

Aus dem
CharitéCentrum 13:
Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie

Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Campus Benjamin Franklin

Direktorin: Prof. Dr. med. Britta Siegmund

Habilitationsschrift

Wirkungsweise von Pathogenen, Pathobionten und Probiotika auf die epitheliale Transport- und Barrierefunktion des Darms

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
"Innere Medizin"

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Hanno Tröger

Eingereicht: Juli 2016
Dekan: Prof. Dr. med. Axel Radlach Pries
1. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. A. Stallmach
2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. E. Cario

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Die epitheliale Barrierefunktion.....	3
1.2 Transportfunktionen des Darmepithels	9
1.2.1 Resorption von Nährstoffen.....	9
1.2.2 Sekretion von Chlorid und Bikarbonat	10
1.3 Formen und Folgen der Barrieredysfunktion	10
1.4 Pathomechanismen der (infektiösen) Diarrhoe.....	11
1.4.1 Malabsorptive Diarrhoe	12
1.4.2 Sekretorische Diarrhoe	13
1.4.3 Leckflux-Diarrhoe.....	13
1.5 Das intestinale Epithel als Eintrittsort für Erreger	14
1.6 Zielsetzung und Fragestellung.....	16
2 Eigene Arbeiten.....	18
2.1 Chronische <i>Giardia lamblia</i>-Infektion	18
2.2 Akute Norovirus-Infektion.....	27
2.3 Akute HIV-Infektion	36
2.4 <i>Escherichia coli</i>-α-Hämolyysin.....	51
2.5 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917.....	62
3 Diskussion	73
4 Zusammenfassung.....	79
5 Literaturverzeichnis	81
Danksagung.....	92
Erklärung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
CD	Cluster of differentiation
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CNF-1	cytotoxic necrotizing factor-1
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogener <i>E. coli</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Fluoreszein-Derivat)
FUT2	Fucosyltransferase 2
GLUT2	Glucosetransporter Typ 2 (transportiert Glukose, Galaktose, Fruktose)
GLUT5	Glucosetransporter Typ 5 (transportiert Fruktose)
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HlyA	α -Hämolyisin von <i>E. coli</i>
IgA	Immunglobulin A
LPS	Lipopolysaccharid
M-Zellen	Microfold-Zellen
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase
MUPP1	Multi-PDZ-Domänen Protein 1
NKCC1	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Carrier Typ 1
NSP4	nicht-strukturelle Protein 4
PKC	Proteinkinase C
PKCzeta	Proteinkinase C zeta
R ^{epi}	epithelialer Widerstand
R ^{sub}	subepithelialer Widerstand
SCFA	kurzkettige Fettsäuren
SGLT1	Natrium-Glukose-Symporter Typ 1
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
TAMP	Tight junction-associated MARVEL protein
TcpC	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein
TER	transepithelialer Widerstand
TJ	Tight Junction
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
ZO	Zona occludens

1 Einleitung

Der Magen-Darm-Trakt des Menschen stellt die größte Grenzfläche zur Umwelt dar. Nach neueren Erkenntnissen geht man davon aus, dass die Gesamtoberfläche des Magen-Darm-Traktes ungefähr 32 m² beträgt.¹ Hierbei wird vor allem durch die spezielle Anatomie des 3-4 Meter langen Dünndarms mit seinen Falten, Zotten, Krypten und Mikrovilli die Oberfläche um ein Vielfaches gegenüber der serosalen Außenfläche vergrößert. Auch der Dickdarm besitzt Krypten und ist zudem der Ort mit der höchsten Bakterienkonzentration im Menschen.²

Das Darmepithel muss dabei zwei Aufgaben bewältigen, die durch ihre Gegensätzlichkeit technisch schwierig sind: Einerseits muss das Epithel eine zuverlässige Barriere gegen die unerwünschte Aufnahme oder Abgabe von Substanzen – insbesondere von toxischen Substanzen und pathogenen Erregern – bilden, und andererseits soll es in selektiver Weise Solute wie Ionen, Nährstoffe und Wasser resorbieren sowie andere Solute sezernieren.

Die **epitheliale Barrierefunktion** wird durch die unterbrechungsfreie Schicht der apikalen Zellmembranen sowie den Schlussleisten (Tight Junctions (TJ)) gebildet und im Gastrointestinaltrakt durch den aufgelagerten Mukus ergänzt. Im weiteren Sinne tragen auch antibiotisch wirkende intestinale Peptide und die Säureproduktion des Magens wirksam zur Barrierefunktion bei.³ Auch die Motilität des Darmes ist eine Voraussetzung zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm, was beispielsweise im Rahmen einer bakteriellen Fehlbesiedlung auf dem Boden einer intestinalen Motilitätsstörung beobachtet werden kann.⁴ In den letzten Jahren hat die Erkenntnis über den Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf den Menschen deutlich zugenommen, so dass man auch von einer „symbiontischen Beziehung“ zwischen Mensch und der eigenen Mikrobiota oder einem „Superorganismus“ sprechen kann.^{2,5} Tatsächlich gibt es mehr bakterielle als menschliche Zellen und mehr bakterielle als menschliche Desoxyribonukleinsäure (DNA) in unserem Körper. Die Beobachtung, dass die intravenöse Injektion von bereits kleinsten Mengen Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, eine schwere immunologische Reaktion hervorruft,⁶ lässt den Schluss zu, dass sowohl eine physikalische Abschirmung als auch eine immunologische Toleranz gegenüber der eigenen Mikrobiota existiert.

Das klinische Bild einer gestörten Barrierefunktion reicht von leichter Diarrhoe bis zur letalen Sepsis durch bakterielle Translokation, d.h. einem Durchtritt von Bakterien aus dem Darm in den Blutkreislauf. Zudem kann eine gestörte Barrierefunktion zu einem vermehrten Übertritt von immunstimulierenden Bestandteilen der Mikrobiota führen wie zum Beispiel bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) oder bei der Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektion.⁷

Die **Transportfunktion des Epithels** ist eine andere Hauptaufgabe des Darmes und geschieht in zwei Transportrichtungen, Sekretion und Resorption. Resorption beinhaltet die Aufnahme von Ionen, Nährstoffen, Spurenelementen, Vitaminen und Wasser aus dem Darmlumen in das Interstitium. Auf dem transzellulären Transportweg arbeiten eine Vielzahl integraler Zellmembranproteine (Kanäle, Carrier und ATPasen) der apikalen und basolateralen Zellmembran zusammen und gewährleisten einen regulierten Ablauf dieser Prozesse. Der Transport von lipophilen Soluten ist nicht auf Kanäle und Carrier angewiesen, sondern kann als sog. einfache Diffusion direkt durch die Lipidphase der Zellmembran erfolgen.⁸

Einen ganz anders gearteten Transportmechanismus stellt die Transzytose dar, die aus der endozytotischen Aufnahme und exozytotischer Abgabe auf der gegenüberliegenden Zellseite

besteht. Zwar sind die Transportraten der Transzytose im Vergleich zum Ionentransport durch Kanäle und Carrier gering; die Bedeutung der Transzytose besteht jedoch darin, dass auch große Moleküle transportiert werden können.⁹

Die epitheliale Transportfunktion erfolgt nicht allein transzellulär (also durch die apikale und basolaterale Zellmembran des Epithels), sondern überraschenderweise auch parazellulär (durch die TJ und den Interzellularspalt). Dies kommt dadurch zustande, dass einige Proteine der TJ nicht ausschließlich abdichten, sondern parazelluläre Kanäle für Kationen, Anionen oder Wasser bilden.¹⁰

Die TJ-Kanäle oder nicht-selektive Unterbrechungen der TJ-Stränge können je nach elektrochemischem Gradienten dem transzellulären Transport im Sinne eines Lecks entgegenwirken oder den Transport noch verstärken.⁸

Störungen der intestinalen Barriere oder der Resorption äußern sich durch eine quantitative und/oder qualitative Mangelernährung mit den Folgen eines Gewichtsverlusts, spezifischer Mangelerkrankungen und den Symptomen einer Diarrhoe.¹¹

1.1 Die epitheliale Barrierefunktion

Epithelien wie z.B. die der Haut, des Urogenital- oder des Gastrointestinaltrakts kleiden äußere und innere Oberflächen des Menschen aus und bilden zudem die Ausführungsgänge von exokrinen Drüsen, wie den Speichel- oder Schweißdrüsen. Sie stehen daher an vorderster Front im Kontakt mit der Umwelt und deren vielfältigen Einflüssen. In Bereichen, in denen ein Epithel starker mechanischer oder chemischer Belastung ausgesetzt ist, ist dieses Epithel mehrreihig, wohingegen es in den übrigen Abschnitten einreihig ist (Abb. 1).

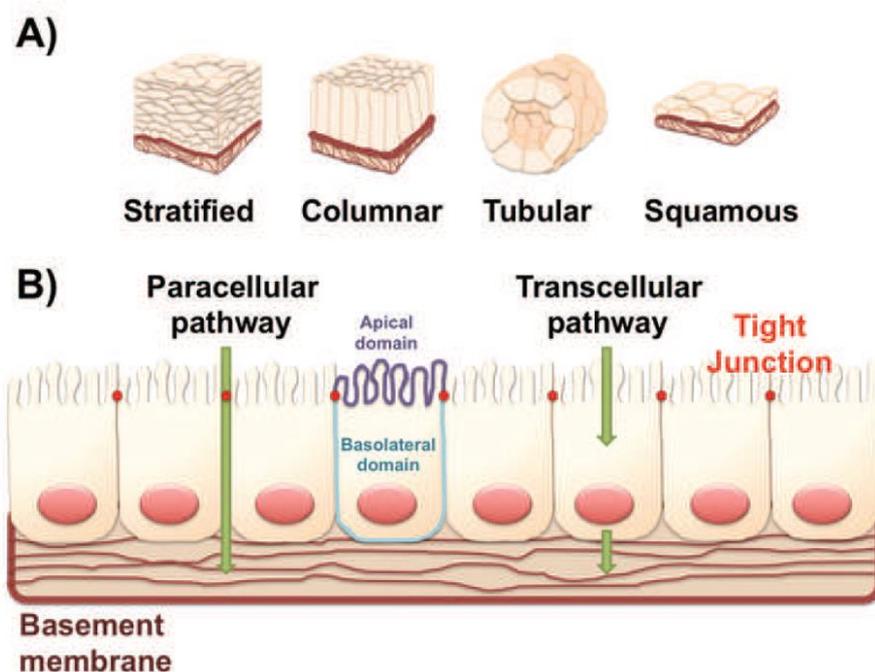


Abbildung 1. Schematischer Aufbau von Epithelien mit Darstellung des parazellulären und des transzellulären Weges. Quelle: Gonzales-Mariscal et al. 2013¹²

Wesentliches Charakteristikum der Barrierefunktion ist die polarisierte epitheliale Zellmembran sowie das Schlussleistennetz. Die Schlussleisten, auch **TJ** genannt, werden durch Proteine gebildet, die als Heterodimere mit TJ-Proteinen der Nachbarzelle interagieren. TJ haben zwei wesentliche Barrierefunktionen, die „Gate“-Funktion und die „Fence“-Funktion. Die "Gate"-Funktion beschreibt die Abdichtung des parazellulären Raumes und ist Voraussetzung für den epithelialen Nettotransport. Grundsätzlich kann der Transport über Epithelien entweder trans- oder parazellulär erfolgen. Hierbei ist zu beachten, dass es neben abdichtenden auch kanalbildende TJ-Proteine gibt, die parazelluläre Kanäle für Kationen, Anionen oder Wasser bilden. Die „Fence“-Funktion dagegen beschreibt die Limitierung einer lateralen Diffusion von Proteinen und Lipiden in der Zellmembran, so dass eine charakteristische apikale und basolaterale Membranfraktion aufrecht erhalten werden kann, die die Basis der Polarität der Epithelzellen bildet (Übersichtsarbeit: ¹³).

Historisch wurden die TJ erstmals mittels **Elektronenmikroskopie** als Punkte entdeckt, an denen die Zellmembranen benachbarter Epithelzellen zu fusionieren schienen und damit den parazellulären Raum abdichteten. In Gefrierbruchschnitten, die für die Elektronenmikroskopie erstellt werden, erschienen die TJ als Netzwerk von feinen Linien, in denen man partikuläre Bestandteile erkennen konnte.¹⁴

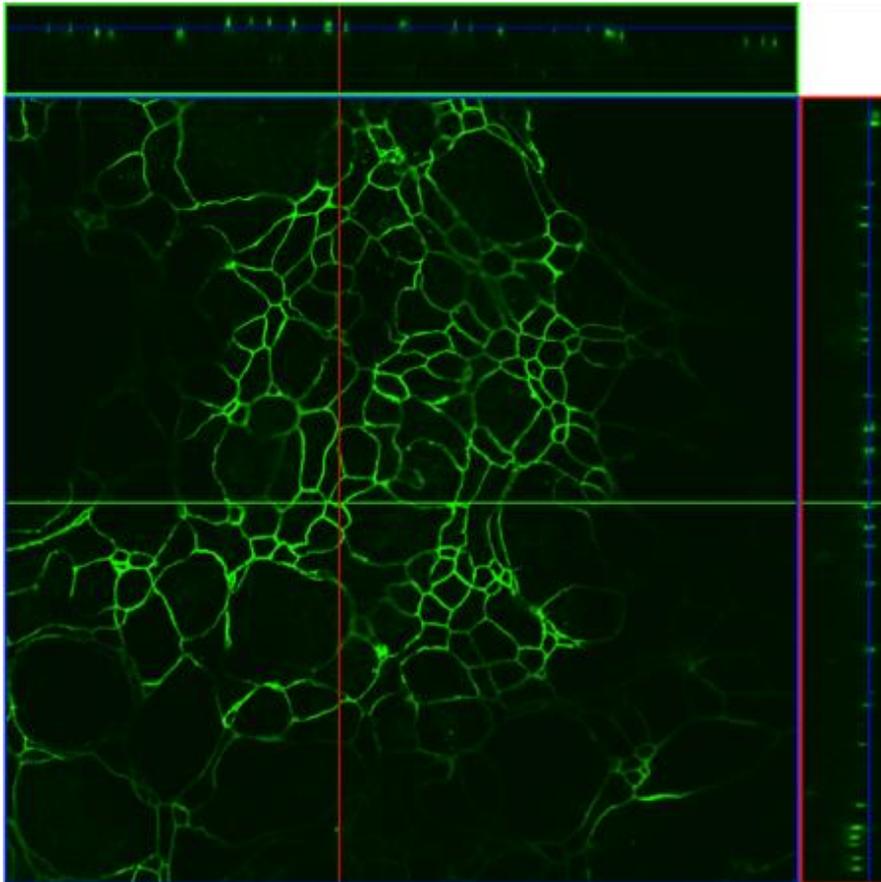


Abbildung 2. Konfokale Laserscanningmikroskopie eines Zellmonolayers (HT-29/B6) nach immunhistologischer Färbung mit einem anti-zonula occludens (ZO)-1-Antikörper (grün) (eigene Abbildung)

Bei **immunhistologischer Anfärbung** zeigt sich das TJ-Netzwerk in der Aufsicht als scharfe Begrenzung der äußeren (apikalen) Zellmembran, was zu einer maschendraht-ähnlichen Konfiguration führt (Abb. 2). Das erste Vier-Membrandomänen-Protein der TJ wurde von der Arbeitsgruppe von Soichiro Tsukita im Jahr 1993 identifiziert und Occludin benannt.¹⁵ Im Querschnitt erscheint die TJ dabei als punkt- oder strichförmiges Areal, welches die apikale von der basalen Zellmembran trennt und damit eine wesentliche Funktion illustriert, nämlich die der „Fence“-Funktion.

