

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dr.med. Reinhold Erben)

**Einfluss einer *Cryptosporidium parvum* Infektion auf Tight Junction
Proteine im Jejunumepithel neugeborener Kälber**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sarah Kugler

Wien, im März 2022

Betreuerin: Ass.-Prof. Dr.med.vet. Franziska Dengler
Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik
Department für Biomedizinische Wissenschaften
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim, Dipl.EVPC
Institut für Parasitologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG | 1 |
| 2. | LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 2.1. | <i>Cryptosporidium parvum</i> | 3 |
| 2.1.1. | Entwicklungszyklus..... | 3 |
| 2.1.2. | Klinik, Diagnostik und Therapie | 5 |
| 2.1.3. | Pathologie und Pathophysiologie | 6 |
| 2.2. | Darmbarriere und Tight Junctions..... | 7 |
| 2.2.1. | Struktur und Funktion der Tight Junction Proteine | 9 |
| 2.2.1.1. | Claudine..... | 9 |
| 2.2.1.2. | Occludin..... | 11 |
| 2.2.1.3. | ZO..... | 11 |
| 2.2.2. | Regulation der Tight Junctions | 12 |
| 2.3. | Einfluss einer <i>C. parvum</i> Infektion auf die Tight Junction Proteine | 13 |
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 15 |
| 3.1. | Versuchstiere | 15 |
| 3.2. | Durchführung des Tierversuches..... | 15 |
| 3.3. | Anfertigung der Gefrierschnitte..... | 16 |
| 3.4. | Immunfluoreszenzfärbung | 17 |
| 3.4.1. | Fixierung..... | 17 |
| 3.4.2. | Präinkubation..... | 17 |
| 3.4.3. | Antikörperinkubation..... | 19 |
| 3.5. | Mikroskopische Analyse | 19 |
| 3.6. | Zweistufige real time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion..... | 20 |

| | | |
|------|--|----|
| 4. | ERGEBNISSE | 24 |
| 4.1. | Nachweis von <i>C. parvum</i> | 24 |
| 4.2. | Occludin | 25 |
| 4.3. | Claudin-1 | 29 |
| 4.4. | Claudin-3..... | 32 |
| 4.5. | Genexpression | 35 |
| 5. | DISKUSSION | 36 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 42 |
| 7. | SUMMARY | 43 |
| 8. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 44 |
| 9. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 45 |
| 10. | ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS..... | 50 |

1. Einleitung und Fragestellung

Kryptosporidien parasitieren im Darm von zahlreichen Lebewesen, die bedeutendsten Wirte sind Menschen und Rinder. Besonders suszeptibel für die Krankheit sind juvenile und immunkompromittierte Individuen (Innes et al. 2020).

Laut dem Robert Koch-Institut (2021) wurden in Deutschland im Jahr 2020 insgesamt 1.190 humane Kryptosporidiose-Fälle (das entspricht 1,4 Fällen pro 100.000 Einwohner) gemeldet. Im Jahr 2018 wurden in jenen 20 Ländern des Europäischen Wirtschaftsraumes, in denen die Kryptosporidiose eine meldepflichtige Krankheit darstellt, in Summe 14.252 Fälle (das sind 4,4 Fälle pro 100.000 Einwohner) bestätigt, wobei Kinder bis zum vierten Lebensjahr den größten Anteil ausmachten (European Centre for Disease Prevention and Control 2021). In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) traten im Jahr 2018 12.540 Kryptosporidiose-Fälle (das sind 3,8 Fälle pro 100.000 Einwohner) beim Menschen auf (Centers for Disease Control and Prevention 2019). In Ländern mit niedrigerem Gesundheitsstandard sind diese Zahlen, vor allem bei Kindern, bedeutend höher (Checkley et al. 2015).

Im Bereich der Veterinärmedizin wurden im Rahmen einer in Österreich durchgeführten Studie 177 an Durchfall erkrankte Kälber untersucht, wobei im Kot von 55,4 % der Kälber Oozysten von *Cryptosporidium* gefunden wurden (Lichtmannsperger et al. 2019). Eine aktuelle länderübergreifende Studie aus Frankreich, Belgien und den Niederlanden zeigte eine sehr hohe durchschnittliche Prävalenz (93 %) von *Cryptosporidium* in 57 untersuchten Betrieben (Pinto et al. 2021). Die Krankheit verursacht nicht nur durch die Behandlungskosten und die erhöhte Mortalität von Kälbern große ökonomische Verluste in der Nutztierhaltung, sondern geht auch mit beträchtlichem Tierleid einher. Sehr häufig treten infolge der Störung des Darmepithels durch den Parasiten Koinfektionen mit anderen viralen oder bakteriellen Durchfallerregern auf, was die Wichtigkeit einer intakten Darmbarriere hervorhebt (Delling und Daugschies 2022). Einen zentralen Bestandteil dieser Barriere stellen die Tight Junction Proteine zwischen Enterozyten dar, welche durch Infektionserkrankungen moduliert werden und daher möglicherweise eine wichtige Rolle in der Therapie der Krankheit spielen könnten.

Trotz der hohen Prävalenz sowohl beim Menschen als auch im veterinärmedizinischen Bereich ist der Kenntnisstand zur Pathogenese und Therapie der Kryptosporidiose vergleichsweise gering. Dies verdeutlicht die Relevanz der Forschung am Parasiten *Cryptosporidium* für die Human- und die Veterinärmedizin. In der vorliegenden Arbeit wurde

untersucht, inwiefern die Expression von für die Darmbarriere wichtigen Tight Junction Proteinen im Jejunumepithel von Kälbern durch eine Infektion mit Kryptosporidien verändert ist. Es sollten mittels Immunfluoreszenzmarkierung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Veränderungen in der Expression und subzellulären Lokalisation sowie mittels quantitativer PCR (qPCR) die Genexpression der Proteine erforscht werden. Folgende Hypothese wurde dabei zugrunde gelegt: Eine Infektion mit *Cryptosporidium parvum* führt zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung der Tight Junctions im Jejunumepithel neugeborener Kälber, insbesondere von Occludin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und ZO-1.

2. Literaturübersicht

2.1. *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium ist ein einzelliger Parasit aus dem Stamm der Alveolata und der Klasse der Coccidea. Es gibt rund 30 verschiedene Arten von *Cryptosporidium*, die sowohl bei Säugetieren, einschließlich des Menschen, als auch bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen eine Rolle als Krankheitserreger spielen (Deplazes et al. 2021).

Cryptosporidium parvum ist einer der häufigsten Enteritiserreger in neugeborenen Kälbern und verursacht durch verringerte Gewichtszunahmen, Behandlungskosten und nicht zuletzt auch Abgänge weltweit große ökonomische Verluste in der Nutztierhaltung (Innes et al. 2020). In der Humanmedizin stellt die Kryptosporidiose eine bedeutende Infektionskrankheit dar und führt vor allem bei Patienten mit Immundefizienz zu chronischer Diarrhoe (Checkley et al. 2015). Von allen *Cryptosporidium* Spezies hat *C. parvum* die größte zoonotische Bedeutung (Innes et al. 2020).

2.1.1. Entwicklungszyklus

Cryptosporidium parvum-Oozysten werden durch direkten Kontakt mit infiziertem Kot oder indirekt über die kontaminierte Umwelt oral aufgenommen. Im sauren Milieu des Gastrointestinaltraktes exzystieren vier Sporozoiten (Abb. 1a). Diese heften sich an den Enterozyten an (Abb. 1b) und etablieren sich in einer parasitophoren Vakuole in den Zellen. Darin entwickeln sich die länglichen Sporozoiten zu rundlichen Trophozoiten mit speziellen Organellen für die Nährstoffaufnahme (Abb. 1c). Nach der Aufnahme in die Zelle beginnt die asexuelle Vermehrung: die Trophozoiten differenzieren sich zu Meronten vom Typ I mit je acht Merozoiten (Abb. 1d), die aus den Enterozyten ins Darmlumen gelangen und sofort die benachbarten Zellen infizieren können. Daraufhin können sie sich erneut asexuell fortpflanzen oder sie entwickeln sich zu Meronten vom Typ II mit je vier Merozoiten (Abb. 1e), die die sexuelle Vermehrung induzieren. Die frei gewordenen Merozoiten entwickeln sich in neu infizierten Darmepithelzellen zu Mikrogameten und Makrogameten (Abb. 1f), die während der sexuellen Vermehrung zu Zygoten verschmelzen (Abb. 1g). Daraus entstehen in weiterer Folge Oozysten mit je vier Sporozoiten. Die Freisetzung dünnwandiger Oozysten ins Darmlumen führt zur unmittelbaren Autoinfektion weiterer Enterozyten (Abb. 1a) und Wiederholung des beschriebenen Zyklus. Dickwandige Oozysten

werden mit dem Kot ausgeschieden (Abb. 1h) und sind sofort infektiös für neue Wirte (Deplazes et al. 2021, Thomson et al. 2017).

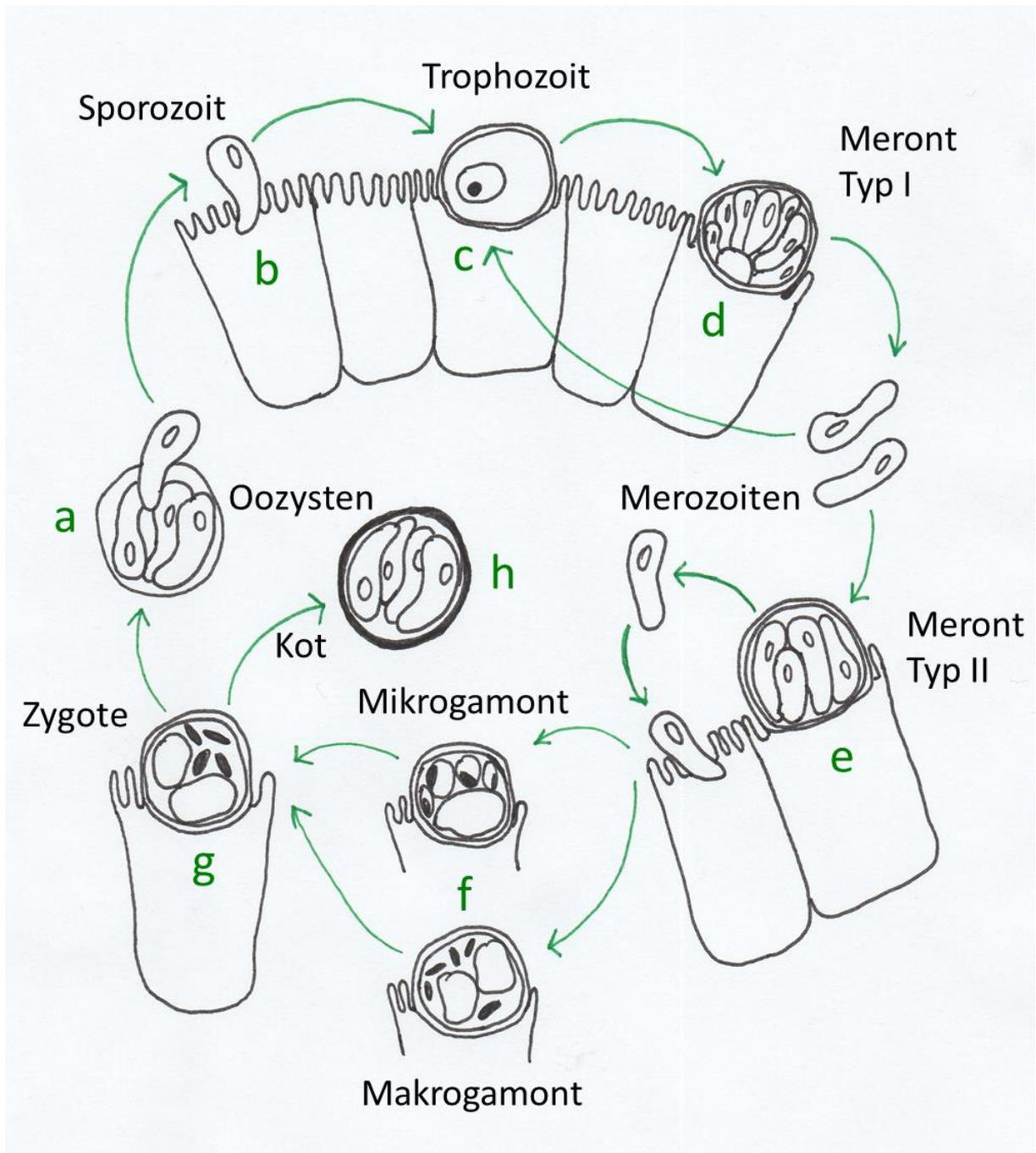


Abb. 1: Lebenszyklus von *C. parvum* (Abb.: Sarah Kugler).

Die sporulierten Oozysten können bei 15-20 °C für einen Zeitraum von rund drei Monaten und bei 5 °C bis zu einem Jahr infektiös bleiben. Eine Inaktivierung kann entweder durch Austrocknung erfolgen oder durch Erwärmung auf über 65 °C bzw. Abkühlung auf unter -20 °C (Deplazes et al. 2021).

2.1.2. Klinik, Diagnostik und Therapie

Neugeborene Kälber infizieren sich meist in den ersten drei Lebenswochen mit *C. parvum*, die Präpatenz beträgt vier bis sechs Tage. Die Tiere zeigen in der Regel für ein bis zwei Wochen starken Durchfall, Apathie, Inappetenz, Exsikkose und Fieber. In extremen Fällen kann die Infektion auch tödlich verlaufen (Deplazes et al. 2021, Innes et al. 2020). Schwere Krankheitsverläufe treten oft bei Koinfektionen mit anderen Durchfallerregern wie Rota- und Coronaviren oder *Escherichia coli* auf (Delling und Dauschies 2022, Renaud et al. 2021). Nach überstandener Infektion erkennt man genesene Tiere häufig an der geringeren Gewichtszunahme (Innes et al. 2020).

Eine Möglichkeit zur Diagnostik stellt die Mikroskopie von Kotproben dar. Die rund 4-6 µm großen Oozysten können mittels modifizierter Ziehl-Neelson-Färbung oder Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden (Deplazes et al. 2021, Checkley et al. 2015). Als weitere Diagnosemöglichkeit stehen auch Antigen-Schnelltests zur Verfügung, die direkt im Stall ausgewertet werden können (Deplazes et al. 2021, Innes et al. 2020). Für die Speziesdiagnostik ist die PCR die zielführendste Methode (Innes et al. 2020).

Der wichtigste Therapieansatz bei einer Kryptosporidiose ist die symptomatische Behandlung der an Durchfall erkrankten Kälber. Diese Therapie beinhaltet eine orale oder intravenöse Flüssigkeitssubstitution und Energieversorgung und den Ausgleich der durch die Diarrhoe entstandenen metabolischen Azidose, zum Beispiel mit einer Dauertropfinfusion aus Natriumchlorid, Glucose und Bicarbonat (Dirksen und Baumgartner 2006). Das einzige zugelassene Medikament gegen *C. parvum* ist Halofuginon (0,1 mg/kg *p. o.*) (Deplazes et al. 2021). Die Behandlung führt aber nicht zur kompletten Heilung, sondern verringert nur die Oozysten-Ausscheidung und die Dauer der Diarrhoe. Zur besten Wirksamkeit sollte Halofuginon innerhalb von 24 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome und für sieben aufeinanderfolgende Tage verabreicht werden (Thomson et al. 2017). Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass das Medikament eine sehr geringe therapeutische Breite aufweist, was schon bei minimaler Überdosierung letale Folgen haben kann (Deplazes et al. 2021).

Um einer Kryptosporidien Infektion vorzubeugen, ist ein umfangreiches und wirkungsvolles Hygienekonzept essentiell. Die Kälberboxen und deren Umgebung müssen gründlich gereinigt und desinfiziert und anschließend getrocknet werden, um die Überlebenschancen der Oozysten zu verringern. Zur Verminderung des Infektionsdruckes aus der Umwelt sollte mehrmals täglich der Kot und die damit kontaminierte Einstreu aus dem Stall entfernt werden (Thomson et al. 2017). Weiters ist auch eine gute Kolostrumversorgung in den ersten Lebensstunden und eine trockene und warme Aufstallung der Kälber erforderlich (Innes et al. 2020).

2.1.3. Pathologie und Pathophysiologie

Die genauen Pathomechanismen einer *C. parvum* Infektion sind noch nicht zur Gänze erforscht. Es ist jedoch klar, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt (Di Genova und Tonelli 2016).

Im Rahmen der pathohistologischen Untersuchung zeigt der Darm der infizierten Tiere eine katarrhalische Entzündung mit Nekrosen und Epithelzellverlusten sowie eine Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen. Außerdem zeigt sich eine Atrophie der Zotten mit gleichzeitiger Hyperplasie der Krypten (Deplazes et al. 2021, Schnieder et al. 2006).

Die Zottenatrophie geht mit einem Verlust von Epithelzellen einher. Die genauen Mechanismen hinter diesem Zellverlust sind noch unklar. Der wahrscheinlichste Mechanismus ist die Apoptose, also der durch kontrollierte Genexpression der Zelle gesteuerte Zelltod (Foster und Smith 2009, Gookin et al. 2002). Mele et al. (2004) konnten zeigen, dass die Apoptose der Zellen abhängig vom Entwicklungsstadium von *C. parvum* ist. Der Parasit inhibiert den Zelluntergang im Trophozoitenstadium, da er in diesem Stadium von der Wirtszelle abhängig ist. Die späteren Lebensstadien des Parasiten aktivieren wiederum die Apoptose der Zellen (Di Genova und Tonelli 2016, Mele et al. 2004).

