2.1.5 P34-Antikörperserum

Mit dem aufgereinigten Protein wurde die Herstellung eines P34-spezifischen Antikörperserums aus Kaninchen bei der Firma SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen, Dtl.) in Auftrag gegeben. Die Herstellung erfolgte nach dem Standardimmunisierungsprotokoll (2 Monate) der Firma.

3.2.2 Zellkultur

Das sterile Arbeiten erfolgte unter einer Laminar Flow (Thermo Electron Corporation). Als Epithelzellen wurde die Epithelzelllinie IPEC-J2 (*intestinal epithelial cell line J2*) (siehe Berschneider 1989 und Schierack et al. 2006) aus dem Schwein verwendet. Die IPEC-J2 Zellen wurden uns freundlicher Weise von Herrn Dr. Peter Schierack (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin, Dtl.) zur Verfügung gestellt. Die IPEC-J2 Zellen sind in Abbildung 7 a und b gezeigt. Zudem wurden aus dem Blut von Schweinen isolierte PBMCs verwendet (siehe 3.2.3.2) und daraus auch MoDCs generiert (siehe 3.2.3.3). Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 39 °C, der Körpertemperatur von Schweinen.

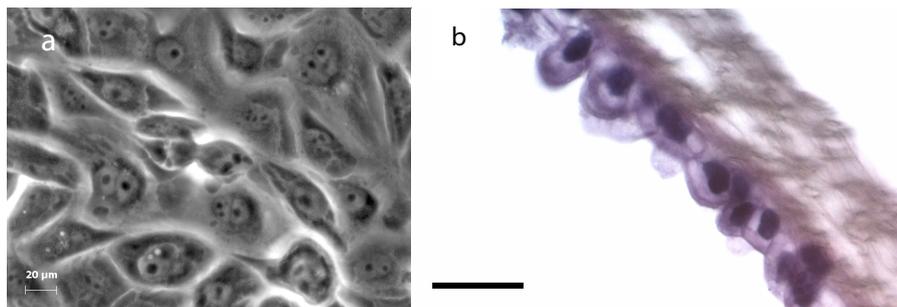


Abbildung 7: a) IPEC-J2 Zellen fotografiert im inversen Mikroskop (Aufnahme 400 x, der Balken entspricht 20 µm, Foto Frau Dr. H. Rau), b) in Paraffin eingebettete Hämatoxylin und Eosin gefärbte IPEC-J2 Zellen auf einem Transwelleinsatz (Aufnahme 400 x, Balken entspricht 40 µm).

3.2.2.1 Kultur von IPEC-Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das Medium auf 37 °C vorgewärmt und die Zellen (circa $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL) in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Dtl.) aus dem Tiefkühlschrank (-20 °C) oder flüssigen Stickstoff direkt ins Wasserbad befördert und anschließend in 40 mL Medium aufgenommen. Die Zellen wurden auf zwei T75 Zellkulturflaschen (Nunc) verteilt (20 mL je T75 Flasche). Am Folgetag wurde das Medium gewechselt.

Die Zellen wurden zweimal in der Woche passagiert. Dazu wurde der Zellrasen der jeweiligen Flasche mit PBS (37 °C) gewaschen und die Zellen mit Trypsin-EDTA (PAN Biotech, Aidenbach, Dtl.) bei 37 °C für zehn Minuten abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in frisches Medium aufgenommen, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und zentrifugiert (zehn Minuten, 350 g, RT). Circa 20 Passagen lang wurden die Zellen nach dem Auftauen in Kultur gehalten. Die ausgesäte Zellzahl war 13300 Zellen/cm² (50000 Zellen je Milliliter). Die Kultivierung erfolgte bei 39 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator (Nunc, Roskilde, Dänemark).

Eingefroren wurden die Zellen in 10 Vol.-% DMSO (PAN Biotech, Aidenbach, Dtl.) und 90 Vol.-% FCS (PAN Biotech). Je Milliliter waren es $5 \cdot 10^6$ IPEC-J2 Zellen.

3.2.2.2 Herstellen von PBMCs

Die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus dem heparinisierten Blut (Heparin, Liquemin N 25000, Roche, Grenzach-Wyhlen, Dtl.) von Schweinen des Versuchstierbestandes des IMTM (Immune Technologies and Medicine GmbH, Magdeburg, Dtl.) isoliert. Die Entnahme erfolgte unter Standardbedingungen aus der kranialen *Vena cava*. Das Blut (100 mL) wurde durch ein Zellsieb gefiltert und zu gleichen Teilen mit kaltem PBS-EDTA verdünnt und auf 50 mL Röhrchen (Polypropylen, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Dtl.) verteilt. Das verdünnte Blut wurde anschließend mit Ficoll (Ficoll Paque Plus, Pharmacia, Uppsala, Schweden) unterschichtet (10 mL unter 30 mL). Die Zentrifugation erfolgte in einer Eppendorf Laborzentrifuge Typ 58 10R (Eppendorf, Hamburg, Dtl.) für 25 Minuten bei RT, 800 g und ohne Bremse. Die abgenommene Interphase wurde in neue Röhrchen umgefüllt, mit PBS-EDTA auf 50 mL aufgefüllt und dreimal gewaschen (zehn Minuten, 4 °C, 350 g). Die Zellen wurden abschließend zusammengeführt und in 10 mL PBS-EDTA oder in Zellmedium resuspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 10 Vol.-% Schweineserum bei 39 °C, 5 % CO₂ in einem Inkubator (Nunc, Roskilde, Dänemark).

3.2.2.3 MoDCs

Aus den in 3.2.2.2 beschriebenen PBMCs ließen sich Monozyten über deren SWC3a-Rezeptor isolieren. Zehn Prozent aller PBMCs nach der Ficoll-Separation sind Monozyten. Die gewaschenen PBMCs wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt und pelletiert. Je 10^6 Monozyten wurden 10 μ L Anti-SWC3a Antikörper (SWC-3a, 74-22-15a, IgG2b, frisches Aliquot, Hybridomaüberstände, zur Verfügung gestellt von Frau Dr. D. Bimczok, PhD) direkt mit dem Zellpellet für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 50 mL PBS-EDTA gewaschen (4 °C, 350 g, zehn Minuten). Im übrig gebliebenen Puffer oberhalb der Zellen wurden die Zellen danach resuspendiert und mit 20 μ L Kügelchenlösung (Ziege Anti-Maus *microbeads*, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Dtl.) je 10^7 Monozyten inkubiert (80 μ L Puffer je 10^7 Monozyten). Die Inkubation erfolgte auf Eis für 20 Minuten. Schließlich wurden die Zellen in MACS-Puffer (entgast und auf 4 °C gekühlt) für zehn Minuten gewaschen (4 °C, 350 g). In der Zwischenzeit konnte die LS Säule (MACS LS Säule, midiMACS, Miltenyi Biotec) für die Separation vorbereitet werden. Dafür wurde sie in die magnetische Separationseinheit geklemmt und mit kaltem MACS-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 5 mL MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule gegeben. Diese wurde nun gewaschen, bis das Eluat klar war und die in der Säule gebundenen Zellen wurden mit 5 mL Puffer in ein neues 15 mL Röhrchen herausgespült (die Säule wurde zuvor aus der magnetischen Einheit herausgenommen). Anschließend wurden die separierten Zellen noch einmal in PBS-EDTA gewaschen (250 g, zehn Minuten, 4 °C) und dann auf 12-Well-Platten (Corning, Berlin, Dtl.) für drei Tage in einem Inkubator (39 °C, 5 % CO₂) (Nunc, Roskilde, Dänemark) kultiviert. Es wurden je Well 10^6 Zellen ausgesät in einer Lösung aus DMEM inklusive 10 Vol.-% Schweineserum, 150 ng/mL GM-CSF und 50 ng/mL IL-4 (beide Biosource, Solingen, Dtl.).

3.2.2.4 Versuche Zellkultur

Für alle Versuche wurden IPEC-J2 Zellen aus den ersten 20 Passagen nach dem Auftauen benutzt. Wenn nicht anderes beschrieben wurden die Zellen auf 24-Well-Platten (Corning, Wiesbaden, Dtl.) für die Versuche kultiviert. In jedes Well wurden 110000 Zellen in 1 mL Medium ausgesät. Nach Eintreten der Konfluenz wurden die Zellen nur noch mit serumfreiem Medium kultiviert (meist Folgetag). Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Der jeweilige Versuch fand neun Tage nach dem Aussäen und acht Tage nach dem Wechsel auf serumfreies Medium statt. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Medienmenge während der Versuche war bei 24-Well-Platten 0.5 mL. Nach Inkubation (mit Protein und anderen Substanzen) wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, trypsinisiert (100 μ L Trypsin-EDTA/Well) und erneut gewaschen. Mit 200 μ L *cell wash*-Lösung (BD Beckton Dickinson, Heidelberg, Dtl.) und 10 μ L Propidiumiodid (0.1 mg/mL PI, Sigma) erfolgte die Messung in einem BD FACS Calibur-Gerät (BD Beckton Dickinson) in dafür vorgesehenen FACS-Röhrchen (BD Beckton Dickinson). PI interkaliert mit der DNA und passiert nur die Membran toter Zellen. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (=MFI) von mindestens 15000 Zellen bestimmt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der CellQuest Software. Für die Auswertung wurden die Zellen heraus sortiert, die lebend und für FITC-Signale positiv waren.

Transwell

Es wurden für die Transwellversuche Transwells für 12-Well-Platten aus Polystyrol der Firma Greiner Bio-one (Frickenhausen, Dtl.) mit 1 µm Porendurchmesser (zum Beispiel für Elektronenmikroskopie) oder kollagenbeschichtete Transwells der Firma Corning mit 0.4 µm Porengröße verwendet (Abbildungen 7 b und 34). Dort wurden 50000 IPEC-J2 Zellen je Transwelleinsatz ausgesät. Die Zellen wurden auf den Transwells für acht Tage kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie mit serumfreiem Medium behandelt (2 mL oder 1.5 mL im basolateralen und 1 mL oder 0.5 mL im apikalen Kompartiment). Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER *transepithelial electrical resistance*) erfolgte mit einem TEER-Messgerät nach Herstellerangaben (Millipore, Schwalbach, Dtl.). Die Elektrode wurde hierfür nach Sterilisation in serumfreiem Medium über Nacht equilibriert.

Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme (IPEC-J2 und MoDC)

Für die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme wurden IPEC-J2 Zellen am Versuchstag mit 0, 50, 250, 500 oder 1000 µg/mL Protein-FITC (77 % P34) in serumfreiem Medium für zwei Stunden bei 4 °C und bei 39 °C inkubiert (im Kühlschrank oder Inkubator). Die FITC-Markierung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.6 beschrieben. Für die Versuche der Zeitabhängigkeit wurden 150 µg/mL Protein-FITC (77 % P34) für 15, 30, 60, 120 Minuten, 8 und 24 Stunden auf den Zellen inkubiert, ebenfalls bei 4 °C und 39 °C. Die Zellen wurden anschließend wie oben beschrieben gewaschen, trypsiniert und im FACS gemessen.

Für die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme in MoDCs wurden Zellen wie in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben verwendet. Sie wurden ebenfalls für zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 10, 25, 50, 100 und 250 µg/mL) Protein-FITC (77 % P34) in Zellmedium inkubiert und anschließend für die Analyse im FACS mit PBS-EDTA von den Platten gelöst.

Inhibition der Oberflächenbindung durch Zucker

Die IPEC-J2 Zellen wurden mit 100 mM Zucker und 100 µg/mL Protein-FITC oder nur mit Protein-FITC (99 % P34) für eine Stunde bei 4 °C oder 39 °C inkubiert (vergleichbar mit den ELISA-Tests, siehe 3.2.5.3). Die Monosaccharide (siehe Tabelle 2) wurden als 1 M Lösungen in serumfreiem Medium als Vorverdünnung angesetzt.

Tabelle 2: Verwendete Monosaccharide

Monosaccharid	Verwendung	Firma
D(+)-Xylose	100 mM	Roth (Karlsruhe, Dtl.)
D(+)-Mannose	10 mM (ELISA)	
L(-)-Fukose		Fluka (Basel, Schweiz)

Aufnahme und Durchtrittsbeeinflussung durch cholesterolbindende Substanzen

Am Versuchstag wurden die IPEC-J2 Zellen mit den in Tabelle 3 aufgeführten Substanzen für 30 Minuten bei 39°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Protein (Protein-FITC 150 µg/mL, 99 % P34) in serumfreiem Medium für zwei

Stunden zusammen mit den Substanzen inkubiert bei 4 °C und bei 39 °C. Zur Kontrolle wurden Zellen mit Protein-FITC ohne Substanzbehandlung in serumfreiem Medium mitgeführt. Für die vergleichbaren Transwellversuche (unbeschichtete Transwells der Firma Greiner Bio-one) wurde vor dem Versuch die Dichte des Epithels mit dem TEER-Messgerät überprüft. Die Zellen wurden anschließend mit Protein (77 % P34) für drei Stunden inkubiert und die basolateralen Überstände vollständig aufgefangen. Die eingesetzte Proteinkonzentration war 1 mg/mL in 500 µL. Es wurden jeweils Zellen mit und ohne Substanzbehandlung mitgeführt. Die basolateralen Überstände wurden für die Analyse im Immunoblot mit TCA-Lösung ausgefällt und gelelektrophoretisch getrennt (siehe Methoden 3.2.3.1, 3.2.3.4, 3.2.3.5).

Tabelle 3: Cholesterolbindende bzw. -depletierende Substanzen

Substanz	Vorinkubation (Zeit in Minuten)	Konzentration	Firma
Nystatin	30	500 U/mL	beide Sigma Aldrich,
Methyl-β-Cyclodextrin	30	10 mM	(Crailsheim, Dtl.)

Zellalter und Proteinendozytose

Um die Proteinaufnahme unterschiedlich alter Zellen zu beobachten, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Entweder wurden die Zellen einer Passage am gleichen Tag in Flaschen ausgesät und immer für den jeweiligen Tag (1, 4, 7, 10 und 13 Tage) trypsinisiert, ausgesät und am Folgetag auf serumfreies Medium gesetzt. Im anderen Fall wurden Zellen unterschiedlicher Passagen ausgesät. Diese waren entweder frisch passagiert oder im Kühlschrank für zwei bis vier Tage gelagert. Die Inkubation mit FITC-markiertem Protein (77 % P34) erfolgte für zwei Stunden am gleichen Versuchstag in serumfreiem Medium mit der gleichen FITC-markierten Proteinprobe.

Epitheliale Zytokine

Für das Nachweisen epithelialer Zytokine nach P34-Inkubation wurden zunächst 275000 IPEC-J2 Zellen je Well in einer 6-Well-Platte (Corning) in 5 mL Medium ausgesät. Ab dem nächsten Tag, nach Feststellen der Konfluenz der Zellschicht, wurden die Zellen nur noch mit serumfreiem Medium behandelt. Am Versuchstag (neun Tage nach Aussaat) wurden die Zellen mit 50, 150, 250, 500 und 1000 µg P34/mL in 2.5 mL serumfreiem Medium für zwei Stunden inkubiert. Es wurde die 77 %ige P34-Probe verwendet. Die Zellen wurden anschließend mit kaltem PBS mehrmals gewaschen und unter einem Abzug in 500 µL Trizol aufgenommen. Die Isolation der mRNA, Reverse Transkription und PCR erfolgte wie in den Abschnitten 3.2.3.7-3.2.3.9 beschrieben.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Aufkonzentrieren von Proteinproben

Das Aufkonzentrieren der Proteinlösungen geschah durch Fällung mit einer Trichloressigsäurelösung (TCA-Lösung) oder mit Hilfe von Zentrifugationseinheiten (Roti®Spin MIDI-3, MINI-10, Roth, Karlsruhe, Dtl.). Das Fällen der Proteine mit der TCA-Lösung (10 g/100 mL) erfolgte auf Eis für zehn Minuten. Anschließend wurden

die Proben für 20 Minuten bei 20000 g in einer Laborzentrifuge Typ 5417R (Eppendorf, Hamburg, Dtl.) zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden dann mit Aceton gewaschen und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. An der Luft trockneten die Pellets und wurden schließlich in destilliertem Wasser oder Puffer für die Analyse im SDS-Acrylamidgel gelöst. Sollte das Protein weiter verwendet werden, wurden die Proteinproben mit Hilfe von Dialysemembranen (Spectra/Por® Dialysemembranen (6-8000 Da) Spectrum Laboratories, Inc. CA USA) und PEG (20 g/100 mL) (>8000 Da, Roth, Karlsruhe, Dtl.) in Phosphatpuffer aufkonzentriert.

3.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Proben wurde mit Hilfe der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Als Standard wurde BSA (Fraktion V, Roth, Karlsruhe, Dtl.) verwendet (0.01-0.05 µg/µL). Die Vermischung der Proben und Standards mit 40 µL Roti®Quant-Lösung (Roth, Karlsruhe, Dtl.) und Aqua dest. (aufgefüllt auf 200 µL) erfolgte in 96-Well-Platten. Die Absorptionsmessung der Proben auf der 96-Well-Platte erfolgte bei 520 nm in einem ELISA-Reader nach fünfminütiger Inkubation (CM Sunrise Microplate Reader, Tecan Crailsheim, Dtl.).

3.2.3.3 Nachweis der Glykosylierung

Der Nachweis der Glykosylierung an Proteinen erfolgte nach Focke (Focke et al. 1998). Die Hydroxylgruppen der Zuckerreste können unter Bildung von Ameisensäure und Formaldehyd durch Periodat oxidiert werden. Die entstandenen Aldehyde werden dann mit Schiffchem Reagenz (Fertiglösung) als violette Banden im Gel sichtbar gemacht: Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine im Gel für 30 Minuten fixiert. Danach wurde das Gel für fünf Minuten in Wasser gewaschen und schließlich mit Periodsäurelösung für 30 Minuten inkubiert. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation mit dem Schiffchen Reagenz. P34 wurde mit BSA (Fraktion V, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Ovalbumin (Sigma Aldrich, Crailsheim, Deutschland) verglichen. Ovalbumin ist glykosyliert, BSA nicht.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli 1970

Vor dem Beladen wurden die Proben mit 4-fachem Ladepuffer versetzt (ein Viertel des Probenvolumens) und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und auf Eis gelagert. Neben einem Proteingrößenmarker (SDS-Page Broad Range Biorad (6.5-200 kDa) oder Page Ruler TM *prestained protein ladder* (10-170 kDa), Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.) wurden die Proteinproben dann auf ein vertikal gegossenes auspolymerisiertes SDS-Acrylamidgel (0.75 mm Schichtdicke) aufgetragen. Die verwendete Elektrophoresekammer war von der Firma Biorad (Mini Protean™, Biorad, München, Dtl.). Die Proben eines Gels wurden mit 10 mA gesammelt und 30 mA getrennt (Spannungsgerät von Biorad). Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung geschwenkt (20-30 Minuten) und danach solange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. (Alle gezeigten Gele sind „10 %ige“ Gele.)

3.2.3.5 Blotten von Acrylamidgelen und Immunfärbung

Das Verfahren fand in einer Halbtrockenzelle (Life Science BioRad, München, Dtl.) mit Platin/Edelstahl-Elektroden statt. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden Gel, Nitrozellulosemembran (Blotmembranen Protran BA 85, Nitrozellulose 0.45 oder 0.2 µm Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Dtl.) und Filterpapier (*Extra Thick Blot Paper*, BioRad, München, Dtl.) in *Blotting*-Puffer equilibriert und anschließend in die Halbtrockenzelle übereinander gelegt (Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, Filterpapier). Der Proteintransfer geschah während 50 Minuten bei 15 Volt. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran fixiert und kurz durch Ponceaurot (Ponceau S, Fluka, Basel, Schweiz) sichtbar gemacht. Überschüssige Farbe wurde anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die auf dem Blot fixierten Proteine konnten mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4). Zum Blockieren und Detektieren wurde das BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (*mouse/rabbit*, Roche, Grenzach-Wyhlen, Dtl.) nach Herstellerangaben verwendet. Für Caveolin-1, Flotillin und Clathrin wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Sekundärantikörper der Firma Santa Cruz verwendet. Die Analyse der Blotmembranen erfolgte über das Auswertungssystem AlphaEase® FC Imaging System.

Tabelle 4: Auf Immunoblots verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Spezifikation	Firma	Eingesetzte Verdünnung
Caveolin-1	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Clathrin	Maus, IgG1	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.	1:1000
Flotillin-1	Ziege, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
F5	Maus, monoklonal, IgG2a	freundlicher Weise von Prof. Dr. Ogawa (Koyoto University Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt	1:1000
Anti-P34 Kaninchenserum	polyklonal	Seqlab, Göttingen, Dtl.	1:2000
Ziege Anti-Kaninchen	IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.	1:8000
Ziege Anti-Maus	IgG		
Esel Anti-Ziege	IgG		

3.2.3.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Fluoreszeinisothiocyanat Isomer I (FITC, Sigma, Steinheim, Dtl.) wurde zum Markieren von Zielprotein in PBS (Biochrom AG, Berlin, Dtl.) verwendet. Zunächst wurde FITC in Dimethylsulfoxid (DMSO, PanBiotech, Aidenbach, Dtl.) gelöst (1 µg/µL). Das Protein und gelöstes FITC wurden immer im gleichen Molverhältnis von 1:4.4 eingesetzt. Nach einer viertelstündigen Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler wurden freies FITC und Protein-FITC über eine circa neun Zentimeter hohe Größenausschluss säule (Material Sephadex® G-75, Kügelchendurchmesser 20-50 µm, Sigma) wieder voneinander getrennt.

3.2.3.7 RNA-Isolation mit Trizol

Für die Isolation von RNA aus Epithelzellen wurde Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.) verwendet. Die Zellen wurden nach dem jeweiligen Versuch (beschrieben in Abschnitt 3.2.2.4) unter einem Abzug in Trizol aufgenommen (1 mL/ 5-10 · 10⁶ Zellen) und gelagert (-80 °C). Zur Isolation von RNA wurden die Zellen zunächst mit einer Spritze und Kanüle (Omnifix®-F1, 1 mL, Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert und

anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach anschließendem Untermischen von Chloroform (0.2 mL/mL Trizol), Vortexen und Inkubieren wurde das Gemisch zentrifugiert (15 Minuten, 4 °C, 12000 g). Die RNA befand sich in der wässrigen Phase, wurde abgenommen und mit 0.5 mL Isopropanol/mL Trizol gefällt (Inkubation zehn Minuten, RT, Zentrifugation zehn Minuten, 4 °C, 12000 g). Abschließend wurde die RNA mit 75 Vol.-% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, fünf Minuten, 7500 g). Nachdem das RNA-Pellet getrocknet war, wurde es in DEPC-Wasser (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.) aufgenommen. Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte bei 260 nm und 280 nm in einem Photometer (SmartSpec 3000, Biorad, München, Dtl.).

3.2.3.8 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der RNA erfolgte mit einer Reversen Transkriptase (M-MuLV Reverse Transkriptase 20 U/ μ L aus dem RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit, Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.). Zunächst wurden zwei Ansätze hergestellt; Mischung 1 enthielt 1.5 μ g RNA, 1 μ L Oligo(dT)₁₈ primer (0.5 μ g/ μ L) und wurde zu 11 μ L mit DEPC-Wasser (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.) aufgefüllt. Mischung 1 wurde kurz gemischt, zentrifugiert, anschließend bei 70 °C für fünf Minuten inkubiert (Cycler von Biometria, Göttingen, Dtl.) und dann auf Eis gestellt. Danach wurde Mischung 2 (4 μ L 5-fach Reaktionspuffer, 1 μ L RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor, 2 μ L dNTP Mischung (10 mM)) hinzu gegeben und bei 37 °C für fünf Minuten inkubiert. Je Reaktionsgefäß wurden 2 μ L Reverse Transkriptase abschließend hinzu pipettiert und die Mischung dann bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend gestoppt (70 °C für 10 Minuten, dann 20 °C für zehn Minuten). Das Endvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf 100 μ L eingestellt. Das in der PCR eingesetzte Volumen der cDNA-Lösung waren 5 μ L.

3.2.3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Je Probe wurde in den PCR-Ansatz wie folgt pipettiert: 1 μ L (10 mM) dNTP-Mischung, 0.5 μ L (10 mM) sense-Primer, 0.5 μ L (10 mM) antisense-Primer, 5 μ L 10-fach PCR-Puffer, 1.5 μ L MgCl₂ (50 mM), 0.4 μ L Taq-Polymerase (5 U/ μ L) (alles Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.). Es wurden 5 μ L cDNA-Lösung zugefügt und der Ansatz auf 50 μ L mit Ampuwa-Wasser (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Dtl.) aufgefüllt. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die PCR fand in einem Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf (Hamburg, Dtl.) statt.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing Temperatur	Zyklusanzahl
IL-8 sense	AGC CCG TGT CAA CAT GAC TTC C	63.3°C	38
IL-8 antisense	GAA GTT GTG TTG GCA TCT TTA CTG AG		
GAPDH sense	TTC CAC GGC ACA GTC AA	55°C	30
GAPDH antisense	GCA GGT CAG GTC CAC AA		
IL-6 sense	ATG AAC TCC CTC TCC ACA AGC	58°C	40
IL-6 antisense	TGG CTT TGT CTG GAT TCT TTC		
TGF- β sense	AAG CGG CAA CCA AAT CTA TG	58°C	35
TGF- β antisense	GGC GAA AAC CCT CTA TAG CC		
β -Aktin sense	GGA CTT CGA GCA GGA GAT GG	65°C	27
β -Aktin antisense	GCA CCG TGT TGG CGT AGA GG		
Cyclophilin sense	AAC CCC ACC GTC TTC TTC	58°C	30
Cyclophilin antisense	TGC CAT CCA ACC ACT CAG		

Von den PCR-Produkten wurden 15 μL mit 2 μL Ladepuffer vergleichend auf ein Agarosegel geladen (1.5 g/100 mL Agarose von Promega, Mannheim, Dtl. und 10 μL /100 mL Ethidiumbromid, Sigma, Crailsheim, Dtl.). Die Proben diffundierten mit einem Marker (Mass Ruler TM DNA *ladder low range*, 80-1031 Basenpaare, 60.9 ng/ μL , Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.) zusammen im Gel bei 100 Volt für 45 Minuten in dafür vorgesehener Gelkammer mit Spannungsgerät (Serva, Heidelberg, Dtl.). Die Analyse aller Gele erfolgte im UV-Licht mit Hilfe des Auswertungssystem AlphaEase® FC Imaging System (Alpha Innotech Corp., San Leandro CA, USA).

3.2.4 Färbeprotokolle

3.2.4.1 Elektronenmikroskopie von IPEC-J2 und P34

Für die Elektronenmikroskopie wurden unbeschichtete Transwells aus Polystyrol der Firma Greiner Bio-one (Frickenhausen, Deutschland) mit 1 μm Porendurchmesser verwendet. Nach Inkubation der Zellen mit P34 am Versuchstag für zwei Stunden folgte das standardisierte Immunfärbeprotokoll bevor die Einbettung für die Elektronenmikroskopie stattfand. Die Zellen auf den Zellkultureinsätzen wurden mit Phosphatpuffer (PB) dreimal gewaschen und anschließend fixiert (RT, zehn Minuten). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PB, wurden die Zellen für den primären Antikörper permeabilisiert (fünf Minuten) und erneut gewaschen. Das Blockieren erfolgte mit BSA (1 g/100 mL) für zehn Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur. Der primäre Antikörper (F5) wurde für zwei Stunden (oder über Nacht) auf den gut eingepackten Einsätzen schüttelnd belassen. Die Einsätze wurden anschließend erneut gewaschen und nach wiederholter Blockierung mit dem zweiten Antikörper (biotinyliert, Anti-Maus IgG, Biozol, Eching, Dtl.) inkubiert (zwei Stunden, Schüttler). Es folgte die Inkubation der Zellen mit ABC-Lösung für eine Stunde (nach Herstellerangaben) nach einem vorherigen Waschschrift. Die Sichtbarmachung des sekundären Antikörpers erfolgte mit Diaminobenzidin (DAB, 0.5 mg/mL Endkonzentration in PB, + 220 μL 0.3 Vol.-% H_2O_2). Nach der Immunfärbung folgte die Nachfixierung mit 1-3 Vol.-% Glutaraldehyd für zwei bis sechs Stunden oder über Nacht. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze mit den Zellen ausgestant und über Nacht in PB bei 4 °C aufbewahrt. Das weitere Protokoll entsprach der Aufarbeitung von Gewebeschnitten für die Elektronenmikroskopie, das heißt 30 Minuten Fixierung in Osmiumtetroxid (1 g/100 mL, Science Service) und anschließendes Spülen mit Puffer. Es folgte eine aufsteigende Ethanolreihe (60-99 Vol.-%) zum Dehydrieren. Hiernach wurden die Zellen auf den Membranen mit Durcupan (Fluka, Buchs, Schweiz), einem Epon-Araldit-Gemisch, zwischen Folien flach eingebettet und polymerisierten bei 70 °C zwei bis drei Tage aus. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle konnten nun interessante Bereiche ausgestant und vertikal auf Leerblöckchen aufgeklebt werden. An einem Ultracut S (Reichert-Jung, Wien, Österreich) wurden Semidünnschnitte (0.5-2 μm) mit einer Toluidinfärbung und Ultradünnschnitte (50-80 nm) hergestellt. Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte an einem LEO 906 E von Zeiss (Oberkochen, Dtl.) mit einer digitalen BioScan Kamera von Gatan.

3.2.4.2 Immunfärbung auf Zellen

Die Objektträger (LabTek, Nunc, Wiesbaden, Dtl.) wurden mit Poly-D-Lysin in serumfreiem Medium beschichtet. Hierzu wurden 8 µg Poly-D-Lysin (BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.) in 320 µL serumfreiem Medium gelöst und auf einem Feld des Objektträgers (0.8 cm²) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit PBS waren die Felder auf den Objektträgern für die Aussaat mit Zellen gebrauchsfertig. Es wurden 50000 IPEC-J2 Zellen je Feld ausgesät. Nach Konfluenz der Zellen, wurden diese nur noch mit serumfreiem Medium behandelt. Am Versuchstag (neun Tage nach Aussaat und acht Tage in serumfreiem Medium) wurden 500 µg/mL Protein (77 % P34) in serumfreiem Medium für zwei Stunden auf den Zellen inkubiert. Nach anschließendem gründlichem Waschen waren die Objektträger fertig zur Fixierung und Färbung (siehe 3.2.4.1). Es wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Antikörper verwendet und für jeweils zwei Stunden bei RT inkubiert.

Tabelle 6: Für die Immunfärbung verwendete Antikörper

Antikörper	Spezifikation	Firma	Eingesetzte Verdünnung
F5	mAb, Maus IgG2a	Geschenk Prof. Ogawa	1:10-1:25
FITC-Phalloidin		Sigma Aldrich, Crailsheim, Dtl.	1:50
Anti-Maus IgG2a	TexasRed markierter sekundärer Antikörper	Southern Biotech, Birmingham, USA	1:20
DAPI	Zellkernfärbung	Partec GmbH Münster, Dtl.	1:10

Fixier- und Waschlösung entsprachen dem oben genannten Protokoll, hier allerdings wurde die DAPI-Kernfärbung dem sekundären Antikörper angeschlossen und ein Schritt mit Natriumborhydrid (1 g/100 mL, Sigma) in PB eingefügt. Natriumborhydrid wird zur Verminderung der Eigenfluoreszenz der Zellen eingesetzt. Nach dem Nachfixieren wurden die Objektträger mit dem Eindeckmedium eingedeckt und am nächsten Tag die Deckgläschen mit Nagellack fixiert.

3.2.4.3 Cytospots

Cytospots wurden von MoDCs oder Epithelzellen auf Objektträgern hergestellt, nachdem diese mit FITC-markiertem Protein inkubiert worden sind (Gerätschaft und Zentrifuge der Firma Hettich, Kirchlegern, Dtl.). Die Zellen wurden auf den Objektträgern mit Methanol-Aceton (4 °C, 90 Sekunden) fixiert und dann mit TBS-Tween gewaschen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10, Partec, Münster, Dtl.) für fünf bis zehn Minuten gefärbt und die Objektträger anschließend erneut gewaschen (TBS-Tween). Die Objektträger wurden schließlich eingedeckelt. Am Folgetag wurden dann die Deckgläschen mit Nagellack fixiert.

3.2.4.4 Histologische Färbung

Epithelzellbewachsene Zellkultureinsätze (kollagenbeschichtet von Corning, siehe Abschnitt 3.2.2.4) wurden in Parafin eingebettet und davon 5-10 µm dicke Schnitte angefertigt (Schlittenmikrotom Microm, Walldorf, Deutschland). Diese wurden auf Objektträger gelegt und in Xylol entparaffiniert (zweimal für fünf Minuten) und anschließend mit absteigender Ethanolreihe entwässert. Es folgte die Hämatoxilin-färbung (Hämatoxilin, Merck, Darmstadt, Dtl.) für eine Minute und das Differenzieren in EtOH-HCl. Gebläut wurden die Objektträger in Leitungswasser für zehn Minuten, woraufhin die

Eosinfärbung (Eosin, Serva, Heidelberg, Dtl.) für 30 Sekunden folgte. Vor dem Eindeckeln wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und in aufsteigender Ethanolreihe inkubiert.

Alle visuellen Auswertungen erfolgten mit einem Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dtl.), die Filter für die Fluoreszenzmikroskopie sind im Anhang (Seite 110) aufgeführt. Die digitalen Bilder wurden mit einer Spot RT Digital Kamera mit Spot Advanced Software (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) aufgenommen.

3.2.5 Weitere Methoden

3.2.5.1 Dichtegradientenultrazentrifugation

Mit der Dichtegradientenultrazentrifugation über einen Sucrosegradienten lassen sich *Lipid Raft*- Fraktionen aus Zellysaten anreichern. Die *Lipid Raft* Fraktionen reichern sich durch ihren hohen Lipidanteil im Bereich niedrigster Dichte an, wenn während des Zellaufschlusses nichtionische Detergenzien verwendet werden, in denen sie nicht löslich sind (Brown und Rose 1992). Dort bilden sie nach Zentrifugation im oberen Gefäßbereich leicht abnehmbare Ringe. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden circa $60 \cdot 10^6$ IPEC-J2 Zellen (acht T75 Flaschen) für 1.5 Stunden mit 1 mg/mL Protein (77 % P34) inkubiert, von der Platte mit Trypsin-EDTA gelöst und für die Zentrifugation in 1 mL Lysispuffer für zehn Minuten auf Eis lysiert. Das Lysat wurde anschließend zu gleichen Teilen in 80 %iger Sucroselösung vermischt und in einem Homogenisator (Douncer, Roth, Karlsruhe, Dtl.) gleichmäßig feinverteilt. Nach dem Transfer dieser Mischung in ein klares Zentrifugenröhrchen (Ultra Clear Centrifuge Tube, Beckman Instruments Inc., CA, USA) erfolgte die Überschichtung des Zellysates mit 2 mL eiskalter 30 %iger Sucroselösung und 1 mL 5 %iger Sucroselösung. Die Zentrifugation fand in einem SW55Ti Rotor einer Ultrazentrifuge (Beckman L-70 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld, Dtl.) für 20 Stunden bei 100000 g und 4 °C statt (minimale Beschleunigung, keine Abbremsung). Nach der Zentrifugation waren zwei Ringe sichtbar, die separat abgenommen wurden: R1 und R2, die Phase dazwischen wurde getrennt abpipettiert (I1) und die nach R2 folgenden Fraktionen F1-F8 jeweils mit 400 µL abgenommen (siehe Abbildung 8).

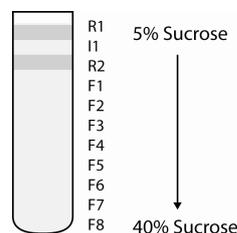


Abbildung 8: Nach der Dichtegradientenultrazentrifugation abgenommene Fraktionen

Anteile der Fraktionen wurden anschließend für die Analyse gelelektrophoretisch getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert (siehe Methoden 3.2.3.4 und 3.2.3.5). Es wurden auf den Membranen die Proteine P34, Flotillin-1, Caveolin-1 und Clathrin nachgewiesen.