Elektrophysiologisch wird die epitheliale Barriereeigenschaft des Darmes im Wesentlichen durch das komplexe Zusammenspiel der TJ-Proteine bestimmt. Der epitheliale Zellverband bildet einen elektrischen Widerstand, der sich als transepithelialer Widerstand (TER) leicht messen lässt und den Kehrwert der Durchlässigkeit für Ionen darstellt. Dieser kann durch zwei parallel geschaltete Widerstände modelliert werden, dem transzellulären und dem parazellulären Widerstand. Der transzelluläre Widerstand besteht aus zwei seriellen Widerständen, die die apikale und basolaterale Plasmamembran reflektieren. Da in einem "lecken" Epithel wie dem Dünndarm der transzelluläre Widerstand höher als der parazelluläre Widerstand ist, fließt ein extern eingespeister Strom vor allem durch den parazellulären Weg, so dass eine TER-Messung im Wesentlichen den parazellulären Widerstand misst. Somit kann der TER in "lecken" Epithelien als ungefähres Maß der TJ-Barrierefunktion für Ionen verwendet werden. Aus dem Gesagten ergibt sich, dass diese Vereinfachung nicht ohne Weiteres für "dichte" Epithelien wie dem Dickdarm gilt, da hier der parazelluläre Widerstand höher als der transzelluläre ist und der TER somit hauptsächlich vom transzellulären Weg bestimmt wird. Wenn allerdings der parazelluläre Widerstand sinkt, sinkt auch der TER entsprechend – TJ-Barrieredefekte für Ionen können also auch im Dickdarm mittels TER detektiert werden.¹⁶

Eine weitere Möglichkeit, die Permeabilität des parazellulären Weges zu bestimmen, ist die **Fluxmessung** von verschiedenen großen Substanzen über eine Epithelschicht.¹⁷ Idealerweise müssen geeignete Substanzen dafür wasserlöslich sein und sollten nicht endozytiert oder degradiert werden und auch nicht über spezielle membranständige Transporter aufgenommen werden. Die Messung der durchgetretenen Substanzen erfolgt meist mit Hilfe einer radioaktiven oder fluoreszenz-optischen Markierung dieser Tracersubstanzen. Etablierte Beispiele für solche Permeabilitätsmessungen sind radioaktiv markiertes Mannitol (182 Da) oder die fluoreszierenden Substanzen, Fluorescein (332 Da) und FITC-markiertes Dextran. Bei Letzterem werden Dextrane unterschiedlicher Größe benutzt; üblich sind 1, 4, 10, 20 und 40 kDa.

Die Barrierefunktion für Ionen (genau: für die Summe aller in den angrenzenden Lösungen vorhanden Ionen in ihren jeweiligen Konzentrationen) kann durch Messung des TER bestimmt werden. Die klassische Messtechnik für Darmepithelien ist die Gleichstrommessung in der Ussing-Kammer. Der Nachteil der klassischen Technik besteht darin, dass der gesamte Widerstand des eingespannten Gewebes erfasst wird. Eine Weiterentwicklung dieser Technik ist die **Impedanzspektroskopie**, die am Institut für Klinische Physiologie der Charité zur Erforschung der Barrierefunktion des Darmepithels etabliert wurde.¹⁸ Die Methode erlaubt in ihrer basalen Form ("one-path impedance spectroscopy") eine separate, zerstörungsfreie Bestimmung des epithelialen und subepithelialen Widerstands von Epithelien *in vitro*. Die Messung basiert darauf, dass der Widerstand der Epithelzellschicht frequenzabhängig ist, die der unter dem Epithel befindlichen Gewebeschichten jedoch nicht, da diese über keine kontinuierlichen Zell-Zell-Verbindungen verfügen und somit auch keine kapazitiven Eigenschaften haben. Im Gegensatz zu Zellkulturen besteht ein partiell gestrippter Darm oder

eine endoskopisch gewonnene Biopsie aber eben nicht nur aus der Epithelschicht, welche allerdings für die Barrierefunktion die biologisch relevante Schicht darstellt. Da sich das Epithel und das Subepithel im Rahmen von Erkrankungen nicht selten gegenseitig verändern,¹⁹ ermöglicht die Impedanzspektroskopie eine Zuordnung der intestinalen Permeabilitätsveränderungen zu den betroffenen Gewebeschichten.

Um die Beiträge von trans- und parazellulärem Widerstand zu messen, wurde die Methode zur "two-path impedance spectroscopy" weiterentwickelt.²⁰ Diese Technik kann jedoch nur an epithelialen Zellkulturen angewandt werden und ist nicht in der Lage, lokale Läsionen zu erfassen.

Lokale Läsionen in Form einer regionalen Verteilung der Ionenleitfähigkeit einer Epithelschicht können mit einer weiteren am Institut für Klinische Physiologie entwickelten elektrophysiologische Methode erfasst werden, der **Conductance Scanning**-Technik (Abb. 3).²¹ Sie erlaubt eine lokal begrenzte Messung epithelialer Leitfähigkeiten. Die Methode beruht auf der Erfassung von lokalen Unterschieden der Stromdichte in der Elektrolytlösung über einer Epithelschicht. Dies geschieht mittels eines Mikroelektrodenpaars, das unter mikroskopischer Kontrolle gesteuert wird, während ein definierter Wechselstrom durch das Gewebe fließt.

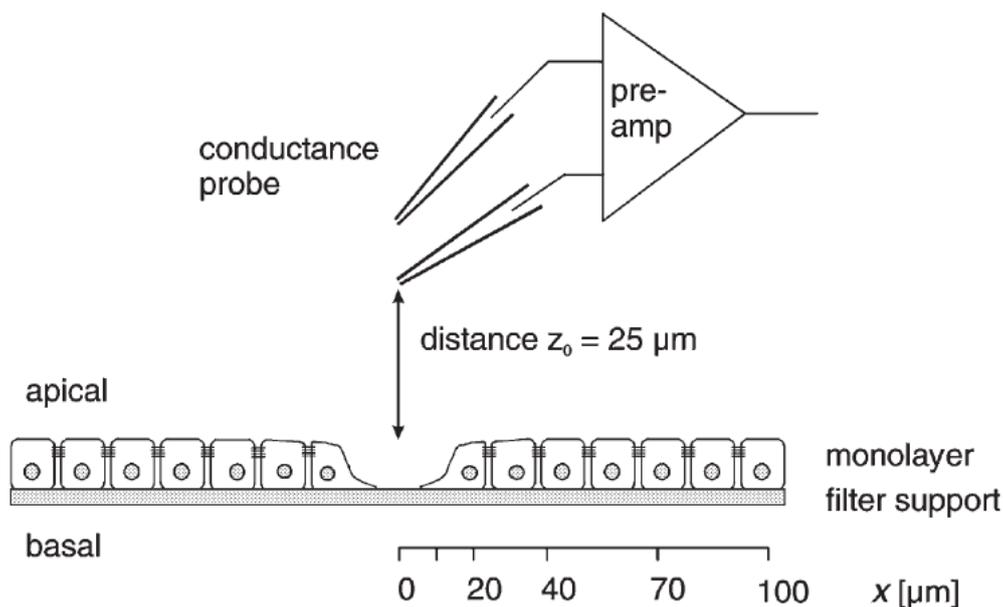


Abbildung 3. Schematische Zeichnung der Conductance Scanning-Technik mit einem Mikroelektrodenpaar über einem Defekt in einem epithelialen Monolayer. Quelle: Florian et al. 2002²²

Der **molekulare Aufbau der TJ** ist erst seit einigen Jahren genauer bekannt.²³ Die für die Barriere- bzw. Kanalfunktion der TJ entscheidenden Vier-Membrandomänen-Proteine werden durch zwei Protein-Familien gebildet, den Claudinen mit derzeit 27 bekannten Mitgliedern beim Säugetier und den sogenannten TAMPs („Tight junction-associated MARVEL proteins“) mit den drei Mitgliedern Occludin, Tricellulin und MarvelD3.²⁴ Fast alle diese Proteine orientieren sich intrazellulär über sogenannte PDZ-Domänen an Gerüst- bzw. Ankerproteinen der MAGUK-Familie (membrane-associated guanylate kinase) mit ihren Hauptvertretern ZO-1, ZO-2 und ZO-3, die wiederum am Zytoskelett aufgehängt sind (Abb.4).²⁵

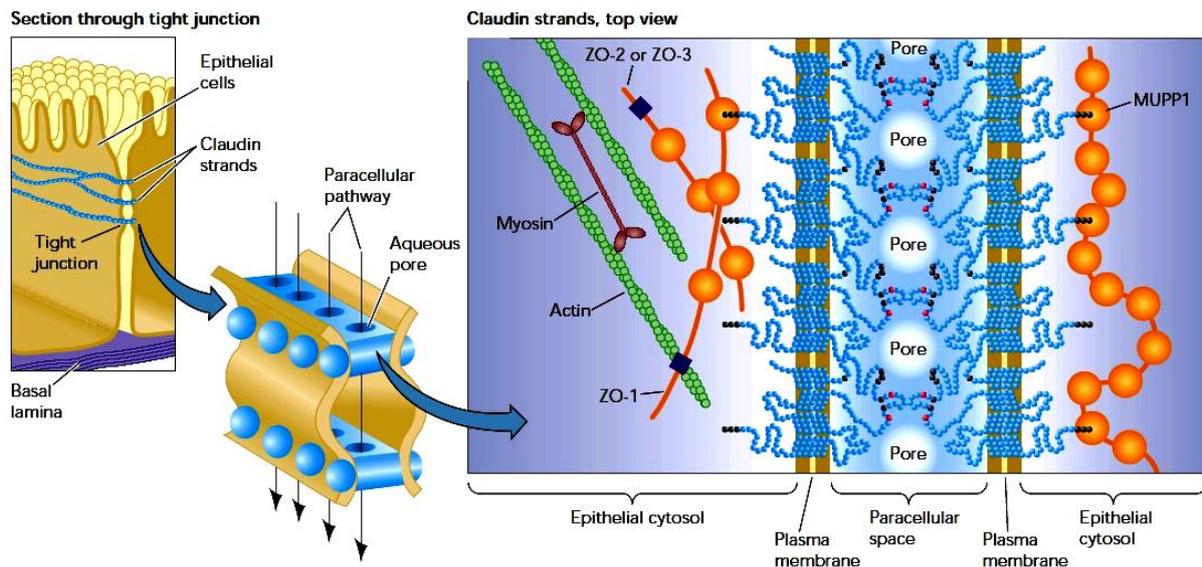


Abbildung 4. Schematischer Aufbau der Tight junction mit Darstellung eines spekulativen Modells der Porenbildung von kanalbildenden Claudinen. Claudine binden im Bereich ihres C-Terminus an PDZ-Domänen von Gerüstproteinen wie ZO-1 und Multi-PDZ-Domänen Protein 1 (MUPP1), die wiederum mit Aktin- und Myosinfasern des Zytoskeletts verbunden sind. Quelle: Van Itallie & Anderson, 2004²⁶

Während alle TAMPs und viele Claudine abdichtende Eigenschaften aufweisen, bilden einige Claudine parazelluläre Kanäle für Kationen, Anionen oder Wasser.¹⁰

Abdichtende Claudine wie Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-5 (vollständige Auflistung siehe Tabellen 3 und 4 in Günzel & Yu 2014)²⁷ verursachen bei Verminderung ihrer Expression eine mehr oder weniger ausgeprägte Schwächung der parazellulären Barrierefunktion. Das bekannteste experimentelle Beispiel hierfür ist die bei Claudin-1-Knockout-Mäusen postpartal auftretende letale Dehydratation aufgrund einer gestörten epidermalen Barrierefunktion.²⁸ Es zeigte sich jedoch schon früh, dass zwischen den abdichtenden Claudinen (sowie dem Occludin) eine funktionelle Redundanz besteht, durch die der Mangel einzelner TJ-Proteine von anderen TJ-Proteinen ausgeglichen werden kann.²⁹

Kanalbildende Claudine führen – anders als Membrankanäle – nicht durch die Zellmembran hindurch, sondern bilden spezifische extrazelluläre Durchgänge zwischen der apikalen Seite (z.B. dem Darmlumen) und dem Interzellularspalt als Bestandteil der basolateralen Seite (s. Abb. 4). Hinsichtlich ihrer Selektivität existieren nach gegenwärtiger Kenntnis drei Gruppen,

kationenselektive (z.B. Claudin-2, Claudin-10b, Claudin-15), anionenselektive (z.B. Claudin-10a, Claudin-17) und wasserselektive Claudine (Claudin-2).¹⁰ Das erste als ladungsselektiv charakterisierte TJ-Protein war Claudin-2, das Kationen, aber keine Anionen passieren lässt.³⁰ Erst mehrere Jahre später wurde entdeckt, dass der von Claudin-2 gebildete Kanal nicht nur für Kationen, sondern auch für Wasser permeabel ist.³¹ Die erste Kristallstruktur eines Claudins, des Kationenkanals Claudin-15, wurde kürzlich aufgeklärt,³² und wenig später ein erstes dreidimensionales Kanalmodell, in diesem Fall für den Anionenkanal Claudin-17, vorgeschlagen.³³

Aufgrund der spezifischen Selektivitätseigenschaften der unterschiedlichen Claudine innerhalb des TJ-Netzwerkes kann das intestinale Epithel abhängig von seiner Lokalisation und Funktion mehr abdichtende oder eher selektiv durchlässige Eigenschaften aufweisen.¹⁰

Hierbei zeigt sich für den Gastrointestinaltrakt eine Zunahme der Dichtigkeit von proximal nach distal, die durch die Zunahme abdichtender TJ-Proteine verursacht wird und mit der biologischen Funktion der einzelnen Abschnitte (Resorption von Nährstoffen im proximalen Teil versus Abdichtung und Konzentrierung der Faeces im distalen Teil mit hoher Konzentration an Bakterien) im Einklang steht.³⁴

Die **Regulation der TJ** ist komplex und lässt sich auf verschiedenen Ebenen beschreiben. Dabei gibt es transkriptionelle Regulation, posttranslationale Modifikationen, Veränderungen der Bindung an den unterhalb der TJ lokalisierten „scaffolding“-Proteinen, sowie einer Veränderung der Interaktion mit den TJ-Proteinen der gleichen Membran (cis-Interaktion) und der Nachbarmembran (trans-Interaktion). In Zellkulturarbeiten wurde durch verschiedene intra- oder extrazelluläre Stimuli die Integrität der TJ beeinflusst. Vermittelt wurden diese Signale beispielsweise durch Mitogen-aktivierte Proteinkinase, Proteinkinase C (PKC) oder Phosphatidylinositol-3-Kinase.^{35,36,37}

Eine gesteigerte Expression von kanalbildenden TJ-Proteinen (und/oder eine verminderte Expression von abdichtenden TJ-Proteinen) führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der TJ und kann damit eine Barrierestörung induzieren. Dieses Phänomen tritt typischerweise bei entzündlichen Erkrankungen des Darmes auf.³⁸

