

Mechanismen der Barriere-Protektion von Resveratrol und Curcumin bei *Campylobacter jejuni*-Infektion

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Fábia Daniela Lobo da Fonseca de Sá

aus Berlin

März 2021

Diese Dissertation wurde in dem Zeitraum vom 15. Oktober 2017 bis zum 31. März 2021 unter der Leitung von PD. Dr. Roland Bücke in der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Arbeitsbereich Ernährungsmedizin / Klinische Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Roland Bücke

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Arbeitsbereich Ernährungsmedizin / Klinische Physiologie
Campus Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12203 Berlin
Tel.: +49 (0) 30 450 514548
E-Mail: roland-felix.buecker@charite.de

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Tauber

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Institut für Laboratoriumsmedizin,
Klinische Chemie und Pathobiochemie
Campus Virchow Klinikum
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin
Tel.: +49 (0) 30 450 569001
E-Mail: rudolf.tauber@charite.de

Disputation am: 11. Mai 2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die epitheliale Barriere	1
1.1.1	Funktion intestinaler Epithelien	1
1.1.2	Die <i>Tight Junction</i>	2
1.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	5
1.2.1	<i>Campylobacter jejuni</i> -induzierte Immunantwort	8
1.2.2	Diarrhömechanismen bei <i>Campylobacteriosen</i>	10
1.2.3	<i>Campylobacter jejuni</i> -Infektionsmodelle <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	13
1.3	Therapieoptionen und protektive Ansätze	15
1.3.1	Resveratrol	16
1.3.2	Curcumin	17
1.4	Zielstellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Labormaterial	25
2.1.3	Geräte	28
2.1.4	Zellen, Mikroorganismen und Zytokine	31
2.1.5	Medien, Lösungen und Puffer	31
2.1.5.1	Medien	31
2.1.5.2	Lösungen und Puffer	33
2.1.6	Kits	35
2.1.7	Antikörper	36
2.1.8	Software	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Zellbiologische Methoden	39
2.2.1.1	Kultivierung humaner Zelllinien und Stimulation	39
2.2.1.2	<i>In vitro</i> -Infektionsmodell	40
2.2.1.3	<i>In vitro</i> -Testsubstanzgabe	40
2.2.2	Mausmodell	41
2.2.2.1	Behandlung der Mäuse	41
2.2.2.2	<i>In vivo</i> -Infektionsmodell	41
2.2.3	Biochemische Methoden	42
2.2.3.1	Zytotoxizitäts-Assay	42
2.2.3.2	Cytometric Bead Array und Durchflusszytometrie	42
2.2.3.3	Western Blot	42
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	44

2.2.4.1	RNA-Isolation von Epithelzellen, Quantifizierung und cDNA-Synthese	44
2.2.4.2	<i>Next Generation Sequencing</i> , RNA-Sequenzierung und IPA-Analyse	45
2.2.5	Elektrophysiologische Methoden	46
2.2.5.1	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes in Zellkulturen	46
2.2.5.2	Ussingkammer Messungen	46
2.2.5.3	Permeabilitätsbestimmung	48
2.2.6	Histologische Methoden	48
2.2.6.1	Immunhistochemische Färbung und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	48
2.2.6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Kolonproben der Maus	49
2.2.7	Statistische Analysen	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Untersuchung der Barrierestörung durch <i>Campylobacter jejuni</i> in verschiedenen intestinalen Epithelzellkulturen	51
3.2	Potenzielle protektive oder therapeutische Substanzen gegen die <i>Campylobacter jejuni</i>-Infektion	52
3.3	Protektive Wirkung von Resveratrol auf die <i>Campylobacter jejuni</i>-induzierte Barrierestörung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
3.3.1	Resveratrol minimiert die durch <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierte Barrierestörung	54
3.3.2	Einfluss von Resveratrol auf die Expression von <i>Tight Junction</i> -Proteinen und deren Lokalisation	56
3.3.3	Wirkung von <i>Campylobacter jejuni</i> und Resveratrol auf die Apoptose-Induktion	61
3.3.4	<i>In vitro</i> -Zytokin-Stimulation und die Behandlung mit Resveratrol	62
3.4	Etablierung eines Co-Kultur-Modells mit humanen intestinalen Epithelzellen und Immunzellen	63
3.5	Protektive Wirkung von Curcumin auf die immunvermittelte <i>Campylobacter jejuni</i>-induzierte Barrierestörung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	65
3.5.1	Curcumin inhibiert den durch <i>Campylobacter jejuni</i> -vermittelten Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand	65
3.5.2	Curcumin stärkt die epitheliale Barriere belegt durch eine Verringerung der Permeabilität für Fluorescein	66
3.5.3	Curcumin reduziert die <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierte Immunantwort	67
3.5.4	Einfluss von <i>Campylobacter jejuni</i> und Curcumin auf die Expression von <i>Tight Junction</i> -Proteinen	69
3.5.5	Einfluss von <i>Campylobacter jejuni</i> und Curcumin auf die Lokalisation von <i>Tight Junction</i> -Proteinen	70
3.5.6	Wirkung von <i>Campylobacter jejuni</i> und Curcumin auf die Apoptose-Induktion	74
3.5.7	Rolle des NFκB-Signalweges hinsichtlich der Barrierefunktion	75
3.5.8	RNA-Sequenzierungsanalyse mit <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>	76

4	Diskussion	79
4.1	<i>Campylobacter jejuni</i> induziert intestinale Barrierestörungen.....	79
4.2	Die <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierte Immunantwort hat einen Einfluss auf die Barrierefunktion	82
4.3	Verminderung der <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierten Barrierestörung durch Resveratrol und Curcumin	86
4.4	Potenzielle synergistische Effekte von Resveratrol, Curcumin und weiteren antiinflammatorischen und Barriere-protectiven Substanzen	90
4.5	Ausblick	93
5	Zusammenfassung	95
6	Summary	97
7	Literaturverzeichnis.....	98
I.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III.	Tabellenverzeichnis.....	VI
IV.	Verzeichnis der Publikationen.....	VII
V.	Lebenslauf.....	IX
VI.	Anhang.....	X

1 Einleitung

1.1 Die epitheliale Barriere

Epithelien kleiden fast alle Körperoberflächen aus, grenzen das Körperinnere von externen Einflüssen ab, wie beispielsweise die Haut, den Urogenital- oder den Respirationstrakt, und formen somit eine physikalische Barriere. Die größte Epitheloberfläche bildet dabei der Gastrointestinaltrakt. Die Barrierefunktion der Epithelien ist jedoch nicht absolut, denn sie ermöglichen zugleich einen geregelten Stoffaustausch zwischen inneren und äußeren Kompartimenten.

Die Funktion der epithelialen Barriere für Ionen kann mithilfe elektrophysiologischer Techniken charakterisiert werden. Dabei definieren der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) und der Kurzschlussstrom die Integrität der epithelialen Barriere bzw. den aktiven Ionentransport. Der dänische Physiologe Hans Henriksen Ussing publizierte 1949 die bis heute eingesetzte Ussingkammer-Technik, mit der gut definierte Messungen an Geweben durchgeführt werden können (Ussing 1949). Messungen von TER, Kurzschlussstrom und Fluxen bzw. Permeabilität für kleine Markermoleküle, wie Fluorescein (332 Da), Dextran (4 kDa) oder Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*; HRP; 44 kDa) können in Ussingkammern analysiert werden. Außer in der Ussingkammer kann der TER an epithelialen Zellkulturen auch mittels Chopstick-Elektroden gemessen werden.

1.1.1 Funktion intestinaler Epithelien

Im Darm bilden Mikroorganismen, die Mukusschicht, die Epithelzellen und das darunterliegende mukosale Immunsystem einen Schutzschild gegenüber Noxen, die intestinale Barriere (Stange und Schroeder 2019). Das intestinale Epithel besteht aus polarisierten Epithelzellen und erfüllt unter anderem zwei wichtige Aufgaben. Zum einen bilden die Epithelzellen eine selektive Barriere, um den Organismus vor schädlichen Einflüssen, wie Bakterien, Viren, Antigenen und Toxinen zu schützen. Zum anderen werden Nährstoffe, Elektrolyte, kurzkettige Fettsäuren (*short-chain fatty acids*; SCFA), Aminosäuren, Zucker und Wasser über das Epithel resorbiert oder sezerniert (Ferraris und Diamond 1997, Kunzelmann und Mall 2001, Bliklager *et al.* 2007, Groschwitz und Hogan 2009). Der Stoffaustausch erfolgt dabei sowohl über den transzellulären als auch über den parazellulären Weg (Ferraris und Diamond 1997) (Abbildung 1). Während bei der transzellulären Passage direkt durch die Zelle hindurch Kanäle, Carrier und Pumpen benötigt werden oder Transportprozesse aktiv über rezeptorvermittelte Transzytose ablaufen, erfolgt die parazelluläre Passage getrieben durch elektrochemische Gradienten passiv über den intrazellulären Spalt

durch die *Tight Junction* (TJ) hindurch (Anderson 2001). In Abhängigkeit vom Darmsegment (proximal oder distal) bzw. der Differenzierungsseite in der Schleimhaut (Krypte, Oberfläche oder Zotten) wird durch das Expressionsmuster und die Verteilung verschiedener TJ-Proteine, insbesondere der Claudine, die intestinale epitheliale Barrierefunktion aufrechterhalten.

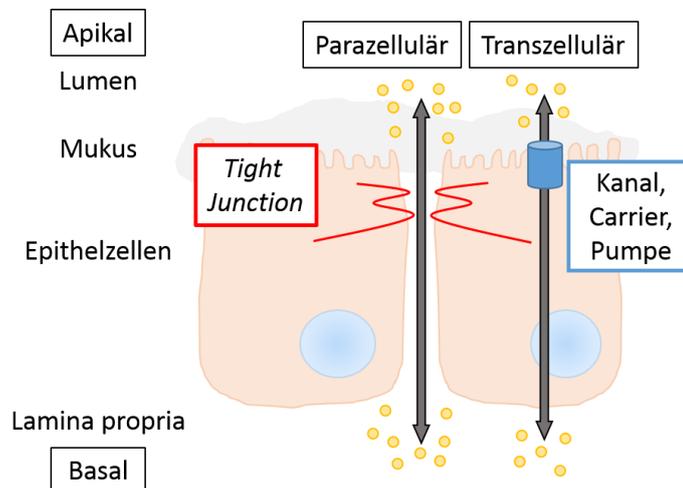


Abbildung 1: Transportwege durch die Epithelschicht. Über den parazellulären Weg werden Ionen, Elektrolyte und Wasser durch den intrazellulären Spalt passiv durch die *Tight Junction* hindurch transportiert. Im Gegensatz dazu erfolgt ein aktiver Transport über den transzellulären Weg mittels Kanälen, Carriern, Pumpen oder (hier nicht dargestellt) rezeptorvermittelter Transzytose.

1.1.2 Die *Tight Junction*

Benachbarte Epithelzellen werden über ein kontinuierliches Netzwerk aus verschiedenen Membranproteinen miteinander verknüpft, welche den junctionalen Komplex (Schlussleistenkomplex) bilden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichten bereits vor 50 Jahren eine Visualisierung der Zell-Zell-Verbindungen und des Netzwerkes der TJ-Proteine (Abbildung 2A und B) (Staehein 1974). Die Proteine des junctionalen Komplexes dichten in erster Linie das Epithel ab. Dabei besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Anzahl der Stränge (*strands*) der Zell-Zell-Verbindungen und der Dichtigkeit des Epithels (Claude und Goodenough 1973, Claude 1978). Inzwischen ist allerdings bekannt, dass die Dichtigkeit bzw. Undichtigkeit von Epithelien sowohl von der parazellulären als auch von der transzellulären Permeabilität abhängig ist und sich „lecke“ oder „dichte“ Epithelien abhängig von der Zusammensetzung der TJ-Proteine ausbilden bzw. definieren (Fromm 2019). Zum junctionalen Komplex gehören die lateroapikal gelegenen transmembranen TJ-Proteine, welche auch als Schlussleiste oder *Zonula occludens* bezeichnet werden. Unter der TJ liegt die *Adherens Junction*, die knopfartigen Desmosomen (Farquhar und Palade 1963) und die *Gap Junction*, welche jedoch nicht zu dem junctionalen Komplex gehören

(Abbildung 2C). *Adherens Junctions* und *Desmosomen* dienen vorrangig der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte, besitzen signalvermittelnde Funktionen zur Kommunikation benachbarter Zellen und tragen im Gegensatz zur TJ nicht zur parazellulären Barriere bei (Shen *et al.* 2009).

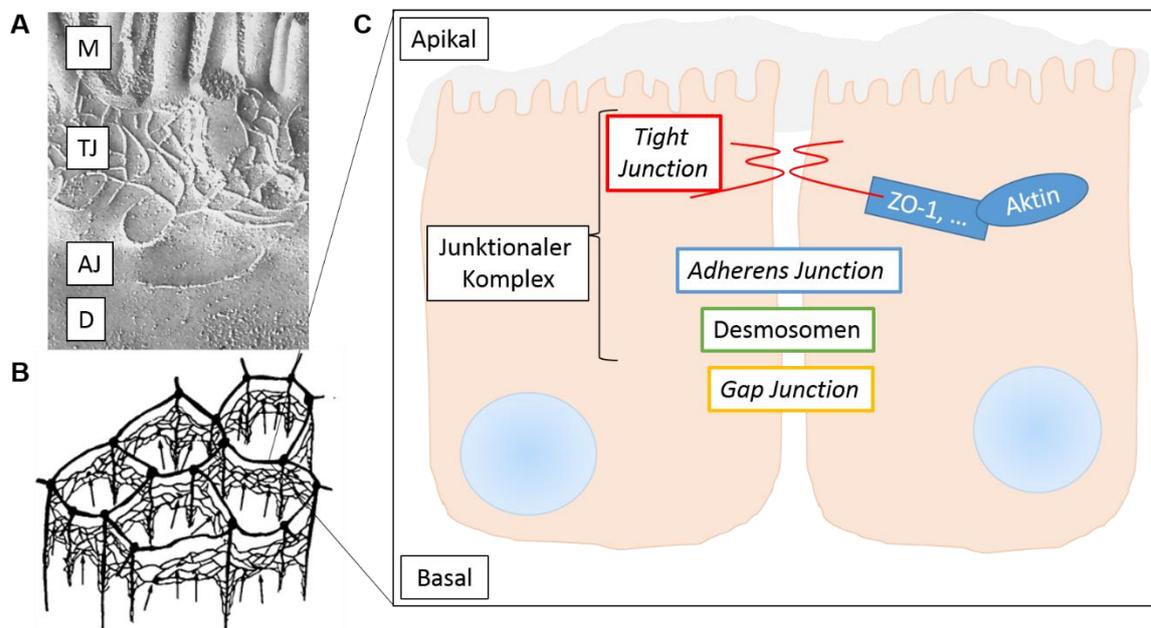


Abbildung 2: Darstellung des junctionalen Komplexes. **A)** Elektronenmikroskopische Aufnahme des kontinuierlichen *Tight Junction* (TJ)-Netzwerkes intestinaler Epithelzellen (modifiziert nach Staehelin 1974). Die TJ befinden sich direkt unterhalb der apikalen Mikrovilli (M). Weiter basolateral folgen die *Adherens Junction* (AJ) und die punktuell lokalisierten *Desmosomen* (D). **B)** Drei-dimensionales Schema der Zellgrenzen von fünf Epithelzellen. Die Proteine des junctionalen Komplexes umspannen die Epithelzellen gürtelartig (Menco 1988). **C)** Schematische Zusammensetzung des junctionalen Komplexes, welcher aus TJ, *Adherens Junction* und *Desmosomen* besteht. Darunter sind *Gap Junctions* lokalisiert. TJ binden mit ihrem längeren C-Terminus an Gerüstproteine, wie das *Zonula Occludens Protein-1* (ZO-1), welches wiederum direkt an Aktin binden kann.

Das erste identifizierte transmembranale TJ-Protein war Occludin (Furuse *et al.* 1993), gefolgt von der Familie der Claudine (Furuse *et al.* 1998) und Tricellulin, welches präferentiell in der drei oder mehr Zellen miteinander verknüpfenden trizellulären TJ lokalisiert ist und die parazelluläre Passage gegenüber kleinen Makromolekülen abdichtet (Ikenouchi *et al.* 2005, Krug *et al.* 2009). Das *Junctional Adhesion Molecule* (JAM)-Protein ist ebenfalls Bestandteil der Gruppe der Transmembranproteine. Occludin gehört neben MarvelD3 und Tricellulin (MarvelD2) zu der *Tight junction-associated MARVEL Protein* (TAMP)-Familie (Raleigh *et al.* 2010). Die TJ-Proteine sind mit intrazellulären Gerüstproteinen, wie *Zonula Occludens-Protein-1* (ZO-1), -2 und -3, MUPP1, Cingulin oder MAGI verbunden, welche wiederum mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft sind (Van Itallie und Anderson 2014, Shi *et al.* 2018). TJ-Proteine können direkt miteinander interagieren. Dies erfolgt entweder zwischen nebeneinander liegenden Proteinen innerhalb einer Zellmembran (cis-Interaktion) oder zwischen Proteinen von gegenüberliegenden Zellen (trans-Interaktion) (Krause *et al.*

2008). Neben einer stabilisierenden Aufgabe gewährleisten und begrenzen die TJ-Proteine die selektive Diffusion von Ionen und Elektrolyten und bilden somit eine Diffusionsbarriere (*gate function*). Außerdem ermöglichen die TJ-Proteine die Polarisation der Epithelzellen, indem sie die Vermischung von Transmembranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran verhindern. Diese Funktion wird auch als Zaunfunktion (*fence function*) bezeichnet (Mandel *et al.* 1993). Eine weitere wichtige Rolle spielen die TJ in der Signaltransduktion (González-Mariscal *et al.* 2008, Balda und Matter 2009) sowie in der Funktion des angeborenen Immunsystems (Sawada 2013) (Abbildung 3).

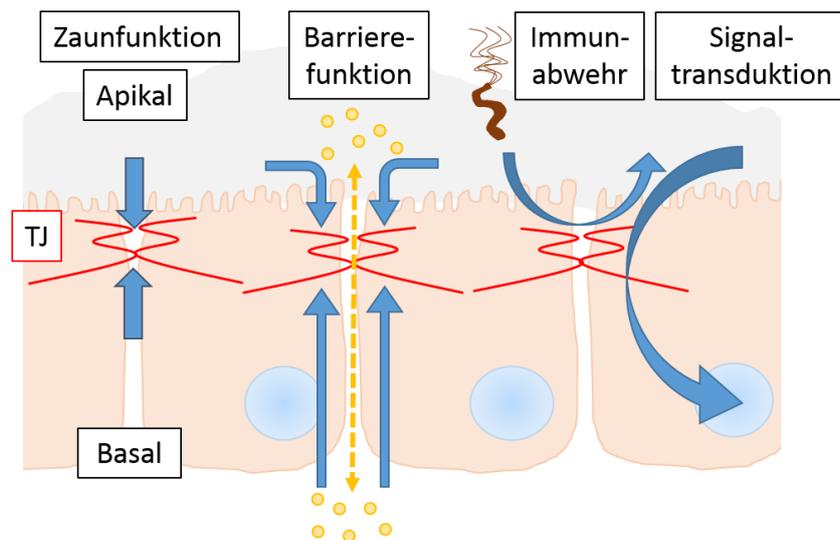


Abbildung 3: Funktionen der epithelialen Barriere. Die Zaunfunktion (*fence function*) ist für die Entstehung der Polarität verantwortlich und führt zur Ausbildung eines apikalen und eines basolateralen Membrankompartiments. Die Barrierefunktion (*gate function*) reguliert die passive parazelluläre Diffusion von Soluten und Wasser zwischen der apikalen und basolateralen Epithelseite über die *Tight Junction* (TJ) und verhindert das Eindringen von Mikroorganismen, deren Antigenen und Toxinen (Immunabwehr). Die TJ vermittelt zudem die Weiterleitung von Signalkaskaden.

Claudine bilden das Rückgrat der TJ-Stränge. Strukturell sind alle Claudine vergleichbar. Die 20 – 27 kDa großen Proteine bestehen aus vier Transmembranregionen und zwei extrazellulären Schleifen (*extracellular loops*; ECL1 und ECL2), einer kleinen intrazellulären Schleife sowie intrazellulär gelegene C- und N-Terminals (Furuse *et al.* 1998). Dabei unterscheiden sich die meisten Claudine im längeren C-Terminus, welcher unterschiedliche PDZ-Bindedomänen beinhalten kann und an Gerüstproteine, wie ZO-1, bindet (Krause *et al.* 2008). In Säugern besteht die Claudinfamilie aus 27 bisher identifizierten Mitgliedern (Lal-Nag und Morin 2009, Günzel und Yu 2013, Günzel 2017). Die Verteilung ist organ- und gewebespezifisch (Günzel und Yu 2013), wodurch unterschiedliche Dichtigkeiten zwischen verschiedenen Geweben und Gewebeabschnitten resultieren. 14 verschiedene Claudine konnten im humanen Darm nachgewiesen werden (Günzel und Yu 2013). Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -12 und -15 wird in verschiedenen Darmsegmenten unterschiedlich stark exprimiert (Chiba *et al.* 2008, Luettig *et al.* 2015). Noch sind nicht alle Claudine vollständig

charakterisiert, jedoch können aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben die Claudine in abdichtende und in kanalbildende Claudine unterteilt werden (Günzel und Fromm 2012), also in Claudine, welche die Barriere stärken oder in Claudine, die zum selektiven Stoffaustausch beitragen. Es stellte sich heraus, dass kanalbildende Claudine funktionell in drei Gruppen unterteilt werden können, solche mit Selektivität i) für Kationen, ii) für Anionen und iii) für Kationen und zugleich Wasser. Zur ersten Gruppe (reine Kationenselektivität) gehören eventuell Claudin-7 (Alexandre *et al.* 2005), Claudin-12 (Fujita *et al.* 2008) und Claudin-21 (Tanaka *et al.* 2016), aber auf jeden Fall Claudin-10b (Günzel *et al.* 2009) und Claudin-16/Claudin-19 (Hou *et al.* 2008). Zur zweiten Gruppe (Anionenselektivität) gehören Claudin-10a (Günzel *et al.* 2009) und Claudin-17 (Krug *et al.* 2012). Zur dritten Gruppe (Kationenselektivität und zugleich Wasserpermeabilität) gehören Claudin-2 (Amasheh *et al.* 2002, Fujita *et al.* 2008, Rosenthal *et al.* 2010) und Claudin-15 (Charoenphandhu *et al.* 2009, Tamura *et al.* 2011, Rosenthal. *et al.* 2020).

Die im humanen Gastrointestinaltrakt vorkommenden Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 werden der Gruppe der abdichtenden Claudine zugeordnet (Furuse *et al.* 2002, Amasheh *et al.* 2005, Amasheh *et al.* 2009, Milatz *et al.* 2010).

Eine Expressionsänderung oder eine subzelluläre Umverteilung von TJ-Proteinen, insbesondere der Claudine, spiegelt das molekulare und strukturelle Korrelat zur Barrieredysfunktion wider. Eine solche Barrieredysfunktion kann durch verschiedene invasive Pathogene ausgelöst werden, wie beispielsweise *Escherichia coli* (Pawłowska und Sobieszczkańska 2017), *Salmonella* spp. (Tafazoli *et al.* 2003), *Yersinia enterocolitica* (Hering *et al.* 2015), *Shigella* spp. (Sakaguchi *et al.* 2002), genau wie *Campylobacter* spp., welche in den letzten Jahren aufgrund der weltweit hohen und steigenden Inzidenz stark an Bedeutung gewonnen haben (RKI 2020).

1.2 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni ist ein gramnegatives, spiralförmiges, mikroaerophiles Bakterium mit einer Länge von 1,5 – 6 µm und einer Breite von 0,2 – 0,9 µm (Beltinger *et al.* 2008) mit polarem Flagellum, an einem oder an beiden Zellpolen. Sie werden der ε-Proteobacteria-Klasse (Ordnung *Campylobacteriales*) zugeordnet.

Campylobacter jejuni ist der weltweit häufigste zoonotische, lebensmittelbedingte bakterielle Auslöser für Gastroenteritis (Skirrow 1982). 90% der humanen *Campylobacter*-Infektionen werden durch *C. jejuni* (80%) und *C. coli* (10%) verursacht (Dasti *et al.* 2010). In den

letzten fünf Jahren wurden in Deutschland jährlich 60.000 – 70.000 Fälle von *Campylobacteriosen* dokumentiert, wobei im Jahr 2019 genau 61.526 Fälle vom Robert Koch-Institut registriert wurden. Damit liegt die Zahl der gemeldeten Fälle deutlich unter denen der letzten Jahre (RKI 2020). Die Dunkelziffer wird um einiges höher eingeschätzt.

Campylobacter kolonisiert neben dem Menschen auch Nutz- und Haustiere, aber vor allem Vögel. *Campylobacter* gelten in den meisten Fällen als Kommensale der Tiere, sodass zum Beispiel Vögel keine Erkrankungszeichen zeigen. Durch *C. jejuni* verursachter Durchfall konnte experimentell bisher nur bei Primaten und Schweinen beobachtet werden (Murphy *et al.* 2011). Beim Menschen hingegen reicht eine geringe Anzahl von 500 *C. jejuni*-Bakterien für eine Infektion und die Ausprägung von Symptomen aus (Black *et al.* 1988). Die Inkubationsdauer beträgt zwei bis fünf Tage. Eine Infektion mit *C. jejuni* geht mit leichten bis schweren, wässrigen oder zum Teil blutigen Durchfällen, abdominalen Krämpfen und häufig auch mit Fieber, Erbrechen und Kopfschmerzen einher (Skirrow 1994). Die durchschnittliche Dauer der Symptome beträgt sieben Tage, wobei die Infektion nach circa zwei Wochen selbstlimitierend ist. Jedoch ist *C. jejuni* noch nach mehreren Wochen im Stuhl nachweisbar (Ketley 1997). *C. jejuni*-Infektionen stehen im Zusammenhang mit einer Reihe von schweren Komplikationen und Folgeerkrankungen, wie das Guillain-Barré Syndrom (Speed *et al.* 1984), eine reaktive Arthritis (Berden *et al.* 1979) oder das postinfektiöse Reizdarmsyndrom (García Rodríguez *et al.* 2006).

Die Übertragung von *C. jejuni* erfolgt vornehmlich durch den Verzehr von kontaminierten tierischen Produkten, vor allem aber durch rohes oder nicht vollständig gegartes Geflügelfleisch, Rohmilchprodukte oder über Kreuzkontaminationen in der Küche. Auch kontaminiertes Oberflächenwasser, der Kontakt mit infizierten Tieren oder die Übertragung von Mensch zu Mensch über den fäkal-oralen Weg wurden als Übertragungswege beschrieben (Dasti *et al.* 2010, Kaakoush *et al.* 2015).

Bei einer Infektion gelangt *C. jejuni* über die orale Aufnahme in den Magen und kolonisiert das Jejunum, das distale Ileum und das Kolon, wobei letzteres das eigentliche Ziel der Kolonisation darstellt (Black *et al.* 1988). *C. jejuni* kolonisiert zunächst den Mukus und vermehrt sich dort (van Spreeuwel *et al.* 1985). Im weiteren Verlauf adhäriert *Campylobacter* an und invadiert in die Epithelzellen (Welkos 1984, Lee *et al.* 1986). Zudem transmigrieren die Bakterien durch die intestinale epitheliale Barriere (Konkel *et al.* 1992) sowohl über den parazellulären als auch über den transzellulären Weg durch das Epithel in die Submukosa (Backert *et al.* 2013). Diese Mechanismen haben insgesamt einen direkten Einfluss auf die Barriere und schädigen diese. Zusätzlich sezernieren die Bakterien Toxine und virulenzassoziierte Faktoren, welche ebenfalls einen negativen Einfluss auf die epitheliale Barriere

ausüben (Dasti *et al.* 2010). In der *Lamina propria* können sowohl die Bakterien selbst, als auch deren virulenzassoziierte Faktoren die dort liegenden Immunzellen angreifen, wodurch eine Immunreaktion ausgelöst wird. Die dabei ausgeschütteten proinflammatorischen Mediatoren, wie Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder Interleukin (IL)-1 β , schädigen ebenfalls die Barrierefunktion (siehe Kapitel 1.2.1).

