

Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Isolation und Charakterisierung von intestinalen Epithelzellen aus dem Schwein mit unterschiedlichen Methoden gezeigt. Die Etablierung einer intestinalen Epithelzelllinie aus den primären Enterozyten konnte aufgrund der geringen Zellzahl nicht realisiert werden. Die Ergebnisse wurden mit Untersuchungen bezüglich zweier intestinaler Epithelzelllinien (IPEC-1 und IPEC-J2) verglichen. Es konnte der intestinale Ursprung, aber auch die Nicht-Transformation und der nicht karzinogene Ursprung beider Zelllinien durch Chromosomenzahlbestimmung und einem Wachstumsversuch im Softagar belegt werden. Um Aussagen bezüglich des Vergleiches beider Zelllinien treffen zu können, wurden wichtige Gene aus dem Bereich des Zellzyklus, der Differenzierung und des Metabolismus auf mRNA-Ebene untersucht. Hierbei ergab sich ein 300-fach erhöhtes p53-mRNA-Level für IPEC-J2.

Parallel wurde eine neue Kultivierungsmethode für Enterozyten als wichtiger Bestandteil der intestinalen Barriere entwickelt. Bei der Air-Liquid Interface Kultur wird die Schichtdicke des apikalen Mediums auf ein Minimum reduziert, wodurch die Sauerstoffversorgung der Zellen entscheidend verbessert wird. Mit dieser Methode konnte eine morphologische und funktionelle Annäherung der Zelllinien an die *in vivo*-Situation erreicht werden. Die Schichtdicke, Zellzahl pro Fläche, Zellkernfläche, Zellfläche und das Zellkern-Zell-Verhältnis wurden hierfür untersucht. Die funktionellen Eigenschaften wurden durch die Aufnahme des Modell-Proteins BSA analysiert. Eine Aufnahme des Modellproteins BSA konnte nur in den ALI-Kulturen gezeigt werden, während in den anderen Systemen lediglich eine apikale Anlagerung beobachtet werden konnte (Nossol et al., 2011). Im nächsten Schritt wurde die Expression wichtiger Gene des Bürstensaumes, des Energiestoffwechsels und des Zytoskeletts auf mRNA-Ebene und Proteinebene untersucht. Villin konnte auf Proteinebene nur in den ALI-Kulturen nachgewiesen werden. GAPDH hingegen zeigte eine Abnahme in den ALI-Kulturen. Dies gibt den Hinweis, dass es durch die verbesserte Sauerstoffversorgung in den ALI-Kulturen zu Veränderungen im Stoffwechsel gekommen ist. Die Expression und Struktur der Tight Junctions wurde durch PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzen erfasst. ZO-1, Occludin, Claudin-3 und Claudin-4 konnten in allen Kulturen nachgewiesen werden. Nicht nur die Ausbildung intakter Tight Junctions zählen zu den wichtigen Merkmalen eines differenzierten Monolayers sondern auch die Abnahme der Proliferation der Enterozyten. So konnte eine Abnahme der Proliferation, welche mittels BrdU-Einbau untersucht wurde, in folgender Reihenfolge: impermeabler Untergrund > permeabler Untergrund > ALI-Kultur verzeichnet werden.

In einem weiteren Schritt wurde das Membrankulturmodell mit der zellulären Komponente der MoDCs ergänzt. Dendritische Zellen, als antigenpräsentierende Zellen, spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. Ein wichtiges Merkmal einer intakten Barriere *in vivo* ist der Kontakt der DCs zur Basalmembran (hier permeabler Untergrund). Dies konnte durch die inverse Aussaat der Epithelzellen realisiert werden. Die Entsendung von Fortsätzen in die Poren konnte sowohl für die DCs als auch für die Epithelzellen nachgewiesen werden.

Summary

In this study the isolation and characterisation of porcine intestinal epithelial cells was shown with different methods. The study was extended with an analysis of two established cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. These cell lines are non-transformed and not tumor derived. The intestinal, non-transformed and non-carcinogenic nature of these cell lines was documented by the quantification of the number of chromosomes and the growth in soft agar. For the comparison of both cell lines important genes of the cell cycle, differentiation and metabolism was analysed on the mRNA-level. A 300-fold up regulation of p53 was found in IPEC-J2. P53 was chosen as central gene to discuss the differences between the cell lines IPEC-1/IPEC-J2.

At the same time a new culture method was developed to study intestinal epithelial cells as an important component of the intestinal barrier. In the air-liquid interface (ALI) cultures the apical medium is reduced to a thin film, which results in an improved oxygen supply. The description of important morphological and functional features were realised through different methods and the comparison of the three culture conditions: impermeable support, permeable support and ALI-culture. A morphological and functional *in vivo*-approximation of both cell lines was found. The phenotype of the cultured cells was described by analysing the thickness of the layer, cell number per area, cell area, nucleus area and nucleus/cell ratio. A steady approximation of the morphology of the cultured cells to the *in vivo* situation was noticed in the sequence of impermeable support > permeable support > ALI culture (Nossol et al., 2011). BSA was used for functional analysis. The uptake of BSA was detected in the ALI-cultures, but no intracellular BSA-DyLight was found in conventional membrane cultures. The conventional cultures showed only an apical coating with the protein (Nossol et al., 2011). In the next step the expression of different genes regulating brush border, metabolism and cytoskeleton were examined by PCR and western blot. Villin-1 was found by western blot only in ALI cultures. GAPDH as an important protein of the glycolysis showed differences in the western blot analyses in the different cultures. A decreased GAPDH-level was detected in the ALI cultures of both cell lines. Possibly, changes in the metabolism took place due to the improved oxygen supply. An important characteristic of an intact monolayer is the expression and the structure of the tight junctions. This was examined via PCR, western blot and immunofluorescence. ZO-1, occluding, claudin-3 and claudin-4 were detected in all cultures. Another important marker of a differentiated monolayer is a decreased proliferation level of the enterocytes. This was checked with BrdU-incorporation and indicates a progressive differentiation of the cells in the following sequence: impermeable support > permeable support > ALI-culture.

Another step was to add MoDCs to the membrane cultures. Dendritic cells are antigen-presenting cells and play an important role in the immune response. One important feature of an intact barrier *in vivo* is the contact between DCs and the basement membrane. This was studied in inverted membrane cultures of the epithelial cells. The co-cultures were examined using electron microscopy. Dendrites of both cell types were found in the pores of the membrane demonstrating the interaction of epithelia and DCs.