3.2.5.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein colorimetrischer Test. Die Stoffwechselaktivität von lebenden Zellen wird mit diesem über die Aktivität mitochondrialer Enzyme quantitativ bestimmt. MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird von vitalen Zellen in einer NADH-abhängigen Reaktion zu Formazan umgesetzt (Denizot und Lang 1986). Hierbei sind Farbintensität und Zellvitalität proportional. Die PBMCs wurden aus dem Blut von Schweinen durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten isoliert (siehe 3.2.3.2). 100000 Zellen je Well wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 2,5, 5, 10 und 25 µg/100 µL) von P34 (77 %ig) in Medium für drei bis fünf Tage auf einer 96-Well-Platte (Nunc) inkubiert (Gesamtvolumen 100 µL). Nach Ablauf dieser Zeit wurden 10 µL MTT-Lösung (0,5 mg/mL in PBS) in jedes Well dazu pipettiert und zwei bis vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µL Lysispuffer und die erneute Inkubation im Dunkeln bei RT für wiederum zwei bis vier Stunden. Die Messung im ELISA-Reader (CM Sunrise Microplate Reader, Tecan Crailsheim, Dtl.) erfolgte bei 570 nm (Referenz 650 nm). Zum Vergleich wurden Zellen, die mit zusätzlich Concanavalin A (Con A, 5 µg/mL) inkubiert worden sind, mitgeführt. Con A (Pharmacia, Uppsala, Schweden) als Lektin und Mitogen fördert die Proliferation von PBMCs. Die relative Stoffwechselaktivität wurde wie folgt kalkuliert (Abs steht für die Absorption bei der Wellenlänge von 570 nm): $\text{Abs}_{570} \text{ Probe} - \text{Abs}_{570} \text{ Basislinie} / \text{Abs}_{570} \text{ Kontrolle} - \text{Abs}_{570} \text{ Basislinie}$.

3.2.5.3 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

P34 Antikörper im Serum von Schweinen

Die 96-Well-Platten (maxisorp, Nunc) wurden mit Protein P34 (99 %) über Nacht bei 4 °C beschichtet (10 µg P34/mL, 100 µL je Well). Anschließend wurden die Plattenvertiefungen einmal mit PBS gewaschen (jeweils 200 µL) und mit Ziegen Serum (1:100 in PBS, 100 µL/Well, Dianova, Hamburg, Dtl.) für eine Stunde bei RT blockiert. Nach dem anschließenden Waschen mit PBST wurden die Seren (siehe Tabelle 7) in den entsprechenden Verdünnungen (1:50-1:1000) pipettiert (jeweils 100 µL je Well) und wiederum für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit dem sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper (Ziegenantikörper Anti-Schwein, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) wurde nach erneutem Waschen inkubiert (1:10000, eine Stunde, RT). Schließlich erfolgte die Inkubation mit o-Phenylendiamin (SigmaFast™OPD Sigma Aldrich, Crailsheim, Dtl., Verwendung nach Herstellerangaben) für 30 Minuten bei Dunkelheit und RT. Gemessen wurde die Platte im ELISA-Reader (CM Sunrise Microplate Reader, Tecan Crailsheim, Dtl.) bei 450 nm. Zur Kontrolle wurden die gleichen Proben auf nicht mit Protein vorbeschichteten Platten pipettiert.

Tabelle 7: Verwendete Seren

1) für Sojaprotein positive Seren	Herkunft: University of Bristol, Bristol, UK; die Schweine wurden mit ganzen gemahlten Sojabohnen (circa 100 g/ Tag) im Alter von acht bis zwölf Wochen gefüttert und nach vier Monaten geschlachtet (Angaben Dr. Martin Kenny)
2) Tiere konventioneller Haltung	Herkunft: IMTM GmbH Magdeburg, Dtl.; Futter K 849/08 deuka SFT gekörnt (Deutsche Tiernahrung GmbH & C) ad libitum, das Futter beinhaltet Sojaextraktionsschrot (dampferhitzt) und Sojapflanzenöl
3) negative Seren	Herkunft: FBN Dummerstorf, Dummerstorf, Dtl., Seren von ungesäugten, neugeborenen Ferkeln

Inhibition der Oberflächenbindung an Epithelzellen des P34 durch Zucker

IPEC-J2 Zellen wurden auf 96-Well-Platten ausgesät (25000 Zellen/Well). Nach Eintreten der Konfluenz wurden die Zellen nur noch mit serumfreiem Medium behandelt. Am Versuchstag (Tag neun nach Aussaat) erfolgte zunächst die einstündige Blockierung bei 4 °C mit Schweineserum (1 Vol.-%, Sigma) in PBS. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 99 %igem P34 (10 und 50 µg/mL in 1 Vol.-% Schweineserum in PBS) und / oder den Monosacchariden (10 mM Mannose, Xylose, Fukose) bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Stunde wurden die Zellen sorgfältig gespült (kaltes PBST) und in 4 Vol.-% Formalin fixiert. Nach erneutem Waschen in kaltem PBST erfolgte die Inkubation bei 4 °C mit dem polyklonalen Kaninchenserum (spezifisch für P34) der Verdünnung 1:5000 in 1 Vol.-% Schweineserum in PBS für zwei Stunden bei 4 °C. Dem erneuten Waschen folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Schwein Anti-Kaninchen Immunglobuline, DAKO GmbH, Hamburg, Dtl.) der Verdünnung 1:7500 für zwei Stunden bei 4 °C und schließlich die Inkubation mit dem OPD-Reagenz nach Herstellerangaben (Sigma Aldrich, Crailsheim, Dtl.). Die Messung im ELISA-Reader (CM Sunrise Microplate Reader, Tecan, Crailsheim, Dtl.) erfolgte bei 450 nm.

3.2.5.4 *In vitro* Verdauung nach Boisen und Miller

Zur Überprüfung der Verdaulichkeit des Proteins P34 aus der Sojabohne wurde das Protokoll nach Boisen (1991) verwendet mit einer Adaption nach Miller (Miller et al. 1981). Ein Gramm Sojabohnen (über Nacht eingeweicht oder trocken) wurden mit Mörser und Pestel klein gemahlen und in Kolben (100 mL) überführt. 25 mL Phosphatpuffer (0.1 M, pH 6) und 10 mL 0.2 M HCl wurden addiert und die Lösung auf pH 2 eingestellt (pH-Meter von Schott, Mainz, Dtl.). Das Zufügen des Pepsins (1 mL, 0.1 M HCl inklusive 28.6 mg Pepsin, 0.7 FIPU/mg, Pepsin aus der Magenschleimhaut von Schweinen, Merck) und die zweistündige Inkubation im 39 °C warmen Wasserbad (85-mal in eine Richtung je Minute) sollte der Magenverdauung entsprechen.

Nach den zwei Stunden wurden die Kolben auf Eis gelagert, 10 mL Phosphatpuffer (0.2 M, pH 6.8) und 5 mL 0.6 M NaOH zugefügt und der pH-Wert auf 6.8 mit einem pH-Meter eingestellt. Dazu wurde 1 mL frische Pankreatinlösung gegeben (50 mg Pankreatin, Sigma, Crailsheim, Dtl., *activity equivalent to 4 x USP specifications* in 0.1 M Na₂CO₃). Die Ansätze wurden geteilt und in jeweils einem Ansatz wurde dazu noch Gallensalz im Masseverhältnis von 1:6.25 Pankreatin: Gallensalze (nach Protokoll Miller et al. 1981) gegeben (Galle als Trockenextrakt aus dem Schwein, Sigma, Crailsheim, Dtl.). Nach weiteren zwei Stunden Inkubation im Wasserbad wurden die Kolben abschließend auf Eis gelagert, die Ansätze abzentrifugiert (10000 g, 4 °C, fünf Minuten) und dann Proben entnommen. Für die gelelektrophoretische Auftrennung und den Transfer auf Blotmembranen wurden je 100 µL der Proben mit TCA-Lösung gefällt.

3.2.5.5 In Gel Verdau und Massenspektrometrie

Der verwendeten Methode liegt ein adaptiertes Protokoll nach Shevchenko et al. (1996) zu Grunde. Das Protein enthaltene Gelstück wurde zweimal durch wiederholtes Zufügen und Abnehmen von 0.1 M NH₄HCO₃ (Ammoniumhydrogencarbonat) und Acetonitril (beide 50 Vol.-%) gewaschen und nachfolgend in einer Vakuumzentrifuge (Gerät Savant

der Firma Thermo) getrocknet. Anschließend wurden die Proteine durch die Inkubation in 10 mM Dithiothreitol für 45 Minuten bei 56 °C reduziert. Die erhaltenen SH-Gruppen der Cysteinreste wurden nachfolgend durch Inkubation in 55 mM Iodacetamid für 30 Minuten bei Raumtemperatur alkyliert. Die Gelstückchen wurden dann erneut durch wiederholtes Zufügen und Abnehmen von 0.1 M NH_4HCO_3 und Acetonitril gewaschen und anschließend wieder in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurden sie in 50 mM NH_4HCO_3 und 12.5 ng/ μL Trypsin (Roche Diagnostics, modifiziert, *sequencing grade*) resolubilisiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen tryptischen Peptide wurde aus dem Gel durch wiederholte Zugabe einer ausreichenden Menge 25 mM NH_4HCO_3 und Acetonitril gewaschen. Die Extraktion wurde durch Sonifikation (Ultraschallbad Bandelin, Sonorex) unterstützt. Alle Extrakte wurden anschließend zusammengeführt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Peptide wurden dann in 5 μL 0.1 Vol-% Trifluoressigsäure (TFA) gelöst und auf einer 250 nl *Reversed Phase*-Nanosäule (C18, Poros R2, ziptip, Millipore) gereinigt. Die Elution der Peptide erfolgte in 7 μL 70 Vol-% Acetonitril. Die Peptide wurden anschließend erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proben in 10 μL 2 Vol-% Acetonitril, 0.05 Vol-% TFA gelöst und einer Ultimate/Switchos Nano-HPLC (Dionex, Dtl.) zugeführt. Die Proben wurden auf einer 1 mm PepMap-*trapping* Säule (Dionex) für 10 Minuten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ gebunden und anschließend einer 75 μm ID, 5 cm PepMap C18-Säule (Dionex, Dtl.) zugeführt. Die Peptidseparation wurde durch einen Acetonitrilgradienten bei 300 nL/min unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 0-40 Minuten 2-50 Vol-% Acetonitril, 40-50 Minuten 50-90 Vol-% Acetonitril, 50-55 Minuten 90 Vol-% Acetonitril und 55-70 Minuten 2 Vol-% Acetonitril. Die Nano-HPLC war online durch eine *nano-spray* Quelle (Bruker, Dtl.) an ein Esquire HCT Iontrap Massenspektrometer (Bruker) gekoppelt. Die Massenspektren wurden im positiven MS/MS-Modus aquiriert. Alle MS-Parameter wurden vorher für tryptische Peptide optimiert. Die Verarbeitung der MS/MS-Spektren wurde mit Hilfe von DataAnalysis- und der BioTools-Software von Bruker, Dtl. durchgeführt. Die Datenbanksuche erfolgte mit der MASCOT Software und der NCBI Inr -Proteindatenbank.

3.2.5.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur genauen Bestimmung der Molmasse des P34 wurde dieses einer massenspektrometrischen Analyse am MALDI-TOF-MS unterzogen. Die Probe wurde mittels einer 250 nL *Reversed-Phase* C4 Nanosäule (C4, Poros R1) gereinigt und konzentriert. Die Elution erfolgte mit 5 μL 100 % Acetonitril. Anschließend wurden 1 μL Probe mit 0.5 μL Sinapinsäure (20 mg/mL in 70 Vol-% Acetonitril) auf einem SCOUT 384 -MALDI-Target kokristalisiert. Die Massenspektrometrie erfolgte an einem MALDI-TOF-MS (Reflex III, Bruker Daltonics, Dtl.) im positiven linearen Modus mit externer Kalibrierung. Die Auswertung wurde unter zu Hilfenahme der FlexAnalysis- und BioTools -Software (Bruker Daltonics) durchgeführt.

4 Resultate

Das Protein P34 wurde aufgereinigt, um anschließend dessen Endozytose und Transzytose (Abschnitt 4.3) in die Enterozyten der IPEC-J2 Zelllinie zu studieren und dessen immunmodulatorische Wirkung auf Immunzellen (Abschnitt 4.4) zu prüfen. Mit einem *in vitro* Verdauungsmodell (Abschnitt 4.2) wurde zunächst gezeigt, dass P34 die enterozytäre Zelloberfläche erreichen kann.

4.1 P34 Aufreinigung

Die Aufreinigung des Sojabohnenproteins P34 bestand aus zwei Schritten: zunächst dem Zentrifugationsprotokoll nach dem Verfahren von Herman (1987) und schließlich der entwickelten Trennung der erhaltenen Proteinmischung mit Hilfe der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC). Die Daten dieser Aufreinigung wurden publiziert (Sewekow, E., Keßler L.C., Seidel-Morgenstern, A. und Rothkötter, H.-J. (2008): Isolation of soy bean protein P34 from oil bodies using hydrophobic interactions chromatography, *BMC Biotechnology*, 8, 27).

4.1.1 Zentrifugationsprotokoll

Die Herstellung des *oil body* durch Zentrifugation erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben. Diese Proteinpräparation wurde als Ausgangsmaterial für die Chromatographie genutzt oder für Studien der Proteinendozytose in IPEC-J2 Zellen verwendet (Abbildung 9, Bahn 5, 77%ige P34 Probe). P34 diffundierte selektiv aus dem flotierenden Sojafett in 0.1 M Natriumcarbonat (Na_2CO_3). Es konnte beobachtet werden, dass das Sojafett trotz mehrmaligem Waschen mit Natriumcarbonat am Ende des Zentrifugationsprotokolls noch immer Zielprotein P34 enthielt (Daten nicht gezeigt). Mehrmaliges Waschen des Fettes und eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Natriumcarbonat veränderte die Proteinzusammensetzung des resultierenden Überstandes nicht. Das Verhältnis, in dem Natriumcarbonat dem Fett zugesetzt wurde, konnte mit 1:30, 1:15, 1:7.5 Gramm Fett/Milliliter 0.1 M Natriumcarbonat festgelegt werden. Mit diesen Homogenisationsschritten konnte das meiste Protein in kürzester Zeit aus dem Sojafett heraus gewaschen werden. Mit dem Zentrifugationsprotokoll konnte eine Reinheit von 77 % des Proteins P34 erreicht werden. In Abbildung 9 sind die Resultate der gelelektrophoretischen Analyse von Proteinproben aus unterschiedlichen Stadien des Prozesses im Vergleich dargestellt. Das Protein P34 ist die Proteinbande, welche auf Höhe der Masse von etwa 32 kDa im Gel zu sehen ist (Pfeil). Der P34 Gehalt jeder Bahn des Gels wurde densitometrisch bestimmt. Von Bahn 1 bis 5 ist der P34 Gehalt: 7 % im Homogenisat vor der Zentrifugation, 15 % im *oil body* nach dem ersten Zentrifugationsschritt, 22 % im *oil body* nach dem letzten Waschschrift mit Natriumcarbonat, 41 % im Natriumcarbonatüberstand und 77 % in der dialysierten Proteinmischung, verglichen mit dem absoluten Proteingehalt pro Bahn ($2 \mu\text{g} = 100 \%$).

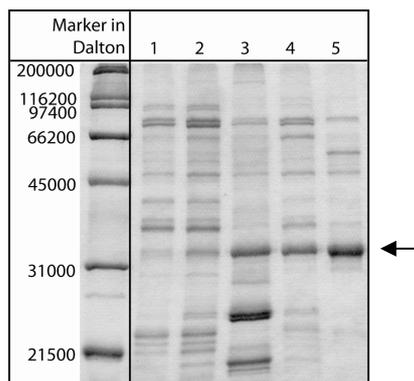


Abbildung 9: 2 µg Gesamtprotein wurden je Bahn des Coomassie-gefärbten SDS-Gels geladen: Bahn **1** Homogenisat vor der Zentrifugation, **2** *oil body* nach dem ersten Zentrifugationsschritt, **3** *oil body* nach dem letzten Zentrifugationsschritt mit Natriumcarbonat, **4** Natriumcarbonat-überstand, **5** dialysierte Proteinmischung vor der chromatographischen Trennung.

4.1.2 Auswahl der HIC-Phase

Während der Prozessentwicklung wurden mögliche Aufreinigungsstrategien getestet. Es war jedoch weder mit der Größenausschlusschromatographie, der Lektin-gekoppelten Affinität (Con A), noch der Kationenaustausch- und der Anionenaustauschchromatographie möglich, die erforderliche Reinheit des Proteins zu erzeugen. Die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) wurde wegen der Affinität von P34 zu Sojafett ausprobiert. Um dafür die passende Phase auszuwählen, wurden unterschiedlich beladene stationäre HIC Phasen in Spritzenexperimenten getestet. Die Resultate sind in Abbildung 10 dargestellt. Für jede Phase sind während des Ladens und Eluierens Proben gesammelt worden. Nicht gebundenes Protein im Durchlauf mit 1 M Ammoniumsulfat (erste Bahn für jede Säule) und die Elution bei 0.4 M Ammoniumsulfat (zweite Bahn) fassen die Ergebnisse für jede Phase zusammen. Als Referenz ist die Ausgangsproteinmischung ebenso gegeben (Bahn 0).

Bei dem Vergleich der Bahnen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 ist zu sehen, dass die gewählten Bedingungen für den Bindungspuffer gut genug für die Adsorption von P34 waren, nicht aber für die Adsorption anderer kontaminierender Proteine. Das vereinfacht erstens die Aufreinigung, da unerwünschte Proteine gar nicht erst die Aufreinigung stören und zweitens erhöht es die Adsorptionsfläche für P34, welches nun mit weniger anderen Proteinen in Konkurrenz um Bindung in das Material gehen muss. Mit den beschriebenen Elutionsschritten konnte P34 bei graduell abnehmender Salzkonzentration eluiert werden. Mit Ausnahme der Phasen Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) und Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub), konnte P34 mit 0.4 M Ammoniumsulfat eluiert werden. Bei den drei anderen Phasen (Butyl Sepharose 4 FF ausgenommen) eluierte P34 zusammen mit Kontaminanten. Bei einem optischen Vergleich der Bahnen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 ist die erreichte Reinheit für P34 am besten für die Butyl Sepharose 4 FF. Wenig P34 war im Durchlauf und kaum andere Proteine eluierten zusammen mit Protein P34.

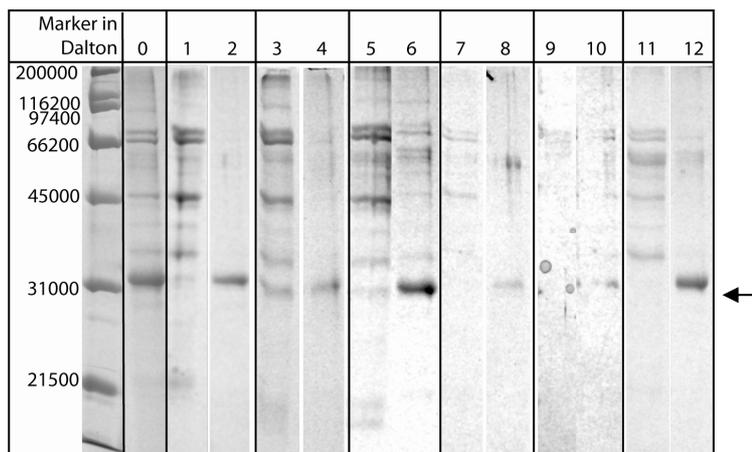


Abbildung 10: Die Fraktionen unterschiedlicher HIC-Phasen wie beschrieben in 3.2.1.3 wurden gefällt und auf SDS-Gelen chromatographisch getrennt. P34 ist sichtbar als Bande bei einer Masse um 32 kDa. Bahn 0 zeigt die Chromatographieausgangslösung, Bahnen 1 und 2 sind eluierte Fraktionen der Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Bahnen 3 und 4 der Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow, Bahnen 5 und 6 der Octyl Sepharose 4 Fast Flow, Bahnen 7 und 8 der Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub), Bahnen 9 und 10 der Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) und Bahnen 11 und 12 die Fraktionen der Phenyl Sepharose High Performance. Die linke Bahn einer Phase zeigt immer den Durchlauf der Proteine bei 1 M Ammoniumsulfat, die rechte die Elution bei 0.4 M Ammoniumsulfat.

Aus diesem Grund wurde die Butyl Sepharose 4 FF als geeignete stationäre Phase für die Aufreinigung von P34 gewählt. Für dieses Material wurden die Gradientenelutionsbedingungen detaillierter geprüft. Mit Hilfe der vorgepackten HiTrap Säulen wurden die Pufferbedingungen für die Wasch- und Elutionsschritte weiter auf einer chromatographischen Anlage überprüft. Es stellte sich heraus, dass Elutionsschritte mit 0.6 M und 0.4 M Ammoniumsulfat im Phosphatpuffer und eine Konzentration von 1 M Ammoniumsulfat im Bindungspuffer die besten Aufreinigungsergebnisse brachten. Wie in den HIC-Phasen-Auswahlexperimenten wurde P34 mit 0.4 M Ammoniumsulfat eluiert. Da allerdings die Menge an aufgereinigtem P34 nach der Chromatographie mit der 1 mL Säule nicht groß genug für weiterführende Studien war, wurde die Säulengröße erhöht.

4.1.3 Säulenvergrößerungsschritte

Wie in den Methoden beschrieben (Abschnitt 3.2.1.4), wurden für den ersten Säulenvergrößerungsschritt 7.5 mL Butyl Sepharose 4 FF, gefüllt in eine Säule der Größe 10 x 150 mm, benutzt. Die Säule wurde mit 705 µg der vorgereinigten Proteinprobe in Bindungspuffer beladen (siehe Abbildung 9, Bahn 5, 77 % P34). P34 konnte während des zweiten Elutionsschrittes (0.4 M Ammoniumsulfat) eluiert werden. Während der chromatographischen Trennung wurden Fraktionen gesammelt und anschließend analysiert. Die Ergebnisse sind auf den Gelen in Abbildung 11 dargestellt. Der Proteingehalt jeder Fraktion multipliziert mit 100 und dividiert durch den absoluten Proteingehalt in allen Fraktionen ist unten in Abbildung 11 in Form von Balken dargestellt.

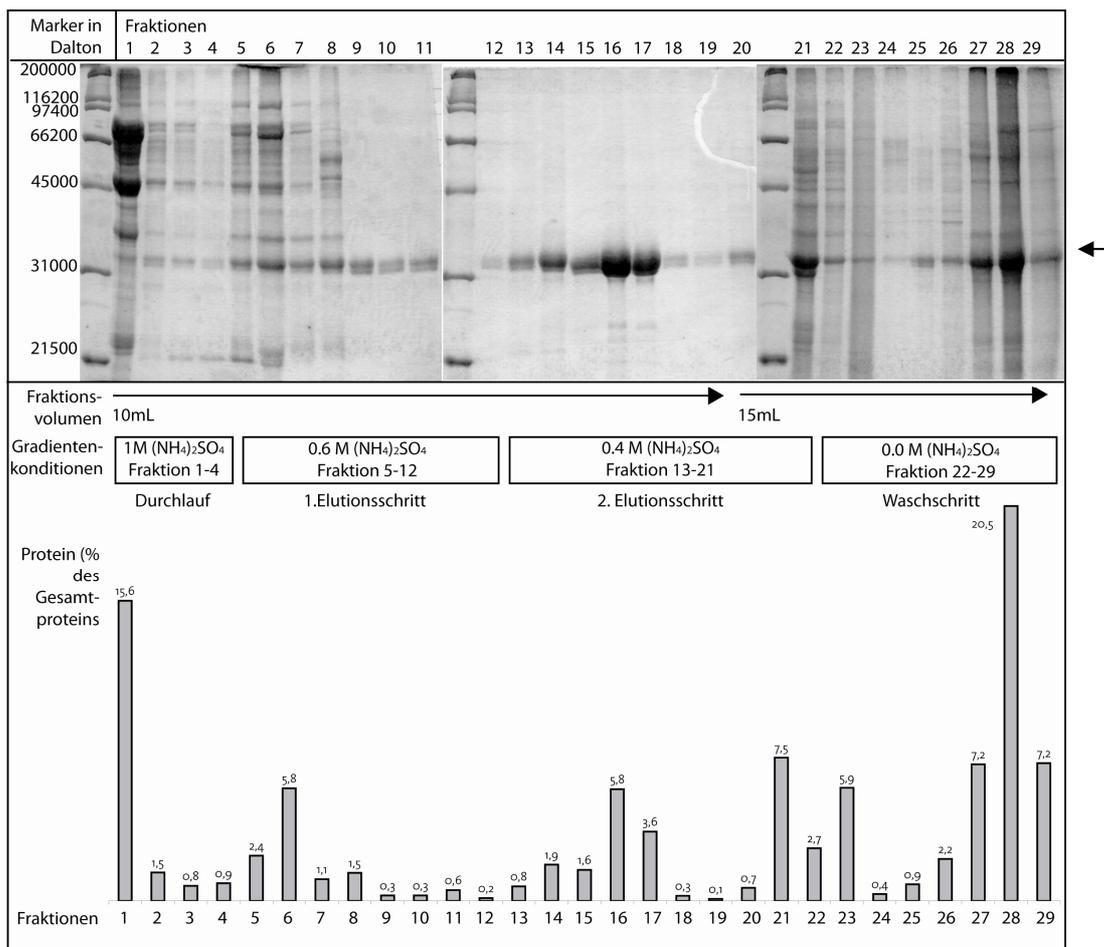


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Analyse einer zweistufigen Elution in der 7,5 mL großen Säule: Die Säule wurde mit der vorgereinigten P34 Probe (705 µg) in Bindungspuffer (1 M Ammoniumsulfat in 0,05 M PB, pH 6,5) beladen. Die Elution erfolgte mit 0,6 und 0,4 M Ammoniumsulfat. In den zu sehenden Coomassie-gefärbten Gelen entspricht eine Bahn einer Fraktion, deren Fraktionsvolumen unterhalb der Gele angezeigt ist. Für die Analyse wurden die Fraktionen (10 und 15 mL) auf 30 µL mit Zentrifugationseinheiten aufkonzentriert und vergleichend auf die zu sehenden Gele geladen. Bahnen 1-4 zeigen nicht gebundene Proteine im Durchlauf, Bahnen 5-12 die mit 0,6 M Ammoniumsulfat eluierten Fraktionen und die Bahnen 13-21 die mit 0,4 M Ammoniumsulfat eluierten Fraktionen. Die restlichen Bahnen (22-29) entsprechen den Fraktionen, welche ohne Salz eluierten. Die im unteren Teil der Abbildung befindlichen Balken entsprechen der prozentualen Proteinmenge in jeder Fraktion als Anteil des Gesamtproteins.

Die Proteinkonzentrationsmessung (Methode siehe Abschnitt 3.2.3.2) zeigte, dass in den ersten vier Fraktionen (Durchlauf) 19 % des nach Chromatographie gefundenen Gesamtproteins enthalten sind. Sehr wenig P34 (Bande um 32 kDa) wurde in diesen Fraktionen gefunden (siehe Abbildung 11). Möglicherweise war die Kapazität der Säule erschöpft. Während des ersten Elutionsschrittes (Fraktionen 5-12) wurden alle schwach bindenden Proteine von der Säule gespült. Die kalkulierte Proteinmenge dieser Fraktionen war 12 %, wieder befand sich etwas P34 in diesen Fraktionen. Im zweiten Elutionsschritt (0,4 M Ammoniumsulfat, Bahnen 12-19, Abbildung 11) war es möglich P34 zu eluieren. Der Proteingehalt dieser Fraktionen war ungefähr 14 % des Gesamtproteins und 18 % des auf die Säule geladenen Proteins P34. Die stark gebundenen Proteine wurden ohne Ammoniumsulfat eluiert, deren Anteil am Gesamtprotein war 47 % (Fraktionen 20-29). Ein gewisser Anteil in diesen Fraktionen ist ebenfalls P34.

Das Dialysieren der gesammelten P34 Fraktionen mit Membranen der Porengröße von 6-8 kDa erhöhte weiterhin die Reinheit von P34 zu 99 % in Coomassie-gefärbten Gelen im Vergleich zu allen mit Coomassie detektierten Proteinen der Bahn (siehe Abbildung 12). Vorhandene kleinmolekulare Kontaminanten (Abbildung 11) konnten auf diese Weise entfernt werden. Der Erfolg des Aufreinigungsverfahrens ist in Abbildung 12 zu sehen als Vergleich zwischen Proteinlösung vor und nach der HIC. Diese Ergebnisse ließen sich gut reproduzieren.

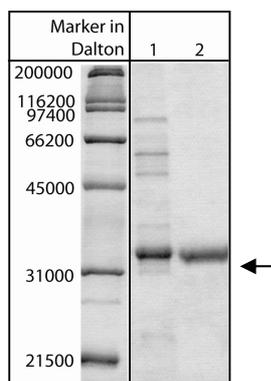


Abbildung 12: Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes Gel, Bahn 1 ist die für die HIC vorgereinigte Proteinprobe (77 %ig) und Bahn 2 das gereinigte P34 (99 %ig). Je Bahn wurden 2 µg Protein aufgetragen.

In einem weiteren Schritt konnte die Säulengröße auf 75 mL Butyl 4 FF Sepharose erhöht werden. Die gleichen zwei Elutionsstufen wurden zu Beginn bei der Trennung angewandt. Sauberes Protein konnte erhalten werden. Nach detaillierterer Analyse der Proteine, die mit dem letzten Waschschrift eluierten, konnte beobachtet werden, dass noch immer P34 ohne Kontaminanten von der Säule eluierte. Zur Optimierung der Elutionsbedingungen wurden unterschiedliche Bindungs- und Elutionspuffer erneut getestet. Die beste Salzkonzentration während des Ladens war 0.6 M Ammoniumsulfat, da P34 bei niedrigeren Salzkonzentrationen schon eluierte (Beobachtungen aus den Versuchen mit den Säulengrößen 1 mL und 7.5 mL). Die Ergebnisse gelektrophoretischer Untersuchungen ergaben aber auch, dass nach einer Elution mit 0.4 M Ammoniumsulfat noch immer kontaminierende Proteine an die Matrix absorbierten, woraufhin sich ein Eluieren mit 0.05 M Phosphatpuffer ohne Salz verbot. Weitere Experimente ergaben einen daraus folgenden Elutionsschritt mit 0.25 M Ammoniumsulfat. Es konnte damit die Ausbeute des Zielproteins bei gleicher Reinheit erhöht werden.

Um die Prozesszeit auf der 75 mL Säule zu verkürzen, wurde überprüft, ob das zweistufige Elutionsverfahren mit 0.6 (oder 0.4) M Ammoniumsulfat und 0.25 M Ammoniumsulfat bei einem Bindungspuffer von 1 M Ammoniumsulfat in eine Einstufen-Elution umgewandelt werden kann (laden der Proteine mit 0.6 M Ammoniumsulfat und Eluieren des Zielproteins mit 0.25 M Ammoniumsulfat). Das Chromatogramm eines solchen Prozesses ist in Abbildung 13 dargestellt.

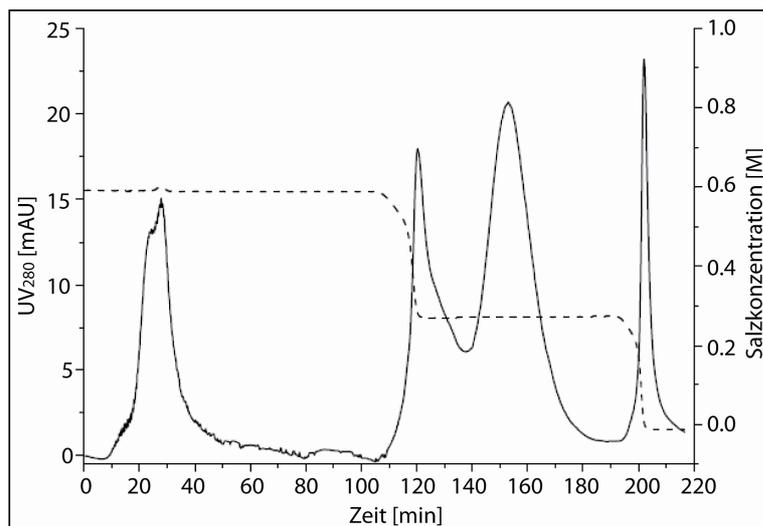


Abbildung 13: Chromatogramm der Ein-Stufen-Elution auf der 75 mL Säule, in dieser Separation wurden 13 mg Protein auf die 75 mL Säule geladen. Der Bindungspuffer enthielt 0.6 M Ammoniumsulfat. Die Proteine des Durchlaufs befinden sich in Peak 1. Protein P34 wurde mit 0.25 M Ammoniumsulfat eluiert (Peak 2 und 3). Das noch gebundene Protein wurde ohne Ammoniumsulfat eluiert (Peak 4).

Während der Elution konnten überlappende Proteinelutionspeaks beobachtet werden. Diese wurden fraktioniert gesammelt und für die gelelektrophoretische Analyse aufkonzentriert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

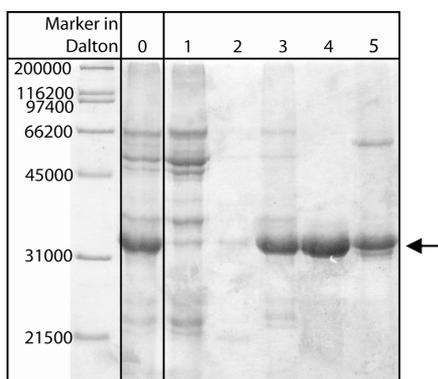


Abbildung 14: Gelelektrophoretische Analyse eines Ein-Stufen-Elutionsprozesses auf der 75 mL Säule – gelagerte Proteinprobe; 4 mL der Fraktionen wurden aufkonzentriert und auf das hier gezeigte Coomassie-gefärbte SDS-Acrylamidgel geladen. Bahn 0 zeigt das Ausgangsmaterial, Bahn 1 und 2 den Durchlauf in Bindungspuffer (0.6 M Ammoniumsulfat), Bahnen 3 und 4 die beiden Proteinpeaks, welche während der Elution mit 0.25 M Ammoniumsulfat erhalten wurden und Bahn 5 die Proteine, welche ohne Ammoniumsulfat in 0.05 M PB eluiert wurden.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, eluierte P34 mit dem ersten Elutionspeak (siehe Abbildung 13, Peak 2 und Abbildung 14, Bahn 3) zusammen mit wenigen Kontaminanten. Der Hauptteil des eluierten P34 befand sich aber im darauf folgenden Elutionspeak (Abbildung 13, Peak 3, Abbildung 14, Bahn 4). In Bahn 5 ist zu sehen, dass P34 wieder nicht vollständig von der Säule eluiert werden konnte. Da aber das Ziel dieser Arbeit eher die Maximierung der P34 Reinheit denn die Maximierung der Ausbeute war, kann die Ein-Stufen-Elution als erfolgreich angesehen werden. Reproduzierbarkeit war gegeben.

Bei einem der weiteren Chromatographieläufe wurde trotz identischer Chromatographiebedingungen ein etwas anderes Bild eluierter Proteine bei grundsätzlich gleicher Peakverteilung festgestellt. Wieder wurden die Fraktionen gesammelt, aufkonzentriert und auf einem Coomassie-gefärbten Gel analysiert. In Abbildung 15 ist das Gel dargestellt. Die Bahnen 1 und 2 entsprechen dem Durchlauf, Bahnen 3 und 4 den Elutionspeaks und Bahnen 5 und 6 den Fraktionen, die während des Waschens der Säule gesammelt wurden.

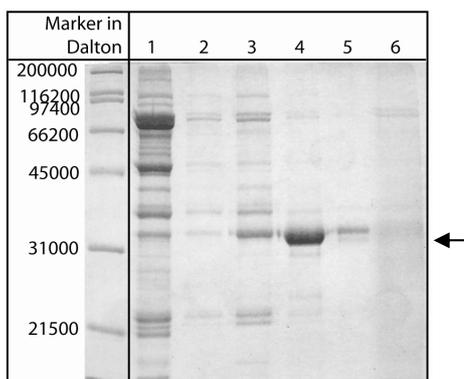


Abbildung 15: Gelelektrophoretische Analyse eines Ein-Stufen-Elutionsprozesses auf der 75 mL Säule – frische Proteinprobe; 4 mL der Fraktionen wurden aufkonzentriert und auf das hier gezeigte Coomassie-gefärbte SDS-Acrylamidgel geladen. Bahn 1 und 2 zeigen die Proteine im Durchlauf in Bindungspuffer (0,6 M Ammoniumsulfat), Bahnen 3 und 4 die beiden Proteinpeaks, welche während der Elution mit 0,25 M Ammoniumsulfat erhalten wurden und Bahnen 5 und 6 die Proteine welche ohne Ammoniumsulfat in 0,05 M Phosphatpuffer eluiert wurden.