Ein Transportmechanismus ganz anderer Art ist die **Transzytose**, also das Zusammenspiel von endozytischer Aufnahme von Substanzen auf einer Epithelzellseite und exozytischer Abgabe auf der gegenüberliegenden Seite. Zytosemechanismen stellen eine elementare Eigenschaft von Zellen im Rahmen der Kommunikation und Nährstoffaufnahme dar und sind darüber hinaus entscheidend für spezielle Aufgaben wie der Regulation der äußeren Form und der Größe einer Zelle, der Zellmigration und für die Immunabwehr. Hierbei können verschiedene Endozytosemechanismen der Zelle unterschieden werden, wie z.B. die der Rezeptor-medierten Clathrin-vermittelten Endozytose oder der F-Actin-abhängigen Phagozytose bzw. Makropinozytose.⁹

Eine Veränderung der Endozytose- bzw. Transzytoseeigenschaften von intestinalen Epithelzellen ist mit erheblichen Konsequenzen durch den potentiellen Eintritt von Erregern oder Antigenen verbunden. Daneben kann durch Endozytose und damit Internalisierung von TJ-Proteinen auch eine Regulation der TJ-Funktion erfolgen.³⁹

Ein wesentlicher Parameter einer effektiven intestinalen Barrierefunktion ist die Integrität des Zellverbandes. Das Darmepithel unterliegt einem hohen Zellumsatz und man geht davon aus, dass die Epithelzellschicht des Darmes in durchschnittlich weniger als einer Woche komplett

erneuert wird. Daher spielt für den Aufbau und die Barrierefunktion des Darmepithels der **Zelltod von Enterozyten** eine wichtige Rolle. Hierbei lassen sich der nekrotische Zelltod beispielsweise durch Toxine oder Ischämie vom programmierten, **apoptotischen Zelltod** abgrenzen. Letzterer Vorgang stellt einen physiologischen Prozess des sich ständig erneuernden Epithels dar. Man geht davon aus, dass sich ungefähr ein Prozent der Epithelzellen im Darm im Zustand der Apoptose befinden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Apoptosen – obgleich sie einen physiologischen Prozess darstellen – durchaus Undichtigkeit im Zellverband darstellen und somit zu einer Barriestörung beitragen können.⁴⁰

Auch Veränderungen in der Regenerationsfähigkeit des Epithels, die nach Auftreten von kleinen (z.B. Einzelzellläsionen) oder größeren Läsionen (z.B. Ulzerationen) notwendig sind, können die Barrierefunktion beeinflussen.⁴²

Im Rahmen einer systemischen oder lokalen **Entzündungsreaktion** kann es zu einer Störung der Transport- und Barrierefunktion des Epithels kommen. Dies ist sowohl für die Ätiopathogenese verschiedener Erkrankungen als auch als Ursache des zentralen Symptoms der Diarrhoe von erheblicher Bedeutung. In diesem Rahmen wurden verschiedene spezifische Veränderungen von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interferon- γ , Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) oder auch Interleukin-13 untersucht.^{41,42,43} Interessant ist auch, dass es offenbar neben der elektrophysiologisch messbaren Transport- und Barriestörung bereits frühzeitig zu einer Veränderung von Endozytoseprozessen kommt, die pathogenetisch sicherlich ebenso bedeutsam für die Erkrankungen sind.⁴⁴

1.2 Transportfunktionen des Darmepithels

Die Transportfunktionen des Darmepithels bestehen aus einer sehr großen Zahl unterschiedlicher trans- und parazellulärer Einzelprozesse. Im Folgenden werden die wichtigsten transepithelialen Mechanismen dargestellt, die an Erkrankungen des Darms beteiligt oder betroffen sind.

1.2.1 Resorption von Nährstoffen

Die Resorption von Nährstoffen über das intestinale Epithel findet über spezielle Transporter statt, in vielen Fällen geschieht dies durch Symporter mit Hilfe der Kopplung an Natriumionen.

Die Aufnahme von Glukose geschieht über den Symport-Carrier der apikalen Zellmembran SGLT1 (Natrium-Glukose-Symporter Typ 1), der unter Ausnutzung des elektrochemischen Natriumgradienten pro Transportzyklus zwei Na⁺ mit einem Glukose- oder Galaktosemolekül aus dem Darmlumen in die Zelle transportiert. Der Natriumgradient wird durch die basolateral lokalisierte Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten. Dieses Transportsystem wird als sekundär aktiv bezeichnet und bewirkt, dass diese beiden Monosaccharide auch gegen ihren Konzentrationsgradienten fast restlos aus dem Darmlumen aufgenommen werden. Im Gegensatz hierzu wird Fruktose durch den Uniport-Carrier GLUT5 (Glukosetransporter Typ 5; eigentlich ein Misnomer, da dieser keine Glukose transportiert) aufgenommen und kann somit nur passiv, also im Sinne seines Konzentrationsgradienten, transportiert werden.

Glukose, Galaktose und Fruktose verlassen die Epithelzelle auf der basolateralen Seite über den Uniport-Carrier GLUT2.

Für die Funktion von SGLT1 zeigte sich in Experimenten an der Maus, dass die luminal erforderliche Natriummenge durch eine durch die beiden kationenkanalbildenden Claudin-2 und -15 vermittelte Rezirkulation des Natriums vermittelt wird.⁴⁵

Aminosäuren werden als Monomere ebenfalls über mehrere spezifische sekundär aktive Symtransport-Carrier aufgenommen, was zeigt, dass es sich hierbei um ein verbreitetes Prinzip des Nährstofftransportes handelt. Zu ergänzen ist, dass Aminosäuren zu einem wesentlichen Anteil als kleine Peptide über den Antiport-Carrier PepT1 im Austausch gegen H^+ aufgenommen werden.

1.2.2 Sekretion von Chlorid und Bikarbonat

Chlorid wird in allen Darmsegmenten aktiv und elektrogen unter regulatorischer Kontrolle sezerniert.⁴⁶ Die beiden beteiligten Transportschritte sind der apikale Ausstrom von Chlorid über den Kanal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), sowie der basolaterale Einstrom von Chlorid in die Zelle durch den Symport-Carrier NKCC1 (Natrium-Kalium-2-Chlorid-Carrier Typ 1), der durch einen von der Na^+/K^+ -ATPase erzeugten Natriumgradienten angetrieben wird. Der sekundär aktive Transportschritt erfolgt somit an der basolateralen Membran, die Regelung der Chloridsekretion greift jedoch an den Chloridkanälen der apikalen Membran an.

Neben dem CFTR spielen apikale Kalzium-sensitive Chloridkanäle eine weitere wichtige Rolle bei der Chloridsekretion. Die intrazellulären Regulationswege der Chloridsekretion bestehen einerseits in der Wirkung von zyklischem Adenosinmonophosphat (AMP) auf den CFTR sowie andererseits in der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium auf die Kalzium-sensitiven Chloridkanäle.

Bikarbonat ist ein weiteres Anion, das in wesentlichen Mengen sezerniert wird. Der apikale Ausstrom erfolgt ebenfalls über den CFTR. Für die Bikarbonatsekretion in Drüsenepithelien spielt zudem ein Chlorid/Bikarbonat-Austauscher eine wichtige Rolle, woran der CFTR wiederum indirekt beteiligt ist.⁴⁷ Eine wichtige Regulationsfunktion der Bikarbonatsekretion im Dickdarm spielen die von der Mikrobiota produzierten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA).⁴⁸

1.3 Formen und Folgen der Barriervedysfunktion

Der Gastrointestinaltrakt ist ständig einer großen Menge luminaler Fremddantigene, verschiedener Mikroorganismen und Toxine ausgesetzt. Neben der Aufrechterhaltung der Homöostase für kleine Solute und Wasser ist deshalb eine weitere lebenswichtige Aufgabe der intestinalen Barriere die Abschirmung des Körpers gegen die Aufnahme von immunogenen oder inflammatorisch wirkenden Substanzen.

Die pathophysiologischen Konsequenzen einer Barriervedysfunktion können mannigfaltig sein. Sowohl in der Fachliteratur als auch in der Laienpresse finden sich Assoziationen einer gestörten Darmbarriere mit verschiedensten Erkrankungen. Dieses wird häufig unter dem Begriff „Leaky Gut-Syndrom“ zusammengefasst.

Erschwert wird diese Betrachtung durch eine Komplexität der intestinalen Barrierefunktion, die nicht nur durch die entsprechenden Eigenschaften der TJ definiert wird, sondern auch durch die intestinale Motilität, die Produktion von Muzin sowie das angeborene Immunsystem und die Zusammensetzung der Mikrobiota bestimmt wird.

Gut belegt ist die Rolle der intestinalen Barriestörung bei CED, der Zöliakie sowie des Reizdarmsyndroms.^{49,50} Für Morbus Crohn beispielsweise ist seit langem bekannt, dass nicht nur die Patienten selbst, sondern auch deren nahe Verwandte im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe eine gestörte Barrierefunktion aufweisen.⁵¹ Bei Kindern mit früher Manifestation einer CED und monogenetischer Erkrankungsform findet man neben der großen Gruppe an immunologischen Defekten auch Veränderungen, die mit der epithelialen Barriere assoziiert sind.⁵² Auch bei Erwachsenen mit CED lassen sich bei Subgruppen mehr als ein Dutzend Genmutationen finden, die mit der epithelialen Barrierefunktion in Zusammenhang stehen, wie zum Beispiel bei dem Adherens Junction-Protein E-Cadherin, der Ausbildung der Muzinschicht durch MUC3, oder dem epithelialen Polaritätsfaktor PAR-3.⁵³

Darüberhinaus wird eine gestörte Barrierefunktion auch mit anderen immunologisch vermittelten Erkrankungen wie dem Typ 1-Diabetes⁵⁴, der Multiplen Sklerose⁵⁵ oder rheumatischen Erkrankungen⁵⁶ in Verbindung gebracht.

Bei chronischen Lebererkrankungen spielt eine gestörte epitheliale Barrierefunktion für die Entstehung der Leberschädigung eine wichtige Rolle. Ausgelöst durch eine unkontrollierte Translokation von Bakterien und/oder deren immunogenen Bestandteilen kommt es zu entzündlichen und toxischen Leberschädigungen.⁵⁷

Einen ähnlichen Mechanismus diskutiert man für die HIV-Infektion. Hierbei nimmt man an, dass die vermehrte Translokation von LPS einen wesentlichen Faktor für die chronische Immunaktivierung darstellt.⁵⁸ Neben immunologischen Veränderungen kommt es im Rahmen der HIV-Infektion auch zu einer epithelialen Barriestörung.^{59,60} Die Barriestörung auf ionaler Basis wurde als Ursache der auftretenden Diarrhoe im Rahmen der HIV-Enteropathie diskutiert. Unklar ist allerdings, ob diese Barriestörung auch im Zusammenhang mit dem Übertritt von größeren Molekülen wie dem LPS steht.

Eine weitere Folge einer gestörten Barrierefunktion im Sinne einer fehlregulierten immunologischen Abwehr ist eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit pathogenen Erregern, beispielsweise in Form einer verminderten Sekretion von Defensinen oder fehlender luminaler Sekretion von IgA. Ein Beispiel dafür ist die chronische Lambliasis bei einem selektiven IgA-Mangel oder die vermehrte Anfälligkeit gegenüber einer Salmonelleninfektion bei Defensindefizienten Mausmodellen.^{61,62}

Eine weitere Folge einer Barrieredysfunktion ist das Auftreten von Durchfall durch den Leckflux-Diarrhoemechanismus. Pathomechanismen der Diarrhoe inklusive dem Leckfluxmechanismus sollen im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

1.4 Pathomechanismen der (infektiösen) Diarrhoe

Diarrhoe ist letztlich ein gestörtes Gleichgewicht von intestinaler Resorption und Sekretion und letztlich immer ausgelöst durch osmotisch wirksame Kräfte im Darmlumen. Auch wenn man anhand der Pathomechanismen Diarrhoen in verschiedene Formen einteilen kann (s.u.), ist dies eine Einteilung mit eher wissenschaftlich-theoretischer Bedeutung.

In der Praxis zeigt sich nämlich, dass pathogene Erreger oft eine Kombination von Störungen hervorrufen, die zum klinisch evidenten Symptom der Diarrhoe führen und damit meist ein Mischbild verschiedener Diarrhoemechanismen darstellen.

Im Folgenden eine kurze pathophysiologische Einteilung und dann sollen die drei für die infektiöse Diarrhoe wichtigsten Pathomechanismen näher erläutert werden:

Die **osmotische Diarrhoe** im engeren Sinne wird ausgelöst durch Solute, für die es keinen epithelialen Transporter gibt und die dadurch im Darmlumen Wasser binden. Beispiele hierfür sind die Einnahme von großen Mengen Zuckeraustauschstoffen wie beispielsweise Sorbit oder die Einnahme von Magnesiumverbindungen.⁶³

Motilitätsbedingte Diarrhoe bedeutet, dass es aufgrund einer Hypermotilität der intestinalen glatten Muskulatur zu einem beschleunigten Transport durch den Gastrointestinaltrakt kommt. Dies wiederum führt zu einer unzureichenden Kontaktzeit des Chymus mit der epithelialen Oberfläche und damit zu einer reduzierten Absorption. Diesen Pathomechanismus beobachtet man beispielsweise bei der Hyperthyreose oder als Nebenwirkung von Prokinetika.⁶⁴

Malabsorptive Diarrhoe wird durch eine Störung von aktiven Resorptionsprozessen im Dünndarm verursacht, was zum Verbleib von osmotisch wirksamen Substanzen im Darmlumen und zu voluminösen Durchfällen führt. Ein anschauliches Beispiel ist die chirurgische Resektion von Teilen des Dünndarms zum Beispiel im Rahmen einer Durchblutungsstörung bei einem Mesenterialinfarkt. Ein weiteres, weniger dramatisches Beispiel ist die Laktoseintoleranz. Hierbei führt die fehlende Expression der Laktase, die sich im Bürstensaum der Dünndarmenterozyten befindet, zu einer Resorptionsstörung von Laktose. Diese Symptomatik ist durch eine laktosefreie Diät rasch zu beheben.

Sekretorische Diarrhoe kommt durch pathologisch gesteigerte Anionensekretion (gefolgt von Kationen und Wasser) zustande. Sie tritt typischerweise im Rahmen von akuten infektiösen Gastroenteritiden auf, wie z.B. bei der Cholera oder der Reisediarrhoe, also Erkrankungen, die durch bakterielle Exotoxine ausgelöst werden. Diese Diarrhoe ist klinisch durch Reiswasserartige heftige Durchfälle mit erheblichem Flüssigkeits- und Elektrolytverlust gekennzeichnet.⁶⁵

Leckflux-Diarrhoe ist als eigenständiger Mechanismus erst seit den Erkenntnissen über die funktionelle Bedeutung der TJ für die Pathomechanismen von Diarrhoen etabliert worden. So ist vor allem durch die Arbeit von Fasano *et al.* gezeigt worden, dass eine isolierte epitheliale Barrierestörung infolge eines ins Lumen gerichteten passiven Fluxes von kleinmolekularen Substanzen und Wasser eine Diarrhoe hervorrufen kann.⁶⁶ Mittlerweile wissen wir, dass ein Leckfluxmechanismus bei der Diarrhoeentstehung zahlreicher infektiöser Durchfallerkrankungen wie z.B. bei pathogenen *Escherichia coli* (*E. coli*), Salmonellen aber auch Rotaviren beteiligt ist.⁶⁷

1.4.1 Malabsorptive Diarrhoe

Diese Form der Diarrhoe ist klinisch durch ein Malabsorptionssyndrom gekennzeichnet, so dass sich neben der Diarrhoe meist auch ein quantitativer oder qualitativer Mangel an Nährstoffen findet. Dies äußert sich in einem Gewichtsverlust sowie ggf. zusätzlich durch spezifische Mangelerscheinungen, wie z.B. Blutarmut, Hautveränderungen oder Nachtblindheit.