Damit trotz Zellverlusten eine kontinuierliche Epithelbarriere erhalten bleibt, retrahieren die Darmzotten und somit entsteht die Zottenatrophie. Durch den Verlust der Villuszellen und deren Nährstofftransport sinkt die Resorptionskapazität für wichtige Nährstoffe und die damit verbundene osmotische Triebkraft für die Aufnahme von Wasser aus dem Darmlumen. Um die zerstörten Epithelzellen zu ersetzen, kommt es wahrscheinlich zu einer kompensatorischen Hyperplasie der proliferativen Kryptenzellen (Foster und Smith 2009, Gookin et al. 2002). Diese undifferenzierten Zellen sind vor allem für die Sekretion von Cl^- ins

Darmlumen verantwortlich. Aufgrund des osmotischen Gradienten folgt Wasser den Ionen aus den Zellen (Engelhardt et al. 2015).

Zusätzlich führt die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandinen, über verschiedene Signalwege zu einer vermehrten Anionensekretion und Inhibition der NaCl-Resorption, was wiederum zur Entstehung einer Diarrhoe beiträgt. Die Prostaglandinsekretion ist vermutlich eine Folge der infektionsbedingten Infiltration der Lamina propria mit Immunzellen (Foster und Smith 2009, Gookin et al. 2002). Durch das Zusammenwirken dieser Mechanismen kommt es zu einer sogenannten osmotischen bzw. malabsorptiven sowie einer sekretorischen Diarrhoe (Engelhardt et al. 2015).

Cryptosporidium parvum wird in wenigen Studien auch mit einer erhöhten parazellulären Permeabilität und einem erniedrigten transepithelialen Widerstand, bedingt durch die Zerstörung der Darmbarriere, assoziiert. Inwiefern eine Veränderung der Tight Junction Proteine zum Verlust der Barriere beiträgt und welche Mechanismen dazu führen ist jedoch noch nicht bekannt (Adams et al. 1994, Di Genova und Tonelli 2016, Kumar et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit wird spezifisch auf Veränderungen der Tight Junction Proteine im Jejunumepithel von mit *C. parvum* infizierten Kälbern eingegangen. Dadurch soll zum Verständnis der Funktion und Regulation der Tight Junctions und der Darmpermeabilität, welche entscheidend für die zukünftige Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten sein könnten, beigetragen werden.

Der aktuelle Wissensstand zur Darmbarriere mit besonderer Berücksichtigung von Tight Junctions wird im Folgenden zusammenfassend erläutert.

2.2. Darmbarriere und Tight Junctions

Die Schleimhaut des Darms stellt eine Barriere zwischen dem inneren Milieu des Körpers und der Außenwelt dar und ist essentiell für die Abwehr von Mikroorganismen und Toxinen, jedoch auch für den gerichteten Transport von Nährstoffen und Wasser über die Zellen. Die Schleimhautbarriere besteht aus dem einschichtigen hochprismatischen Epithel des Darms selbst, dem Schlussleistenkomplex, welcher die benachbarten Zellen verbindet und den parazellulären Raum verschließt, sowie einer aufliegenden Schleimschicht (France und Turner 2017).

Der Schlussleistenkomplex setzt sich aus drei Zonen zusammen: der *Zonula occludens*, der *Zonula adhaerens* und der *Macula adhaerens* (Abb. 2). Die *Zonula adhaerens* und die aus Desmosomen bestehende *Macula adhaerens* dienen der mechanischen Verbindung benachbarter Zellen. Die apikale *Zonula occludens* besteht aus den Tight Junctions, die den Raum zwischen zwei Zellen abdichten und so den parazellulären Transport regulieren (Alberts et al. 2021, Buckley und Turner 2018).

Die Tight Junctions können mittels Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden und stellen sich als lineare paarige Stränge in den Zellmembranen benachbarter Zellen dar (Buckley und Turner 2018). Sie setzen sich aus einem komplexen Konstrukt verschiedener Transmembranproteine, wie Claudinen und Occludin, und membran-assoziierten Proteinen zusammen (Furuse 2010)(Abb. 2). Claudine sind essentiell für den Aufbau der Tight Junction Stränge und die Regulierung des transzellulären Transports. Occludin dient eher der Regulation der Tight Junctions als dem strukturellen Aufbau. Die Familie der membran-assoziierten ZO (lat. *Zonula occludens*) Proteine stellt eine Verbindung der Tight Junction Proteine mit dem Zytoskelett der Zellen dar und ist auch an der Bildung der Stränge beteiligt (Buckley und Turner 2018, Furuse 2010).

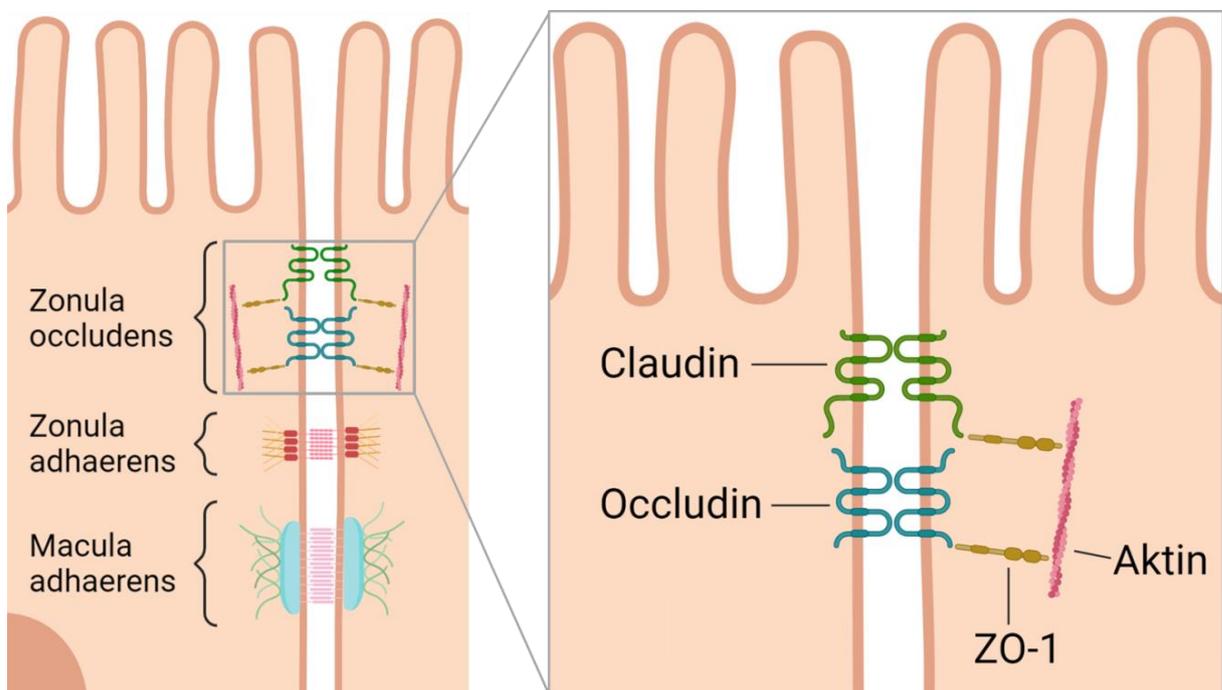


Abb. 2: Schematische Darstellung des Schlussleistenkomplexes zwischen Enterozyten und des Aufbaus der Tight Junctions (Abb.: Sarah Kugler, generiert mit BioRender.com nach Turner 2009).

2.2.1. Struktur und Funktion der Tight Junction Proteine

2.2.1.1. Claudine

Die Familie der Claudine umfasst 27 verschiedene Subtypen. Die Expression der Subtypen variiert in den unterschiedlichen Epithelien der Organe (vgl. Tab. 1) und definiert die Eigenschaften der Barriere und die Permeabilität der Schlussleiste (Buckley und Turner 2018, Garcia-Hernandez et al. 2017). Im Allgemeinen wird zwischen abdichtenden und porenformenden Claudinen unterschieden (Günzel und Yu 2013)(Tab. 1).

Claudine haben eine Größe von 21-28 Kilodalton (kDa). Sie bestehen aus vier Transmembrandomänen mit einem Amino-Terminus und einem Carboxy-Terminus (C-Terminus) im Zytoplasma, zwei extrazellulären Schleifen und einem kurzen intrazellulären Bereich. Die erste, größere Schleife beinhaltet ein für Claudine charakteristisches Aminosäuremuster. Die meisten Claudine haben eine Bindungsstelle am C-terminalen Ende mithilfe dessen sie an ZO Proteine binden können (Furuse 2010, Krause et al. 2008).

Die primäre Funktion der Claudine ist die Bildung der Tight Junction Stränge. Der der Formierung dieser linearen Strukturen zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit noch nicht zur Gänze erforscht (Anderson und van Itallie 2009). Furuse (2010) beschreibt eine Theorie, wonach die Dimerisierung von ZO-1 oder ZO-2 (s. u.) an der Zellwand zur Polymerisation von Claudinen führt und somit die typischen Tight Junction Stränge entstehen.

Die Claudine sind verantwortlich für die Regulierung des parazellulären Transportes über zwei unterschiedliche Transportwege. Der „*pore-pathway*“ ist ein ladungsselektiver Transportweg für Moleküle mit einem Radius unter 4 Å. Dieser Kanal hält den elektrischen Gradienten entlang den Zellen aufrecht, was für den physiologischen Ionentransport der Zelle substantiell ist (Anderson und van Itallie 2009). Der zweite Transportweg zeigt keine Ladungsselektivität und ist durchlässig für Moleküle mit einem Radius über 4 Å. Dieser Weg wird „*leak-pathway*“ genannt, da er wahrscheinlich aus Löchern zwischen den Tight Junctions besteht und sehr empfindlich auf Veränderungen des Zytoskeletts reagiert (Anderson und van Itallie 2009). Die tatsächliche Permeabilität der Tight Junctions hängt von den ausgebildeten Claudin Subtypen (Tab. 1) und deren Quantität ab. Während beispielsweise Claudin-1 und Claudin-4 das Epithel abdichten, wirken Claudin-2 und Claudin-10 genau gegenteilig – das Epithel wird durchlässiger (Anderson und van Itallie 2009, Slifer und Blikslager 2020).

Tab. 1: Claudin Subtypen und deren Gewebeverteilung und Funktion (nach Garcia-Hernandez et al. 2017, Günzel und Yu 2013).

| Claudin Subtyp | Lokalisation | Funktion |
|-----------------------|--|--|
| 1 | in den Epithelien aller Organe | Barriere |
| 2 | in durchlässigen Epithelien, v. a. in der Niere und im Darm | Kationenpore |
| 3 | in vielen Epithelien, v. a. im Respirationstrakt, Gastrointestinaltrakt, Harntrakt und in Speicheldrüsen | Barriere |
| 4 | v. a. in der Niere und der Lunge | Barriere; formt mit Claudin-8 Anionenpore |
| 5 | v. a. im Endothel von Blutgefäßen | Barriere v. a. in der Blut-Hirn-Schranke |
| 6 | nur in embryonalen und fetalen Zellen | Na ⁺ - und Cl ⁻ -Barriere |
| 7 | in vielen Epithelien, v. a. in der Lunge und der Niere | Cl ⁻ -Pore |
| 8 | in vielen Epithelien, v. a. in der Lunge und der Niere | Na ⁺ -Barriere oder Cl ⁻ -Pore (Zelltyp-spezifisch) |
| 9 | im Innenohr | K ⁺ -Barriere zwischen Endo- und Perilymphe |
| 10 | in vielen Epithelien, v. a. in der Niere (10a), im Darm und in Speicheldrüsen (10b) | 10a: Anionenpore 10b: Kationenpore |
| 11 | im Nervensystem und den Hoden | Barriere |
| 12 | im Darm | Ca ²⁺ -Pore, wird hochreguliert durch Vitamin D |
| 13 | im Kolon, in der Niere und der Harnblase | noch zu wenig erforscht |
| 14 | im Innenohr | K ⁺ -Barriere zwischen Endo- und Perilymphe |
| 15 | im Darm | Na ⁺ -Pore oder Cl ⁻ -Barriere (Zelltyp-spezifisch) |
| 16 | in vielen Epithelien, v. a. in der Niere und in Speicheldrüsen | divalente Kationenpore (noch nicht bewiesen) |
| 17 | v. a. in der Niere und im Gehirn | Anionenpore |
| 18 | v. a. in der Lunge und im Magen | Na ⁺ - und H ⁺ -Barriere |
| 19 | v. a. in der Niere, der Retina und im peripheren Nervensystem | Barriere |
| 20 - 27 | noch zu wenig erforscht | noch zu wenig erforscht |

2.2.1.2. Occludin

Das Protein Occludin wurde 1993 als erstes Transmembranprotein der Tight Junctions beschrieben (Furuse et al. 1993). Es hat eine Größe von 65 kDa und hat den gleichen Aufbau aus vier Transmembrandomänen wie Claudine, jedoch gibt es keine Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Charakteristisch für Occludin ist der hohe Anteil an Glycin und Tyrosin in der ersten extrazellulären Schleife. Am C-Terminus befindet sich wiederum eine Bindungsstelle für ZO Proteine (Furuse 2010).

Occludin spielt eher eine akzessorische Rolle in der Bildung und der Regulation der Tight Junctions, über die es jedoch noch sehr wenige Informationen gibt (Anderson und van Itallie 2009). Saitou et al. (2002) zeigten, dass sich die Morphologie der Tight Junctions in Occludin Knockout Mäusen nicht von Kontrolltieren unterscheidet und dass die Funktion der Schleimhautbarriere erhalten bleibt. Jedoch entwickelten die Knockout Mäuse andere pathologische Veränderungen, wie zum Beispiel eine chronische Entzündung und Hyperplasie der Magenschleimhaut, was auf eine komplexere, noch unbekanntere Funktion des Proteins schließen lässt (Saitou et al. 2000).

2.2.1.3. ZO

Es gibt drei Subtypen des ZO Proteins: ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Die intrazellulären Proteine bestehen aus drei PDZ¹-Domänen und weiteren funktionell wichtigen Domänen, die essentielle Bindungsstellen für die Proteine der Schlussleiste und das Aktin-Zytoskelett der Zelle darstellen und mit zahlreichen Signalproteinen interagieren (Furuse 2010).

Die erste PDZ-Domäne der ZO Proteine bindet an den C-Terminus der Claudine, ZO-1 bindet überdies auch an Occludin. Die übrigen Domänen von ZO-1 sind verantwortlich für die Lokalisation von ZO-1 an der Zellmembran und für dessen Dimerisierung mit darauf folgender Polymerisation der Claudine (Fanning und Anderson 2009, Furuse 2010). Somit ist ZO-1 unabdingbar für den Aufbau der Tight Junction Stränge.

¹ PDZ-Domänen sind spezielle Teile des Proteins, deren Funktion die Interaktion mit anderen Proteinen ist. Die Abkürzung PDZ setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der Proteine zusammen, in denen diese Domänen zum ersten Mal beschrieben wurden. Das Z steht für ZO-1 (Fan und Zhang (2002).

2.2.2. Regulation der Tight Junctions

Die Regulation der Tight Junctions wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst, unter anderem von Zytokinen, von Wachstumsfaktoren und von der Interaktion mit Ionenkanälen (Slifer und Blikslager 2020).

Die Steigerung der Permeabilität der Tight Junctions durch Zytokine wurde intensiv anhand des Verlustes der Barrierefunktion bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erforscht. Dabei werden die Zytokine Interleukin-13 (IL-13) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) im Zuge der Aktivierung des Immunsystems vermehrt ausgeschüttet und führen zu einem Verlust der Darmbarriere (Buckley und Turner 2018, France und Turner 2017). Die Hochregulation von IL-13 bewirkt eine vermehrte Expression von Claudin-2, welches kationenselektive Poren ausbildet und dadurch den Kationenfluss durch den „*pore-pathway*“ erhöht (France und Turner 2017, Günzel und Yu 2013). Die Bindung von TNF α an Rezeptoren der Epithelzellen führt zu einer vermehrten Aktivität der Myosin-leicht-Ketten-Kinase (engl. *myosin-light-chain-kinase*, MLCK), wodurch es zu einer Kontraktion des Aktomyosinrings der Zelle kommt. Dadurch entstehen größere Löcher zwischen den Tight Junctions und die Permeabilität entlang des „*leak-pathway*“ steigt (Cunningham und Turner 2012, France und Turner 2017). Zusätzlich führt die Ausschüttung von TNF α zu einer Endozytose von Occludin, was wiederum den Barriereverlust unterstützt. MLCK ist auch an einer physiologischen Steigerung der Permeabilität beteiligt: Die Aktivierung des Na⁺/Glucose-Cotransporters 1 führt mit Hilfe von MLCK zu einem erhöhten parazellulären Fluss von wichtigen Nährstoffen (Buckley und Turner 2018, Cunningham und Turner 2012, France und Turner 2017).