P34 eluierte mit mehr Kontaminanten während des ersten Elutionspeaks (siehe Abbildung 15, Bahn 3). Der zweite Elutionspeak (Bahn 4) enthielt ziemlich sauberes P34 (in dem hier gezeigten Coomassie-gefärbten Gel) jedoch mit mehr Kontaminanten als in Abbildung 14 (Bahn 4) gesehen.

4.1.4 Identifikation von P34

Zur genauen Identifizierung des Proteins wurde die Proteinbande der Größe von circa 32 kDa aus einem Coomassie-gefärbten Gel geschnitten und durch einen in-Gel-Verdau und Massenspektrometrie analysiert (siehe Methode Abschnitt 3.2.5.5). Die Datenbankanalyse mit Hilfe der MASCOT Software und MSDB und/oder NCBI Protein-datenbank identifizierte das Protein eindeutig als *Glycine max* (Sojabohne) Protein P34. Das P34 konnte außerdem mit dem monoklonalen Antikörper F5 detektiert werden (siehe zum Beispiel Abbildung 34, Transzytose). Der Antikörper bindet die Aminosäuren 115-132 des Proteins P34 (Hosoyama et al. 1996).

4.1.5 P34-Antikörperserum

Mit dem isolierten Protein wurde die Herstellung eines Antikörperserums aus dem Kaninchen in Auftrag gegeben (siehe Methoden, Abschnitt 3.2.1.5). In Abbildung 16

wurde P34 auf einem Immunoblot mit dem Kaninchenserum inkubiert. P34 ist mit dem polyklonalen Antikörperserum bis zu einer Menge von 15.6 ng noch schwach sichtbar.

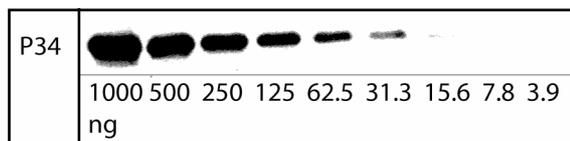


Abbildung 16: Verdünnungsreihe von P34 auf einem Immunoblot. P34 wurde spezifisch detektiert mit dem polyklonalen Antikörperserum (Verdünnung 1:2000).

4.2 P34 passiert die Verdauung *in vitro*

Die Verdaubarkeit des Proteins P34 sollte anhand eines *in vitro* Verdauungsmodells überprüft werden. Verdauungsresistente Proteine erreichen eher als ganze Proteine die Epithelzellen des Dünndarms. Es wurden wie in Abschnitt 3.2.5.4 dieser Arbeit beschrieben gemörserte trockene und eingeweichte Sojabohnen in zwei Ansätzen nach dem Verdauungsprotokoll von Boisen (1991) und Miller et al. (1981) verdaut. Ein Ansatz jeweils enthielt neben Pepsin und Pankreatin Gallensalze, der andere nicht. Die Gallensalze sollten die Fettverdauung fördern und die Erreichbarkeit des an Fett assoziierenden P34 für die Verdauungsenzyme verbessern.

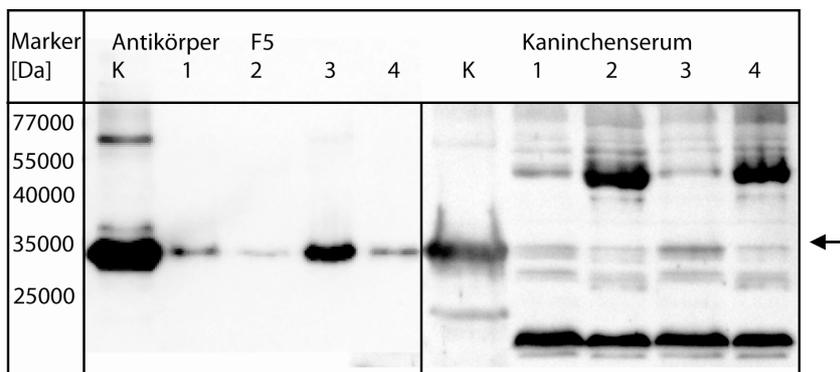


Abbildung 17: Die Abbildung zeigt den Immunoblot der Proben eines Verdauungsversuches. Es wurden jeweils 100 μ L des Ansatzes gefällt und auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach dem Blotten die P34 Banden mit Kaninchenserum und dem monoklonalen Antikörper F5 sichtbar gemacht. In Bahn K sieht man das Referenzprotein P34 (Höhe des Pfeils), Bahnen 1 und 2 zeigen trockene verdaute Bohnen, Bahn 1 mit und Bahn 2 ohne Gallensalze im Verdauungsansatz, für Bahn 3 und 4 wurden die Bohnen über Nacht eingeweicht, wobei wiederum für den Ansatz in Bahn 3 Gallensalze hinzu gefügt wurden und für den Ansatz in Bahn 4 nicht.

Für alle Verdauungsansätze ist auf dem Immunoblot eine P34 Bande in Höhe der Kontrollbande zu erkennen (circa 32 kDa). Mehr Protein P34 ist nach Einweichen der Sojabohnen über Nacht und in den Ansätzen mit Gallensalz mit dem monoklonalen Antikörper F5 und dem Kaninchenserum nachgewiesen worden (Vergleich der Bahnen 1 und 3 mit 2 und 4, Abbildung 17). Mit F5 wurden keine weiteren Proteinbanden detektiert. Die mit dem Antikörperserum detektierten Peptid- bzw. Proteinprofile unterschieden sich nicht für eingeweichte und nicht eingeweichte Sojabohnen oder die Ansätze mit und ohne Gallensalz. Die dominanteren Proteinbande (nahe 55 kDa) war

prominenter in den Ansätzen ohne Gallensalz. Eine weitere dominante Bande befindet sich auf der Höhe von circa 20 kDa.

4.3 P34-Antikörper im Serum von Schweinen

Im Abschnitt 4.2 konnte gezeigt werden, dass P34 die Verdauung durch Verdauungsenzyme *in vitro* passiert und es theoretisch die epithelialen Zellen des Dünndarms erreicht. P34 wurde in dem hier genutzten *in vitro* Zellsystem aus jejunalen Enterozyten aus dem Schwein (IPEC-J2 Zellen) endozytiert und auch transportiert (siehe folgender Abschnitt 4.4). Theoretisch kann davon ausgegangen werden, dass Antikörper dann im jeweiligen Organismus zu finden sind, wenn das Protein ganz oder in Bruchstücken die Zellen des Immunsystems erreicht, zum Beispiel durch Passieren der intestinalen Epithelschicht. Es war nun von Interesse, ob Schweine P34-Antikörper im Serum haben. Das Serum von Tieren unterschiedlicher Herkunft und Haltung wurde auf Antikörper gegen P34 mit Hilfe eines ELISA (wie beschrieben in Abschnitt 3.2.5.3) untersucht. Die folgende Abbildung 18 fasst die Ergebnisse des P34-Antikörper spezifischen ELISA zusammen. Für diesen wurde P34 auf eine 96-Well-Platte beschichtet, die Seren darauf inkubiert und gebundene Antikörper mit sekundären Anti-Schwein-Antikörpern, die mit einer Peroxidase gekoppelt waren, gebunden. Durch eine durch die Peroxidase umgesetzte Farbreaktion, war es möglich die P34-Serenantikörperbindung per Absorption spezifisch zu detektieren.

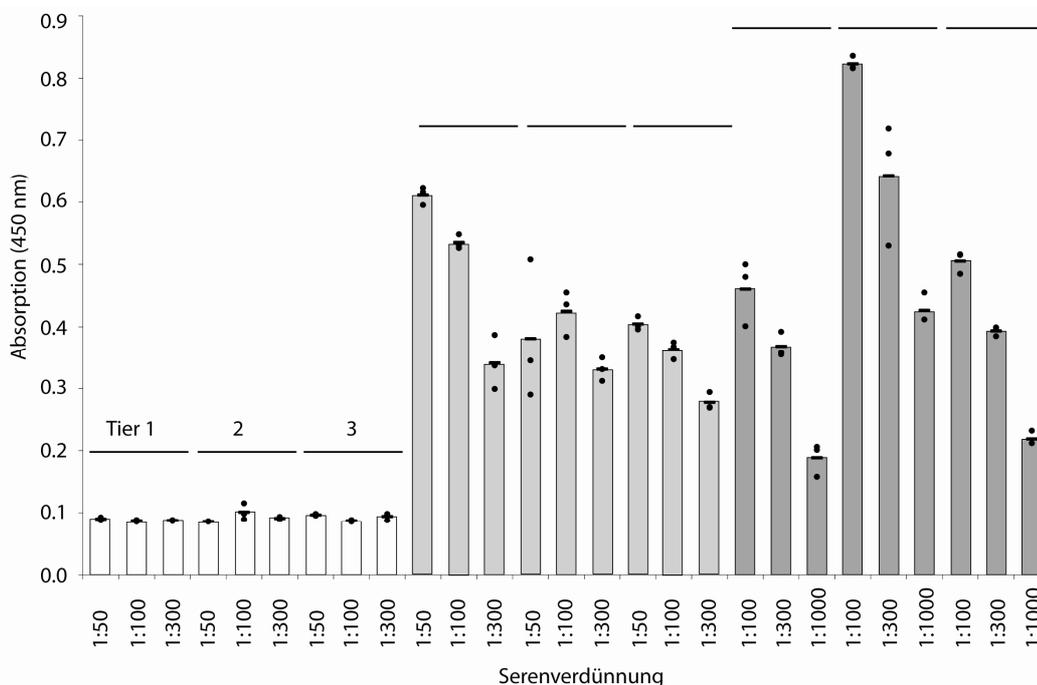


Abbildung 18: Im ELISA auf P34-Antikörper getestete Seren von Schweinen; es wurden verschiedene Verdünnungen der Seren ausprobiert. Jeweils neun Balken gehören zu einer aus drei Tieren bestehenden Gruppe (□ ungesäugte neu geborene Ferkel, ▒ konventionell gehaltene Schweine, ■ mit Sojabohnen gefütterte Tiere), von jedem Tier wurden drei verschiedene Serenverdünnungen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte (Balken) und Einzelwerte (•) eines Versuchs.

In Abbildung 18 ist zu sehen, dass keine Absorptionssignale für alle Verdünnungen der Seren neu geborener Ferkel gefunden wurden. Es konnten also keine Antikörper, die P34 auf der Well-Platte banden, gefunden werden. Verdünnungsabhängige Signale finden sich bei allen anderen Schweineseren. In den Schweineseren konventionell gefütterter Tiere genauso wie in den Seren von Tieren, welche mit einem besonderen Soja-fütterungsprotokoll gefüttert wurden, waren P34 bindende Antikörper enthalten. Es ist deutlich, dass im Serum Sojaprotokoll-gefütterter Tiere mehr Antikörper waren, die P34 banden. Für alle Seren, in denen P34 bindende Antikörper gefunden wurden, ist die Höhe des Absorptionssignals im ELISA abhängig von der Verdünnung des Serums (je höher die Verdünnung, desto kleiner das Signal), jedoch nicht proportional.

4.4 Proteinaufnahme in und Durchtritt durch die Enterozyten

Mit aufgereinigtem Protein (siehe Abschnitt 4.1) konnte die Bindung des Proteins an die Zelloberfläche und die Proteinendozytose in die Enterozyten studiert werden. Es war in dieser Arbeit von Interesse mit welchem Endozytoseweg P34 in die Enterozyten gelangt, ob es als vollständiges Protein die Zellen passiert und ob die Aufnahme des Proteins einer Sättigung unterliegt. Da die Glykosylierung von Proteinen ausschlaggebend für deren Stabilität und Allergenität ist (siehe auch 1.2.2.1) sollte hier auch geklärt werden, ob die Oberflächenbindung von P34 von seiner Glykosylierung abhängig ist. Ein Aufnahme-mechanismus könnte damit möglicherweise entdeckt werden. Die folgenden Abbildungen zeigen zunächst die IPEC-J2 Zellen, die als Epithelzelllinie in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurde, in elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

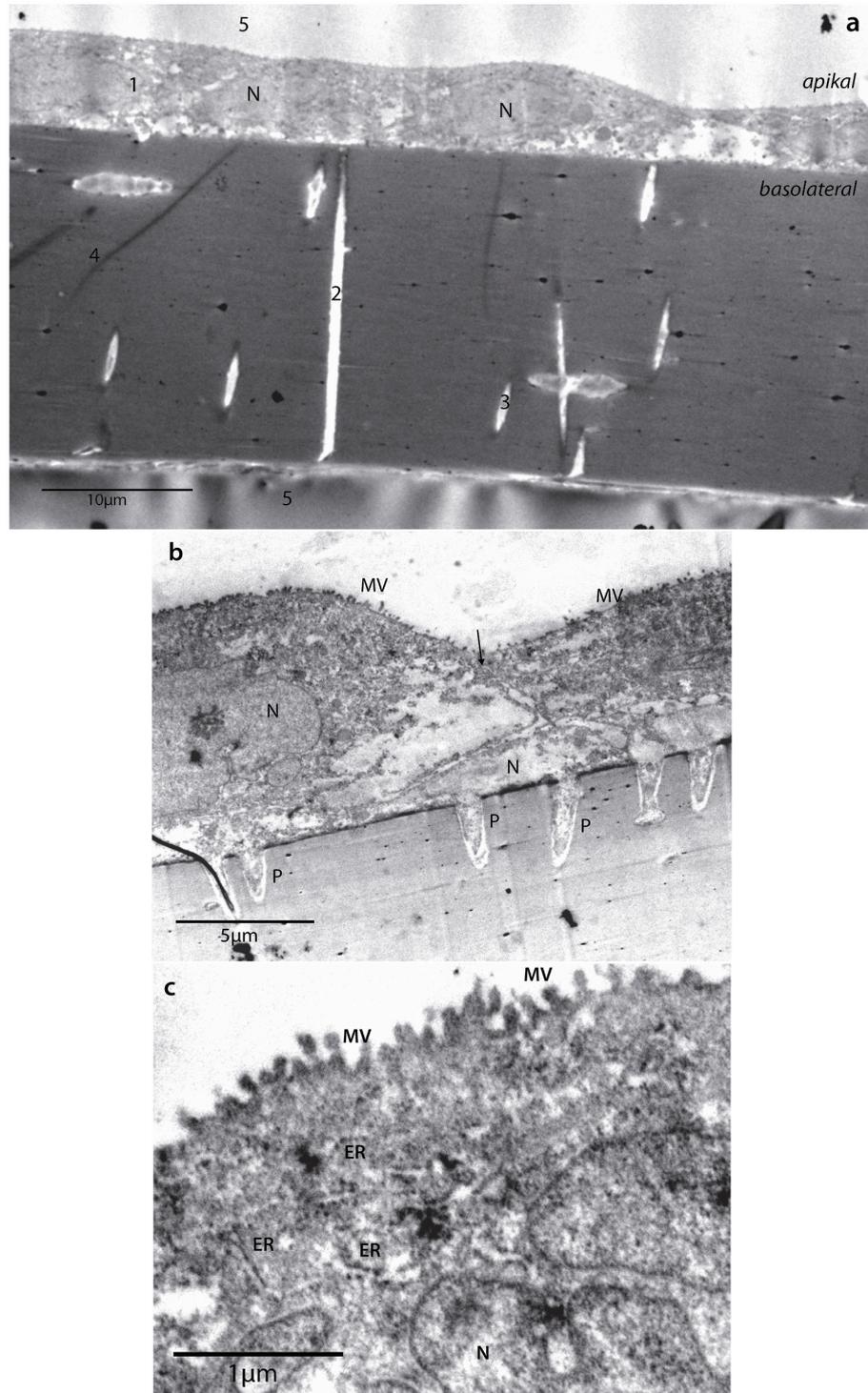


Abbildung 19: IPEC-J2 Zellen im Elektronenmikroskop,
a) Übersicht auf dem Transwell gewachsener Zellen: **1** Zellrasen, **2** längs angeschnittene Pore, **3** quer angeschnittene Transwellpore, **4** Transwellmembran, **5** Einbettmedium Durcupan, Balken 10 µm
b) Epithelzellen sind in die Poren (P) der Transwellmembran gewachsen, der Pfeil mittig deutet auf einen Zell-Zell-Kontakt hin, Balken 5 µm
c) Mikrovilli der IPEC-J2 Zellen, der Nukleus hier hat große Einstülpungen, Balken 1 µm (Abkürzungen: N-Nukleus, MV-Mikrovilli, ER-Endoplasmatisches Retikulum)

4.4.1 Abhängigkeit der Oberflächenbindung von P34 von der Glykosylierung

Nach der chromatographischen Aufreinigung war P34 glykosyliert wie mit dem Verfahren von Focke (Focke et al. 1998) nachgewiesen werden konnte (Methode siehe 3.2.3.3). Es wurde in der dargestellten Abbildung mit BSA und Ovalbumin auf zwei unterschiedlich behandelten SDS-Acrylamidgelen verglichen, ersteres ist kein und zweiteres ein Glykoprotein. P34 ist eindeutig positiv für den Glykosylierungsnachweis (siehe graue Bande auf Höhe des Proteins, Abbildung 20).

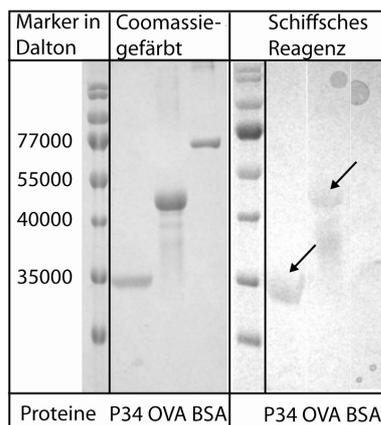


Abbildung 20: Dargestellt sind P34, Ovalbumin und BSA auf einem Coomassie-gefärbten Gel und einem Gel, was mit Schiffsschem Reagenz behandelt wurde. Die Pfeile deuten auf die Banden nach Behandlung der Proteine im Gel mit Schiffsschem Reagenz hin.

Ob die Glykosylierung ausschlaggebend für die Bindung an der Enterozytenoberfläche ist, sollte mit Hilfe eines ELISA (siehe Abschnitt 3.2.5.3) überprüft werden. Hierzu wurden konfluente Monolayer der Epithelzelllinie IPEC-J2 mit P34 (10 und 50 µg/mL) und / oder den Monosacchariden Fukose, Mannose und Xylose (10 mM) bei 4 °C inkubiert. Alle drei Monosaccharide sind in der Glykosylierung von P34 enthalten (siehe Bando et al. 1996) und würden vermutlich die Oberflächenadsorption von P34 an die Zellen kompetitiv hemmen, wenn die Oberflächenadsorption des Proteins abhängig von dessen Glykosylierung ist. Nach Inkubation der Zellen mit P34 und den Monosacchariden wurden die Zellen gewaschen und mit dem P34-spezifischen Kaninchenantikörperserum inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpern. Die Oberflächenbindung wurde mit der durch die Peroxidase umgesetzten Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Absorption des umgesetzten Farbstoffes spiegelt die Menge an oberflächlich gebundenem P34 wieder. Die Messwerte des ELISA sind in folgender Abbildung (21) dargestellt. Die korrigierten Werte des Versuchs aus Abbildung 21 sind in Abbildung 22 darunter zusammengefasst. Die Kontrollen (10 und 50 µg P34/mL) entsprechen in Abbildung 22 100 %.

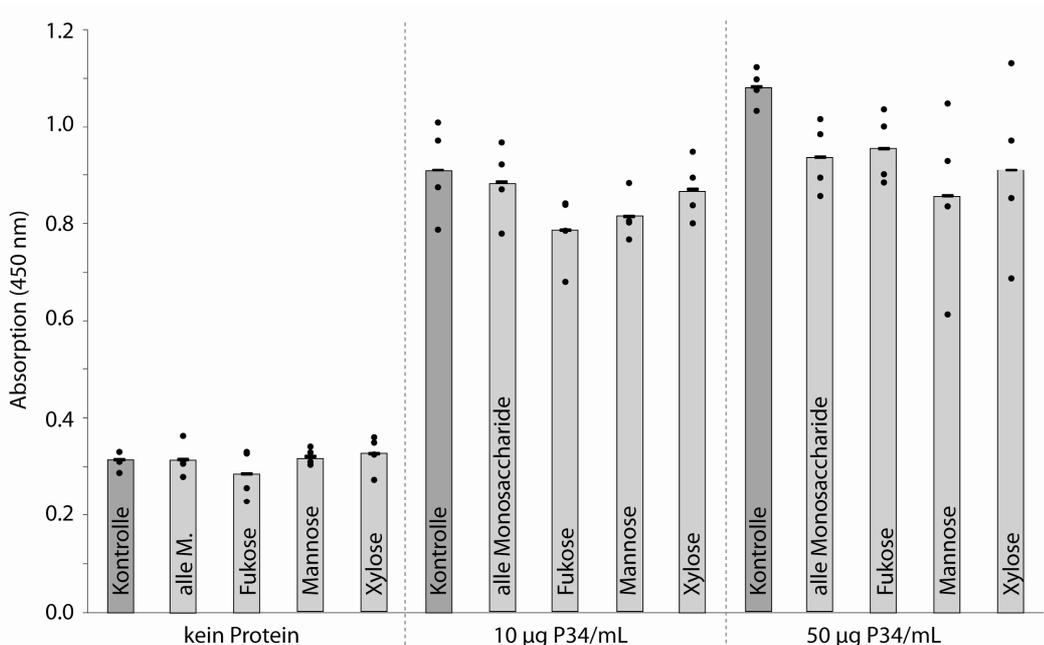


Abbildung 21: Die P34 Oberflächenbindung an Enterozyten (IPEC-J2) ist dargestellt. 10 und 50 µg P34/mL wurden entweder allein (Kontrollen) oder in Konkurrenz zu Monosacchariden (jeweils 10 mM) auf den Epithelzellen bei 4 °C inkubiert. Die Absorptionswerte ohne Proteininkubation entsprechen dem Hintergrundsignal dieses Testsystems. Es sind die Einzelwerte (n=4) eines Versuchs abgebildet (●) und die jeweiligen Mittelwerte (Balken).

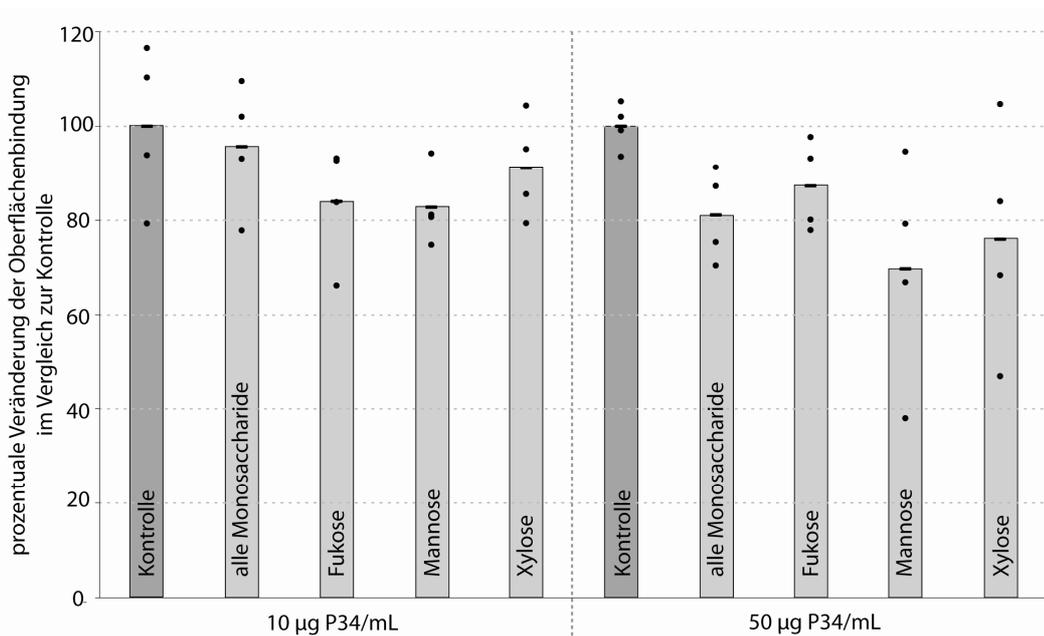


Abbildung 22: Oberflächenbindung von P34 in Konkurrenz zu den Monosacchariden seiner Glykosylierung (ELISA), es sind die korrigierten Einzelwerte (●) eines Experiments dargestellt, die Balken entsprechen den Mittelwerten. Die Kontrollen sind jeweils die gemessenen Absorptionssignale der P34-Oberflächenbindung ohne eingesetzte Monosaccharide (= 100 %).

Die Oberflächenadsorption von P34 war bei einer Inkubation von 10 µg P34/mL zusammen mit 10 mM Fukose, Mannose und Xylose leicht vermindert, am meisten jedoch für die Fukose (Abbildung 21, 22). Gleiches galt für die Inkubation der Monosaccharide mit 50 µg Protein, jedoch war hier die P34-Oberflächenadsorption für

Mannose am niedrigsten. Die Unterschiede waren deutlicher bei Einsatz von mehr Protein. Die Inkubation von 50 μg P34/mL resultierte nicht in einer fünffachen Adsorption im Vergleich zu 10 μg P34/mL (beide Proteinkontrollen ohne Monosaccharide). Auf eine Sättigung der Zelloberfläche kann geschlossen werden. Die Einzelwerte im ELISA waren weit gestreut und der Test an sich war schwer reproduzierbar (Abbildung 21, 22), da die gemessenen Signale auch von der Fixierung der Zellen abhängen. Bei der Inkubation mit 50 μg P34/mL entsprach die Hemmung der Oberflächenadsorption von P34 durch alle drei Monosaccharide zusammen dem Durchschnitt der kompetitiven Hemmung der Oberflächenadsorption durch die drei einzeln eingesetzten Monosaccharide.

Zur Reproduktion und zum Vergleich wurden die Oberflächenadsorption von P34 und dessen Aufnahme in die Zelle in Anwesenheit der drei Monosaccharide auch mit P34-FITC und der Messung der Zellen im Durchflußzytometer untersucht. Das Protein/Zucker-Verhältnis war vergleichbar (hier 100 μg P34/mL und 100 mM Monosaccharid). In Abbildung 23 ist die prozentuale Veränderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) der IPEC-J2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle (P34-FITC in serumfreiem Medium ohne Monosaccharide = 100 %) dargestellt.

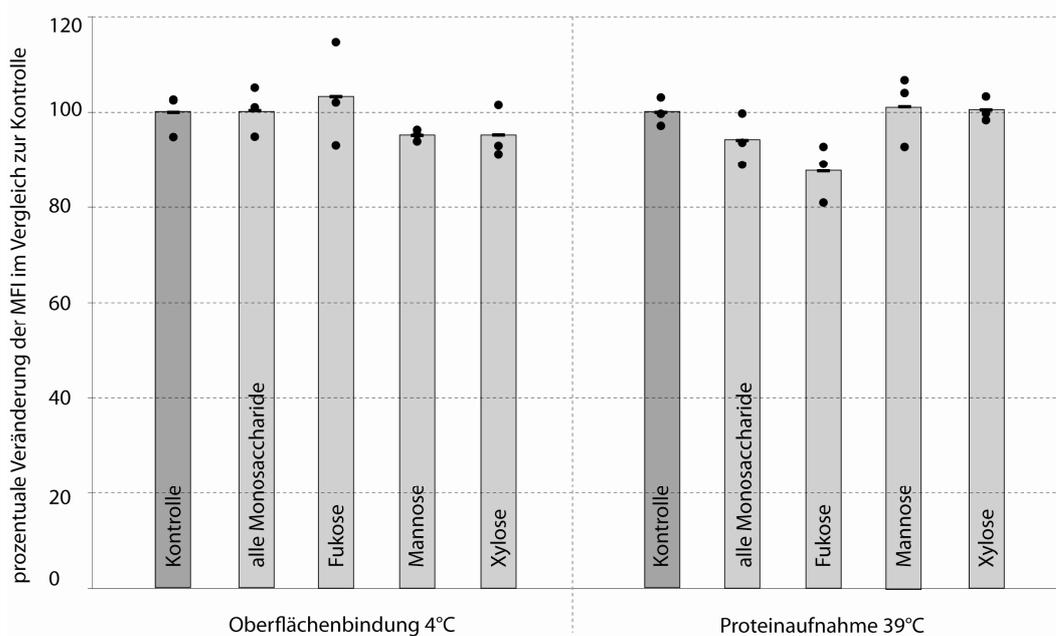


Abbildung 23: Die prozentuale Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (K = Protein-FITC in serumfreiem Medium) der Epithelzelloberflächenbindung (4 °C) und -Aufnahme (39 °C) von P34-FITC bei Mitinkubation von Monosacchariden sind dargestellt. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert (Balken) und die Einzelwerte (•) eines Versuchs.

Bei den Versuchen mit FITC-markiertem Protein ließen sich für die Oberflächenbindung und die Endozytose von P34 mit der Zugabe von Monosacchariden kaum Unterschiede zur Kontrolle feststellen. Die Oberflächenbindung von P34-FITC war etwas vermindert bei Mitinkubation von Mannose und Xylose und die P34-Endozytose in Anwesenheit der Fukose. Die Unterschiede der Oberflächenbindung von P34 bei Mitinkubation von Monosacchariden im Vergleich zur Kontrolle war deutlicher im

Testsystem ELISA. Mannose und Xylose schienen in beiden Testsystemen einen Einfluss auf die Oberflächenbindung von P34 zu haben, wenn auch einen geringen.

4.4.2 Caveolae-vermittelte Endozytose

Verschiedene Endozytosemechanismen in die Zelle können für Proteine angenommen werden. Für die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurden Clathrinvesikel- und *Caveolae*-vermittelte Mechanismen für die P34 Aufnahme vorgeschlagen (Weangscripina et al. 2006). Um das Involviertsein von *Lipid Rafts* bzw. *Caveolae* an der P34-Endozytose zu studieren, wurden mit *Lipid Rafts* angereicherte Membranfraktionen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe Abschnitt 3.2.5.1). Es konnten auf diese Weise *Lipid Raft* enthaltende Fraktionen (positiv für Caveolin-1 und Flotillin) von anderen Vesikeln und intrazellulären Bestandteilen unterschieden werden, da sie sich im Bereich niedrigster Dichte aufgrund des hohen Lipidanteils anreichern. Es wurden nach der Zentrifugation folgende Fraktionen abgenommen und Proben davon gelelektrophoretisch getrennt und auf Blotmembranen transferiert (siehe auch Abschnitt 3.2.5.1): deutlich sichtbare Ringe (als „R“ bezeichnet), Intermediärphase („I“) und die darunter liegenden Fraktionen, die 400 µL-weise abgenommen wurden (mit „F“ bezeichnet). Im abgebildeten Immunoblot (Abbildung 24) wurden Clathrin-, Caveolin-1-, Flotillin- und P34-Antikörper (F5 für P34) auf den jeweiligen Blotmembranen gefärbt (siehe 3.2.3.5).

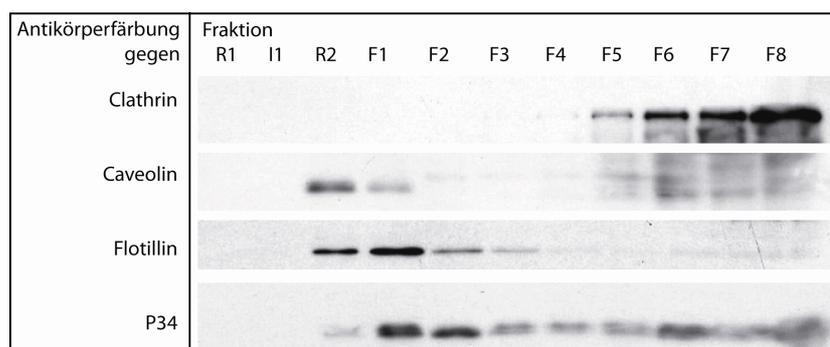


Abbildung 24: Immunoblot von unterschiedlichen Fraktionen, die nach der Dichtegradientenzentrifugation über einen Sucrosegradienten entstanden und aus dem Gefäß von oben abgenommen wurden. Es wurden auf den Blotmembranen Flotillin, Clathrin, Caveolin-1 und P34 entsprechend nachgewiesen.

Protein P34 ist deutlicher in den Fraktionen F1 und F2 zu sehen, aber auch in der Fraktion R2. Weniger deutlich kommt P34 in allen anderen F-Fraktionen vor. Die Fraktionen R2 bis F1 waren mit *Lipid Rafts* angereichert. Sie waren positiv für die Immunfärbung der Proteine Flotillin und Caveolin-1. Für die Clathrinfärbung positive Zellfraktionen waren angereichert in den Fraktionen F6-F8. Eine Assoziation zwischen Caveolin-1 und Flotillin enthaltenden Fraktionen und P34 war deutlich sichtbar.

Um diese Daten, die auf einen *Caveolae*-vermittelten Transport in den Enterozyt hindeuten, zu verifizieren, wurden Epithelzellen mit Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD), was durch die Depletion von Cholesterol die *Caveolae*-Formation beeinträchtigt (Simons und Toomre 2000), vor und während der Proteininkubation behandelt. Es wurde FITC-markiertes Protein verwendet. Die Inkubation von 150 µg/mL erfolgte für zwei Stunden

bei 4 °C und 39 °C. In Abbildung 25 ist die prozentuale Veränderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) der im Durchflußzytometer (FACS) gemessenen IPEC-J2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach Substanz- und Proteininkubation dargestellt.

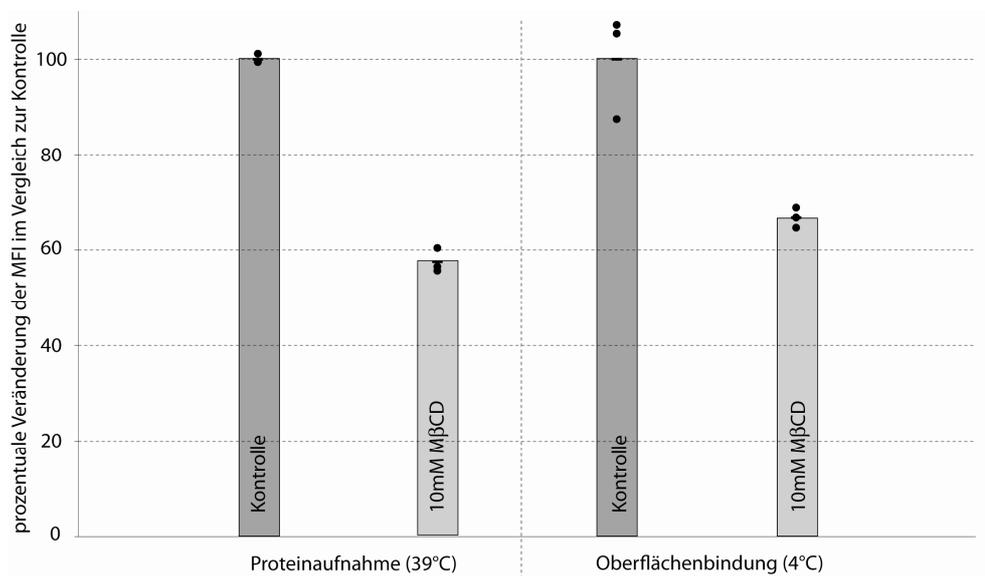


Abbildung 25: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) von bei 39 °C und 4 °C mit P34-FITC inkubierten und mit MβCD behandelten und im FACS gemessenen Zellen. Es sind exemplarisch die Einzelwerte (●) und der Mittelwert (Balken) eines Versuchs abgebildet.

Das MβCD hatte einen negativen Einfluss auf die P34-Endozytose in IPEC-J2 Epithelzellen (Abbildung 25). Betrachtet man die intrazellulären Signale absolut (MFI für 4 °C subtrahiert von MFI für 39 °C) so verminderte MβCD die P34-Endozytose um ungefähr 44 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteinoberflächenbindung (Inkubation bei 4 °C) war nach einer Behandlung mit MβCD im Vergleich zur Kontrolle um 33 % vermindert.

Mit Nystatin behandelte Zellen (siehe 3.2.2.4) wurden nach P34-FITC Inkubation ebenfalls im FACS gemessen. Deren durchschnittliche Fluoreszenzintensität war im Vergleich zu den Kontrollzellen regelmäßig leicht erhöht. Diese Daten waren im Vergleich zu allen anderen FACS Daten schwerer reproduzierbar. Von solchen mit Nystatin behandelten Zellen wurden Cytospots (Methodik siehe 3.2.4.3) angefertigt, welche in folgender Abbildung gezeigt sind. Auf diesen Cytospots ist zu sehen, dass gehäufte P34-FITC Signale auch in den Kontrollzellen sind. Es wurden jedoch nach Nystatinbehandlung mehr Zellen gefunden, die gehäufte intrazelluläre Signale aufwiesen. Zusammenfassend lassen sich eine Kolokalisation von P34 mit Caveolin-1/Flotillin positiven Zellfraktionen und ein Einfluss von MβCD auf die P34-Endozytose feststellen. Der Einfluss einer Nystatinbehandlung äußerte sich in vermehrten zellulären P34-FITC Signalen.