Strukturell oder funktionell kommt es dabei zu einer Verminderung der resorptiven Oberfläche wie dies einerseits durch Fehlen von Darmfläche, z.B. nach chirurgischer Resektion oder durch Funktionsverlust von Darmabschnitten, meist durch entzündliche Veränderungen (Zöliakie, Morbus Crohn, Common-Variable-ImmunoDeficiency-Syndrom) zustande kommt. Auch chronische Infektionen des Dünndarmes im Rahmen eines Morbus Whipple oder einer chronischen Lambliasis führen zu einer malabsorptiven Diarrhoe. Beim Morbus Whipple

kommt es aufgrund der massenhaften Präsenz von Bakterien-beladenden Makrophagen zu einer Zottenreduktion und dadurch verbunden zu einer malabsorptiven Diarrhoe.⁶⁸ Bei der chronischen Lambliasis kommt es zu unterschiedlich ausgeprägten Störungen der Zottenarchitektur, sowie einer verminderten Aktivität von Bürstensaumenzymen.^{69,70} Kinder mit Lamblieninfektion zeigen dabei eine deutliche Wachstumsverlangsamung, die auf die Malabsorption zurückgeführt wird.⁷¹

1.4.2 Sekretorische Diarrhoe

Die Sekretion von Anionen wie Chlorid oder Bikarbonat ist der wesentliche Faktor, der als Mechanismus zur Diarrhoe beiträgt wie zum Beispiel bei der Cholera.

Dieses typische Beispiel einer sekretorischen Diarrhoe wird durch toxintragende Vibrionen ausgelöst. Das Cholera-toxin bewirkt über eine Stimulation der Adenylatzyklase konsekutiv eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen AMP.⁷² Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Sekretion von Anionen in das Lumen. Diesem folgen Kationen und Wasser. Klinisch ist die sekretorische Diarrhoe durch profuse wässrige Durchfälle gekennzeichnet, die einer raschen oralen oder parenteralen Substitutionstherapie bedürfen. Auch im Rahmen der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe gibt es Hinweise auf eine sekretorische Komponente, ausgelöst durch das *Clostridium difficile*-Toxin.^{73,74} In Deutschland und umgebenden Ländern werden infektiöse Diarrhoen am häufigsten durch Noroviren ausgelöst. Auch diese Diarrhoeform geht mit heftigen, wässrigen Diarrhoen einher. Da man bislang dieses Virus nicht in Zellkultur kultivieren kann, sind die Erkenntnisse über die Pathomechanismen dieser viralen Gastroenteritis bisher unzureichend. Die Pathophysiologie der Diarrhoe bei der Rotavirus-Infektion ist dagegen wesentlich besser bekannt: Hier konnte gezeigt werden, dass das nicht-strukturelle Protein 4 (NSP4) zu einer Calcium-vermittelten Chloridsekretion führt.⁷⁵

1.4.3 Leckflux-Diarrhoe

Diese Diarrhoe-Form kommt durch eine vermehrte Passage von Soluten und Wasser aufgrund einer pathologischen Permeabilitätszunahme der TJ für Ionen (und Wasser) zustande.

Es gibt mittlerweile viele Untersuchungen zu Pathogenen und deren Wirkung auf das TJ-Netzwerk des Darmepithels. Hier sind sowohl Umverteilungsvorgänge von TJ-Proteinen durch Beeinflussung intrazellulärer Signalwege, als auch beispielsweise Spaltung von TJ-Molekülen durch bakterielle Proteasen als Pathomechanismus belegt.^{76,67}

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) sind bei Kindern in Entwicklungsländern häufige Diarrhoeerreger, die eine Störung der TJ hervorrufen können. Sie haben die Eigenschaft, sich an das Darmepithel anzuheften und dabei charakteristische „attaching and effacing“ Veränderungen (a/e lesions) zu verursachen. EPEC benutzen eine Art molekulare Spritze, das Typ 3-Sekretionssystem, mit dem sie Effektorproteine direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle injizieren können. Diese Effektormoleküle lösen vielfältige Veränderungen in der Wirtszelle aus, unter anderem auch an der TJ-Barrierefunktion. Hierbei konnte an Zellkulturen eine Umverteilung von TJ-Proteinen und eine elektronenmikroskopisch nachweisbare Veränderung der TJ-Architektur gezeigt werden.⁷⁷

Der häufigste Diarrhoeerreger bei Kindern ist das Rotavirus mit signifikanter Mortalität in Entwicklungsländern. Pathophysiologisch zeigt sich auch hier, dass verschiedene strukturelle (VP8) und nicht-strukturelle (NSP4) virale Proteine zu einer erhöhten epithelialen Permeabilität durch Veränderungen der TJ führen können.⁷⁸

Zudem ergab sich auch bei Messungen an Lamblien-infizierten Personen und im Tiermodell eine erhöhte intestinale Permeabilität,^{79,80} was im Zellkulturmodell auf eine erhöhte Apoptoserate zurückgeführt werden konnte.⁸¹

Neben Veränderungen der TJ-Permeabilität trägt nämlich auch eine Steigerung der physiologischerweise niedrigen epithelialen Apoptoserate zur Barrierestörung im Sinne eines Leckflux-Mechanismus bei. Dies konnte sowohl durch direkte Leitfähigkeitsmessungen an einzelnen Apoptosen als auch durch Induktion und Hemmung der Apoptoserate im Epithel mit den daraus resultierenden elektrophysiologischen Konsequenzen auf den Zellverband gezeigt werden.^{40,82}

Eine erhöhte Apoptoserate als Ursache der intestinalen Barrierestörung zeigt sich beispielsweise im Rahmen einer EPEC-Infektion.⁸³ Auch bei der Clostridienkolitis spielt die Toxin-induzierte epitheliale Apoptose eine pathogenetisch wichtige Rolle.⁸⁴ Vermittelt wird dies im Rahmen einer Infektion entweder durch eine direkte Wirkung durch das pathogene Agens selbst oder indirekt über proinflammatorische Zytokine (z.B. $\text{TNF}\alpha$ oder zytotoxische T-Zellen (FAS-Liganden, Perforin).

Ein weiteres Beispiel für eine durch Pathogene ausgelöste epitheliale Apoptose ist die Produktion von Toxinen. Das von uropathogenen *E. coli* produzierte Toxin „cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1)“ führt beispielsweise zu einer Apoptoseinduktion in Urothelzellkulturen.⁸⁵ Allerdings ist die Rolle dieses Toxins im Darm unklar. Für einen anderen Keim der intestinalen Mikrobiota, *Klebsiella oxytoca*, ist ein Toxin charakterisiert worden, das eine signifikante Apoptoseinduktion des Epithels auslöst.⁸⁶ Dieser Pathomechanismus spielt eine Rolle bei der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe, wo eine Veränderung der Mikrobiota durch eine Antibiotikatherapie (Dysbiose) zu einer schweren hämorrhagischen Kolitis führen kann, die durch toxintragende *Klebsiella oxytoca* Isolate ausgelöst wird.⁸⁷

Interessanterweise konnte in einer kürzlich publizierten Arbeit gezeigt werden, dass enteropathogene *E. coli* auch die epitheliale Apoptose hemmen können.⁸⁸ Es ist vor allem von virusinfizierten Enterozyten bekannt, dass diese ausgelöst durch zytotoxische T-Zellen in Apoptose gehen und abgeschilfert werden. Eine Inhibition der Apoptose kann daher möglicherweise die Persistenz und Replikation der Bakterien im Wirt erleichtern und damit einen Pathogenitätsfaktor darstellen.

1.5 Das intestinale Epithel als Eintrittsort für Erreger

Das intestinale Epithel stellt einen wichtigen Eintrittsort für Erreger dar. Neben der Infektion über das respiratorische Epithel ist der Magen-Darm-Trakt der wichtigste Ort für die Aufnahme von Krankheitserregern in den Organismus. Dies gilt nicht nur für klassische Erreger von gastrointestinalen Infektionen, wie z.B. Noroviren, *Campylobacter* oder Salmonellen,^{89,90,91} sondern auch für systemische Infektionen wie dem Morbus Whipple, Typhus, Listeriose oder der HIV-Erkrankung.^{92,93}

Bei Noroviren geht man davon aus, dass die Viren an die Antigene des AB0-System auf Epithelzellen binden und darüber vermittelt in das Epithel eintreten.⁸⁹ Man weiß, dass die Empfänglichkeit für eine Infektion beim Menschen vom sogenannten Sekretorstatus abhängt.⁹⁴ Der Sekretorstatus wird bestimmt durch den Genotyp der Fucosyltransferase 2 (FUT2). Die FUT2 ist verantwortlich für die Expression des H-Antigen auf den Epithelzellen.

Das H-Antigen, auch H-Vorläufersubstanz genannt, ist die Basis für die AB0-Antigene. Bei circa 30% der Menschen liegt eine Mutation der FUT2 vor, so dass ein „Non-Sekretorstatus“ besteht. Diese Menschen sind vor der Infektion von einigen wichtigen Norovirus Genotypen geschützt.⁹⁵

Einige pathogene Bakterien sind in der Lage, die Phagozytoseaktivität der Epithelzellen zu manipulieren und sich damit Zugang zum Wirt zu schaffen.⁹⁶ Hierbei kann man grundlegend zwei verschiedene Mechanismen unterscheiden, den „Trigger“-Mechanismus und das „Zipper“-Prinzip. Bei Ersterem injizieren die Bakterien über Sekretionssysteme Effektormoleküle in die Zielzelle um dadurch die eigene Aufnahme auszulösen („zu triggern“). Beim Zippermodell exprimiert das Bakterium Oberflächenmoleküle, wodurch wie bei einem Reißverschluss das Bakterium durch die Bindung komplett umhüllt und damit aufgenommen wird.

Auch TJ-Moleküle können direkt als Rezeptoren für Pathogene fungieren. Als Beispiel ist hier das Hepatitis C-Virus oder der Adeno- und Coxsackievirus-Rezeptor zu nennen.^{97,98,99}

Neben der spezifischen Invasion von Erregern in das Epithel kann eine zugrundeliegende Barrierestörung, wie sie zum Beispiel bei Pankreatitis, CED oder Sepsis auftritt, zu einem unkontrollierten Übertritt von Bestandteilen der eigenen Mikrobiota ins Blut führen. Dieser Vorgang, den man bakterielle oder mikrobielle Translokation nennt, stellt eine schwerwiegende Komplikation in den oben genannten Situationen dar.^{100,101} Dabei ist die epitheliale Veränderung nur eine Komponente der globalen Barrierestörung, die in diesem Rahmen weitere wichtige Faktoren beinhaltet, wie die intestinale Mikrobiota und das mukosale Immunsystem.⁷

Welchen Weg die Erreger vom Darmlumen über das intestinale Epithel in das primär sterile Kompartiment der Blutzirkulation nehmen, ist dabei nicht sicher geklärt. Man vermutet, dass Bakterien im Rahmen der gestörten Barriere über den trans- oder auch den parazellulären Weg durchtreten können.¹⁰² Kommt es zu einem Durchtritt durch den Epithelzellverband, führt dies zu einer unkontrollierten Aktivierung des darunter liegenden mukosalen Immunsystems. Welche bakteriellen Mechanismen genau dabei eine Rolle spielen, ist bislang nicht geklärt.

Neben den Epithelzellen spielen auch die M-Zellen (Microfold-Zellen) als Eintrittsort im Rahmen von Infektionen eine Rolle. M-Zellen befinden sich in dem spezialisierten follikel-assoziierten Epithel über den Peyer'schen Plaques und nehmen physiologischerweise Bestandteile aus dem Darm auf und führen diese den darunter liegenden Immunzellen zu.¹⁰³ Viele Pathogene exprimieren Adhäsionsmoleküle, die an M-Zellen binden können, und dringen auf diese Weise in den Körper ein, wie beispielsweise *Yersinia enterocolitica*.¹⁰⁴

Welche pathophysiologische Rolle die dendritischen Zellen bei der Invasion von Erregern spielen, die in der Lage sind, durch das Epithel hindurch unter Ausbildung von TJ-Molekülen Antigene aufzunehmen, ist Gegenstand aktueller Forschung.¹⁰⁵

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Erreger auf die Transport- und Barrierefunktion des Darms zu untersuchen. Dabei war die zentrale Zielsetzung, die Veränderungen der Epithelschicht zu charakterisieren, die als Pathomechanismen dem klinischen Symptom der Diarrhoe zu Grunde liegen. Daneben sollte die Rolle der epithelialen Barriestörung im Rahmen der bakteriellen Translokation, d.h. dem Übertritt von Bakterien der eigenen Mikrobiota ins Blut untersucht werden und dafür verantwortliche bakterielle Faktoren identifiziert werden. Darauf aufbauend sollte ein Screening von nicht-pathogenen, probiotischen Bakterien erfolgen, um Isolate zu identifizieren, die die epitheliale Barrierefunktion stärken und damit Erkrankungen verhindern können. Diese Keime sollten charakterisiert und die dafür verantwortlichen Mechanismen untersucht werden.

Basis der Untersuchung waren verschiedene Modelle der intestinalen epithelialen Barriere.

Einerseits wurden drei verschiedene Kolonkarzinomzelllinien verwendet, nämlich ein konfluenten Monolayer bildender Subklon der Zelllinie HT-29 (HT-29/B6) sowie die Zelllinien Caco-2- und T84. Die wesentliche Arbeit wurde an den HT-29/B6-Zellen vorgenommen. Dieser Subklon wurde in unserem Labor generiert und charakterisiert und zeigt neben der Eigenschaft der Muzin- und Chloridsekretion auch eine deutliche Regulation der Barrierefunktion unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine.^{106,41,42} Auf der Basis dieses reduktionistischen Modells lässt sich die Wirkung von einzelnen Erregern auf die Barriere- und Transportfunktion gut und reproduzierbar untersuchen.

Für Fragestellungen, die in einer höheren Integrationsebene beantwortbar sind, wurden Untersuchungen am Rattendarm *ex vivo* durchgeführt. Hierbei wird nach Tötung der Tiere der Darm entnommen und die Mukosa von der darunterliegenden Schicht frei präpariert („gestrippt“), damit der Darm länger in der Versuchskammer vital bleibt.¹⁰⁷ Diese Methode erlaubt direkte Infektionsversuche an gesunden Därfen sowie die Untersuchung von Därfen von zuvor infizierten Tieren in der Ussing-Kammer.