Die Reparatur der Tight Junction Stränge nach Epithelzellverlusten ist essentiell für die Wiederherstellung der Barrierefunktion und der Polarität der Zelle. Ionenkanäle, wie der Chloridkanal CIC-2 oder der Na⁺/H⁺ Austauscher NHE2, fungieren nicht nur als Ionentransporter, sondern haben auch eine wichtige Funktion in der Regulation der Tight Junctions. Es wurde gezeigt, dass CIC-2 eine Rolle bei der Wiederverwertung und Restauration der internalisierten Proteine an der Zellmembran spielt. Außerdem führt eine Überexpression von CIC-2 zu einem vermehrten Einbau von abdichtenden Claudinen (Slifer und Blikslager 2020). NHE2 reguliert die Reparatur der Tight Junctions durch Bindung an das Aktin Zytoskelett (Slifer und Blikslager 2020). Es bedarf jedoch noch weiterer Forschung an den genauen Prozessen, die der Interaktion zwischen den Ionenkanälen und den Tight Junctions zugrunde liegen.

2.3. Einfluss einer *C. parvum* Infektion auf die Tight Junction Proteine

Es gibt diverse Studien, die sich mit der Zerstörung der Darmbarriere und der Tight Junctions durch verschiedene Pathogene und Krankheiten, wie Toxoplasmose, Giardiose (Paradis et al. 2021) und chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Groschwitz und Hogan 2009), befassen, jedoch nur sehr wenige über die Veränderung der Tight Junction Proteine bei einer Infektion mit dem Parasiten *C. parvum*.

Kumar et al. (2018) beschrieben als Erste den molekularen Hintergrund der Zerstörung der Darmbarriere infolge einer *C. parvum* Infektion. Die Forscher/innen untersuchten die Proteinexpression der Tight Junctions mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot und die mRNA Expression der Proteine mittels qPCR in Caco-2 Zellen (*Carcinoma colon*, Zelllinie aus humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen), Mausenteroiden und der Darmschleimhaut von Mäusen. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot konnte bei einer *C. parvum* Infektion eine signifikante Verminderung des Proteingehaltes von Occludin und Claudin-4 in allen untersuchten Geweben dargestellt werden. Die Proteine Claudin-3 und ZO-1 waren in infizierten Caco-2 Zellen weniger stark, aber dennoch signifikant verringert. Auf Claudin-1 und Claudin-2 hatte eine Infektion mit dem Parasiten keinen Einfluss. Die mRNA-Expression von Occludin und Claudin-4 war in infizierten Mäusen ebenfalls signifikant vermindert, während sich in den Caco-2 Zellen keine Unterschiede zwischen infizierten Zellen und Kontrollzellen zeigten (Kumar et al. 2018). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die zu untersuchenden Proteine für die vorliegende Arbeit ausgewählt, da diese eine zentrale Rolle für die Barrierefunktion des gastrointestinalen Epithels einnehmen könnten und ihre Regulation im Zusammenhang mit einer *C. parvum* Infektion daher von besonderem Interesse ist.

Basierend auf der oben genannten Studie untersuchten Priyamvada et al. (2021) den Mechanismus hinter der Degradierung der Tight Junction Proteine. Es konnte in Caco-2 Zellen eine durch *C. parvum* induzierte Autophagie bestimmter Wirtsproteine nachgewiesen werden, die zur Verminderung der Expression von Occludin und Claudin-4 führte. Es wurde angenommen, dass dieser Prozess entweder ein Infektionsmechanismus des Parasiten ist, der die Darmbarriere schwächt oder ein Verteidigungsmechanismus der Zelle, der über die darauffolgende Diarrhoe zu einer Beseitigung des Parasiten führen soll (Priyamvada et al. 2021).

Während diese Ergebnisse einen ersten Fingerzeig liefern, dass die Interaktion der Wirtszelle mit *C. parvum* im Bereich der Tight Junctions eine wichtige Rolle spielen könnte, muss doch einschränkend gesagt werden, dass der Großteil dieser Studien an einem Zellkulturmodell durchgeführt wurde, der Lebenszyklus von *C. parvum* aber nur *in vivo* abgeschlossen wird (Lendner und Dauschies 2014). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer *C. parvum* Infektion auf Tight Junction Proteine im Jejunumepithel neugeborener Kälber untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden Proben des Jejunums von zwölf Kälbern aus einem vorangegangenen Tierversuchsvorhaben (TVV) untersucht. Der Tierversuch wurde von der Landesdirektion Sachsen unter dem Aktenzeichen TVV 19/20 genehmigt und entsprechend der nationalen und europäischen Gesetzgebung unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Arwid Dauschies durchgeführt.

Die neugeborenen Bullenkälber der Rasse Holstein Friesian stammten aus einem sächsischen Milchviehbestand. Die Geburten erfolgten im Zeitraum von Juli bis Dezember 2020. Um einen vergleichbaren Immunstatus zu gewährleisten, wurde jedem einzelnen Tier im Herkunftsbetrieb Kolostrum aus einem vorab gepoolten Kolostrumvorrat verabreicht. Nach einer umfassenden klinischen Untersuchung wurden die neugeborenen Tiere innerhalb des ersten Lebensstages in die Stallungen des Instituts für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig transportiert und dort einzeln gehalten. Sie erhielten dreimal täglich je zwei Liter Milchaustauscher und ab dem fünften Lebenstag (Studientag (ST) 4) zusätzlich zwei Liter Elektrolytlösung.

3.2. Durchführung des Tierversuches

Die Versuchsanordnung umfasste drei Gruppen von Tieren: eine Kontrollgruppe (Stichprobengröße $N = 4$), eine experimentell infizierte Gruppe ($N = 5$) und eine natürlich infizierte Gruppe ($N = 3$)(Tab. 2).

Die Infektion der Versuchstiere der experimentell infizierten Gruppe erfolgte am ersten Lebenstag (ST 0) direkt nach Ankunft des Tieres. Zu diesem Zweck wurden 2×10^7 *C. parvum*-Oozysten (Laborstamm des Instituts für Parasitologie, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig, Deutschland, Joachim et al. 2003) pro Tier in 3 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) suspendiert und den Kälbern oral verabreicht. Die Kälber aus den anderen beiden Gruppen erhielten jeweils 3 ml Wasser *p. o.* Die Tiere der natürlich infizierten Gruppe hatten sich schon im Herkunftsbetrieb auf natürliche Art mit dem Parasiten infiziert, es erfolgte eine sogenannte Feldinfektion. Die Isolate wurden nachfolgend sequenziert, um eine später stattgefundenene Infektion am Institut für Parasitologie auszuschließen.

Es wurden in weiterer Folge täglich klinische Untersuchungen durchgeführt, Kotproben entnommen und diese auf die Ausscheidung von Oozysten untersucht. In diesem Zusammenhang erfolgte auch die Dokumentation der Menge der ausgeschiedenen Oozysten pro Gramm Kot (OpG) durch das Institut für Parasitologie Leipzig.

Tab. 2: Gruppeneinteilung der Versuchskälber.²

| Kontrolltiere | experimentell infizierte Tiere | natürlich infizierte Tiere |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Kalb 1 | Kalb 2 | Kalb 5 |
| Kalb 7 | Kalb 4 | Kalb 10 |
| Kalb 9 | Kalb 6 | Kalb 13 |
| Kalb 11 | Kalb 8 | |
| | Kalb 12 | |

² Kalb 3 wurde aufgrund hochgradig gestörten Allgemeinbefindens aus der Studie ausgeschlossen.

3.3. Anfertigung der Gefrierschnitte

Nach der Euthanasie der Kälber am achten Lebenstag (ST 7) erfolgte die Resektion von Teilen des distalen Jejunums. Der Darm wurde mit PBS ausgespült und anschließend für 24 Stunden in 30 % Sucrose eingelegt. Danach wurde das Gewebe ohne weitere Fixierung in Tissue-Tek (VWR International, LLC, Radnor, USA) eingebettet. Daraus wurden mit einem Kryostat (Leica CM3050 S, Leica Biosystems GmbH, Nußloch, Deutschland) 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die dann bei -80 °C in einem Ultratiefkühlschrank bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit am Institut für Physiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt.

3.4. Immunfluoreszenzfärbung

Die Tight Junction Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und ZO-1 wurden mit der im Folgenden beschriebenen Methode in den Gefrierschnitten jedes Kalbes sichtbar gemacht.

3.4.1. Fixierung

Die Objektträger wurden aus dem Ultratiefkühlschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurden für jedes Protein verschiedene Fixierlösungen getestet, um die beste Methode zu ermitteln. Diese waren:

- 4,5 % Formaldehyd (Roti[®]Histofix, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland),
- ≥ 99 % Aceton (VWR International, LLC, Radnor, USA),
- $\geq 99,5$ % Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland),
- $\geq 98,5$ % Methanol (VWR International, LLC, Radnor, USA) und
- Bouin'sche Lösung (Mulisch und Welsch 2010, Romeis 1968).

Die Schnitte wurden zehn Minuten mit der entsprechenden Fixierlösung (Tab. 3) beschichtet und anschließend in drei Zyklen zu je einer Minute mit PBS gewaschen.

3.4.2. Präinkubation

Danach erfolgte eine Umrandung der Jejunumschnitte mit einem Fettstift (Mini PAP Pen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA), um ein Überlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Schnitte wurden danach für eine Stunde in PBS mit 4 % Esel- (Abcam PLC, Cambridge, Vereinigtes Königreich) bzw. Ziegen Serum (MP Biomedicals, LLC, Irvine, USA)(Tab. 3) präinkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Zur Permeabilisierung der Zellen war der Lösung 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) zugesetzt. Diese Präinkubationslösung diente auch der Verdünnung der Primärantikörper. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Tab. 3: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der einzelnen Proteine.

| | Occludin | Claudin-1 | Claudin-3 | Claudin-4 | ZO-1 |
|---|--|--|--|--|--|
| Fixierung | Aceton | ohne Fixierung | Aceton | - | - |
| Serum | Esel | Esel | Ziege | Esel | Ziege |
| Primär-antikörper (Bestellnummer) | Mouse anti-Occludin (sc-271842) | Mouse anti-Claudin-1 (sc-166338) | Rabbit anti-Claudin-3 (34-1700) | Mouse anti-Claudin-4 (sc-376643) | Rat anti-ZO-1 (sc-33725) |
| Verdünnung | 1:100 | 1:100 | 1:100 | 1:100 | 1:100 |
| Hersteller | Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA | Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA | Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA | Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA |
| Sekundär-antikörper (Bestellnummer) | Donkey anti-Mouse Alexa 488 (A-21202) | Donkey anti-Mouse Alexa 488 (A-21202) | Goat anti-Rabbit Alexa 488 (A-11034) | Donkey anti-Mouse Alexa 488 (A-21202) | Goat anti-Rat Alexa 488 (A-11006) |
| Verdünnung | 1:200 | 1:200 | 1:500 | 1:200 | 1:500 |
| Hersteller | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

3.4.3. Antikörperinkubation

Anschließend wurden die Schnitte für zwei Stunden mit dem entsprechenden Primärantikörper (Tab. 3) inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS (je 5 Minuten) erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Tab. 3) für eine Stunde im Dunkeln. Zum Nachweis von *C. parvum* wurden die Sekundärantikörper in Sporo-Glo™ (A600Cy3R-1X, Waterborne, Inc., New Orleans, USA) verdünnt. Um eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper auszuschließen, wurde zusätzlich eine Sekundärantikörperkontrolle durchgeführt. Diese Objektträger wurden ohne die Zugabe von Primärantikörpern inkubiert, ansonsten jedoch genau gleich behandelt.

Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Schnitte abschließend noch für fünf Minuten mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1.000 überschichtet und anschließend in drei Zyklen zu je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Eindeckelung erfolgte mit Hilfe des Deckmediums Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA).

Die Proteine Claudin-4 und ZO-1 konnten mit den verwendeten Primärantikörpern trotz verschiedener Fixiermethoden und mehrmaliger Färbeversuche nicht zufriedenstellend dargestellt werden. Deshalb wird in dieser Arbeit nicht mehr auf diese Proteine eingegangen. In zukünftigen Studien sollte die Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-4 und ZO-1 mit anderen Primärantikörpern wiederholt werden.

3.5. Mikroskopische Analyse

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte zuerst mit einem Weitfeldmikroskop (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Mittels einer mit dem Mikroskop verbundenen Kamera (DP72, Olympus Corporation, Tokio, Japan) wurden repräsentative Epithelabschnitte dokumentiert. Für die Vergleichbarkeit der Abbildungen innerhalb eines Proteins wurden identische Aufnahmebedingungen gewählt.

Zur genaueren Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der Proteine wurden die Schnitte anschließend mit einem Konfokalmikroskop (LSM 880, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland; VetCore Facility (Imaging) der Veterinärmedizinischen Universität Wien) betrachtet und erneut dokumentiert. Die vorgenommenen Einstellungen in der

Mikroskopsoftware (ZEN, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4: Einstellungen am Konfokalmikroskop.

| | | Tight Junction Proteine | DAPI | Sporo-Glo™ (<i>C. parvum</i>) |
|---------------------------------|------------------|--------------------------------|-------------|--|
| Laserwellenlänge zur Exzitation | | 488 nm | 405 nm | 561 nm |
| Detektionswellenlänge | | 490-561 nm | 410-487 nm | 566-681 nm |
| Laser- intensität | Occludin | 4,0 % | 2,0 % | 2,0 % |
| | Claudin-1 | 4,0 % | 2,0 % | 2,0 % |
| | Claudin-3 | 2,6 % | 1,5 % | 2,0 % |
| Detektor- verstärkung | Occludin | 730 | 550 | 650 |
| | Claudin-1 | 630 | 530 | 650 |
| | Claudin-3 | 630 | 530 | 650 |

3.6. Zweistufige real time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die mRNA-Expression von Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-5 in den Darmepithelzellen der Kälber wurde mit der im Folgenden beschriebenen Methode quantifiziert.

Für diese Analyse wurde isoliertes Jejunumepithel direkt postmortal entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Davon wurden je 20 mg Epithelgewebe eingewogen und mit 350 µl Lysepuffer aus dem ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) mit dem FastPrep-24 5G Instrument (MP Biomedicals, LLC, Irvine, USA) mit Beads der Größe „S“ (MP Biomedicals, LLC, Irvine, USA) homogenisiert. Die Extraktion der mRNA aus dem Gewebe erfolgte mittels des ReliaPrep RNA Cell Miniprep Systems (Promega GmbH,

Mannheim, Deutschland) gemäß dem Herstellerprotokoll einschließlich einer Behandlung mit DNase. Die Konzentration und Qualität der extrahierten mRNA wurden mit Hilfe eines NanoDrop Spektralphotometers (DeNovix Inc., Wilmington, USA) bestimmt.

Die nachfolgende Transkription der mRNA in cDNA wurde unter Verwendung des GoScript Reverse Transcription Systems (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) ebenfalls laut den Herstellerangaben durchgeführt.

Anschließend erfolgte die qPCR. Dafür wurde die hergestellte cDNA 1:20 verdünnt und 2 µl davon zu einem 20 µl Ansatz, bestehend aus 10 µl Mastermix (GoTaq DNA Polymerase Kit, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), 112 nM Primermix und DNase-freiem Wasser, hinzugefügt. Diese Lösungen wurden in 0,1 ml Strip-Tubes (LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) pipettiert und in einem Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen Inc., Hilden, Deutschland) analysiert. Die Reaktionsschritte der qPCR erfolgten in 40 Zyklen bei folgenden Bedingungen: die Denaturierung für 30 s bei 95 °C, die Primerhybridisierung für 30 s bei optimalen Temperaturen für den jeweiligen Primer (vgl. Tab. 5) und die Elongation für 30 s bei 60 °C.

Die Basensequenzen der für die Amplifikation verwendeten Primer sind in Tabelle 5 dargestellt. Diese wurden nach bekannten Sequenzen aus der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA) mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI, Bethesda, USA) entworfen und von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

Die Bestimmung des Quantifikations-Schwellenwertes (C_t -Wert) und der Amplifikationseffizienz jeder Amplifikationskurve erfolgte mit der Rotor Gene 6000 Series Software 1.7 (Corbett/Qiagen Inc., Hilden, Deutschland). Zur Analyse der Daten wurde das Relative Expression Software Tool (REST 2009-RG Mode, Qiagen Inc., Hilden, Deutschland), etabliert von Pfaffl et al. (2002), verwendet. Dieses berechnete die relative mRNA-Expression der Claudine in infizierten Tieren verglichen mit jener in Kontrolltieren, deren Expressionsrate gleich 1 gesetzt wurde. Die mRNA-Expression der infizierten Tiere wird somit als Vielfaches der Kontrolltiere angegeben. Die Software berechnet statistische Unterschiede zwischen den Gruppen mittels eines Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl et al. 2022). Unterschiede in den Expressionsraten wurden ab einem Signifikanzwert (p) unter 0,05 als statistisch signifikant angenommen.