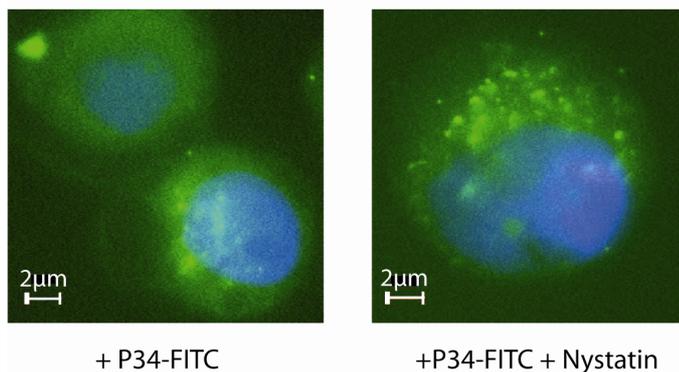


Abbildung 26: Cytospots von IPEC-J2 Zellen, die P34-FITC enthalten, es sind Einzelzellen dargestellt. Es werden Kontrollzellen (inkubiert mit P34-FITC in serumfreiem Medium) verglichen mit welchen, die zusätzlich mit 500 U/mL Nystatin inkubiert worden sind. Der Balken entspricht 2 µm.

4.4.3 Abhängigkeit der Endozytose von der Zeit, der P34 Konzentration und dem Alter der IPEC-J2 Zellen

Um eine Vorstellung über die Geschwindigkeit der P34-Aufnahme in die Epithelzelle zu bekommen und zu prüfen, ob die Aufnahme einer Sättigung unterliegt, wurden Epithelzellen unterschiedlich lange oder mit unterschiedlichen Konzentrationen mit Fluoreszein-markiertem Protein inkubiert und im FACS analysiert (siehe Abschnitt 3.2.2.4). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der IPEC-J2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlicher P34 Konzentration für zwei Stunden bei 4 °C und 39 °C ist in Abbildung 27 zu sehen.

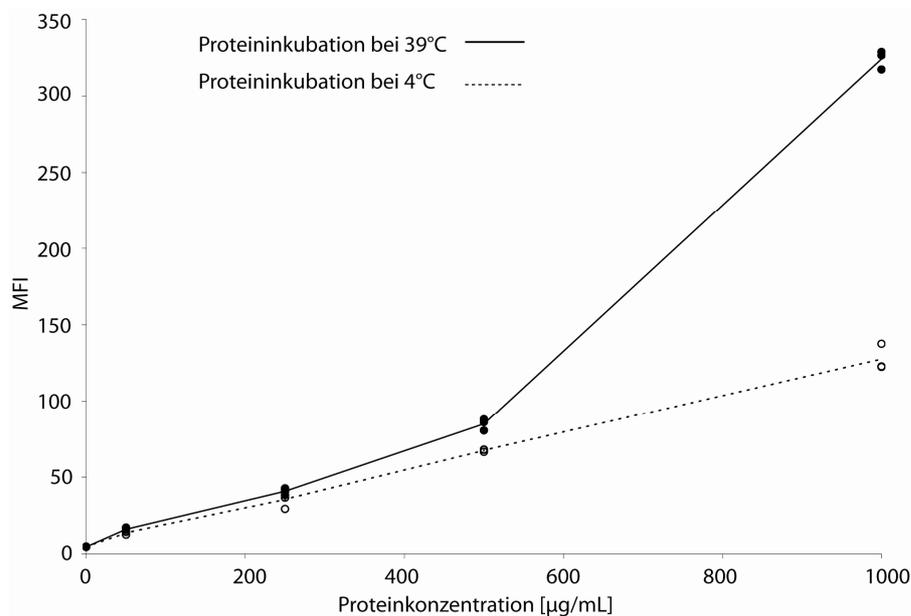


Abbildung 27: Konzentrationsabhängigkeit der Proteinaufnahme (39 °C) und Oberflächenbindung (4 °C) für IPEC-J2 Zellen. Es sind die drei Einzelwerte (durchschnittliche Fluoreszenzintensität = MFI) eines Versuchs beispielhaft dargestellt, die durchgezogene Linie verbindet die Mittelwerte.

Die Proteinoberflächenbindung (bei 4 °C) und die Proteinaufnahme (39 °C) waren für die Zelllinie bis zu einer Konzentration von 500 µg/mL linear. Bei der Inkubation mit 1000 µg/mL Protein war die Aufnahme im Vergleich zu geringeren Konzentrationen unproportional erhöht. Exemplarisch sind folgend außerdem die FACS-Daten dargestellt. Es werden in Abbildung 28 Zellen, die mit FITC-Protein bei 4 °C und bei 39 °C inkubiert wurden, mit den Kontrollzellen, die nur mit serumfreiem Medium inkubiert worden sind, verglichen. Die Verschiebung des Peaks ist gleich zu setzen mit der Vermehrung zellulärer FITC-Signale.

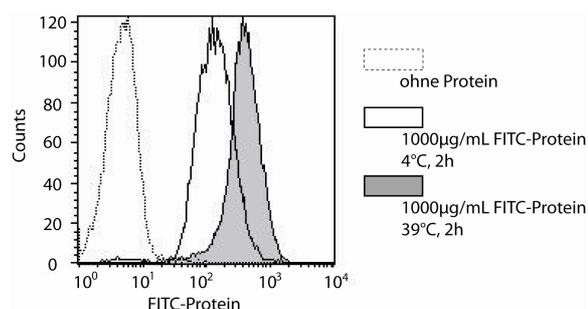


Abbildung 28: FACS-Daten, abgebildet sind die Fluoreszenzdaten von mindestens 15000 Zellen, jeweils IPEC-J2 Zellen, die nicht mit Protein stimuliert wurden sowie Zellen, die mit 1000 µg/mL Protein-FITC für zwei Stunden bei 4 °C oder 39 °C stimuliert wurden.

In Abbildung 29 ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen für die Protein-FITC-Aufnahme und -Oberflächenbindung in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Zellen wurden bei 4 °C und 39 °C mit 150 µg/mL P34-FITC inkubiert.

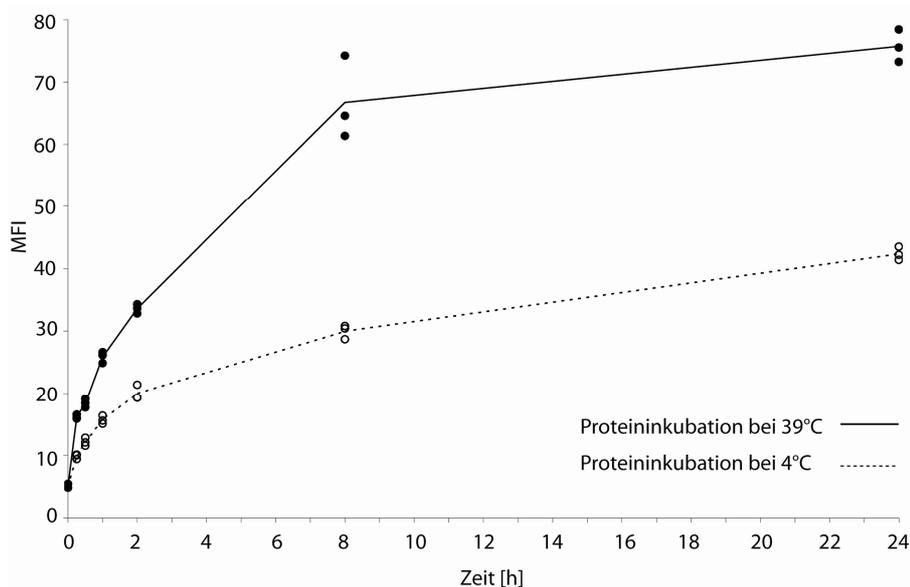


Abbildung 29: Zeitabhängigkeit der Proteinaufnahme (39 °C) und Oberflächenbindung (4 °C) für IPEC-J2 Zellen. Es sind die drei Einzelwerte (durchschnittliche Fluoreszenzintensität = MFI) eines Versuchs beispielhaft dargestellt, die durchgezogene Linie verbindet die Mittelwerte.

Die Proteinaufnahme stieg mit zunehmender Zeit, jedoch nicht proportional und erfuhr genauso wie die Adsorption an die Zelloberfläche (4 °C) mit zunehmender Zeit eine

Sättigung. Für die IPEC-J2 Zellen stagnierte die Proteinaufnahme zwischen acht und 24 Stunden. Ein Maximum der Proteinaufnahme war noch nicht erreicht.

Die P34-Endozytose unterschiedlich alter Zellen ist in Abbildung 30 dargestellt. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben unterschiedlich lange in serumfreiem Medium kultiviert und am gleichen Versuchstag mit 150 µg/mL P34-FITC für zwei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im FACS gemessen.

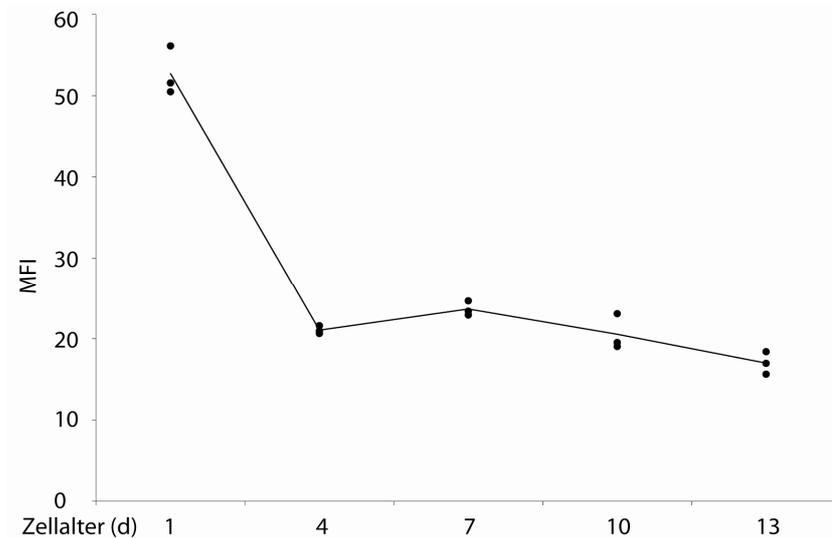


Abbildung 30: Unterschiedlich alte Zellen wurden mit P34-FITC inkubiert und im FACS gemessen. Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen. Es sind die drei Einzelwerte eines Versuches gezeigt, die Mittelwerte sind zu einer Linie verbunden.

In Abbildung 30 ist deutlich zu sehen, dass die P34-Endozytose am höchsten ist bei einen Tag alten Zellen und danach vergleichbar hoch bleibt. Für die Proteinoberflächenbindung (gemessen bei 4 °C) waren die MFI-Werte bei einen Tag alten Zellen durchschnittlich bei 18.0 und bei 13 Tage alten Zellen durchschnittlich bei 11.0. Die Versuchsergebnisse unterschieden sich trotz unterschiedlicher Lagerung der Zellen nicht.

P34 konnte intrazellulär mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung dargestellt werden (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Die Zellen wurden wie beschrieben auf Poly-D-Lysin beschichteten Objektträgern ausgesät und nach acht Tagen konfluentem Wachstum in serumfreiem Medium mit P34 inkubiert. Die Detektion von P34 erfolgte mit dem primären Antikörper F5 und einem TexasRed-markierten sekundären Antikörper (siehe Abbildung 31).

Es sind diffus verteilte Proteinfarbsignale zu erkennen, die sich mit dieser Färbung nicht lokalisieren ließen. Diese Färbung lässt keine Differenzierung zwischen intrazellulärem und subzellulärem P34 zu.

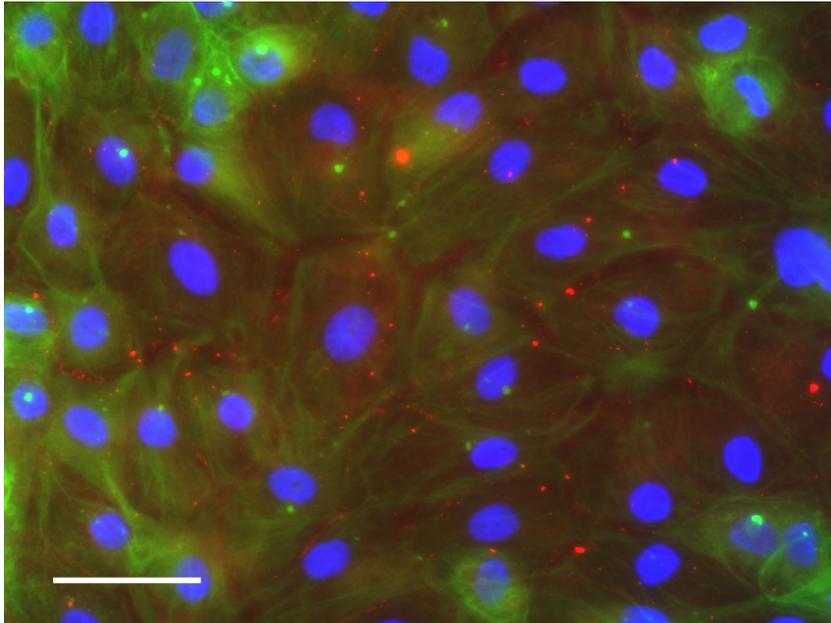


Abbildung 31: Abgebildet sind IPEC-J2 Zellen, die acht Tage auf Poly-D-Lysin-beschichteten Objektträgern gewachsen sind und anschließend mit P34 stimuliert wurden. Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit Hilfe einer Immunfärbung mit DAPI (blau, Kernfärbung), FITC-Phalloidin (grün, Aktinfilamente) und F5 (rot, P34) gefärbt. Der Balken entspricht 50 µm.

Die intrazelluläre Darstellung von P34 erfolgte auch elektronenmikroskopisch wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben. Mit P34 inkubierte IPEC-J2 Epithelzellen auf Transwell-Einsätzen wurden mit einem Immunfärbeprotokoll behandelt und für die Elektronenmikroskopie fixiert. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen IPEC-J2 Zellen im elektronenmikroskopischen Bild. Zellen, die bei 4 °C und 39 °C inkubiert worden sind, werden verglichen. Abbildung 33 (a und b) zeigen Zellen mit besonders viel P34-Markierung (siehe Pfeile). In Abbildung 33 c und d sind dann ebenfalls Strukturen dargestellt worden, die so mehrmals aufgetreten sind. Diese Strukturen ähneln großen granulären Vesikeln und scheinen voller Markierung zu sein.

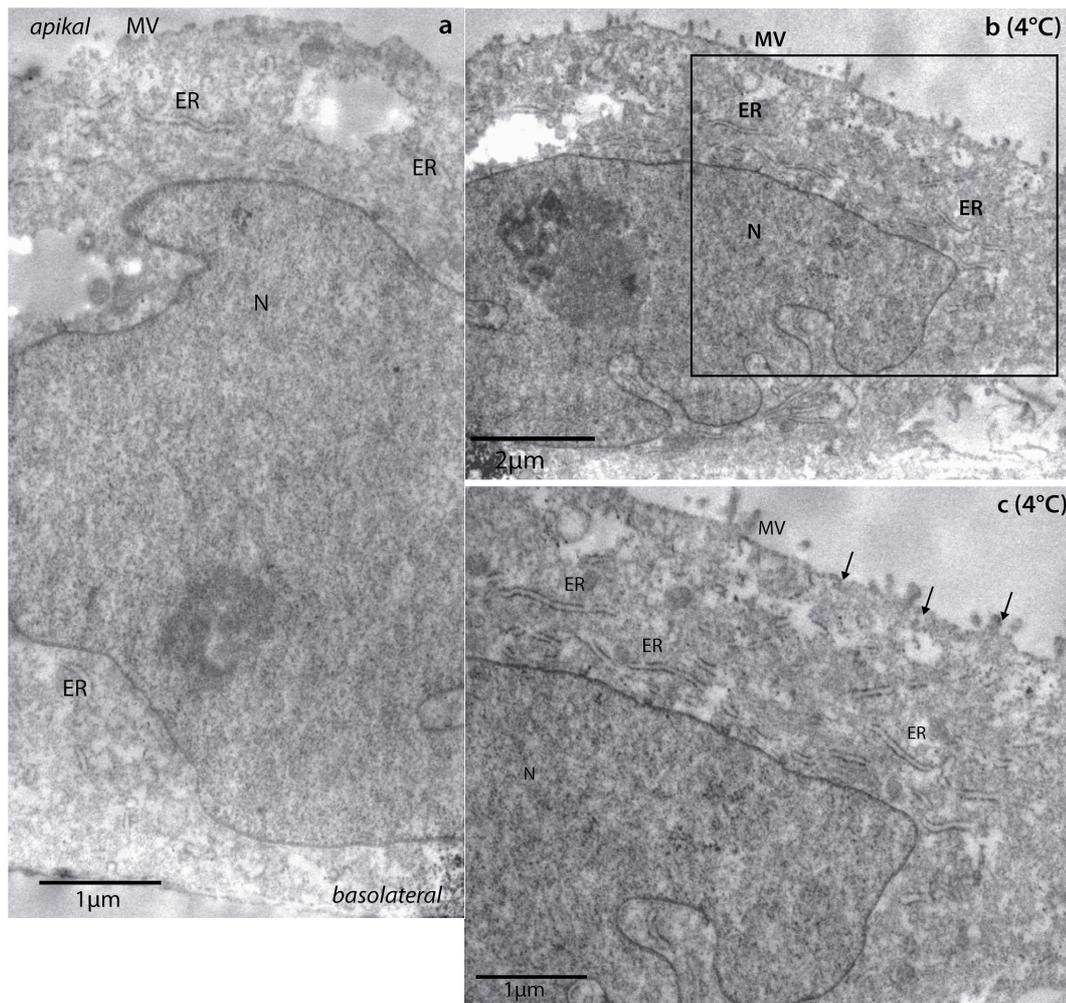


Abbildung 32: Es sind IPEC-J2 Zellen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt:
a) Kontrolle, die Zellen wurden mit primärem Antikörper P34-Antikörper (F5) und sekundärem biotinylierten Antikörper behandelt, die Sichtbarmachung erfolgte mit DAB, die Zellen wurden nicht mit P34 inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.4.1)
b) die Zellen wurden mit Protein bei 4 °C inkubiert und mit beiden oben genannten Antikörpern behandelt, die Sichtbarmachung erfolgt mit DAB, zu sehen ist eine Übersicht
c) hier ist der Ausschnitt von b) dargestellt, die Pfeile deuten auf Markierung an der Zelloberfläche hin
 Abkürzungen: MV-Mikrovilli, ER-Endoplasmatisches Retikulum, N-Nukleus

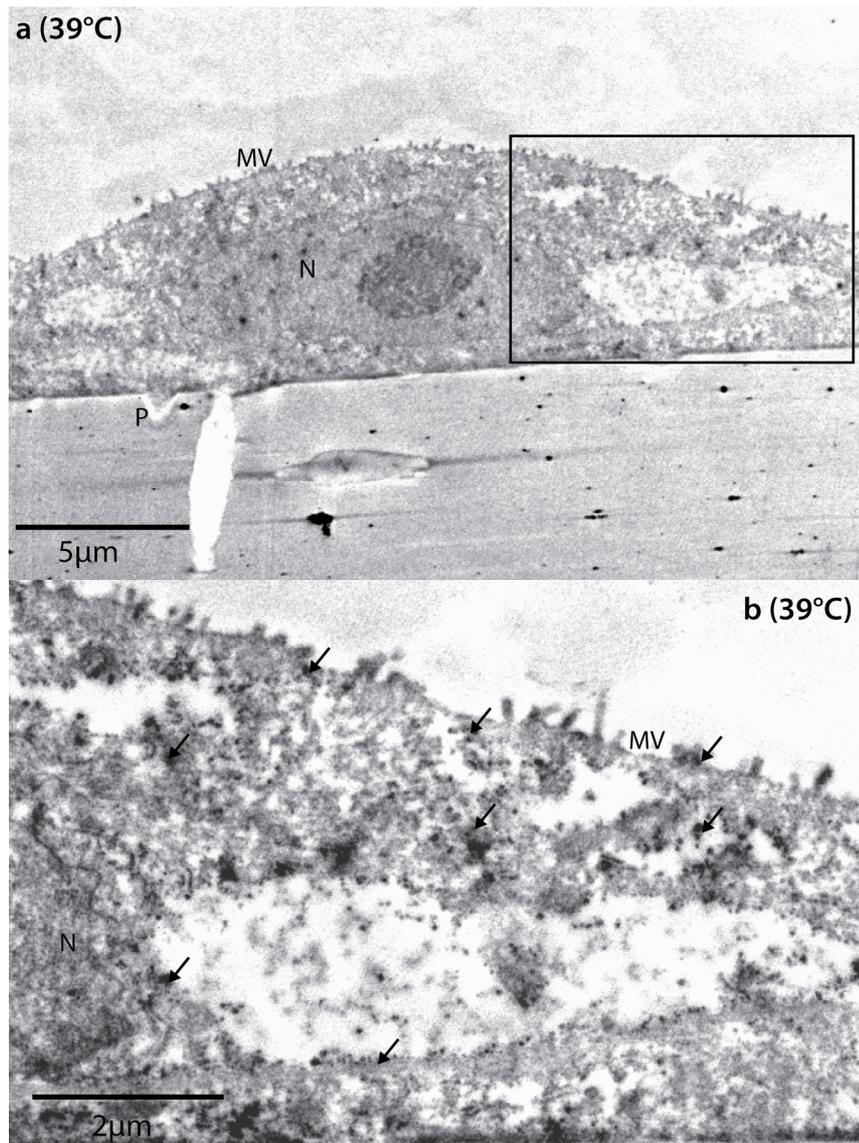
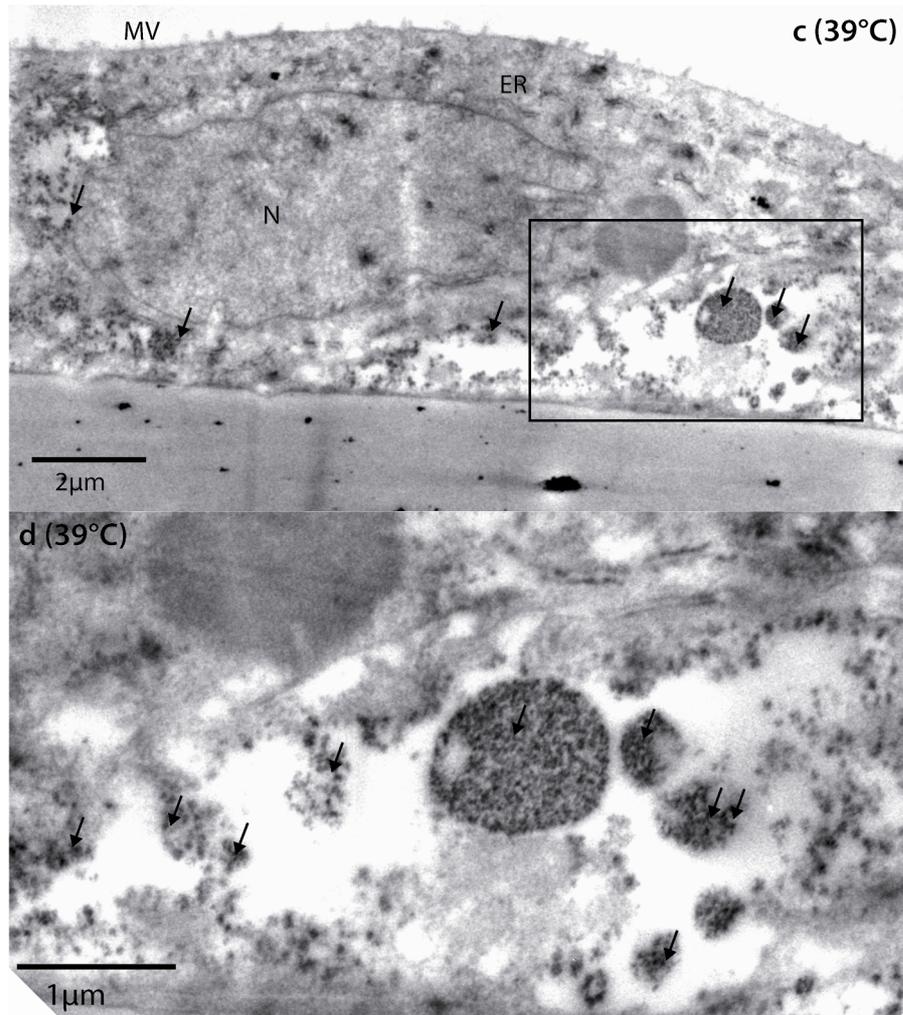


Abbildung 33: Es sind IPEC-J2 Zellen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt:
a) die Zellen wurden mit Protein bei 39 °C inkubiert und mit primärem P34-Antikörper (F5) und sekundärem biotinylierten Antikörper behandelt, die Sichtbarmachung erfolgte mit DAB, zu sehen ist eine Übersicht
b) hier ist der Ausschnitt von a) dargestellt, die Pfeile deuten auf die Markierung hin
 Abkürzungen: MV-Mikrovilli, ER-Endoplasmatisches Retikulum, N-Nukleus, P-Transwellpore



c) die Zellen wurden mit Protein bei 39 °C inkubiert und mit primärem P34-Antikörper (F5) und sekundärem biotinylierten Antikörper behandelt, die Sichtbarmachung erfolgte mit DAB, zu sehen ist eine Übersicht, bei der runde granulierte Zellorganellen mit Markierung gefunden worden sind
d) hier ist der Ausschnitt von c) dargestellt, die Pfeile deuten auf Markierung hin, verschiedene markierte runde Zellorganellen sind zu sehen
 Abkürzungen: MV-Mikrovilli, ER-Endoplasamtisches Retikulum, N-Nukleus

4.4.4 Transzytose von P34

Wie in der Einführung beschrieben (siehe 1.1.1.1) bilden Enterozyten ein einschichtiges Epithel aus. Die *Tight Junctions*, welche sie zueinander ausbilden, grenzen deren apikale Oberfläche von der basolateralen Zellseite ab, das freie Passieren von großen Molekülen an den Zellen vorbei ist dann nicht mehr möglich. Sind die Zellen vollständig ausdifferenziert, kann die „Dichte“ auf dem Transwelleinsatz wachsender Zellen als transepithelialer Widerstand (TEER) mit Hilfe eines TEER-Messgerätes gemessen werden. Der transepitheliale Widerstand gilt als Indikator der Integrität und Permeabilität der Epithelzellschicht (Fromter und Diamond 1972). Es ist während der Arbeiten deutlich geworden (siehe Abbildung 34), dass P34 die dicht gewachsenen Epithelzellen im Transwellsystem vollständig passiert. Der durchschnittliche TEER-Wert war vor dem Versuch $4540 \Omega/\text{cm}^2$ und danach $1893 \Omega/\text{cm}^2$. Es kann davon ausgegangen werden, dass P34 aktiv transportiert wurde.

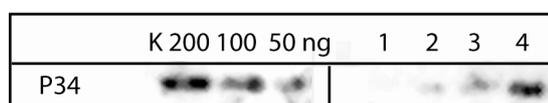


Abbildung 34: Der Immunoblot zeigt den Durchtritt des gesamten Proteins P34 nach drei Stunden im Transwellsystem. Die basolateralen Überstände wurden vollständig mit TCA-Lösung ausgefällt und auf ein SDS-Gel geladen, anschließend auf Blotmembranen transferiert und P34 mit dem Antikörper F5 detektiert. Zur Kontrolle (**K**) ist P34 in drei verschiedenen Verdünnungen mit auf das Gel aufgetragen worden (200, 100 und 50 ng P34, 77%). In den mit **1 – 4** beschrifteten Bahnen sind die basolateralen Überstände von apikal aufgetragenen unterschiedlichen Konzentrationen (50, 250, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) von 77%igem P34 zu sehen.

Um die Substanzen M β CD und Nystatin ebenfalls auf ihren Einfluss auf die P34-Transzytose hin zu überprüfen, wurden auf dem Transwell gewachsene IPEC-J2 Zellen mit diesen Substanzen behandelt. *Caveolae*, welche die Endozytose für P34 in IPEC-J2 Zellen vermitteln, transportieren auch Proteine, zum Beispiel durch Endothelzellen (Schnitzer et al. 1994). Es ist in der folgenden Abbildung der Immunoblot mit den ausgefallten basolateral aufgefangenen Überständen dargestellt. Die Überstände von mit P34 inkubierten Zellen, die mit Nystatin und M β CD behandelt worden sind, wurden mit den Überständen von unbehandelten aber mit P34 inkubierten Zellen verglichen. Im basolateralen Kompartiment der Enterozyten wurden keine Bruchstücke von P34 mit dem Antikörper F5 nachgewiesen. Der durchschnittliche TEER-Wert vor dem Versuch war $3347 \Omega/\text{cm}^2$ und nach dem Versuch (gemessen nach Proteininkubation und Entnahme der Überstände mit neuem serumfreien Medium) $2869 \Omega/\text{cm}^2$.

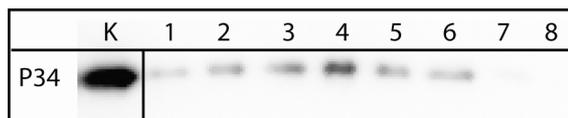


Abbildung 35: Basolaterale Überstände von transzytiertem P34 (1 mg/mL 77% P34 apikal für 3h), **K** ist die Ladekontrolle (62.5 ng P34), **1** und **2** die gefällten Überstände nach M β CD-Behandlung, **3** und **4** die Überstände nach Nystatinbehandlung, **5** und **6** die Überstände ohne Behandlung und **7** und **8** die negativen Kontrollen.

P34 passierte das Transwellssystem als vollständiges Protein. Die Flächen der Überstände im basolateralen Bereich des Transwells (siehe Abbildung 35) wurden densitometrisch bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Auswertung ergab, dass durch M β CD die Proteinmenge einmal 0.64-fach (Bahn 1, Abbildung 35) im Vergleich zur Kontrolle (=1) und einmal unverändert war (Bahn 2). Für die Nystatinbehandlung war die P34-Menge im basolateralen Kompartiment für Bahn 3 1.35-mal so hoch wie die Kontrolle und für Bahn 4 2.65-mal so hoch. Die Ergebnisse für Nystatin ließen sich reproduzieren, die für M β CD nicht.

4.5 Zytokinexpression von Epithelzellen nach Inkubation mit P34

Wie in den Kapiteln 1.1.1.5 und 1.1.1.6 dargestellt, sind Enterozyten in der Lage Zytokine zu exprimieren, welche Immunzellen rekrutieren können. In dieser Arbeit wurde nach der veränderten Expression der IL-6-, IL-8- und TGF- β -mRNA in intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) nach Inkubation mit unterschiedlichen P34 Konzentrationen gesucht. In den folgenden Abbildungen (Abbildung 36-Abbildung 38) ist die Veränderung der mRNA aller drei Zytokine aus den IPEC-J2 Zellen in Abhängigkeit von der inkubierten Proteinkonzentration dargestellt. Die Banden der im Agarosegel durch UV-Licht sichtbaren PCR-Produkte der Zytokine wurden densitometrisch bestimmt und einzeln korrigiert gegen die densitometrisch bestimmten Flächen der Banden der PCR-Produkte der drei Kontrollen β -Aktin, GAPDH und Cyclophilin (semiquantitative Auswertung). In den Abbildungen sind die drei Einzelwerte der drei Versuche abgebildet, die jeweils einzeln mit den Kontrollen korrigiert worden sind.

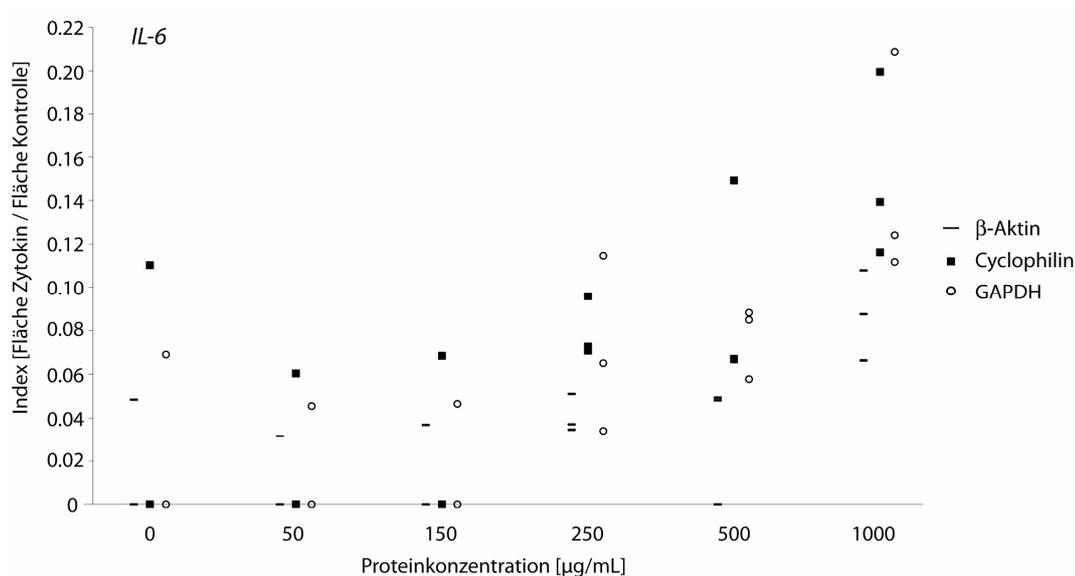


Abbildung 36: Abgebildet ist die Veränderung der PCR-Produkte von IL-6 der IPEC-J2 Zellen in Abhängigkeit von der P34 Konzentration. Die IL-6 PCR-Produkte jedes Versuches sind korrigiert worden gegen die PCR-Produkte von β -Aktin, Cyclophilin und GAPDH und als Index angegeben. Es sind die drei Einzelwerte von drei Versuchen dargestellt.

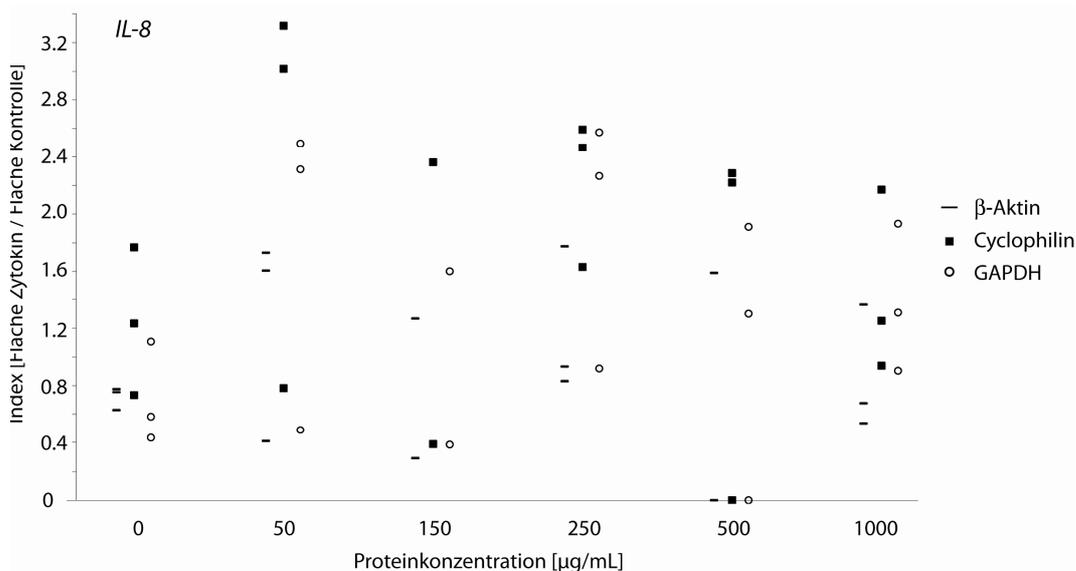


Abbildung 37: Abgebildet ist die Veränderung der PCR-Produkte von IL-8 der IPEC-J2 Zellen in Abhängigkeit von der P34 Konzentration. Die IL-8 PCR-Produkte jedes Versuches sind korrigiert worden gegen die PCR-Produkte von β -Aktin, Cyclophilin und GAPDH und als Index angegeben. Es sind die drei Einzelwerte von drei Versuchen dargestellt.