In einem weiteren Ansatz wurden endoskopisch entnommene humane Biopsien aus dem Duodenum oder dem Dickdarm in modifizierten Ussing-Kammern untersucht. Hierbei kann die Biopsie mehrere Stunden lang vital erhalten und untersucht werden. Diese Technik wurde im Institut für Klinische Physiologie etabliert und erforderte den Bau einer speziellen Halterung für die relativ kleinen Präparate.¹⁰⁸

Unter dem Einsatz genannter Methoden wurden nachfolgende Fragen bearbeitet:

1. Welche epithelialen Barriere- und Transportveränderungen treten beim Menschen im Rahmen einer chronischen Lambliasis auf und welche strukturellen Veränderungen sind dafür verantwortlich?
2. Welche epithelialen Barriere- und Transportveränderungen findet man im Dünndarm von Norovirus-infizierten Patienten und welche strukturellen Veränderungen sind dafür verantwortlich?
3. Kommt es bereits im Rahmen der primären HIV-Infektion zu einer intestinalen Barriestörung und wie verändert sich das mukosale Kompartiment hinsichtlich der Lymphozyten im Rahmen der akuten HIV-Infektion?

4. Gibt es in der Gruppe von nicht-pathogenen *E. coli*-Stämmen Isolate, die in der Lage sind, über das Epithel zu translozieren? Welche Wege der Translokation werden dabei beschrrieben und welche bakteriellen Faktoren sind dafür notwendig?
5. Gibt es probiotische Bakterien, die im Zellkulturmodell eine barriereprotektive Wirkung besitzen und welche Barriereeffekte lassen sich hierbei charakterisieren? Welche bakterielle Faktoren sind für den barrierestärkenden Effekt verantwortlich und über welche Signalwege wird dieser vermittelt?

2 Eigene Arbeiten

2.1 Chronische *Giardia lamblia*-Infektion

Effect of chronic Giardia lamblia infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum

Hanno Troeger, Hans-Joerg Epple, Thomas Schneider, Ulrich Wahnschaffe, Reiner Ullrich, Gerd-Dieter Burchard, Tomas Jelinek, Martin Zeitz, Michael Fromm, Joerg-Dieter Schulzke

Gut 2007;56:328-335 <https://dx.doi.org/10.1136/gut.2006.100198>

Die Lambliasis ist die häufigste Ursache für chronischen Durchfall bei Reiserückkehrern aus den Tropen. In einer Kooperation mit dem Tropeninstitut wurde ein Projekt zur Pathophysiologie der Diarrhoe bei chronischer Lambliasis durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit einer in unserem Labor bereits etablierten miniaturisierten Ussingkammer-Technik durchgeführt, mit der die endoskopisch gewonnenen Duodenalbiopsien von Patienten mit Lambliasis und Kontrollpatienten elektrophysiologisch untersucht wurden. Hierbei zeigte sich als wesentlicher Pathomechanismus die reduzierte Natrium-Glukose-Aufnahme des Epithels als Hinweis auf eine malabsorptive Diarrhoe. Dabei war die reduzierte epitheliale Oberfläche bedingt durch eine Zottenreduktion der wesentliche Faktor.

Als weitere Veränderung fand sich eine erhöhte Bumetanid-hemmbar Anionensekretion, die am ehesten einer gesteigerten Chloridsekretion entspricht. Daneben kommt es bei Patienten mit chronischer Lambliasis zu einer Barrierestörung im Sinne einer Leckflux-Diarrhoe, die durch eine verminderte Claudin-1-Expression und eine erhöhte epitheliale Apoptoserate bedingt war.

Zusammenfassend kam es bei Patienten mit chronischer Lambliasis zu einer kombinierten epithelialen Transport- und Barrierestörung. Dies bestätigte die zuvor publizierten Daten aus einem Zellkultur- und Tierinfektionsmodell einer kanadischen Arbeitsgruppe um Buret *et al.*^{80,81}

2.2 Akute Norovirus-Infektion

Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection

Hanno Troeger, Christoph Loddenkemper, Thomas Schneider, Eckart Schreier, Hans-Joerg Epple, Martin Zeitz, Michael Fromm, Jörg-Dieter Schulzke

Gut 2009;58:1070-1077 <https://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.160150>

Noroviren sind die häufigste Ursache infektiöser Gastroenteritiden in Deutschland und damit eine der häufigsten Infektionserkrankungen überhaupt. Es gibt aber aufgrund der fehlenden Anzuchtmöglichkeit des Virus bisher kaum wissenschaftliche Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Erkrankung. In den Wintermonaten kommt es aufgrund der hohen Infektiosität des Erregers häufig zu Epidemien in Pflegeheimen oder Krankenhäusern.

In dieser Arbeit wurde mittels Impedanzspektroskopie an endoskopisch gewonnenen Duodenalbiopsien Veränderungen der epithelialen Transport- und Barrierefunktion untersucht. Zudem wurde mittels (Immun-)Histologie und Western-Blot weitere zelluläre und ultrastrukturelle Veränderungen der Mukosa im Rahmen der Infektion analysiert.

Es zeigte sich im Duodenum der Patienten eine bereits nach wenigen Tagen auftretende Veränderung der Zottenarchitektur. In dem hier untersuchten Kollektiv halbierte sich die Zottenoberfläche im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Elektrophysiologisch zeigte sich zum Ersten eine deutlich gestörte epitheliale Barrierefunktion mit reduzierter Claudin-4- und Claudin-5-Expression und zum Zweiten eine aktivierte Anionensekretion.

Daneben fanden wir eine durch aktivierte zytotoxische intraepitheliale Lymphozyten bedingte gesteigerte epitheliale Apoptoserate.

Zusammenfassend zeigte sich bei der akuten Norovirusinfektion beim Menschen eine Kombination aus Leckflux-bedingter und sekretorischer Diarrhoe als Ursache der klinisch zu beobachtenden heftigen wässrigen Diarrhoe.

2.3 Akute HIV-Infektion

Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect

Hans-Joerg Epple, Kristina Allers, Hanno Tröger, Anja Kühl, Ulrike Erben, Michael Fromm, Martin Zeitz, Christoph Loddenkemper, Jörg-Dieter Schulzke und Thomas Schneider

Gastroenterology 2010;139:1289-1300 <https://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.065>

Der Gastrointestinaltrakt spielt eine Schlüsselrolle bei der HIV-Infektion. Hier befindet sich die größte Anzahl an aktivierten CD4-T-Zellen, die wiederum der wichtigste Ort der Virusreplikation sind. Zudem kommt es im Rahmen der chronischen HIV-Infektion zu einer intestinalen Barrierestörung und dadurch zu einer Translokation von Antigenen und einer Immunaktivierung. Die Immunaktivierung gilt als die wesentliche Triebkraft für die Immundepletion. Welche Pathomechanismen hier zugrunde liegen, und vor allem wann sich diese Veränderungen beim Menschen ausbilden, ist jedoch unklar.

Mit Hilfe von endoskopisch gewonnenen Biopsien an einem Kollektiv von Patienten mit akuter HIV-Infektion wurde in dieser Arbeit sowohl die epitheliale Barrierefunktion in miniaturisierten Ussing-Kammern als auch mukosale T-Zellpopulationen mit Hilfe von Immunhistologie und Durchflusszytometrie analysiert. Es fand sich überraschenderweise eine erhöhte Anzahl an mukosalen T-Zellen bei der akuten HIV-Infektion im Vergleich zu Patienten mit chronischer HIV-Infektion und im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten. Dabei waren nicht nur CD8-positive sondern auch CD4-positive mukosale T-Zellen erhöht, obwohl letztere in dieser Krankheitsphase typischerweise im Blut erniedrigt sind. Die erhöhte Zahl von CD8-positiven T-Zellen in der Mukosa wiesen einen aktivierten Phänotyp auf (Perforin-positiv) und korrelierten mit einer erhöhten epithelialen Apoptoserate. Die erhöhte epitheliale Apoptoserate ging einher mit einer epithelialen Barrierestörung, die sich in einem erniedrigten epithelialen Widerstand und einer erhöhten Permeabilität für Mannitol ausdrückte.

Zusammengefasst zeigte sich bei der akuten HIV-Infektion eine Infiltration von aktivierten T-Zellen in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes und begleitend eine epitheliale Barrierestörung, die bereits in der akuten Phase der Erkrankung auftrat. Diese Veränderungen sind ursächlich für die im Weiteren stattfindende Immundepletion, die diese Erkrankung charakterisiert.

2.4 *Escherichia coli*- α -Hämolyisin

***Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation**

Hanno Troeger, Jan F. Richter, Lothar Beutin, Dorothee Günzel, Ulrich Dobrindt, Hans-Jörg Epple, Alfred H. Gitter, Martin Zeitz, Michael Fromm und Jörg-Dieter Schulzke

Cellular Microbiology (2007);9:2530-2540

<https://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00978.x>

Ausgehend von der Suche nach *E. coli*-Isolaten der Mikrobiota, die die Eigenschaft besitzen, über einen Epithelverband zu translozieren, wurde die Wirkung von *E. coli* α -Hämolyisin auf die epitheliale Barrierefunktion am Zellkulturmodell untersucht. Alpha-Hämolyisin gehört zur Gruppe der porenbildenden bakteriellen Toxine und gilt als Virulenzfaktor für uropathogene *E. coli*.

Es zeigte sich in Zellkulturexperimenten von intestinalen Monolayern eine vermehrte Translokation von α -Hämolyisin-exprimierenden *E. coli*-Stämmen, was mit einem Widerstandsabfall des Epithelzellverbandes einherging. Die bakterielle Translokation konnte durch Präinkubation des Epithels mit proinflammatorischen Zytokinen verstärkt werden. Alpha-Hämolyisin-mutierte *E. coli* hingegen riefen keinen Widerstandsabfall und keine vermehrte Translokation hervor.

Bei der Charakterisierung des Widerstandsabfalls konnten verstreut auftretende kleine Durchtrittsstellen im Epithel als Ursache der Barriestörung und als Durchtrittsort für Bakterien identifiziert werden, sogenannte „focal leaks“. Diese Veränderungen konnten auch am nativen Rattendarm durch Infektion mit *E. coli* *ex vivo* nachvollzogen werden. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die elektrophysiologische Charakterisierung der *focal leaks* als auch auf die Visualisierung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie gelegt.

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass α -Hämolyisin ein Faktor zu sein scheint, der aus einem Symbiont ein Pathogen machen kann. Das Auftreten von *focal leaks* repräsentiert eine Form der epithelialen Barriestörung, durch die Bestandteile der Mikrobiota translozieren können.

2.5 *Escherichia coli* Nissle 1917

TcpC protein from E. coli Nissle improves epithelial barrier function involving PKC ζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells

Nina A Hering, Jan F Richter, Anja Fromm, Andreas Wieser, Susanne Hartmann, Dorothee Günzel, Roland Bücker, Michael Fromm, Jörg-Dieter Schulzke und Hanno Troeger

Mucosal Immunology (2014);7:369-78 <https://dx.doi.org/10.1038/mi.2013.55>

Neben den Krankheitserregern, die die Darmschleimhaut schädigen oder über diese in den Körper eintreten, gibt es auch probiotische Keime, die in der Lage sind, positive Effekte auf den Wirt auszuüben. Hierbei hat sich das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 als wirksam zur Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa erwiesen.¹⁰⁹ Die Wirkung von *E. coli* Nissle 1917 ist vielfältig und scheint in einer Kolonisationshemmung von Pathogenen, einer anti-inflammatorischen Wirkung auf das mukosale Immunsystem und einer barrierestärkenden Eigenschaft zu bestehen.

Wir konnten hierbei in verschiedenen Modellen die barrierestärkenden Eigenschaften dieses Bakteriums genauer charakterisieren. Wir fanden, dass die Barrierestärkung durch die transkriptionelle Hochregulation eines noch relativ wenig bekannten abdichtenden TJ-Proteins, dem Claudin-14, vermittelt wird. Mittels siRNA konnte die abdichtende Funktion dieses TJ Proteins in HT29/B6 nachgewiesen werden. *E. coli* Nissle 1917 führte zudem zu einer Aktivierung der atypischen Proteinkinase C zeta (PKCzeta), die für die Ausbildung der Polarität von Epithelien eine wichtige Rolle spielt.

Der probiotische Effekt von *E. coli* Nissle 1917 konnte einem bakteriellen Protein, dem TcpC, zugeordnet werden, wobei die genaue Funktion dieses Proteins im Rahmen der epithelialen Veränderungen bislang unklar ist.

Hiermit wurde eine weitere probiotische Eigenschaft des *E. coli* Nissle 1917 charakterisiert, die sich in einer barrierestärkenden Wirkung manifestiert. Dies wird über das bakterielle Protein TcpC vermittelt und führt zu einer transkriptionellen Veränderung der TJ-Zusammensetzung durch Hochregulation von Claudin-14.

3 Diskussion

Grundlegender Ansatz der hier vorgelegten Arbeit ist die Erforschung des Einflusses von im menschlichen Darm befindlichen pathogenen Erregern, Pathobionten und Probiotika auf die Barriere- und Transportfunktion des Darmes. Für diese Funktion des Darmes ist die epitheliale Zellschicht maßgeblich verantwortlich. Daher ist das Epithel ins Zentrum dieser Untersuchungen gestellt worden.

Methodischer Zugang zur epithelialen Barrierestörung beim Menschen

Um eine epitheliale Barrierestörung im Sinne einer erhöhten Permeabilität beim Menschen zu untersuchen, gibt es als einfachsten Ansatz sogenannte Trinkversuche, in denen die intestinale Durchlässigkeit für verschiedene Molekülgrößen nach oraler Aufnahme von Permeabilitätsmarkern untersucht werden kann.¹¹⁰ Bei dieser Methodik bestehen aber Limitationen wie beispielsweise Metabolisierung, inkomplette renale Elimination, Verdünnung durch gastrointestinale Sekretion oder veränderte gastrointestinale Transitzeit,¹⁷ so dass wir Messungen an Biopsie bevorzugt haben, da diese in der Genauigkeit ihrer Aussagen den Trinktestmethoden überlegen sind.

Untersuchungen mittels der klassischen Ussing-Technik ermöglichen eine basale funktionelle Charakterisierung von Epithelien. Die üblichen Ussing-Kammern sind jedoch aufgrund ihrer Größe nicht für menschliche Biopsieproben geeignet. Aus diesem Grund sind für Fragestellungen am Menschen miniaturisierte Ussingkammer entwickelt worden.¹⁰⁸ Dadurch können Erkrankungen, die sich im Duodenum oder im Kolon manifestieren, an endoskopisch entnommenen Biopsien untersucht werden. Dies hat sich in der Vergangenheit und in den hier vorgestellten Arbeiten als gut funktionierende und reproduzierbare Technik erwiesen.^{108,111}

Der mit der klassischen Ussing-Technik messbare Parameter der epithelialen Barriere ist der transepitheliale Widerstand (TER). Dieser besteht aus der Summe der Widerstände des Epithels (R^{epi}) selbst und der Gewebeschichten unterhalb des Epithels (R^{sub}). Um diese beiden Werte getrennt und zerstörungsfrei zu messen, haben wir bei allen Untersuchungen an menschlichen Proben eine Impedanzspektroskopie durchgeführt.