Tab. 5: Primer und Bedingungen der qPCR.

| Gen | Identifikationsnummer in der Gendatenbank des NCBI | Basensequenz (5-3') Forward/Reverse | Temperatur bei der Primerhybridisierung |
|------------------|---|---|--|
| Claudin-1 | NM_001001854.2 | TGGCTATTTTAGTTGCCACAGC/ GCCTGACCAAATTCATACCTGG | 62 °C |
| Claudin-3 | NM_205801.2 | GATGCAGTGCAAGGTGTACG/ CGAAGACGGCCAGTAGGATG | 62 °C |
| Claudin-5 | NM_001076460.1 | CCTGGACCACAACATCGTGA/ GGAGTCGTACACCTTGCACT | 62 °C |
| β-Actin | NM_173979.3 | AGCCTTCCTTCCTGGGCAT/ TAGAGGTCCTTGCGGATGTC | 60 °C |
| PPIA | NM_178320.2 | GGTCCTGGCATCTTGTCCAT/ GCTTGCCATCCAACCACTCA | 60 °C |
| RPL32 | NM_001034783.2 | AGACCCCTCGTGAAGCCTAA/ CCGCCAGTTCCGCTTGATTT | 60 °C |
| YWHAZ | NM_174814.2 | ACCTACTCCGGACACAGAACA/ TCATCATATCGCTCAGCCTGC | 60 °C |

Die Normalisierung der Daten wurde mit Hilfe der Referenzgene beta-Actin (β -Actin), Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA), Ribosomales Protein L32 (RPL32) und 14-3-3 Protein Zeta/Delta (YWHAZ) durchgeführt. Diese Gene haben sich unter den experimentellen Bedingungen, unter denen auch diese Arbeit angefertigt wurde, als stabil bewährt. Die Stabilität der Gene wurde mit dem Programm Reffinder (Xie et al. 2012) getestet.

Zusätzlich wurden für jeden Lauf zwei Kontrollen mit DNase-freiem Wasser mitgeführt. Jede Probe wurde außerdem zur Minimierung von Dispensationsartefakten als Duplikat angefertigt. Die von der Software automatisch berechneten C_t -Werte wurden vor der Verwendung manuell kontrolliert. Die Abweichung des C_t -Wertes der Duplikate sollte kleiner als 0,3 sein, sonst wurden die Daten verworfen und der Lauf wiederholt.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis von *C. parvum*

Um die tatsächlich mit *C. parvum* infizierten Enterozyten darzustellen, wurden die Fortpflanzungsstadien des Parasiten mittels Immunfluoreszenzfärbung angefärbt. In der experimentell infizierten Gruppe (Abb. 3c, d) und der natürlich infizierten Gruppe (Abb. 3e, f) sind Entwicklungsstadien von *C. parvum* auf bzw. in den Zellen sichtbar (rote Pfeile), während in der Kontrollgruppe (Abb. 3a, b) erwartungsgemäß keine Parasiten zu sehen sind. Die natürlich infizierte Gruppe scheint mehr Parasitenstadien als die experimentell infizierte Gruppe zu beinhalten. Weiters kann man erkennen, dass das Epithel mancher Zotten bei den infizierten Tieren nicht mehr vollständig intakt ist (Abb. 3d, f, gelbe Pfeile).

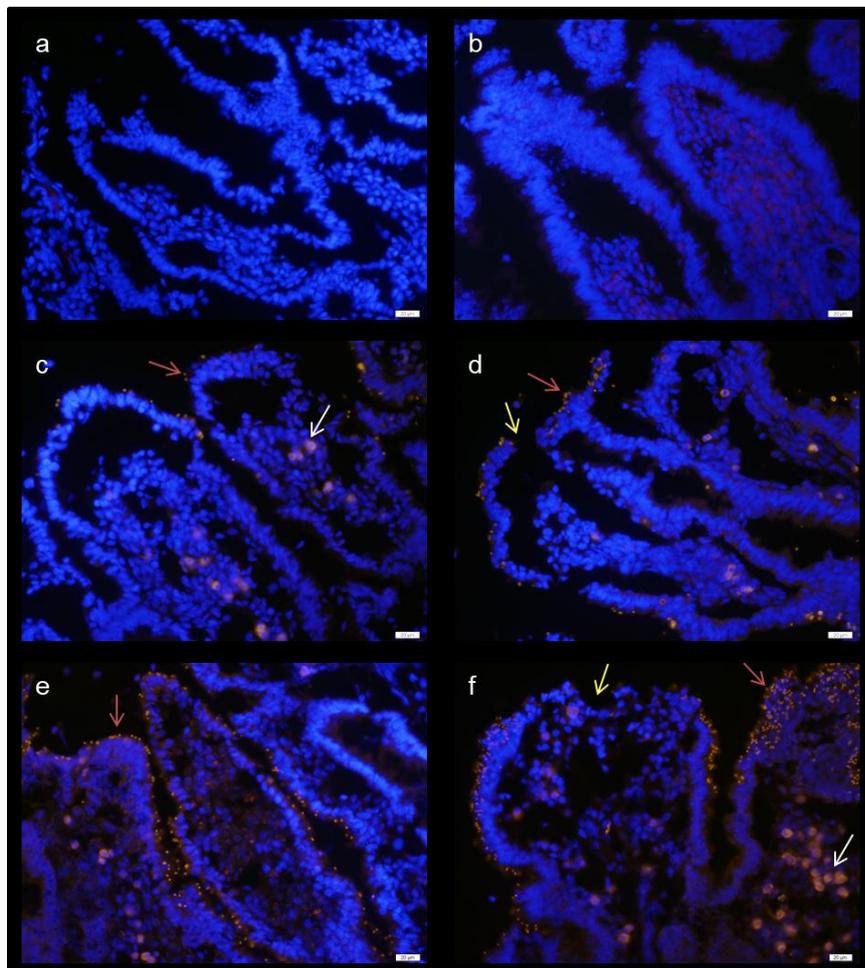


Abb. 3: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von *C. parvum*: **a, b** Kontrolltiere, **c, d** experimentell infizierte Tiere, **e, f** natürlich infizierte Tiere, Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot, rote Pfeile), zerstörtes Zottenepithel (gelbe Pfeile), unspezifische Färbung der Bindegewebszellen (weiße Pfeile), Maßstabsskala 20 μm .

Zur genaueren Untersuchung wurde die Oozystenausscheidung der Kälber quantifiziert. Tabelle 6 stellt die Menge der ausgeschiedenen Oozysten der infizierten Tiere am jeweiligen Studientag dar. Die Kontrolltiere werden nicht in der Tabelle gezeigt, da die Oozystenausscheidung aller Kälber dieser Gruppe stets 0 OpG betrug. Die experimentell infizierten Tiere schieden bereits ab ST 2-4 Oozysten aus, während diese bei den natürlich infizierten Tieren erst ab ST 6-7 nachgewiesen werden konnten (Tab. 6). Dies korrelierte auch mit dem Beginn der klinischen Symptomatik einer Diarrhoe. Die Menge der Oozystenausscheidung der experimentell infizierten Tiere sank im Laufe des Versuches bereits wieder ab, sie betrug am Tag der Euthanasie $1,50-5,93 \times 10^5$ OpG. Bei den natürlich infizierten Tieren hingegen betrug die Menge der ausgeschiedenen Oozysten zu diesem Zeitpunkt mit $2,4-8,3 \times 10^6$ OpG mehr als das Zehnfache (Tab. 6), was den visuell gewonnenen Eindruck untermauert.

Tab. 6: Menge der ausgeschiedenen Oozysten der infizierten Tiere je Studientag in OpG.³

| | experimentell infizierte Tiere | | | | | natürlich infizierte Tiere | | |
|-------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| | Kalb 2 | Kalb 4 | Kalb 6 | Kalb 8 | Kalb 12 | Kalb 5 | Kalb 10 | Kalb 13 |
| ST 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ST 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ST 2 | $1,98 \times 10^5$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ST 3 | $1,98 \times 10^5$ | 0 | $1,00 \times 10^6$ | 0 | $8,90 \times 10^5$ | 0 | 0 | 0 |
| ST 4 | $5,93 \times 10^5$ | $1,80 \times 10^6$ | $4,75 \times 10^6$ | $1,40 \times 10^6$ | $6,20 \times 10^6$ | 0 | 0 | 0 |
| ST 5 | $1,19 \times 10^6$ | $1,20 \times 10^6$ | $3,17 \times 10^6$ | $1,20 \times 10^6$ | $8,90 \times 10^5$ | 0 | 0 | 0 |
| ST 6 | $7,91 \times 10^5$ | $8,00 \times 10^5$ | $1,19 \times 10^5$ | $4,00 \times 10^5$ | $5,90 \times 10^5$ | $4,5 \times 10^6$ | 0 | $5,9 \times 10^5$ |
| ST 7 | $3,95 \times 10^5$ | $3,90 \times 10^5$ | $5,93 \times 10^5$ | $2,00 \times 10^5$ | $1,50 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^6$ | $8,3 \times 10^6$ | $7,5 \times 10^6$ |

³ Die Daten wurden dankenswerterweise vom Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig zur Verfügung gestellt.

4.2. Occludin

Das Protein Occludin formt eine netzartige Struktur rund um das apikale Kompartiment der Epithelzellen der Kontrolltiere (Abb. 4a, b, c). Bei Betrachtung des gesamten Schnittes scheint diese netzartige Struktur bei den experimentell infizierten Tieren (Abb. 4d, e, f) und

den natürlich infizierten Tieren (Abb. 4g, h) zwar weitgehend erhalten, aber nicht so stark ausgeprägt zu sein wie bei den Kontrolltieren, die Fluoreszenz scheint vermindert. Die Sekundärantikörperkontrolle (Abb. 4i) weist im Bereich des Darmepithels keine Fluoreszenz auf, wodurch eine unspezifische Bindung des Antikörpers am Epithel ausgeschlossen werden kann. Lediglich im Bereich der Bindegewebszellen im Zotteninneren kommt es zu einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers (Abb. 3, weiße Pfeile), was sich jedoch nicht auf die Ergebnisse dieser Untersuchung auswirkt.

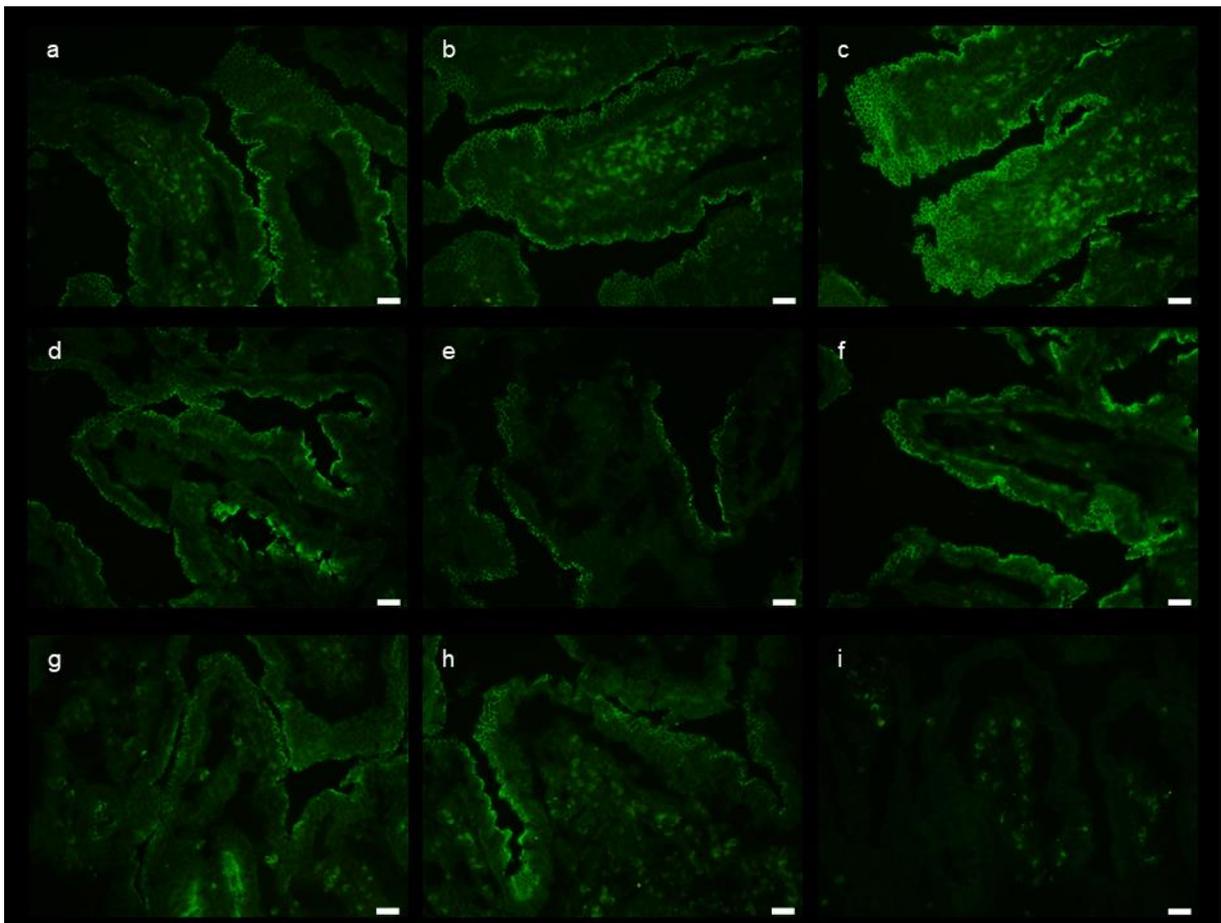


Abb. 4: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin: **a, b, c** Kontrolltiere, **d, e, f** experimentell infizierte Tiere, **g, h** natürlich infizierte Tiere, **i** Sekundärantikörperkontrolle, Occludin (grün), Maßstabsskala 20 μ m.

Abbildung 5, welche mittels des detailreicheren Konfokalmikroskops aufgenommen wurde, zeigt wiederum die stärkere Ausprägung der netzartigen Struktur von Occludin in der Kontrollgruppe (Abb. 5a, b). In den Schnitten der natürlich infizierten Gruppe (Abb. 5d) kann man vor allem im Bereich der Zottenspitzen erkennen, dass die Struktur nicht mehr vollständig intakt ist.

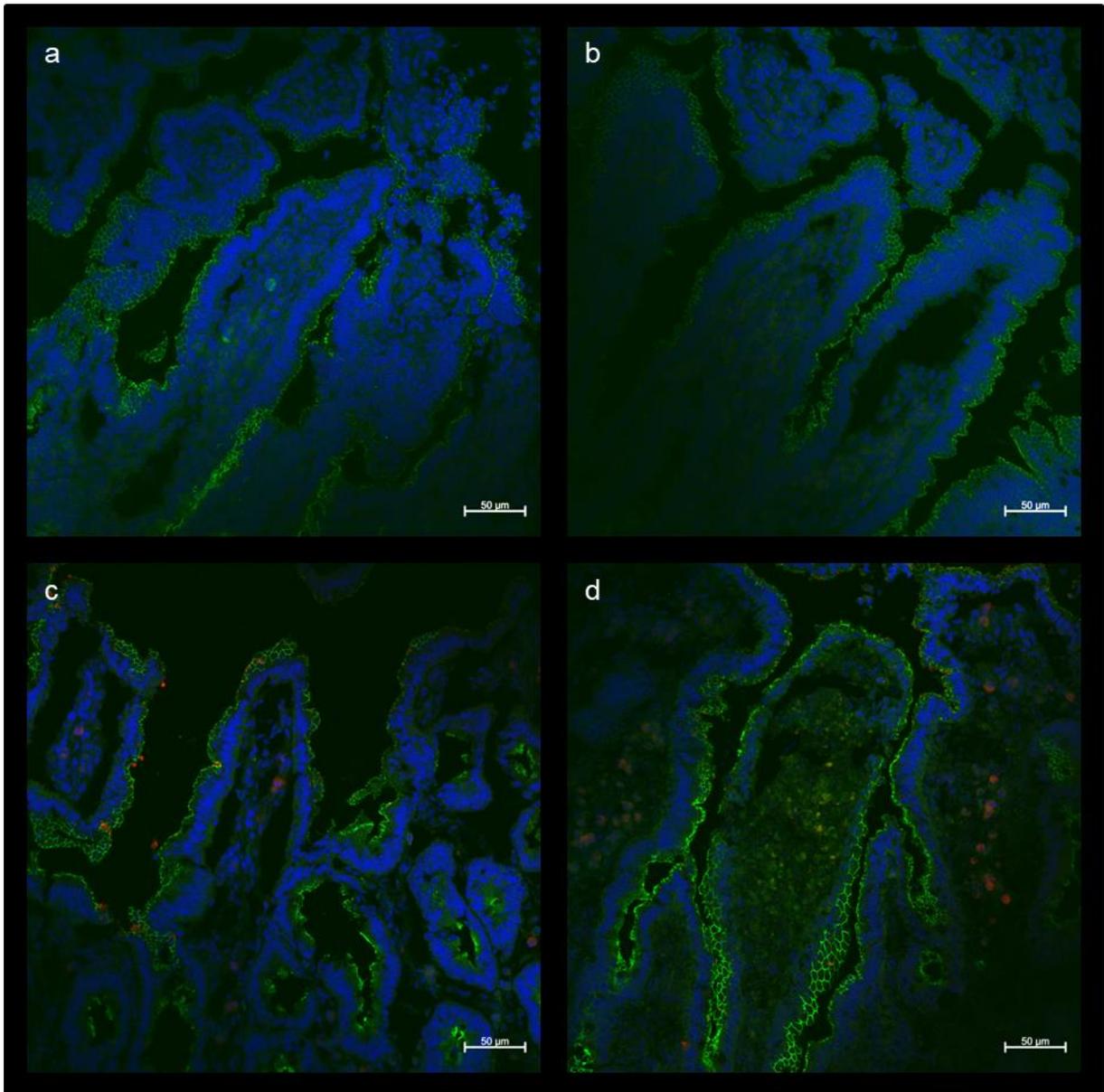


Abb. 5: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin: **a, b** Kontrolltiere, **c** experimentell infizierte Tiere, **d** natürlich infizierte Tiere, Occludin (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Maßstabsskala 50 µm.