Im Vergleich zu anderen Diarrhö-auslösenden Bakterien besitzt *Campylobacter* nur wenige virulenzassoziierte Faktoren. Die Flagellen dienen vorrangig der Chemotaxis und Motilität der Bakterien, jedoch sind sie auch für die Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle essentiell (Newell *et al.* 1985, Black *et al.* 1988). Zudem dienen die Flagellen auch als Sekretionsapparat, um *campylobacter invasive antigens* (Cia)-Proteine zu sezernieren, welche ebenfalls zur Invasion beitragen (Rivera-Amill *et al.* 2001, Konkel *et al.* 2004). Ebenso ermöglichen Lipooligosaccharide (LOS) und *fibronectin-binding outer membrane protein* (CadF) die Adhäsion und Invasion (Konkel *et al.* 1997, Krause-Gruszczynska *et al.* 2007, Louwen *et al.* 2008). Lipopolysaccharide (LPS), die Hauptzelladhäsionsantigene PEB1 und PEB3 sowie das Oberflächen-exponierte Lipoprotein JlpA scheinen ebenfalls eine Rolle im Prozess der Adhäsion zu spielen (McSweegan und Walker 1986, Pei *et al.* 1991, Pei *et al.* 1998, Jin *et al.* 2001). Sequenzanalysen zeigten, dass *C. jejuni* nur ein Enterotoxin bildet – das *cytolethal distending toxin* (CDT), bestehend aus den drei Untereinheiten CdtA, CdtB und CdtC (Johnson und Lior 1988, Parkhill *et al.* 2000). Das CDT wird über *outer membrane vesicles* (OMV) von den Bakterien sezerniert (Lindmark *et al.* 2009). Die Menge an produziertem CDT variiert von Stamm zu Stamm (Dasti *et al.* 2010). CDT induziert eine Zelldehnung und hemmt den Zellzyklus der Wirtszellen in der G1- und/oder G2-Phase der Zellteilung und kann so zum Zelltod über Apoptose-Induktion führen (Whitehouse *et al.* 1988, Jain *et al.* 2009).

Campylobacter transmigriert durch die epitheliale Barriere über den parazellulären und den transzellulären Weg und gelangt an die basolaterale Zellmembran der Wirtszellen, wo sich Rezeptoren zur Invasion befinden, wie Fibronectin oder Integrin (Monteville und Konkel 2002, Backert *et al.* 2013). Die parazelluläre Translokation der Bakterien wird von einer Veränderung in der Expression und einer Umverteilung der TJ-Proteine begleitet, sodass eine direkte Schädigung der Barrierefunktion resultieren kann. Mukosale Immunzellen reagieren auf die *C. jejuni*-Infektion mit einer übersteigerten Immunantwort in Form eines mukosalen Zytokin-Sturms (Black *et al.* 1988, Bückler *et al.* 2018), bei dem nicht nur Zytokine, sondern auch Chemokine und inflammatorische und neurogastrointestinale Mediatoren ausgeschüttet werden, welche ebenfalls zur Barrierschädigung beitragen können (Black *et al.* 1988). Auf die *C. jejuni*-induzierte Immunantwort wird im nachfolgenden Kapitel detaillierter eingegangen (Kapitel 1.2.1).

Die Campylobacteriose stellt ein ernstzunehmendes Problem für die Humanmedizin dar. Aber auch in der Veterinärmedizin besteht Handlungsbedarf in den kontaminierten Nutztierställen, sodass die Aufklärung der zugrundeliegenden Übertragungs- und Pathomechanismen und die Präventions- und Therapieoptionen von großer Bedeutung für die Bekämpfung dieser Zoonose sind.

1.2.1 *Campylobacter jejuni*-induzierte Immunantwort

Mukosale Zytokine beeinflussen die epitheliale Barrierefunktion in intestinalen Entzündungssituationen, wie sie bei verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen einschließlich der Campylobacteriose vorliegen. Sowohl *Campylobacter* selbst als auch seine Virulenzfaktoren greifen das Epithel an und induzieren parallel dazu eine Immunantwort im Subepithel. Begleitet werden die direkt induzierten Barrieredefekte mit einer erhöhten pro- und antiinflammatorischen Zytokin- und Chemokinsekretion. Zusätzlich können andere inflammatorische und neurogastrointestinale Mediatoren, wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Schmitz *et al.* 1996), Serotonin (Spiller *et al.* 2000) oder Laktatdehydrogenase (LDH) (Beltinger *et al.* 2008) eine indirekte Schädigung am Epithel auslösen. Diese Entzündungsmediatoren werden dabei nicht nur von Immunzellen, sondern auch mitunter von den Epithelzellen selbst sezerniert. Die Menge der sezernierten Entzündungsmediatoren korreliert mit der Dauer und Intensität der Gewebeschädigung.

Generell locken inflammatorische Signale Immunzellen zum Entzündungsort, um Bakterien zu eliminieren und somit die Infektion zu bekämpfen. Während dieses Prozesses stellt das angeborene Immunsystem – bestehend aus verschiedenen Immunzellen wie Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und Phagozyten – die initiale Abwehr gegen die eindringenden Bakterien dar. Bakterien enthalten hochkonservierte pathogenassoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular pattern*; PAMP), welche vom befallenen Wirt mittels Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-recognition receptors*; PRR) erkannt werden. Dabei können PAMPs Peptide, Nukleinsäuren oder im Falle von Bakterien das hitzestabile Oberflächenantigen LPS sein. Die entscheidenden PRRs in Bezug auf die Campylobacteriose stellen die Toll-like Rezeptoren (TLR) und NOD-like Rezeptoren (NLR) dar (Watson und Galán 2005, Andersen-Nissen *et al.* 2005, Watson *et al.* 2007, Haag *et al.* 2012a, Otto *et al.* 2012, Zilbauer *et al.* 2007). Anschließend erkennen die Immunzellen der adaptiven Immunantwort die Muster auf den Antigenpräsentierenden Zellen. Die adaptive Immunantwort kann in die

humorale B-Zell Aktivierung und die zelluläre T-Zell-Aktivierung unterteilt werden. Die letztere Gruppe inkludiert T-Helferzellen, welche im weiteren Verlauf zu Th1, Th2, Th17, Th22 oder T_{reg} differenzieren und spezifische Zytokinprofile sezernieren.

Die Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten sezerniert vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie IFN- γ , TNF- α , IL-1 β und IL-13 (Bücker *et al.* 2018). Verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen, dass IFN- γ (Adams *et al.* 1993, Bruewer *et al.* 2003, Rees *et al.* 2008), TNF- α (Schmitz *et al.* 1999, Gitter *et al.* 2000b, Gitter *et al.* 2000a, Mankertz *et al.* 2000, Bruewer *et al.* 2003, Barmeyer *et al.* 2004, Amasheh *et al.* 2010, Luettig *et al.* 2016, Hatayama *et al.* 2018), IL-1 β (Barmeyer *et al.* 2004, Wang *et al.* 2017), IL-6 (Wang *et al.* 2007), IL-13 (Heller *et al.* 2005, Heller *et al.* 2008) und Chemokine (Hu *et al.* 2005) die intestinale epitheliale Barriere unterschiedlich intensiv schädigen können und somit Barriere-relevant sind. Zudem regulieren Zytokine die Expression und Lokalisation der TJ-Proteine. Die *C. jejuni*-induzierte mukosale Immunantwort ist daher wesentlich für die Barrierekonstruktion und trägt zur Diarrhö infolge eines Leckflux-Mechanismus bei (siehe Kapitel 1.2.2) (Gitter *et al.* 2000a, Schulzke *et al.* 2006, Bücker *et al.* 2018).

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α spielt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von infektiösen entzündlichen Erkrankungen. Verschiedene intestinale Epithelzellen zeigen nach der Stimulation mit TNF- α eine gestörte intestinale Barrierefunktion mit einem reduzierten TER und einem erhöhten Makromolekülfluss (Schmitz *et al.* 1999, Gitter *et al.* 2000b, Mankertz *et al.* 2000, Amasheh *et al.* 2010, Gitter *et al.* 2000a, Luettig *et al.* 2016, Hatayama *et al.* 2018). TNF- α induziert außerdem einen Kalium (K⁺)- und Chlorid (Cl⁻)-Ausstrom durch einen subepithelialen PGE₂-vermittelten Weg (Schmitz *et al.* 1996). Zudem führt die Stimulation mit TNF- α zu epithelialen Lecks und Einzelzellapoptosen (Gitter *et al.* 2000b), was wiederum die Ausbildung einer Leckflux-Diarrhö verstärkt.

IFN- γ ist ein weiterer zentraler Mediator in der intestinalen Inflammation und beeinflusst die Barrierefunktion, was beispielsweise durch reduzierte TER-Messung *in vitro* im T84-Zellmodell gezeigt werden konnte (Madara und Strafford 1989, Adams *et al.* 1993, Mankertz *et al.* 2000). Die TER-Reduktion wird von erhöhten Na⁺- und Mannitol-Permeabilitäten begleitet (Madara und Strafford 1989). IFN- γ vermindert die aktive Anionensekretion (Colgan *et al.* 1994, Besançon *et al.* 1994), reguliert die Expression von ZO-1 und Occludin herunter (Sugi *et al.* 2001), induziert die Umverteilung von TJ-Proteinen aus den TJ-Strängen (Bruewer *et al.* 2003) und spaltet Claudin-2, vergleichbar mit TNF- α (Mankertz *et al.* 2000). IFN- γ verstärkt zudem synergistisch mit *C. jejuni* den intestinalen Epithelzellverlust und verändert die Occludin-Lokalisation (Rees *et al.* 2008).

Campylobacter jejuni-Infektionen führen darüber hinaus zu einer erhöhten Sekretion des Chemokins IL-8, was als initiales Event akuter Inflammationen die Immunantwort triggert (Hickey *et al.* 1999, Borrmann *et al.* 2007, Beltinger *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2008). Es wurden Unterschiede in der IL-8-Sekretion nach *C. jejuni*-Infektionen zwischen Zelllinien und primären Zellkulturen beobachtet, wobei primäre Zellen stärker und schneller auf die Infektion mit *C. jejuni* reagieren (MacCallum *et al.* 2006). Die IL-8-Sekretion wird mit Adhäsion- und Invasioneigenschaften viabler Bakterien (Hickey *et al.* 1999), mit dem Flagellum (Zheng *et al.* 2008) oder mit CDT assoziiert (Hickey *et al.* 2000, Zheng *et al.* 2008).

Außerdem führt eine *C. jejuni*-Infektion zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, wie der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK), *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) via *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha* (I κ B α)-Degradation, was ebenfalls zu einer erhöhten IL-8-Sekretion führt (Mellits *et al.* 2002, Watson und Galán 2005). IL-1 β und IL-6 wirken sich ebenfalls negativ auf die intestinale Barrierefunktion in verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen aus (Barmeyer *et al.* 2004, Wang *et al.* 2007). Ebenso stört IL-13 die epitheliale Barrierefunktion (Heller *et al.* 2005, Schulzke *et al.* 2009). IL-13 erhöht zudem die Apoptoserate und induziert die Expression des porenbildenden Claudin-2 (Heller *et al.* 2005).

1.2.2 Diarrhömechanismen bei Campylobacteriosen

Obwohl zahlreiche Studien zur Charakterisierung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der *Campylobacter*-Infektion durchgeführt wurden, sind bisher noch nicht alle Mechanismen und Virulenzfaktoren, die zur Ausbildung der Diarrhö führen, abschließend analysiert. Grundsätzlich liegt bei allen Durchfallerkrankungen ein Ungleichgewicht zwischen Sekretion und Absorption vor. Pathophysiologisch kann die infektiöse entzündliche *Campylobacter*-Diarrhö drei Mechanismen zugeordnet werden: i) der sekretorischen, ii) der malabsorptiven und iii) der Leckflux-Diarrhö. Detaillierte Informationen dazu finden sich in unserem kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel (Lobo de Sá *et al.* 2021a).

i) Sekretorische Diarrhö

Bei der sekretorischen Diarrhö kommt es durch eine aktive Sekretion von Anionen zu einem Flüssigkeitsverlust (Abbildung 1Abbildung 4). Dies wird durch Pathogene verursacht, welche Enterotoxine bilden, wie das Cholera toxin (CT) von *Vibrio cholerae*. Es wurde zunächst

angenommen, dass *C. jejuni* ebenso ein solches Cholera-toxin-ähnliches Enterotoxin produziert (*Campylobacter jejuni* Enterotoxin; CJT) (Ruiz-Palacios *et al.* 1983). Obwohl die Funktionalität eines Enterotoxins bewiesen schien (McCardell *et al.* 1984), wird die Existenz von CJT inzwischen von vielen Wissenschaftlern angezweifelt (Wadström *et al.* 1983, Wassenaar 1997). Enterotoxine vom Cholera-toxin-Typ verursachen einen Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) in der Epithelzelle, wodurch es zu einem Anstieg der Flüssigkeits- und Cl⁻-Sekretion in das Darmlumen kommt (Wassenaar 1997). Bei der *Campylobacter*-Infektion konnte jedoch keine aktive Cl⁻- oder Bikarbonat-Sekretion, wie beim CT, nachgewiesen werden. Kurzschlussstrommessungen in der Ussingkammer von Biopsien der Darmmukosa von *C. jejuni*-Patienten bestätigten ebenfalls das Fehlen der postulierten Cl⁻-Sekretion und schlossen somit die aktive Anionensekretion als Diarrhömechanismus aus (Bücker *et al.* 2018). Da die Anionentransportkapazität zudem reduziert war, wurde von einer verminderten Aktivität von Transportern und Kanälen, wie des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), ausgegangen. Die Reduktion dieser Transportaktivität konnte auf RNA-Ebene bestätigt werden (Bücker *et al.* 2018). Es kommt also in der Darmmukosa der *C. jejuni*-Patienten zu einer reduzierten Cl⁻-Sekretion via CFTR (Bücker *et al.* 2018), was *in vitro* in *C. jejuni*-infizierten T84-Zellen ebenfalls gezeigt wurde (Negoro *et al.* 2014). Dieser Diarrhömechanismus allein kann die *Campylobacter*-Enteritis demnach nicht erklären, sodass weitere Dysregulationen vorliegen müssen.

ii) Malabsorptive Diarrhö

Die malabsorptive Diarrhö manifestiert sich, wenn Kanäle, Carrier oder Verdauungsenzyme defekt oder inhibiert sind (Abbildung 4). Ein gängiges Beispiel für die malabsorptive Diarrhö ist die Fruktoseintoleranz, bei der die Expression oder Aktivität des apikalen Fruktosetransporters GLUT5 der Enterozyten reduziert ist. Durch die Akkumulation der Fruktose im Dünndarmlumen kann von einer osmotischen Komponente bei der Entstehung der Diarrhö ausgegangen werden. Es gelangt aber auch die nicht resorbierte Fruktose in den Dickdarm und wird dort von Dickdarmbakterien verstoffwechselt. Die im Dickdarm fermentierte Fruktose wird in Gase (Methan, Wasserstoff) umgesetzt, was zu Blähungen, Abdominalschmerzen und Durchfall führt. Bei *Campylobacter*-Patienten hingegen wurde eine vermehrte Gasproduktion oder eine verminderte Expression von Transportern im Dünndarm bisher nicht beschrieben.

In der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 führt eine Infektion mit *C. jejuni* zu einer Flüssigkeitsansammlung und zum Kollaps von Zellkuppelbildungen (*dome formation*) bedingt

durch eine inhibierte absorptive Transportfunktion, was als Hinweis auf einen malabsorptiven Mechanismus gilt (MacCallum *et al.* 2005). Außerdem wurde in der Darmmukosa von *C. jejuni*-infizierten Patienten ein herunterregulierter Anionentauscher DRA (*down regulated in adenoma*) und ein ebenfalls herunterregulierter epithelialer Natriumkanal (ENaC) festgestellt. In Summe führt dies zu einer gestörten Cl^- - und Na^+ -Absorption (Bücker *et al.* 2018, Nattramilarasu, Lobo de Sá *et al.* 2020). Außerdem ist die Na^+ -Resorption über den ENaC nach einer *Campylobacter*-Infektion gestört. Insbesondere betrifft die verminderte Aktivität des ENaC dabei die Expression der regulatorischen Untereinheiten β und γ (Bücker *et al.* 2018, Nattramilarasu, Lobo de Sá *et al.* 2020). Zudem inhibiert die *C. jejuni*-Infektion die Na^+/K^+ -ATPase im Ileumschleifen-Modell bei Wistar-Ratten, was als ein weiterer Hinweis zur verminderten resorptiven Transportkapazität angesehen wird (Kanwar *et al.* 1994). Eine Na^+/H^+ -Antiporter (NHE)-Inhibierung konnte für verschiedene infektiöse Diarrhöen beschrieben werden, welche in Gurney *et al.* 2017 zusammengefasst sind. Allerdings konnte diese Inhibition bisher nicht für *Campylobacter*-Infektionen gezeigt werden.

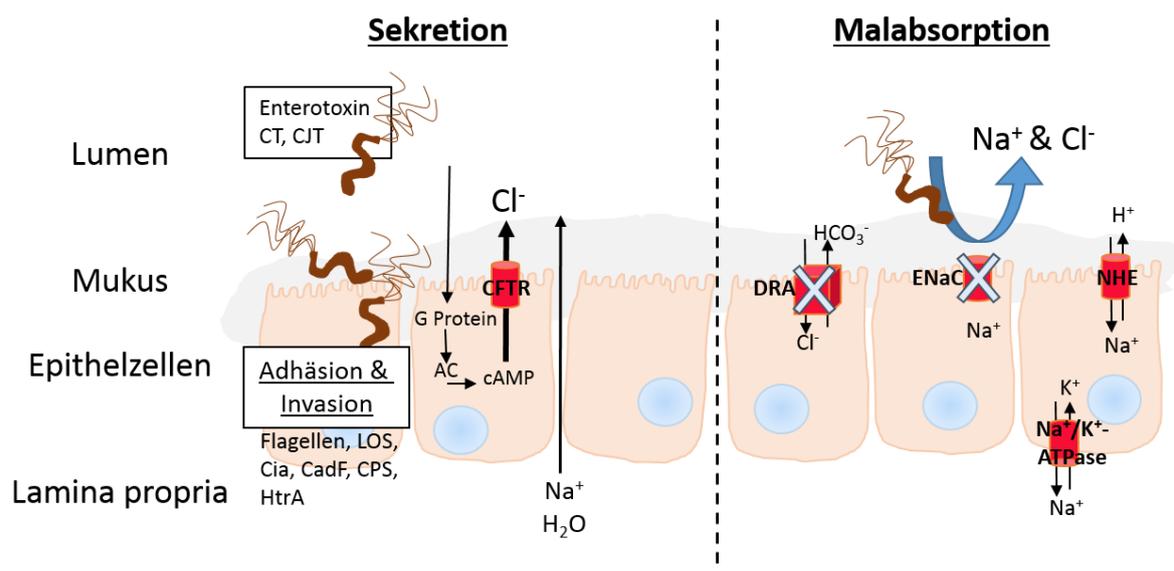


Abbildung 4: Mechanismen der sekretorischen und malabsorptiven Diarrhö, die bei einer *Campylobacter jejuni*-Infektion wirksam werden können. Bakterielle Enterotoxine, wie das Cholera-toxin (CT) oder potentielle *C. jejuni* Enterotoxine (CJT), sowie Adhäsion und Invasion werden mit einer sekretorischen Diarrhö in Verbindung gebracht. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) scheinen eine geringere Rolle in der *C. jejuni*-Infektion zu spielen. Im Gegensatz dazu inhibiert die *C. jejuni*-Infektion den Anionentauscher DRA (*down regulated in adenoma exchanger*) und den epithelialen Natriumkanal (ENaC). Ob *C. jejuni* ebenfalls die Na^+/K^+ -ATPase und den Na^+/H^+ -Antiporter (NHE) reguliert ist bisher fraglich. AC: Adenylatcyclase; CadF: *campylobacter adhesin to fibronectin*; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; AC: Adenylatcyclase; CadF: *campylobacter adhesin to fibronectin*; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; Cia: *campylobacter invasion antigens*; CPS: Polysaccharidkapsel; HtrA: *high temperature requirement A* Serinprotease; LOS: Lipooligosaccharide (Lobo de Sá *et al.* 2021a).

iii) Leckflux-Diarrhö

Eine Leckflux-Diarrhö entsteht, wenn Solute und Wasser passiv in das Darmlumen strömen. Dieser Ausfluss entsteht durch eine veränderte Proteinexpression oder Umverteilungen der TJ-Proteine oder andere Barrierschäden, z. B. durch Apoptose-Induktion (Schulzke *et al.* 2009). Durch die geschädigte Barriere können zusätzlich zu den Ionen und dem Wasser auch Makromoleküle mit unterschiedlicher Größe, wie Antigene, aus dem Lumen in die Mukosa eindringen und weiteren Schaden anrichten. Um die Mechanismen der Dysfunktion der epithelialen Barriere zu beschreiben, wurde der Begriff "Leckflux-Mechanismus" in die Literatur eingeführt (Gitter *et al.* 2000a). Eine Leckflux-Diarrhö wird durch die Pathogene selbst, wie bei der *Yersinia enterocolitica* (Hering *et al.* 2011, Hering *et al.* 2016), oder aber auch durch proinflammatorische Zytokine der induzierten Immunantwort, wie TNF- α , ausgelöst (Gitter *et al.* 2000a). Auch *Campylobacter* spp. induzieren eine Diarrhö auf der Basis des Leckflux-Mechanismus (Nielsen *et al.* 2011, Bückler *et al.* 2017, Bückler *et al.* 2018).

Alle drei aufgeführten Diarrhömechanismen resultieren aus intestinalen Transport- und Barriestörungen sowie der mukosalen Immunantwort, welche synergistisch mitunter auch zu blutigen Durchfällen führen können, wenn die epitheliale Restitution eine inadäquate Response zeigt und in der Folge Läsionen entstehen, aus denen Blutungen auftreten.

1.2.3 *Campylobacter jejuni*-Infektionsmodelle *in vitro* und *in vivo*

Eine der Herausforderungen in der *Campylobacter*-Forschung ist ein Mangel an geeigneten experimentellen Modellen, welche die Situation im menschlichen Organismus widerspiegeln. Um die teilweise noch unklaren Pathomechanismen zu charakterisieren, wurden in der Vergangenheit Infektionsstudien an verschiedenen intestinalen epithelialen Zelllinien durchgeführt. Dabei kamen vor allem polare Kolonkarzinomzelllinien zum Einsatz, wodurch die Dysfunktion an der intestinalen epithelialen Barriere nachgestellt und Mechanismen wie Adhäsion, Invasion und Transmigration untersucht werden konnten. Zu den eingesetzten Zelllinien gehören beispielsweise die humanen intestinalen Epithelzelllinien Caco-2 (Everest *et al.* 1992), T84 (Monteville und Konkel 2002) und HT-29 (Haddad *et al.* 2010) und die nicht polaren humanen intestinalen INT-407-Zellen (Grant *et al.* 1993, Boehm *et al.* 2012), aber auch die humane Magenkarzinomzelllinie MKN-28 (Boehm *et al.* 2012) und die epitheliale Hundenierenzelllinie MDCK-I (Wine *et al.* 2008). Neben den direkten Barrierschäden, die *C. jejuni* verursacht, löst die Infektion eine akute Entzündungsreaktion aus, welche

ebenso eine wesentliche Rolle in der Ausbildung der Barrierefunktion spielt (Black *et al.* 1988). Um die *C. jejuni*-induzierte Immunantwort zu charakterisieren wurden dendritische Zellen (Hu *et al.* 2006), isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral blood mononuclear cell*; PBMC) (Hamza *et al.* 2017) und THP-1-Immunzellen (Jones *et al.* 2003) mit *C. jejuni* infiziert und die Veränderungen im Zytokin- und Chemokinprofil untersucht.

Bei den meisten *in vitro*-Zellkulturmodellen handelt es sich um 2D-Monokulturen, die aus nur einer Zelllinie auf einer ebenen Matrix (z. B. PCF-Filter-Material) bestehen. Diese reflektieren die Komplexität der Infektion nicht ausreichend, da nicht nur Zell-Zell-Kontakte zwischen verschiedenen Zellen und somit die interzelluläre Kommunikation, sondern auch die Rolle der Immunantwort des Wirtes nicht berücksichtigt wird (Smith *et al.* 2018). Um die Bakterien-Wirt-Interaktion besser zu charakterisieren, könnten zunächst Co-Kultur-Modelle, bestehend aus Epithel- und Immunzellen (Kämpfer *et al.* 2017, Smith *et al.* 2018), einen Vorteil haben. Ein solches Co-Kultur-Modell, bestehend aus epithelialen HT-29/B6-Zellen und PBMCs, wurde von uns bereits mit *C. jejuni* infiziert und verdeutlichte die essentielle Rolle der Immunantwort auf die Barrierefunktion (Bücker *et al.* 2018). Neben den Co-Kultur-Modellen eignen sich für die *in vitro*-Simulation insbesondere auch verschiedene komplexe 3D-Modelle, welche verschiedene Zelltypen enthalten (Smith *et al.* 2018). Zu den 3D-Modellen gehören zum Beispiel Organoide (Smith *et al.* 2018), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) (Workmann *et al.* 2017), *precision-cut tissue slices* (PCTS) (de Graaf *et al.* 2010) und die *organ-on-a-chip*-Technologie (Skardal *et al.* 2017). All diese Modelle gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung und ermöglichen neben der Aufklärung von zugrundeliegenden Pathomechanismen ebenfalls Pharmakotoxizitäts- und Metabolismus-Studien von potenziellen neuen Therapeutika, sodass Tierversuche reduziert werden können. Erst kürzlich wurde ein 3D-Modell basierend auf Caco-2-Zellen auf einem extrazellulären Matrixgerüst entwickelt, sodass die 2D *in vitro* und *in vivo* generierten Ergebnisse der *C. jejuni*-Pathogenese weiter ergänzt werden konnten (Alzheimer *et al.* 2020).

Trotz der zahlreichen innovativen *in vitro*-Modelle sind *in vivo*-Studien noch von besonderer Bedeutung. Häufig werden *in vivo*-Infektionsstudien mit *Campylobacter* im Hühnermodell durchgeführt, jedoch ist dieses Modell für die Aufklärung der Pathomechanismen ungeeignet, da die Bakterien als Kommensale den Darmtrakt der Hühner kolonisieren und keine Erkrankungssymptome bzw. nur eine milde, adäquate Immunantwort auslösen. Somit eignen sich Hühnermodelle eher um allgemeine Aspekte der Wirtskolonisation, Verbreitung der Bakterien und mögliche Hygienestrategien in der Fleischverarbeitungskette zu entwickeln (Young *et al.* 2007), sodass für die Campylobacteriose des Menschen diverse Maus-

modelle mit einem entsprechenden Krankheitsverlauf etabliert wurden. Aufgrund von Kolonisationsresistenzen der Mäuse gegenüber *C. jejuni* und die fehlende Ausbildung von Symptomen sind die meisten Wildtyp-Mausmodelle für Infektionsversuche nicht geeignet (Poly und Guerry 2008, Haag *et al.* 2012b). In den letzten Jahren wurden jedoch immer mehr präkonditionierte Mausmodelle etabliert, die auf der Eradikation der murinen Darmflora, Fäzes-Transplantation, *knockout*-Modellen (IL-10^{-/-}, TLR4^{-/-}, Nod2^{-/-}, MyD88^{-/-}) und Kombinationen aus den aufgeführten Methoden beruhen (Watson *et al.* 2007, Bereswill *et al.* 2011a, Bereswill *et al.* 2011b, Haag *et al.* 2012a, Otto *et al.* 2012, Stahl *et al.* 2014, Heimesaat *et al.* 2017, Heimesaat *et al.* 2019).