Ein klassisches Beispiel für den Wert dieser Methode ist die kollagene Kolitis. Bei dieser chronischen Durchfallserkrankung kommt es charakteristischerweise zu einer subepithelialen Kollagenablagerung.¹¹² In Biopsieversuchen von erkrankten Patienten zeigt sich keine Änderung im Gesamtwiderstand, allerdings kommt es zu einer starken Verschiebung der einzelnen Widerstandskomponenten, nämlich einer Reduktion des epithelialen und einer Erhöhung des subepithelialen Widerstandes.¹⁹ Beide Veränderungen, die in der Summation nicht signifikant waren, tragen aber zum Pathomechanismus der Diarrhoe bei. Auch bei der chronischen Lambliasis, bei der es charakteristischerweise nur zu einer geringen entzündlichen Infiltration in der Lamina propria kommt,¹¹⁴ zeigen sich lediglich subtile epitheliale Veränderungen. Das bestätigte sich in der fehlenden signifikanten Änderung des Gesamtwiderstandes bei allerdings signifikanter Änderung des epithelialen Widerstandes. Dies passt zu den morphologischen Veränderungen der TJ-Expression und Apoptoseinduktion. Auch bei der akuten HIV-Erkrankung kam es ausschließlich zu einer signifikanten Änderung des epithelialen Widerstandes, nicht aber des subepithelialen Widerstandes. Diese epitheliale Barrierestörung konnte man ohne den Einsatz der Impedanzspektroskopie nicht detektieren. Diese Veränderungen sind biologisch relevant, wie

wir von der Theorie der Barrierestörung als treibende Kraft der Immunaktivierung bei der HIV-Infektion wissen.⁷

Ein weiterer Vorteil der direkten Messung von Biopsien in der Ussing-Kammer besteht darin, dass am gleichen Gewebestück, an denen funktionelle Analysen (Widerstands- und Permeabilitätsmessungen von Markersubstanzen) durchgeführt wurden, anschließend molekularbiologische Untersuchungen (z.B. Western Blot, Immunhistologie) durchgeführt werden können.

Pathomechanismen der infektiösen Diarrhoe

Eine Infektion mit dem begeißelten Protozoon *Giardia lamblia* führt in circa 15-30% der Fälle zu einem chronischen Verlauf mit den Zeichen einer malabsorptiven Diarrhoe. Der Parasit heftet sich mit seiner Saugplatte an die apikale Membran der Dünndarmenterozyten, wo er auch im Rahmen einer Duodenalbiopsie nachgewiesen werden kann.¹¹³ Daneben findet man Zysten und Trophozoiten im Stuhl, deren Nachweis als Goldstandard der Diagnostik gilt. Interessanterweise zeigt sich im Rahmen der Infektion trotz hoher Parasitendichte kaum eine mukosale Entzündungsreaktion.¹¹⁴ Man geht sogar davon aus, dass die Lamblien im Rahmen der Infektion die mukosale Immunantwort inhibieren.¹¹⁵ Eventuell spielt bei dieser „Immun-Evasionsstrategie“ die Depletion von Arginin durch Lamblien-spezifische Arginin-Deiminasen eine Rolle.¹¹⁶ Aus diesem Grund ist diese chronische gastrointestinale Infektion ein interessantes Modell einer offenbar direkten Interaktion der Parasiten mit den die epitheliale Barriere bildenden Enterozyten.

Bei der Charakterisierung der Duodenalschleimhaut von Tropenrückkehrern mit gesicherter Lambliasis bestätigten sich für den Menschen die Daten einer kanadischen Arbeitsgruppe aus Tiermodellen und Zellkulturarbeiten. Dies betrifft einerseits die erhöhte intestinale epitheliale Apoptoserate und andererseits die bereits bekannten malabsorptiven Veränderungen, die sich in unserer Arbeit in einer reduzierten Aufnahmekapazität für Natrium und Glukose über den Symporter SGLT1 darstellten.^{81,69}

Ebenfalls bestätigt werden konnten die Daten aus der Zellkulturarbeit, die einen Effekt auf die TJ-Funktion bei der Lambliasis zeigten. In den Zellkulturarbeiten war dies bedingt durch eine MLCK-abhängige Umverteilung des Ankerproteins ZO-1.⁸⁰ Es liegt also bei der chronischen Lambliasis neben der Zottenreduktion mit Malabsorption auch eine Form der Leckflux-Diarrhoe vor.

Im Gegensatz zur Lamblieninfektion ist die Klinik der akuten Norovirusinfektion durch eine hyperakut auftretende Gastroenteritis mit Übelkeit, Erbrechen, Fieber und einer wässrigen Diarrhoe gekennzeichnet. Die Erkrankung ist die häufigste Form der infektiösen Diarrhoe und verläuft in der Regel selbstlimitierend.¹¹⁷

Bei unseren Untersuchungen war die deutlich aktivierte Anionensekretion im Duodenum der Patienten das hervorstechende Phänomen und wurde hier erstmalig beschrieben. Aufgrund der Ergebnisse der Inhibition mit Chloridkanalblockern muss man dabei von einer aktivierten Chloridsekretion ausgehen. Das klassische Beispiel einer akuten Gastroenteritis mit einer gesteigerten Chloridsekretion ist die Cholera mit Toxin-induzierter elektrogener Chloridsekretion vermittelt über eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen AMP.⁷² Wässriger Durchfall ist auch ein zentrales Symptom der Norovirusinfektion. Ob auch bei dieser Erkrankung die aktivierte Chloridsekretion über zyklisches AMP vermittelt wird, ist unklar. Eine Arbeit aus den 70er Jahren mit intestinalen Homogenaten konnte zumindest keine erhöhte

Aktivität der Adenylatzyklase zeigen.¹¹⁸ Alternativ wäre auch ein vom zyklischen AMP unabhängiger Weg der Chloridsekretionsinduktion möglich. Hier wären vor allem Kalzium-abhängige Signalwege denkbar.¹¹⁹ Dadurch kann auch eine CFTR unabhängige Chloridsekretion über Kalzium-abhängige Chloridkanäle induziert werden, was beispielsweise für das NSP4 von Rotavirus beschrieben wurde.¹²⁰

Intraepitheliale Lymphozytose und Zottenmorphologie bei Infektionen des Gastrointestinaltraktes

In unseren Untersuchungen über akute gastrointestinale Infektionen zeigte sich hinsichtlich der intraepithelialen Lymphozyten sowohl bei der HIV-Infektion als auch im Rahmen der Norovirusinfektion eine Assoziation von aktivierten intraepithelialen Lymphozyten mit einer erhöhten epithelialen Apoptoserate. Humane intraepitheliale Lymphozyten sind fast alle CD8 positiv und besitzen zytotoxische Aktivität.¹²¹ Eine wichtige Differentialdiagnose der intraepithelialen Lymphozytose stellen virale Infektionen des Gastrointestinaltrakts dar. Erstmals konnte dies in der eigenen Arbeit auch für die Norovirusinfektion gezeigt werden.

Beide virale Infektionen – die akute HIV-Infektion und die akute Norovirusinfektion – zeigen neben der intraepithelialen Lymphozytose deutliche morphologische Veränderungen in Form einer Zottenarchitekturstörung. Dies ist zwar bei den klassischen chronischen Dünndarm-erkrankungen wie der Zöliakie oder dem Morbus Crohn bekannt, bei den akuten viralen Infektionen erscheinen morphologische Veränderungen aber zunächst ungewöhnlich. Mit welcher Dynamik morphologische Veränderungen vonstatten gehen können, zeigen Infektionsstudien mit Norovirusisolaten an gesunden Probanden aus den 70er Jahren. Hierbei wurden im zeitlichen Verlauf der Erkrankung mehrfach Biopsate aus der Dünndarmschleimhaut entnommen und analysiert.^{122,123} In diesen Untersuchungen wurde eine schnell einsetzende, reversible Architekturstörung der Dünndarmschleimhaut beschrieben, die von einer vermehrten Infiltration von mononukleären Zellen in der Lamina propria begleitet war. Eine der beiden Arbeiten geht sogar noch weiter ins Detail und bemerkt eine vermehrte Infiltration von mononukleären Zellen im Zwischenraum der Epithelzellen, korrespondierend zu dem, was wir heute als intraepitheliale Lymphozyten beschreiben würden.

Eine rasche Zottenreduktion konnte ebenfalls bei der HIV-Modellinfektion, der SIV (Simianes Immundefizienz-Virus)-Infektion an Rhesusaffen, gezeigt werden. Dabei waren die morphologischen Veränderungen mutmaßlich durch zytotoxische Lymphozyten sowie durch eine Aktivierung von Matrixmetalloproteasen vermittelt.¹²⁴

Man kann spekulieren, ob die intraepithelialen Lymphozyten selbst zu den morphologischen Veränderungen beitragen oder nur ein Epiphänomen sind. Ob dabei primär das Epithel oder eher stromale Veränderungen, wie z.B. Matrixmetalloproteasen, ursächlich für die morphologischen Veränderungen sind, lässt sich aus den hier vorgelegten Arbeiten nicht ableiten. In einer kürzlich publizierten tierexperimentellen Arbeit zeigte sich, dass eventuell Interleukin-15, welches im Rahmen der Zöliakie eine entscheidende Rolle spielt, im Zusammenspiel mit CD4+-T-Zellen zu einer Aktivierung von zytotoxischen CD8+-T-Zellen führt, was eine Sprue-ähnliche Enteropathie mit entsprechenden morphologischen Veränderungen zur Folge hatte.¹²⁵ Der Einsatz von anti-IL15-Antikörpern wird derzeit unter Studienbedingungen bei Patienten mit refraktärer Zöliakie untersucht.

Bakterielle Translokation und Pathobionten

Die Translokation von Makromolekülen und Bakterien spielt in der Pathogenese der Immundefizienz im Rahmen der HIV-Infektion eine wesentliche Rolle.⁷ In einem epithelialen Zellkulturmodell zur bakterielle Translokation konnte von uns das porenbildende α -Hämolyisin von *E. coli* (HlyA) als ursächlich identifiziert werden. Es induzierte typische pathologische Veränderungen mit Ausbildung von *focal leaks* im Epithelverband. An diesen Orten kam es zum Übertritt von Bakterien über das Epithel. Voraussetzung zur Ausbildung von *focal leaks* war eine hohe Toxinkonzentration, so dass primär Bedingungen im Darm vorhanden sein müssen, die ein rasches bakterielles Wachstum erlauben. Dies passt ins Konzept der Dysbiose, ausgelöst durch beispielsweise eine Antibiotikatherapie, einer Immunsuppression oder im Rahmen einer CED. Eine Dysbiose ist vor allem durch eine Reduktion der Diversität der Mikrobiota gekennzeichnet und kann symbiontischen Stämmen der Mikrobiota erlauben, pathogene Effekte auszuüben.¹²⁶

Prinzipiell gelten α -hämolyisierende *E. coli* im Darm eigentlich nicht als pathogene Erreger. Aufgrund von Untersuchungen an gesunden Probanden geht man davon aus, dass circa 10% der *E. coli*-Population hämolytische Stämme sind, auch wenn viele nur geringe Mengen Toxin exprimieren.¹²⁷ Alpha-hämolyisierende *E. coli* zählen zumeist zur Gruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli* und sind hier vor allem mit schweren Verlaufsformen von Harnwegsinfektionen, aber auch mit Bakteriämien und extraintestinalen Infektionen assoziiert.¹²⁸ Diese Krankheitsbilder beinhalten als ersten und wesentlichen Schritt, die epitheliale Barriere zu überwinden, d.h. zu translozieren. Auch hierfür könnte das α -Hämolyisin mit Ausbildung von *focal leaks* im Epithel ein wichtiger Pathomechanismus sein.

Aufgrund dieser Beobachtung und den eigenen Ergebnissen zur Rolle des α -Hämolyisins auf das Darmepithel wurde die Hypothese entwickelt, dass diese sich im Darm befindlichen Keime, beziehungsweise die dort produzierten Toxine, im Rahmen von speziellen Rahmenbedingungen wie z.B. einer Dysbiose der Mikrobiota nach Antibiotikatherapie, im Rahmen einer Immunsuppression oder durch Entzündung des Darmes und einer damit einhergehenden epithelialen Barrierestörung zu *focal leaks* führen können. Diese sind dann wiederum Eintrittspforte für Antigene und ermöglichen darüber hinaus eine bakterielle Translokation der hämolyisierenden Bakterienstämme wie aber auch von anderen Bakterien der Mikrobiota. Man müsste α -Hämolyisin-tragende Bakterien im Darm damit als Pathobionten bezeichnen. Als Pathobionten bezeichnet man Bestandteile der Mikrobiota, die unter bestimmten Bedingungen pathogenes Potential entwickeln können.¹²⁹ Diese Hypothese wurde durch nachfolgende Ergebnisse an Mausmodellen bestätigt.¹³⁰ Hier zeigte sich eine signifikante Verschlechterung einer Kolitis von Interleukin-10-defizienten Mäusen, durch Besiedlung mit einem HlyA-exprimierenden *E. coli*.

Dass dieses Prinzip der lediglich fakultativ pathogenen, toxintragenden Spezies der Mikrobiota (Pathobionten) eventuell weiter zu verallgemeinern ist, zeigen andere Arbeiten über toxintragende *Klebsiella oxytoca*-Stämme. Auch diese Stämme findet man im Stuhl von Gesunden und auch hier bedarf es zunächst einer Dysbiose, ausgelöst durch eine Antibiotikatherapie, die dann im zweiten Schritt einen toxintragenden Stamm zum Pathogen werden lässt, in diesem Fall in Form einer hämorrhagischen Kolitis.^{86,87}

E. coli – eine Frage des Kompartiments?

Neben diesen potentiell pathogenen Effekten auf den Wirt – ausgelöst durch Bestandteile der Mikrobiota – gibt es auch eine Gruppe von Bakterien, die einen positiven Einfluss auf die Gesundheit ausüben, die Probiotika. Der wohl bekannteste Vertreter ist das Isolat *E. coli* Nissle 1917, der unter dem Namen Mutaflor® im Handel erhältlich ist. Zugelassen wurde dieses Probiotikum zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa bei Unverträglichkeit gegenüber Mesalazin. *E. coli* Nissle 1917 wurde vom deutschen Arzt Alfred Nissle im Balkan während des Ersten Weltkrieges aus dem Stuhl eines Soldaten isoliert, der im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an bakterieller Ruhr litt. Der Stamm ist mittlerweile komplett sequenziert und zeigt eine große Nähe zu der Gruppe der uropathogenen *E. coli*.¹³¹ Welche Faktoren einen uropathogenen Keim zu einem Probiotikum werden lassen, ist von großem wissenschaftlichem Interesse. Insbesondere vor dem Hintergrund der therapeutischen Effekte einer Stuhltransplantation bei anhaltend gestörter Mikrobiota durch Antibiotika, um in Zukunft möglicherweise gezielt und kontrolliert die gestörte Mikrobiota wiederherzustellen.