Bei stärkerer Vergrößerung ergibt sich ein noch deutlicheres Bild des Proteinnetzes. Sowohl bei den experimentell (Abb. 6c) als auch bei den natürlich infizierten Tieren (Abb. 6e) finden sich Zotten, deren Proteinstruktur, verglichen mit jener der Kontrolltiere (Abb. 6a, b), noch intakt ist. Die Abbildungen 6d und 6f hingegen zeigen Zotten mit großem Strukturverlust. An manchen Stellen der Schnitte der natürlich infizierten Tiere scheint Occludin zudem auch intrazellulär detektierbar (Abb. 6e, f, weiße Pfeile). Es ist darüber hinaus auch in dieser

Darstellung zu erkennen, dass die natürlich infizierten Tiere mehr Entwicklungsstadien von *C. parvum* aufweisen als die experimentell infizierten Tiere.

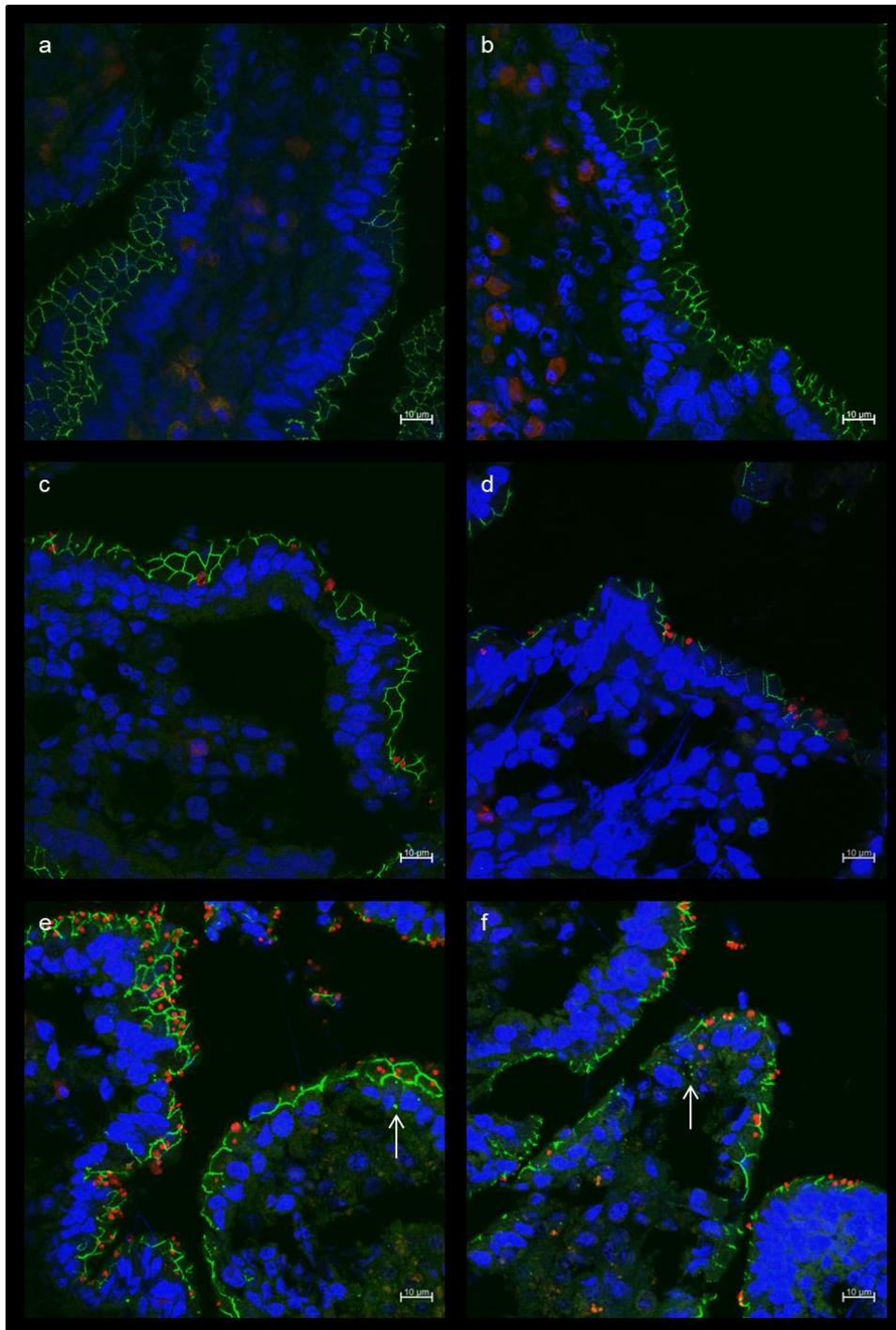


Abb. 6: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin: **a, b** Kontrolltiere, **c, d** experimentell infizierte Tiere, **e, f** natürlich infizierte Tiere, Occludin (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Pfeile werden im Text erklärt, Maßstabsskala 10 µm.

4.3. Claudin-1

Das Protein Claudin-1 zeigt eine ähnliche Struktur wie Occludin, jedoch erscheint die Färbung bei Betrachtung des gesamten Schnittes nicht so regelmäßig. Es scheint sich an manchen Stellen des Darmepithels besser anzufärben als an anderen. Die Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 zeigt keine Unterschiede in der Ausprägung des Proteins zwischen der Kontrollgruppe (Abb. 7a, b, c) und der experimentell infizierten Gruppe (Abb. 7d, e, f) bzw. der natürlich infizierten Gruppe (Abb. 7g, h). Es ist lediglich die stärkere Zerstörung des Zottenepithels der infizierten Tiere nachzuweisen (Abb. 7e, h). Die Sekundärantikörperkontrolle (Abb. 7i) weist auch hier keine Fluoreszenz im Epithel auf.

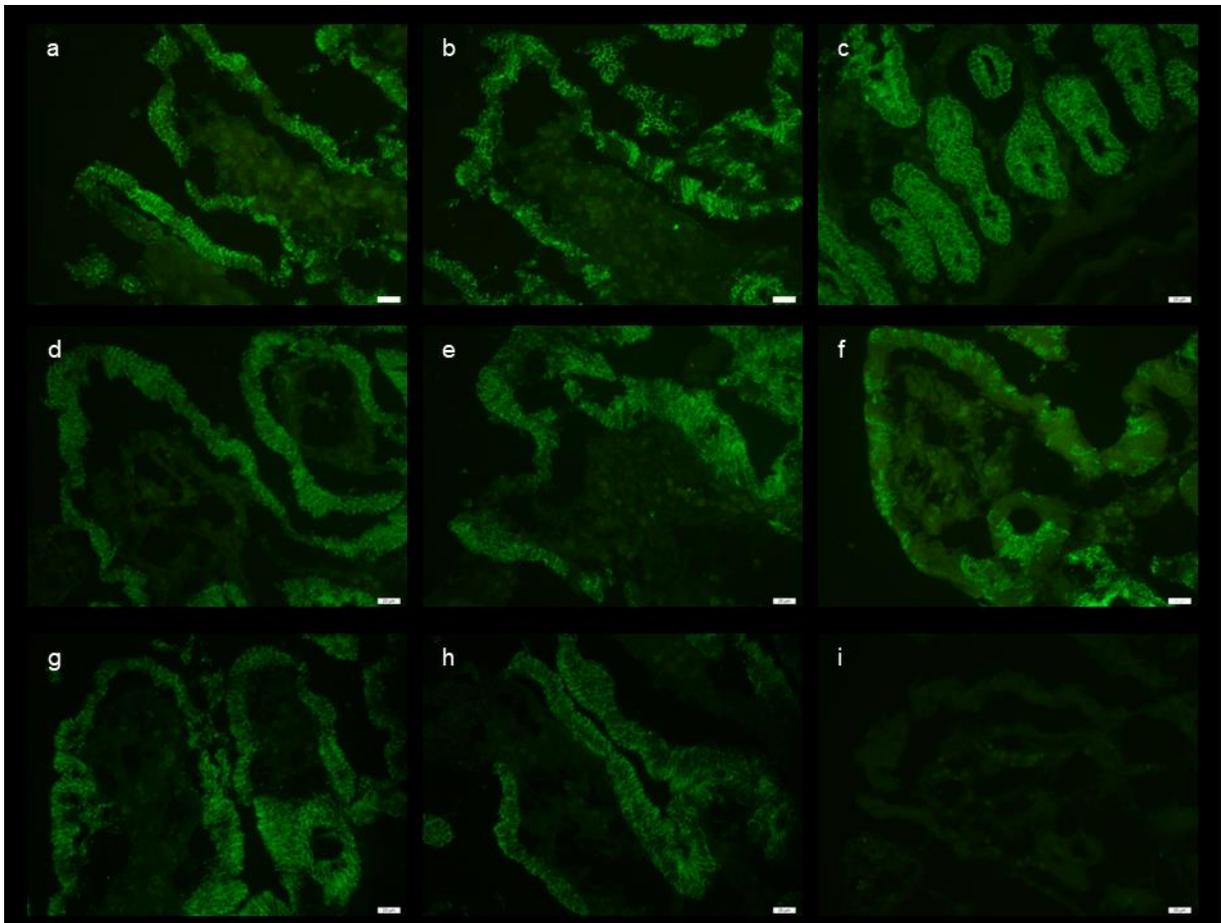


Abb. 7: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-1: **a, b, c** Kontrolltiere, **d, e, f** experimentell infizierte Tiere, **g, h** natürlich infizierte Tiere, **i** Sekundärantikörperkontrolle, Claudin-1 (grün), Maßstabsskala 20 μm .

Eine ergänzende Betrachtung mittels des hochauflösenden Konfokalmikroskops zeigte ebenfalls keine Hinweise auf einen Unterschied der Expression des Proteins zwischen Kontrolltieren und infizierten Tieren (Abb. 8, 9).

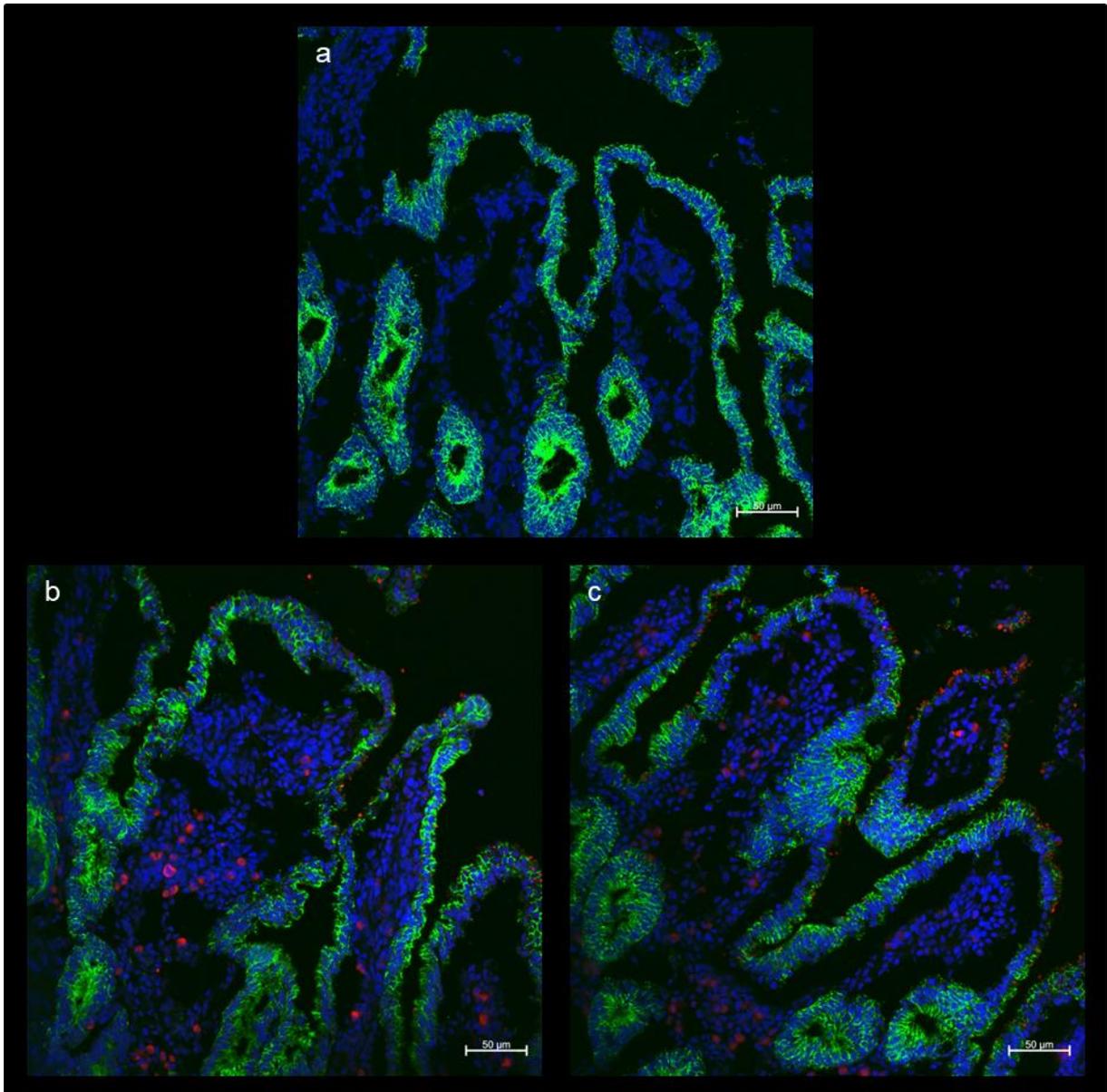


Abb. 8: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-1: **a** Kontrolltiere, **b** experimentell infizierte Tiere, **c** natürlich infizierte Tiere, Claudin-1 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Maßstabsskala 50 µm.

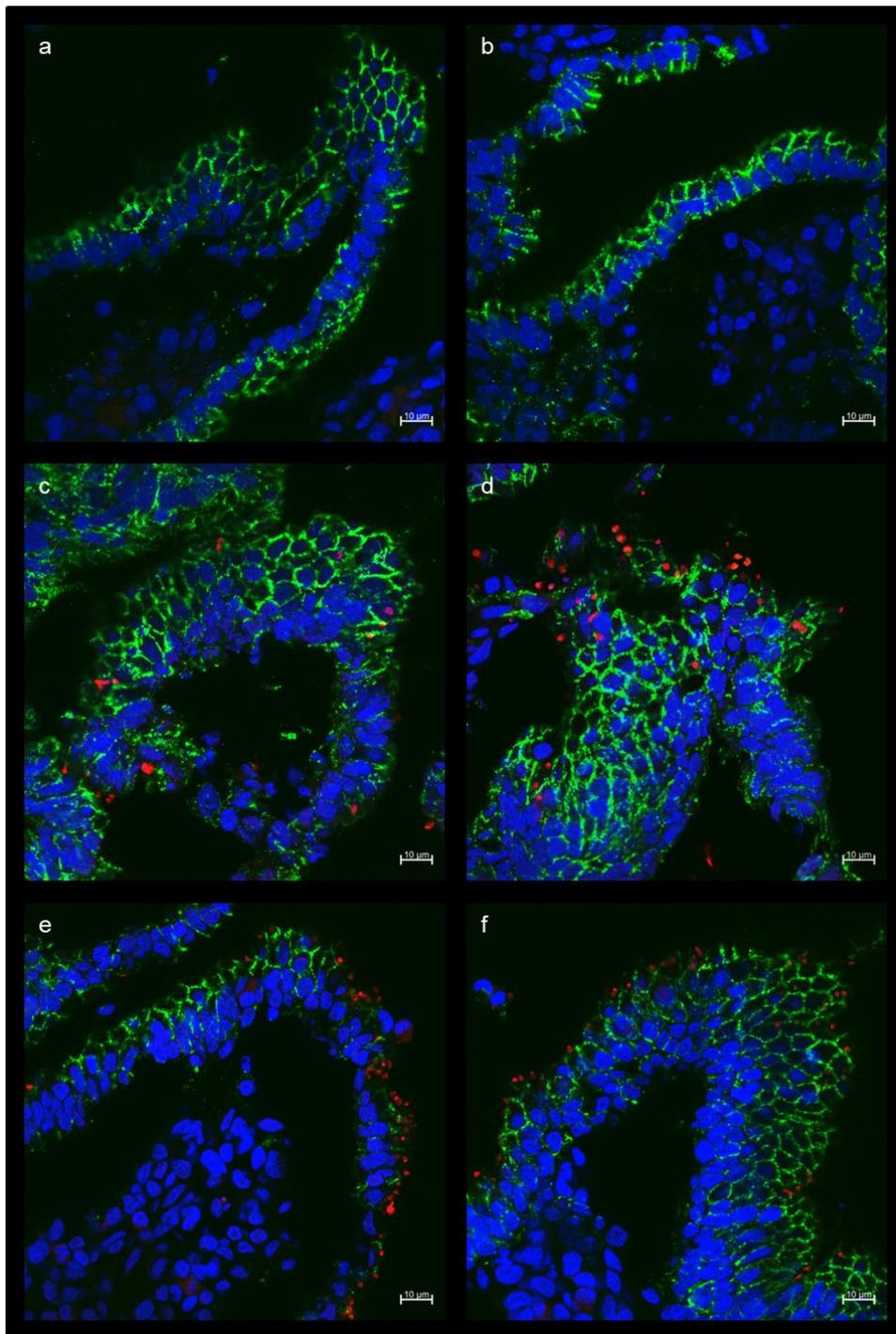


Abb. 9: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-1: **a, b** Kontrolltiere, **c, d** experimentell infizierte Tiere, **e, f** natürlich infizierte Tiere, Claudin-1 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Maßstabsskala 10 µm.