Alle aufgezählten Modelle bieten eine gute Möglichkeit, die zugrundeliegenden Pathomechanismen der *Campylobacter*-Infektionen im Detail zu beleuchten und so auch mögliche Therapieoptionen oder protektive Ansätze sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin zu identifizieren.

1.3 Therapieoptionen und protektive Ansätze

Campylobacteriosen stellen aufgrund der stetig hohen weltweiten Inzidenz und möglicher Komplikationen mit Spätfolgen ein globales Gesundheitsproblem dar, sodass die Entwicklung innovativer Strategien zur Vorbeugung, Kontrolle und Behandlung im Fokus der Forschung steht. Um dieses Ziel zu erreichen, könnten verschiedene Barriere-protektive und/oder antiinflammatorische Substanzen zum Einsatz kommen.

Der hohe Flüssigkeits- und Elektrolytverlust bei der Diarrhö wird meistens zunächst mit Hausmitteln, wie dem Trinken von gesüßten Getränken und dem Verzehr von Salzstangen, ausgeglichen. Klinisch kommen Rehydratationslösungen (*oral rehydration solution*; ORS) zum Einsatz. Antibiotika gegen *C. jejuni*-Infektionen werden nur bei schweren Verläufen und bei Risikopatienten verabreicht, wobei als erstes Mittel der Wahl Azithromycin und als Alternative Ciprofloxacin empfohlen werden (RKI 2018).

Neben dem essentiellen Spurenelement Zink, welches von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) als Supplement zur ORS bei Durchfällen empfohlen wird (WHO 2011), kommt auch eine Behandlung mit Probiotika bei einer *C. jejuni*-Infektion in Frage (Fooks und Gibson 2003, Messaoudi *et al.* 2012, Helmy *et al.* 2017, Šikić Pogačar *et al.* 2020).

Der Fokus dieser Arbeit zielt allerdings auf natürlich vorkommende Substanzen, welche den durch *C. jejuni*-induzierten Krankheitsverlauf mildern könnten, indem sie die Barriere

stärken oder die überschießende und Barriere-kompromittierende Immunreaktion attenuieren. Zu den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Substanzen gehören die beiden pflanzlichen Polyphenole Resveratrol und Curcumin.

1.3.1 Resveratrol

Resveratrol (3, 5, 4'-Trihydroxystilbene; Molekulargewicht (*molecular weight*, MW) = 228,25 g/mol) (Abbildung 5) kommt als Mikronährstoff in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Lebensmitteln, wie Weintrauben (<3,5 µg/g), Beeren (ca. 0,02 – 95 µg/g), Erdnüsse (ca. 2 – 39 µg/g) und dem in der traditionellen asiatischen Medizin eingesetzten Japanische Staudenknöterich (*Reynoutria japonica*; 520 – 3420 µg/g), vor (Koushiki *et al.* 2018, Liu *et al.* 2020). Resveratrol wird im Jejunum und im Ileum resorbiert (Chudzińska *et al.* 2020) und im weiteren Verlauf zu verschiedenen Metaboliten und Intermediaten metabolisiert, welche in unterschiedlichen Konzentrationen im Serum, Urin und Fäzes nachgewiesen werden (Boocock *et al.* 2007) und ebenfalls therapeutisch wirksam sein können, wie z. B. bei der Behandlung von Tumoren (Potter *et al.* 2002).

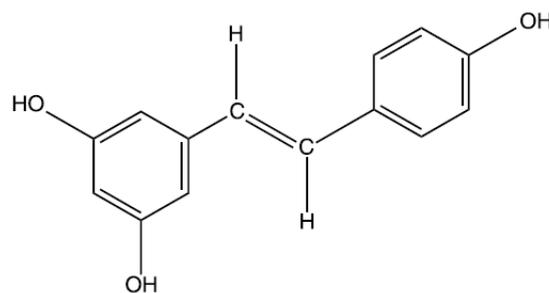


Abbildung 5: Chemische Struktur des trans-Resveratrol.

Dem Polyphenol Resveratrol werden eine Reihe gesundheitsfördernder Effekte zugesprochen, welche u. a. das Herz-Kreislauf-System betreffen (Weiskirchen und Weiskirchen 2016). Das unter Medizinern umstrittene „französische Paradoxon“ beschreibt, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit Todesfolge in Frankreich seltener als in anderen Ländern vorkommen, da mehr gesättigte Fettsäuren und Rotwein, welcher hohe Mengen an Resveratrol enthält, konsumiert werden (Renaud und Lorgeil 1992). Diese Beobachtung soll auf den kardio- und gefäßprotektiven Eigenschaften des Resveratrols basieren, welche in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt wurden (zusammengefasst in Chudzińska *et al.* 2020). Neben seiner Aufgabe als Radikalfänger und der Reduktion des oxidativen Stresses wird Resveratrol auch als antikarzinogene Substanz eingesetzt (Leonard *et al.* 2003). Zudem zeigt Resveratrol antiinflammatorische Eigenschaften, da es bei-

spielsweise die Entzündung während einer *Toxoplasma gondii*-induzierten Ileitis im Tiermodell reduziert (Bereswill *et al.* 2010, Oh *et al.* 2009), sodass es auch bei der Behandlung gastrointestinaler Erkrankungen protektiv wirkt (Li *et al.* 2020). Colitis-induzierte mikrobielle Dysbiosen (Alrafas *et al.* 2019) und die TJ-Expression werden moduliert und somit die intestinale Barriere gestärkt (Carrasco-Pozo *et al.* 2013, Ling *et al.* 2016, Mayangsari und Suzuki 2018). Resveratrol zeigte zudem protektive Eigenschaften in Mykotoxin-behandelten intestinalen Zellen *in vitro* (Ling *et al.* 2016). Die antibakterielle Wirkung von Resveratrol konnte für *Arcobacter* spp. (Ferreira *et al.* 2014), aber auch für verschiedene *E. coli* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Providencia stuartii* nachgewiesen werden, sodass Resveratrol als Supplementation von Antibiotika-Behandlungen oder als potenzielle Substanz im Kampf gegen Bakterien mit Multiple-Therapie-Resistenzen (*multi drug resistance*; MDR) Einsatz finden könnte (Seukep *et al.* 2016). Der Einsatz von Resveratrol im Zusammenhang mit *C. jejuni*-Infektionen ist bisher wenig erforscht. Jedoch weiß man, dass die Adhäsion von *C. jejuni* in Anwesenheit von Resveratrol inhibiert ist, was eine reduzierte Invasion zufolge hat und die intrazelluläre Überlebensrate der Bakterien in intestinalen Zellen minimiert (Klančnik *et al.* 2017). Hinweise für Barriere-protektive Eigenschaften des Resveratrols bei *C. jejuni*-induzierten Barrierschädigungen lieferten parallel zu dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experiment *in vivo*-Studien in IL-10^{-/-}-Mäusen (Heimesaat, Lobo de Sá *et al.* 2020). Außerdem inhibiert Resveratrol verschiedene Signalwege, welche direkt oder indirekt bei der Stärkung der intestinalen Barriere involviert sind; dazu gehören NF-κB (Tsai *et al.* 1999, Leonard *et al.* 2003), MAPK (Ling *et al.* 2016) und der p38-abhängige Kinase MK2/3 – Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg (Nakajima *et al.* 2019).

Therapeutische Dosen können aufgrund des geringen Gehaltes nur schwer allein über die Nahrung aufgenommen werden (Boocock *et al.* 2007, Weiskirchen und Weiskirchen 2016). Zudem ist die Bioverfügbarkeit durch die geringe intestinale Resorption, der schnellen Metabolisierung und Exkretion gering (Boocock *et al.* 2007), sodass eine geeignete Galenik in Form von Nanopartikeln (Ha *et al.* 2019) oder Mizellen (zusammengefasst in Chimento *et al.* 2019) eine bessere Pharmakokinetik gewährleisten könnte.

1.3.2 Curcumin

Curcumin ((E,E)-1,7-Bis-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion; MW = 368,38 g/mol) (Abbildung 6) ist ein lipophiles Polyphenol, welches hauptsächlich in der Wurzel der *Curcuma longa* Pflanze (Gelbwurzel) vorkommt und zu den Ingwergewächsen

zählt (auch als Kurkuma oder engl. *Tumeric (root)* bezeichnet) (Goel *et al.* 2008, Cho und Park 2015, Masashi *et al.* 2017).

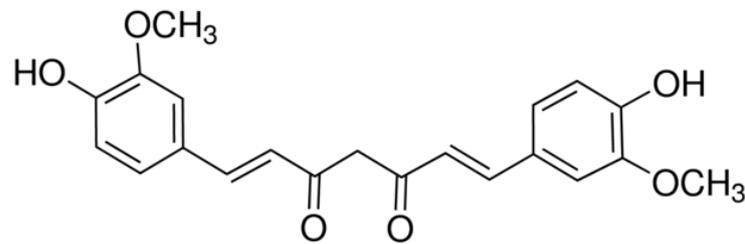


Abbildung 6: Chemische Struktur des Curcumins.

Curcumin findet vor allem Anwendung als Farbstoff, in Kosmetika und ist als Hauptbestandteil in Currygewürzen enthalten (Cho und Park 2015, Goel *et al.* 2008). Seit Jahrhunderten wird Curcumin jedoch auch in der traditionellen indischen und chinesischen Medizin gegen verschiedene gastrointestinale Erkrankungen und Verdauungsstörungen eingesetzt (Goel *et al.* 2008, Anggakusuma *et al.* 2014, Masashi *et al.* 2017). Studien zeigen, dass Curcumin als komplementäre Therapie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn) die Remissionsinduktion und -erhaltung unterstützt (Hanai *et al.* 2006, Singla *et al.* 2014, Lang *et al.* 2015, Kucharzik *et al.* 2018). Curcumin weist in hohen Dosen antibakterielle, antiinflammatorische, antioxidative, antikarzinogene, antivirale, (anti)apoptotische und antiproliferative Eigenschaften auf (Mahady *et al.* 2002, Goel *et al.* 2008, Chen *et al.* 2010, Bereswill *et al.* 2010, Anggakusuma *et al.* 2014) und zeigt dabei keine toxischen Nebenwirkungen in Tierversuchsstudien sowie im Menschen (Lao *et al.* 2006). Neben Resveratrol beeinflusst auch Curcumin durch Mikroorganismen verursachte intestinale Dysfunktionen (Gan *et al.* 2019). Der antibakterielle Effekt konnte u. a. gegen *Salmonella* spp. (Marathe *et al.* 2016), *Helicobacter pylori* (Mahady *et al.* 2002, Moghadamtousi *et al.* 2014, Santos *et al.* 2015), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* (Gunes *et al.* 2016) gezeigt werden. Ob Curcumin auch auf *Campylobacter* antibakteriell wirkt, wurde bis zur Anfertigung dieser Arbeit nicht untersucht. Verschiedene Studien verdeutlichen die Fähigkeit von Curcumin, die Sekretion und/oder Produktion entzündlicher Botenstoffe, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8, zu inhibieren (Goel *et al.* 2008, Wang *et al.* 2017, Cho und Park 2015). Außerdem blockiert Curcumin verschiedene Signalwege und Enzyme, wie NF- κ B, Protein-Kinasen (Goel *et al.* 2008, Chen *et al.* 2010, Moghadamtousi *et al.* 2014), *signal transducers and activators of transcription* STAT3, reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxidative species*; ROS) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Goel *et al.* 2008, Ohno *et al.* 2017, Dai *et al.* 2018), welche alle direkt oder indirekt eine

Rolle in der Erhaltung der Barrierefunktion spielen. Des Weiteren ist bekannt, dass Curcumin die mRNA-Expression von Claudin-4 in Caco-2-Zellen induziert (Watari *et al.* 2012) und somit die intestinale Barrierefunktion stärken kann (Wang *et al.* 2017).

Die schlechte Wasserlöslichkeit und die Pharmakokinetik mit der begrenzten Bioverfügbarkeit gelten jedoch als limitierende Faktoren in der klinischen Anwendung von Curcumin. Aus diesem Grund werden verschiedene innovative Formulierungen entwickelt und untersucht. So zeigen Formulierungen wie Mikronisate und Mizellen (Schiborr *et al.* 2014) oder Nanopartikel (Ohno *et al.* 2017) eine verbesserte Bioverfügbarkeit aber u. a. auch effektivere antimikrobielle Eigenschaften *in vitro* (Bhawana *et al.* 2011).

1.4 Zielstellung

Die hohe weltweite Inzidenz der *C. jejuni*-Infektion, sowie die klinische Bedeutung der Diarrhö, Darmentzündungen und Folgeerkrankungen, verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Behandlung der *Campylobacter*-Enteritis. Potentiell effektive Substanzen und Kombinationstherapien aus antiinflammatorischen und Barriere-protectiven Wirkungsweisen könnten in Zukunft nicht nur für die Humanmedizin von Interesse sein, sondern auch als Strategie für die Minimierung der Kolonisation bei Tieren, die zur Nahrungsmittelproduktion verwendet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein sensibles *in vitro*-Zellkulturmodell zu identifizieren, in dem die zugrundeliegende *C. jejuni*-induzierte Barriestörung näher charakterisiert werden kann und das als Testsystem für die Effektivität von Wirkstoffen gegen die *C. jejuni*-induzierten Barrierschäden genutzt werden kann. Dabei kommen verschiedene *in vitro*-Modelle und das *in vivo*-IL-10-*knockout*-Modell zum Einsatz. Als wesentliche Weiterentwicklung des *in vitro*-Modells wird ein neues Co-Kultur-Modell bestehend aus Epithelzellen und Immunzellen etabliert.

In Vorarbeiten wurde eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) von Kolonbiopsien von *C. jejuni*-infizierten Patienten durchgeführt, die eine potentielle Wirksamkeit von Polyphenolen wie Resveratrol und Curcumin nahelegen. Auf Basis dieser bioinformatischen Vorhersage stellt sich die Hauptfrage dieser Arbeit: Sind die pflanzlichen Substanzen Resveratrol und Curcumin effektive Pharmaka gegen die *C. jejuni*-induzierte Barrieredysfunktion?

Zur Beantwortung der vorliegenden Fragestellungen, werden auf der funktionellen Ebene Messungen der Barrierefunktion (Permeabilität, transepithelialer elektrischer Widerstand) durchgeführt und weiter auf molekularer Ebene analysiert. Western Blot-Analysen dienen der Ermittlung von Expressionsänderungen von *Tight Junction* (TJ)-Proteinen. Mithilfe von

Immunfluoreszenzfärbungen werden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Lokalisationsänderung von TJ-Proteinen visualisiert. Des Weiteren werden die Apoptose-Induktion, Inhibitor-Experimente sowie weitere RNA-Seq-Analysen der *in vitro*-Experimente durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle für die Zellkultur verwendeten sterilen Materialien, wie Einwegpipetten und Kulturflaschen, wurden nur unter der Werkbank oder an einem brennenden Bunsenbrenner ausgepackt und geöffnet. Flüssigkeiten, wie Medien oder Puffer, wurden ebenfalls nur unter der Werkbank oder am Bunsenbrenner geöffnet. Wenn nicht anderes angegeben wurden Lösungen mit bidestilliertem Wasser (H_2O_{dd}) angesetzt. Material, welches nicht steril erhältlich war, wurde für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.1.1 Chemikalien

Für die Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Chemikalien verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und zugehörige Hersteller

Chemikalien	Hersteller
0,5 M Tris-HCl Puffer, pH 6,8	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
1 M Tris-HCl, pH 7,5	Gibco, Carlsbad, CA, US
1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
16 % Paraformaldehyd (PFA)	Electron Microscopy Sciences, Inc., Hatfield, PA, US
1M Tris Puffer, pH 8,8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
1M Tris-HCL, pH 7,5	Gibco, Carlsbad, CA, US
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Acrylamid-Bis Fertiglösung 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Chemikalien	Hersteller
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Biomol GmbH, Hamburg, DE
Bromphenolblau	GE Healthcare, Chicago, IL, US
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Carbogen	Linde plc, Dublin, IRL
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Curcumin (C ₂₁ H ₂₀ O ₆)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Dimethylsulfoxid (DMSO; C ₂ H ₆ OS)	Riedel-de Haën AG, Seelze, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Dithiotreitol (DTT; C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + Glutamax	Gibco, Carlsbad, CA, US
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	Gibco, Carlsbad, CA, US
Eosin	Merck KGaA, Certistan, Darmstadt, DE
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Ethanol 80 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA; C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Chemikalien	Hersteller
Fluorescein (332 Da)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
flüssiger Stickstoff	Linde plc, Dublin, IRL
Formalin Roti-Histofix 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Fötales Rinderserum (<i>Fetal bovin serum</i> ; FBS)	Gibco, Carlsbad, CA, US
G418-BC	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin	Merck KGaA, Certistan, Darmstadt, DE
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Hygromycin B	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Linde plc, Dublin, IRL
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Minimum Essential Media (MEM) AQ Medium (M0446)	Gibco, Carlsbad, CA, US
Müller Hinten Medium (MH-Medium)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumazid (NaN ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumlaurylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i> ; SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Nicht essentielle Aminosäuren	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Paraffin Paraplast Plus	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S, 100x, P11-010)	Gibco, Carlsbad, CA, US
Pertex	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; C ₃₆ H ₅₆ O ₈)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Phosphate-buffered saline mit (PBS ⁺) oder ohne (PBS) Mg ²⁺ und Ca ²⁺	Gibco, Carlsbad, CA, US
Polysorbat 20 (Tween-20; C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Arcos Organics B.V.B.A., Fair Lawn, NJ, USA
Polyvinylpyrrolidone (PVP-40; (C ₆ H ₉ NO) _n)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Resveratrol (C ₁₄ H ₁₂ O ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
RNase-freies Wasser	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Tetramethylethylenediamine (TEMED; C ₆ H ₁₆ N ₂)	Amresco, Inc., West Chester, PA, US
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton X-100 (C ₃₃ H ₆₀ O ₁₀)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US

Chemikalien	Hersteller
Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, CA, US
Wasser (arium pro Reinstwassersystem; H ₂ O _{dd})	Sartorius AG, Göttingen, DE
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ziegenserum (<i>Goatserum</i> ; GS)	Gibco, Carlsbad, CA, US

2.1.2 Labormaterial

Für die Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 2 gelisteten Labormaterialien verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien

Labormaterial	Bezeichnung/Volumen	Hersteller
Anaerobier Box	2,5 L	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Blutagarplatten	Columbia	Thermo Scientific Oxoid, Waltham, MA, US
chirurgische Einmalskalpelle	No. 11 und No. 20	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Dako-Stift	Dako-PEN	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, US
Deckgläschen	24x50 mm	Menzel Deckgläser Thermo Scientific, Waltham, MA, US
Einbettkassette	Swingsette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi)	Safe Seal Reaktionsgefäß 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Falcon-Stripette	5 mL, 10 mL, 25 mL	Corning, Inc., Corning, NY, US

Labormaterial	Bezeichnung/Volumen	Hersteller
Falcon-Tube	Zentrifugenröhrchen CentriStar 15 mL, 50 mL	Corning, Inc., Corning, NY, US
Faltenfilter	Selecta	Schleicher & Schüll GmbH, Maidstone, UK
Filterpapier (WB)	Whatman 3 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Gaspack Campygen	2,5 L	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Glashomogenisator	CXE6.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glaspasteurpipetten	-	BRAND GmbH + Co.
Histoacrylkleber	Histoacryl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Injekt Spritzen	1 mL, 10 mL, 20 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Kopierfolie	A4	Folex Coating GmbH, Köln, DE
Kryoröhrchen	1,6 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Neubauer Zählkammer	-	BRAND GMBH + Co. KG, Wertheim, DE
Objektträger	-	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Objektträger beschichtet	SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Parafilm	Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, IL, US
Petrischalen	unbeschichtet, 6 cm Ø	Corning, Inc., Corning, NY, US

Labormaterial	Bezeichnung/Volumen	Hersteller
Pipettenspitzen (gestopft und ungestopft)	Filter Tips 0,5 µL – 1000 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran)	PVDF-Transfer-Membran	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
ProTaq MountFluor	Einbettmedium	Biocyc GmbH & Co. KG., Luckenwalde, DE
Sterican Kanülen	Nr. 1. 24 G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US
Sterilfilter	0,2 µm	GE Healthcare, Chicago, IL, US
Trans-Blot Turbo Mini PVDF-Membran	-	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Tuberkulinnadel	1 mL, 26 G x 3/8 in	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US
Well-Platten	12-, 24-, 96-Well	Corning, Inc., Corning, NY, US
Western Blot Größenmarker	Page-Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Zellkulturfilter	Millicell-PCF; 0,4 µm und 3 µm Porengröße	Merck Millipore, Burlington, MA, US
Zellkulturflasche	25 cm ² (T25) und 75 cm ² (T75)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE
Zellschaber/Rührspatel	-	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE

2.1.3 Geräte

Für die Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Geräte und zugehörige Hersteller

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aspirationsstation	Fisherbrand FB70155	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Autoklav	Systec VX-150	Systec GmbH, Linden, DE
Brutschrank	Heracell VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Kryostat	Leica CM1900	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, DE
Durchflusszytometer (<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; FACS)	Cantoll	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US
Elektrophoresegerät	BioRad Power PAC200	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Elektrophoresekammer	BioRad	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Feinwaage	PAS214	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Fusion	FX7	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
Heizblock	AccuBlock	Labnet International, Inc., Corning, NY, US
Inkubationsschüttler	UNIMAX 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Inversmikroskop	Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 780	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
Lichtmikroskop	IMT-2	Olympus K.K., Tokio, JPN
Magnetrührer/Heizplatte	IKA-COMBIMAG RCT	IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, DE
Magnetrührfisch	-	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Multipipette	100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Nanodrop	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Ohmmeter	Widerstandsmessgerät	Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
Paraffineinbettstation	Leica EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch, DE
Photometer	SpectraMax M2	Molecular Devices LLC, San José, CA, US
Photometer	Lambda2 UV/VIS Spectrophotometer	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, US
Photometer	Tecan infinite M200	Tecan Group AG, Männedorf, CH
Pipetboy	Pipetboyacu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Pipetten	10 µL, 100 µL, 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Schlittenmikrotom	-	R. Jung Heidelberg, Heidelberg, DE
Schwenkplattform	Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Sterilwerkbank	HeraSafe KS	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Transferkammer	-	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Mini Trans-Blot	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Ultraschallsonde	UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Ussing Kammer	Eigenbau	Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
Voltage Clamp Apparatur	CVC6	Fiebig Hard & Software, Berlin, Germany
Vortexer	34524-200	Thermo Fisher Scientific GmbH, Breda, NL
Waage	L2200P	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad	-	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, DE
Wiegeschüttler	Wippe WT12	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Zentrifuge	Heraeus FRESCO21 (1,5 mL – 2 mL)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
Zentrifuge	UNIVERSAL 320 R (15 mL – 50 mL)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Brea, CA, US

2.1.4 Zellen, Mikroorganismen und Zytokine

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Zelllinien wurden für die Durchführung der Versuche verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelle	Hersteller
Caco-2D	ATCC HTB-37
Caco-2BBe	ATCC CRL-2102
HT-29/B6	Kreusel <i>et al.</i> 1991
HT-29/B6-GR/MR	Bergann <i>et al.</i> 2009
T84	ATCC CCL-248
THP-1	ATCC TIB-202

Die Infektionsversuche wurden mit dem Referenzstamm *C. jejuni* 81-176 (ATCC BAA-2151) und einer Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*; MOI) von 100 je nach Fragestellung entweder von apikal oder von basolateral durchgeführt. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80°C in einem 70 %-igen Glycerolstock.

Zytokin-Stimulationsversuche erfolgten vom basolateralen Kompartiment ausgehend mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (PeproTech, Inc., Rocky Hill, CT, US).

2.1.5 Medien, Lösungen und Puffer

2.1.5.1 Medien

Für die Kultivierung der humanen Zellen wurden folgende Medien zubereitet und verwendet.

Caco-2D:	MEM AQ Medium	15	%	FBS
		1	%	P/S-Lösung

Caco-2BBe:	DMEM+ Glutamax	10	%	FBS
		1	%	P/S-Lösung
		10	mM	HEPES
		10	mM	1x nicht essentielle Aminosäuren
HT-29/B6:	RPMI 1640 Medium	10	%	FBS
		1	%	P/S-Lösung
HT-29/B6-GR/MR:	RPMI 1640 Medium	10	%	FBS
		1	%	P/S-Lösung
		200	µg/mL	Hygromycin B
		300	µg/mL	G418-BC
T48:	DMEM/F-12	10	%	FBS
		1	%	P/S-Lösung
THP-1:	RPMI 1640 Medium	10	%	FBS hitzeinaktiviert (HI)
		1	%	P/S-Lösung

Die Lagerung der Medien erfolgte nach Anbruch im Kühlschrank bei 2 - 8 °C. Die Hitzeinaktivierung des FBS erfolgte im Wasserbad bei 56 °C für mindestens 30 min.

2.1.5.2 Lösungen und Puffer

Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Substanzlösungen und Chemikalienlösungen benötigt:

Blockierlösung für Immunfluoreszenzfärbung:	5	%	Ziegenserum	
	3	%	BSA	
	0,05	%	Triton X-100	in PBS ⁺
Blockierlösung für Western Blot:	1	%	PVP-40	
	0,05	%	Tween-20	in TBST
EPHO-Puffer:	10	%	10x West-Puffer	
	0,1	%	SDS	
Gesamtlysepuffer:	150	mM	NaCl	
	10	mM	Tris-Puffer pH 7,5	
	0,5	%	Triton X-100	
	0,1	%	SDS	
	1	Tablette	Proteaseinhibitor pro 10 mL	
Laemmli-Probenpuffer (5x):	125	mM	Tris-HCl, pH 6,8	
	500	mM	DTT	
	50	%	Glycerol	
	10	%	SDS	
	0,001	%	Bromphenolblau	

Membranlysepuffer:	2	mL	1 M Tris-HCl, pH 7,4	
	500	µL	1 M MgCl ₂	
	200	µL	0,5 M EDTA	
	120	µL	0,5 M EGTA	
	100	mL	H ₂ O _{dd}	
	1	Tablette	Proteaseinhibitor pro 10 mL	
Ringerlösung:	113,6	mM	NaCl	
	21	mM	NaHCO ₃	
	5,4	mM	KCl	
	2,4	mM	Na ₂ HPO ₄	
	1,2	mM	MgCl ₂	
	1,2	mM	CaCl ₂	mit Carbo-
	0,6	mM	NaH ₂ PO ₄	gengas ver-
	(10	mM	Glucose)	setzt pH 7,4
		Substrate		
Sammelgel:	5,1	%	Acrylamid-Bis Fertiglösung 30 %	
	125	mM	Tris-HCl, pH 6,8	
	0,1	%	SDS	
	0,1	%	APS	
	0,1	%	TEMED	

TBST:	500	mM	NaCl	
	200	mM	TRIS	
	0,1	%	Tween-20	pH 7,3
Transferpuffer:	10	%	10x West-Puffer	
	10	%	Methanol	
Trenngel:	10-12,5	%	Acrylamid	
	350	mM	Tris Puffer, pH 8,8	
	0,1	%	SDS	
	0,1	%	APS	
	0,1	%	TEMED	
10x West-Puffer:	1,9	M	Glycin	
	0,25	M	Tris	pH 8,1 – 8,4

2.1.6 Kits

Die in Tabelle 5 aufgeführten gebrauchsfertigen Kits wurden nach Herstellerangaben angewendet.