An der gut differenzierten Zelllinie HT-29/B6 zeigte *E. coli* Nissle 1917 eine ausgeprägte barrierestärkende Wirkung. Interessanterweise war dies durch ein einzelnes Protein, das TcpC (Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein) komplett zu erklären. TcpC ist eigentlich ein erst kürzlich charakterisierter Virulenzfaktor von uropathogenen *E. coli*, der durch seine Interferenz mit dem Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalweg über Bindung an das intrazelluläre Adapterprotein MyD88 eine antiinflammatorische, lokal immunsuppressive Wirkung am Urothel entfaltet und dadurch Harnwegsinfekte begünstigt.¹³² Ein TLR-abhängiger Mechanismus konnte allerdings in unserem intestinalen Modell ausgeschlossen werden. Man muss daher davon ausgehen, dass die barrierestärkende Wirkung eine andere, bisher unbekannte Eigenschaft dieses Proteins darstellt, und dass die Eigenschaft des TcpC-exprimierenden Bakteriums (Probiotikum bzw. Uropathogen) Organ-abhängig unterschiedlich zu sein scheint.

Epitheliale Polarität

Der TcpC-tragende *E. coli* Nissle 1917 führte zu einer Aktivierung der PKCzeta im intestinalen Epithelzellverband. PKCzeta wiederum spielt bei der Polarität von Epithelien eine entscheidende Rolle, da sie Teil eines sogenannten Polaritätskomplexes ist, der auch die TJ-Funktion reguliert.¹³³ Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten an T84-Zellen einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die eine Hochregulation von mRNA des apikalen Polaritätskomplexes durch *E. coli* Nissle 1917 zeigen konnten.¹³⁴

Es liegt also nahe, zu vermuten, dass es bakterielle „probiotische“ Faktoren gibt, die die Polarität von Epithelzellen unterstützen.

TJ bewirken mit ihrer "fence function" die Aufrechterhaltung der Polarität zwischen apikaler (oberhalb der TJ gelegenen) und basolateraler (unterhalb der TJ gelegenen) Plasmamembran von Epithel- und Endothelzellen. Dies geschieht, indem die TJ die laterale Diffusion von integralen Membranproteinen zwischen apikal und basolateral verhindert, wozu auch alle Transporterproteine gehören. Die Ungleichverteilung von Kanälen, Carriern und ATPasen bildet eine wesentliche Voraussetzung für einen gerichteten transzellulären Transport. Darüber hinaus ist die Rezeptorausstattung dieser beiden Membranen zumeist unterschiedlich und sodass ein „Andocken“ oder der Eintritt von Erregern über spezifische Oberflächenproteine oft seitenspezifisch (also „polar“) ist. Verändert sich diese Eigenschaft

einer epithelialen Zelle, kommt es zu einer weiteren Form einer Barrierestörung, bei der die Invasion und Transzytose von Bakterien erleichtert ist. Man könnte daher diskutieren, dass die probiotische Wirkung von *E. coli* Nissle 1917 u.a. in der Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität besteht.

Dass Bakterien die Polarität von Epithelzellen beeinflussen können, ist bereits für Pseudomonadenstämme beschrieben worden. Diese schaffen sich an der apikalen Membran lokale Bedingungen wie an der basolateralen Membran, worüber sie dann gut anheften und invadieren können.¹³⁵ Eventuell kann daher *E. coli* Nissle 1917 über das TcPC einen protektive Effekt gegenüber der Invasion von Pathogenen vermitteln. Dies wurde für *E. coli* Nissle 1917 in einem Zellkultur-basierten Invasionsmodell für eine Vielzahl von Pathogenen beschrieben.¹³⁶ Auch proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise für $\text{TNF}\alpha$ gezeigt,¹³⁷ können die epitheliale Polarität stören und dadurch zur Barrierestörung beitragen. Man muss daher davon ausgehen, dass dieser Mechanismus auch im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion im Gastrointestinaltrakt eine Rolle spielt, wie kürzlich für die Zöliakie erstmalig beschrieben worden ist.¹³⁸

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Pathogenen, Pathobionten und von Probiotika auf die intestinale Barriere- und Transportfunktion untersucht. Dies erfolgte anhand von verschiedenen Modellen der intestinalen Barriere, wie Zellkulturen, partiell gestripptem Rattendickdarm und menschlichem Dünn- und Dickdarm durch endoskopisch gewonnene Biopsien. Neben klassischen Methoden der epithelialen Transport- und Barriereforschung wie der Ussingkammer-Technik wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt, um Funktion und Struktur zu untersuchen und diese zu korrelieren. Daneben spielten auch spezialisierte Techniken wie die Impedanzspektroskopie, die Conductance Scanning-Technik oder besondere Anwendungen der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie eine wesentliche Rolle.

Ausgehend von der Frage, welche Bakterien im Zellkulturmodell in der Lage sind, über die intestinale Epithelschicht zu translozieren, wurde eine neue Funktion des lange bekannten *E. coli*-Toxins α -Hämolysin beschrieben. Dieses Toxin gilt eigentlich als Virulenzfaktor von uropathogenen *E. coli*. Erstmals konnte die Rolle dieses Toxins im Darm charakterisiert werden, wo es in der Lage ist, „focal leaks“ im Epithelzellverband zu induzieren und damit eine schwere Barriestörung auszulösen. Diese „focal leaks“ sind Orte des Durchtritts von Bestandteilen der Mikrobiota im Sinne einer bakteriellen Translokation und damit potentieller Motor der Perpetuierung von intestinaler Inflammation wie z.B. bei CED. Alpha-Hämolysin-tragende *E. coli* können damit als Pathobionten bezeichnet werden, d.h. Symbionten die unter speziellen Bedingungen pathogene Eigenschaften entwickeln. Dieses Konzept konnte kürzlich im Tiermodell bestätigt werden.¹³⁰

Aufgrund der Tatsache, dass im Blut von HIV-infizierten Patienten Konzentration bakterieller Bestandteile (LPS) erhöht ist, nimmt man an, dass die epitheliale Barriestörung einen entscheidenden Anteil bei der Immunaktivierung und dem Fortschreiten der HIV-Erkrankung hat. Bei chronisch HIV-infizierten Patienten lässt sich eine Barriestörung nachweisen, die durch den Einsatz einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) komplett reversibel ist. Erstmals konnte mit Hilfe endoskopisch gewonnenen Duodenalbiopsien im Rahmen der akuten HIV-Infektion eine zeitlich früh auftretende Barriestörung nachgewiesen werden. Hierbei fand sich als strukturelles Korrelat eine erhöhte epitheliale Apoptoserate, bedingt durch aktivierte zytotoxische T-Zellen.

Mit Hilfe der speziell für endoskopisch entnommene Biopsien entwickelten Ussing-Kammer konnten zwei klinisch wichtige gastrointestinale Infektionen, die chronische Lambliasis und die akute Norovirusinfektion beim Menschen charakterisiert werden. Bei Tropenrückkehrern mit chronischer Lambliasis zeigte sich neben der bekannten malabsorptiven Veränderung der Dünndarmschleimhaut auch eine erhöhte epitheliale Apoptoserate und eine Veränderung der TJ-Proteinexpression. Dies bestätigte die vorangegangenen Zellkulturarbeiten und konnte erstmals auch beim Menschen eine epitheliale Transport- und Barriestörung belegen. Bei der Norovirusinfektion wurden erstmals überhaupt Daten zur epithelialen Transport- und Barrierefunktion erhoben, da das Virus bislang in Zellkultur nicht anzüchtbar ist. Hierbei fand sich eine erhöhte Anzahl von aktivierten, zytotoxischen intraepithelialen Lymphozyten, verbunden mit einer Reduktion der Zottenoberfläche im Duodenum. Als Korrelat der klinisch im Vordergrund stehenden wässrigen Diarrhoe zeigte sich eine starke Aktivierung der intestinalen Chloridsekretion.

Neben den Untersuchungen zu pathogenen Erregern fand sich in unserem Zellkulturmodell eine Verbesserung der Barrierefunktion nach Zugabe von *E. coli* Nissle 1917, einem für die Colitis ulcerosa zugelassenem Probiotikum. Hierbei wurde erstmalig eine bisher nicht bekannte Funktion eines bislang als Virulenzfaktor von uropathogenen *E. coli* bekannten Proteins (TcpC) beschrieben. Es führte über eine intrazelluläre Signalkaskade zu einer transkriptionellen Hochregulation des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-14.

Zusammenfassend wurde in diesen Arbeiten die vielfältige Interaktion von pathogenen Erregern und Probiotika mit der Epithelschicht des Darmes weiter aufgeklärt. Es zeigt sich dabei, dass diese Interaktion mit den Folgen einer Dysregulation der Transport- und Barrierefunktion sowohl bei klassischen gastrointestinalen Infektionen wie z.B. der Norovirusinfektion als auch bei systemischen Erkrankungen wie z.B. der HIV-Infektion eine entscheidende Rolle spielt. Die Kenntnis dieser Interaktion stellt die Basis dar für mögliche therapeutische Interventionen beispielsweise durch den Einsatz von Probiotika, wie anhand der Wirkungsweise eines einzelnen bakteriellen Proteins von *E. coli* Nissle 1917 dargestellt.

5 Literaturverzeichnis

- ¹ Helander HF, Fändriks L. (2014) Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol.* 49(6):681-9
- ² Macfarlane GT, Macfarlane LE. (2009) Acquisition, evolution and maintenance of the normal gut microbiota. *Dig Dis.* 27 Suppl 1:90-8
- ³ Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. (2014) Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 14:189
- ⁴ Marie I, Ducrotté P, Denis P, Menard JF, Levesque H. (2009) Small intestinal bacterial overgrowth in systemic sclerosis. *Rheumatology* 48(10):1314-9
- ⁵ Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346): 174–180
- ⁶ Bunnell E, Lynn M, Habet K, Neumann A, Perdomo CA, Friedhoff LT, Rogers SL, Parrillo JE. (2000) A lipid A analog, E5531, blocks the endotoxin response in human volunteers with experimental endotoxemia. *Crit Care Med.* 28(8):2713-20
- ⁷ Brenchley JM & Douek DC. (2012) Microbial Translocation Across the GI Tract. *Annu Rev Immunol.* 30: 149–173
- ⁸ Fromm M (2010) Kapitel 3: „Transport in Membranen und Epithelien“, In: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg), 31. Auflage, Springer Medizin, Heidelberg. ISBN 978-3-642-01650-9, p 36-48 and p 895-897
- ⁹ Tuma PL & Hubbard AL. (2003) Transcytosis: Crossing cellular barriers. *Physiol Rev.* 83(3): 871-932
- ¹⁰ Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. (2014) Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Devel Biol.* 36: 166-176
- ¹¹ Schulzke JD, Tröger H, Amasheh M. (2009) Disorders of intestinal secretion and absorption. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 23(3):395-406

-
- ¹² Lorenza Gonzalez-Mariscal, Miguel Quiros, Mónica Diaz-Coranguez and Pablo Bautista (2012). Tight Junctions, Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, Prof. Stevo Najman (Ed.), ISBN:978-953-51-0544-2, InTech, available from: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-and-perspectives-in-cellbiology/tight-junctions>
- ¹³ Günzel D, Fromm M. (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol.* 2(3): 1819-52
- ¹⁴ Staehelin LA. (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci.* 13: 763-786
- ¹⁵ Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. (1993) Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-1788
- ¹⁶ Günzel D, Krug SM, Rosenthal R, Fromm M. (2010) Biophysical methods to study tight junction permeability. *Curr Top Membr.* 65: 39-78
- ¹⁷ Stein J, Ries J, Schröder O, Zeuzem S, Caspary WF. (1994) Methodischer Zugang zur Messung der Permeabilität des Dünndarmes. In: Caspary WF, Kist M, Zeitz M, Hrsg. Ökosystem Darm VI Immunologie, Mikrobiologie, Funktionsstörungen, Klinische Manifestation. Springer Berlin Heidelberg: 72-84
- ¹⁸ Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. (1985) Epithelial and subepithelial contributions to transmural electrical resistance of intact rat jejunum, in vitro. *Pflügers Arch.* 405: 400-402
- ¹⁹ Bürgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2002) Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 123(2): 433-43
- ²⁰ Krug SM, Fromm M, Günzel D. (2009) Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J.* 97(8): 2202-2211
- ²¹ Gitter AH, Bertog M, Schulzke J, Fromm M. (1997) Measurement of paracellular epithelial conductivity by conductance scanning. *Pflügers Arch.* 434(6): 830-40
- ²² Florian P, Schöneberg T, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH. (2002) Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J Physiol.* 545(Pt 2): 485-99
- ²³ Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 511–516
- ²⁴ Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell.* 21: 1200–1213
- ²⁵ González-Mariscal L, Betanzos A, Ávila-Flores A (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Sem. Cell Dev. Biol.* 11: 315–324
- ²⁶ Van Itallie CM, Anderson JM (2004) The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 19: 331–338

-
- ²⁷ Günzel D, Yu AS. (2013) Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* 93(2): 525–569
- ²⁸ Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156(6): 1099-1111
- ²⁹ Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. (2005) Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta.* 1669(1): 34-42
- ³⁰ Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. (2002) *J Cell Sci.* 115(Pt 24): 4969-76
- ³¹ Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* 123: 1913–1921.
- ³² Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y (2014) Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* 344: 304–307.
- ³³ Conrad MP, Piontek J, Günzel D, Fromm M, Krug SM (2016) Molecular basis of claudin-17 anion selectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73: 185–200.
- ³⁴ Amasheh S, Fromm M, Günzel D. (2011) Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol* 201: 133-140
- ³⁵ Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, Yamashita T, Sawada N. (2004) Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp. Cell Res.* 295: 36–4
- ³⁶ Clarke H, Marano CW, Peralta Soler A. & Mullin JM. (2000) Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41: 283–301
- ³⁷ Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, Tavalali S, Fromm M, Schulzke JD. (2009) TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 336: 67–77
- ³⁸ Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M. (2009) Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1165: 294-300
- ³⁹ Utech M, Mennigen R, Bruewer M. (2010) Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 484987
- ⁴⁰ Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. (2000) Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J.* 14(12): 1749-53
- ⁴¹ Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 112: 137-46

-
- ⁴² Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129(2): 550-64
- ⁴³ Madara JL, Stafford J. (1989) Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest.* 83(2): 724-7
- ⁴⁴ Clark EC, Patel SD, Chadwick PR, Warhust G, Curry A, Carlson GL. (2003) Glutamine deprivation facilitates tumour necrosis factor induced bacterial translocation in Caco-2 cells by depletion of enterocyte fuel substrate. *Gut* 52: 224–230
- ⁴⁵ Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. (2013) Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology* 144(2): 369-80
- ⁴⁶ Barrett KE & Keely SJ. (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol.* 62: 535-72
- ⁴⁷ Park HW, Lee MG. (2012) Transepithelial bicarbonate Secretion: Lessons from the pancreas. *Cold Spring Harb Persp Medicine* 2(10): pii: a009571
- ⁴⁸ Binder HJ, Rajendran V, Sadasivan V, Geibel JP. (2005) Bicarbonate secretion a neglected aspect of colonic ion transport. *J Clin Gastroenterol.* 39(4 Suppl 2): S53-8
- ⁴⁹ Pastorelli L, De Salvo C, Mercado JR, Vecchi M, Pizarro TT. (2013) Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. *Front Immunol.* 4: 280
- ⁵⁰ Odenwald M, Turner JR. (2013) Intestinal permeability defects: Is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(9): 1075-1083
- ⁵¹ Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. (1986) Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med.* 105: 883–5
- ⁵² Uhlig HH. (2013) Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut* 62: 1795-1805
- ⁵³ McCole D (2014) IBD Candidate Genes and Intestinal Barrier Regulation. *Inflamm Bowel Dis.* 20: 1829-1849
- ⁵⁴ Bosi E, Molteni L, Radaelli MG, Folini L, Fermo I, Bazzigaluppi E, Piemonti L, Pastore MR, Paroni R. (2006) Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* 49: 2824–7
- ⁵⁵ Yacyszyn B, Meddings J, Sadowski D, Bowen-Yacyszyn MB. (1996) Multiple sclerosis patients have peripheral blood CD45RO⁺ B cells and increased intestinal permeability. *Dig Dis Sci.* 41: 2493–8
- ⁵⁶ Martinez-Gonzalez O, Cantero-Hinojosa J, Paule-Sastre P, Gómez-Magán JC, Salvatierra-Ríos D. (1994) Intestinal permeability in patients with ankylosing spondylitis and their healthy relatives. *Br J Rheumatol.* 33: 644–7