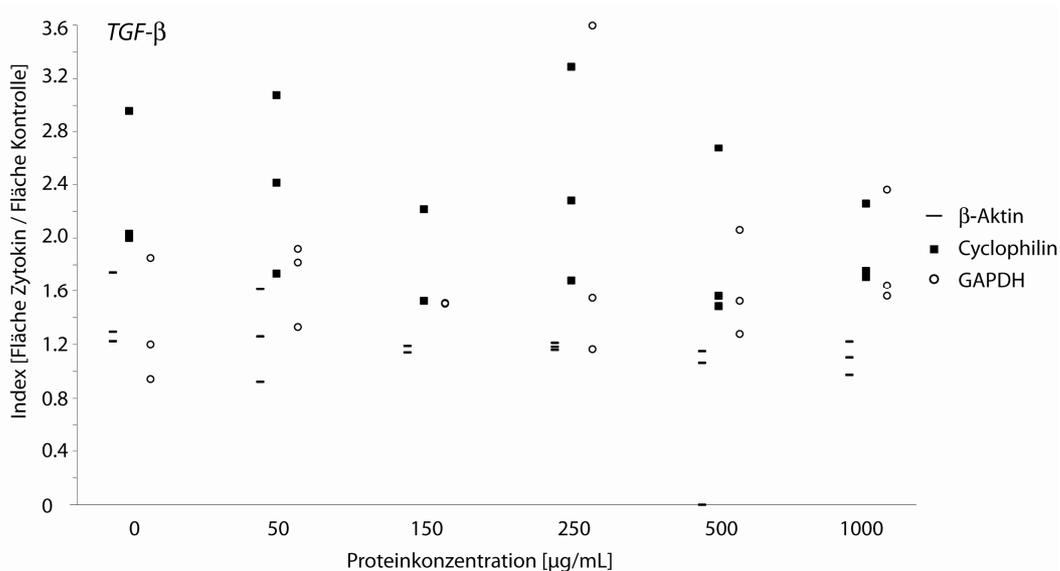


Abbildung 38: Abgebildet ist die Veränderung der PCR-Produkte von TGF- β der IPEC-J2 Zellen in Abhängigkeit von der P34 Konzentration. Die TGF- β PCR-Produkte jedes Versuches sind korrigiert worden gegen die PCR-Produkte von β -Aktin, Cyclophilin und GAPDH und als Index angegeben. Es sind die drei Einzelwerte von drei Versuchen dargestellt.

Überall dort, wo in den Abbildungen die Punkte für die Indices die x-Achse treffen, wurde kein PCR-Produkt gefunden. Es konnte beobachtet werden, dass die Ergebnisse der hier abgebildeten drei Versuche sehr schwankten. Ebenfalls variierten die Ergebnisse für die Korrektur jeweils eines Zytokins mit den drei Kontrollen. Für IL-8 und TGF- β war eher ein Anstieg der PCR-Produktmenge bei geringen P34 Konzentrationen (50 $\mu\text{g/mL}$) zu beobachten. Im Durchschnitt und mit höherer Konzentration ist keine konzentrationsabhängige Veränderung der PCR-Produkte zu sehen. In zwei von drei Versuchen wurde kein PCR-Produkt von der IL-6 cDNA für die ersten drei P34 Konzentrationen gefunden (0, 50 und 150 $\mu\text{g/mL}$, Abbildung 36). Die PCR-Produkt-

menge für das Zytokin IL-6 schien mit zunehmender P34 Konzentration zu steigen. Die PCR-Produktmengen waren von IL-6 geringer als für die anderen beiden Zytokine. Es ist zusammenfassend ein konzentrationsabhängiger Aufwärtstrend der IL-6 mRNA Transkripte zu beobachten. Die PCR-Produktmenge der anderen beiden Zytokine IL-8 und TGF- β schwankten zwar stark, es war im Durchschnitt aber keine P34-Konzentrationsabhängigkeit ihrer Bildung sichtbar.

4.6 Immunmodulatorische Wirkung von P34 auf PBMCs und MoDCs

Es konnte mit den vorhergehenden Versuchen *in vitro* gezeigt werden, dass P34 die Enterozyten der IPEC-J2 Zelllinie passiert und als ganzes Protein den basolateralen Raum erreicht (siehe Abschnitt 4.2 und 4.4). Theoretisch kann P34 Immunzellen, welche sich unterhalb des Epithels befinden, erreichen. Solche Zellen könnten periphere Lymphozyten oder Dendritische Zellen sein (siehe Einleitung 1.1.1). In den folgenden Darstellungen sind die Ergebnisse zusammengefasst, die aus der Arbeit mit den aus dem Blut von Schweinen isolierten Zellen (PBMCs und MoDCs) entstanden sind.

4.6.1 Dendritische Zellen (MoDCs)

Aus Monozyten isolierte und differenzierte MoDC (siehe Abschnitt 3.2.2.3) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen P34-FITC für zwei Stunden bei 4 °C und 39 °C inkubiert (siehe Methode Abschnitt 3.2.2.4). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der im FACS gemessenen MoDCs ist in Abbildung 39 dargestellt.

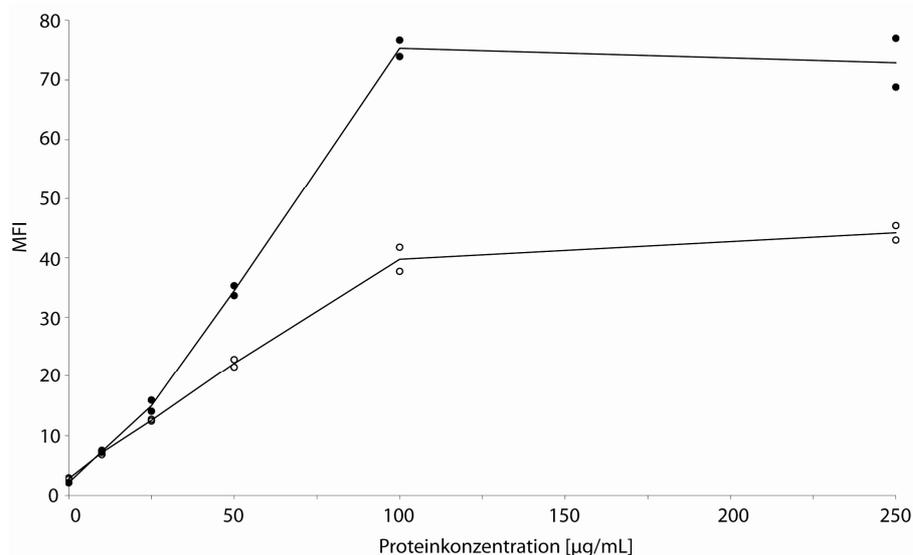


Abbildung 39: FITC-Proteinaufnahme bei Dendritischen Zellen, dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zweier Versuche bei 39 °C. Dargestellt sind die Duplikate von zwei Versuchen, die Mittelwerte sind jeweils zu einer Linie verbunden.

Die Proteinendozytose steht hier in proportionalem Verhältnis zur eingesetzten Konzentration und war in beiden Versuchen gesättigt bei 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (siehe Abbildung 39). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der bei 4 °C mit 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inkubierten Zellen war im Durchschnitt für den oberen Graph 17.4 und den unteren Graph 18.9. Die unterschiedlich hohe absolute Fluoreszenzintensität kann mit einer nicht identischen FITC-Markierung erklärt werden. Diese wurde zwar immer gleich angefertigt (siehe Abschnitt 3.2.3.6), die Kopplung der FITC-Moleküle an das Protein ist aber nicht beeinflussbar. Obwohl die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der MoDCs im FACS nach Inkubation mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P34-FITC gleich hoch war, sind im Cytospot einzelne Zellen erkennbar, die mehr Protein aufgenommen zu haben schienen (Abbildung 40). Die intrazellulären Protein-FITC-Signale waren zudem unterschiedlich von Zelle zu Zelle.

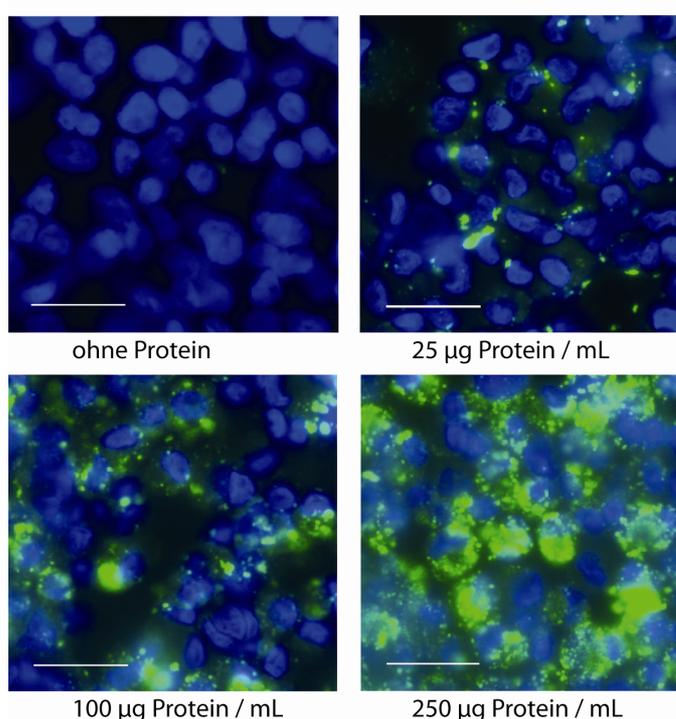


Abbildung 40: Cytospots von MoDCs (200fache Vergrößerung), die mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oder 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC-markiertem Protein (siehe auch Abbildung 39) inkubiert wurden und anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt worden sind. Der Balken entspricht 40 μm .

4.6.2 Stoffwechselaktivität von PBMCs

Aufgrund der Allergenität des Proteins P34 beim Menschen (Ogawa et al. 1991), sollten dessen immunmodulierende Eigenschaften auch an Immunzellen aus dem Schwein getestet werden (zum Beispiel periphere mononukleäre Blutzellen, PBMCs). Die damit verbundene Frage lautet, ob möglicherweise ins Blut transportiertes P34 das Wachstum dieser Zellpopulation stimuliert. Weangsripinaval und Kollegen (2005) haben nach P34 Gabe bei Mäusen selbiges in deren Blut wieder gefunden und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Schweine P34-bindende Antikörper im Blut haben (siehe Abschnitt 4.3). Zellwachstum, Proliferation, Lebensfähigkeit und Aktivität von PBMCs

in Abhängigkeit von ansteigender Proteinkonzentration wurden mit Hilfe des MTT-Tests ermittelt. Der MTT-Test bemisst den metabolischen Umsatz von PBMC Kulturen mit Hilfe einer durch mitochondriale Enzyme umgesetzten Farbreaktion. Die relative Proliferation der für drei Tage mit P34 oder P34 und ConA stimulierten PBMCs wurde mit der unstimulierten Zellen (Proliferationsindex = 1, Hilfslinie, siehe Abbildung) verglichen. Die Ergebnisse aus dem MTT-Test sind in Abbildung 41 dargestellt worden.

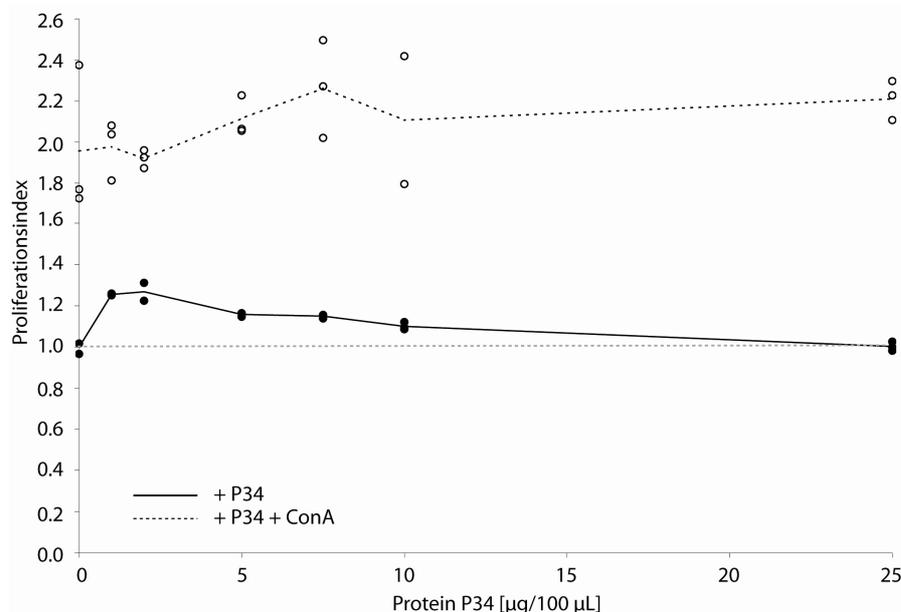


Abbildung 41: Der Proliferationsindex von mit P34 und P34 + ConA stimulierten PBMCs ist hier dargestellt. Verglichen werden die Veränderung der metabolischen Aktivität und die Proliferation von Zellen (PBMCs), die mit P34 allein oder zusätzlich mit Conavalin A stimuliert wurden. Es sind die Einzelwerte dargestellt (●) und der Mittelwert ist zu einer Linie verbunden.

In der Abbildung ist zu sehen, dass die Zellproliferation der PBMC Kulturen durch ConA mehr stimuliert war, was mit der mitogeninduzierten Lymphozytenproliferation übereinstimmt. P34 beeinträchtigte oder stimulierte bei geringeren P34 Konzentrationen (1-5 µg/Well, ein Well = 100 µL Volumen) die Zellstoffwechselaktivität der PBMCs mit und ohne Con A. Jedoch glich insgesamt die kalkulierte Stoffwechselaktivität der mit P34 stimulierten Zellen eher einer Basislinie bis zu einer Konzentration von 25 µg P34 je Well.

5 Diskussion

Die folgende Abbildung fasst zunächst die Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal zusammen. In den folgenden Abschnitten werden dann die einzelnen Resultate beginnend mit der P34 Aufreinigung, der *in vitro* Verdauung von Sojabohnen, der P34-Endozytose und dem Transport sowie schließlich der Interaktion von P34 mit Immunzellen diskutiert.

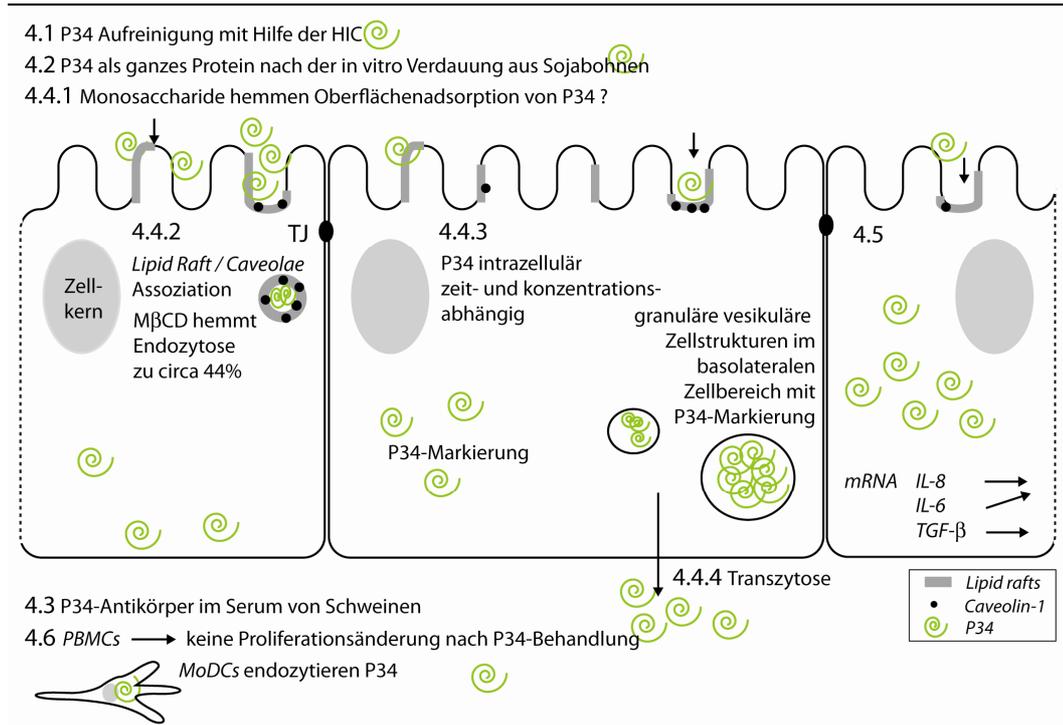


Abbildung 42: Ergebniszusammenfassung: es sind beispielhaft Enterozyten der IPEC-J2 Zelllinie dargestellt. P34 konnte mit Hilfe der HIC erfolgreich aufgereinigt werden (Abschnitt 4.1), es wurde als gesamtes Protein und Bruchstücke nach dem *in vitro* Verdauungsprozess nachgewiesen (Abschnitt 4.2), P34-Antikörper konnten mit Hilfe eines ELISA aus dem Serum von Schweinen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.3). Das Protein wurde durch IPEC-J2 Zellen endozytiert und transportiert (siehe Abschnitt 4.4), die Bildung der IL-6, IL-8 und TGF-β mRNA wurde in IPEC-J2 Zellen nach P34 Inkubation gemessen (Abschnitt 4.5) und die Wirkung von P34 auf die Stoffwechselaktivität von PBMC Kulturen und die P34-Endozytose in MoDCs wurden überprüft (Abschnitt 4.6).

5.1 Aufreinigung von P34

Es wurde in dieser Arbeit unter Verwendung der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) ein Verfahren entwickelt, mit dem zügig sauberes Protein P34 erhalten werden konnte. Das HIC Verfahren folgte dem Zentrifugationsprotokoll, bei dem P34 relativ einfach aus flotierendem Sojafett heraus gewaschen werden konnte (Herman 1987, Kalinski et al. 1992).

In Vorversuchen wurde eine HIC-Phase gefunden, bei der mit einer Salzkonzentration von 1 M Ammoniumsulfat im Phosphatpuffer P34 mit der Phase interagiert und

wenige Kontaminanten die Trennung von P34 störten. Die kontaminierenden Proteine banden zum großen Teil nicht in die Phase und ließen sich mit dem Durchlauf des Bindungspuffers herauspülen (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11, Abschnitt 4.1.2-3). Dies ist auch von Vorteil für die Kapazität der ausgewählten Phase - Butyl Sepharose 4 FF -, P34 zu binden. Weiterhin ließ sich mit der gewählten Phase das Protein im Vergleich zu allen anderen Phasen relativ einzeln mit 0.4 M Salz im Elutionspuffer eluieren (siehe Abbildung 10, Kapitel 4.1.2). Bei der detaillierten Beschreibung der chromatographischen Separation in der 7.5 mL Säule fiel auf, dass P34 auch mit dem Bindungspuffer zu geringsten Mengen wieder von der Säule gespült wurde (Abbildung 11, Abschnitt 4.1.3). Es wurde hierfür angenommen, dass die Kapazität der Säule für P34 erreicht war. Auch mit dem ersten Elutionsschritt (0.6 M Ammoniumsulfat) eluierten geringe Mengen P34. Das Protein hat vermutlich unterschiedliche Interaktionsflächen, die sich in ihrer Hydrophobizität oder sterischen Erreichbarkeit unterscheiden. Auch können unterschiedliche Strukturen in der Nähe der Adsorptionsstelle auf der Proteinoberfläche sterisch mit der stationären Phase interagieren und so die Adsorption schwächen. Da aber die Menge an früher eluiertem P34 gering war, musste auf diesen Verlust nicht weiter Rücksicht genommen werden. Die Bindungs- und Elutionspufferbedingungen wurden auf der nächst größeren Säule (75 mL) weiter variiert, da sich nach beiden Elutionsschritten weiterhin Protein auf der Säule befand (Abbildung 11, Abschnitt 4.1.3).

Der zweistufige Elutionsprozess wurde zuletzt auf einen Ein-Stufen-Elutionsprozess reduziert. Der Tatsache, dass P34 unterhalb einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0.6 M zu eluieren begann, also die Interaktion mit der stationären Phase nachließ, wurde Rechnung getragen mit einem Bindungspuffer dieser Salzkonzentration. Dieser ließ es zu, eine Interaktion aller kontaminierenden Proteine, welche bei Salzkonzentrationen überhalb von 0.6 M in die Phase binden, auszuschließen. Weiterhin konnte die absolute Menge an eluiertem Protein P34 mit einer niedrigeren Elutionsstufe (0.25 M Ammoniumsulfat) erhöht werden. Diese niedrigere Elutionsstufe schloss aus, dass alle restlichen noch gebundenen Kontaminanten mit eluierten, was sie bei nächst niedrigeren Salzstufen taten (siehe Abbildung 14, Abschnitt 4.1.3).

Während dieser Arbeiten konnte festgestellt werden, dass die Lagerung der für die Chromatographie verwendeten Proteinlösung in 1 M Ammoniumsulfat einen positiven Einfluss auf die chromatographische Isolierung von P34 zu haben schien (Vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Lagerung erfolgte stets bei 4 °C, es zeigte sich aber, dass sich bei der Verwendung einer frischen Proteinprobe mehr kontaminierende Proteine in der P34 Fraktion befanden (siehe Abbildung 15, Bahn 4). Eine mögliche Teilverdauung der anderen Proteine veränderte deren Bindungsverhalten in der stationären Butyl Sepharose 4 FF Phase. Das schien die Aufreinigung von P34 zu vereinfachen (siehe Abbildung 14) und P34 nicht zu betreffen. Das Laufverhalten von P34 im SDS-Acrylamidgel war während der chromatographischen Reinigung unverändert (Abbildungen 9 und 12, Abschnitt 4.1). Das Protein war nach der Aufreinigung glykosyliert (siehe Abbildung 20, Abschnitt 4.4.1). Die Glykosylierung konnte nach dem Verfahren von Focke (Focke et al. 1998) nachgewiesen werden. Es handelt sich hier vermutlich um die am Asparagin 170 befindliche Glykosylierung des Proteins (beschrieben in Bando et al. 1996, Vergleich Abbildung 5, Abschnitt 1.2.2.1). Mit dem beschriebenen Verfahren kann die Position der Glykosylierung nicht geklärt werden, für das in der Pflanzenzelle pro-

zessierte Protein ist aber keine andere Glykosylierung beschrieben (siehe Abbildung 4, Abschnitt 1.2.2.1).

Um den Aufreinigungsprozess in Hinsicht auf die Ausbeute des Proteins auszuwerten, muss zwischen der totalen Effizienz des Gesamtprozesses (beinhaltet die Herstellung der Proteinausgangslösung aus der Sojabohne und dem chromatographischen Prozess) und der Hydrophoben Interaktionschromatographie als eigenständigem Prozess unterschieden werden, welcher das vorgereinigte Protein als Ausgangspunkt hat. Für die Evaluation des gesamten Prozesses ist der Ausgangspunkt die P34-Menge in der Sojabohne. Wie in Abschnitt 1.2.2.1 beschrieben, wurde der Gehalt mit 2-3 % am Gesamtprotein der Sojabohne bemessen (Kalinski et al. 1990). Nach Herstellerangaben haben die verwendeten Bohnen einen Proteingehalt von 39 % an der Gesamtmasse. Beide Angaben ergeben einen theoretischen P34 Gehalt von 7.8 mg P34 je Gramm Sojabohne (für 2 % P34-Anteil am Gesamtprotein). Diese Angabe entspricht der höchst möglichen Ausbeute für die Aufreinigung. Es muss allerdings bemerkt werden, dass diese Angaben nur angenommen werden, da der P34 Gehalt und die Proteinmenge der Sojabohne bei den verwendeten Bohnen variieren können. Eine Quantifizierung für P34 wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Diese Zahlen ergeben einen Anhaltspunkt für die Ausbeute. Für die 7.5 mL Säule war das beste Resultat der P34 Aufreinigung 173 µg P34 aus einem Gramm Sojabohne. Die Ausbeute dafür ist im Gesamtprozess ~2 %. Für die 75 mL Säule und beiden Elutionsverfahren (Ein-Stufen- und Zwei-Stufen-Elution) konnte eine durchschnittliche Menge von 250 µg P34 je Gramm Sojabohne erhalten werden, was eine Ausbeute von ~3 % bedeutet. Zunächst scheint diese Ausbeute niedrig zu sein, dennoch ergab eine weitere Analyse des Prozesses, dass sich aus 200 g Sojabohnen nur 192 mg P34 in der Ausgangslösung für die Chromatographie befanden. Für das Zentrifugationsprotokoll kann also nur eine Ausbeute von 12 % für P34 berechnet werden. Hier würden bessere Prozessierungsbedingungen höhere Ausbeuten erzielen.

Soll in der Konsequenz jedoch der chromatographische Prozess selbst bewertet werden, muss der P34 Gehalt der dafür präparierten Ausgangslösung als Referenz benutzt werden. Diese Berechnung führt zu Ausbeuten von 18 % für P34 in der 7.5 mL Säule und 27 % für P34 in der 75 mL Säule. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen HIC Verfahren und der Isolation einzelner Komponenten aus einer Mischung vieler Komponenten (Passarinha et al. 2008, Berot et al. 2005), sind aber im Vergleich zu anderen chromatographischen Verfahren noch immer gering. Für den hier beschriebenen Prozess ist das allerdings durch die hohe Verfügbarkeit an Ausgangsmaterial (Sojabohne) und der Geschwindigkeit des Gesamtprozesses nicht problematisch.

Verglichen mit dem P34 Isolationsverfahren, welches durch Herman (1987) erstmalig beschrieben und durch Weangsripanaval und Kollegen (Weangsripanaval et al. 2005) noch etwas verändert wurde, ist es nun möglich, mit nur einem zusätzlichen Chromatographieschritt sauberes Protein herzustellen. Im Vergleich zur Methode von Ogawa und anderen (Ogawa et al. 1993), deren mehrstufiges Aufreinigungsverfahren auf der Globulinfraktionierung der Sojabohnenproteine basierte (siehe Thanh und Shibasaki 1976) und P34-bindende IgE-Antikörper aus Patientenseren benötigte, ist der hiermit beschriebene Prozess deutlich einfacher. Mit dem zuletzt genutzten Ein-Stufen-Elutionsprozess wurde der chromatographische Lauf für die Größte der ausprobierten Säulen auf ein Minimum von 200 Minuten reduziert mit einer durchschnittlichen

Ausbeute von 27 % für den Chromatographieteil und eine Ausbeute von 3 % für P34 ausgehend von der Sojabohne. Da ungefähr 88 % P34 schon während der Vorreinigung verloren gingen, ist hier Prozessoptimierung nötig.

Mit der hier vorgestellten Methode ist es möglich innerhalb kurzer Zeit ausreichende Mengen P34 für funktionelle Tests herzustellen. Und durch die stufenartige Veränderung der Elutionspufferbedingungen ist das Verfahren ebenfalls mit Spritzen und vorgepackten Säulen jederzeit einfach realisierbar. Der Vorteil des verwendeten HIC-Verfahrens ist die Nutzung wässriger Systeme, welche die Proteinstabilität gewährleisten.

5.2 P34 erreicht die intestinalen Epithelzellen *in vitro*

Damit ein Antigen überhaupt eine immunogene Wirkung haben kann, muss es das Darmepithel passieren, um die Zellen des Immunsystems zu erreichen. Das gilt ebenfalls für das hier besprochene Protein P34. Ob das Protein zum Auslösen von Immunreaktionen in seiner Struktur vollständig erhalten bleiben muss, ist ungeklärt (Fu 2002). Die Proteinlänge und die Struktur sind entscheidend (Mills et al. 2004, Kimber et al. 1999).

Auch für P34 stellt sich die Frage, ob es den Gastrointestinaltrakt bis zum Dünndarmepithel als intakter Nahrungsbestandteil passieren kann, um dort möglicherweise als gesamtes Protein absorbiert zu werden. Wie in Abbildung 17 (Abschnitt 4.2) gesehen, ist P34 nach dem *in vitro* Verdauungsprocedere nach Boisen (1991) und Miller et al. (1981) noch partiell mit seiner gesamten Molekülmasse vorhanden. P34 wurde mit einem monoklonalen Antikörper (F5) und einem P34-spezifischen Antikörperserum als ganzes Protein nachgewiesen. Es wurden auch Bruchstücke mit dem Antikörperserum detektiert (siehe Abbildung 17, dominantere Banden um 20 kDa). Diese weniger großen, aber dominanten Banden sind durch Weangripinaval et al. (2005) ebenfalls dargestellt worden: als Bruchstücke von P34 im Serum von Mäusen. Die Detektion erfolgte auch mit einem polyklonalen Antikörperserum. Diese 20 kDa Fragmente konnten vermutlich in der hier beschriebenen Arbeit nicht mit dem monoklonalen Antikörper F5 detektiert werden, weil Pepsin das Protein an der Bindungsstelle des Antikörpers gespalten hatte (siehe Abbildung 43). Der monoklonale Antikörper F5 bindet an den Aminosäuren 115-132 des Proteins (mit Dekapeptid, Hosoyama et al. 1996).

Da die physiologische Ähnlichkeit zwischen Mensch und Schwein auch für die Proteinverdauung gegeben ist (Fuller und Tome 2005), kann das hier verwendete *in vitro* Verdauungsmodell nach Boisen (Boisen 1991) nach Modifikation ebenfalls die Proteinverdauung für den Menschen abbilden. Es fehlen diesem Verdauungsmodell die Gallensalze, weshalb das Modell in dieser Arbeit um die Fettverdauung nach einem bekannten *in vitro* Verdauungsmodell (Miller et al. 1981) erweitert wurde. Die hier gewählten zwei Stunden für jeweils Magen- und Dünndarmabschnitt der Verdauung sind mit der physiologischen Situation übereinstimmend. So dauert die Magen-Dünndarm-Passage vier bis acht Stunden an. Die abschließende Verdauung findet für 24-48 Stunden im Kolon statt (Cummings et al. 2004).

Lipide und Emulgatoren *in vivo* und *in vitro* positiv beeinflusst, was auch mit dessen Lipophilie erklärt wurde (Weangscripina et al. 2005, 2006). Bei Hühnern wurde eine Mehrsekretion der Lipase und eine verminderte Ausschüttung von Trypsin und Chymotrypsin nach Aufnahme einer fettreichen Nahrung gefunden (Longland 1991). Trypsininhibitoren, die in Gemüse vorkommen (auch als *antinutritional factors* bezeichnet) setzen die Verdaulichkeit von Proteinen und die Verfügbarkeit der Aminosäuren herab (Gilani et al. 2005). Physiologische Mengen von Phosphatidylcholin, welches in der Lebensmittelindustrie als grenzflächenaktive Substanz eingesetzt und durch die Magenschleimhaut sekretiert wird, veränderten die Verdauung von α -Lactalbumin *in vitro* durch Verlangsamung der simulierten Verdauung im Magen (Moreno et al. 2005). Die Entstehung von Maillardprodukten bei der Lebensmittelverarbeitung kann ebenfalls die Proteinverdaulichkeit beeinflussen (Gilani et al. 2005). Die Eigenschaften der Proteine an sich verändern ebenfalls deren Verdaulichkeit; die Glykosylierung (Breiteneder und Radauer 2004) oder ein hoher Prolingehalt (zum Beispiel bei Gluten, siehe Hausch et al. 2002) behindern die Verdaubarkeit. Diese die Proteinverdaulichkeit beeinflussenden Faktoren haben zweierlei zur Folge: erstens ist die Aminosäureverfügbarkeit vermindert und zweitens ist es möglich, dass besonders stabile Nahrungsproteine den Dünndarm erreichen.

Ein *in vitro* Verdauungsmodell kann nicht alle *in vivo* Situationen abbilden. Viele Faktoren sind verändert, es fehlt zum Beispiel die Mikroflora, welche die Verdauungskapazität beeinflusst (siehe Ratcliffe 1991). Die Konsistenz des Speisebreis ist kaum nachstellbar und die schrittweise Abgabe des Speisebreis aus dem Magen an die duodenale Verdauung ebenso wenig (Savoie 1991). Dennoch, gerade weil das fein gemörserte „Sojamehl“ in den 50 mL Puffer permanent den Verdauungsenzymen ausgesetzt ist und trotzdem noch P34 gefunden werden kann, lässt dieses *in vitro* Modell die Vermutung zu, dass P34 im oberen Dünndarm als vollständiges Protein vorhanden ist oder große Bruchstücke davon noch existieren.

Während dieser Arbeit wurden Seren von Schweinen auf das Vorhandensein von P34-Antikörpern untersucht. Es wurden je nach Fütterungsprotokoll (siehe Abbildung 18, Abschnitt 4.3) Antikörper gegen das Protein gefunden. In einer Arbeit von Weangscripina und Kollegen (2005) konnte das ganze Protein P34 im Serum von Mäusen wieder gefunden werden, was die Autoren auch mit einer Passage des Proteins vorbei an den Bürstensaumenzymen der Enterozyten diskutierten. Die Menge der Antikörper im Serum der Schweine, die mit konventionell hergestelltem Futter (siehe 3.2.5.3) gefüttert wurden, war nicht so hoch wie die im Serum der Schweine, welche circa 100 Gramm Sojabohnen je Tag über einen längeren Zeitraum gefüttert bekamen. Die Tatsache, dass frisch geborene Ferkel keine maternalen Immunglobuline über die Plazenta erhalten, wie das beim Menschen möglich ist (Rothkötter et al. 2005), wurde mit diesem ELISA ebenfalls bestätigt. Beispiele für das Auffinden von Antikörpern gegen Sojabohnenproteine finden sich in der Literatur viele; zum Beispiel Bailey et al. (2004), Miller et al. (1994), Dreau et al. (1994), Bailey et al. (1993), Friesen et al. (1993) und Stokes et al. (1987). Das bedeutet wie hier postuliert, dass Proteine bzw. große Bruchstücke davon, die mögliche erkennbare Epitope enthalten, zu den Immunzellen gelangen. Solche Immunzellen könnten antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen

und Dendritische Zellen in der Lamina propria serosal des Villusepithels sein. Sollten M-Zellen das Antigen transportiert haben sind die Adressaten unprozessierter Antigene ebenfalls Dendritische Zellen und Makrophagen. In beiden Fällen kommen auch B-Zellen für die Antigenerkennung in Frage. Das absorptive Epithel kann P34 unprozessiert transportieren wie im Folgenden diskutiert wird (siehe Abschnitt 5.3) und in Abschnitt 1.1.1.4 dargestellt wurde. Schon Gardner (Gardner 1983, Gardner 1998) stellte fest, dass das Vorhandensein von Antikörpern gegen Nahrungsproteine oder deren Immunkomplexe im Blut vollständig gesunder Individuen den Hinweis darauf gibt, dass Proteine und Peptide davon durch das Darmepithel aufgenommen werden. Das geschieht trotz der gegebenen Epithelbarriere aus Bakterien, sIgA, Muzinen und den Enterozyten selbst (Oswald 2006).

5.3 P34 Endozytose in Enterozyten und Transzytose durch Enterozyten

5.3.1 Endozytosemechanismus für P34

Die Proteine, die resistent gegenüber der Verdauung durch Enzyme im Gastrointestinaltrakt sind, erreichen die Epithelzelloberfläche des Dünndarms. Epithelzellen bilden ein gut organisiertes einschichtiges Epithel aus polarisierten Enterozyten mit Sekretions-, Absorptions- und Ionentransportfunktion (Simons und Wandering-Ness 1990). Wie P34 in die Enterozyten der IPEC-J2 Zelllinie absorbiert wird, war von Interesse in dieser Arbeit. Von Weangsripinaval et al. (2006) wurde für P34 in Caco-2 Zellen die *Caveolae*- und Clathrinvesikel-vermittelte Endozytose vorgeschlagen. *Caveolae* und *Raft*-Endozytose lassen sich sehr gut von Clathrin-abhängiger und konstitutiver Pinozytose durch die Cholesterolsensitivität gegenüber Reagenzien wie Nystatin, Filipin und Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) unterscheiden (Nabi und Le 2003, Schuck und Simons 2004). *Caveolae* sind Caveolin-1-enthaltende Plasmamembraneinstülpungen reich an *Raft* Lipiden (Lamaze et al. 2001). Wegen des hohen Anteils an diesen *Raft* Lipiden sind *Caveolae* unlöslich in nichtionischen Detergenzien bei 4 °C (Pelkmans und Helenius 2002).

In dieser Arbeit wurden lysierte mit P34 inkubierte IPEC-J2 Zellen mit Hilfe der Dichtegradientenultrazentrifugation separiert. Mit solch einer Präparation lassen sich *Lipid Rafts* bzw. *Caveolae* anreichern (Nichols 2003). Die Glykolipid-*Rafts* können, unabhängig von dem Protein Caveolin-1, Invaginationen und Endozytose-kompetente Vesikel bilden, durch das Abschnüren mit Hilfe von Dynamin. Caveolin-1 aber stabilisiert die Plasmamembranassoziation der *Caveolae* (Le et al. 2002). Eine Funktion der *Lipid Rafts* ist es, Proteine aus- und einzuschließen. Dabei handelt es sich meist um Proteine mit einer Affinität zu den *Rafts* wie die Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteine (Simons und Toomre 2000). Caveolin-1 und Flotillin sind in der Präparation die positiven Marker für *Lipid Raft* Fraktionen und somit für das Vorhandensein von *Caveolae*. Flotillin-1 ist ein endosomales Protein Clathrin-unabhängiger Endozytose und kann eine Komponente von morphologisch definierten *Caveolae* in einigen Zellen sein (Bickel et al. 1997). Die Flotillin Proteine wurden durch ihre Unlöslichkeit in Triton X und ihrer Anwesenheit in den in Wasser hochtreibenden Fraktionen

als Bestandteile der *Lipid Rafts* betrachtet (Stuermer und Plattner 2005). Flotillin-1 ist aber auch in Zellen und Organismen, die für eine Caveolin-1-Markierung negativ sind, exprimiert (Glebov et al. 2006).

Auf dem in Abschnitt 4.4.2 (Abbildung 24) gezeigten Immunoblot ist P34 mit den Caveolin-1 und Flotillin enthaltenen Fraktionen eindeutig kolokalisiert. Die Vermutung liegt nahe, dass P34 über eine *Caveolae*-assoziierte Endozytose in die IPEC-J2 Zellen gelangt. Es ist aber nicht möglich zwischen Caveolin-1 tragenden oder anderen *Lipid Raft*-Vesikeln zu differenzieren. *Lipid Rafts* können Moleküle unabhängig von den *Caveolae* internalisieren (Lamaze et al. 2001) und die Lipidkomposition von *Caveolae* und *Lipid Rafts* ist gleich (Lisanti et al. 1993). Um die gewonnene Vermutung eines *Caveolae*-vermittelten Transports zu verifizieren, wurden IPEC-J2 Zellen mit M β CD und Nystatin behandelt und anschließend mit P34-FITC inkubiert. Die Proteinaufnahmefähigkeit der IPEC-J2 Zellen nach Cholesteroldepletion sollte geprüft werden. Das Mycotikum Nystatin bindet Cholesterin während M β CD die Zellen an Cholesterin verarmt (Simons und Toomre 2000, Le et al. 2002). Cholesterin ist wichtig für die Funktion eingestülpter *Caveolae* aber auch für die der *Caveolae*-abhängigen Endozytose (Parton et al. 1994). M β CD formt unlösliche Komplexe mit Cholesterin, was dessen Löslichkeit in Wasser erhöht und gehört zu den Cyclodextrinen - zyklische Oligomere der Glucose (Pitha et al. 1988, Ohtani et al. 1989). Wie in Abbildung 25 (Abschnitt 4.4.2) zu sehen ist, wurde die Aufnahme von P34 in die Epithelzelle durch M β CD zu etwa 44 % gehemmt. Die P34-FITC Aufnahme von mit Nystatin behandelten Zellen (nicht gezeigt) war wiederholt (im Vergleich zur Kontrolle) leicht erhöht. Cytospots solcher Zellen zeigen mehr intrazelluläre P34-FITC Anreicherungen (Abbildung 26). Da Nystatin auch den degradierenden Abbauweg (über Endosomen zu Lysosomen) für Makromoleküle im Endothel hemmt (Schnitzer et al. 1994), könnte mit Nystatin auf eine mögliche Anreicherung auch im Epithel geschlossen werden. Ausgeschlossen ist weiterhin auch nicht, dass es sich um ein Artefakt handelt, dass Nystatin an IPEC-J2 Zellen anders wirken könnte. Wie in Abbildung 26 zu sehen, waren auch in den Kontrollzellen in geringerem Umfang fluoreszierende Partikel zu finden.

Die intrazelluläre Anreicherung und Transzytose von P34 wurden durch M β CD um 40 % in Caco-2 Zellen vermindert. Nystatin im gleichen Zellmodell verminderte jedoch nur die intrazelluläre Anreicherung, nicht aber den Transport durch die Zellen (Weangsrinaval et al. 2006). Für die Transzytose von P34 bestätigte sich dieses Ergebnis für IPEC-J2 Zellen (siehe Abbildung 35), jedoch für M β CD nicht reproduzierbar. Die P34-Transzytose wurde durch eine M β CD-Behandlung durchschnittlich eher gehemmt und durch Nystatin eher verstärkt (siehe 4.4.4, Abbildung 35). Weitere Liganden dieses *Caveolae*-vermittelten Transports sind SV40 (*Simian Virus 40*) und Choleratoxin (Ctx). Sie werden in Caveolin-1 positive Kompartimente bzw. die Caveosomen transportiert (Nichols 2002, Pelkmans et al. 2001, Parton et al. 1994). Die *Caveolae* scheinen einen intrazellulären Weg unabhängig von dem der klassischen Endozytose zu nehmen. Einige Liganden *Caveolae*-vermittelter Endozytose jedoch können auch in endosomalen Kompartimenten gefunden werden, weshalb schwierig ist, weitere intrazelluläre Wege der *Caveolae*-Liganden zu interpretieren. Wichtig ist, dass dieser Endozytoseweg niedrige pH-Werte und Abbaukompartimente umgeht (Pelkmans und Helenius 2002). Die Transzytose von P34 (siehe Abbildung 34, Kapitel 4.2.5)

bestätigt das. M β CD und Nystatin veränderten den transepithelialen Widerstand der IPEC-J2 Zellen nach Cholesteroldepletion nicht. Das bestätigte ähnliche Befunde in MDCK-Zellen (Leyt et al. 2007).

Ein weiteres Indiz für die *Caveolae*-vermittelte Endozytose von P34 ergaben Immunfärbungen. Es konnte keine Kolo-kalisation des P34 mit dem Marker für frühe Endosomen EEA1 (Wilson et al. 2000) in IPEC-J2 Zellen gefunden werden. Liganden eines Transports Clathrin-bemantelter Vesikel werden in frühe Endosomen transportiert (Ivanov et al. 2004). Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild (siehe auch Abbildung 45, Abschnitt 6): nach Separation der *Lipid Raft*-Fraktionen ist P34 in Caveolin-1 und Flotillin-1-positiven Fraktionen (*Lipid Rafts*) angereichert. M β CD, was für die *Caveolae*-Formation wichtiges Cholesterol von der Zellmembran depletiert (siehe oben), hemmt die P34 Endozytose um ungefähr 44 %, während der Einfluss von Nystatin auf die P34-Endozytose hier fraglich ist. Da für P34 visuell keine Kolo-kalisation zu EEA1 nachgewiesen werden konnte, wird eine *Caveolae*-vermittelte Endozytose angenommen. Die Interpretation von Daten aus einer Behandlung mit cholesterolbindenden Substanzen für die funktionelle Rolle der *Lipid Rafts* ist schwierig, weil durch nicht mehr vorhandenes Cholesterol mehr Effekte auf die Zellphysiologie zu erwarten sind als das Umordnen der *Lipid Rafts* (Nichols 2003). Der weiterhin für *Caveolae* beschriebene Prozess der Potozytose kann auch nicht ausgeschlossen werden. Die Potozytose ist die direkte Diffusion kleiner Moleküle in das Zytoplasma nach Assoziation mit *Caveolae*-vermittelter Aufnahme ohne eine Membraninternalisierung (Kurzchalia und Parton 1999).

Interessanterweise konnten sehr selten größere granuläre Vesikel mit einer P34-Markierung gefunden werden (siehe Abbildung 33 c und d, Abschnitt 4.4). Für einzelne *Caveolae*-Vesikel sind die gefundenen Vesikel etwas zu groß. Diese sind in Darstellungen circa 100 nm im Durchschnitt groß (Vgl. Pelkmans und Helenius 2002, Nierene-pithelzellen). Eine Zusammenlagerung mehrerer *Caveolae* hatte in einer Veröffentlichung von Pelkmans und Kollegen eine Größe von 500 nm (siehe Pelkmans et al. 2001). Die in dieser Arbeit gefundenen Vesikel haben einen Durchmesser von 200-1000 nm. Sie könnten einer engen Zusammenlagerung mehrerer *Caveolae* zu dichten Caveosomen entsprechen.

Die unterschiedlichen Darstellungen von P34 in der Zelle in Abschnitt 4.4 (Immunfärbung auf ausgesäten Zellen, Abbildung 31, P34-FITC in Cytospots in Abbildung 26 und die intrazelluläre Verteilung von P34 in den elektronenmikroskopischen Abbildungen siehe Abbildung 33) lassen sich, was die intrazelluläre Verteilung von P34 anbelangt, nur anteilig zur Deckung bringen. Das Alter der Zellen variierte vermutlich und damit ihre Kapazität, P34 zu endozytieren (siehe auch Abschnitt 4.4.3). P34-FITC in Cytospots lässt den Schluss vieler vesikulärer Strukturen in den Zellen zu. Es kann der Transport durch Vesikel angenommen werden (siehe oben). Die eher einzeln verteilten Körnchen der Immunfärbung (Abbildung 31) könnten damit übereinstimmen, immerhin sind die Zellen anders als die Cytospots lang gezogen und konfluent gewachsen. In elektronenmikroskopischen Bildern allerdings deuten die gefundenen Vesikel ebenfalls auf das Vorhandensein von P34 angereicherten größeren Strukturen hin. Sie liegen im basolateralen Bereich der Zelle (Vgl. Abbildung 33, c und d). Die Verteilung anderer Markierungen ist eher gleichmäßig und vereinzelt (Abbildung 33, a und b). Die P34-Verteilung in den Einzelzellen ist unterschiedlich (Abbildung 26 und

Abbildung 33). Es existieren parallel Zellen, die viel Immunmarkierung enthalten genauso wie Zellen, in denen weniger P34 zu finden ist. Im Cytospot und auf dem Zellrasen können parallel viel mehr Zellen begutachtet werden als im Elektronenmikroskop, weshalb die gezeigten Abbildungen möglicherweise immer nur einen Ausschnitt der P34-Situation in der Zelle zeigen können.

5.3.2 Abhängigkeit der P34 Endozytose von der Zeit, der Konzentration und dem Alter der IPEC-J2 Zellen

Die Konzentrationsabhängigkeit der Proteinaufnahme in die Enterozyten der Zelllinie IPEC-J2 (siehe 4.4.3) und in MoDCs (siehe 4.6.1) wurde in dieser Arbeit ebenso untersucht wie die Abhängigkeit der Aufnahme von P34 in die Epithelzellen vom Zellalter/Differenzierungsstadium und der Zeit. Die P34-Endozytose genauso wie die P34-Oberflächenbindung in die bzw. an die IPEC-J2 Zelllinie war konzentrations- und zeitabhängig. Mit der Zeit war die P34-Endozytose sättigbar. Die Sättigung war jedoch mit der hier untersuchten Obergrenze von 24 h (150 µg/mL) noch nicht erreicht. Bis zu einer Konzentration von 500 µg P34/mL apikal war die Proteinendozytose linear. Bei der Inkubation mit doppelt soviel Protein stieg die Proteinaufnahme überproportional an. Es besteht die Möglichkeit einer Induktion der Aufnahme. Der für P34 propagierte *Caveolae*-vermittelte Transport ist ein induzierbarer Prozess, der durch den Liganden stimuliert werden kann (Mayor und Pagano 2007). In Caco-2 Zellen war eine Sättigung der P34 Aufnahme beim Inkubieren der Zellen mit 1000 µg Protein je Transwelleinsatz (2 mg/mL) nach acht Stunden zu sehen. Die P34 Aufnahme des intakten Proteins stieg ebenfalls konzentrationsabhängig (Weangsrinaval et al. 2006).

Makromoleküle können in Enterozyten ohne Rezeptor aufgenommen werden. Sie binden dann unspezifisch und werden endozytiert (Sanderson und Walker 1993). Auch für andere Nahrungsproteine ist die Aufnahme des vollständigen Proteins bekannt. Zum Beispiel wurde β -Lactoglobulin teilweise vollständig durch die Mukosa von adulten Ratten aufgenommen (Marcon-Genty et al. 1989). Sensibilisierte Ratten hatten schon zwei Minuten nach luminaler Gabe endozytierte Meerrettichperoxidase (HRP) in den Enterozyten und in der Lamina propria (Berin et al. 1997). FITC-markiertes Ovalbumin wurde zeitabhängig in Caco-2 Zellen aufgenommen und auch transportiert (Koda et al. 2003). Und Ziv und Bendayan (2000) konnten zeigen, dass luminales Insulin durch das endosomale Kompartiment von Epithelzellen transportiert wurde und die Zirkulation durch die basolaterale Membran nach fünf bis zehn Minuten erreichte. Lösliche Proteine können trotz der in 1.1.1.1 besprochenen Barrierefunktion des Epithels intakt in kleinen Mengen absorbiert werden. Zum Beispiel konnte im Serum von abgesetzten Ferkeln das Sojabohnenprotein β -Conglycinin gefunden werden (Bailey et al. 2004). Die unspezifische Aufnahme von kompletten, unverdauten Proteinen scheint ein langsamer aber stabiler Prozess in den Epithelzelllinien Caco-2 und HT29 zu sein und erfolgt durch Flüssigphasenpinozytose (So et al. 2000). Für P34 kann zusammenfassend die intrazelluläre Anreicherung bestätigt werden (siehe auch Zusammenfassung Abbildung 45 und Abschnitt 5.3.1). Es bindet im Gegensatz zu Fluoreszein-markiertem Ovalbumin (Koda et al. 2003) auch an die Enterozytenoberfläche bei 4 °C (Vergleich Abbildung 27-Abbildung 29, Abschnitt 4.4.3). Die Endozytose über *Caveolae* ist rezeptorvermittelt

(Snoeck et al. 2005). Albumin wird über einen Rezeptor in *Caveolae* transportiert (Conner und Schmid 2003). Das dimere Immunglobulin A kann die Internalisierung seines Rezeptors in *Raft*-Vesikel initiieren (Leyt et al. 2007). Ob P34 einen Rezeptor bindet (unspezifisch oder spezifisch) und welchen konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

In Bezug auf die Endozytose von P34 in Abhängigkeit vom Zellalter, ließ sich feststellen, dass IPEC-J2 Zellen an Tag 1 nach der Aussaat deutlich mehr Protein aufnehmen als an den Folgetagen (siehe Abbildung 30, Abschnitt 4.4.3). Bei IPEC-J2 Zellen lässt sich erst nach circa acht Tagen ein stabiler TEER-Wert messen (Rau et al. 2006). Die Konfluenz der Monolayer bzw. das Wachstumsstadium haben einen Einfluss auf die Proteinaufnahme von Enterozyten. Es scheint bei diesen Zellen kein Zusammenhang zwischen der durch den TEER-Wert bemessenen Dichte des Epithels und der Proteinendozytose zu bestehen. Es wurde ebenfalls eine höhere Oberflächenadsorption von P34-FITC an einen Tag alte Zellen festgestellt. Ein möglicher Grund für die erhöhte Endozytose von P34 in einen Tag alte Zellen könnte die wachstumsbedingte Mehraufnahme von Nährstoffen in die Zellen sein. Die erhöhte Oberflächenbindung von P34 resultierte eventuell daraus. Da bei IPEC-J2 Zellen auch eine Mukusschicht nachgewiesen wurde (Schierack et al. 2006), ist es möglich, dass diese bei differenzierten ausgewachsenen Zellen die P34-Oberflächenadsorption verringert.

Im Darm wird das Epithel der Villi alle drei bis vier Tage erneuert (Snoeck et al. 2005). Die Epithelzellen des Darmes differenzieren sich beim „Wandern“ von der Krypte zum Villus (Stadnyk 2002). Sie werden wie die anderen Zellen des Darmepithels aus proliferierenden Stammzellen in der Mitte der Krypten gebildet (Gebert et al. 2000, McCracken und Lorenz 2001). Bei Mäusen konnte festgestellt werden, dass die unreifen Zellen der Krypten mehr Protein aufnehmen als die reifen Zellen der Villi (Heyman et al. 1989). Das lässt sich einerseits mit dem enzymlosen Bürstensaum der Enterozyten der Krypten (Ahnen 1991) erklären und andererseits damit, dass die Komposition der apikalen Zelloberfläche von der Reife des Enterozyten abhängt. Makromoleküle binden bevorzugt an die Oberfläche unreiferer Zellen (Sanderson und Walker 1993). Unreife Zellen befinden sich auf der Darmoberfläche junger Säuger oder dann in der Darmwand, wenn durch zum Beispiel Enteropathie der Lebenszyklus der Enterozyten stark vermindert ist. Dort werden die Villusenterozyten zerstört und durch unreife Zellen der Krypten ersetzt. Es ist jedoch fraglich, ob der Zustand der Zellen auf den Kulturplatten mit den zellulären Verhältnissen *in vivo* vergleichbar ist.

5.3.3 Oberflächenbindung

Es wurde in dieser Arbeit weiterhin geprüft, ob P34 an die Oberfläche der Enterozyten aufgrund seiner Glykosylierung adsorbiert. Das Binden an die Oberfläche von Enterozyten bestimmt, ob ein Molekül die Zelle passiert oder degradiert wird (Sanderson und Walker 1993) und klärt die Bindung an bestimmte Rezeptoren. Das P34 ist nach dem in dieser Arbeit entwickelten Aufreinigungsverfahren glykosyliert (siehe Abschnitt 4.4.1, Abbildung 20). Es sollte die Oberflächenbindung des Proteins P34 an die Enterozyten kompetitiv durch die Monosaccharide, aus denen die Glykosylierung von P34 besteht, gehemmt werden. Die Oberflächenadsorption von P34 wurde mit Hilfe eines ELISA

detektiert oder mit dem FITC-markierten P34 durchflusszytometrisch überprüft (siehe Abschnitt 4.4.1). In beiden Testsystemen konnte keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob die Glykosylierung einen Einfluss auf die Bindung an die Epithelzelloberfläche hat (siehe Resultate, 4.4.1). Mit beiden Testsystemen kann auch nicht die Art (spezifisch / unspezifisch) der Oberflächenadsorption von P34 an IPEC-J2 Zellen differenziert werden. Die Reproduzierbarkeit der detektierten Oberflächenbindungen im ELISA war schwierig, da sie auch abhängig waren von der Menge noch fixierter Zellen. Wie auch immer, mit diesem Testsystem konnte die P34-Oberflächenadsorption an IPEC-J2 Zellen detektiert werden (Vergleich der Absorptionswerte mit und ohne P34, Abbildung 21). Die Inkubation der Zellen mit mehr Protein (50 µg P34/mL im Vergleich zu 10 µg/mL) schien eine höhere kompetitive Hemmung der P34 Oberflächenadsorption durch die Monosaccharide zu initiieren. Die Tatsache, dass die gemessene Oberflächenbindung von 50 µg/mL P34 im Vergleich zu 10 µg/mL nicht in einem fünffachen Absorptionssignal resultierte, könnte mit einer Sättigung der Zelloberfläche durch P34 zu erklären sein (Vergleich auch Abbildung 22, Abschnitt 4.4.1).

Glykosylierte Proteine werden einige hundertmal mehr aufgenommen als ihre unglykosylierten Äquivalente. Das gilt zum Beispiel für die Proteinaufnahme in MoDCs und wird mit der Anwesenheit eines Mannoserezeptors begründet. Dieser Rezeptor kann auch das Prozessieren glykosylierter Proteine durch antigenpräsentierende Zellen (APC) beschleunigen (Huby et al. 2000). Das in der Literaturübersicht (Abschnitt 1.2.2.1, Abbildung 5) beschriebene N-Glykan, welches auch für P34 angenommen werden kann (lediglich bestätigt ist die Zusammensetzung der Glykosylierung, Bando et al. 1996), besitzt Mannose- und Xylosemoleküle außen, während N-Acetylglukosaminmoleküle das Gerüst bilden und die Xylose dem Asparagin des Proteins nahe am Acetylglukosamingerüst bindet. Die Glykosylierung von P34 könnte so aussehen, dies wird durch die Verwendung der Peptid-N-Glykosidase A (PNGase A) für die Deglykosylierung bestätigt (Bando et al. 1996). Die PNGase A spaltet die α -1,3 verknüpfte Fukose nahe dem Proteingerüst ab (Tretter et al. 1991). Die PNGase F ist wirkungslos an P34, spaltete aber nicht fukosylierte N-Glykane von zum Beispiel Ovalbumin (nicht gezeigte Daten). Für die Mittelwerte der Oberflächenbindungssignale nach Koinkubation von 10 mM Xylose und Mannose mit 50 µg P34/mL könnte eine verminderte Adsorption für P34 an die Enterozytenoberfläche propagiert werden. Ihre mögliche Lage in der Glykosylierung könnte das erklären.

Zusammenfassend kann eine mögliche Oberflächenbindung für P34 über dessen Glykosylierung angenommen werden, jedoch nur zu einem geringen Anteil. Für die Immunogenität des Proteins hat die Glykosylierung vermutlich eine größere Bedeutung. Es gibt gegen glykosydische Seitenketten von Nicht-Säuger-Proteinen IgE-Antikörper (Aalberse und van Ree 1997). Auch für Gly m Bd 28K, ein anderes Sojabohnenprotein, ist die Glykosylierung entscheidend für die Antikörperbindung. Auf einem Immunoblot war keine IgE Bindung von Patientenseren für das deglykosylierte Protein zu finden (Hiemori et al. 2000). Das könnte aber auch mit einer veränderten Faltung und Abdeckung möglicher Epitope zu tun haben. Schon Bando und Kollegen haben darauf verwiesen, dass die Fukosylgruppe von P34 möglicherweise als Epitop reagieren kann und von den IgE der Seren sojabohnensensitiver Patienten erkannt wird (Bando et al. 1996).

P34 bindet aber auf jeden Fall an die Oberfläche der IPEC-J2 Zellen. Eine Bindung an *Lipid Rafts* in der Zellmembran wird vermutet. Diese wurde wie in Abbildung 25 (Abschnitt 4.4.2) durch M β CD gehemmt (siehe auch Diskussionsabschnitt 5.3.1). Ohne diese Adsorption wäre vermutlich auch die *Lipid Raft/Caveolae*-vermittelte Endozytose von P34 nicht möglich, welche in der hier vorgestellten Arbeit festgestellt wurde.

5.3.4 Transzytose

Polarisierte Epithelzellen unterscheiden sich von anderen Zellen durch die Fähigkeit, endozytierte Moleküle nicht nur in Richtung der Lysosomen zur Degradation, sondern aufgenommene Moleküle auch transzellulär zur anderen Zellseite zu transportieren (Mostov und Simister 1985).

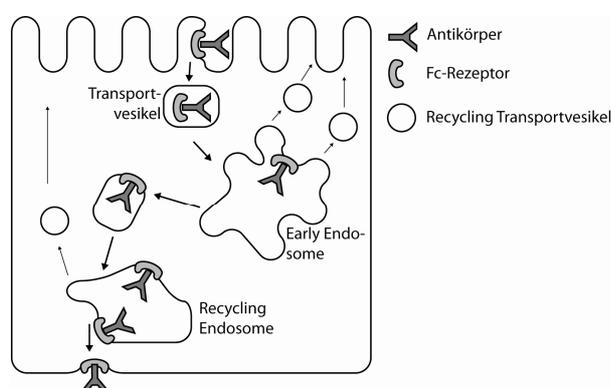


Abbildung 44: Beispiel für die Transzytose in einem polarisierten Enterozyten: Immunglobuline werden apikal mit ihrem Fc-Teil an den Fc-Rezeptor gebunden, Rezeptor und Ligand werden dann durch das endosomale Kompartiment auf die andere Seite der Zelle transportiert, der Rezeptor wird zurück transportiert (Abbildung übernommen aus Alberts et al. 2008).

Beispiele für die Transzytose sind bekannt (siehe auch Abschnitte der Einleitung 1.1.1.4 und 1.1.2): durch M-Zellen werden Antigene transportiert (z.B. Gebert et al. 1999), polymeres IgA wird durch Enterozyten von basolateral nach apikal transportiert (Rojas und Apodaca 2002) und die passive Immunität durch maternales IgG ist möglich, weil IgG über den neonatalen Fc-Rezeptor in die Enterozyten endozytiert wird (Tuma und Hubbard 2003). Die Sensibilisierung mit einem Antigen, steigert sogar dessen Transzytose durch das Darmepithel *in vivo* (Berin et al. 1997). In *in vitro* Epithelzellmodellen (MDCK und Caco-2) ist die Transzytose von Nahrungsproteinen ebenfalls beschrieben (Caillard und Tome 1995, Bomsel et al. 1989), wobei intaktes Protein eher wenig (um 5 %) und degradierte Produkte eher mehr gefunden wurden (20-25 %) (Caillard und Tome 1995). Heyman und Kollegen (Heyman et al. 1990) propagierten erstens einen direkten und zweitens einen lysosomalen Abbauweg für den Transport von Antigenen durch Enterozyten (siehe auch Snoeck et al. 2005). Der Allergentransport durch die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 ist unter anderem für 2 S Albumine des Sesams und der Paranuss (Moreno et al. 2005), Gliadin (Bodinier et al. 2007) sowie Ovalbumin (Koda et al. 2003) beschrieben.

Auch P34 passierte die im Transwell wachsenden IPEC-J2 Epithelzellen (siehe Abbildung 34 und Abbildung 35, Abschnitt 4.4.4). Der Vorteil kultivierter Zellen im Transwellssystem *in vitro* ist die Trennung der apikal und basolateral liegenden Komparti-

mente (Bomsel et al. 1989). Vor und nach Proteininkubation war der transepitheliale Widerstand (TEER) stabil, das Epithel also „dicht“. Ein aktiver Transport ist offensichtlich. Weangscripanaval und andere (2006) publizierten eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der P34 Transzytose in Caco-2 Zellen. Es wurden keine Bruchstücke im basolateralen Kompartiment des Transwellsystem gefunden (Weangscripanaval et al. 2006). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass es eine konzentrationsabhängige Transzytose für P34 durch intestinale Epithelzellen gibt (Abbildung 34) und keine Bruchstücke von P34 mit dem monoklonalen Antikörper F5 gefunden werden konnten. Die *Caveolae* spielen eine Rolle bei der endothelialen Transzytose (Henley et al. 1998, Schnitzer et al. 1994). Für P34 und Caco-2 Zellen ist eine Transzytosehemmung nach einer M β CD-Behandlung, nicht aber nach einer Nystatinbehandlung gefunden worden (Weangscripanaval et al. 2006). Wie schon in Abschnitt 5.2 diskutiert, hemmte M β CD vermutlich die Transzytose von P34 während Nystatin diese im Vergleich zur Kontrolle (Transzytose von P34 ohne Substanzbehandlung) leicht erhöhte. Diese Resultate sprechen möglicherweise für die Beteiligung von *Caveolae* an der P34-Transzytose.

5.4 Epitheliale Zytokine nach Inkubation mit P34

Die unspezifischen Abwehrmechanismen, die das Epithel zur Verfügung stellt, sind Muzin, Lysozym und der Transport von sekretorischem Immunglobulin A über den Immunglobulin-Rezeptor (Oswald 2006). Es kann aber auch Chemokine und Zytokine sekretieren, die Immunzellen wie Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten anlocken. Diese Zytokine haben eine wichtige Funktion bei der Entzündungsantwort und Immunität (Stadnyk 2002). Epithelzellen sekretieren verschiedenste Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, GM-CSF, TNF- α und TGF- β (McCracken und Lorenz 2001). Um herauszufinden, ob das Allergen P34 in IPEC-J2 Zellen nach Inkubation die Zytokinproduktion proinflammatorischer oder immunzellrekrutierender Zytokine stimuliert, wurde die Veränderung der mRNA-Transkriptmenge von IL-8, IL-6 und TGF- β überprüft. Das TGF- β gilt als Zytokin, welches Immunreaktionen unterdrückt. Durch den von TGF- β induzierten Immunglobulin-*switch* von IgM nach IgA in B-Zellen wird es als Mitinduktor von Toleranz gesehen (Strobel 2002, Mayer et al. 2001). Das Chemokin (*chemoattractent cytokine*) IL-8 rekrutiert und aktiviert polymorphnukleäre Leukozyten (Eckmann et al. 1993a). Das Zytokin IL-6 wird normalerweise reichlich im GALT exprimiert und hat zwei wichtige Funktionen, zum einen durch die Induktion der Sekretion von IgA und zum anderen die Bildung regulatorischer T-Zellen (Nagler-Anderson 2001). Die Reifung von DCs ist auch von Zytokinen wie IL-6 und TGF- β in der lokalen Umgebung abhängig (Banchererau et al. 2000).

Es wurde in dieser Arbeit eine von der P34 Inkubation abhängige Erhöhung der epithelialen IL-6 PCR-Produkte festgestellt (Vergleich Abbildung 36, Abschnitt 4.5). Nach einer Inkubation der Zellen mit mehr Protein wurde mehr PCR-Produkt gefunden. Hingegen schwankte die Menge der PCR-Produkte von IL-8 zwar im kleineren Proteinkonzentrationsbereich, die Veränderung der mRNA Mengen zeigte jedoch keinen von der P34 Konzentration abhängigen Trend (Abbildung 37). Keine Veränderung war für die TGF- β PCR-Produkte zu beobachten. Es war weder eine Veränderung der PCR-

Produkte von TGF- β mit und ohne Proteininkubation noch eine Veränderung der PCR-Produkte nach Inkubation mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen zu sehen (Abbildung 38). Im Unterschied zu humanen Zelllinien, wurde in den IPEC-J2 Zellen mRNA für das Zytokin IL-6 gefunden (Eckmann et al. 1993b). In dieser Arbeit wurde außerdem TGF- β mRNA in den IPEC-J2 Zellen detektiert im Gegensatz zu der Veröffentlichung von Schierack und Kollegen (Schierack et al. 2006). Die Zytokinsekretion von Enterozyten wurde meist im Zusammenhang von Bakterien untersucht. Epithelzellen erkennen bakterielle Produkte über *Toll-like*-Rezeptoren (Stokes et al. 2004). Zum Beispiel reagierte die IPEC-1 Epithelzelllinie aus dem Schwein mit einer Hochregulation der Zytokine IL-6 und IL-10 auf die Stimulation mit sekretierten Produkten von *Trichuris suis* (Parthasarathy und Mansfield 2005). Die in dieser Arbeit genutzten IPEC-J2 Zellen exprimierten signifikant mehr IL-8 nach einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* (Schierack et al. 2006). Caco-2 Zellen bildeten in einem *in vitro* Mehrzellensystem zusammen mit PBMC Kulturen nach Behandlung mit nicht-pathogenen *E.coli* oder *Lactobacillus sakei* die Zytokine IL-8, MCP-1, IL-1 β sowie TNF- α . Allein schienen die Epithelzellen hyporesponsiv, was darauf hindeutet, dass die Interaktion der Zellen an sich wichtig ist für deren Reaktionsfähigkeit (Haller et al. 2000). Die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF α stieg nach einer Infektion der Caco-2 Zellen mit ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*) stark an (Roselli et al. 2006). Nach einer Infektion von Schweinen mit dem Mycotoxin Fumonisin B₁ wurde eine Immunsuppression durch die Herunterregulation von IL-8 im Ileum beobachtet. Die Daten konnten mit den IPEC-1 Zellen *in vitro* bestätigt werden (Bouhet et al. 2006).

Das Absetzen von Ferkeln geht einher mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Dünndarm, pegelt sich aber ab Tag zwei wieder auf die Normalwerte zurück ein (Pie et al. 2004). Vermutlich ist die Zeit des Absetzens bei Schweinen korreliert mit entzündungsähnlichen Situationen im Darm (Stokes et al. 2004). Lokale Immunreaktionen und damit einhergehende morphologische Veränderungen der Darmwand werden zum Beispiel auch Sojamehl im Futter nach dem Absetzen (Pluske et al. 1997) vor allem aber der Umstellung des Futters generell zugeschrieben (Pie et al. 2004). Dennoch würde eine auf ein Nahrungsprotein mit proinflammatorischen Zytokinen „reagierende“ Epithelzelle im Darm eine permanente Entzündung induzieren, was für die Darmhomöostase kontraproduktiv ist.

Es ist jedoch bekannt, dass einige Patienten bei Nahrungsmittelintoleranz mit der erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α reagieren. Ein möglicher Zusammenhang mit der Stimulation anderer intestinaler Bakterien wird vermutet (Jacobsen et al. 2000, Seibold 2005). Das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 induzierte die Freisetzung von IL-6 und IL-8 über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) in pulmonären Epithelzellen (Kauffman et al. 2006, Asokanathan et al. 2002). Beide Zytokine ermöglichen dem inhalierten Allergen den Zugang zu unterhalb des Epithels liegenden Dendritischen Zellen (Asokanathan et al. 2002). Ob für P34 ähnliche Mechanismen angenommen werden können, da es einen Anstieg der epithelialen IL-6 mRNA induzierte, müsste getestet werden. Die Zellen könnten bei Untersuchungen in Kokulturmolekellen mit Dendritischen Zellen genutzt werden. Das Zytokin IL-6 würde möglicherweise nach P34 Inkubation die Reifung von Dendritischen Zellen induzieren (siehe

Banchereau et al. 2000). Trotzdem die IPEC-J2 Zellen keine MHC II-Oberflächenmoleküle exprimieren (Rau et al. 2006, Schierack et al. 2006), wären sie aufgrund ihrer Zytokinexpression an sich ein gutes Modell, um Interaktionen zu anderen Zellen zu untersuchen. Da die Zytokindaten semiquantitativ gemessen wurden, sind weitere quantitative Ergebnisse erforderlich. Ebenso sollte ein Proteinnachweis zur weiteren Charakterisierung der Immunreaktion durchgeführt werden.

5.5 Wirkung von P34 auf Immunzellen und antigenpräsentierende Zellen

Da P34 alle Eigenschaften potentieller Allergene wie Glykosylierung, Stabilität und Löslichkeit (Breiteneder und Mills 2005) hat und aus den zuvor diskutierten Ergebnissen klar ist, dass P34 das Epithel passiert und Immunzellen erreichen kann, sollte dessen immunmodulatorische Wirkung auf die Immunzellen des Schweines überprüft werden. Schweine entwickeln zwar keine Allergie, aber es kommt nach Sojafütterung bei Ferkeln zu vorübergehender Überempfindlichkeit (Li et al. 1990). Die Induktion dieser Überempfindlichkeit ist beim Schwein vergleichbar mit der Allergieentwicklung beim Menschen mit ähnlicher gastrointestinaler Symptomatik (Helm et al. 2003). Die für diese Arbeit verwendeten Zellen waren periphere Lymphozyten (PBMCs) und antigenpräsentierende Zellen, die MoDCs, aus dem Schwein.

5.5.1 Stoffwechselaktivität von PBMCs

Die PBMCs wurden aus dem Blut von Schweinen isoliert, die vermutlich P34 Antikörper hatten. Für die Blutabnahme wurden unterschiedliche Tiere verwendet. Die Ergebnisse des ELISA zeigten (siehe ELISA, Abbildung 18, Abschnitt 4.3), dass die drei Seren von verschiedenen Tieren auf P34-Antikörper positiv getestet wurden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch das Blut, aus denen die PBMCs isoliert worden sind, P34-Antikörper enthielt. Das wurde aber nicht explizit getestet. Wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, ließ sich mit Hilfe des MTT-Tests, einer Methode, die den metabolischen Umsatz mitochondrialer Enzyme bemisst, keine Stimulierbarkeit der PBMCs durch P34 unterschiedlicher Konzentration nachweisen. Im Gegensatz dazu reagierten die Zellen mit erhöhtem Stoffwechselumsatz auf das Mitogen Con A, was als Kontrollstimulanz eingesetzt wurde (siehe Cummings et al. 2004), bis zu einer Konzentration von zusätzlich 25 µg P34/Well (je 100 µL, siehe Abbildung 41).