Tabelle 5: Verwendete gebrauchsfertige Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Cytometric Bead Array	Th1/Th2/Th17 Kit Zytokin-quantifizierung	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Cytometric Bead Array	Flex-Set IL-13 Flex-Set IL-1 β	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

Kit	Verwendung	Hersteller
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Zellproliferations- und Zytotoxizitäts-Assay	Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, JPN
Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Kit	Chemilumineszenz-Lösung für Western Blot Detektion	Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
mirVana	RNA Isolation	Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Pierce BCA Protein Assay	Proteinquantifizierung	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, US
TUNEL-Assay	Apoptosequantifizierung	Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

2.1.7 Antikörper

Die in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgeführten Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot-Analysen eingesetzt. Spezies, Verdünnungsfaktoren (VF) und Hersteller sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Tabelle 6: Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	VF (IF)	VF (WB)	Hersteller
anti- β -Aktin	Maus	-	1:10.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US
anti- Claudin-1	Kaninchen	1:50	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti- Claudin-1	Maus	1:50	-	Life Technologies, Carlsbad, CA, US
anti- Claudin-2	Maus	1:100	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti- Claudin-2	Kaninchen	1:100	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US

	Bezeichnung	Spezies	VF (IF)	VF (WB)	Hersteller
anti-	Claudin-4	Maus	1:100	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti-	Claudin-4	Kaninchen	1:100	1:1000	ProSci, Inc., Poway, CA, US
anti-	Claudin-5	Kaninchen	1:100	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti-	Claudin-7	Kaninchen	1:100	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti-	Claudin-8	Kaninchen	1:100	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti-	<i>cleaved Caspase-3</i>	Kaninchen	1:100	-	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US
anti-	Occludin	Kaninchen	1:100	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
anti-	ZO-1	Maus	1:100	-	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US
anti-	ZO-1	Kaninchen	1:100	-	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US

IF: Immunfluoreszenz; VF: Verdünnungsfaktor; WB: Western Blot

Tabelle 7: Sekundärantikörper

	Bezeichnung	VF (IF)	VF (WB)	Hersteller
anti-	Kaninchen (IgG-gesamt AlexaFluor®594)	1:500	-	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
anti-	Maus (IgG-gesamt DyLight™488)	1:500	-	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US

Bezeichnung		VF (IF)	VF (WB)	Hersteller
anti-	Maus	-	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, US
anti-	Kaninchen	-	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, US

IF: Immunfluoreszenz; VF: Verdünnungsfaktor; WB: Western Blot

2.1.8 Software

Für die Auswertung der Versuche wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Computer-Programme verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Verwendung	Hersteller
Analogon	Datenaufnahme der Ussingkammern	Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
Easywin Fitting, Version V6.0a	Photometrische Auswertung	Tecan Group AG, Männedorf, CH
FlowJo	Durchflusszytometrische Analyse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US
GraphPad Prism 8	Statistische Auswertung und Diagrammherstellung	GraphPad Software, San Diego, CA, US
ImageJ	Bildbearbeitung, densitometrische Auswertung der Western Blots, Zellzahlquantifizierung	Rasband, W. S., National Institute of Health US
Image Studio Lite	Bildbearbeitung und densitometrische Auswertung der Western Blots	Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, US
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	Auswertung RNA-Sequenzierung	Qiagen N.V., Hilden, DE
Microsoft Office – Excel	Datenaufnahme und Auswertung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

Software	Verwendung	Hersteller
SoftMax Pro 6.4	Photometer	Molecular Devices, LLC, San José, CA, US
Zen	Bildverarbeitung des konfokalen Mikroskops	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE

2.2 Methoden

Wenn nicht anders angegeben erfolgten Inkubationsphasen im Brutschrank immer bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Infektionsversuche mit *C. jejuni* erfolgten immer bei 37 °C und unter mikroaeroben Bedingungen in luftdichten Boxen. Die mikroaerobe Atmosphäre wurde mithilfe von Gaspacks (CampyGen), welche ca. 5 – 10 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂ produzieren, erzeugt.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien und Stimulation

Die Kultivierung der adhärennten humanen Kolonepithelzellen HT-29/B6, des Subklon HT-29/B6-GR/MR, sowie der Zelllinien Caco-2, Caco-2-BBe und T84 erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C, mit 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im jeweiligen Medium (Kapitel 2.1.5.1). An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel bis zur vollständigen Differenzierung der Zellen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden T25-Flaschen mit 10 mL PBS gespült und anschließend mit 3 mL Trypsin-EDTA für 5 min im Brutschrank trypsiniert. Der Überstand mit abgestorbenen Zellen wurde verworfen. Die vollständige Ablösung der vitalen Zellen erfolgte mit 1 mL Trypsin-EDTA ebenfalls im Brutschrank. Durch die Zugabe von 10 mL des jeweiligen Mediums wurde der enzymatische Verdau des Trypsin-EDTA gestoppt. Nach dem Resuspendieren durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Eine definierte Zellzahl wurde zur Weiterkultivierung in eine neue T25-Flasche (ca. 1,5 mL) oder in PCF-Filter (ca. 500 µL) überführt. Die Zellen in den Filtern differenzierten dabei in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm. Die Zellkulturen wurden mindestens zwei Stunden – im Idealfall über Nacht – vor der Infektion mit *C. jejuni* zwei Mal mit antibiotikafreiem Medium gewaschen. Die Infektionsversuche erfolgten in Anwesenheit von hitzeinaktiviertem FBS.

Die THP-1-Immunzellen erhielten alle zwei Tage frisches Medium. Zur Weiterkultivierung wurde nach sieben Tagen eine definierte Zellzahl der Suspensionszellen je nach Bedarf in eine neue T25 oder T75 überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellzahl während der Kultivierung nicht mehr als 10^6 Zellen/mL betrug. Für den Infektionsversuch wurden sieben Tage alte Zellen in Falcon-Tubes überführt und bei 22 °C für 10 min bei $130 \times g$ zentrifugiert und in frischem Medium ohne Antibiotika resuspendiert. Für die nachfolgenden Co-Kultur-Versuche wurden $1,8 \cdot 10^5$ THP-1-Zellen je Well einer 12-Well-Platte gesät und mit 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 24 Stunden (Std.) stimuliert, damit die THP-1-Zellen zu Immunzellen mit makrophagenähnlichem Phänotypen differenzierten. Nach der 24-stündigen Differenzierung wurde das PMA-Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen einmal mit frischem antibiotikafreiem Medium gewaschen.

2.2.1.2 *In vitro*-Infektionsmodell

Der Referenzstamm *C. jejuni* wt 81-176 wurde aus einem tiefgefrorenen 70 %-igem Glycerolstock auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C und unter mikroaeroben Bedingungen (5 – 10 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) kultiviert und nach zwei Tagen auf frische Blutagarplatten überimpft. Anschließend wurden einzelne Kolonien in Müller-Hinton (MH)-Flüssigmedium aufgenommen und für 2 Std. bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler ebenfalls unter mikroaeroben Bedingungen geschüttelt. Für die *in vitro*-Infektionsversuche wurden die Bakterien bei 10 °C für 2 min und $5.000 \times g$ zentrifugiert. Die OD₆₀₀ wurde ermittelt und eine OD₆₀₀ von 1 mit dem jeweiligen Zellkulturmedium eingestellt. Diese OD₆₀₀ entsprach ca. 10^8 koloniebildenden Einheiten (KBE). Im Anschluss wurden die Zellen mit einer MOI von 100 je nach Fragestellung entweder von apikal oder von basolateral infiziert und über die gesamte Dauer des Experimentes bei 37 °C und zum Vorteil der Bakterien unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert.

2.2.1.3 *In vitro*-Testsubstanzgabe

Die in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöste Stocklösung der Testsubstanz wurde in dem jeweiligen Zellkulturmedium ohne Antibiotika gelöst. Die Substanzen wurden entweder nur von apikal (Resveratrol, Endkonzentration im Filter 100 µM) oder von beiden Seiten (apikal und basolateral; Curcumin, Endkonzentration im Filter 50 µM) appliziert. Die behandelten Zellen inkubierten zwei Stunden bei normalen Kultivierungsbedingungen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) bevor die Infektion der Zellen mit *C. jejuni* 81-176 und einer MOI 100 erfolgte.

2.2.2 Mausmodell

Für das *in vivo*-Infektionsmodell wurden abiotische IL-10-*knockout* (IL-10^{-/-})-Mäuse (mit einem C57BL/10J Hintergrund) verwendet und unter spezifisch pathogenfreien (*specific pathogen free*; SPF) Bedingungen in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin gehalten. Die *in vivo*-Versuche erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Gastrointestinale Mikrobiologie“ des „Instituts für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin“. Um die Darmflora der Tiere zu eliminieren, erhielten die Tiere über einen Zeitraum von acht Wochen einen Antibiotikacocktail *ad libitum* über das Trinkwasser. Dieser Antibiotikacocktail enthielt Ampicillin/Sulbactam (1,5 g/L), Ciprofloxacin (200 mg/L), Imipenem/Cilastatin (150 mg/L), Metronidazol (1 g/L) und Vancomycin (50 mg/L). Dieses für *C. jejuni* etablierte Mausmodell wurde bereits publiziert (Bereswill *et al.* 2011a, Haag *et al.* 2012a). Die Studien wurden gemäß dem Tierschutzgesetz und den ARRIVE-Richtlinien durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo Berlin; G0104/19, G0109/19 und G0172/16) tierschutzrechtlich genehmigt.

2.2.2.1 Behandlung der Mäuse

Zwei Tage vor dem Infektionsstart wurde der Antibiotikacocktail im Trinkwasser der sekundär abiotischen IL-10^{-/-}-Mäuse gegen Wasser, welches die Testsubstanz enthielt, ausgetauscht. Die Tiere erhielten dann *ad libitum* über autoklaviertes Trinkwasser Resveratrol (0,3 mg/mL in 2 % Carboxymethylcellulose (CMC)) oder Curcumin (0,5 mg/L, in 2 % CMC gelöst in PBS pH 7,4).

2.2.2.2 *In vivo*-Infektionsmodell

An zwei aufeinanderfolgenden Tagen (d 0/1) wurden die Tiere per oraler Gavage mit 10⁸ - 10⁹ KBE *C. jejuni* 81-176 in 0,3 mL PBS (pH 7,4) infiziert. Die *C. jejuni*-infizierten IL-10^{-/-}-Mäuse entwickelten innerhalb von sechs Tagen eine akute Enterokolitis (Haag *et al.* 2012a). Sechs Tage nach der Infektion wurden die Mäuse mittels Isofluran-Inhalation betäubt, mittels zervikaler Dislokation getötet und das distale Kolon unter sterilen Bedingungen entnommen. Das lebende Kolongewebe wurde sofort in Ussingkammern eingebaut und elektrophysiologische Messungen des transmuralen Widerstandes sowie Permeabilitätsanalysen mithilfe des Tracermoleküls Fluorescein (332 Da) durchgeführt. Außerdem wurde weiteres Gewebe für histologische Analysen in 4 % Formalin fixiert. Für molekulare biologische Analysen wurde das Gewebe direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Zytotoxizitäts-Assay

Um zytotoxische Effekte des Bakteriums auf die Zellkulturen zu untersuchen, wurde ein WST-basierter Zytotoxizitätstest (Cell Counting Kit-8 (CCK-8)-Assay) verwendet. WST-8 wird durch eine Dehydrogenase, welche nur in vitalen Zellen vorhanden ist, reduziert und produziert den wasserlöslichen orangen Farbstoff Formazan. Die produzierte Formazan Menge ist direkt proportional zu der Anzahl an lebenden Zellen. Die CCK-8-Lösung wurde in Zellkulturmedium gelöst (10 μ L CCK-8 auf 100 μ L Medium) und auf die zuvor zwei Mal mit Medium gewaschenen Zellen pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Unbehandelte und uninfierte Zellen repräsentierten 100 % Vitalität. Als Positivkontrolle für die Effektivität des Testes wurden Zellen mit 1 % SDS inkubiert und definierten den Wert für vollständig geschädigte Zellen.

2.2.3.2 Cytometric Bead Array und Durchflusszytometrie

Um den Einfluss der *C. jejuni*-Infektion sowie den der Substanzbehandlung im Hinblick auf die Zytokinsekretion während der Co-Kultur zu untersuchen, wurde nach dem Versuchsende Zellkulturüberstand abgenommen und mithilfe des Cytometric Bead Arrays (CBA) gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie der Zytokingehalt quantifiziert. Zur Messung verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine kamen der humane Th1/Th2/Th17 Zytokin Kit sowie die Flex Sets IL-13 und IL-1 β zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt und nach der Färbung über Nacht im Dunkeln bei 4 °C bis zur Durchflusszytometrie gelagert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

2.2.3.3 Western Blot

Für die Membranproteinextraktion aus murinem Kolongewebe wurde das Gewebe in einen Glashomogenisator gegeben, Membranlysepuffer hinzugefügt und solange homogenisiert bis keine Gewebestücke mehr vorhanden waren. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, zehn Mal durch eine gelbe Kanüle (Nr. 1; 24 G) und anschließend zehn Mal durch eine Tuberkulinnadel (26 G) gezogen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 200 \times g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 42.100 \times g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gelöste Fraktion. Für die Generation der membranständigen Proteinfraction wurden 100 μ L

des eiskalten Gesamtlysepuffer zum Pellet gegeben und das Pellet vorsichtig gelöst. Die Probenlagerung bis zum Western Blot erfolgte bei -20 °C.

Für die Gesamtproteinextraktion aus Zellkulturen wurden die Zellkulturfilter zwei Mal mit PBS⁺ gewaschen und mit Gesamtlysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Spatel vom Zellkulturfilter abgeschabt und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. 30 – 60 min inkubierten die Zellen mit wiederholtem Vortexen auf Eis. Ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4 °C und 15.000 × g folgte. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, mit einer Ultraschallsonde mit 10 Pulse behandelt und erneut zentrifugiert (15 min, 4 °C, 15.000 × g). Die Lagerung des fertigen Proteins aus dem Überstand erfolgte bei -20 °C bis zum Western Blot.

Um jeweils vergleichbare Proteinmengen im Western Blot gewährleisten zu können, erfolgte die Quantifizierung des Proteingehaltes in den Proben mit dem Pierce BCA (*Bicinchoninic acid*) Kit nach Herstellerangaben. Dabei werden zweiwertige Kupferionen (Cu²⁺) in einem alkalischen Milieu durch Proteine in einwertige Kupferionen (Cu⁺) reduziert. Die reduzierten einwertigen Kupferionen bilden mit der Bicinchoninsäure violette Komplexe, welche mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm und einer Standardreihe quantifiziert wurden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970). Durch ein angelegtes elektrisches Feld wandern die negativ geladenen Proteine der Probe während der Elektrophorese zur Anode, sodass sich die Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße trennen und kleinere Moleküle schneller als die großen Moleküle zur Anode gelangen. Für die Gelelektrophorese wurden 1,5 mm dicke Gele, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel, hergestellt. Die Proteinlysate wurden mit Lysepuffer und zwar soweit verdünnt, dass ein definierter Proteingehalt (10 – 20 µg pro Probe) resultierte. Zusätzlich wurden die Proteinlysate jeweils im Verhältnis 5:1 mit 5x Laemmli-Puffer versetzt, um die Position der Proteine sichtbar zu machen. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben nach Entfernen des Probenkammes in die Probenaschen des Sammelgels gegeben und die Kammer mit EPHO-Puffer gefüllt. Zusätzlich wurde eine Probenasche mit einem Größenmarker (Page-Ruler Plus Ladder) beladen, um später eine Größendefinition der detektierten Proteine zu ermöglichen. Im Anschluss erfolgte die Gelelektrophorese bei einer Spannung von zunächst 80 V. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht haben, wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Die Elektrophorese dauerte im Durchschnitt zwei Stunden.

Für den Semi-dry-Transfer der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde der Mini Trans-blot (17 min, 25 V, ca. 1,5 A) verwendet. Dafür wurden die Membranen für mindestens 5 min in Methanol aktiviert. Anschließend wurde sowohl die Membran als auch das Gel für 15 min in Transferpuffer äquilibriert und ohne Luftblasen in der Transferkammer zusammengesetzt. Alternativ erfolgte der Wet-Transfer mit Transferpuffer in gekühlten Transferzellen für 1 Std. bei 100 V.

Die aufgetrennten Mausproteine wurden mit dem Mini Trans-blot System nach Herstellerangaben auf Trans-Blot Turbo Mini PVDF-Membranen transferiert (Programm: „Mixed MW“; 7 min, 25 V, ca. 2,5 A).

Nach dem Protein-Transfer wurde die Membran für 2 Std. bei Raumtemperatur (RT) unter Schwenken in der Blockierungslösung blockiert. Die Blockierungslösung enthält PVP-40 und BSA, welches an freie Proteinbindungsstellen bindet, sodass dieser Schritt unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers reduziert. Anschließend wurde der erste Antikörper (siehe Tabelle 6) über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für jeweils 10 min folgte die zweistündige Inkubation des Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 7) in 1 % Milchpulverlösung in TBST-Puffer schwenkend bei RT. Anschließend wurde die Membran für 5 min (bei der Detektion von β -Aktin für 2 min) in der Lumi-Light^{PLUS}-Lösung im Dunkeln inkubiert. Die Membran wurde im letzten Schritt zwischen zwei Folien gelegt, Luftblasen wurden entfernt und die Proteine sofort mithilfe des Fusion FX7 detektiert. Durch den Größenmarker konnten die gesuchten Proteine identifiziert werden und mittels ImageJ oder der Image Studio Lite Software densitometrisch quantifiziert werden.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolation von Epithelzellen, Quantifizierung und cDNA-Synthese

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem *mirVana* miRNA Isolations Kit von LifeTechnologies nach Herstellerangaben. Alle Schritte erfolgten dabei auf Eis. Für die Isolation wurden die auf den Filtern gewachsenen Zellen mit PBS⁺ gewaschen, mit 600 μ L des mitgelieferten Lysepuffers lysiert, in ein sauberes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und gevortext. 60 μ L des RNA-Homogenat-Additives wurden hinzu pipettiert und weiter gevortext. Die Proben inkubierten im Anschluss 10 min auf Eis bevor 600 μ L Acid-Phenol:Chloroform hinzugefügt wurden. Dann wurden die Proben erneut 30 – 60 s gevortext bevor sie für 5 min, bei 10.000 \times g und RT zentrifugiert wurden, um die wässrige von der organischen Phase zu

trennen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig, ohne Berührung der Interphase, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen der abgenommenen wässrigen Phase wurde mit 1,25 multipliziert, um das Volumen des notwendigen 100 %igen Ethanols zu berechnen. Für jede Probe wurde jeweils eine Filterkartusche in ein Sammelreaktionsgefäß gesteckt und mit maximal 700 µL Probe (Lysat/Ethanol-Gemisch) beladen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 s, bei 10.000 × g, bei dem der Durchfluss verworfen wurde. Dann wurden 700 µL RNA Waschlösung in die Kartusche pipettiert und die Proben für ca. 5 – 10 s bei 10.000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut entsorgt und die Proben zwei Mal mit 500 µL Waschlösung 2/3 wie im vorherigen Zentrifugationsschritt gewaschen. Flüssigkeitsrückstände im Filter wurden durch einen einminütigen Zentrifugierschritt entfernt. Die Kartusche wurde auf ein neues Sammelreaktionsgefäß gesteckt und mit 100 µL nukleasefreiem Wasser, welches zuvor auf 95 °C erhitzt wurde, befüllt. Die Proben wurden für die Isolierung der RNA bei maximaler Geschwindigkeit (17.200 × g) zentrifugiert.

Die Quantifizierung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Nanodrop 2000. Die nachfolgenden Schritte wurden von unseren Kooperationspartnern an der Universität Köln durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte aus der gewonnenen RNA mithilfe des Illumina´s RNA-Seq prep Kits nach Herstellerangaben.

2.2.4.2 Next Generation Sequencing, RNA-Sequenzierung und IPA-Analyse

Im Anschluss erfolgte mittels TrueSeq Stranded Total RNA Methode und dem NovaSeq 6000 Sequenzierungssystem die Sequenzierung. 50 Mio. Reads und eine Qualitätskennzahl von $\geq 80\%$ wurden für den Ausgabebereich definiert. Die resultierenden Reads wurden von einem Bioinformatiker gegen das humane Referenzgenom GRCh38.97 gemappt und in einem 2-Pass-Verfahren mit der STAR aligner Version 2.7.1 sortiert (Dobin *et al.* 2013). Das erste Mapping resultierte aus der Verwendung der Ensembl v97 Koordinaten. Bei dem zweiten Mapping wurden Spleißstellen mit einbezogen, die während des ersten Mapping identifiziert wurden. Mittels der Feature Count Funktion des Bioconductor Packets Rsubread wurde eine Tabelle mit den Gen-Read-Coverages erstellt (Liao *et al.* 2019). Zur Bestimmung der differentiellen Expression zwischen zwei Konditionen wurde das DESeq2-Paket verwendet (Love *et al.* 2014). Die Änderungen wurden in Form von log₂-Change und *P*-Wert dargestellt, wobei die *P*-Werte mittels Benjamini-Hochberg Methode mit multiplexer Testung berechnet wurden.

Down- und Upstream-Analysen erfolgten mithilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)-Software von Qiagen.

2.2.5 Elektrophysiologische Methoden

2.2.5.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes in Zellkulturen

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) steht für die Integrität, also die Unversehrtheit eines Epithels und gibt somit Auskunft über die ionale Dichtigkeit der Barriere. Der TER von Zellkulturen wurde mithilfe einer Chopstick-Elektrode gemessen. Dabei taucht die eine Seite der Elektrode apikal in den Zellkulturfilter und die andere Seite in das basale Medium ein. Von dem gemessenen TER wurde jeweils der Widerstand eines Filters ohne Zellen jedoch mit Medium subtrahiert und mit der Filterfläche von $0,6 \text{ cm}^2$ multipliziert. Die Messung erfolgte immer unter einer Sterilwerkbank. Zwischen den Messungen wurden die Elektroden vorsichtig mit 80 %-igem Ethanol desinfiziert.

2.2.5.2 Ussingkammer Messungen

Mithilfe der Ussingkammer kann der aktive Ionentransport in *ex vivo*-Explantaten aber auch in *in vitro*-Zellmonolayern ermittelt werden. Zusätzlich können Permeabilitätsmessungen mit unterschiedlich großen Tracermolekülen durchgeführt werden. Die U-förmige Ussingkammer besteht aus zwei Kammerhälften, welche nur durch das eingesetzte Epithel getrennt sind, sodass ein Stoffaustausch zwischen serosaler und mukosaler Seite erfolgen kann (Abbildung 7).

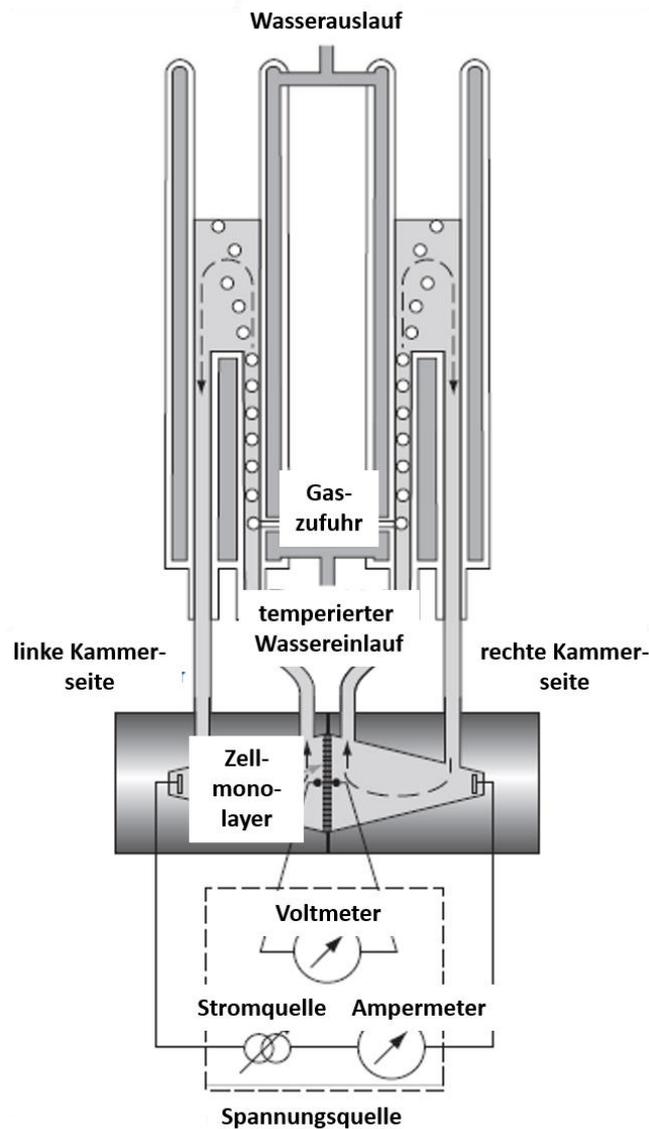


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer Ussingkammer. Die beiden Kammerhälften werden lediglich durch eingebaute Zellmonolayer bzw. Gewebe getrennt. Beide Kammerhälften sind mittels Agarbrücken (0,5 M KCl) über epithelnahe Spannungs- und epithelferne Stromelektroden miteinander verbunden. Die Stromelektroden sind an ein Amperemeter angeschlossen. Durch den angelegten Gleichstrom wird über dem Epithel eine Potentialdifferenz verursacht, welche mithilfe des Voltmeters gemessen werden kann. Aus diesen beiden Größen kann der Widerstand mithilfe des Ohm'schen Gesetzes berechnet werden (modifiziert nach Günzel *et al.* 2010).

Um das Gewebe *ex vivo* unter physiologischen Bedingungen am Leben zu halten, wurden die Kammerhälften auf 37 °C erwärmt und in die beiden Hälften jeweils dasselbe Volumen der Ringerlösung synchron befüllt, um hydrostatische Druckunterschiede zu vermeiden. Für eine ausreichende und zirkulierende Versorgung mit Sauerstoff und der Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes von 7,4 in der Ringerlösung erfolgte die Begasung mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂). Mithilfe des Ohm'schen Gesetzes ($R = \frac{U}{I}$) wurde der TER in Ohm berechnet, welcher im Anschluss mit dem Leerwertwiderstand der Kammer (Badwiderstand) und der Epithelfläche von 0,049 cm² verrechnet wurde. Zusätzlich wurde in den

Ussingkammern die Einwege-Impedanztechnik angewendet, um zwischen epithelialem (R^{epi}), subepithelialem (R^{sub}) und transepithelialem Widerstand (R^{t}) unterscheiden zu können (Gitter *et al.* 1998). Die Steuerung und Datenaufnahme erfolgte mit der Software Analogon (entwickelt von Detlef Sorgenfrei; Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin).