-
- ⁵⁷ Schnabl B. (2013) Linking intestinal homeostasis and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 29(3): 264-70
- ⁵⁸ Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 12(12): 1365-71
- ⁵⁹ Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. (2013) Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev.* 26(1): 2-18
- ⁶⁰ Stockmann M, Fromm M, Schmitz H, Schmidt W, Riecken EO, Schulzke JD. (1998) Duodenal biopsies of HIV-infected patients with diarrhoea exhibit epithelial barrier defects but no active secretion. *AIDS* 12(1): 43-51
- ⁶¹ Zinneman HH, Kaplan AP. (1972) The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Am J Dig Dis.* 17: 793-97
- ⁶² Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. (2003) Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422(6931): 522-6
- ⁶³ Bauditz J, Norman K, Biering H, Lochs H, Pirlich M. (2008) Severe weight loss caused by chewing gum. *BMJ* 336:96-97
- ⁶⁴ Wegener M, Wedmann B, Langhoff T, Schaffstein J, Adamek R. (1992) Effect of hyperthyroidism on the transit of a caloric solid-liquid meal through the stomach, the small intestine, and the colon in man. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 745-9
- ⁶⁵ Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. (2012) Cholera. *Lancet* 379(9835): 2466-76
- ⁶⁶ Fasano A, Baudry B, Pumphlin DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, Kaper JB. (1991) *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(12): 5242-6
- ⁶⁷ Guttman JA & Finlay BB. (2009) Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta.* 1788(4): 832-41
- ⁶⁸ Ratnaike RN. (2000) Whipple's disease *Postgrad Med J* 76: 760-766
- ⁶⁹ Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG. (1992) Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *giardia lamblia*. *Gastroenterology* 103: 506-13
- ⁷⁰ Singh KD, Bhasin DK, Rana SV, Vaiphei K, Katyayal R, Vinayak VK, Singh K. (2000) Effect of *Giardia lamblia* on duodenal disaccharidase levels in humans. *Trop Gastroenterol.* 21: 174-6
- ⁷¹ Newman RD, Moore SR, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. (2001) A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Trop Med Int Health.* 6(8): 624-34
- ⁷² Sharp GW, Hynie S. Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. (1971) *Nature.* 229: 266-9

-
- ⁷³ Lima AA, Lyerly DM, Wilkins TD, Innes DJ, Guerrant RL. (1988) Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect Immun.* 56(3): 582-8
- ⁷⁴ Mitchell TJ, Ketley JM, Burdon DW, Candy DC, Stephen J. (1987) The effects of *Clostridium difficile* crude toxins and purified toxin A on stripped rabbit ileal mucosa in Ussing chambers. *J Med Microbiol.* 23(3): 199-204
- ⁷⁵ Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 272(5258): 101-4
- ⁷⁶ Vogelmann R, Amieva MR, Falkow S, Nelson WJ. (2004) Breaking into the epithelial apical-junctional complex--news from pathogen hackers. *Curr Opin Cell Biol.* 16(1): 86-93
- ⁷⁷ Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 6: 783-793
- ⁷⁸ Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, Magnusson KE, Svensson L. (2001) NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells *J Virol.* 75(3): 1540-6
- ⁷⁹ Serrander R, Magnusson KE, Sundqvist T. (1984) Acute infections with *Giardia lamblia* and rotavirus decrease intestinal permeability to low-molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). *Scand J Infect Dis.* 16(4): 339-44
- ⁸⁰ Scott KGE, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG. (2002) Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123: 1179-90
- ⁸¹ Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. (2002) Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier funktion in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun.* 70(7): 3673-80
- ⁸² Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, Fromm M, Schulzke JD. (2001) Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol.* 535(Pt 2): 541-52
- ⁸³ Crane JK, Majumdar S, Pickhardt DF. (1999) Host cell death due to enteropathogenic *Escherichia coli* has features of apoptosis. *Infect Immun.* 67(5): 2575-84
- ⁸⁴ Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP. (1996) Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut* 38(3): 337-47
- ⁸⁵ Mills M, Meysick KC, O'Brien AD. (2000) Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun.* 68(10): 5869-80
- ⁸⁶ Schneditz G, Rentner J, Roier S, Pletz J, Herzog KA, Bückner R, Troeger H, Schild S, Weber H, Breinbauer R, Gorkiewicz G, Högenauer C, Zechner EL. (2014) Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(36): 13181-6

-
- ⁸⁷ Högenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G, Krause R, Gerstgrasser N, Krejs GJ, Hinterleitner TA. (2006) *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *N Engl J Med.* 355(23): 2418-26
- ⁸⁸ Pearson JS, Giogha C, Ong SY, Kennedy CL, Kelly M, Robinson KS, Lung TW, Mansell A, Riedmaier P, Oates CV, Zaid A, Mühlen S, Crepin VF, Marches O, Ang CS, Williamson NA, O'Reilly LA, Bankovacki A, Nachbar U, Infusini G, Webb AI, Silke J, Strasser A, Frankel G, Hartland EL. (2013) A type III effector antagonises death receptor signalling during bacterial gut infection. *Nature* 501(7466): 247-51
- ⁸⁹ Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X and Le Pendu J. (2002) Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122: 1967-1977
- ⁹⁰ O Cróinín T, Backert S. (2012) Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 2:25
- ⁹¹ Finlay BB, Fry J, Rock EP, Falkow S. (1989) Passage of *Salmonella* through polarized epithelial cells: role of the host and bacterium *J Cell Sci Suppl.* 11:99-107
- ⁹² Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, Beier V, Machner MP, Domann E, Wehland J, Chakraborty T, Heinz DW. (2002) Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* 111(6):825-36
- ⁹³ Hocini H, Bomsel M. (1999) Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins *J Infect Dis.* Suppl 3:S448-53
- ⁹⁴ Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendu J, Baric R. (2003) Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection *Nat Med.* 9(5):548-53
- ⁹⁵ Currier RL, Payne DC, Staat MA, Selvarangan R, Shirley SH, Halasa N, Boom JA, Englund JA, Szilagyi PG, Harrison CJ, Klein EJ, Weinberg GA, Wikswo ME, Parashar U, Vinjé J, Morrow AL. (2015) Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. *Clin Infect Dis.* 60(11):1631-8.
- ⁹⁶ Kumari S, Mg S, Mayor S. (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research* 20: 256-275
- ⁹⁷ Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805
- ⁹⁸ Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. (2008) The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol.* 82: 3555-3560
- ⁹⁹ Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15191-15196

-
- ¹⁰⁰ Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KK. (1993) Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg.* 165(1): 46-50
- ¹⁰¹ O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. (1998) Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 42(1): 29-35
- ¹⁰² Berg RD. (1995) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 3: 149–154
- ¹⁰³ Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2(11): 1004-9
- ¹⁰⁴ Hanski C, Kutschka U, Schmoranzler HP, Naumann M, Stallmach A, Hahn H, Menge H, Riecken EO. (1989) Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun.* 57(3): 673-8
- ¹⁰⁵ Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P. (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204(5): 572-81
- ¹⁰⁶ Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. (1991) Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol.* 261(4 Pt 1): C574-82
- ¹⁰⁷ Schulzke JD, Fromm M, Hegel U. (1996) Epithelial and subepithelial resistance of rat large intestine: segmental differences, effect of stripping, time course, and action of aldosterone. *Pflügers Arch.* 407(6): 632-7
- ¹⁰⁸ Stockmann M, Gitter AH, Sorgenfrei D, Fromm M, Schulzke JD. (1999) Low edge damage container insert that adjusts intestinal forceps biopsies into Ussing chamber systems. *Pflügers Arch.* 438(1): 107-12
- ¹⁰⁹ Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53(11): 1617-23
- ¹¹⁰ Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. (1995) Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108(5): 1566-81
- ¹¹¹ Stockmann M, Fromm M, Schmitz H, Schmidt W, Riecken EO, Schulzke JD. (1998) Duodenal biopsies of HIV-infected patients with diarrhoea exhibit epithelial barrier defects but no active secretion. *AIDS* 12(1): 43-51
- ¹¹² Guarda LA, Nelson RS, Stroehlein JR, Korinek JK, Raymond AK. (1983) Collagenous Colitis. *Am J Clin Pathol* 80(4): 503-7
- ¹¹³ Wahnschaffe U, Ignatius R, Loddenkemper C, Liesenfeld O, Muehlen M, Jelinek T, Burchard GD, Weinke T, Harms G, Stein H, Zeitz M, Ullrich R, Schneider T. (2007) Diagnostic value of endoscopy for the diagnosis of giardiasis and other intestinal diseases in patients with persistent diarrhea from tropical or subtropical areas. *Scand J Gastroenterol.* 42: 391-6
- ¹¹⁴ Oberhuber G, Kastner N, Stolte M. (1997) Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol* 32: 48–51

-
- ¹¹⁵ Cotton JA, Motta J-P, schenck LP, Hirota SA, Beck PL, Buret AG. (2014) *Giardia duodenalis* Infection Reduces Granulocyte Infiltration in an in vivo Model of Bacterial Toxin-induced Colitis and Attenuates Inflammation in Human Intestinal Tissue. *PLoS One*. 9(10): e109087
- ¹¹⁶ Banik S, Viberos PB, Seeber F, Klotz C, Ignatius R, Aebischer T. (2013) *Giardia duodenalis* Arginine Deiminase Modulates the phenotype and cytokine secretion of human dendritic cells by depletion of arginine and Formation of Ammonia. *Infect Immun*. 81(7): 2309-17
- ¹¹⁷ Schneider T, Schreier E, Zeitz M. (2007) [Noroviruses: most frequent cause of infectious gastroenteritis]. *Dtsch Med Wochenschr*. 132(43):2261-6
- ¹¹⁸ Levy AG, Widerlite L, Schwartz CJ, Dolin R, Blacklow NR, Gardner JD, Kimberg DV, Trier JS. (1976) Jejunal adenylate cyclase activity in human subjects during viral gastroenteritis. *Gastroenterology* 70: 321–325
- ¹¹⁹ Murek M, Kopic S, Geibel J. (2010) Evidence for intestinal chloride secretion. *Exp Physiol*. 95(4):471-8
- ¹²⁰ Morris AP, Scott JK, Ball JM, Zeng CQ, O'Neal WK & Estes MK. (1999) NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca²⁺-mediated I⁻ influx into intestinal crypts of CF mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277, G431–G44
- ¹²¹ Beagley KW, Husband AJ. (1998) Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. *Crit Rev Immunol*. 18(3):237-54
- ¹²² Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, Northrup RS. (1973) Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. *Ann Intern Med* 79: 18–25
- ¹²³ Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. (1973) The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* 21: 1318–22
- ¹²⁴ Kewenig S, Schneider T, Hohloch K, Lampe-Dreyer K, Ullrich R, Stolte N, Stahl-Hennig C, Kaup FJ, Stallmach A, Zeitz M. (1999) Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology* 116: 1115-23
- ¹²⁵ Korneychuk N, Ramiro-Puig E, Ettersperger J, Schulthess J, Montcuquet N, Kiyono H, Meresse B, Cerf-Bensusan N. (2014) Intereukin 15 and CD4+ T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietars antigen. *Gastroenterology* 146(4): 1017-27
- ¹²⁶ Buttó LF, Schaubeck M, Haller D. (2015) Mechanisms of Microbe-Host Interaction in Crohn's Disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection. *Front Immunol*. 19;6:555.
- ¹²⁷ Siitonen A. (1992) *Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity. *J Infect Dis*. 166: 1058-1065
- ¹²⁸ Johnson JR and Russo TA. (2002) Extraintestinal pathogenic *E. coli*: „the other bad *E. coli*“. *J Lab Clin Med*. 139: 155-162
- ¹²⁹ Chow J, Tang H, Mazmanian SK. (2011) Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol* 23: 473-480.

-
- ¹³⁰ Bückler R, Schulz E, Günzel D, Bojarski C, Lee IF, John LJ, Wiegand S, Janßen T, Wieler LH, Dobrindt U, Beutin L, Ewers C, Fromm M, Siegmund B, Troeger H, Schulzke JD. (2014) Alpha-Hemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut* 63(12): 1893-901
- ¹³¹ Reister M, Hoffmeier K, Krezdorn N, Rotter B, Liang C, Rund S, Dandekar T, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA. (2014) Complete genome sequence of the Gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Biotechnol.* 187: 106-7
- ¹³² Cirl C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, Fischer H, Stappert D, Wantia N, Rodriguez N, Wagner H, Svanborg C, Miethke T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.* 14: 399–406
- ¹³³ Bryant DM & Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissues. (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(11): 887-901
- ¹³⁴ Veltman K, Hummel S, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. (2012) Identification of specific miRNAs targeting proteins of the apical junctional complex that stimulate the probiotic effect of Nissle 1917 on T84 epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 44: 341-349
- ¹³⁵ Kierbel A, Gassama-Diagne A, Rocha C, Radoshevich L, Olson J, Mostov K, Engel J. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane. *J. Cell Biol.* 177: 21–27
- ¹³⁶ Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschlaeger TA. (2004) The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40(3):223-9
- ¹³⁷ Mashukova A, Wald FA, Salas PJ. (2011) Tumor Necrosis Factor Alpha and Inflammation Disrupt the Polarity Complex in Intestinal Epithelial Cells by a Posttranslational Mechanism. *Mol Cell Biol.* 31(4): 756-65
- ¹³⁸ Schumann M, Günzel D, Buergel N, Richter JF, Troeger H, May C, Fromm A, Sorgenfrei D, Daum S, Bojarski C, Heyman M, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2012) Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut* 61(2): 220-8

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Physiologie für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit, sowie meinen Kooperationspartnern. Besonderer Dank gilt hierbei Anja Fromm, bei der kaum eine Frage im Laboralltag unbeantwortet bleibt und Detlef Sorgenfrei, der leider bereits verstorben ist, der mir bei der Impedanzspektroskopie mit Rat und Tat zur Seite stand.

Großer Dank gilt den beiden Laborleitern Prof. Dr. Michael Fromm und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke für die kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch dem leider bereits verstorbenen ehemaligen Klinikdirektor Prof. Dr. Martin Zeitz für seine Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Entwicklung.

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider und PD Dr. Hans-Jörg Epple bedanken für die Kooperation und Hilfestellung bei infektiologisch, klinisch-wissenschaftlichen Fragestellungen. Besonders hervorheben möchte ich hier die klinische Weiterbildungszeit auf der damaligen Isolierstation unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider, die einige wesentliche wissenschaftliche Projekte angestoßen haben.

Für die Unterstützung bei der Habilitationsschrift sowie in der täglichen klinischen Arbeit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Britta Siegmund herzlich bedanken.

Und schließlich danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Nane, ohne deren Rückhalt diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Erklärung

Erklärung nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift