

# ZUSAMMENFASSUNG

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

von Dipl.-Biol. Anne-Kathrin Diesing

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion der porcinen intestinalen Barriere auf den Einfluss des Mykotoxins DON aus zellphysiologischer Sicht *in vitro* betrachtet. Als sensibelste Spezies gegenüber dem Getreide-kontaminierenden Mykotoxin gilt das Hausschwein, daher wurden die genetisch unveränderten, intestinalen porcinen Epithelzelllinien IPEC-1 und IPEC-J2 als polarisiertes *in vitro*-Enterozytenkulturmodell verwendet. *In vivo* trifft das im Nahrungsbrei enthaltene Mykotoxin im Gastrointestinaltrakt zuerst von der apikalen Seite auf die Enterozyten. Weiterhin sind diese dem Toxin von der basolateralen Zellseite ausgesetzt, da DON nach der schnellen Aufnahme in den oberen Darmabschnitten mit dem Blutstrom transportiert wird. Da die konventionelle Zellkultivierung auf impermeablem Untergrund der Modellierung der intestinalen Barriere nicht gerecht wurde, sind zur Annäherung an die Situation *in vivo* Membrankultureinsätze verwendet worden. Selbige gewährleisteten auf permeablem Untergrund eine physiologische Zellpolarisierung und gleichzeitig durch die Kompartimentierung eine Nährstoffversorgung von apikaler und basolateraler Zellseite. Damit wurde es möglich, das Toxin nicht nur von der apikalen, sondern auch von der basolateralen Zellseite zu applizieren. In der landwirtschaftlichen Praxis kommt es entweder zu akuten, durch hohe Toxin-Dosen verursachten Reaktionen oder zu chronischen Krankheitserscheinungen, die meist durch geringe DON-Dosen verursacht werden. So wurden auch in dieser Arbeit die beiden Konzentrationsrahmen unterschieden. Dabei wurde festgestellt, dass hohe DON-Konzentrationen (2000 ng/ml) toxische Effekte induzieren, wohingegen niedrige Konzentrationen (200 ng/ml) modulatorische Effekte auf die zelluläre Regulation haben. Das heißt, dass hohe DON-Konzentrationen durch typische Toxizität (Apoptoseinduktion) charakterisiert sind und zur Zerstörung der Integrität der intestinalen Barriere führen, was durch die Auflösung der Tight Junction-Struktur deutlich wurde. Niedrige DON-Konzentrationen wiesen dagegen keine mit den verwendeten Methoden detektierbaren toxischen Eigenschaften auf, sondern es wurde ein unerwarteter, hier erstmalig beschriebener, proliferativer Effekt auf Enterozyten detektiert. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Reaktion der jejunalen Zelllinie IPEC-J2 auf permeablem Untergrund dramatische Unterschiede aufweist, in Abhängigkeit von der Richtung der Toxin-Exposition. Bei gleicher DON-Konzentration war die basolaterale Seite der simulierten, intestinalen Barriere signifikant empfindlicher als ihr apikales Gegenstück. Das zeigte sich nach basolateraler Applikation besonders im Hinblick auf die zerstörte Tight Junction-Integrität und die damit verbundene, erhöhte Apoptoserate. Im Vergleich der beiden Kultivierungsbedingungen fiel auf, dass die apikale Applikation der hohen DON-Konzentration (2000 ng/ml) unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen hatte. Auf impermeablem Untergrund führte die hohe Toxinkonzentration zur Zerstörung des epithelialen Zellverbandes, wohingegen auf permeablem Untergrund kein sichtbarer zytotoxischer Effekt detektierbar war. Lediglich die basolaterale Gabe der gleichen DON-Konzentration führte zu der beschriebenen, gravierenden Zellschädigung. Nach den beobachteten DON-induzierten zellphysiologischen Effekten, sollte die Wirkung von gerichtet appliziertem DON auf molekularer Ebene in IPEC-J2-Zellen untersucht werden. Mittels Microarray und quantitativer Real-Time-PCR wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, welche die Stoffwechselwege aufzeigte, die von DON konzentrations- und richtungsabhängig reguliert werden (z.B. zellulärer Metabolismus, Informationsverarbeitung und Prozesse der Strukturproteine). Interessanterweise aktivierte die basolaterale Applikation der niedrigen DON-Konzentration (200 ng/ml) zehnmal mehr Transkripte, als die apikale Gabe der gleichen Konzentration (2539 gegenüber 267), obwohl die Zellverbände beider Behandlungsgruppen optisch und analytisch intakt waren (TEER). Im Gegensatz zu den Zellen, die die hohe DON-Konzentration von der basolateralen Seite erhielten, blieb die Tight Junction-Integrität auch bei der Gruppe mit hoher, apikaler DON-Behandlung intakt. Letztere zeigte aber fast sechsmal so viel veränderte Transkripte, als die mit hoher Konzentration und von basolateral DON-behandelte Gruppe (3589 und 669). Die Ergebnisse verdeutlichten noch einmal, dass die gerichtete DON-Applikation, von apikaler oder basolateraler Seite, gänzlich verschiedene Genantworten nach sich zieht und damit die zelluläre Homöostase unterschiedlich stark beeinflusst.

## SUMMARY

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

*by Dipl.-Biol. Anne-Kathrin Diesing*

The aim of the present work was to investigate the physiological cellular reaction of the porcine intestinal barrier on the effects of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) *in vitro*. Pigs appear to be the most sensitive species against the Fusarium-derived, cereal-contaminating mycotoxin. This was the reason for choosing the non-transformed intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2 as polarised enterocyte *in vitro* model system. *In vivo*, the mycotoxin containing feed enters the gastrointestinal system and faces the enterocytes from the mucus protected luminal site (apical exposure). Furthermore, the enterocytes are exposed to the mycotoxin from the basolateral site, as DON is absorbed in proximal intestinal sections and transported via the bloodstream to the enterocytes. The conventional cell culture on impermeable supports was used to analyse first cellular reactions on DON application, but did not fit to the demands of the intestinal barrier model. Thus, membrane culture inserts were used for mimicking the situation *in vivo*. On permeable supports the cells were permitted to form the physiological polarisation accompanied by a nutritional supply from apical and basolateral site due to the compartmentalisation. That made it possible to apply the mycotoxin not only from apical but also from the basolateral cell site. In agricultural practise, clinical symptoms in pigs occur either due to high, mostly acute, DON intoxication (vomiting) or, more frequently, due to low but chronic DON ingestion (depression of weight gain). In this work too, both DON concentration ranges were applied, resulting in the finding that high DON concentrations (2000 ng/ml) induce toxic effects, whereas low DON concentrations (200 ng/ml) modulate cellular regulation. High DON concentrations are characterised by typical cytotoxic features such as induction of apoptosis and impairment of the intestinal barrier integrity (disintegration of tight junction structure). Low DON concentrations did not lead to measurable cellular toxicity, but an unexpected, here firstly described proliferative effect on enterocytes was detected. Moreover, this work elucidates that the reaction of the jejunal cell line IPEC-J2 on permeable supports show dramatic differences depending on the direction of toxin exposure. The basolateral site of the stimulated intestinal barrier was significantly more sensitive towards the application of the high DON concentration than their apical counterpart. This was especially apparent in the destroyed tight junction integrity and the linked increase of apoptosis upon basolateral DON application. The comparison of both cell culture techniques gives evidence that the apical application of the high DON concentration leads to different cellular effects. On impermeable supports the high concentration damages the epithelial cell layer, whereas on permeable supports no cytotoxic effect was detectable. Only the basolateral challenge with the same DON concentration resulted in the described dramatic cellular damage. After the observed DON-induced physiological effects on IPEC-J2 cells, the mechanism of site-directed DON application was to be examined on molecular level in this cell line. The gene expression analysis was carried out using microarrays and quantitative real time PCR to elucidate biological pathways, which are regulated by DON dependent on concentration and direction (e.g. cellular metabolism, information processing and cellular processes). Interestingly, the basolateral application of the low DON concentration (200 ng/ml) triggered ten times more genes, than the apical challenge of the same concentration (2539 versus 267), despite the visual and analytical intactness (TEER) of both cell layers. In contrast to those cells exposed to the high DON concentration from basolateral site, the junctional integrity stayed intact in the group of high apical DON dosage. But the latter showed almost six times more changed transcripts as the high basolateral DON challenged group (3589 versus 669). These results underline the strikingly different cellular reactions on gene expression level and cellular homeostasis after site-directed DON application either from apical or basolateral site.