2.2.5.3 Permeabilitätsbestimmung

Permeabilitätsmessungen fanden für *ex vivo*-Gewebe in den Ussingkammern und für Zellkulturfilter in 12-Well-Platten statt. Für die Messung von Gewebe, wurden die Kolonbiopsien der Mäuse in die Ussingkammern eingespannt, jede Kammerhälfte mit jeweils 10 mL Ringerlösung synchron befüllt und die Spannungsklemme aktiviert. Von der basolateralen Seite wurden sowohl aus der 12-Well-Platte als auch aus der Ussingkammer 300 μL einer Leerwertprobe entnommen und mit frischer Ringerlösung bzw. Medium ersetzt. Anschließend wurde die entsprechende Menge Fluorescein (332 Da) für eine finale Konzentration von 0,1 mM apikal hinzu pipettiert. Nach 15, 30, 45 und 60 Minuten wurden jeweils 300 μL -Proben vom basolateralen Kompartiment abgenommen und mit frischer Ringerlösung bzw. Medium ersetzt. Nach dem Versuchsende wurden die Fluorescein-Konzentrationen in Doppelbestimmungen ($\approx 130 \mu\text{L}$ pro Well) in einer 96-Well-Platte photometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm ermittelt und mithilfe einer Kalibriergeraden zur Berechnung der Fluxe und Permeabilitäten verwendet.

2.2.6 Histologische Methoden

2.2.6.1 Immunhistochemische Färbung und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Durch Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen oder Gewebeschnitten können definierte Proteinstrukturen visualisiert und lokalisiert werden. Dafür wurden die Zellkulturfilter nach dem Versuchsende mit PBS⁺ gewaschen und mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁺ wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 in PBS⁺ für 7 min permeabilisiert und anschließend mit Blockierungslösung für 1 Std. bei RT blockiert, um freie Bindungsstellen an den Proteinen zu blockieren und somit unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Die Filtermembran wurde im Anschluss vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Filtergerüst geschnitten und für 1 Std. bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C mit zwei verschiedenen Primärantikörpern (siehe Tabelle 6) inkubiert. Neben dem Zielprotein erfolgte die Färbung eines TJ-Referenzproteins, wie dem Zonula Occludens-1 (ZO-1). Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Zellen drei Mal mit

der Blockierungslösung gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C im Dunkeln mit dem fluoreszenzgekoppelt Sekundärantikörper (Tabelle 7), welcher sich jeweils gegen den Primärantikörper (Maus oder Kaninchen) richtet. Zur weiteren Orientierung wurden die Zellkerne mit dem Nukleinsäurefarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für mindestens 10 min im Dunkeln gefärbt. Durch die Fluoreszenzmarkierung können die Proteine bei den Exzitationswellenlängen von $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{ex}} = 594 \text{ nm}$ und der Zellkern bei $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (*Confocal laser-scanning microscopy*, CLSM) sichtbar gemacht werden. Nach mehrmaligem Waschen mit Blockierungslösung, PBS⁺ und H₂O_{dd} wurden die Zellen kurz mit Ethanol gespült und anschließend mit ProTaq MountFluor eingebettet und bis zur mikroskopischen Visualisierung in lichtdichten Boxen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Kolonproben der Maus

Die Kolonproben der Mäuse aus den Ussingkammern wurden nach der Messung für 2 Std. in 4 % Formalin bei RT fixiert und anschließend bei 4 °C in PBS⁺ bis zur Entwässerung gelagert. Die Entwässerung erfolgte mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe in der Pathologie der Charité. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet, mit einem Schlittenmikrotom circa 4 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf beschichteten Objektträgern aufgebracht. Um Übersichtsaufnahmen für die Oberflächenkorrektur der Proben anfertigen zu können, folgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Hierbei werden saure bzw. basophile Strukturen, wie die Zellkerne, durch das Hämatoxylin (Hämalaun) blau und basische bzw. eosinophile Strukturen, wie das Zytoplasma, durch das Eosin rot angefärbt. Für die HE-Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst für 10 min und dann noch einmal für 30 s in Xylol entparaffiniert. Für die Rehydratisierung wurden die Gewebeschnitte für jeweils 30 s mit einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %, 30 %, H₂O_{dd}) behandelt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 1 min mit Hämalaun gefärbt und so lange mit lauwarmem Leitungswasser gebläut bis das Wasser klar wurde. Es folgte eine Dehydratisierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 min H₂O_{dd}, dann jeweils 30 s in 30 %, 70 %, 96 % Ethanol). Je nach gewünschtem Färbegrad wurden die Gewebeschnitte für 10 – 30 min mit Eosin gefärbt und kurz in 96 % Ethanol getaucht. Die finale Dehydratisierung erfolgte durch zweimaliges Eintauchen für 30 s in 100 % Ethanol und zweimaliges Eintauchen für 30 s in Xylol. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit Pertex eingedeckt. Übersichtsaufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen und zur Berechnung des Oberflächenkorrekturfaktors für die Korrektur der Widerstandsdaten der *ex vivo*-Darmgewebe verwendet.

2.2.7 Statistische Analysen

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt und wurden mehrfach wiederholt (n-fach). Die statistische Auswertung erfolgte dabei mithilfe der Software GraphPad Prism 8.4.2, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5 % ($P < 0,05$) als statistisch signifikant definiert wurde. Statistisch signifikante Gruppen werden bei $P < 0,05$ mit einem Stern (*), bei $P < 0,01$ mit zwei Sternen (**) und bei $P < 0,001$ mit drei Sternen (***) gekennzeichnet. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte mittels Student's *t*-Test für normalverteilte Daten und mittels Mann-Whitney-*U*-Test für nicht-parametrische Daten. Um die Normalverteilung zu identifizieren, wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test vorab durchgeführt ($P < 0,05$ = nicht parametrisch). Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte eine einfache Varianzanalyse (1way ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur oder für nicht normalverteilte Daten der Kruskal-Wallis-Test.

3 Ergebnisse

Im nachfolgenden Kapitel 3.1 werden zunächst verschiedene Zellkulturzelllinien im Hinblick auf die *C. jejuni*-induzierte Barrieredysfunktion analysiert. In Kapitel 3.2 folgt die Identifizierung möglicher protektiver und therapeutischer Substanzkandidaten gegen *C. jejuni*-induzierte Barrierestörungen. Kapitel 3.3 zeigt die Charakterisierung der Barriere-Protektion durch Resveratrol. Im zweiten Teil der Ergebnisse folgt in Kapitel 3.4 die Etablierung des neuen Co-Kultur-Modells und in Kapitel 3.5 die Untersuchung der Wirkung von Curcumin auf die indirekt *C. jejuni*-vermittelten immunmedierten Barrierschäden.

Die dargestellten Ergebnisse für Resveratrol (Kapitel 3.3) (Lobo de Sá *et al.* 2021b), für Curcumin (Kapitel 3.5), sowie für die neu etablierte Co-Kultur (Kapitel 3.4) (Lobo de Sá *et al.* 2019) sind zum Teil bereits in *Frontiers in Pharmacology* bzw. im *International Journal of Molecular Sciences* publiziert.

3.1 Untersuchung der Barrierestörung durch *Campylobacter jejuni* in verschiedenen intestinalen Epithelzellkulturen

In der Literatur sind verschiedene Zellkulturmodelle beschrieben, die als Infektionsmodelle für die *C. jejuni*-Infektion verwendet wurden. Dabei stand jedoch die funktionelle Messung der Barrierefunktion selten im Mittelpunkt der Analysen. Um eine geeignete Zellkultur für die Infektionsversuche mit *C. jejuni* und die Substanztestung zur Inhibition der Barrierestörung zu identifizieren, wurden zuerst verschiedene humane intestinale Epithelzelllinien getestet. Dabei verursachte *C. jejuni* in den verschiedenen Zelllinien eine Störung der Barrierefunktion in Form eines reduzierten TER. Durch den unterschiedlichen Verlauf der Verminderung des TER ergaben sich unterschiedliche Sensitivitäten der Zellkulturen gegenüber *C. jejuni*.

Caco-2D und Caco-2BBE zeigten 90 Stunden (Std.) nach der Infektion mit *C. jejuni* eine Reduktion des TER. Der Widerstand der infizierten Caco-2D reduzierte sich in dieser Zeit auf 13 ± 2 % (Kontrolle vs. *C. jejuni*, *** $P < 0,001$; Student's *t*-Test, $n = 3 - 4$) und der Caco-2BBE auf 65 ± 8 % (Kontrolle vs. *C. jejuni*, ** $P < 0,01$; Student's *t*-Test, $n = 3$). Im Gegensatz dazu verringert sich der TER der T84-Kontrollzellen bereits nach 20 Std. um mehr als die Hälfte auf 38 ± 6 % (Kontrolle t_0 vs. Kontrolle t_{20} , *** $P < 0,001$; Student's *t*-Test, $n = 8$) und bei den *C. jejuni*-infizierten T84-Zellen auf 20 ± 3 % des Ausgangswertes (Kontrolle t_{20} vs. *C. jejuni* t_{20} , * $P < 0,05$; Student's *t*-Test, $n = 8$). Die TER-Reduktion in der Kontrollgruppe könnte dabei auf die Inkubation unter mikroaeroben Bedingungen zurückzuführen sein. Der TER der T84-Kontrollzellen regenerierte unter normalen Inkubationsbedingungen (37 °C,

5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) nicht und blieb bis zum Versuchsende nach 90 Std. unter dem Kontrollniveau bei 21 ± 7 %. Lediglich die uninfizierten HT-29/B6-Zellen zeigten nach 48 Std. einen stabilen Verlauf mit einem Widerstand von 87 ± 8 % und einem signifikanten Abfall in der *C. jejuni*-infizierten Gruppe auf 43 ± 11 % (Kontrolle vs. *C. jejuni*, ** $P < 0,01$; Student's *t*-Test, $n = 8$). Auch der Subklon HT-29/B6-GR/MR (Bergann *et al.* 2009), welcher einen Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und einen Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) exprimiert, zeigte eine noch stabilere Kontrollgruppe und ebenfalls einen Abfall des TER nach 48 Std. auf 65 ± 10 % nach der Infektion mit *C. jejuni* (Kontrolle vs. *C. jejuni*, ** $P < 0,01$; Student's *t*-Test, $n = 8$). Sieben Tage nach der Passage erreichten die Zellen einen Widerstand von ca. 600 – 900 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Aufgrund der Stabilität und Effektivität der Infektion in der HT-29/B6-GR/MR Zelllinie wurden die nachfolgenden Versuche mit dieser Zelllinie durchgeführt.

Um den Einfluss der *C. jejuni*-Infektion auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde ein WST-basierter Zytotoxizitätstest (CCK-8 Assay) 48 Std. nach der Infektion durchgeführt. *C. jejuni* hatte in proliferierenden konfluenten Zellen (einen Tag nach der Passage) keinen Einfluss auf die Zellviabilität (81 ± 4 % lebende Zellen, nicht signifikant; Student's *t*-Test, $n = 3 - 4$), sodass die beobachteten Barrierestörungen unabhängig von der Zytotoxizität zu sein schießen. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Zellviabilität durch die *C. jejuni*-Infektion in polarisierten Zellen (sieben Tage nach der Passage) auf 54 ± 8 % (** $P < 0,001$; Student's *t*-Test, $n = 12 - 16$).

3.2 Potenzielle protektive oder therapeutische Substanzen gegen die *Campylobacter jejuni*-Infektion

Die Auswahl potenzieller Testsubstanzen beruht auf einer RNA-Sequenzierungs-Analyse von Kolonbiopsien aus *C. jejuni*-infizierten Patienten. Die generierten RNA-Seq-Daten (Bücker *et al.* 2018) wurden mithilfe der *Ingenuity Pathway Analyse* (IPA) näher analysiert. Unter der Infektion mit *C. jejuni* verändert sich die Genexpression (*target molecules in data set*), durch welche sich die daran beteiligten Upstream-Regulatoren ermitteln lassen. Die Software vergleicht die generierten Daten mit einer hinterlegten literaturbasierten Datenbank zu Signalkaskaden, sodass auf Basis einer bioinformatischen Vorhersage verschiedene potenzielle Signalwege aufgelistet werden, die unter der Infektion entweder aktiviert oder inhibiert zu sein scheinen (*predicted activation state*). So zeigten beispielsweise Substanzen, Mediatoren oder proinflammatorische Mediatoren, wie LPS, TNF- α , IFN- γ oder IL-6, einen aktivierten Signalweg, wohingegen Verbindungen, wie Resveratrol und Curcumin, einen inhibierten Signalweg zeigten, sodass eine therapeutische Gabe von Resveratrol und

Curcumin die durch die *Campylobacter*-Infektion gehemmten Signalwege potentiell restituieren könnte. Ein Auszug aus der resultierenden Upstream-Regulatoren-Analysetabelle ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Auszug der Upstream-Regulator-Analyse mittels IPA von Kolonbiopsien von *Campylobacter jejuni*-infizierten Patienten.

Upstream-Regulator	Aktivationsstatusvorhersage	Aktivations-Z-score	P-Wert der Überlap-pung	Target Moleküle im Dataset
LPS	Aktiviert	11,943	3,22E-66	<i>ABCB1,ABCC1,ABCC3,ABCC5, ...</i>
IFNG	Aktiviert	9,622	3,95E-44	<i>ABCA6,ABCB1,ABLIM3,ACOD1, ...</i>
TNF	Aktiviert	8,998	3,23E-41	<i>ABCC1,ABCC3,ABCG2,ABR, ...</i>
IL-6	Aktiviert	7,247	1,18E-38	<i>ABCC1,ABCC3,ABCC5,ABCG2, ...</i>
Calcitriol	Inhibiert	-6,254	8,97E-25	<i>ABCB1,ABCC3,ACKR4,ADAM19, ...</i>
IL-1B	Aktiviert	8,574	1,54E-24	<i>ABCC3,ABCG2,ACHE,ACKR2, ...</i>
Resveratrol	Inhibiert	-2,805	1,09E-05	<i>ADIPOQ,AIF1,BCL2A1,BIRC3, ...</i>
Curcumin	Inhibiert	-3,489	2,06E-05	<i>ABCB1,ABCC1,ABCG1,ADAMTS4, ...</i>

IFNG: Interferon Gamma; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; TNF: Tumornekrosefaktor; modifizierter Auszug aus Bückler *et al.* 2018, Datensatz GEO-Nummer GSE88710.

Auf Basis dieser bioinformatischen Vorhersage in Kombination mit einer Literaturrecherche wurden die Substanzen Resveratrol und Curcumin als Substanzkandidaten identifiziert und hinsichtlich ihrer Barriere-protectiven und immunmodulatorischen Eigenschaften zur Abwehr der *C. jejuni*-induzierten Barriestörungen untersucht.

3.3 Protektive Wirkung von Resveratrol auf die *Campylobacter jejuni*-induzierte Barrierestörung *in vitro* und *in vivo*

Resveratrol wurde in der IPA-Berechnung aus der Genexpression der Kolonmukosa von *C. jejuni*-infizierten Patienten als potenzielle präventive bzw. therapeutisch wirksame Substanz bei *C. jejuni*-Infektionen identifiziert. Um die protektiven Eigenschaften von Resveratrol zu untersuchen, wurde Resveratrol sowohl *in vitro* als auch im *in vivo*-IL-10^{-/-}-Mausmodell eingesetzt.

3.3.1 Resveratrol minimiert die durch *Campylobacter jejuni*-induzierte Barrierestörung

Messungen mit Chopstick-Elektroden sowie elektrophysiologische Analysen in Ussingkammern ermöglichen die Messung des TER. Ein stabiler epithelialer Widerstand spiegelt die Integrität und somit die intakte Funktionsfähigkeit der epithelialen Barriere wider. Veränderungen, welche durch die *C. jejuni*-Infektion oder durch die Resveratrol-Behandlung ausgelöst werden, wurden *in vitro* in Epithelzellmonokulturen sowie *in vivo* in dem sekundär abiotischen IL-10^{-/-}-Mausmodell untersucht. *C. jejuni*-infizierte sekundär abiotische IL-10^{-/-}-Mäuse zeigten akute Symptome einer Enteritis mit blutigem Durchfall und Gewichtsverlust (Haag *et al.* 2012a). Es ist im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen, in diesem speziellen Mausinfektionsmodell die Kolonmukosa aus *C. jejuni*-infizierten Tieren in Ussingkammern u. a. mittels Impedanzspektroskopie zu vermessen und somit eine funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barrierestörung durchzuführen.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* schwächte die *C. jejuni*-Infektion die intestinale epitheliale Barriere (Abbildung 8). *In vitro* reduzierte sich der TER der Zellmonolayer nach der Infektion mit *C. jejuni* auf 43 ± 5 % des Ausgangswertes. In Anwesenheit von Resveratrol erholte sich der TER wieder und erreichte einen Wert von 71 ± 7 % (Abbildung 8A). *In vivo* überstieg der Widerstand der mit Resveratrol-behandelten Gruppe den Widerstandswert der unbehandelten uninfizierten Kontrollgruppe (Kontrolle $61 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vs. Resveratrol + *C. jejuni* $76 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$, * $P < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test, $n = 4 - 17$) (Abbildung 8B).

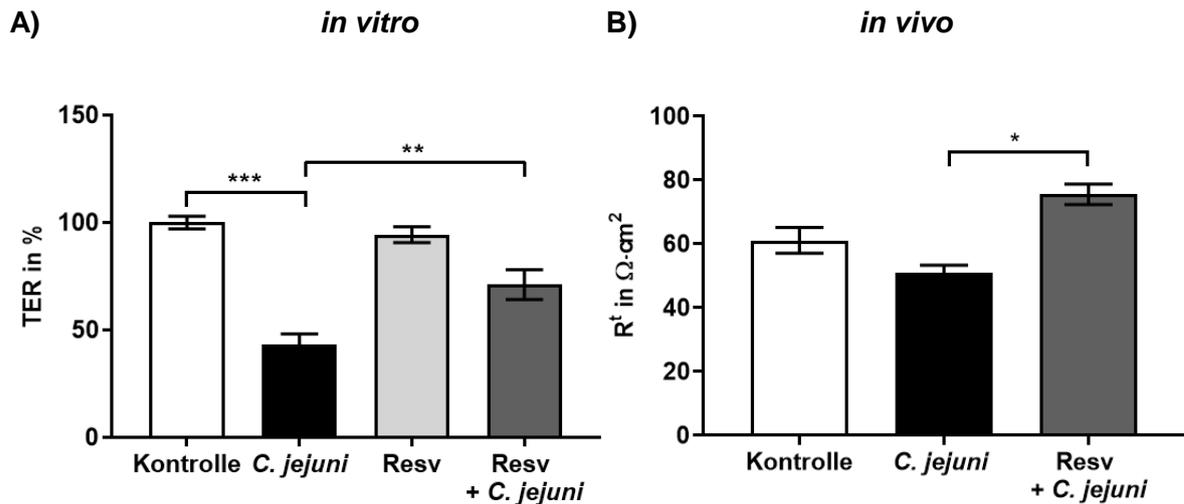


Abbildung 8: Resveratrol minimiert den durch *Campylobacter jejuni*-induzierten Barrieredefekt. **A)** HT-29/B6-GR/MR-Zellen wurden 2 Std. vor der apikalen Infektion mit *C. jejuni* mit 100 μ M Resveratrol (Resv) behandelt und der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) mittels Chopstick-Elektroden 48 Std. nach der Infektion gemessen und die Veränderung prozentual zum Ausgangswert dargestellt (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; 1way ANOVA, $n = 9 - 10$) (Lobo de Sá *et al.* 2021b). **B)** Kolonbiopsien Resveratrol-behandelter IL-10^{-/-}-Mäuse wurden sechs Tage nach der peroralen Infektion mit *C. jejuni* in Ussingkammern eingespannt und der transmurale Widerstand (R^t) gemessen (* $P < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test, $n = 4 - 17$) (modifiziert nach Heimesaat, Lobo de Sá *et al.* 2020).

Der TER repräsentiert die Permeabilität für Ionen, während die parazelluläre Leckage bzw. Dichtigkeit des Epithels gegenüber größeren Molekülen durch die Permeabilität von entsprechenden Marker-Molekülen definierter Größe dargestellt wird (Marker-Flux-Messung). Fluorescein, als ein kleines Makromolekül, diente als parazellulärer Flux-Marker. Sowohl *in vitro* (Abbildung 9A) als auch *in vivo* (Abbildung 9B) schädigte *C. jejuni* die Barriere durch die Öffnung des parazellulären Weges, dargestellt durch die Passage von Fluorescein von apikal nach basolateral. Die Resveratrol-Behandlung verbesserte in beiden Modellen die Permeabilität von Fluorescein im Vergleich zur unbehandelten *C. jejuni*-infizierten Gruppe (Abbildung 9).

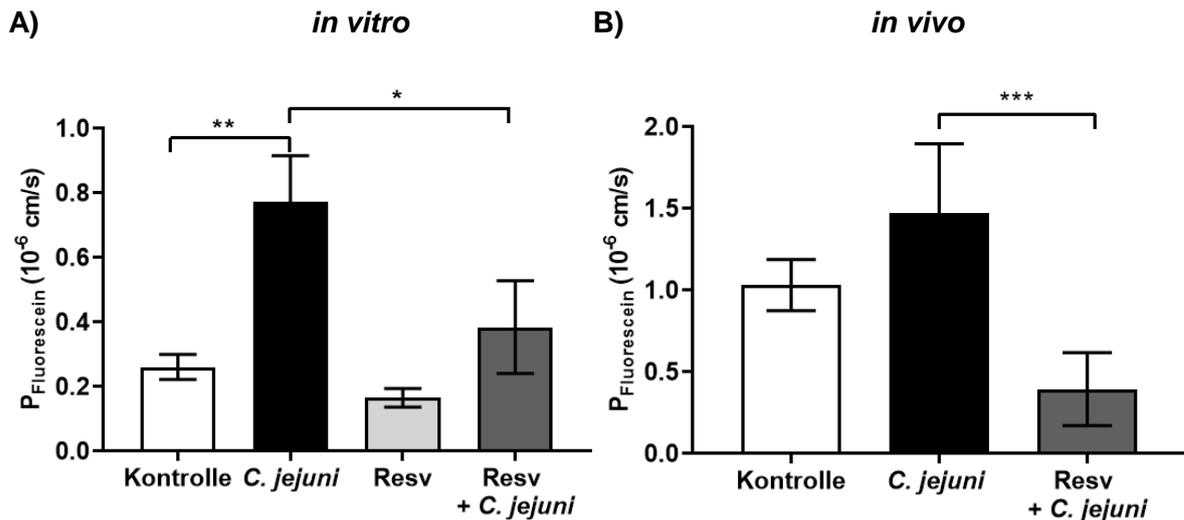


Abbildung 9: Einfluss von *Campylobacter jejuni* und Resveratrol auf den Makromolekülfluss. **A)** 48 Std. nach der *C. jejuni*-Infektion von HT-29/B6-GR/MR-Zellen und der Behandlung mit Resveratrol (Resv) wurde die Permeabilität für Fluorescein (332 Da) bestimmt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; 1way ANOVA, $n = 10$) (Lobo de Sá *et al.* 2021b). **B)** Kolongewebe von *C. jejuni*-infizierten bzw. mit Resveratrol-behandelten IL-10^{-/-}-Mäusen wurde sechs Tage nach der Infektion in Ussingkammern eingespannt und die Permeabilität von Fluorescein ermittelt (** $P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test, $n = 4 - 17$) (Lobo de Sá *et al.* 2021b).

3.3.2 Einfluss von Resveratrol auf die Expression von *Tight Junction*-Proteinen und deren Lokalisation

Da das molekulare Korrelat eines gestörten *leak pathway* häufig auf der Expression und/oder der Verteilung von TJ-Proteinen basiert, wurde sowohl die Proteinexpression als auch die Lokalisation von TJ-Proteinen in *C. jejuni*-infizierten und mit Resveratrol-behandelten HT-29/B6-GR/MR-Zellen analysiert. Eine Infektion mit *C. jejuni* erhöhte die Proteinexpression von Claudin-1 (Abbildung 10A), wohingegen die Proteinexpression von Claudin-2 verringert war (Abbildung 10B). Im Gegensatz zur Claudin-1-Proteinexpression erholte sich die Proteinexpression des Claudin-2 während der Behandlung mit Resveratrol vollständig auf das Kontrollniveau (Abbildung 10B).

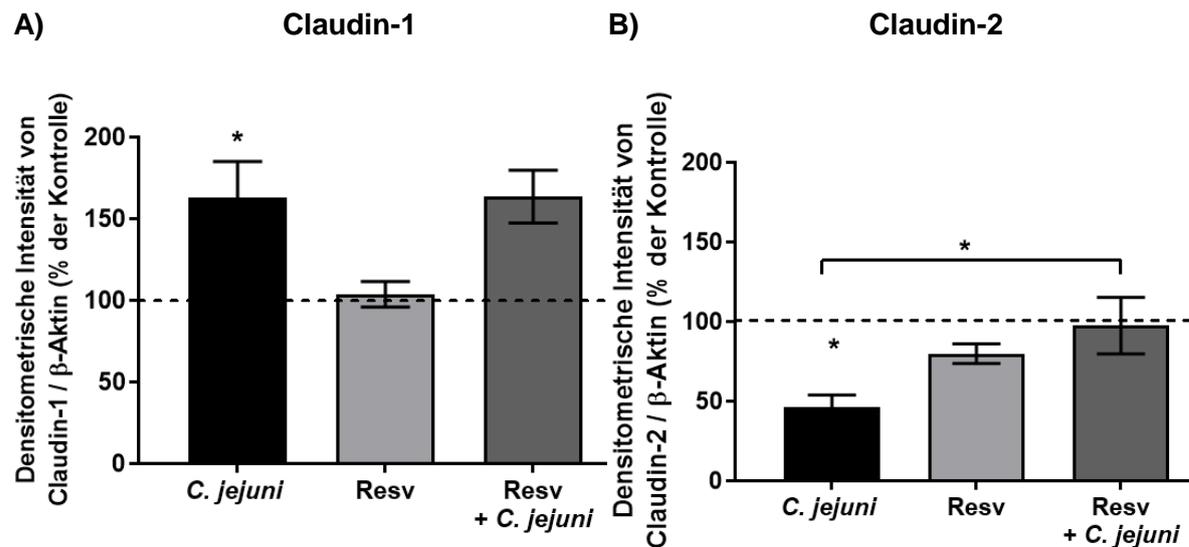


Abbildung 10: Einfluss der *Campylobacter jejuni*-Infektion und Resveratrol-Behandlung auf die Proteinexpression der Epithelzellen. Densitometrische Analyse von **A)** Claudin-1 und **B)** Claudin-2 in Resveratrol (Resv)-behandelten (100 μ M) HT-29/B6-GR/MR-Zellen 48 Std. nach *C. jejuni*-Infektion. Der Kontrollwert un behandelter uninfizierter Zellen wird als gestrichelte Linie dargestellt und entspricht 100 %. Die Proteinexpression wurde auf die β -Aktin-Expression normalisiert (* P <0,05; 1way ANOVA, n= 8 – 9) (Lobo de Sá *et al.* 2021b).

Alle anderen getesteten TJ-Proteine zeigten keine Veränderung in ihrer Expression durch die *C. jejuni*-Infektion oder die Behandlung mit Resveratrol (Tabelle 10). Die Expression von Occludin, Claudin-4 und Claudin-7 in HT-29/B6-Monolayern war nach der *C. jejuni*-Infektion bzw. nach der Resveratrol-Behandlung unbeeinflusst. Obwohl das Expressionsniveau von Claudin-5 und Claudin-8 nach der Infektion eine Tendenz zur Reduktion zeigte und durch die Resveratrol-Behandlung aufgehoben wurde, erreichte dies keine statistische Signifikanz. Außerdem konnte unter diesen Infektionsbedingungen keine Auswirkung auf eine Spaltung von TJ-Proteinen, wie z. B. von Occludin, beobachtet werden (exemplarischer Blot im Anhang Abbildung 26).

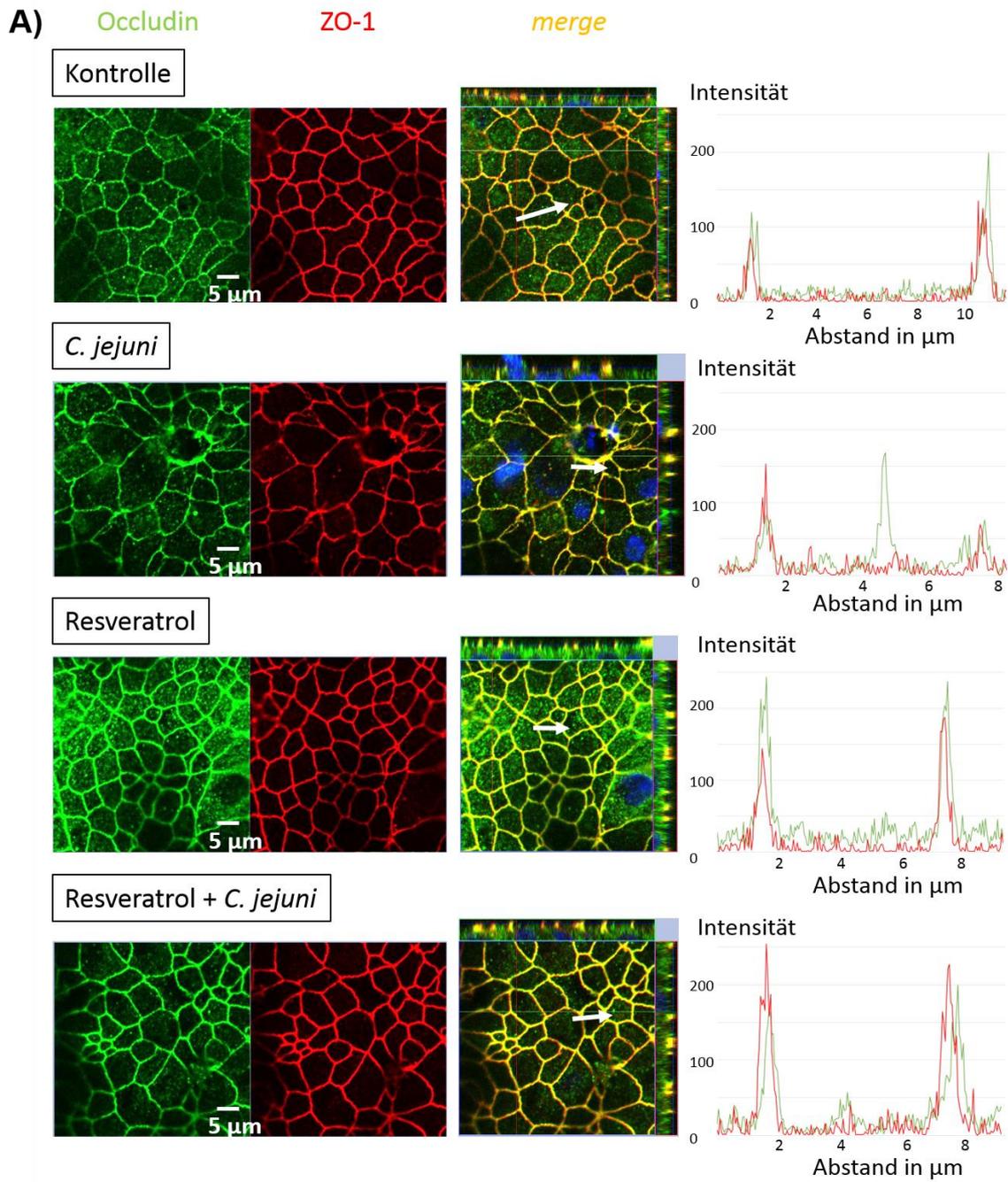
Tabelle 10: Einfluss von *Campylobacter jejuni* und Resveratrol auf die *Tight Junction*-Proteinexpression der Epithelzellen.

TJ-Protein	<i>C. jejuni</i>	Resveratrol	Resveratrol + <i>C. jejuni</i>
Claudin-4	118 \pm 14 %	117 \pm 14 %	99 \pm 7 %
Claudin-5	74 \pm 13 %	81 \pm 14 %	116 \pm 11 %
Claudin-7	105 \pm 18 %	123 \pm 10 %	88 \pm 11 %
Claudin-8	64 \pm 10 %	107 \pm 23 %	104 \pm 30 %

TJ-Protein	<i>C. jejuni</i>	Resveratrol	Resveratrol + <i>C. jejuni</i>
Occludin	102 ± 7 %	84 ± 5 %	108 ± 12 %

Densitometrische Analyse der *C. jejuni*-infizierten bzw. mit 100 µM Resveratrol-behandelten HT-29/B6-GR/MR-Zellen. Die unbehandelten und uninfizierten Zellen wurden als Kontrolle auf 100 % gesetzt. Die Proteinexpression wurde mittels β-Aktin normalisiert (nicht signifikant; 1way ANOVA, n= 5 – 10) (Lobo de Sá *et al.* 2021b).

Um den Einfluss von *C. jejuni* und Resveratrol auf die Lokalisation der TJ-Proteine zu bestimmen, wurden HT-29/B6-GR/MR-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen gefärbt und mithilfe des CLSM visualisiert. Die Z-Stack-Aufnahmen (X-, Y- und Z-Ebene) konnten mittels Intensitäts-Abstand-Plots der ZEN-Software analysiert werden. Nach der Infektion mit *C. jejuni* kam es zu einer Umverteilung der TJ-Proteine Occludin und Claudin-5 aus der TJ-Domäne der Epithelzellen heraus (Abbildung 11). In den mit *C. jejuni* infizierten Zellen befanden sich die Occludin-Signale intrazellulär und waren in den TJ-Strängen nicht mehr mit ZO-1 co-lokalisiert (Abbildung 11A). Noch ausgeprägter war die Umverteilung von Claudin-5 aus der TJ-Domäne nach intrazellulär (Abbildung 11B). In Abbildung 11 zeigen die Intensitätsplots erhöhte intrazelluläre Signale von Occludin und Claudin-5 unter der Infektion mit *C. jejuni*, welche nach der Resveratrol-Behandlung vermindert waren.



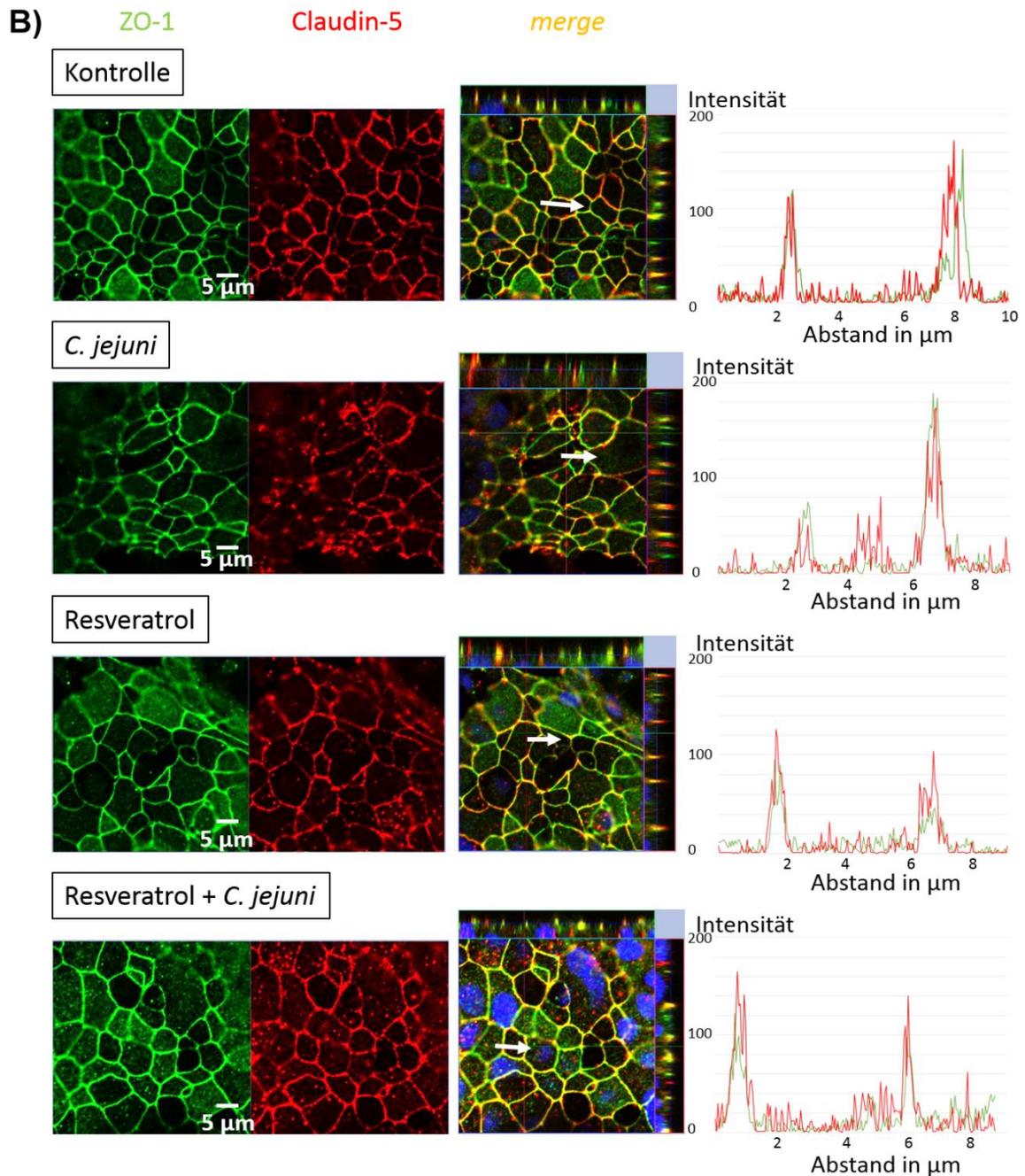


Abbildung 11: Tight Junction-Lokalisation nach der *Campylobacter jejuni*-Infektion und Resveratrol-Behandlung. HT-29/B6-GR/MR-Zellen wurden 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* und der Behandlung mit Resveratrol mit Antikörpern gegen **A)** Occludin (grün) und ZO-1 (rot) sowie **B)** Claudin-5 (rot) und ZO-1 (grün) gefärbt und mittels CLSM visualisiert. Z-Stack-Aufnahmen verdeutlichen die Umverteilung sowohl nach intrazellulär als auch nach basolateral. Die in den Z-Stack-Aufnahmen dargestellten weißen Pfeile geben den analysierten Bereich der Intensitäts-Abstand-Plots wieder. Unter Kontrollbedingungen erscheinen die Intensitätssignale (Y-Achse) der TJ-Proteine in der TJ-Domäne co-lokalisiert mit ZO-1 am höchsten. Die Signale variieren unter Infektions- und Behandlungsbedingungen und verlagern sich unter der Infektion nach intrazellulär (modifiziert nach Lobo de Sá *et al.* 2021b).

3.3.3 Wirkung von *Campylobacter jejuni* und Resveratrol auf die Apoptose-Induktion

Neben den TJ-Veränderungen auf Expressions- und Lokalisationsebene während der *C. jejuni*-Infektion stellt die Induktion der epithelialen Apoptose einen weiteren Barriere-relevanten Pathomechanismus dar. Um den Einfluss von Resveratrol auf die *C. jejuni*-verursachte Apoptose-Induktion zu untersuchen, wurde der TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) durchgeführt. Dabei markiert das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) die 3'OH-Gruppen der apoptotischen DNA-Fragmente, welche im Anschluss an die Färbung fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden können. Die Anzahl an apoptotischen Ereignissen wurde in Relation zur Anzahl der in einem Bildausschnitt liegenden Zellkerne gesetzt und der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven und somit apoptotischen Zellen quantifiziert. Das Ergebnis des TUNEL-Assays zeigte, dass die apikale Infektion der HT-29/B6-GR/MR mit *C. jejuni* einen Anstieg der Apoptose-Ereignisse induzierte. Dieser Anstieg wurde in Anwesenheit von Resveratrol gehemmt (Abbildung 12).

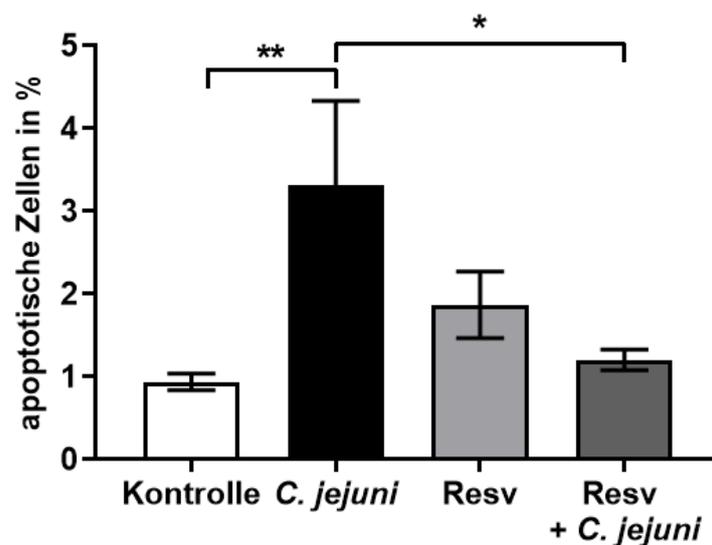


Abbildung 12: Apoptose-Induktion in *Campylobacter jejuni*-infizierten HT-29/B6-GR/MR-Zellen und der antiapoptotische Einfluss von Resveratrol. Die Epithelzellen wurden 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* und der Behandlung mit 100 μ M Resveratrol (Resv) mithilfe des TUNEL-Assays markiert und die Zellkerne mit 4'-6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels CLSM. TUNEL-positive Zellen wurden in Relation zur Gesamtzellzahl eines Bildausschnittes gesetzt und so der prozentuale Anteil an Apoptosen ermittelt. Von jedem Zellmonolayer erfolgte die Aufnahme von sechs zufällig gewählten Bildausschnitten für die Quantifizierung der Apoptoserate (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; 1way ANOVA, $n = 4$) (Lobo de Sá *et al.* 2021b).

3.3.4 *In vitro*-Zytokin-Stimulation und die Behandlung mit Resveratrol

Um die protektive Wirkung von Resveratrol ebenfalls auf durch immunantwortinduzierte Barrierschäden zu untersuchen, wurden HT-29/B6-GR/MR-Zellen mit IFN- γ , TNF- α und IL-1 β stimuliert. Diese Zytokine werden vermehrt in der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten sezerniert (Bücker *et al.* 2018).

Die alleinige IFN- γ -Stimulation erhöhte den parazellulären Flux für Fluorescein, was durch die Gabe von Resveratrol inhibiert werden konnte (Abbildung 13A). Ein Zytokin-Cocktail bestehend aus hohen Dosen IFN- γ , TNF- α und IL-1 β potenzierte die Barrierschädigung im Vergleich zur IFN- γ -induzierten Dysfunktion. Dieser starke Defekt konnte jedoch durch die Resveratrol-Behandlung nicht gehemmt werden (Abbildung 13B). Submaximale Zytokinwirkungen können demnach durch Resveratrol ausgeglichen werden, jedoch gilt dies nicht bei einer maximalen Stimulation mit einem Zytokin-Cocktail.

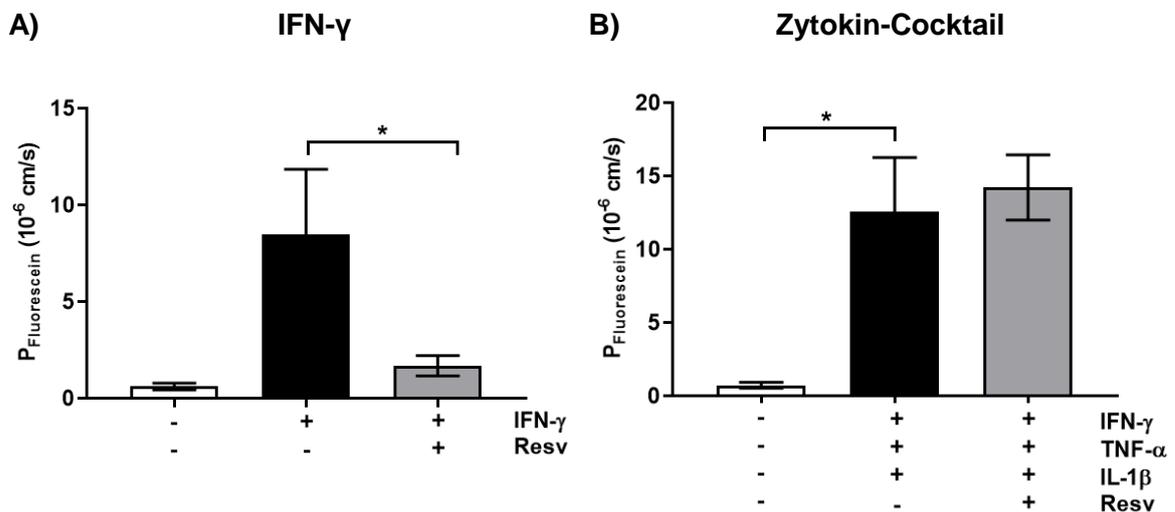


Abbildung 13: Einfluss der Zytokin-Stimulation und Resveratrol-Behandlung auf die Fluorescein-Permeabilität. HT-29/B6-GR/MR wurden nach der Behandlung mit 100 μ M Resveratrol (Resv) von basolateral mit **A)** 50 ng/mL IFN- γ oder **B)** einem Zytokin-Cocktail, bestehend aus 50 ng/mL IFN- γ , 100 U/mL TNF- α und 100 ng/mL IL-1 β , stimuliert. Nach 24 Std. wurden Permeabilitäten für Fluorescein (332 Da) vom apikalen zum basolateralen Kompartiment gemessen (* P <0,05; 1way ANOVA, n = 3 – 8) (Lobo de Sá *et al.* 2021b).

3.4 Etablierung eines Co-Kultur-Modells mit humanen intestinalen Epithelzellen und Immunzellen

Um den Einfluss der *C. jejuni*-induzierten Immunantwort auf die Barrierestörung zu analysieren und die Effektivität möglicher antiinflammatorischer und/oder immunmodulatorischer Substanzen gegenüber *C. jejuni* zu testen, wurde ein Co-Kultur-Modell bestehend aus HT-29/B6-GR/MR-Epithelzellen und subepithelial lokalisierten THP-1-Immunzellen etabliert. Dafür wurden die Epithelzellen auf permeable Filtermembranen mit unterschiedlichen Porengrößen ausgesät und zu einem polarisierten Zellmonolayer mit einem ausgebildeten TJ-Netzwerk differenziert. Parallel dazu wurden die THP-1-Monozyten mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in 12-Well-Platten stimuliert, sodass die Immunzellen zu adhären-ten makrophagenähnlichen Immunzellen differenzierten. Je nach Fragestellung können in dem neu etablierten Co-Kultur-Modell verschiedene Filterporengrößen und die Infektionsseite (apikal oder basal) variiert werden (Abbildung 14).

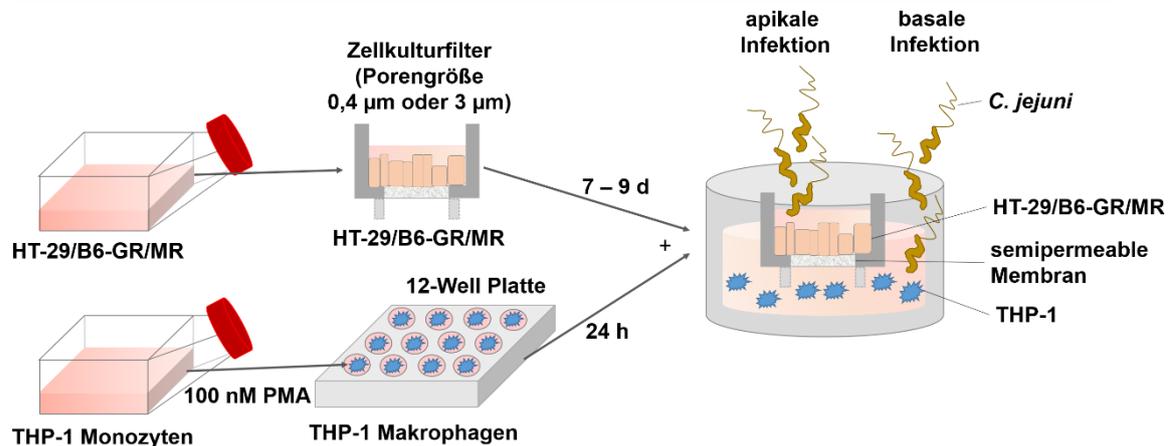


Abbildung 14: Experimentelles Setting des neu etablierten Co-Kultur-Modells mit HT-29/B6-GR/MR-Epithelzellen und THP-1-Immunzellen. Sowohl Epithel- als auch Immunzellen wurden für die kontinuierliche Kultivierung in Zellkulturflaschen kultiviert. Nach sieben bis neun Tagen wurden die konfluenten Epithelzellen aus den Zellkulturflaschen in Zellkulturfilter gesät und differenzierten dort zu polarisierten Monolayern aus. Die THP-1-Immunzellen wurden in 12-Well-Platten gesät und differenzierten mittels 100 nM Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) innerhalb von 24 Std. zu adhären-ten M1 makrophagenähnlichen Immunzellen. Nach der Differenzierung der Epithel- und Immunzellen wurde je ein Filter mit den Epithelzellen in ein Well der 12-Well-Platte positioniert, sodass im apikalen Kompartiment Epithelzellen und im basolateralen Kompartiment Immunzellen lokalisiert waren. Die Infektion mit *C. jejuni* erfolgte je nach Fragestellung entweder von apikal oder von basolateral 2 Std. nach dem Start der Co-Kultivierung (modifiziert nach Lobo de Sá *et al.* 2019).

Das neu etablierte Co-Kultur-Modell zeigte über einen Zeitraum von 48 Std. einen stabilen TER. Die schnellste und stärkste Barrierestörung konnte mit einer Filterporengröße von 3 µm und einer Infektion von apikal beobachtet werden (nachfolgend als Co-Kultur-Modell A bezeichnet), da dabei direkte bakterielle Barrierschäden synergistisch mit der Immunaktivierung wirken. Bei diesem Setting des Co-Kultur-Modells A reduzierte sich der TER in der Co-Kultur bereits nach 22 Std., wohingegen in derselben Zeit in der Epithelzell-

Monokultur kein negativer TER-Effekt bzw. sogar ein Anstieg des TER auf $116 \pm 3\%$ des initialen Wertes in der *C. jejuni*-Gruppe sichtbar war (Kontrolle vs. *C. jejuni*, $*P < 0,05$; Student's *t*-Test, $n = 3$) (Abbildung 15A). Mit der Verwendung einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ und einer Infektion von basal (Co-Kultur-Modell B), kann die Immunzellreaktion isoliert ohne die direkten Einflüsse des Bakteriums auf die epitheliale Barriere untersucht werden, da die Bakterien nicht in der Lage waren, durch die kleinen Poren zu migrieren und nicht an die basolateral lokalisierten Rezeptoren zur Invasion gelangen. Die Migration von lebenden Bakterien wurde durch das Ausplattieren des apikalen Überstandes auf Blutagarplatten überprüft und ausgeschlossen, da keine koloniebildenden Einheiten (KBE) nach 48 Std. in mikroaerober Atmosphäre wuchsen. In Anwesenheit der Makrophagen im Co-Kultur-Modell B reduzierte sich der TER auf $67 \pm 4\%$ (Abbildung 15B), wobei die hier verursachten Barriere-defekte nur auf die durch die *C. jejuni*-induzierte Immunantwort zurückzuführen sind.

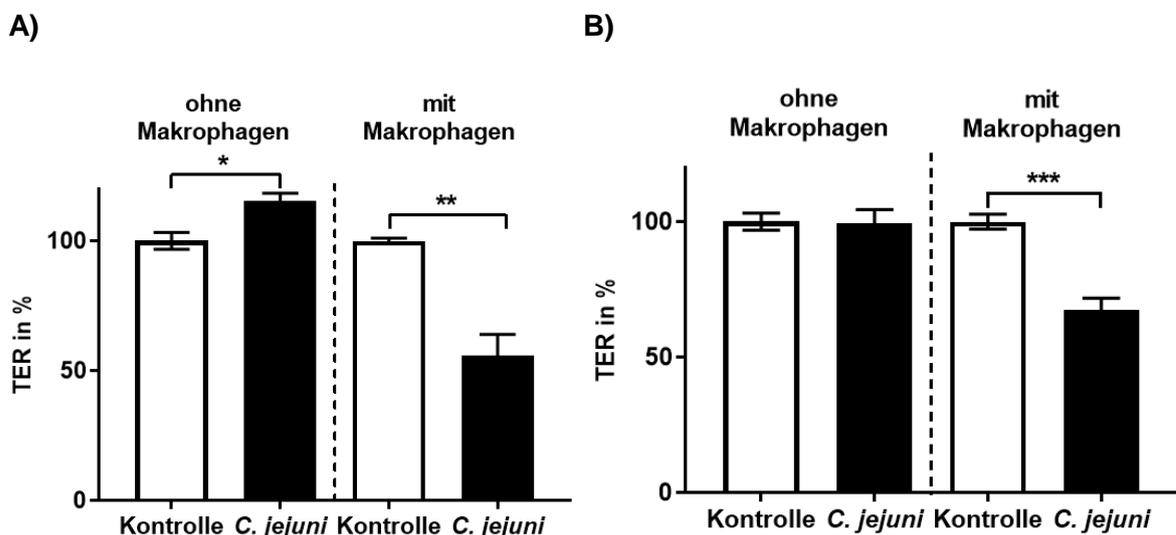


Abbildung 15: *Campylobacter jejuni*-Infektion von Epithelzell-Monokulturen (HT-29/B6-GR/MR) und von Co-Kulturen (HT-29/B6-GR/MR zusammen mit THP-1-Makrophagen). **A)** Transepithelialer elektrischer Widerstand (TER) in Bezug auf die Kontrolle 22 Std. nach der apikalen Infektion mit *C. jejuni* der Monokultur (ohne Makrophagen) und der Co-Kultur A (mit Makrophagen). Die Epithelzellen differenzierten dabei jeweils auf Filtern mit einer Porengröße von $3 \mu\text{m}$ ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$; Student's *t*-Test, $n = 3$). **B)** TER in Bezug auf die Kontrolle 48 Std. nach der basalen Infektion mit *C. jejuni* der Monokultur (ohne Makrophagen) und der Co-Kultur B (mit Makrophagen). Die Epithelzellen differenzierten dabei jeweils auf Filtern mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ ($***P < 0,001$; Student's *t*-Test, $n = 7 - 9$) (Lobo de Sá *et al.* 2019).

3.5 Protektive Wirkung von Curcumin auf die immunvermittelte *Campylobacter jejuni*-induzierte Barrierestörung *in vitro* und *in vivo*

Basierend auf der bioinformatischen Vorhersage der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten und der in der Literatur postulierten Barriere-protektiven und immunmodulatorischen Eigenschaften von Curcumin, wurde Curcumin im Hinblick auf die protektive Wirkung auf die *C. jejuni*-induzierte Barrierestörung untersucht. Diese Analyse erfolgte sowohl *in vitro* in dem neu etablierten Co-Kultur-Modell B als auch in dem *in vivo*-IL-10^{-/-}-Mausmodell.

3.5.1 Curcumin inhibiert den durch *Campylobacter jejuni*-vermittelten Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand

Um isoliert den Einfluss des Immunsystems auf die *C. jejuni*-induzierte Barrierestörung zu beleuchten, wurden die möglichen protektiven Eigenschaften von Curcumin unter Verwendung des Co-Kultur-Modells B (siehe Kapitel 3.4) charakterisiert. Durch den Einsatz dieses Modells können sowohl immunmodulatorische und antiinflammatorische als auch Barriere-protective Eigenschaften des Curcumins untersucht werden. Curcumin zeigte in der nachfolgend verwendeten Konzentration von 50 µM in Vorversuchen weder auf die Epithelzellen noch auf die Immunzellen zytotoxische Eigenschaften im CCK-8 Assay (Epithelzellen: Kontrolle 81 ± 4 % vs. Curcumin 66 ± 6 %, nicht signifikant; Immunzellen: Kontrolle 71 ± 11 % vs. Curcumin 57 ± 5 %, nicht signifikant; 1way ANOVA, n= 3 – 4) (Lobo de Sá *et al.* 2019). Für eine systemische Einschätzung der Effektivität von Curcumin bei einer *C. jejuni*-induzierten Gastroenteritis erfolgten zusätzlich *in vivo*-Infektionsexperimente am IL-10^{-/-}-Mausmodell.

Sowohl in dem Co-Kultur-Modell B (Abbildung 16A) als auch in den IL-10^{-/-}-Mäusen (Abbildung 16B) inhibierte die Curcumin-Behandlung die durch *C. jejuni*-induzierte Verringerung des epithelialen Widerstandes. So wurden in den Curcumin-behandelten Mäusen epitheliale Widerstände erreicht, welche vergleichbar mit den Werten der Kontrollgruppen waren.

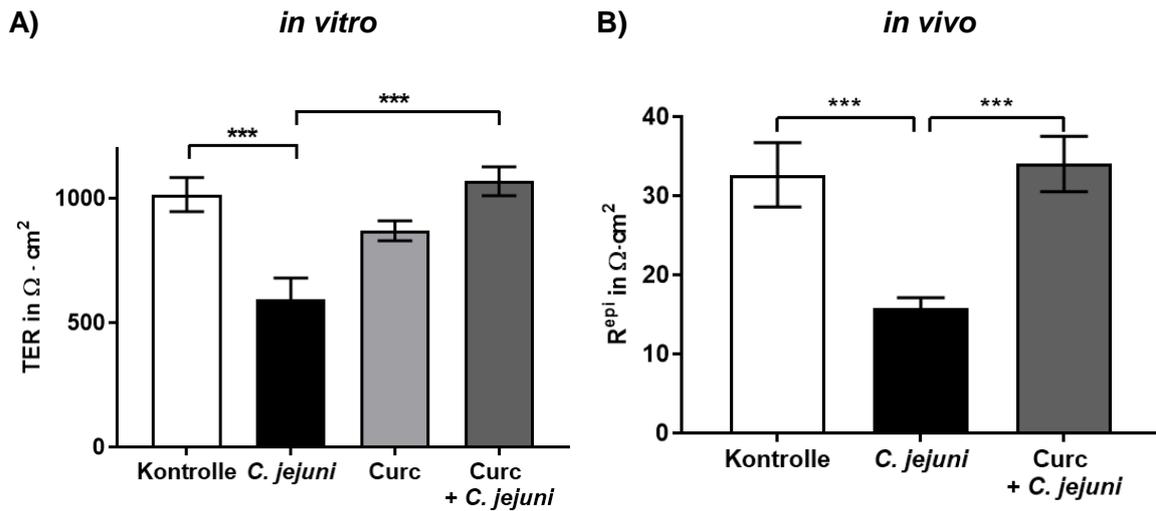


Abbildung 16: Curcumin inhibiert den durch *Campylobacter jejuni*-induzierten Barrieredefekt *in vitro* und *in vivo*. **A)** Die Behandlung mit 50 μM Curcumin (Curc) der Co-Kultur erfolgte *in vitro* sowohl in dem apikalen als auch in dem basalen Kompartiment 2 Std. vor der basalen Infektion mit *C. jejuni*. 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) gemessen ($***P < 0,001$; 1way ANOVA, $n = 13$) (Lobo de Sá *et al.* 2019). **B)** Kolongewebe von *C. jejuni*-infizierten IL-10^{-/-}-Mäusen und von Curcumin-behandelten Tieren wurde in der Ussingkammer mittels Impedanztechnik untersucht und der epitheliale Widerstand (R^{epi}) mithilfe eines Oberflächenkorrekturfaktors ermittelt ($***P < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test, $n = 5 - 18$). Exemplarische HE-Färbungen hierzu befinden sich im Anhang in Abbildung 27.

3.5.2 Curcumin stärkt die epitheliale Barriere belegt durch eine Verringerung der Permeabilität für Fluorescein

Permeabilitätsuntersuchungen spiegeln die Durchlässigkeit von Gewebe gegenüber kleineren Markermolekülen wider. Der parazelluläre Fluxmarker Fluorescein wurde zur Permeabilitätsmessung verwendet. Im Vergleich zu den Kontrollen verdoppelte sich die Permeabilität für Fluorescein nach der Infektion mit *C. jejuni* sowohl in dem Co-Kultur-Modell B (Abbildung 17A) als auch in dem IL-10^{-/-}-Mausmodell (Abbildung 17B). *In vitro* zeigte die uninfizierte Curcumin-Kontrollgruppe bereits einen Trend zur Reduktion der Permeabilität im Vergleich zur unbehandelten und uninfizierten Kontrollgruppe (Kontrolle $1 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s vs. Curcumin $0,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s, nicht signifikant; 1way ANOVA, $n = 7 - 8$). Unter der Curcumin-Gabe verringerte sich die durch die *C. jejuni*-Infektion erhöhte Permeabilität für Fluorescein in beiden Modellen unter das Kontrollniveau, sodass es sogar zu einer Verstärkung der epithelialen Barriere kam.

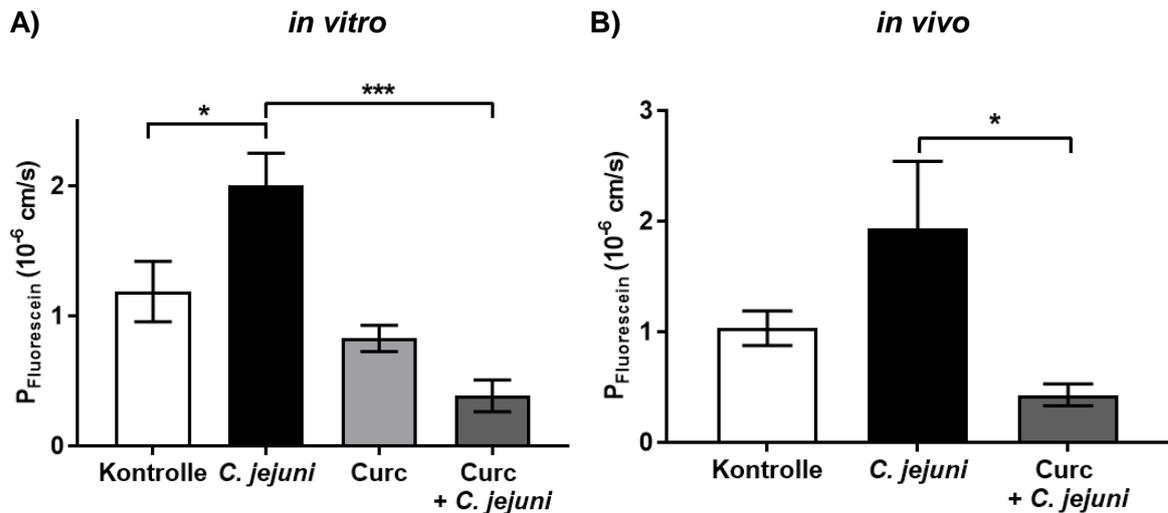
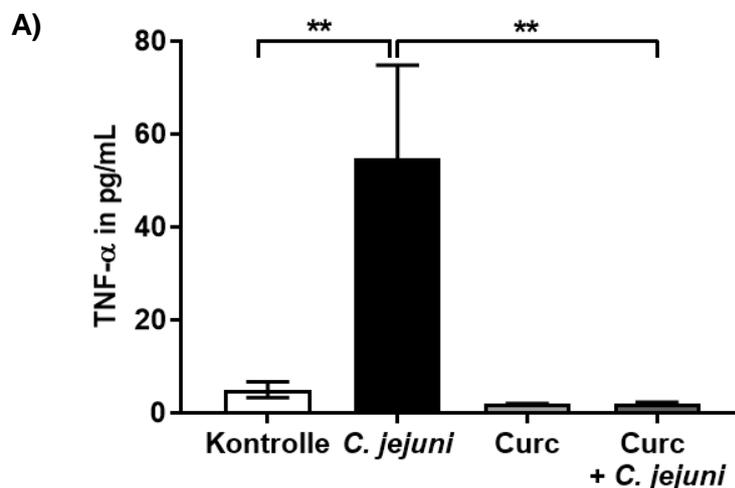


Abbildung 17: Curcumin verbessert die *Campylobacter jejuni*-induzierte Erhöhung der Permeabilität für Fluorescein. A) Die Co-Kultur wurde mit 50 μ M Curcumin (Curc) beidseitig behandelt und nach 2 Std. mit *C. jejuni* von basal infiziert. 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* wurde die Permeabilität für Fluorescein (332 Da) ermittelt (* P <0,05, *** P <0,001; 1way ANOVA, n = 7 – 8) (Lobo de Sá *et al.* 2019). **B)** In Ussingkammern wurde die Permeabilität für Fluorescein im Kolongewebe *C. jejuni*-infizierter und Curcumin-behandelter IL-10^{-/-}-Mäuse gemessen (* P <0,05; Mann-Whitney-U-Test, n = 4 – 14) (Lobo de Sá *et al.* 2019).

3.5.3 Curcumin reduziert die *Campylobacter jejuni*-induzierte Immunantwort

Um zu definieren, welche Zytokine für die Barrierestörung in dem Co-Kultur-Modell B verantwortlich sind, wurden mithilfe des Cytometric Bead Arrays (CBA) die sezernierten Zytokine im Kulturüberstand 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* quantifiziert. Dabei stieg der Gehalt an den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α (Abbildung 18A), IL-1 β (Abbildung 18B) und IL-6 (Abbildung 18C) durch die Infektion mit *C. jejuni* an. Durch die Zugabe von Curcumin reduzierte sich die Zytokinausschüttung von allen drei Zytokinen. Bei TNF- α und IL-1 β wurde dabei das Kontrollniveau wieder erreicht und der IL-6-Anstieg halbierte sich.



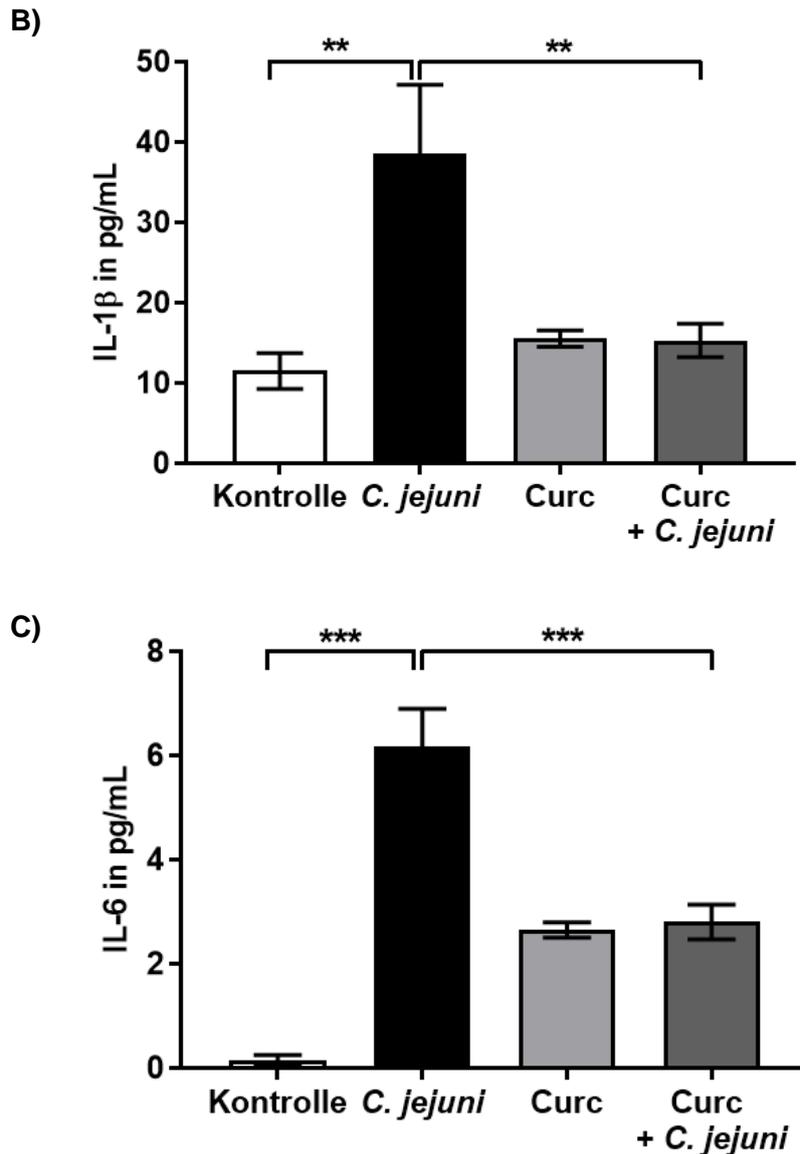


Abbildung 18: Zytokinsekretion der Co-Kultur nach *Campylobacter jejuni*-Infektion und Curcumin-Behandlung. 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* und der beidseitigen Behandlung mit 50 μ M Curcumin (Curc) wurden die proinflammatorischen Zytokine **A)** TNF- α , **B)** IL-1 β und **C)** IL-6 im Kulturüberstand des Co-Kultur-Modells B mittels Cytometric Bead Array und Durchflusszytometrie quantifiziert (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; 1way ANOVA, $n = 5 - 6$) (Lobo de Sá *et al.* 2019).

Weitere hier quantifizierte Zytokine wie IL-2, IL-10, IL-13, IL17A und IFN- γ zeigten keine Veränderung nach der Infektion mit *C. jejuni* (siehe Anhang Abbildung 28).

Vergleichbare Ergebnisse auf RNA-Expressionsebene lieferte die RNA-Sequenzierung der Epithelzellen aus dem Co-Kultur-Experiment für TNF- α , für das die Genexpression nach der *C. jejuni*-Infektion anstieg und sich unter Curcumin-Gabe wieder auf das Basislevel reduzierte (Kontrolle 55 ± 9 Counts per Million (CpM) vs. *C. jejuni* 316 ± 101 CpM, * $P < 0,05$ und *C. jejuni* 316 ± 101 CpM vs. Curcumin + *C. jejuni* 49 ± 9 CpM, * $P < 0,05$; 1way ANOVA, $n = 2 - 3$). Diese Daten stammen aus einer RNA-Seq der *C. jejuni*-infizierten Curcumin-behandelten Co-Kultur B, die in Kapitel 3.5.8 weiter präsentiert werden.

3.5.4 Einfluss von *Campylobacter jejuni* und Curcumin auf die Expression von *Tight Junction*-Proteinen

Um den Einfluss der *C. jejuni*-Infektion und der Curcumin-Behandlung auf die Expression verschiedener TJ-Proteine zu analysieren, wurden Zelllysate der Epithelzellen aus der infizierten und mit Curcumin-behandelten Co-Kultur präpariert. Die Proteinexpressionsänderung wurde mittels densitometrischer Analyse des Western Blots unter Normalisierung gegen β -Aktin quantifiziert (Abbildung 19). In der *C. jejuni*-infizierten Co-Kultur kam es lediglich zu einer Erhöhung der Claudin-1-Expression. Die Curcumin-Behandlung reduzierte die Claudin-1-Proteinexpression tendenziell. Dies konnte auch auf RNA-Ebene beobachtet werden (Kontrolle 347 ± 45 CpM vs. *C. jejuni* 1405 ± 114 CpM, $***P < 0,001$ und *C. jejuni* 1405 ± 114 CpM vs. Curcumin + *C. jejuni* 855 ± 22 CpM, $***P < 0,001$; 1way ANOVA, $n = 2 - 3$). Alle anderen untersuchten TJ-Proteine zeigten keine Proteinexpressionsänderung und zwar weder nach der Infektion noch nach der Curcumin-Behandlung. Mit einer statistischen Auswertung mittels Student's *t*-Test konnte eine Reduktion nach *C. jejuni*-Infektion für die Claudin-8-Proteinexpression beobachtet werden (Kontrolle vs. *C. jejuni*, $*P < 0,05$; Student's *t*-Test, $n = 7 - 9$).

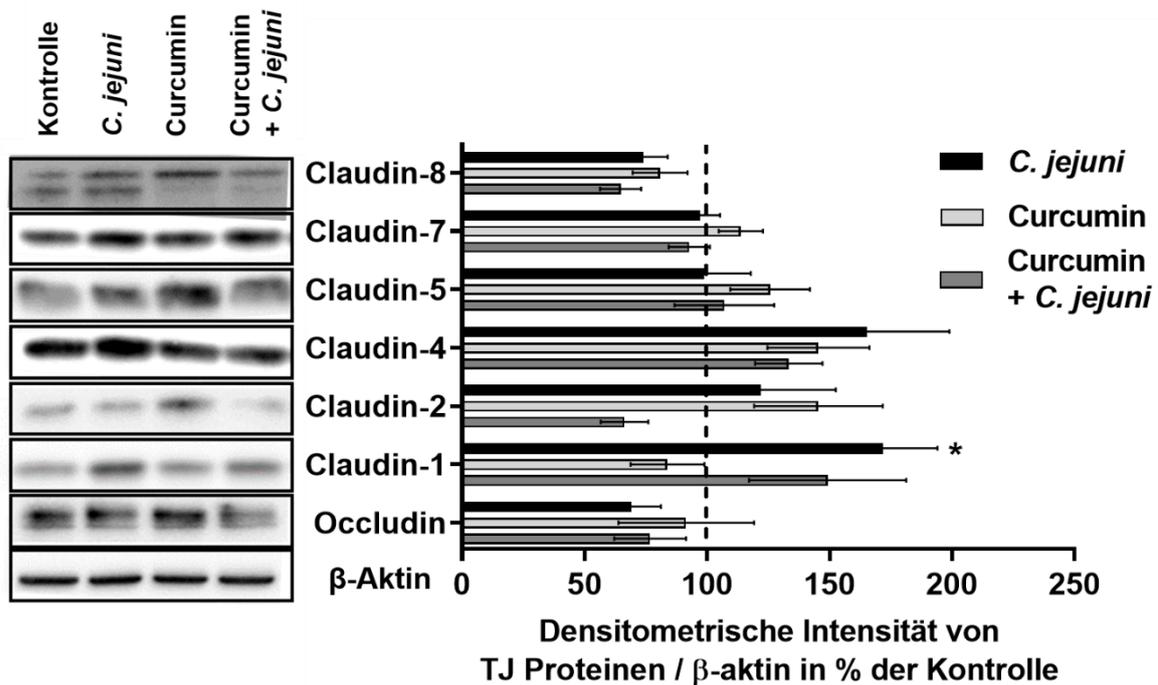


Abbildung 19: *Tight Junction*-Proteinexpression der Epithelzellen aus der Co-Kultur. Repräsentative Western Blots und densitometrische Analyse der *C. jejuni*-infizierten und mit 50 μ M Curcumin-behandelten Co-Kulturen. Die TJ-Proteinexpression wurde mittels β -Aktin normalisiert. Der Kontrollwert der unbehandelten und uninfizierten Zellen wird als gestrichelte Linie bei 100 % dargestellt ($*P < 0,05$; 2way ANOVA, $n = 6 - 9$) (modifiziert nach Lobo de Sá *et al.* 2019).

Darüber hinaus wurden Proteinpräparationen aus Kolongewebe infizierter und Curcumin-behandelter IL-10^{-/-}-Mäuse für Western Blots hergestellt und die Expression der TJ-Proteine analysiert (Abbildung 20). Im Tiermodell zeigten alle getesteten TJ-Proteine eine Herunterregulation der Expression. Jedoch waren vor allem Occludin, Claudin-1, Claudin-5 und Claudin-7 quantitativ von der Herabregulation betroffen. Die Curcumin-Behandlung führte zu einer tendenziellen Normalisierung der TJ-Proteinexpression (Abbildung 20).

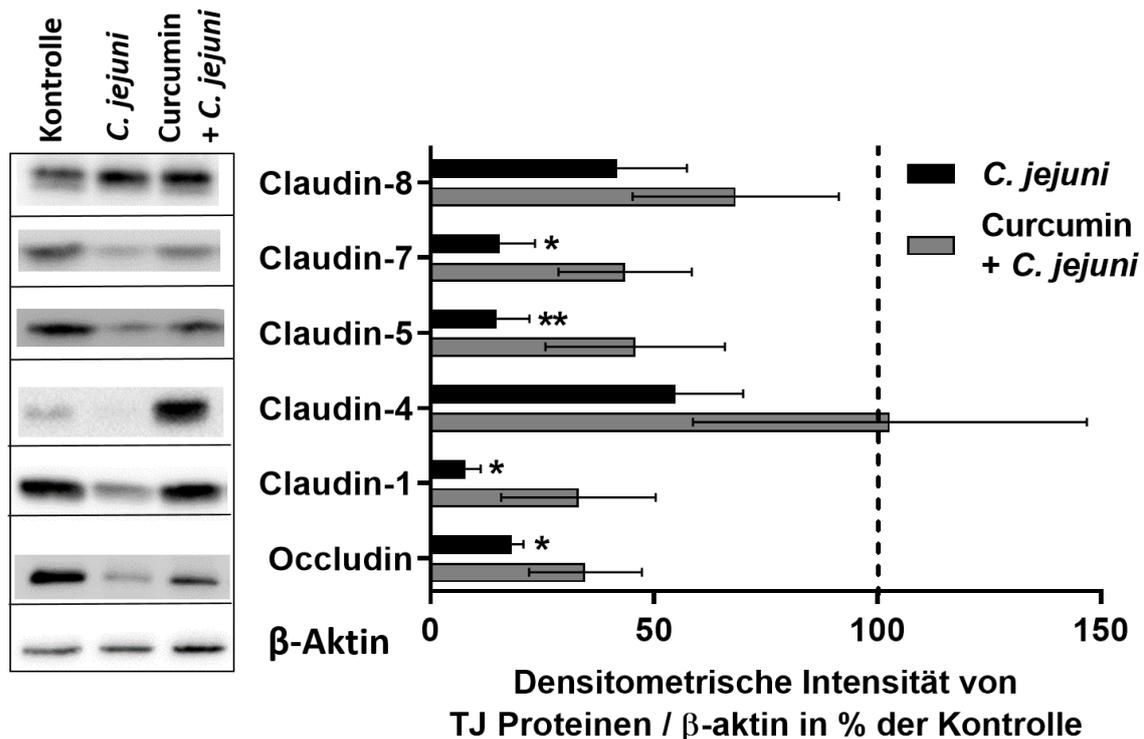


Abbildung 20: Tight Junction-Proteinexpression im Kolongewebe von IL-10^{-/-}-Mäusen. Sekundär abiotische IL-10^{-/-}-Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit *C. jejuni* infiziert und erhielten Curcumin über das Trinkwasser. Sechs Tage nach der Infektion erfolgte die Organentnahme. Kolongewebe wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Proteine isoliert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots und die densitometrische Analyse der *C. jejuni* infizierten und Curcumin-behandelten IL-10^{-/-}-Mäusen. Die TJ-Proteinexpression wurde gegen β-Aktin normalisiert. Der Kontrollwert unbehandelter uninfizierter Kolonproben ist als gestrichelte Linie bei 100 % dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; Kruskal-Wallis-Test, $n = 4 - 5$).

3.5.5 Einfluss von *Campylobacter jejuni* und Curcumin auf die Lokalisation von Tight Junction-Proteinen

Da neben der Proteinexpression insbesondere die Lokalisation der TJ-Proteine in der TJ-Domäne für die Barrierefunktion funktionell maßgeblich ist, wurde die subzelluläre Verteilung von Claudinen im CLSM untersucht. Dabei wurden Z-Stacks (Z-Ebenen der X- und Y-Scans) und darin Intensitäts-Abstands-Plots der *C. jejuni*-infizierten und Curcumin-behandelten Epithelzellen aus der Co-Kultur erstellt. Nach der Infektion mit *C. jejuni* kam es ins-

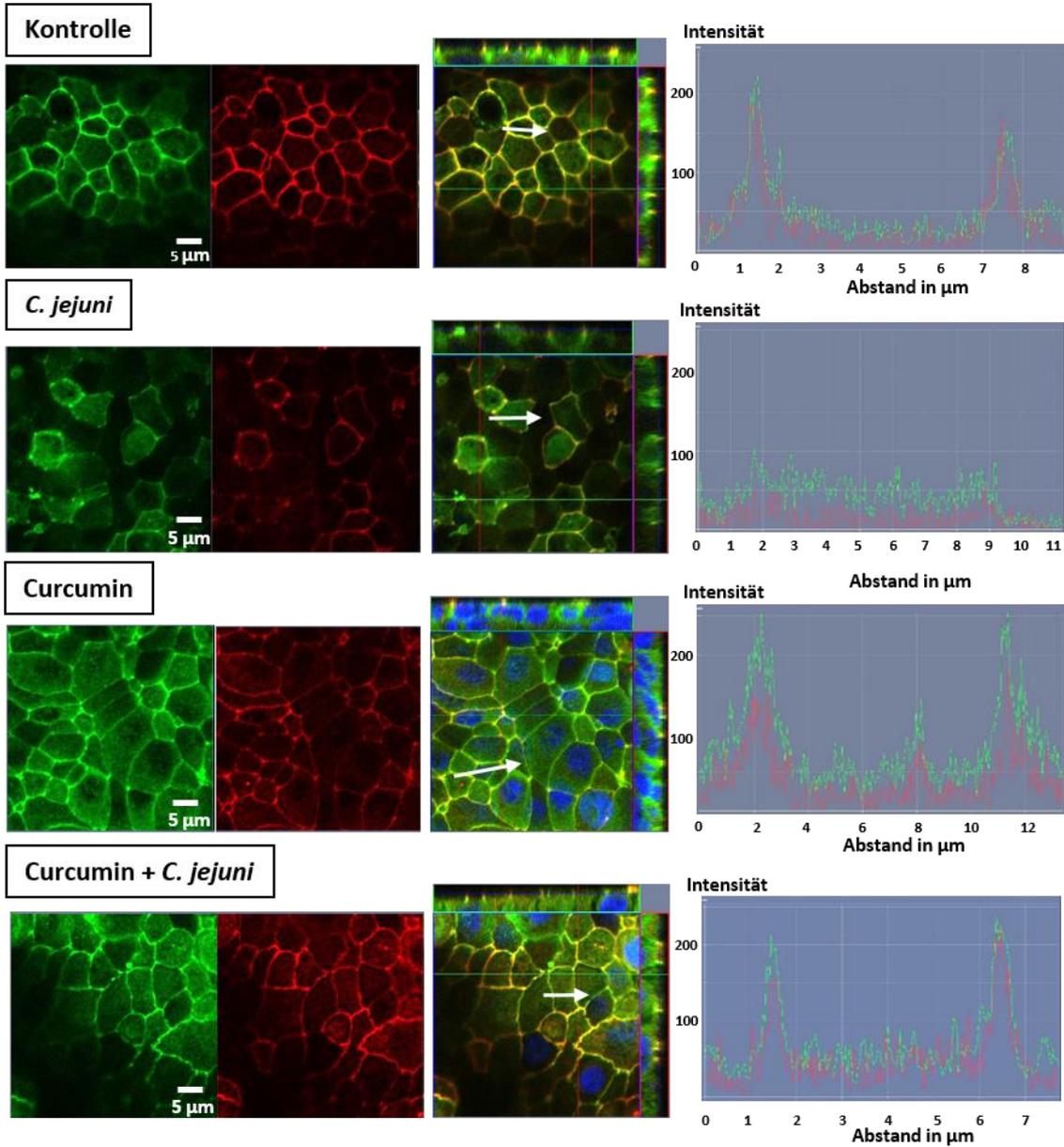
besondere bei Claudin-4 (Abbildung 21A) und Claudin-8 (Abbildung 21B) zu einer Umverteilung der TJ-Proteine nach intrazellulär. Dies wird durch die Intensitäts-Abstands-Plots verdeutlicht. Hier zeigte sich eine intrazellulär höhere Hintergrundintensität bei verminderten Signalstärken über der TJ-Domäne. Das Signal von Claudin-4 bzw. Claudin-8 nach der *C. jejuni*-Infektion zeigte sich nicht mehr mit dem akzessorischen TJ-Protein ZO-1 co-lokalisiert. Nach der Behandlung mit Curcumin erschien sowohl Claudin-4 als auch Claudin-8 wieder in der TJ-Region, sodass die Co-Lokalisation durch ein gelbes Überlagerungssignal (merge) deutlich wurde. Zusätzlich konnten in der TJ-Domäne wieder vergleichbar hohe Peak-Intensitäten wie in der Kontrolle beobachtet werden. Die Curcumin-Kontrollgruppe zeigte weder einen Einfluss auf die Lokalisation noch auf die Signal-Intensität der dargestellten TJ-Proteine.