In einer Studie von Li et al. (1990) wurden Schweine zwischen Tag 7 und 14 mit Sojabohnenmehl gefüttert und später die Lymphozyten aus deren Blut isoliert. Es kam ebenso nicht zu einer Proliferation der Zellen nach Inkubation mit Sojaprotein (2.5 und 5 µg/mL), was damit erklärt wurde, dass antigene Sojabohnenproteine keine zellvermittelten Immunantworten auslösen. Allerdings publizierten Dreau und Kollegen (Dreau et al. 1995a), dass Lymphozyten aus den mesenterialen Lymphknoten einen „Trend zur Proliferation“ zeigten, vor allem, wenn sie mit rohem Sojaproteinextrakt inkubiert wurden, was auf eine zelluläre und eine humorale Immunantwort hindeutete, die mit Sojabohnenüberempfindlichkeit assoziiert ist. Auch in der duodenalen Schleimhaut

liegende B- und T-Lymphozyten proliferierten bei Schweinen, die mit Sojabohnen gefüttert wurden (Dreau et al. 1995b). In einer anderen früheren Studie dieser Gruppe wurde keine Proliferation von systemischen und lokalen Lymphozyten auf Sojabohnenproteininkubation hin mit unter anderem inadäquater Proteinkonzentration (2.5 und 0.25 µg/mL) und der Tatsache begründet, dass Lymphozyten junger Schweine nicht proliferieren (Dreau et al. 1994).

Die Zellmischung der PBMCs beinhaltet Lymphozyten und ungefähr zehn Prozent Monozyten, welche antigenpräsentierende Zellen sind. Con A ist ein Mitogen, was vor allem T-Zellen stimuliert. Die Zellen proliferieren weit mehr in Antwort auf ein Mitogen, weil diese Art der Stimulation unspezifischer ist und an mehr Zellen adressiert ist als zum Beispiel die Stimulation durch ein Antigen. Diese ist spezifischer, es werden weniger Zellen angesprochen und proliferieren demnach (Cummings et al. 2004). Das könnte auch in dieser Arbeit der Grund dafür sein, dass die PBMC Kultur auf eine P34 Inkubation nicht mit erhöhtem Stoffwechselumsatz, dementsprechend auch nicht mit Proliferation reagiert hat.

5.5.2 Antigenendozytose und -präsentation durch MoDCs

Die MoDCs, welche in Anwesenheit der Zytokine IL-4 und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) *in vitro* kultiviert werden, gelten als Äquivalent zu unreifen Dendritischen Zellen (Soruri und Zwirner 2005). Dendritische Zellen (DCs) sind antigenpräsentierende Zellen, die die Gewebe als unreife Phagozyten erreichen und sich durch Aufnahme von Antigenen spezialisieren. Die Reifung von DCs (u. a. Antigenpräsentation) geht einher mit verminderter Endozytose und Phagozytose (Banchereau et al. 2000). Im Vergleich zu den IPEC-J2 Zellen war bei Dendritischen Zellen eine Sättigung der P34 Aufnahme bei einer Konzentration von 100 µg/mL nach Messung der Zellen im FACS zu sehen (siehe Abbildung 39, Abschnitt 4.6). Davor war die P34 Endozytose linear und konzentrationsabhängig. Die hier gesehene Obergrenze von 100 µg/mL könnte die Reifung und gestoppte Antigenaufnahme induziert haben. Unreife Dendritische Zellen nehmen Antigene über Makropinozytose, rezeptorvermittelt (C-Typ Lektinrezeptoren wie der Mannoserezeptor oder Fcγ-Rezeptoren Typ I und II) und Phagozytose auf (Banchereau et al. 2000). Da terminale Monosaccharide wie die Fukose, Mannose und N-Acetylglukosamin kaum in Serumproteinen von Säugern vorkommen, könnten diese wichtig für die Diskriminierung von „fremd“ und „eigen“ sein (Deslee et al. 2002). Möglicherweise wird P34 über den Mannoserezeptor in DCs aufgenommen.

Ein anderes Allergen, das Hausstaubmilbenallergen Der p 1, wurde zeit- und konzentrationsabhängig in humane MoDCs aufgenommen. Die Kurve der mittleren Fluoreszenzintensität der konzentrationsabhängigen Allergenaufnahme schien zwischen 30 und 50 µg/mL abzuflachen. Eine Obergrenze der Aufnahme wurde nicht gezeigt (Deslee et al. 2002). Von dendritischen Zellen aufgenommene Nahrungsantigene induzieren vermutlich Toleranz, da ihnen entzündungsfördernde Signale oder unter Pathogenen weit verbreitete Muster wie bakterielle Lipopolysaccharide (werden erkannt durch TLR und C-Typ Lektine) fehlen, welche die Reifung der DCs induzieren und kostimulatorische Moleküle hochregulieren könnten (Bilsborough und Viney 2004, Strobel 2001,

Banchereau et al. 2000). Bei der Präsentation von diesen Antigenen fehlt dann das kostimulierende Molekül wie CD40, CD80 und CD86 (Banchereau et al. 2000), was bei der Präsentation des Antigens über MHC II Moleküle die Bildung von T-Effektorzellen statt der von regulatorischen T-Zellen induzieren würde. Die Reifung der DCs nach Induktion durch verschiedene Stimuli geht einher mit der Hochregulation von kostimulierenden Molekülen (Banchereau et al. 2000). Im Darm hat die Toleranzinduktion eine besondere Bedeutung, da hier permanent zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien diskriminiert werden muss, um die Homöostase des Darmes zu gewährleisten (Bilsborough und Viney 2004, Harper et al. 1996). Geringe P34 Konzentrationen von 1 und 5 µg/mL konnten die Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD80/86, CD40 sowie die von MHC II bei MoDCs (aus PBMCs des Schweines generiert) nicht initiieren (D. Bimczok 2006, persönliche Kommunikation). Die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Standardantigens Ovalbumin war unverändert. Dieser Versuch könnte bestätigen, dass geringe Mengen Nahrungsantigen allein nicht unbedingt eine DC-Reifung verursachen (siehe oben). Ob eine Präsentation des Antigens stattfand, ist ungeklärt. Ähnliche Ergebnisse fanden Deslee und Kollegen für Der p 1 und humane MoDCs. Sie verglichen die „Reaktionen“ nach Der p 1 Stimulation von *in vitro* kultivierten Dendritischen Zellen von Hausstaubmilbenallergikern mit denen von Nicht-Allergikern und stellten insgesamt eine kaum veränderte Expression der Oberflächenmoleküle fest (Deslee et al. 2002). Auch dendritische Zellen agieren jedoch im Darm-immunsystem nicht allein. Die MoDCs sind erst in einem Kokultursystem mit Epithelzellen nach Inkubation mit Bakterien in der Lage durch Zytokinexpression Th1- und Th2-Antworten hervorzurufen, nicht aber, wenn sie allein mit den Überständen von mit Bakterien behandelten Epithelzellen inkubiert wurden (Rimoldi et al. 2005). Nach dem Kontakt zu Pathogenen sind es die Epithelzellen, welche Zytokine und Chemokine freisetzen, die dann die DC-Funktion kontrollieren (Rimoldi und Rescigno 2005).

6 Zusammenfassung

Viele Menschen sind von Nahrungsmittelallergien betroffen, vor allem Kinder. Eines der wichtigsten Nahrungsmittel, welches Allergien induziert, ist die Sojabohne. Durch ihre guten lebensmitteltechnischen Eigenschaften und die Aminosäurezusammensetzung wird die Sojabohne vielfältig in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt. Die Allergenität stellt deshalb ein Problem dar. Für die Allergieentstehung ist die Beschaffenheit des Allergens - in den meisten Fällen sind es besonders stabile Pflanzenproteine - am wichtigsten. Diese passieren das Verdauungssystem und gelangen in den Dünndarm, werden schnell vollständig aufgenommen und erreichen antigenpräsentierende Zellen und Immunzellen. In der hier vorgestellten Arbeit sollte geklärt werden, wie das Hauptallergen P34 der Sojabohne als Beispielantigen aus der Nahrung das Dünndarmepithel erreicht und passiert und ob es auf die verwendeten Immunzellen eine immunmodulatorische Wirkung hat. Das Protein P34 ist ein besonders interessantes Nahrungsantigen, weil es die Haupteigenschaften allergener Proteine vereinigt (siehe Abschnitt 1.2.2.1) und viele Fragen vor allem die bezüglich P34-induzierter Allergie noch unerforscht sind. Die Nutzung von Zellen aus dem Schwein ist sinnvoll, wegen der physiologischen Ähnlichkeit zwischen Mensch und Schwein (Rothkötter et al. 2005, Fuller und Tome 2005).

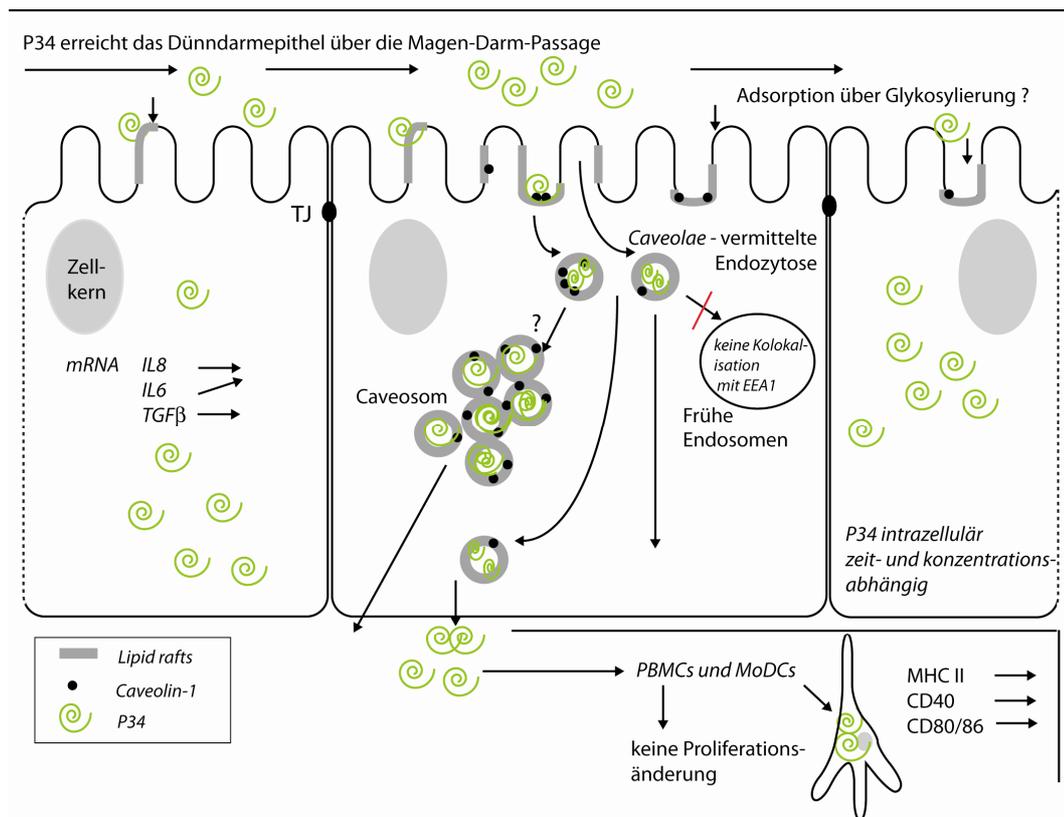


Abbildung 45: Zusammenfassung der Versuche aus dieser Arbeit und Schlussfolgerung. Es sind beispielhaft Enterozyten und eine DC dargestellt. P34 könnte die Enterozyten des Dünndarms erreichen, wird *Caveolae/Lipid Raft* vermittelt endozytiert und transportiert. Es wird angenommen, dass P34 so auch die DCs innerhalb der Lamina propria unter dem Villusepithel erreicht. In Einzelzellsystemen hatte P34 keinen Einfluss auf die Proliferation von PBMCs und die Oberflächenmolekülexpression von MoDCs.

Das Protein P34 konnte erfolgreich mit Hilfe der Hydrophoben Interaktionschromatographie aufgereinigt und für funktionelle Tests sowie die Herstellung eines polyklonalen Antikörperserums verwendet werden. Es konnte nach einem *in vitro* Verdauungsprozedere als ganzes Protein und 20 kDa große Bruchstücke wieder gefunden werden. Damit kann P34 die Dünndarmenterozyten erreichen. Es konnte herausgefunden werden, dass P34 an die Oberfläche der verwendeten Enterozytenzelllinie IPEC-J2 aus dem Schwein gebunden hat. Die Glykosylierung schien die Bindung nur bedingt zu initiieren. P34 gelangte über die *Caveolae* bzw. *Lipid Raft*-vermittelte Endozytose in die Zellen und wurde auch zur basolateralen Seite transportiert. P34 induzierte konzentrationsabhängig eine Hochregulation der epithelialen mRNA des proinflammatorischen Zytokins IL-6, während die gefundenen PCR-Produkte der Zytokine IL-8 und TGF- β nicht P34-abhängig verändert waren. Im Serum von Schweinen konnten P34-bindende Antikörper spezifisch mit einem ELISA nachgewiesen werden, was die aus den Resultaten gestützte Vermutung unterstreicht, dass P34 oder Bruchstücken davon das Blut und Immunzellen erreichen können. Aus dem Blut von Schweinen isolierte PBMC Kulturen jedoch reagierten nicht mit einer P34-spezifischen Veränderung der Stoffwechselaktivität. Die antigenpräsentierenden MoDCs endozytierten das Protein bis zu einer Grenze von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Eine veränderte Expression von Oberflächenmarkern wie CD40, CD80/86 und MHC II der MoDCs konnte bei Konzentrationen von 1 und 5 μg P34/ mL nicht nachgewiesen werden. Ob trotzdem eine Präsentation stattfand ist ungeklärt.

Die verwendeten *in vitro* Systeme sind artifiziell und nicht in der Lage physiologische Bedingungen abzubilden (Cummings et al. 2004, McCracken und Lorenz 2001). Einzelzellen kamen mit P34 in Kontakt. Dennoch bestätigen die P34-spezifischen Antikörper in den Schweineseren, dass auch *in vivo* der in dieser Arbeit gezeigte Transport von P34 stattfindet, der jedoch dort auch über M-Zellen geschehen kann (siehe 1.1.2). Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Transport für ein wichtiges Nahrungsallegen und Antigen auch bis zu absorptiven Enterozyten und durch sie hindurch möglich ist. Durch die Verwendung verschiedener Zell- und Testsysteme ist es in dieser Arbeit gelungen, den Weg des wichtigen Sojabohnenallergens P34 bis hin zu peripheren Immunzellen nachzustellen und zu beobachten.

Zukünftige Schritte könnten sich mit der Untersuchung von P34 und den Zellen des Darmimmunsystems beschäftigen. Ein Kokulturenmodell aus Epithelzellen und Dendritischen Zellen würde klären, ob ein Informationsaustausch zwischen den Zellen andere Immunreaktionen bei Dendritischen Zellen hervorrufen könnte. Außerdem wäre die Untersuchung möglicher zellulärer Rezeptoren interessant.

7 Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C. (2000): Structural biology of allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106, 228-238.
- Aalberse, R. C. und van Ree, R. (1997): Crossreactive carbohydrate determinants, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 15, 375-387.
- Ahnen, D. J. (1991): Protein Digestion and Assimilation, in Textbook of Gastroenterology (Herausgeber Yamada, T., Alpers, D. H., Owyang, C., Powell, D. W., Silverstein, F. E), 381-392 (Kapitel 19), J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Akira, S., Takeda, K., und Kaisho, T. (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nat. Immunol.*, 2, 675-680.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2008): Intracellular vesicular traffic, in Molecular Biology of the Cell, 749-812, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, USA and Abingdon, UK.
- Andersen, R., Nielsen, C. U., Begtrup, M., Jorgensen, F. S., Brodin, B., Frokjaer, S., und Steffansen, B. (2006): In vitro evaluation of N-methyl amide tripeptidomimetics as substrates for the human intestinal di-/tri-peptide transporter hPEPT1, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 28, 325-335.
- Arita, K., Babiker, E. E., Azakami, H., und Kato, A. (2001): Effect of chemical and genetic attachment of polysaccharides to proteins on the production of IgG and IgE, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2030-2036.
- Asokanathan, N., Graham, P. T., Stewart, D. J., Bakker, A. J., Eidne, K. A., Thompson, P. J., und Stewart, G. A. (2002): House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1, *J. Immunol.*, 169, 4572-4578.
- Astwood, J. D., Leach, J. N., und Fuchs, R. L. (1996): Stability of food allergens to digestion in vitro, *Nat. Biotechnol.*, 14, 1269-1273.
- Axelsson, I., Jakobsson, I., Lindberg, T., Polberger, S., Benediktsson, B., und Raiha, N. (1989): Macromolecular absorption in preterm and term infants, *Acta Paediatr. Scand.*, 78, 532-537.
- Babiker, E. E., Hiroyuki, A., Matsudomi, N., Iwata, H., Ogawa, T., Bando, N., und Kato, A. (1998): Effect of Polysaccharide Conjugation or Transglutaminase Treatment on the Allergenicity and Functional Properties of Soy Protein, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 866-871.
- Bailey, M., Haverson, K., Miller, B., Jones, P., Sola, I., Enjuanes, L., und Stokes, C. R. (2004): Effects of infection with transmissible gastroenteritis virus on concomitant immune responses to dietary and injected antigens, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11, 337-343.

- Bailey, M., Miller, B. G., Telemo, E., Stokes, C. R., und Bourne, F. J. (1993): Specific immunological unresponsiveness following active primary responses to proteins in the weaning diet of piglets, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 101, 266-271.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., und Palucka, K. (2000): Immunobiology of dendritic cells, *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 767-811.
- Bando, N., Tsuji, H., Yamanishi, R., Nio, N., und Ogawa, T. (1996): Identification of the glycosylation site of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 347-348.
- Berin, M. C., Kiliaan, A. J., Yang, P. C., Groot, J. A., Taminiau, J. A., und Perdue, M. H. (1997): Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction, *Gastroenterology*, 113, 856-864.
- Berot, S., Compoin, J. P., Larre, C., Malabat, C., und Gueguen, J. (2005): Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.), *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 818, 35-42.
- Berschneider, H. M. (1989): Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl, 9th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association.
- Bevilacqua, C., Montagnac, G., Benmerah, A., Candalh, C., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N., Perdue, M.H. und Heyman, M. (2004): Food Allergens Are Protected from Degradation during CD23-Mediated Transepithelial Transport, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 135, 108-116.
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., und Lodish, H. F. (1997): Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins, *J. Biol. Chem.*, 272, 13793-13802.
- Bilsborough, J. und Viney, J. L. (2004): Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease, *Gastroenterology*, 127, 300-309.
- Bimczok, D., Post, A., Tschernig, T., und Rothkötter, H. J. (2006): Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells, *Cell Tissue Res.*, 325, 461-468.
- Bischoff, S. (2006): Food Allergies, *Current Gastroenterology Reports*, 8, 374-382.
- Bischoff, S. und Crowe, S. E. (2004): Food allergy and the gastrointestinal tract, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 20, 156-161.
- Bodinier, M., Legoux, M. A., Pineau, F., Triballeau, S., Segain, J. P., Brossard, C., und Denery-Papini, S. (2007): Intestinal translocation capabilities of wheat allergens using the Caco-2 cell line, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4576-4583.
- Boisen, S. (1991): A Model for Feed Evaluation Based on In Vitro Digestible Dry Matter and Protein, in In vitro digestion for pig and poultry (Herausgeber M. F. Fuller), 135-146 (Kapitel 10), C. A. B. International, Wallingford UK.

- Bomssel, M., Prydz, K., Parton, R. G., Gruenberg, J., und Simons, K. (1989): Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells, *J. Cell Biol.*, 109, 3243-3258.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, St., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., und Oswald, P. (2004): The mycotoxin Fuminosin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells, *Toxicological Sciences*, 77, 165-171.
- Bouhet, S., Le Dorze, E., Peres, S., Fairbrother, J. M., und Oswald, I. P. (2006): Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies, *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1768-1773.
- Bouhet, S. und Oswald, I. P. (2005): The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108, 199-209.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brandtzaeg, P. E. (2002): Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 964, 13-45.
- Breiteneder, H. und Mills, E. N. (2005): Molecular properties of food allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 14-23.
- Breiteneder, H. und Radauer, C. (2004): A classification of plant food allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 821-830.
- Brown, D. A. und Rose, J. K. (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell*, 68, 533-544.
- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., und Nusrat, A. (2005): Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process, *FASEB J.*, 19, 923-933.
- Bruno, G., Giampietro, P. G., Del Guercio, M. J., Gallia, P., Giovannini, L., Lovati, C., Paolucci, P., Quaglio, L., Zorattoo, E., und Businco, L. (1997): Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study, *Pediatr. Allergy Immunol.*, 8, 190-193.
- Buning, J., Schmitz, M., Repenning, B., Ludwig, D., Schmidt, M. A., Strobel, S., und Zimmer, K. P. (2005): Interferon-gamma mediates antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes, *Eur. J. Immunol.*, 35, 831-842.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Thresher, W., Connaughton, C., Cockrell, G., und Helm, R. M. (1992): Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90, 889-897.
- Businco, L., Bruno, G., und Giampietro, P. G. (1998): Soy protein for the prevention and treatment of children with cow-milk allergy, *Am. J Clin. Nutr.*, 68, 1447S-1452S.

- Caillard, I. und Tome, D. (1995): Transport of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in enterocyte-like Caco-2 cells, *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 179-188.
- Calkhoven, P. G., Aalbers, M., Koshte, V. L., Pos, O., Oei, H. D., und Aalberse, R. C. (1987): Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross-reactive structures, *Allergy*, 42, 382-390.
- Cantani, A. und Lucenti, P. (1997): Natural history of soy allergy and/or intolerance in children, and clinical use of soy-protein formulas, *Pediatr. Allergy Immunol.*, 8, 59-74.
- Chabot, S., Wagner, J.S., Farrant, S. und Neutra, M.R. (2006): TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium, *J. Immunol.*, 176, 4275-83.
- Chambers, S. J., Wickham, M. S., Regoli, M., Bertelli, E., Gunning, P. A., und Nicoletti, C. (2004): Rapid in vivo transport of proteins from digested allergen across pre-sensitized gut, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 1258-1263.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y. und Germain, R.N. (2006): Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial TLR engagement, *J. Exp. Med.*, 203, 2841-52.
- Cloutier, M., Gingras, D., und Bendayan, M. (2006): Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa, *J. Histochem. Cytochem.*, 54, 781-794.
- Conner, S. D. und Schmid, S. L. (2003): Regulated portals of entry into the cell, *Nature*, 422, 37-44.
- Cossart, P. und Sansonetti, P. J. (2004): Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens, *Science*, 304, 242-248.
- Cummings, J. H., Antoine, J. M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., Gibson, G. R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijelaars, S., und Watzl, B. (2004): PASSCLAIM--gut health and immunity, *Eur. J. Nutr.*, 43 Suppl 2, II118-II173.
- Daniel, H. (2004): Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport, *Annu. Rev. Physiol.*, 66, 361-384.
- Danielsen, E. M. und Hansen, G. H. (2006): Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells, *Mol. Membr. Biol.*, 23, 71-79.
- Davis, P. J., Smales, C. M., und James, D. C. (2001): How can thermal processing modify the antigenicity of proteins?, *Allergy*, 56 Suppl 67, 56-60.
- Denizot, F. und Lang, R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, 89, 271-277.
- Deslee, G., Charbonnier, A. S., Hammad, H., Angyalosi, G., Tillie-Leblond, I., Mantovani, A., Tonnel, A. B., und Pestel, J. (2002): Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110, 763-770.

- Dreau, D., Lalles, J. P., LeJan, C., Toullec, R., und Salmon, H. (1995a): Hypersensitivity to soybean proteins in early weaned piglets: humoral and cellular components, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 371B, 865-869.
- Dreau, D., Lalles, J. P., Philouze-Rome, V., Toullec, R., und Salmon, H. (1994): Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs, *J. Anim. Sci.*, 72, 2090-2098.
- Dreau, D., Lalles, J. P., Toullec, R., und Salmon, H. (1995b): B and T lymphocytes are enhanced in the gut of piglets fed heat-treated soyabean proteins, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 47, 69-79.
- Ducroc, R., Heyman, M., Beaufriere, B., Morgat, J. L., und Desjeux, J. F. (1983): Horseradish peroxidase transport across rabbit jejunum and Peyer's patches in vitro, *Am. J. Physiol.*, 245, G54-G58.
- Eckmann, L., Jung, H. C., Schurer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblewska, E., und Kagnoff, M. F. (1993b): Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8, *Gastroenterology*, 105, 1689-1697.
- Eckmann, L., Kagnoff, M. F., und Fierer, J. (1993a): Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry, *Infect. Immun.*, 61, 4569-4574.
- Focke, M., Hemmer, W., Hayek, B., Gotz, M., und Jarisch, R. (1998): Identification of allergens in oilseed rape (*Brassica napus*) pollen, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 117, 105-112.
- Fotisch, K. und Vieths, S. (2001): N- und O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins, *Glycoconj. J.*, 18, 373-390.
- Foucard, T. und Malmheden, Y., I. (1999): A study on severe food reactions in Sweden - is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis?, *Allergy*, 54, 261-265.
- Friedman, M. und Brandon, D. L. (2001): Nutritional and health benefits of soy proteins, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1069-1086.
- Friesen, K. G., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., Blecha, F., Reddy, D. N., Reddy, P. G., und Kats, L. J. (1993): The effect of pre- and postweaning exposure to soybean meal on growth performance and on the immune response in the early-weaned pig, *J. Anim. Sci.*, 71, 2089-2098.
- Fromter, E. und Diamond, J. (1972): Route of passive ion permeation in epithelia, *Nat. New Biol.*, 235, 9-13.
- Fu, T. J. (2002): Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 964, 99-110.
- Fu, T. J., Abbott, U. R., und Hatzos, C. (2002): Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid - a comparative study, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7154-7160.
- Fuller, M. F. und Tome, D. (2005): In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals, *J. AOAC Int.*, 88, 923-934.

- Ganusov, V.V. und De Boer, R.J. (2007): Do most lymphocytes in humans really reside in the gut?, *Trends in Immunology*, 28, 514-518.
- Gardner, M. L. G. (1983): Evidence for, and implications of, passage of intact peptides across the intestinal mucosa, *Biochemical society transactions, Durham meeting*, 810-813.
- Gardner, M. L. G. (1998): Transmucosal passage of intact peptides, in Peptides in Mammalian Protein Metabolism (Herausgeber Grimble, G. K. und Backwell, F. R. C.), 11-29, Portland Press Ltd., London, UK.
- Gebert, A., Fassbender, S., Werner, K., und Weissferdt, A. (1999): The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts, *Am. J Pathol.*, 154, 1573-1582.
- Gebert, A., Göke, M., Rothkötter, H.-J., und Dietrich, C. F. (2000): Mechanismen der Antigenaufnahme im Dün- und Dickdarm: die Rolle der M-Zellen für die Initiierung von Immunantworten, *Z. Gastroenterol.*, 38, 855-872.
- Gebert, A., Steinmetz, I., Fassbender, S., und Wendlandt, K.-H. (2004): Antigen Transport into Peyer's Patches - Increased Uptake by Constant Numbers of M Cells, *Am. J Pathol.*, 164, 65-72.
- Gilani, G. S., Cockell, K. A., und Sepehr, E. (2005): Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods, *J. AOAC Int.*, 88, 967-987.
- Glebov, O. O., Bright, N. A., und Nichols, B. J. (2006): Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.*, 8, 46-54.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W. P., Pfeifer, A. M., Schiffrin, E. J., und Blum, S. (2000): Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures, *Gut*, 47, 79-87.
- Harper, H. M., Cochrane, L., und Williams, N. A. (1996): The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance, *Immunology*, 89, 449-456.
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M., und Khosla, C. (2002): Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, G996-G1003.
- Helm, R., Cockrell, G., Herman, E., Burks, A., Sampson, H., und Bannon, G. (1998): Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 117, 29-37.
- Helm, R. M. und Burks, A. W. (2002): Animal models of food allergy, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2, 541-546.
- Helm, R.M., Golden, C., McMahon, M., Thampi, P., Badger, T.M. und Nagarajan, S. (2007): Diet regulates the development of gut-associated lymphoid tissue in neonatal pigs, *Neonatology*, 91, 248-255.
- Helm, R. M., Ermel, R. W., und Frick, O. L. (2003): Nonmurine animal models of food allergy, *Environ. Health Perspect.*, 111, 239-244.

- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., und McNiven, M. A. (1998): Dynamamin-mediated internalization of caveolae, *J. Cell Biol.*, 141, 85-99.
- Herman, E. (1987): Immunogold-localization and synthesis of an oil-body membrane protein in developing soybean seeds, *Planta*, 172, 336-345.
- Herman, E., Helm, R. M., Jung, R., und Kinney, A. J. (2003): Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean, *Plant Physiol.*, 132, 36-43.
- Herman, E., Melroy, D. I., und Buckhout, T. J. (1990): Apparent Processing of a Soybean Oil Body Protein Accompanies the Onset of Oil Mobilization, *Plant Physiol.*, 94, 341-349.
- Hershberg, R. M. (2002): The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, G833-G839.
- Hershberg, R. M., Cho, D. H., Youakim, A., Bradley, M. B., Lee, J. S., Framson, P. E., und Nepom, G. T. (1998): Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells, *J. Clin. Invest.*, 102, 792-803.
- Hershberg, R. M. und Mayer, L. F. (2000): Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity, *Immunol. Today*, 21, 123-128.
- Heyman, M. (2005): Gut barrier dysfunction in food allergy, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 17, 1279-1285.
- Heyman, M. (2001): Symposium on 'dietary influences on mucosal immunity'. How dietary antigens access the mucosal immune system, *Proc. Nutr. Soc.*, 60, 419-426.
- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A. M., Corthier, G., Morgat, J. L., und Desjeux, J. F. (1986): Postnatal development of protein absorption in conventional and germ-free mice, *Am. J. Physiol.*, 251, G326-G331.
- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A. M., und Desjeux, J. F. (1989): Endocytosis and processing of protein by isolated villus and crypt cells of the mouse small intestine, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 9, 238-245.
- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A. M., Nath, S. K., und Desjeux, J. F. (1990): Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line Caco-2, *J. Cell Physiol.*, 143, 391-395.
- Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J. F., und Morgat, J. L. (1982): Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro, *Am. J. Physiol.*, 242, G558-G564.
- Hiemori, M., Bando, N., Ogawa, T., Shimada, H., Tsuji, H., Yamanishi, R., und Terao, J. (2000): Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28K, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122, 238-245.

- Hosoyama, H., Obata, A., Bando, N., Tsuji, H., und Ogawa, T. (1996): Epitope analysis of soybean major allergen Gly m Bd 30K recognized by the mouse monoclonal antibody using overlapping peptides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1181-1182.
- Huby, R. D., Dearman, R. J., und Kimber, I. (2000): Why are some proteins allergens?, *Toxicol. Sci.*, 55, 235-246.
- Ivanov, A. I., Nusrat, A., und Parkos, C. A. (2004): Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment, *Mol. Biol. Cell*, 15, 176-188.
- Jacobsen, M. B., Aukrust, P., Kittang, E., Muller, F., Ueland, T., Bratlie, J., Bjerkeli, V., und Vatn, M. H. (2000): Relation between food provocation and systemic immune activation in patients with food intolerance, *Lancet*, 356, 400-401.
- Ji, C., Boyd, C., Slaymaker, D., Okinaka, Y., Takeuchi, Y., Midland, S. L., Sims, J. J., Herman, E., und Keen, N. (1998): Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors, *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 95, 3306-3311.
- Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., und Kagnoff, M. F. (1995): A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion, *J. Clin. Invest.*, 95, 55-65.
- Jung, K., Ahn, K., und Chae, C. (2006): Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus, *Res. Vet. Sci.*, 81, 310-315.
- Kalinski, A., Melroy, D. I., Dwivedi, R. S., und Herman, E. (1992): A soybean vacuolar protein (P34) related to thiol proteases is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation, *J. Biol. Chem.*, 267, 12068-12076.
- Kalinski, A., Weisemann, J. M., Matthews, B. F., und Herman, E. (1990): Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteases of the papain family, *J. Biol. Chem.*, 265, 13843-13848.
- Kauffman, H. F., Tamm, M., Timmerman, J. A., und Borger, P. (2006): House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms, *Clin. Mol. Allergy*, 4, 5.
- Kim, H. R., Park, S. W., Cho, H. J., Chae, K. A., Sung, J. M., Kim, J. S., Landowski, C. P., Sun, D., Abd El-Aty, A. M., Amidon, G. L., und Shin, H. C. (2007): Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans, *Pharmacol. Res.*, 56, 224-236.
- Kimber, I., Kerkvliet, N. I., Taylor, S. L., Astwood, J. D., Sarlo, K., und Dearman, R. J. (1999): Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization, *Toxicol. Sci.*, 48, 157-162.

- Koda, T., Minami, H., Ogawa, T., Yamano, M., und Takeda, E. (2003): Higher concentrations of interferon-gamma enhances uptake and transport of dietary antigens by human intestinal cells: a study using cultured Caco-2 cells, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 49, 179-186.
- Komatsu, S., Kajiwara, H., und Hirano, H. (1992): Soybean seed 34k Da oil-body-associated protein separated by two-dimensional gel electrophoresis, *Plant Science*, 81, 21-27.
- Kraehenbuhl, J. P., Hopkins, S. A., Kerneis, S., und Pringault, E. (1997): Antigen sampling by epithelial tissues: implication for vaccine design, *Bebring Inst. Mitt.*, 98, 24-32.
- Kurzchalia, T. V. und Parton, R. G. (1999): Membrane microdomains and caveolae, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 424-431.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., und Dautry-Varsat, A. (2001): Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway, *Mol. Cell*, 7, 661-671.
- Laplace, J. P., Aumaitre, A., und Rerat, A. (2001): Forty years of achievement in French research on digestive physiology in the pig, *Reprod. Nutr. Dev.*, 41, 129-151.
- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y., und Nabi, I. R. (2002): Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, 277, 3371-3379.
- Lee, C. Y. und Scocca, J. R. (1972): A common structural unit in asparagine-oligosaccharides of several glycoproteins from different sources, *J. Biol. Chem.*, 247, 5753-5758.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E., und Reese, G. (1996): Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 553-564.
- Lewis, S. A., Berg, J. R., und Kleine, T. J. (1995): Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules, *Physiol. Rev.*, 75, 561-589.
- Leyt, J., Melamed-Book, N., Vaerman, J. P., Cohen, S., Weiss, A. M., und Aroeti, B. (2007): Cholesterol-sensitive modulation of transcytosis, *Mol. Biol. Cell*, 18, 2057-2071.
- Li, D. F., Nelssen, J. L., Reddy, P. G., Blecha, F., Hancock, J. D., Allee, G. L., Goodband, R. D., und Klemm, R. D. (1990): Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig, *J. Anim. Sci.*, 68, 1790-1799.
- Li, H., Nowak-Wegrzyn, A., Charlop-Powers, Z., Shreffler, W., Chehade, M., Thomas, S., Roda, G., Dahan, S., Sperber, K., und Berin, M. C. (2006): Transcytosis of IgE-antigen complexes by CD23a in human intestinal epithelial cells and its role in food allergy, *Gastroenterology*, 131, 47-58.

- Lisanti, M. P., Tang, Z. L., und Sargiacomo, M. (1993): Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae, *J. Cell Biol.*, 123, 595-604.
- Longland, A. C. (1991): Digestive Enzyme Activities in Pigs and Poultry, in *In vitro digestion for pig and poultry* (Herausgeber M. F. Fuller), 3-16 (Kapitel 2), C. A. B. International, Wallingford U. K..
- MacDonald, T. T. und Monteleone, G. (2005): Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut, *Science*, 307, 1920-1925.
- Machold, C., Deinhofer, K., Hahn, A. und Jungbauer, A. (2002): Hydrophobic interaction chromatography of proteins I. Comparison of selectivity, *Journal of Chromatography A*, 972, 3-19.
- Makala, L. H. C., Nishikawa, Y., Suzuki, N., und Nagasawa, H. (2004): Antigen presenting cells in the gut, *J. Biomed. Sci.*, 11, 130-141.
- Marcon-Genty, D., Tome, D., Kheroua, O., Dumontier, A. M., Heyman, M., und Desjeux, J. F. (1989): Transport of beta-lactoglobulin across rabbit ileum in vitro, *Am. J. Physiol.*, 256, G943-G948.
- Marsh, M. und McMahon, H. T. (1999): The structural era of endocytosis, *Science*, 285, 215-220.
- Mayer, L., Sperber, K., Chan, L., Child, J., und Toy, L. (2001): Oral tolerance to protein antigens, *Allergy*, 56 Suppl 67, 12-15.
- Mayor, S. und Pagano, R. E. (2007): Pathways of clathrin-independent endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 603-612.
- McCracken, B. A., Gaskins, H. R., Ruwe-Kaiser, P. J., Klasing, K. C., und Jewell, D. E. (1995): Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning, *J. Nutr.*, 125, 2838-2845.
- McCracken, V. J. und Lorenz, R. G. (2001): The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota, *Cellular Microbiology*, 3, 1-11.
- Miller, B. G., Whittemore, C. T., Stokes, C. R., und Telemo, E. (1994): The effect of delayed weaning on the development of oral tolerance to soya-bean protein in pigs, *Br. J. Nutr.*, 71, 615-625.
- Miller, D. D., Schrickler, B. R., Rasmussen, R. R., und Van Campen, D. (1981): An in vitro method for estimation of iron availability from meals, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2248-2256.
- Mills, E. N., Jenkins, J. A., Alcocer, M. J., und Shewry, P. R. (2004): Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 379-407.
- Mine, Y. und Zhang, J. W. (2003): Surfactants enhance the tight-junction permeability of food allergens in human intestinal epithelial Caco-2 cells, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 130, 135-142.

- Montagnac, G, Molla-Herman, A., Bouchet, J., Yu, L.C., Conrad, D.H., Perdue, M.H. und Benmerah, A. (2005): Intracellular trafficking of CD23: differential regulation in humans and mice by both extracellular and intracellular exons, *J. Immunol.*, 174, 5562-5572.
- Moreno, F. J., Mackie, A. R., und Mills, E. N. (2005): Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9810-9816.
- Mostov, K. E. und Simister, N. E. (1985): Transcytosis, *Cell*, 43, 389-390.
- Mowat, A. M. (2003): Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens, *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 331-341.
- Mullin, J. M. und Snock, K. V. (1990): Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability, *Cancer Res.*, 50, 2172-2176.
- Nabi, I. R. und Le, P. U. (2003): Caveolae/raft-dependent endocytosis, *J. Cell Biol.*, 161, 673-677.
- Nagler-Anderson, C. (2001): Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa, *Nat. Rev. Immunol.*, 1, 59-67.
- Neutra, M., Frey, A., und Kraehenbuhl, J. P. (1996): Epithelial M cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization, *Cell*, 86, 345-348.
- Neutra, M. R. und Kraehenbuhl, J. P. (2005): Cellular and Molecular Basis for Antigen Transport Across Epithelial Barriers, 3, 111-130.
- Neutra, M. R., Mantis, N. J., und Kraehenbuhl, J. P. (2001): Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues, *Nat. Immunol.*, 2, 1004-1009.
- Nichols, B. (2003): Caveosomes and endocytosis of lipid rafts, *J. Cell Sci.*, 116, 4707-4714.
- Nichols, B. J. (2002): A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex, *Nat. Cell Biol.*, 4, 374-378.
- Niedergang, F. und Kraehenbuhl, J. P. (2000): Much ado about M cells, *Trends Cell Biol.*, 10, 137-141.
- Niedergang, F. und Kweon, M. N. (2005): New trends in antigen uptake in the gut mucosa, *Trends Microbiol.*, 13, 485-490.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Okajima, H., Nishikawa, K., und Sasaoka, K. (1991): Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 37, 555-565.
- Ogawa, T., Samoto, M., und Takahashi, K. (2000): Soybean allergens and hypoallergenic soybean products, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 46, 271-279.

- Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamaru, K., Zhu, Y.-L., Hirano, H., und Nishikawa, K. (1993): Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1030-1033.
- Ogihara, H., Saito, H., Shin, B. C., Terado, T., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Inui, K., und Takata, K. (1996): Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 220, 848-852.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., und Pitha, J. (1989): Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes, *Eur. J. Biochem.*, 186, 17-22.
- Oswald, I. P. (2006): Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine, *Vet. Res.*, 37, 359-368.
- Owen, R. L., Apple, R. T., und Bhalla, D. K. (1986): Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes, *Anat. Rec.*, 216, 521-527.
- Pacha, J. (2000): Development of intestinal transport function in mammals, *Physiol. Rev.* 80, 1633-1667.
- Passarinha, L.A., Bonifacio, M.J., Soares-da-Silva, P. und Queiroz, J.A. (2008): A new approach on the purification of recombinant human soluble catechol-O-methyltransferase from an *Escherichia coli* extract using hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1177, 287-296
- Pappenheimer, J. R., Dahl, C. E., Karnovsky, M. L., und Maggio, J. E. (1994): Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 91, 1942-1945.
- Parthasarathy, G. und Mansfield, L. S. (2005): Trichuris suis excretory secretory products (ESP) elicit interleukin-6 (IL-6) and IL-10 secretion from intestinal epithelial cells (IPEC-1), *Vet. Parasitol.*, 131, 317-324.
- Parton, R. G., Joggerst, B., und Simons, K. (1994): Regulated internalization of caveolae, *J. Cell Biol.*, 127, 1199-1215.
- Parton, R. G. und Simons, K. (2007): The multiple faces of caveolae, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 185-194.
- Pelkmans, L. und Helenius, A. (2002): Endocytosis via caveolae, *Traffic*, 3, 311-320.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., und Helenius, A. (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER, *Nat. Cell Biol.*, 3, 473-483.
- Pie, S., Lalles, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Seve, B., und Oswald, I. P. (2004): Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets, *J. Nutr.*, 134, 641-647.

- Pitha, J., Irie, T., Sklar, P. B., und Nye, J. S. (1988): Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives, *Life Sci.*, 43, 493-502.
- Queiroz, J.A., Tomas, C.T. und Cabral, J.M.S. (2001): Hydrophobic interaction chromatography of proteins, *Journal of Biotechnology*, 87, 143-159
- Ratcliffe, B. (1991): The Role of Microflora in Digestion, in In vitro digestion for pig and poultry (Herausgeber M. F. Fuller), 19-34, C. A. B. International, Wallingford U. K..
- Rau, H., Bimczok, D., Post, A., Sewekow, E., und Rothkötter, H.-J. (2006): Morphological comparison of IPEC-1 and IPEC-J2 cells as model to study the barrier function of the intestinal epithelium, 23. *Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Dtl.*
- Rayon, C., Lerouge, P., und Faye, L. (1998): The protein N-glycosylation in plants, *Journal of Experimental Botany*, 49, 1463-1472.
- Rescigno, M., Rotta, G., Valzasina, B., und Ricciardi-Castagnoli, P. (2001a): Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers, *Immunobiology*, 204, 572-581.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., und Ricciardi-Castagnoli, P. (2001b): Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria, *Nat. Immunol.*, 2, 361-367.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Larghi, P., Vulcano, M., Allavena, P., und Rescigno, M. (2005): Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different, *Blood*, 106, 2818-2826.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Vulcano, M., Allavena, P., und Rescigno, M. (2004): Intestinal epithelial cells control dendritic cell function, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1029, 66-74.
- Rimoldi, M. und Rescigno, M. (2005): Uptake and presentation of orally administered antigens, *Vaccine*, 23, 1793-1796.
- Rivest, J., Bernier, J. F., und Pomar, C. (2000): A dynamic model of protein digestion in the small intestine of pigs, *J. Anim. Sci.*, 78, 328-340.
- Rojas, R. und Apodaca, G. (2002): Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 944-955.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., und Mengheri, E. (2006): Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, *Br. J. Nutr.*, 95, 1177-1184.
- Rothkötter, H.-J., Kirchhoff, T. und Pabst, R. (1994): Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs, *Gut*, 35, 1582-1589.

- Rothkötter, H. J., Sowa, E., und Pabst, R. (2005): The Pig as a Model for Developmental Immunotoxicology, in *Developmental Immunotoxicology* (Herausgeber Holladay, S.D.), 103-115, CRC Press LLC, London, UK.
- Rothkötter, H.-J., Möllhoff, S., und Pabst, R. (1999): The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs, *Scand. J. Immunol.*, 50, 31-38.
- Rytönen, J., Valkonen, K. H., Virtanen, V., Foxwell, R. A., Kyd, J. M., Cripps, A. W., und Karttunen, T. J. (2006): Enterocyte and M-cell transport of native and heat-denatured bovine beta-lactoglobulin: significance of heat denaturation, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1500-1507.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., und Rowland, I. (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *Br. J. Nutr.*, 80, S147-S171.
- Samoto, M., Takahashi, K., Fukuda, Y., Nakamura, S., und Kawamura, Y. (1996): Substantially complete removal of the 34kDa allergenic soybean protein, Gly m Bd 30 K, from soy milk of a mutant lacking the alpha- and alpha'-subunits of conglycinin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1911-1913.
- Sanderson, I. R. und Walker, W. A. (1993): Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update), *Gastroenterology*, 104, 622-639.
- Sangild, P. T. (2003): Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal, *Acta Vet. Scand. Suppl.*, 98, 105-122.
- Savoie, L. (1991): In Vitro Simulation of Protein Digestion: an Integrated Approach, in *In vitro digestion for pig and poultry* (Herausgeber M. F. Fuller): Kapitel 11, C. A. B. International, Wallingford UK.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., und Wieler, L. H. (2006): Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine, *Histochem. Cell Biol.*, 125, 293-305.
- Schneeman, B. O. (2002): Gastrointestinal physiology and functions, *Br. J. Nutr.*, 88, S159-S163.
- Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., und Allard, J. (1994): Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules, *J. Cell Biol.*, 127, 1217-1232.
- Schuck, S. und Simons, K. (2004): Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane, *J. Cell Sci.*, 117, 5955-5964.
- Seibold, F. (2005): Food-induced immune responses as origin of bowel disease?, *Digestion*, 71, 251-260.

- Shah, U. und Walker, W. A. (2002): Pathophysiology of intestinal food allergy, *Adv. Pediatr.*, 49, 299-316.
- Shao, L., Kamalu, O., und Mayer, L. (2005): Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk, *Immunological Reviews*, 206, 160-176.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.*, 68, 850-858.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000): Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 31-39.
- Simons, K. und Wandinger-Ness, A. (1990): Polarized sorting in epithelia, *Cell*, 62, 207-210.
- Snoeck, V., Goddeeris, B., und Cox, E. (2005): The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake, *Microbes. Infect.*, 7, 997-1004.
- So, A. L., Small, G., Sperber, K., Becker, K., Oei, E., Tyorkin, M., und Mayer, L. (2000): Factors affecting antigen uptake by human intestinal epithelial cell lines, *Dig. Dis. Sci.*, 45, 1130-1137.
- Soldati, T. und Schliwa, M. (2006): Powering membrane traffic in endocytosis and recycling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 897-908.
- Soruri, A. und Zwirner, J. (2005): Dendritic cells: limited potential in immunotherapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37, 241-245.
- Stadnyk, A. W. (2002): Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines, *Can. J. Gastroenterol.*, 16, 241-246.
- Stahlhut, M. und van Deurs, B. (2000): Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton, *Mol. Biol. Cell*, 11, 325-337.
- Stirling, C. M., Charleston, B., Takamatsu, H., Claypool, S., Lencer, W., Blumberg, R. S., und Wileman, T. E. (2005): Characterization of the porcine neonatal Fc receptor-potential use for trans-epithelial protein delivery, *Immunology*, 114, 542-553.
- Stokes, C. R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., Pié, S., Oswald, I. P., Williams, B. A., Akkermans, A. D. L., Sowa, E., Rothkötter, H.-J., und Miller, B. G. (2004): Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning, *Animal Research*, 53, 325-334.
- Stokes, C. R., Miller, B.G., Bailey, M., Wilson, A. D., und Bourne, F. J. (1987): The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 17, 413-423.
- Strobel, S. (2001): Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation, *Proc. Nutr. Soc.*, 60, 437-442.

- Strobel, S. (2002): Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 958, 47-58.
- Stuermer, C. A. und Plattner, H. (2005): The 'lipid raft' microdomain proteins reggie-1 and reggie-2 (flotillins) are scaffolds for protein interaction and signalling, *Biochem. Soc. Symp.*, (72), 109-118.
- Terpend, K., Boisgerault, F., Blaton, M. A., Desjeux, J. F., und Heyman, M. (1998): Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma, *Gut*, 42, 538-545.
- Thanh, V. H. und Shibasaki, K. (1976): Major proteins of soybean seeds: A straightforward fractionation and their characterization, *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1117-1121.
- Tretter, V., Altmann, F., und Marz, L. (1991): Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1---3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue, *Eur. J. Biochem.*, 199, 647-652.
- Tsuji, H., Okada, N., Yamanishi, R., Bando, N., Kimoto, M., und Ogawa, T. (1995): Measurement of Gly m Bd 30K, a major soybean allergen, in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 150-151.
- Tu, Y., Salim, S., Bourgeois, J., Di, L., V, Irvine, E. J., Marshall, J. K., und Perdue, M. H. (2005): CD23-mediated IgE transport across human intestinal epithelium: inhibition by blocking sites of translation or binding, *Gastroenterology*, 129, 928-940.
- Tuma, P. L. und Hubbard, A. L. (2003): Transcytosis: crossing cellular barriers, *Physiol. Rev.*, 83, 871-932.
- van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A. M., und Sandvig, K. (2003): Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean, *Trends Cell Biol.*, 13, 92-100.
- van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N., und Heyman, M. (2003): Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice, *Gut*, 52, 1690-1697.
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., und Raposo, G. (2006): Exosomes: a common pathway for a specialized function, *J. Biochem. (Tokyo)*, 140, 13-21.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., und Heyman, M. (2001): Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles, *Gastroenterology*, 121, 337-349.
- van Ree, R. (2002): Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 129, 189-197.

- van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J. P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L., und Lerouge, P. (2000): Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens, *J. Biol. Chem.*, 275, 11451-11458.
- Wang, S, Ng, L.H., Chow, W.L. und Lee, Y.K. (2008): Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines, *World J. Gastroenterol.*, 14, 1067-1076.
- Weangsripanaval, T., Moriyama, T., Kageura, T., Ogawa, T., und Kawada, T. (2005): Dietary Fat and an Exogenous Emulsifier Increase the Gastrointestinal Absorption of a Major Soybean Allergen, Gly m Bd 30K, in Mice, *J. Nutr.*, 135, 1738-1744.
- Weangsripanaval, T., Murota, K., Murakami, Y., Kominami, M., Kusudo, T., Moriyama, T., Ogawa, T., und Kawada, T. (2006): Sodium Cromoglycate Inhibits Absorption of the Major Soybean Allergen, Gly m Bd 30K, in Mice and Human Intestinal Caco-2 Cells, *J. Nutr.*, 136, 2874-2880.
- Wilson, J. M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B. H., Dotti, C. G., und Parton, R. G. (2000): EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts, *Mol. Biol. Cell*, 11, 2657-2671.
- Wilson, S., Blaschek, K., und de Mejia, E. (2005): Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity, *Nutr. Rev.*, 63, 47-58.
- Yang, P. C., Berin, M. C., Yu, L. C., Conrad, D. H., und Perdue, M. H. (2000): Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcepsilonRII), *J. Clin. Invest.*, 106, 879-886.
- Yu, L. C., Yang, P. C., Berin, M. C., Di, L., V, Conrad, D. H., McKay, D. M., Satoskar, A. R., und Perdue, M. H. (2001): Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4, *Gastroenterology*, 121, 370-381.
- Zaloga, G. P. und Siddiqui, R. A. (2004): Biologically active dietary peptides, *Mini. Rev. Med. Chem.*, 4, 815-821.
- Ziv, E. und Bendayan, M. (2000): Intestinal absorption of peptides through the enterocytes, *Microsc. Res. Tech.*, 49, 346-352.

III Anhang

1. Reagenzien und Puffer

Bradford (siehe 3.2.3.2):

Roti[®]Quant (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Blotten von SDS-Gelen (siehe 3.2.3.5):

Blotting Puffer (Bjerrum und Schafer-Nielsen)	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin (Roth, Karlsruhe, Dtl.) 1.3 mM SDS (Roth) 20 Vol.-% Methanol
TBS	50 mM Tris, pH 7.5 150 mM NaCl
TBST	TBS + 0.1 Vol.-% Tween [®] 20 (Serva, Heidelberg, Dtl.)
Stripping buffer	0.2 M Glycin 0.1 g/ 100 mL SDS (Roth) 1 Vol.-% Tween [®] 20 (Serva), pH 2.2

Dichtegradientenultrazentrifugation (siehe 3.2.5.1)

Lysispuffer	50 mM Hepes pH 7.4 oder Tris (AppliChem, Darmstadt, Dtl.) 100 mM NaCl (AppliChem) 3 % Brig 58 (Perbio-Science, Bonn, Dtl.) 1 mM PMSF (Sigma) 5 mM EDTA (Sigma) 1 mM Vanadate (Sigma) 50 mM NaF (Sigma) 10 mM Natriumpyrophosphat (Sigma)
Sucroselösung	80 %ige (Masseprozent) Stocklösung (Sucrose von Fluka) in MNE-Puffer, daraus Verdünnungen zu 30 Vol.-% und 5 Vol.-%
MNE-Puffer	25 mM MES (Fluka) pH 6.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl

Elektrophorese von PCR-Produkten (siehe 3.2.3.9)

TBE-Puffer	90 mM Tris/Base 90 mM Borsäure (Sigma) 0.5 M EDTA-Lösung (20 g NaOH, 186.12 g EDTA, pH 8 je Liter)
Ladepuffer	700 µl A. dest 300 µl Glycerin (Sigma, Steinheim, Dtl.) 250 µl Bromphenolblau (Xylene Cyanole Dye Solution, Sigma)

ELISA (siehe 3.2.5.3)

Beschichtungspuffer	PBS (Biochrom AG, Berlin, Dtl.)
Waschpuffer	PBS + 0.05 Vol.-% Tween®20 (Serva)

Kultur von IPEC-Zellen (siehe 3.2.2.1)

Zellmedium komplett	DMEM/HAMS-F12 (1:1) 5 vol% FCS 1 vol% Insulin-Transferrin-Selenium 16 mM HEPES (alles PAN Biotech, Aidenbach, Dtl.) 5 µg/L EGF (BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.)
Zellmedium serumfrei	ohne FCS siehe oben

Kultur und Herstellung von PBMCs (siehe 3.2.2.2)

Puffer	PBS + 0.03 % EDTA (Sigma)
Medium	RPMI inklusive Glutamin (PAN Biotech) 10 Vol.-% Schweineserum (Sigma, Steinheim, Dtl.) 50 µM Mercaptoethanol (PAN Biotech GmbH)

Kultur und Herstellung von MoDCs (siehe 3.2.2.3)

Waschpuffer	PBS + 0.03 % EDTA
MACS-Puffer	PBS + 0.03 % EDTA + 1 Vol.-% FCS
Medium	DMEM (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.) + 10 Vol.-% Schweineserum (Sigma, Steinheim, Dtl.)

Immunfärbung von Zellen (siehe 3.2.4.1 - 3.2.4.3)

Fixieren/Nachfixieren	4 Vol.-% PFA/ 0.02 Vol.-% GA in 0.1 M PB (pH 7.4)
Waschen	0.1 M PB
Permeabilisieren	0.2 Vol.-% Triton X-100 (Sigma) in 0.1 M PB
Blockieren	1 g/100 mL BSA in 0.1M PB
Vectastain® Elite® ABC Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	
DAB, Diaminobenzidin, Sigma Aldrich (Crailsheim, Deutschland)	
Eindeckmedium	Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) und Glycerol (Sigma, Steinheim, Dtl.) zu gleichen Teilen und 2 % DABCO
Cytospotfixierung	Methanol und Aceton zu gleichen Volumenanteilen
Waschpuffer	TBS + 0.05 Vol.-% Tween

MTT-Proliferationstest (siehe 3.2.5.2)

MTT (Sigma)	
Lysis-Puffer	0.01 M HCl (Roth) 10 g/100 mL SDS (Roth)
Zellmedium	RPMI incl. Glutamin (PAN Biotech, Aidenbach, Dtl.) 10 Vol.-% FCS (PAN Biotech) 50 µM Mercaptoethanol (PAN Biotech)

Nachweis der Glykosylierung (siehe 3.2.3.3):

Fixieren	70 Vol.-% Methanol 10 Vol.-% Eisessig 20 Vol.-% Aqua dest.
Inkubieren	Periodat (1 g/100 mL) 30 Vol.-% Eisessig 70 Vol.-% Aqua dest.
Schiff's Reagenz	Fertiglösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

P34 Aufreinigung (siehe 3.2.1)

Homogenisationspuffer	0.1 M Tris/HCl, pH 8.6
Waschpuffer	0.1 M Tris/HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.6
Waschpuffer	0.1 M Na ₂ CO ₃
Säulenbindungspuffer	1 M oder 0.6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ in 0.05 M PB, pH 6.5
Elutionspuffer	0.6, 0.4, 0.25 und 0.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ in 0.05 M PB, pH 6.5

RNA-Isolation mit Trizol (siehe 3.2.3.7)

Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.)
Chloroform (Roth, Karlsruhe, Dtl.)
Isopropylalkohol (Roth)
75 Vol.-% Ethanol (Roth)

SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3.4):

4-fach Ladepuffer	0.25 M Tris/Base, pH 6.8 40 Vol.-% Glycerin (87 %ig) (Sigma, Steinheim, Dtl.) 8 g/ 100 mL SDS (Roth, Karlsruhe, Dtl.) 20 Vol.-% β-Mercaptoethanol (Fluka, Basel, Schweiz) Bromphenolblau (0.08 g/100mL) (Serva, Heidelberg, Dtl.)
Acrylamidlösung	Rotiphorese 29:1 (Gebrauchslösung, Roth)
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat (10 g/100 mL) (Fluka)
Laemmli-Laufpuffer	0.25 M Tris/Base 2.5 M Glycin (Roth) SDS (1 g/100 mL) (Roth)

Gele:	Sammelgel (2 Gele)	Trenngel 10 % (2 Gele)
	0.83 mL Acrylamidlösung	3.3 mL Acrylamidlösung
	0.625 mL 1M Tris/HCl, pH 6.8	2.5 mL 1M Tris/HCl, pH 8.8
	3.5 mL H ₂ O dest.	4.1 mL H ₂ O dest.
	25 µL 20 g/100 mL SDS	50 µL 20 g/100 mL SDS
	15 µL TEMED	20 µL TEMED
	40 µL 10 g/100 mL APS	60 µL 10 g/100 mL APS
Coomassie-Färbelsg.	0.25 g/100 mL Coomassie Blue R250	
	45 Vol.-% Methanol	
	10 Vol.-% 100 %ige Essigsäure	
	45 Vol.-% Aqua dest.	
Entfärbelösung	30 Vol.-% Methanol	
	10 Vol.-% 100 %ige Essigsäure	
	60 Vol.-% Aqua dest.	

2. Filter für Fluoreszenzmikroskopie (*Axioplan 2, Zeiss*)

Tabelle 8: Verwendete Fluoreszenzfilter

Farbstoff	Anregung [nm]	Emission [nm]
DAPI	359-371	397
FITC	450-490	515-565
TexRed	540-522	690

3. Masse von P34

Während des Prozessierens werden von P34 Peptidstücken abgespalten: nach der Translation Pre- und Pro-Sequenz des Proteins (123 Aminosäuren) und ein weiteres Dekapeptid zeitgleich mit der Proteinmobilisierung beim Keimen der Samen (Herman et al. 1990, Kalinski et al. 1992, siehe auch Abbildung 3). Das Abspalten des Dekapeptides geschieht nach sechs Tagen Samenkeimung (siehe Kalinski et al. 1992). Während der Versuche wurde beobachtet, dass manchmal eine Doppelbande auftrat (siehe zum Beispiel Abbildung 11, Abschnitt 4.1.3). Auf einem Immunoblot war zu sehen, dass schon nach einem Tag, an dem die Sojabohne eingeweicht wurde, eine Doppelbande zu sehen ist. In Abbildung 46 ist leicht die Doppelbande bei der Beschriftung „1d“ (für: über Nacht eingeweichte Sojabohne) zu erkennen. Auch die massenspektrometrische Analyse (Abbildung 47) ergab, dass zwei P34-Varianten vorhanden sind (siehe Methode, Abschnitt 3.2.5.6).

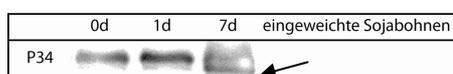


Abbildung 46: Immunoblot von unterschiedlich lange eingeweichten Sojabohnen (gar nicht eingeweicht „0d“, ein oder sieben Tage eingeweicht „1d“ und „7d“). P34 wurde aus den *oil bodies* nach der in 3.2.1.1 beschriebenen Methode (Vgl. Abb. 6 Zentrifugationsprotokoll) isoliert.

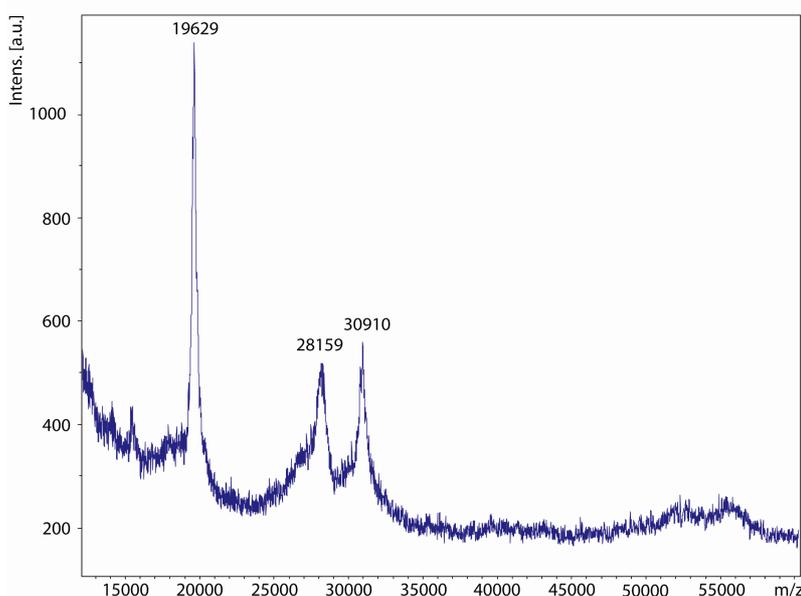


Abbildung 47: Dominante Massen einer P34-Präparation

Die kalkulierte Masse von P34 nach der Aminosäuresequenz ist 28643 Da (Informall database: <http://foodallergens.ifr.ac.uk/>). Die Masse des im SDS-Gel laufenden glykosylierten P34 war während aller Versuche circa 32 kDa. Die in Abbildung 47 Größere der beiden Massen ist 30910 Dalton. P34 ist nach dem Aufreinigungsprocedere (siehe Kapitel 4.2.1, Abbildung 20) noch glykosyliert, weshalb die hier auftretende größere Masse die des Proteins mit Glykosylierung sein könnte. Für die zweite auftretende Masse gibt es drei Möglichkeiten: entweder ist die Glykosylierung oder das Dekapeptid

abgespalten worden oder es hat ein anderer partieller Verdau stattgefunden. Die Daten in Abbildung 47 widersprechen nicht dem propagierten Abspalten des Dekapeptids nach dem Einweichen der Sojabohnen über Nacht (anders als in der Literatur beschrieben, siehe oben). Jedoch entspricht der hier bestimmte Massenunterschied von 2751 Dalton nicht dem Dekapeptid, was rechnerisch eine Masse von 1259 Dalton haben müsste (<http://rna.rega.kuleuven.ac.be/masspec/pepcalc.htm>, Peptide Mass Calculator 3.2).

4. Lagerung von P34

In diesem kurzen Absatz sollen nur Beobachtungen notiert werden. P34 wurde für ein Jahr zu unterschiedlichen Bedingungen in 0.1 M Natriumcarbonat (Puffer, in den das Protein aus den flotierenden *oil bodies* diffundiert) gelagert (Abbildung 48).

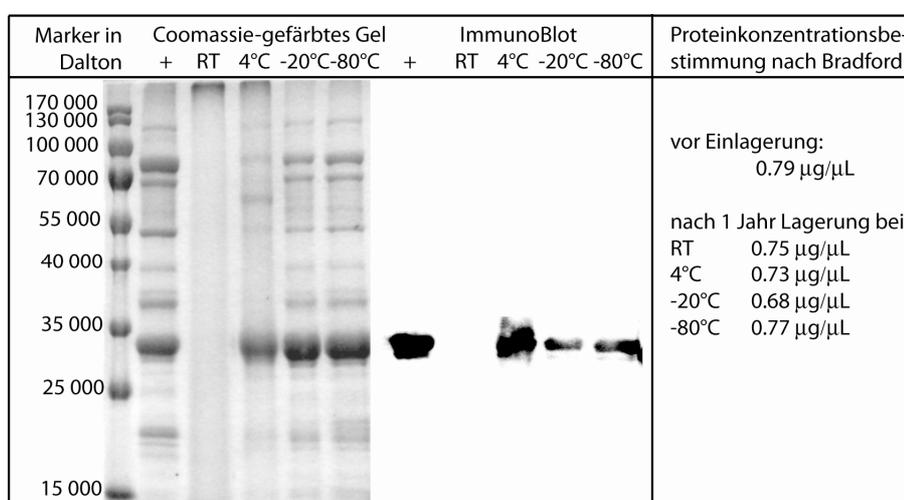


Abbildung 48: Die Abbildung zeigt den einjährigen Lagerungsversuch von P34 in Lösung in 0.1 M Natriumcarbonat. Gleiche Mengen Protein wurden auf das Gel aufgetragen und entweder Coomassie gefärbt oder auf Blotmembranen transferiert und mit F5 immungefärbt.

Es wurde regelmäßig die Proteinverteilung und die Proteinkonzentration gelagerter P34 Proben in PBS geprüft. Eine Lagerung bei -20 °C ist sinnvoll. Das P34 bleibt in Lösung stabil. Außerdem wurde beobachtet, dass die in 1 M Ammoniumsulfat dialysierte Proteinprobe für die Hydrophobe Interaktionschromatographie stabil hinsichtlich Proteinkonzentration und Proteinhaltbarkeit war.

IV Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr bei Herrn Professor Dr. Hermann-Josef Rothkötter bedanken, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat, der mir alle Freiheiten bezüglich dessen Bearbeitung ließ, mich unterstützte und die aufkommenden Fragen jederzeit mit mir diskutierte. Ich danke ihm außerdem für die Schaffung einer kreativen und angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich sehr bei Herrn Privatdozent Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) bedanken, der mir durch Ideen, kritische Anmerkungen und dem zur Verfügung stellen von Methoden während der gesamten Zeit geholfen hat. Mit ihm zusammen sowie mit der Hilfe von Frau Yvonne Ducho sind die Arbeiten entstanden, die den Endozytosemechanismus von P34 und dessen Masse betreffen.

Herrn Professor Dr. Seidel-Morgenstern und Herrn Christian Keßler (Max Planck Institut für die Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg) danke ich für die Hilfe mit der chromatographischen Aufreinigung des Proteins und insbesondere Christian Keßler für die spannende Aufsatzproduktion und die viele Zeit an der ÄKTA. In der Zusammenarbeit mit ihnen ist die Isolation von P34 möglich geworden.

Bei Frau Dr. Heidi Faber-Zuschratter (Institut für Anatomie) möchte ich mich für die Erstellung und Auswahl der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken und die viele Vorarbeit, die dafür nötig war.

Am anatomischen Institut gilt mein weiterer Dank der „alten“ Arbeitsgruppe, von der ich zwei Jahre profitiert, mit der ich diskutiert und eine schöne Zeit verbracht habe:

Frau Dr. Diane Bimczok, PhD. (für Deine zu bewundernde wissenschaftliche Leichtigkeit und Unermüdlichkeit und unser Inseltraining), Frau Henriette Rau, PhD (für unser Zimmer voller Visionen), Frau Dr. Jeannette Koch (für alle Biochemie und Arbeitsgruppenfürsorge) und Herrn Andreas Post (dafür, dass Du mir gezeigt hast, die Kontrollen genau zu wählen und hinzusehen) sowie Herrn Dr. Wolfgang D`Hanis (für die Einblicke in die Neurobiologiewelt sowie die Zeit an frischer Luft).

Ich danke weiterhin Frau Sandra Vorwerk, Frau Andrea Kröber, Frau Petra Wendler, Frau Susanne Schneider sowie Frau Brigitte Ketzler, Frau Sibylle Röhl und Frau Christine Gerlach für die viele Hilfe. Es war dank Ihnen und Euch eine produktive und kurzweilige Laborzeit.

Sandra Vorwerk, Petra Wendler und Susanne Schneider möchte ich noch einmal gesondert für die Bearbeitung meiner letzten Versuche danken!

Frau Wiegand danke ich für die Beschaffung der weit entlegenen Literatur.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Professor em. Dr. Bohnensack (Institut für Biochemie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg), der mir hilfreich bei Fragen zu endosomalen Vesikeln zur Seite stand.

Ich danke außerdem den Laboren von Herrn Professor Dr. Hoffmann (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie) und Herrn Professor Dr. König (Institut für Medizinische Mikrobiologie, beide Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) für die Möglichkeit, die Zentrifugen in ihren Laboren zu benutzen.

Weiterhin gilt mein Dank den Partnern des EU-Projektes „Feed for Pig Health“ (6. EU Rahmenprogramm) insbesondere Herrn Dr. Martin Kenny (University of Bristol, Bristol, UK) für sämtliche Diskussion und Interesse sowie die Schweineserenbeschaffung, Herrn Dr. Jean-Paul Lallès (INRA UMRVP, Saint-Gilles, France), Herrn Dr. Paul Bikker (Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands) und Herrn Dr. habil. Wolfgang Souffrant auch für die Beschaffung von Ferkelseren (FBN Dummerstorf, Dummerstorf, Dtl.).

Mein allerherzlichster Dank gilt meinen Eltern. Für Eure immerwährende Hilfe, Unterstützung, Motivation und Liebe kann ich nicht genug danken. Meiner geliebten Schwester danke ich dafür, dass sie da ist und immer da war, um Dein/mein/unsere Leben zu teilen.

Meinen Freunden danke ich oftmals für die unterschiedlichen Ansichten, Einsichten, Anregungen, Interessen und das Diskutieren all dieser Dinge - schlicht Euch. Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Nane, der ich für unsere gemeinsame Magdeburger Zeit danken möchte - die eineinhalb Sommer auf Balkonien - und alles was noch kommt.

Schließlich möchte ich von Herzen Ludwig danken! Deine Kritik, Deine Geduld, Deine konstruktiven Ideen, Dein immerwährendes Nachfragen haben mir sehr geholfen. Für alles andere, wofür ich Dir danke, reicht der Platz hier nicht aus.

Die Arbeit wurde unterstützt vom 6. EU-Rahmenprogramm „Feed for pig health“ (FOOD-CT-2004-506144).

V Lebenslauf

EVA SEWEKOW

geboren am 17. November 1980 in Berlin

Deutsch und ledig

BERUFLICHER WERDEGANG

07/ 2005- 03/2008 **Otto-von-Guericke Universität Magdeburg,**
 Medizinische Fakultät, Institut für Anatomie
 Stelle als Promotionsstudent
 Thema der Doktorarbeit: „Sojabohnenprotein P34: Aufrei-
 nigung, Verdauung und epithelialer Transport im enteralen
 Zellkulturmodell“

AUSBILDUNG

2002-2005 **Friedrich Schiller Universität Jena**
 Hauptstudium der Ernährungswissenschaften, Diplom 04/2005

06-11/2004 **Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich,**
 Laboratory of Human Nutrition, Institute of Food Science and
 Nutrition,
 Diplomarbeit „*In vitro* dialysability of elemental iron powders
 and ferrous sulphate“

2000-2002 **Justus Liebig Universität Gießen**
 Grundstudium der Oecotrophologie, Vordiplom 09/2002

1993-2000 **Büding Oberschule (Gymnasium), Berlin, Abitur 06/2000**

PUBLIKATIONEN

Sewekow, E., Keßler, L.C., Seidel-Morgenstern, A., Rothkötter, H.-J. (2008): Isolation of soybean protein P34 from oil bodies using hydrophobic interaction chromatography, *BMC Biotechnology*, 8, 27.

Bimczok, D., Rau, H., Sewekow, E., Janczyk, P., Kuhla, B., Souffrant, W.B., Rothkötter, H.-J. (2008): Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro, *Toxicology in vitro*, 22, 652-8.

Rothkötter, H.-J., Bimczok, D., Sewekow, E., Koch, J., Rau, H., Post, A., Bailey, M., Stokes, C.R. (2006): Development of the intestinal immune system and the response to dietary antigens, in *Nutrition and Immunity* (Herausgeber Mengheri, E., Roselli, M., Britti, M.S., Finamore, A.), Research Signpost, Kerala, India.

Rau, H., Bimczok, D., Post, A., Sewekow, E., Rothkötter, H.-J. (Sept. 2006): Morphological comparison of IPEC-1 and IPEC-J2 cells as model to study the barrier function of the intestinal epithelium, Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft Würzburg.