4.4. Claudin-3

Abbildungen 10-12 zeigen die Proteinexpression von Claudin-3. Das Protein bildet eine netzartige Struktur rund um das apikale Kompartiment der Zelle, es lässt sich aber im Gegensatz zu Occludin auch im basolateralen Kompartiment nachweisen. In den experimentell infizierten Tieren (Abb. 10d, e, f) erscheint das Fluoreszenzsignal stärker, d. h. es scheint mehr Protein exprimiert zu sein als in den natürlich infizierten Tieren (Abb. 10g, h). In den Kontrolltieren (Abb. 10a, b, c) erscheint die Fluoreszenz von Claudin-3 vergleichsweise schwächer. Darüber hinaus kann das Protein in der Gruppe der experimentell infizierten Tiere vor allem apikal an den Zellgrenzen lokalisiert werden, während es in der Kontrollgruppe gleichmäßiger entlang der Zellgrenzen verteilt zu sein scheint. Die Sekundärantikörperkontrolle (Abb. 10i) zeigt erneut keine Fluoreszenz im Bereich des Epithels.

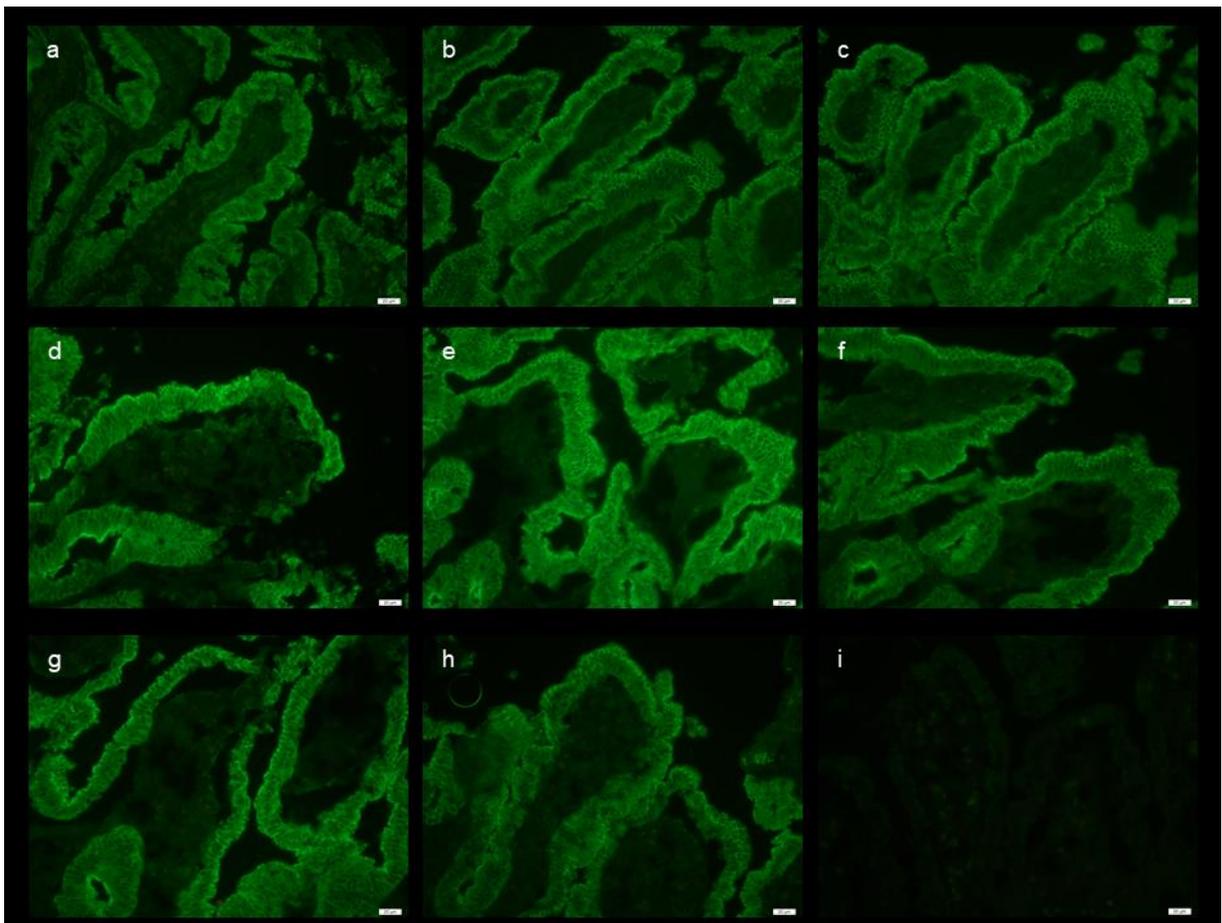


Abb. 10: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-3: **a, b, c** Kontrolltiere, **d, e, f** experimentell infizierte Tiere, **g, h** natürlich infizierte Tiere, **i** Sekundärantikörperkontrolle, Claudin-3 (grün), Maßstabsskala 20 μ m.

In der konfokalmikroskopischen Aufnahme ist nochmals die vermehrt apikale Lokalisation von Claudin-3 in den experimentell infizierten Tieren (Abb. 11b, weiße Pfeile) erkennbar. In den Schnitten der natürlich infizierten Tiere erscheint das Protein zusätzlich intrazellulär detektierbar (Abb. 11c, orange Pfeile).

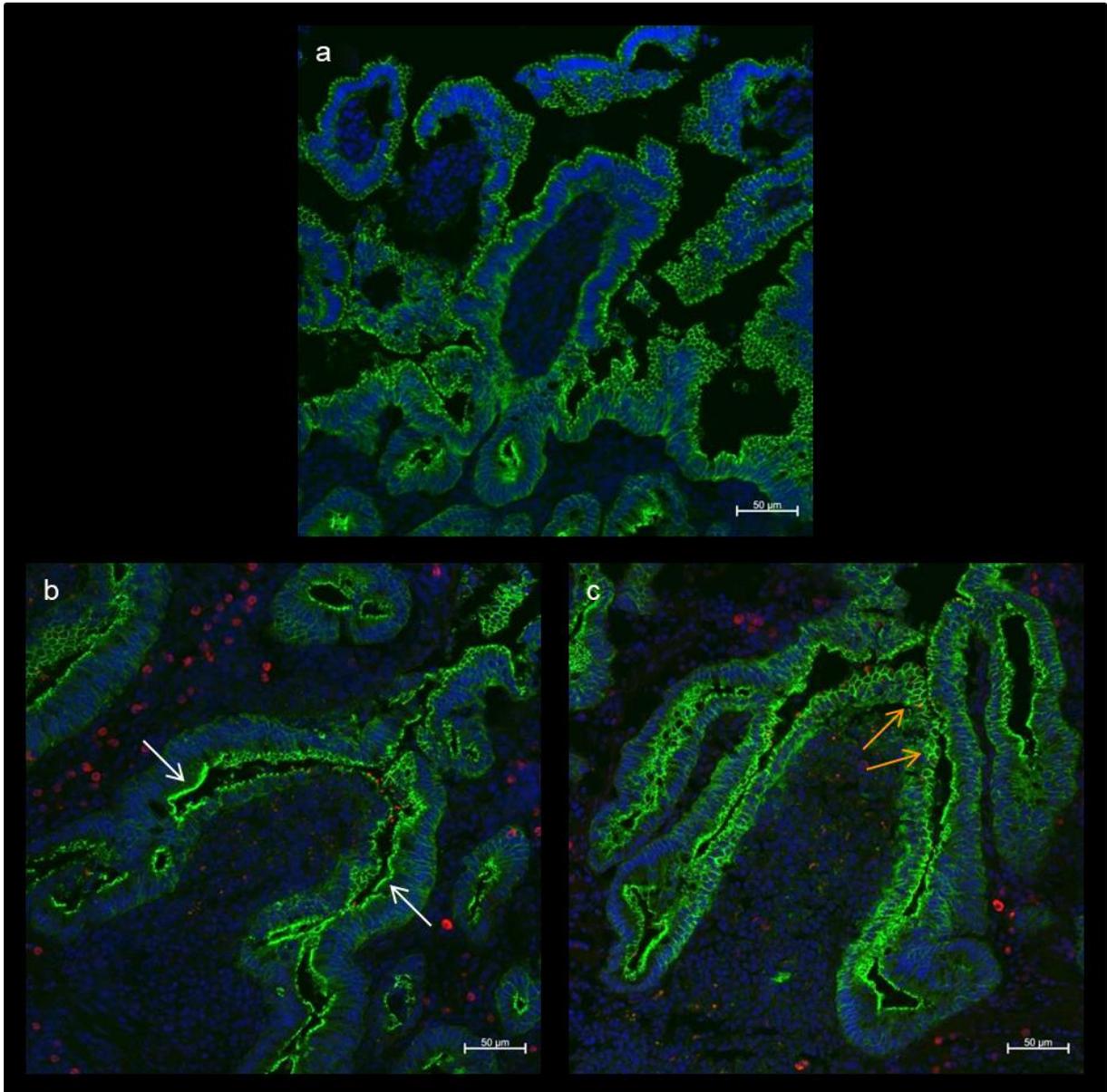


Abb. 11: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-3: **a** Kontrolltiere, **b** experimentell infizierte Tiere, **c** natürlich infizierte Tiere, Claudin-3 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Pfeile werden im Text erklärt, Maßstabsskala 50 µm.

Bei Betrachtung mit stärkerer Vergrößerung bestätigt sich der Eindruck der veränderten Lokalisation von Claudin-3 bei infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren

(Abb. 12a, b). Die experimentell infizierte Gruppe zeigt die verstärkte Fluoreszenz im apikalen Kompartiment der Zelle (Abb. 12c, d, weiße Pfeile), die natürlich infizierte Gruppe intrazellulär (Abb. 12e, f, orange Pfeile).

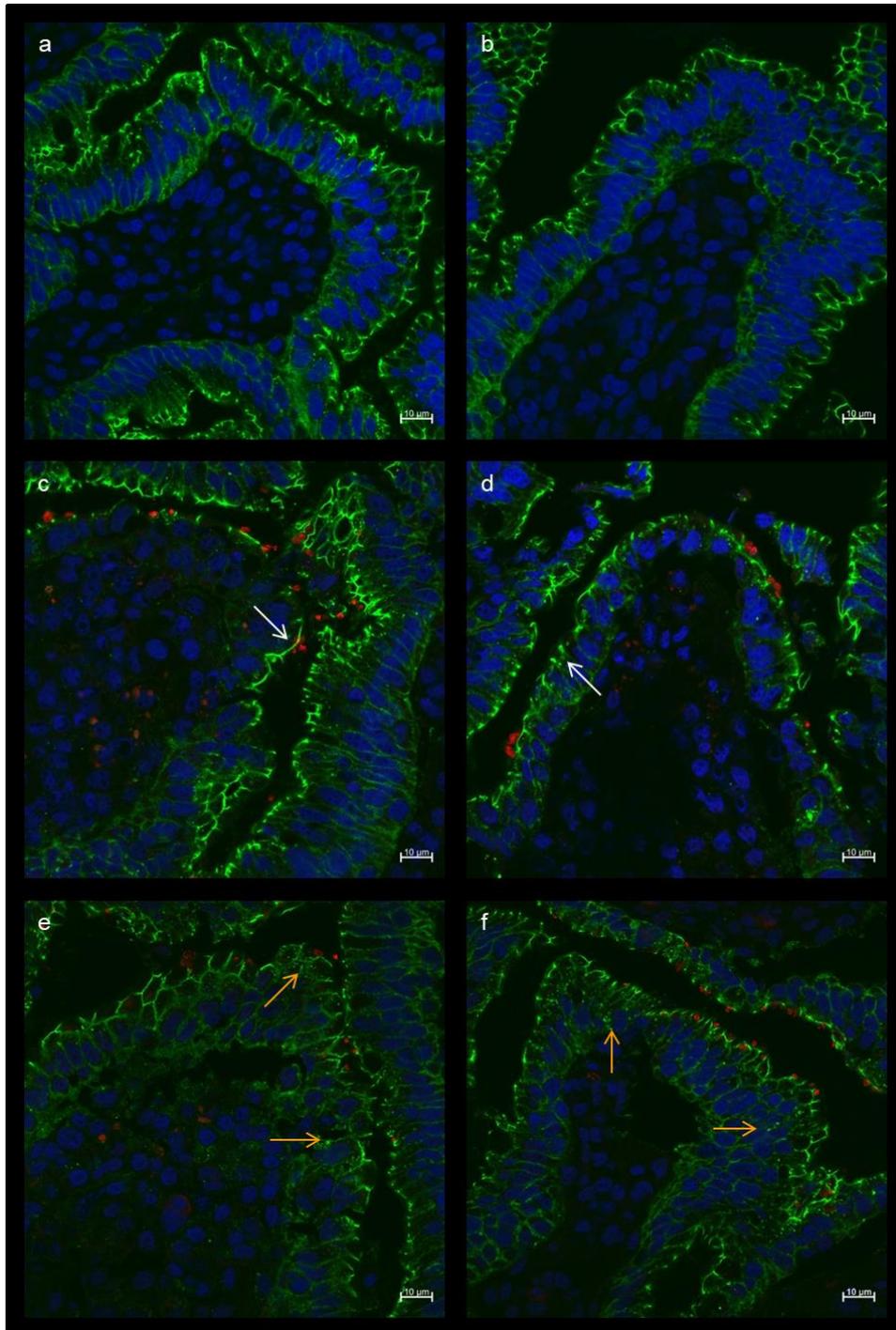


Abb. 12: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-3: **a, b** Kontrolltiere, **c, d** experimentell infizierte Tiere, **e, f** natürlich infizierte Tiere, Claudin-3 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Pfeile werden im Text erklärt, Maßstabsskala 10 μm.

4.5. Genexpression

Die mRNA-Expression von Claudin-1 war in natürlich infizierten Tieren herabreguliert ($p = 0,012$, Abb. 13b), wohingegen sich die Expression in experimentell infizierten Tieren nicht signifikant von jener der Kontrolltiere unterschied (Abb. 13a).

Die mRNA Expression von Claudin-3 in experimentell infizierten Tieren war im Mittel um das 5,288-fache signifikant höher als in Kontrolltieren ($p = 0,003$, Abb. 13a). In natürlich infizierten Tieren betrug dieser Faktor durchschnittlich 2,415, erreichte jedoch knapp keine statistische Signifikanz ($p = 0,078$, Abb. 13b).

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und infizierten Tieren in der mRNA Expression von Claudin-5 (Abb. 13a, b).

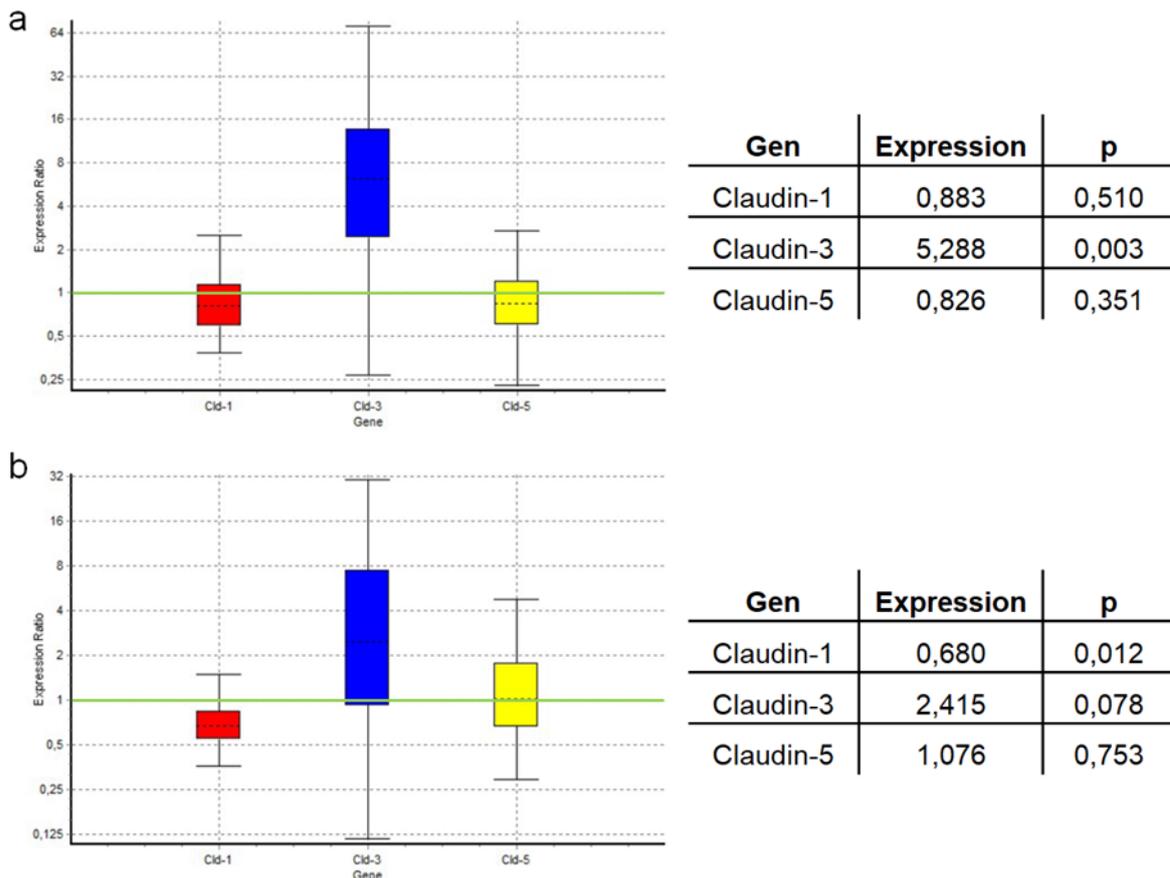


Abb. 13: Relative mRNA-Expression von Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-5 in **a** experimentell infizierten Tieren und **b** natürlich infizierten Tieren verglichen mit Kontrolltieren, deren Expressionsrate gleich 1 gesetzt wurde (grüne Linie). Im Boxplot wird das Minimum, das 1. Quartil, der Median, das 3. Quartil und das Maximum abgebildet. Die Tabelle gibt die relative mRNA Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren und den jeweiligen Signifikanzwert an.

5. Diskussion

Der Parasit *C. parvum* verursacht weltweit zahlreiche Infektionen und nachfolgende Verluste bei neugeborenen Kälbern, aber auch Menschen. Eine ursächliche Therapie gibt es derzeit nicht. Es gibt Hinweise, dass eine Veränderung der Tight Junction Proteine im Darmepithel zur Pathogenese einer *C. parvum* Infektion beitragen kann. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, diese im Jejunumepithel von gesunden und infizierten neugeborenen Kälbern vergleichend zu untersuchen.

Der Nachweis der stattgefundenen Infektion der Versuchskälber erfolgte über die Quantifizierung der Oozystenausscheidung im Kot. Dadurch konnte gezeigt werden, dass experimentell infizierte Tiere früher Oozysten ausschieden als natürlich infizierte. Es ist daher naheliegend, dass der unterschiedliche Erstausscheidungszeitpunkt auf die unterschiedlichen Infektionswege zurückzuführen ist. Die experimentell infizierte Gruppe wurde am ersten Lebenstag mit einer definierten Menge an Oozysten infiziert, die Tiere der natürlich infizierten Gruppe nahmen vermutlich am Herkunftsbetrieb eine unbestimmte, wahrscheinlich geringere Menge an Oozysten auf natürlichem Weg aus der Umgebung auf. Daher dauerte die Präpatenz bei den natürlich infizierten Tieren länger. Aufgrund der späteren Patenz betrug die Menge der ausgeschiedenen Oozysten nach sieben Tagen bei den natürlich infizierten Tieren mehr als das Zehnfache von jener der experimentell infizierten Tiere. Dies ist auch in den Immunfluoreszenzfärbungen anhand der vorhandenen Entwicklungsstadien des Parasiten zu erkennen. Die drei Versuchsgruppen spiegeln somit unterschiedliche Infektionsstadien wider: die Kontrollgruppe durchlief erwartungsgemäß keine Infektion, die natürlich infizierte Gruppe befand sich am Tag der Probenentnahme auf dem Höhepunkt der Infektion und die experimentell infizierte Gruppe bereits in der späten Phase derselben.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression von Occludin, Claudin-1 und Claudin-3 im Jejunumepithel der Kälber dargestellt. Dabei zeigte sich für jedes dieser drei genannten Proteine ein unterschiedliches Ergebnis: Die Proteinexpression von Claudin-1 zeigte keinen Unterschied zwischen infizierten Tieren und Kontrolltieren. Im Falle des Proteins Occludin kam es demgegenüber zu einer verminderten Expression in infizierten Tieren. Claudin-3 schließlich schien in den experimentell infizierten Tieren eine deutliche und in den natürlich infizierten Tieren eine geringfügige Hochregulation im Gegensatz zu den Kontrolltieren aufzuweisen. Im Folgenden sollen diese Befunde im Kontext mit dem aktuellen Wissensstand diskutiert werden.

Das Protein Occludin hat eine derzeit noch unbekannte, aber dennoch unverzichtbare Funktion in der Regulation der Tight Junctions (Anderson und van Itallie 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in infizierten Tieren zu einer Verminderung des Proteins an den Zellgrenzen kommt. Auch Kumar et al. (2018) berichteten eine Herabregulation von Occludin im Darmepithel von mit *C. parvum* infizierten Mäusen und im Caco-2 Zellkulturmodell. Im Falle des Proteins Occludin können also die aus dem Zellkulturmodell bzw. aus den Versuchen mit Mäusen mittels Immunfluoreszenzmarkierung und Western Blot gewonnenen Informationen auch auf Kälber übertragen werden. Demgegenüber konnte mittels qPCR nur in infizierten Mäusen eine Verminderung der mRNA-Expression registriert werden, nicht aber in Caco-2 Zellen, was entweder auf den Versuchsaufbau (*in vivo* vs. *in vitro*) oder auf Unterschiede in der mRNA Expression verschiedener Spezies zurückzuführen ist (Kumar et al. 2018). Zur mRNA-Expression von Occludin in Kälbern liegen noch keine Daten vor. In natürlich infizierten Tieren ist Occludin zudem auch intrazellulär detektierbar. Dies deutet auf eine Internalisierung des Proteins im frühen Stadium der Infektion mit darauffolgender Degradierung im Zellinneren hin, da das Protein in den experimentell infizierten Tieren im späteren Stadium der Infektion nicht mehr intrazellulär nachweisbar war. Ein möglicher Grund dafür ist die bereits gut beschriebene durch TNF α induzierte Endozytose von Occludin als Folge einer Immunreaktion (Marchiando et al. 2010, McDonald 2000). Kumar et al. (2018) zeigten zudem eine erhöhte mRNA-Expression von TNF α in der Darmschleimhaut von Mäusen nach Infektion mit *C. parvum*, was die obige Argumentation untermauert. Im Zellkulturmodell wurde außerdem auch eine durch *C. parvum* induzierte Autophagie gewisser Wirtsproteine nachgewiesen, die zur Verminderung der Expression von Occludin führte (Priyamvada et al. 2021). Ob diese Herabregulation und Internalisierung einen Einfluss auf die Funktion der Tight Junctions und deren Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Epithelbarriere hat kann jedoch nicht zweifelsfrei abgeleitet werden. In Occludin Knockout Mäusen zum Beispiel blieb trotz fehlendem Occludin die Funktion der Schleimhautbarriere erhalten (Saitou et al. 2000).

Claudin-1 kann der Gruppe der Barriere-formenden Claudine zugeordnet werden und wird in allen Epithelien entlang des Verdauungstraktes exprimiert (Garcia-Hernandez et al. 2017). In den in dieser Arbeit analysierten Jejunumschnitten von neugeborenen Kälbern konnte kein Unterschied in der Expression des Proteins zwischen experimentell und natürlich infizierten Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden. Auch im Zellkulturmodell und in Versuchen mit Mäusen zeigte sich diese Stabilität des Proteins (Kumar et al. 2018). Zusätzlich wurde in der

vorliegenden Arbeit eine Quantifizierung der Genexpression der untersuchten Claudine durchgeführt. Entsprechend der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung unterschied sich die Genexpression von Claudin-1 in experimentell infizierten Kälbern nicht von jener der Kontrollkälber. In natürlich infizierten Kälbern hingegen war die Genexpression mit einem Faktor von 0,680 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert. Diese mittels qPCR nachweisbare Verringerung war jedoch in der Immunfluoreszenzfärbung nicht zu erkennen, was möglicherweise in der geringeren Sensitivität der Methode begründet ist. Der Unterschied in der Genexpression zwischen experimentell und natürlich infizierten Tieren könnte auf eine Herabregulation der Genexpression von Claudin-1 im frühen Stadium der Infektion mit *C. parvum* hinweisen, die jedoch schnell wieder stabilisiert wird und sich somit nicht auf Proteinebene auswirkt. Ausgehend von der Annahme, dass das Protein eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion einnimmt, scheint es möglich, dass es durch Signale des Parasiten zu einer verringerten Genexpression (zur Invasionserleichterung) kommt, die Epithelzellen jedoch danach trachten, dieses Protein an den Zellgrenzen aufrechtzuerhalten bzw. es durch erneute Stabilisierung der Genexpression auf einem konstanten Level zu halten. Dieser Hypothese sollte in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

Claudin-3 zählt ebenso wie Claudin-1 zu den abdichtenden Claudinen (Milatz et al. 2010). Es lässt sich mittels Immunfluoreszenzfärbung in den apikalen und basolateralen Kompartimenten der Zellen darstellen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine Hochregulation von Claudin-3 im Laufe des Infektionsgeschehens erkennbar. Es zeigte sich in den experimentell infizierten Tieren eine apikale Anreicherung, in den natürlich infizierten Tieren färbt sich das Protein zusätzlich intrazellulär an. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass es aufgrund der Barrierefunktion von Claudin-3 nach der Infektion über eine vermehrte Genexpression zu einer gesteigerten Neubildung des Proteins und zu dessen Transport an die Zellgrenzen kommt, um den parazellulären Raum zu verdichten. In den Präparaten der natürlich infizierten Tiere stellen dementsprechend die intrazellulär angefärbten Strukturen die Proteine während des Transportes aus dem Endoplasmatischen Retikulum bzw. dem Golgi-Apparat zur Zellmembran dar. In den experimentell infizierten Tieren hingegen befinden sich die neugebildeten Proteine aufgrund des schnelleren Verlaufes der Infektion schon an den apikalen Zellgrenzen. Die mRNA Expression von Claudin-3 korreliert mit diesem anhand der Immunfluoreszenzfärbungen gewonnenen Eindruck. In experimentell infizierten Tieren ist die

mRNA-Expression über fünfmal so hoch und in natürlich infizierten Tieren mehr als doppelt so hoch wie in den Kontrolltieren. Damit spiegeln diese Ergebnisse die vermehrte, bei experimentell infizierten gegenüber natürlich infizierten Kälbern schon weiter fortgeschrittene Genexpression und die dadurch gesteigerte Neubildung der Claudin-3 Proteine wider. Im Gegensatz dazu zeigte sich in infizierten Caco-2 Zellen im Western Blot eine signifikante Verminderung in der Proteinexpression von Claudin-3 (Kumar et al. 2018). Diese Differenz könnte wiederum einerseits durch den Versuchsaufbau (Immunfluoreszenzfärbung bzw. qPCR vs. Western Blot, *in vivo* vs. *in vitro*) bedingt sein, andererseits aber auch einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus von Claudin-3 zwischen verschiedenen Spezies (Rind vs. Mensch) suggerieren. Ähnliches postulierten auch Kumar et al. (2018) für die in deren Studie festgestellten Unterschiede in Caco-2 Zellen und Mäusen. Ein Vergleich der Proteinexpression mit jener in Mäusen ist bei diesem Protein nicht möglich, da dazu keine Versuchsergebnisse vorliegen.

Die dargestellten Prozesse lassen zwei unterschiedliche Interpretationen zu. Einerseits könnte es sich dabei um einen Infektionsmechanismus des Parasiten zur besseren Überwindung der Darmbarriere handeln, andererseits aber auch um einen Verteidigungsmechanismus der Wirtszelle. Die Herabregulation und Internalisierung von Occludin deutet möglicherweise auf eine Infektionsstrategie des Parasiten hin. Über die ausgelöste Entzündungsreaktion kommt es durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie IL-13 und TNF α unter anderem zu einer erhöhten Permeabilität der Darmbarriere und zu einer Endozytose von Occludin (Marchiando et al. 2010), was die Regulation der anderen Tight Junction Proteine beeinflusst und dem Parasiten die Invasion erleichtert. Andererseits könnte es sich dabei aber auch um eine physiologische Reaktion der Zelle handeln, die über die Entzündungsreaktion und darauffolgende Diarrhoe versucht, den Parasiten schnellstmöglich aus dem Körper zu eliminieren (Priyamvada et al. 2021). Die Stabilität von Claudin-1 und die Hochregulation von Claudin-3 deuten mit Bezug auf ihre Barriere-formenden Eigenschaften eher auf eine Abwehrreaktion der Wirtszelle gegen den Parasiten hin. Daraus ergeben sich mögliche Implikationen für die Therapie der Kryptosporidiose. Diese könnte auf eine Stärkung und Hochregulation der Proteine Claudin-1 und Claudin-3 abzielen, um so die Abwehrkraft der Zellen bzw. des Epithelverbands zu verbessern.

Die Tight Junctions des Darmepithels stellen einen beliebten Angriffsort für diverse Pathogene dar. Veränderungen der Tight Junction Proteine durch eine Infektion mit dem

Parasiten *Toxoplasma gondii* sind bereits gut beschrieben (Briceño et al. 2016, Weight et al. 2015). *T. gondii* wird wie *C. parvum* ebenfalls der Klasse der Coccidea zugeordnet und invadiert den Wirt über die Dünndarmschleimhaut (Deplazes et al. 2021). Laut Weight et al. (2015) reichert sich Occludin in mit *T. gondii* infizierten Mauszellen zuerst apikal an und verschiebt sich im Laufe der Infektion ins Zellinnere, wodurch es zu einem zunehmenden Verlust seiner Funktion an der Zellmembran kommt. Weiters konnte eine Auflösung und Umverteilung der netzartigen Struktur der Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 in *T. gondii* infizierten Caco-2 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden (Briceño et al. 2016). Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt dies die zentrale Rolle von Occludin im Infektionsgeschehen.

Ein weiterer Parasit, *Giardia duodenalis*, befällt ebenso den Darmtrakt von Kälbern und heftet sich an der Oberfläche von Enterozyten an (Deplazes et al. 2021). Die Auswirkungen einer Giardiose auf die Proteine der Schlussleiste wurden anhand von Immunfluoreszenzfärbungen an infizierten Caco-2 Zellen untersucht. Im Gegensatz zu den Befunden der vorliegenden Arbeit wurde eine Verschiebung von Claudin-1 ins Zellinnere, jedoch keine Herabregulation des Proteins festgestellt. Diese Relokalisierung von Claudin-1 resultierte in einem drastischen Anstieg der parazellulären Permeabilität (Maia-Brigagão et al. 2012). Da *G. duodenalis* einen rein extrazellulären Entwicklungszyklus durchläuft (Deplazes et al. 2021), zeigt dies, dass schon das Anhaften des Parasiten an den Enterozyten bzw. Signale dessen eine Störung der Darmbarriere hervorrufen können. Es scheint also Wirts- und Parasitenabhängig zu unterschiedlichen Veränderungen der epithelialen Barriere zu kommen.

Im Gegensatz zum Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit kann man im Zellkulturmodell solch geringe Verschiebungen der Proteine besser darstellen als in Schnitten der intakten Darmwand. Beim Anfertigen histologischer Schnitte des Darmepithels kommt es zu schiefen Anschnitten und Überlagerungen mancher Zellen, wodurch die Beurteilung einzelner Zellen teilweise nur eingeschränkt möglich ist. In Zellkulturen hingegen liegen die Epithelzellen vorrangig als Monolayer vor und können so direkt angefärbt werden. Dies erleichtert die Beurteilung der einzelnen Zellen erheblich. Allerdings stellen Zellkulturen nur Modelle dar, die nicht direkt mit der Realität gleichgesetzt werden können. Im Falle des Parasiten *C. parvum* kann der Lebenszyklus zum Beispiel nur *in vivo* abgeschlossen werden (Lendner und Dauschies 2014), was die Notwendigkeit für Versuche an betroffenen Tieren unterstreicht.

Die vorgenannten Ausführungen zu Forschungen an anderen Parasiten zeigen, dass diese zum Teil auch Aufschluss über die Veränderungen der Tight Junctions während einer Infektion mit *C. parvum* geben könnten. Wesentlich ist es jedoch, beim Vergleich mit anderen Studien den jeweiligen Versuchsaufbau und die damit verbundenen Vor- und Nachteile zu berücksichtigen und entsprechend zu interpretieren.

Die vorliegende Arbeit wird durch die sehr kleine und in den jeweiligen Gruppen unterschiedlich große Stichprobengröße von drei, vier und fünf Kälbern limitiert. Die quantitative Beurteilung der Proteinveränderungen ist ebenfalls limitiert, da mittels Immunfluoreszenzfärbung nur eine Tendenz wahrgenommen werden kann, aber diese nicht, wie zum Beispiel mittels Western Blot, quantifiziert werden kann. Eine mögliche Veränderung der Proteine Claudin-4 und ZO-1 konnte mit dem angewandten Färbeprotokoll und den verwendeten Antikörpern nicht dargestellt und interpretiert werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für Folgestudien mit anderen Antikörpern und zusätzlichen quantitativen Methoden.

Trotz der beschriebenen Limitationen konnte die Hypothese, dass eine Infektion mit *C. parvum* zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung der Tight Junction Muster im Jejunumepithel neugeborener Kälber führt, zumindest für einen Teil der Proteine bestätigt werden, was die Heterogenität der Tight Junction Proteine bzw. deren Funktionen widerspiegelt. Ausgehend von diesen Ergebnissen und angesichts der oben dargestellten Limitationen ergeben sich eine Reihe von zusätzlichen Forschungsfragen, welche im Rahmen von weiterführenden Studien bearbeitet werden sollten.

6. Zusammenfassung

Der Parasit *Cryptosporidium parvum* hat große Bedeutung sowohl in der Nutztiermedizin als auch in der Humanmedizin. Eine Infektion führt insbesondere bei immungeschwächten Patienten zu wässriger Diarrhoe, für die bis dato keine kausale Therapie verfügbar ist. Die Pathogenese einer *C. parvum* Infektion ist multifaktoriell, wobei die Tight Junction Proteine als wichtiger Teil der Darmbarriere eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie einer Infektion spielen könnten. Der aktuelle Kenntnisstand zu Veränderungen im Tight Junction Muster im Darmepithel, die das Eindringen des Parasiten fördern oder aber hemmen könnten, ist gering und basiert auf Befunden aus Maus- und Zellkulturmodellen. Das Ziel dieser Arbeit war daher, ausgewählte Tight Junction Proteine im Jejunumepithel von infizierten Kälbern vergleichend mit Kontrolltieren qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwölf neugeborene Kälber in drei Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe, eine experimentell infizierte Gruppe, welche am ersten Lebenstag mit *C. parvum* infiziert wurde, und eine natürlich infizierte Gruppe, deren Individuen eine Feldinfektion durchmachten. Nach der Euthanasie am achten Lebenstag wurden Proben des distalen Jejunumepithels entnommen und mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie bzw. qPCR auf die Protein- bzw. mRNA-Expression von Occludin, Claudin-1 und Claudin-3 untersucht. Es zeigte sich eine verringerte Proteinexpression von Occludin an den Zellgrenzen in infizierten Tieren verglichen mit Kontrolltieren, sowie eine Internalisierung des Proteins in natürlich infizierten Tieren. Das Protein Claudin-1 zeigte demgegenüber keine Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Tieren. Claudin-3 war in infizierten Tieren sowohl auf Protein- als auch auf Genebene hochreguliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Heterogenität der Tight Junction Proteine und deren Funktionen während einer Infektion mit *C. parvum*. Die Herabregulation von Occludin im Zuge der Infektion deutet auf eine Invasionsstrategie des Parasiten hin, während die Hochregulation von Claudin-3 einen Abwehrmechanismus der Enterozyten gegen *C. parvum* darstellen könnte. Eine gezielte Beeinflussung einzelner Tight Junction Proteine wäre somit möglicherweise ein neuer Therapieansatz. Dazu sind jedoch weiterführende Untersuchungen zur Rolle der Tight Junction Proteine während einer *C. parvum* Infektion notwendig.

7. Summary

Influence of *Cryptosporidium parvum* infection on tight junction proteins in the jejunal epithelium of newborn calves

The parasite *Cryptosporidium parvum* is of great importance both in livestock and human medicine. An infection leads to watery diarrhea, especially in immunocompromised patients. To date there is no causal therapy available. The etiopathology of an infection caused by *C. parvum* is multifactorial. The tight junction proteins as an essential part of the intestinal barrier could be of relevance for the pathophysiology of the infection. The current state of knowledge on changes of the tight junction pattern in the infected intestinal epithelium and thus the ability to either promote or inhibit parasite invasion is limited and derived from mouse and cell culture models. Therefore, the aim of this study was to analyse selected tight junction proteins qualitatively and quantitatively in the jejunal epithelium of infected calves in comparison with control animals. For this purpose, twelve newborn calves were divided into three groups: a control group, an experimentally infected group, which was infected with *C. parvum* on the first day of life, and a naturally infected group. Samples of the distal jejunum epithelium were taken after euthanasia on the eighth day of life and were analysed for protein and mRNA expression of occludin, claudin-1 and claudin-3 using immunofluorescence staining with subsequent confocal laser scanning microscopy and qPCR. The staining for occludin indicated a reduced expression of the protein at the cell borders of infected compared to control animals, as well as an internalization of the protein in naturally infected animals. In contrast, claudin-1 showed no difference between infected and healthy animals. Claudin-3 was upregulated both at the protein and gene level in infected animals. The results of this study emphasize the heterogeneity of the tight junction proteins and their functions during an infection with *C. parvum*. The downregulation of occludin during the infection may represent an infection strategy of the parasite, while the upregulation of claudin-3 suggests a defense mechanism of the enterocytes against *C. parvum*. Targeted manipulation of selected tight junction proteins could therefore be a potential new therapeutic approach. However, this requires further investigations on the role of tight junction proteins during *C. parvum* infection.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| Caco | <i>Carcinoma colon</i> (Zelllinie aus humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen) |
| CIC | Chloridkanal |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| C _t -Wert | Quantifikations-Schwellenwert |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| IL-13 | Interleukin-13 |
| kDa | Kilodalton |
| MLCK | Myosin-leicht-Ketten-Kinase |
| N | Stichprobengröße |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NHE | Na ⁺ /H ⁺ Austauscher |
| OpG | Oozysten pro Gramm Kot |
| p | Signifikanzwert |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PPIA | Peptidyl-Prolyl-Isomerase A |
| qPCR | quantitative PCR |
| RPL32 | Ribosomales Protein L32 |
| RT-qPCR | real time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion |
| ST | Studientag |
| TNF α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| TVV | Tierversuchsvorhaben |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| YWHAZ | 14-3-3 Protein Zeta/Delta |
| β -Actin | beta-Actin |

9. Literaturverzeichnis

- Adams RB, Guerrant RL, Zu S, Fang G, Roche JK. 1994. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. *The Journal of Infectious Diseases*, 169 (1): 170-177. DOI 10.1093/infdis/169.1.170.
- Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter, P. 2021. Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Fünfte Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 777-780.
- Anderson JM, van Itallie CM. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (2): a002584. DOI 10.1101/cshperspect.a002584.
- Briceño MP, Nascimento LAC, Nogueira NP, Barenco PVC, Ferro EAV, Rezende-Oliveira K, Goulart LR, Alves PT, Barbosa BdF, Lima WR, Silva NM. 2016. *Toxoplasma gondii* infection promotes epithelial barrier dysfunction of Caco-2 Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 64 (8): 459-469. DOI 10.1369/0022155416656349.
- Buckley A, Turner JR. 2018. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10 (1): a029314. DOI 10.1101/cshperspect.a029314.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Cryptosporidiosis summary report - National Notifiable Diseases Surveillance System, United States, 2018. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/cryptosporidium/cryptosporidium-2018.html> (Zugriff 11.02.2022).
- Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, Fayer R, Griffiths JK, Guerrant RL, Hedstrom L, Huston CD, Kotloff KL, Kang G, Mead JR, Miller M, Petri WA, Priest JW, Roos DS, Striepen B, Thompson RCA, Ward HD, van Voorhis WA, Xiao L, Zhu G, Houpt ER. 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases*, 15 (1): 85-94. DOI 10.1016/S1473-3099(14)70772-8.
- Cunningham KE, Turner JR. 2012. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258 (1): 34-42. DOI 10.1111/j.1749-6632.2012.06526.x.

- Delling C, Dauschies A. 2022. Literature review: coinfection in young ruminant livestock-*Cryptosporidium spp.* and its companions. *Pathogens*, 11 (1): 103. DOI 10.3390/pathogens11010103.
- Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. 2021. *Parasitologie für die Tiermedizin*. Vierte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Di Genova BM, Tonelli RR. 2016. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Frontiers in Microbiology*, 7: 256. DOI 10.3389/fmicb.2016.00256.
- Dirksen G, Gründer HD, Stöber M, Hrsg. 2006. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Fünfte Aufl. Stuttgart: Parey.
- Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G, Hrsg. 2015. *Physiologie der Haustiere*. Fünfte Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 441-443.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2021. Cryptosporidiosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/CRYP_AER_2018_Report_0.pdf (Zugriff 11.02.2022).
- Fan JS, Zhang M. 2002. Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals*, 11 (6): 315-321. DOI 10.1159/000068256.
- Fanning AS, Anderson JM. 2009. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165 (1): 113-120. DOI 10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.
- Foster DM, Smith GW. 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25 (1): 13-36. DOI 10.1016/j.cvfa.2008.10.013.
- France MM, Turner JR. 2017. The mucosal barrier at a glance. *Journal of Cell Science*, 130 (2): 307-314. DOI 10.1242/jcs.193482.
- Furuse M. 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (1): a002907. DOI 10.1101/cshperspect.a002907.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 123 (6 Pt 2): 1777-1788. DOI 10.1083/jcb.123.6.1777.

- Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. 2017. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397 (1): 66-79. DOI 10.1111/nyas.13360.
- Gookin JL, Nordone SK, Argenzio RA. 2002. Host responses to *Cryptosporidium* infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (1): 12-21. DOI 10.1892/0891-6640(2002)016<0012:HRTCI>2.3.CO;2.
- Groschwitz KR, Hogan SP. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124 (1): 3-20. DOI 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- Günzel D, Yu ASL. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*, 93 (2): 525-569. DOI 10.1152/physrev.00019.2012.
- Innes EA, Chalmers RM, Wells B, Pawlowic MC. 2020. A one health approach to tackle Cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 36 (3): 290-303. DOI 10.1016/j.pt.2019.12.016.
- Joachim A, Eckert E, Petry F, Bialek R, Dauschies A. 2003. Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. *Veterinary Parasitology*, 111 (1): 47-57. DOI 10.1016/S0304-4017(02)00329-1.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. 2008. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778 (3): 631-645. DOI 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.
- Kumar A, Chatterjee I, Anbazhagan AN, Jayawardena D, Priyamvada S, Alrefai WA, Sun J, Borthakur A, Dudeja PK. 2018. *Cryptosporidium parvum* disrupts intestinal epithelial barrier function via altering expression of key tight junction and adherens junction proteins. *Cellular Microbiology*, 20 (6): e12830. DOI 10.1111/cmi.12830.
- Lendner M, Dauschies A. 2014. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitology*, 141 (11): 1511-1532. DOI 10.1017/S0031182014000237.
- Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. 2019. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from calves with diarrhoea in Austria and evaluation of point-of-care tests. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 66: 101333. DOI 10.1016/j.cimid.2019.101333.

- Maia-Brigagão C, Morgado-Díaz JA, de Souza W. 2012. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitology International*, 61 (2): 280-287. DOI 10.1016/j.parint.2011.11.002.
- Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR, Raleigh DR, Guan Y, Watson AJM, Montrose MH, Turner JR. 2010. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *Journal of Cell Biology*, 189 (1): 111-126. DOI 10.1083/jcb.200902153.
- McDonald V. 2000. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunology*, 22 (12): 597-604. DOI 10.1046/j.1365-3024.2000.00343.x.
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. 2004. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infection and Immunity*, 72 (10): 6061-6067. DOI 10.1128/IAI.72.10.6061-6067.2004.
- Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Günzel D, Müller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M. 2010. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798 (11): 2048-2057. DOI 10.1016/j.bbamem.2010.07.014.
- Mulisch M, Welsch U, Hrsg. 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Paradis T, Bègue H, Basmacıyan L, Dalle F, Bon F. 2021. Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (5): 2506. DOI 10.3390/ijms22052506.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30 (9): e36. DOI 10.1093/nar/30.9.e36.
- Pinto P, Ribeiro CA, Hoque S, Hammouma O, Leruste H, Détriché S, Canniere E, Daandels Y, Dellevoet M, Roemen J, Barbier Bourgeois A, Kváč M, Follet J, Tsaousis AD. 2021. Cross-Border investigations on the prevalence and transmission dynamics of *Cryptosporidium* species in dairy cattle farms in western mainland Europe. *Microorganisms*, 9 (11): 2394. DOI 10.3390/microorganisms9112394.

- Priyamvada S, Jayawardena D, Bhalala J, Kumar A, Anbazhagan AN, Alrefai WA, Borthakur A, Dudeja PK. 2021. *Cryptosporidium parvum* infection induces autophagy in intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 23 (4): e13298. DOI 10.1111/cmi.13298.
- Renaud DL, Rot C, Marshall J, Steele MA. 2021. The effect of *Cryptosporidium parvum*, rotavirus, and coronavirus infection on the health and performance of male dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 104 (2): 2151-2163. DOI 10.3168/jds.2020-19215.
- Robert Koch-Institut (RKI). 2021. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020. Berlin: RKI. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.pdf?__blob=publicationFile (Zugriff 11.02.2022).
- Romeis B. 1968. Mikroskopische Technik. 16. Aufl. München, Wien: R. Oldenbourg Verlag.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11 (12): 4131-4142. DOI 10.1091/mbc.11.12.4131.
- Schnieder T, Hrsg. 2006. Veterinärmedizinische Parasitologie. Sechste Aufl. Stuttgart: Parey, 127-130.
- Slifer ZM, Bliklager AT. 2020. The integral role of tight junction proteins in the repair of injured intestinal epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (3): 972. DOI 10.3390/ijms21030972.
- Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48 (1): 42. DOI 10.1186/s13567-017-0447-0.
- Turner JR. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9 (11): 799-809. DOI 10.1038/nri2653.
- Weight CM, Jones EJ, Horn N, Wellner N, Carding SR. 2015. Elucidating pathways of *Toxoplasma gondii* invasion in the gastrointestinal tract: involvement of the tight junction protein occludin. *Microbes and Infection*, 17 (10): 698-709. DOI 10.1016/j.micinf.2015.07.001.
- Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80 (1): 75-84. DOI 10.1007/s11103-012-9885-2.

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Lebenszyklus von <i>C. parvum</i> (Abb.: Sarah Kugler)..... | 4 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung des Schlussleistenkomplexes zwischen Enterozyten und des Aufbaus der Tight Junctions (Abb.: Sarah Kugler, generiert mit BioRender.com nach Turner 2009)..... | 8 |
| Abb. 3: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von <i>C. parvum</i> : a, b Kontrolltiere, c, d experimentell infizierte Tiere, e, f natürlich infizierte Tiere, Zellkerne (blau), <i>C. parvum</i> (rot, rote Pfeile), zerstörtes Zottenepithel (gelbe Pfeile), unspezifische Färbung der Bindegewebszellen (weiße Pfeile), Maßstabsskala 20 µm. | 24 |
| Abb. 4: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin: a, b, c Kontrolltiere, d, e, f experimentell infizierte Tiere, g, h natürlich infizierte Tiere, i Sekundärantikörperkontrolle, Occludin (grün), Maßstabsskala 20 µm..... | 26 |
| Abb. 5: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin: a, b Kontrolltiere, c experimentell infizierte Tiere, d natürlich infizierte Tiere, Occludin (grün), Zellkerne (blau), <i>C. parvum</i> (rot), Maßstabsskala 50 µm. | 27 |
| Abb. 6: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin: a, b Kontrolltiere, c, d experimentell infizierte Tiere, e, f natürlich infizierte Tiere, Occludin (grün), Zellkerne (blau), <i>C. parvum</i> (rot), Pfeile werden im Text erklärt, Maßstabsskala 10 µm..... | 28 |
| Abb. 7: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-1: a, b, c Kontrolltiere, d, e, f experimentell infizierte Tiere, g, h natürlich infizierte Tiere, i Sekundärantikörperkontrolle, Claudin-1 (grün), Maßstabsskala 20 µm. | 29 |
| Abb. 8: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-1: a Kontrolltiere, b experimentell infizierte Tiere, c natürlich infizierte Tiere, Claudin-1 (grün), Zellkerne (blau), <i>C. parvum</i> (rot), Maßstabsskala 50 µm. | 30 |

- Abb. 9:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-1: **a, b** Kontrolltiere, **c, d** experimentell infizierte Tiere, **e, f** natürlich infizierte Tiere, Claudin-1 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Maßstabsskala 10 µm. 31
- Abb. 10:** Weitfeldmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-3: **a, b, c** Kontrolltiere, **d, e, f** experimentell infizierte Tiere, **g, h** natürlich infizierte Tiere, **i** Sekundärantikörperkontrolle, Claudin-3 (grün), Maßstabsskala 20 µm. 32
- Abb. 11:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-3: **a** Kontrolltiere, **b** experimentell infizierte Tiere, **c** natürlich infizierte Tiere, Claudin-3 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Pfeile werden im Text erklärt, Maßstabsskala 50 µm. 33
- Abb. 12:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-3: **a, b** Kontrolltiere, **c, d** experimentell infizierte Tiere, **e, f** natürlich infizierte Tiere, Claudin-3 (grün), Zellkerne (blau), *C. parvum* (rot), Pfeile werden im Text erklärt, Maßstabsskala 10 µm. 34
- Abb. 13:** Relative mRNA-Expression von Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-5 in **a** experimentell infizierten Tieren und **b** natürlich infizierten Tieren verglichen mit Kontrolltieren, deren Expressionsrate gleich 1 gesetzt wurde (grüne Linie). Im Boxplot wird das Minimum, das 1. Quartil, der Median, das 3. Quartil und das Maximum abgebildet. Die Tabelle gibt die relative mRNA Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren und den jeweiligen Signifikanzwert an. 35

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Claudin Subtypen und deren Gewebeverteilung und Funktion (nach Garcia-Hernandez et al. 2017, Günzel und Yu 2013). | 10 |
| Tab. 2: Gruppeneinteilung der Versuchskälber..... | 16 |
| Tab. 3: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der einzelnen Proteine. | 18 |
| Tab. 4: Einstellungen am Konfokalmikroskop. | 20 |
| Tab. 5: Primer und Bedingungen der qPCR. | 22 |
| Tab. 6: Menge der ausgeschiedenen Oozysten der infizierten Tiere je Studientag in OpG.. | 25 |