A)

Claudin-4

ZO-1

merge



B)

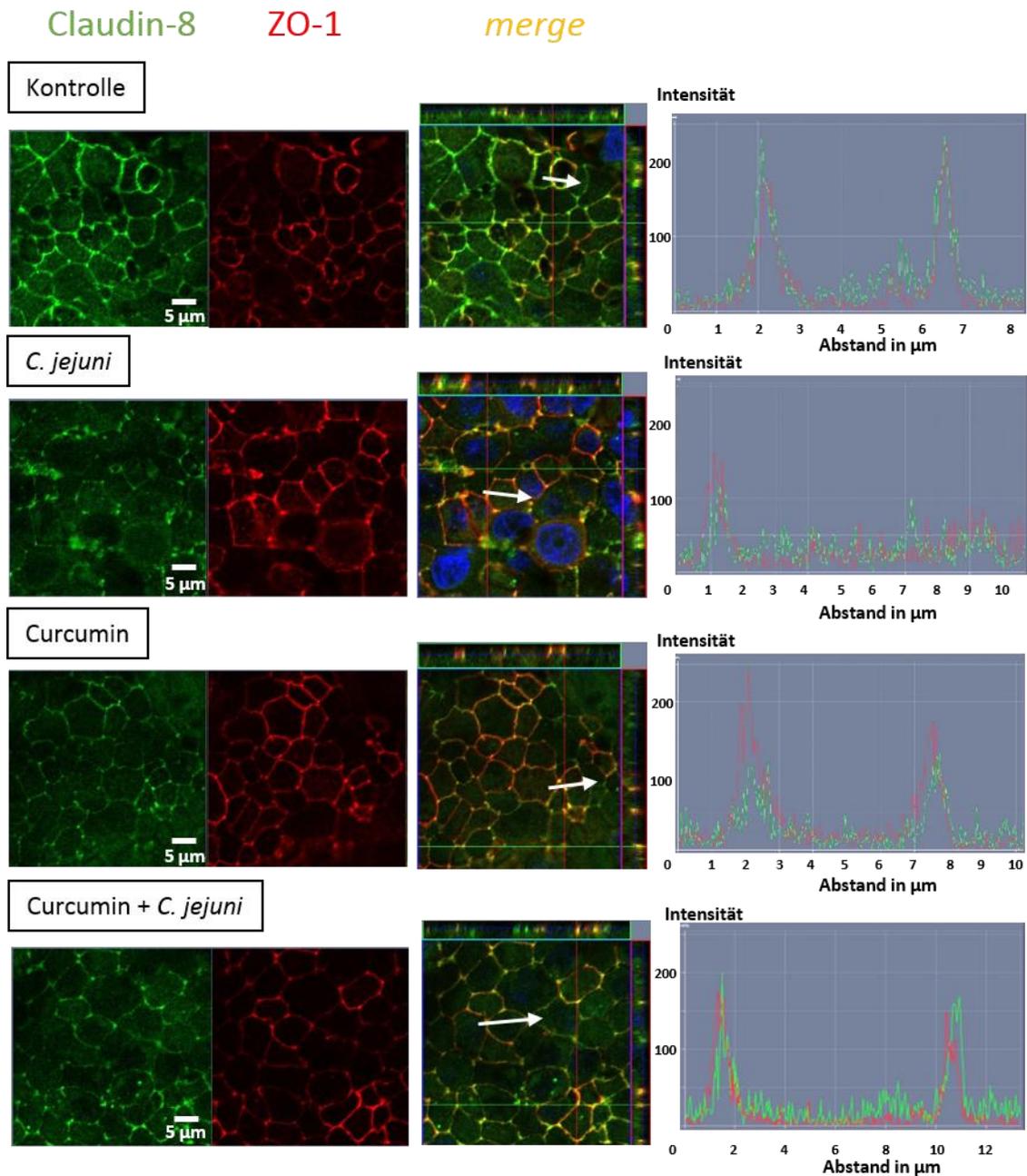
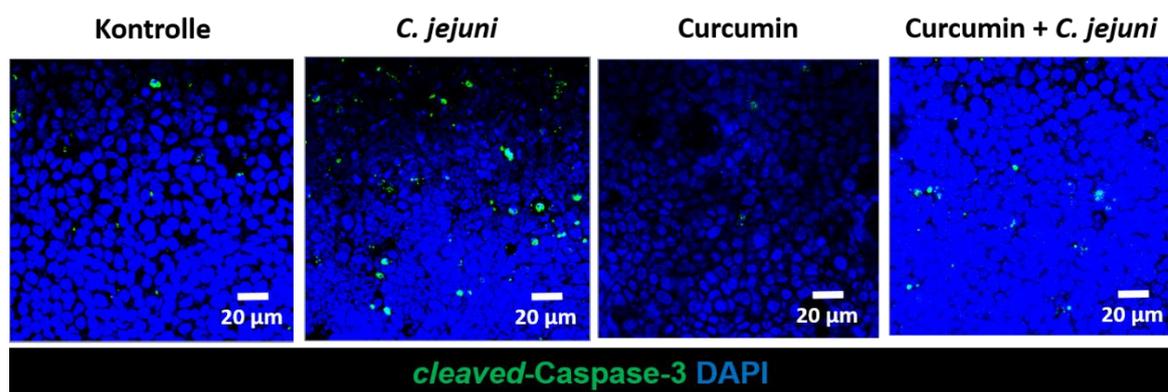


Abbildung 21: Claudin-Verteilung in der Co-Kultur nach *Campylobacter jejuni*-Infektion und Curcumin-Behandlung. Dargestellt sind repräsentative CLSM Bilder (links), Z-Stacks (mitte), sowie Intensitäts-Abstands-Plots (rechts; Intensität: Y-Achse; Abstand in μm : X-Achse) von Epithelzellen aus der Co-Kultur B nach Infektion mit *C. jejuni* und Curcumin-Behandlung. Die weißen Pfeile in den Z-Stacks zeigen den Bereich des gemessenen Intensitäts-Abstands-Plots. Immunfluoreszenzfärbung der Epithelzellen wurden zuvor mit Antikörpern gegen **A**) Claudin-4 (grün) bzw. **B**) Claudin-8 (grün) und ZO-1 (rot) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mithilfe von 4'-6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) blau gefärbt (modifiziert nach Lobo de Sá *et al.* 2019).

3.5.6 Wirkung von *Campylobacter jejuni* und Curcumin auf die Apoptose-Induktion

Da die im Western Blot und die im CLSM beobachteten Defekte möglicherweise nicht allein für die resultierende Barrierestörungen verantwortlich sein können, wurde der Anteil der Apoptose-Ereignisse untersucht, da Apoptose-Events auch Barriere-relevant sein können. Apoptosen wurden als ein wichtiger Pathomechanismus bei der *C. jejuni*-Infektion postuliert. Zur Detektion von Apoptosen wurden die Epithelzellen der Co-Kultur B mit Antikörpern gegen *cleaved*-Caspase-3 gefärbt und anschließend mittels CLSM visualisiert (Abbildung 22A). Die Apoptosen wurden gezählt und in das Verhältnis zu der Gesamtanzahl der Zellen in einem Bildausschnitt gesetzt (Abbildung 22B). Dabei wurde eine Verdreifachung der Apoptose-Events 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* gemessen (Kontrolle $0,8 \pm 0,4$ % vs. *C. jejuni* $3,0 \pm 0,4$ %, $***P < 0,001$; 1way ANOVA, $n = 6$). Die Curcumin-Behandlung inhibierte die durch *C. jejuni*-induzierte Apoptose-Induktion (Abbildung 22), sodass die Ausbildung des Apoptose-abhängigen Leckflux-Mechanismus inhibiert werden konnte.

A)



B)

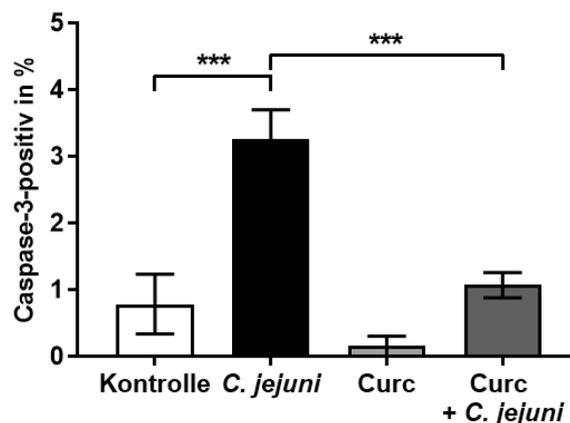


Abbildung 22: Apoptose-Induktion in *Campylobacter jejuni*-infizierten Co-Kulturen. Die Epithelzellen der Co-Kulturen wurden 48 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni* und der Behandlung mit 50 µM Curcumin mit Antikörpern gegen *cleaved*-Caspase-3 zur Visualisierung der apoptotischen

Zellen (grün) und mit 4'-6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) für die Zellkerne blau gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels CLSM. **A)** Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung der Epithelzellen aus Co-Kulturen nach der Infektion mit *C. jejuni* und der Curcumin-Behandlung. **B)** Caspase-3-positive Zellen wurden in Relation zur Gesamtzellzahl innerhalb eines Bildausschnittes gesetzt und so der prozentuale Anteil an Apoptosen bestimmt ($***P<0,001$; 1way ANOVA, $n=6$) (Lobo de Sá *et al.* 2019).

Ferner wurden Inhibitorversuche mit dem Pan-Caspase Inhibitor Q-VD-Oph in der Co-Kultur B durchgeführt, um den relativen Anteil der Apoptosen an der beobachteten Barriere-störung zu ermitteln (Abbildung 23). Die Behandlung mit Q-VD-Oph führte bereits zu einem Anstieg des TER auf 147 ± 10 % (Kontrolle 100 ± 5 % vs. Q-VD-Oph 147 ± 10 %, $*P<0,05$; 1way ANOVA, $n=3-5$). Die Behandlung mit Q-VD-Oph der mit *C. jejuni*-infizierten Zellkulturen ließ den TER auf 80 ± 11 % wieder ansteigen (*C. jejuni* 9 ± 5 % vs. Q-VD-Oph + *C. jejuni* 80 ± 11 %, $**P<0,01$; 1way ANOVA, $n=3-5$) (Abbildung 23A).

Neben dem TER wurde auch die Permeabilität des Markermoleküls Fluorescein untersucht, um Undichtigkeiten des parazellulären Weges darzustellen. Die Infektion mit *C. jejuni* verursachte eine Verdreifachung der Permeabilität für Fluorescein. Dieser Anstieg konnte durch die Behandlung mit Q-VD-Oph aufgehoben werden (Abbildung 23B).

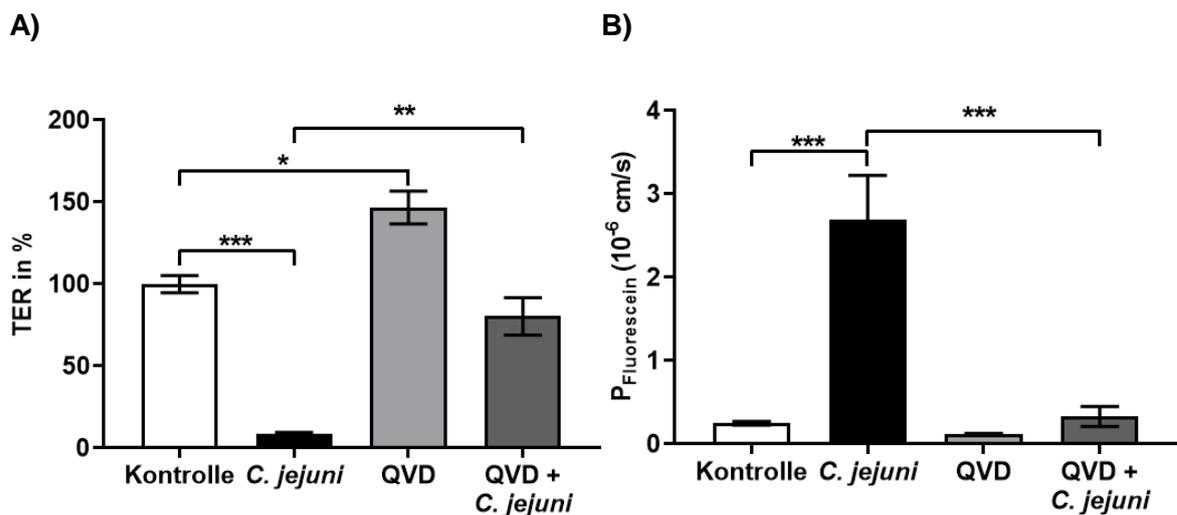


Abbildung 23: Barriere-relevante Apoptose-Induktion durch die *Campylobacter jejuni*-Infektion. Der inhibitorische Effekt von $10 \mu\text{M}$ Q-VD-Oph in *C. jejuni*-infizierten Co-Kulturen des Modells B ist sowohl bei dem **A)** transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) als auch bei der **B)** Permeabilität für Fluorescein (332 Da) 48 Std. nach der basalen Infektion zu beobachten ($*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$; 1way ANOVA, $n=3-5$).

3.5.7 Rolle des NF κ B-Signalweges hinsichtlich der Barrierefunktion

Da der NF- κ B-Signalweg eine zentrale Rolle bei der *Campylobacter jejuni*-Infektion zu spielen scheint, wurde die Relevanz des NF- κ B-Signalweges im Zusammenhang mit dem Erhalt der Barrierefunktion untersucht. Dafür wurde die *C. jejuni*-infizierte Co-Kultur B mit dem

NF- κ B-Inhibitor BAY 11-7082 (BAY) behandelt. BAY inhibierte die *C. jejuni*-vermittelte TER-Reduktion, sodass der Widerstand eindrucksvollerweise das Kontroll-Level erreichte (Abbildung 24A) und verhinderte ebenso einen Anstieg der Permeabilität für Fluorescein (Abbildung 24B).

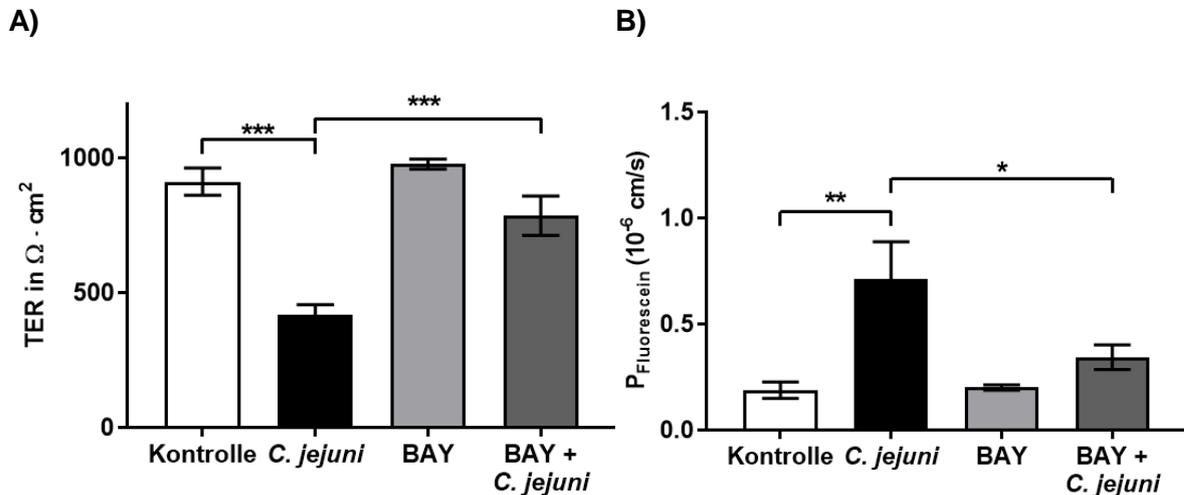


Abbildung 24: Der NF- κ B-Signalweg ist Barriere-relevant. Der inhibitorische Effekt von 10 μM BAY 11-7082 (BAY) in *C. jejuni*-infizierten Co-Kulturen des Modells B ist sowohl bei dem **A)** transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) als auch bei der **B)** Permeabilität von Fluorescein (332 Da) messbar (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; 1way ANOVA, $n = 5$) (Lobo de Sá *et al.* 2019).

3.5.8 RNA-Sequenzierungsanalyse mit *Ingenuity Pathway Analysis*

Um weitere Expressionsdaten auf RNA-Ebene zur *C. jejuni*-Infektion sowie der Behandlung mit Curcumin zu erhalten, wurden die infizierten Epithelzellen der Co-Kultur B mittels RNA-Sequenzierungsanalyse und einer nachgeschalteten bioinformatischen Signalwegsanalyse (IPA) tiefer charakterisiert. Mithilfe der IPA können u. a. kausale Netzwerkanalysen (Identifikation von Upstream-Molekülen, welche die Genexpression kontrollieren), Vergleichsanalysen (Visualisierung von kanonischen Signalwegen) oder aber auch Upstream-Regulator-Analysen (bioinformatische Vorhersage möglicher Upstream-Moleküle, welche eine veränderte Genexpression hervorrufen können) erstellt werden.

Wie auch in den *C. jejuni*-infizierten Patienten-Proben (vgl. Tabelle 9, Kapitel 3.2) konnten in der *C. jejuni*-infizierten Co-Kultur LPS, IFN- γ , IL-6, TNF- α und IL-1 β als Top-Upstream-Regulatoren identifiziert werden (Tabelle 11). Des Weiteren tauchen auch in dieser Analyse die potenziellen protektiven Kandidaten Resveratrol und Curcumin aus Kapitel 3.2 auf.

Tabelle 11: Upstream-Regulator-Analyse mittels IPA von Epithelzellen aus der *Campylobacter jejuni*-infizierten Co-Kultur.

Upstream-Regulator	Aktivations Z-score	P-Wert der Überlappung	Target Moleküle im Dataset
LPS	1,026	5,96E-29	AGT,ALOX5AP,APOC1,APOE,...
IFNG	-1,392	1,35E-27	A2M,AGT,ALDH1A3,ALOX5AP,...
TNF	-0,485	6,73E-27	A2M,AGT,ALDH1A3,ALOX5AP,...
IL-1B	0,315	1,16E-14	A2M,APOE,BCL2A1,BMP2,...
IL-6	0,867	7,49E-11	A2M,AGT,ANPEP,APOE,...
Curcumin	-1,373	3,35E-06	APOE,AQP1,CCL5,CD36,...

IFNG: Interferon Gamma; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; TNF: Tumor Nekrosefaktor

Auch die mit 50 µM Curcumin behandelten Epithelzellen aus der *C. jejuni*-infizierten Co-Kultur wurden mittels IPA analysiert und eine Upstream-Regulator-Analyse durchgeführt (Tabelle 12). Es wurde davon ausgegangen, dass die Zugabe der potenziellen protektiven Kandidaten die vorhergesagte Inhibition gegenregulieren oder aufheben würde. Diese Gegenregulierung konnte in der IPA dann auch tatsächlich nachgewiesen werden, sodass die *in vitro*-Daten, die *in vivo* gewonnen Daten nicht nur widerspiegeln, sondern die Effektivität des Substanzkandidaten Curcumin direkt bestätigen. Durch die Zugabe von Curcumin zur Behandlung der *C. jejuni*-Infektion wird aus dem negativen Aktivations Z-Score von -1,373 (siehe Tabelle 11) ein positiver Wert von 0,858 für Curcumin (siehe Tabelle 12). Zudem erhöht sich der P-Wert der Überlappung in allen aufgeführten Upstream-Regulatoren durch die Behandlung mit Curcumin. Aber auch die Z-Scores der proinflammatorischen Zytokine werden negativer und die P-Werte verringern sich (Tabelle 12), was für die antiinflammatorische Wirkung von Curcumin sprechen könnte.

Tabelle 12: Upstream-Regulator-Analyse mittels IPA von Epithelzellen aus der *Campylobacter jejuni*-infizierten mit 50 µM Curcumin behandelten Co-Kultur.

Upstream-Regulator	Aktivations Z-score	P-Wert der Überlappung	Target Moleküle im Dataset
IL1B	-2,092	3,54E-14	<i>ACHE, BAMBI, CFTR, CHI3L1,...</i>
LPS	-1,202	5,56E-14	<i>ABCB1, ALDH3A1, BAG3, BAMBI,...</i>
IFNG	-2,526	1,22E-10	<i>ABCB1, CCL26, CFTR, CP,...</i>
TNF	-2,653	2,24E-10	<i>ALDH3A1, BAMBI, CCL26, CFTR,...</i>
IL6	-0,982	6,77E-08	<i>ACVRL1, BAMBI, CLU, COL2A1,...</i>
Curcumin	0,858	4,07E-03	<i>ABCB1, DNAJB1, EGR1, FOSB,...</i>

IFNG: Interferon Gamma; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; TNF: Tumor Nekrosefaktor

4 Diskussion

Campylobacter jejuni-Infektionen stellen weltweit die häufigste Ursache für lebensmittelbedingte Gastroenteritiden dar und können zu Folgeerkrankungen wie postinfektiösem Reizdarmsyndrom, infektreaktiver Arthritis oder einem Guillain-Barré-Syndrom führen. Trotz der intensiven Forschung zur Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der *Campylobacteriose* sind diese bisher nicht aufgeklärt. Nicht zuletzt hierdurch ist auch die Entwicklung geeigneter präventiver und therapeutischer Maßnahmen erschwert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung zweier verschiedener natürlich vorkommender Polyphenole als mögliche Substanzen zur Bekämpfung der *Campylobacter jejuni*-Infektion: zum einen Resveratrol, welches überwiegend in Rotwein vorkommt, und zum anderen Curcumin, welches aus der Pflanze *Curcuma longa* extrahiert wird. Beide Substanzen wurden sowohl in *in vitro*-Modellen als auch in dem *in vivo*-IL-10^{-/-}-Mausmodell auf ihr Potenzial, *Campylobacter jejuni*-induzierte Barrierestörungen zu inhibieren, analysiert und stellen vielversprechende Prophylaxe- oder sogar Therapieoptionen sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin dar.

4.1 *Campylobacter jejuni* induziert intestinale Barrierestörungen

Die intestinale epitheliale Barriere grenzt den Organismus von pathogenen Einflüssen des Lumens ab. Gelangen jedoch pathogene Bakterien, wie *C. jejuni* in den Gastrointestinaltrakt, können diese die Barriere schädigen, indem sie die Expression oder Lokalisation abdichtender TJ-Proteine verändern oder Apoptosen induzieren, wodurch ein vermehrter Efflux von Elektrolyten und Wasser ausgelöst wird, was zu wässrigen oder zum Teil auch blutigen Durchfällen führen kann (Skirrow 1994, Bückner *et al.* 2018). Letztere werden durch den vermehrten Influx von Antigenen über die geschwächte epitheliale Barriere als inflammatorischer Potentiator begünstigt (Gitter *et al.* 2000a, Schulzke *et al.* 2006, Bückner *et al.* 2018).

Für die Untersuchung der direkt durch *C. jejuni*-verursachten Barrierestörungen kamen verschiedene epitheliale Zelllinien zum Einsatz. Abhängig von der Zelllinie und den experimentellen Infektionsbedingungen war *C. jejuni* unterschiedlich effektiv in der Lage, Barrierestörungen – gemessen auf TER-Ebene und somit der Permeabilität für Ionen – zu induzieren. Während sich der Widerstand von Caco-2D- und Caco-2BBE-Zellen erst 90 Std. nach der Infektion verringerte, reduzierte sich der Widerstand von T84-Zellen bereits 20 Std. nach der Infektion mit *C. jejuni*. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Arbeiten überein, bei denen Caco-2-Zellen bis dahin keine bis allenfalls leichte Abnahmen des TER 8 Std. nach

der *C. jejuni*-Infektion zeigten, obwohl die Bakterien nach wenigen Stunden in dem basolateralen Kompartiment nachweisbar waren und somit die Epithelzellen schnell durchwandert hatten (Konkel *et al.* 1992, Brás und Ketley 1999). Dieser TER-Effekt war sowohl in Caco-2- als auch in T84-Zellen von einer Occludinumverteilung begleitet (MacCallum *et al.* 2005, Chen *et al.* 2006). Diese Occludinspaltung basiert auf der *C. jejuni*-vermittelten HtrA-Sekretion, welche sowohl in Caco-2-Zellen als auch in humanen Kolonbiopsien beobachtet werden konnte (Harrer *et al.* 2019). In unserem HT-29/B6-Modell konnte keine Occludinspaltung auf Proteinebene nach der Infektion mit *C. jejuni* beobachtet werden. Neben der Occludinspaltung induzierte *C. jejuni* zudem auch die Spaltung des *Adherence Junction* Proteins E-Cadherin in nicht-polarisierenden INT-407- und polarisierenden MKN-28-Zellen durch die sezernierte Serinprotease HtrA, welche nicht durch eine TER-Reduktion begleitet wurde (Boehm *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu zeigten *C. jejuni*-infizierte T84- und MDCK-1-Zellen auch in anderen Studien eine Reduktion im TER (Wine *et al.* 2008). Gleichzeitig zur Reduktion im TER kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer erhöhten Permeabilität für Fluorescein (332 Da) und somit zu einer erhöhten parazellulären Durchlässigkeit gegenüber größeren Molekülen sowohl im epithelialen Monokultur-Modell als auch im Co-Kultur-Modell mit Immunzellen. Gesteigerte Permeabilitäten wurden auch in anderen *C. jejuni*-infizierten T84-Epithelzellen für größere Markermoleküle (10 kDa Dextran) gemessen (Wine *et al.* 2008). Auch in humanen Kolonbiopsien kam es zu erhöhten Permeabilitäten von kleinen Markermolekülen wie Mannitol und Lactulose (Spiller *et al.* 2000) und zu einer Erhöhung des Fluorescein-Fluxes jedoch nicht für 4 kDa Dextran (Bücker *et al.* 2018).

In vivo-Modelle mit klinisch vergleichbaren Symptomen wie bei einer Campylobacteriose des Menschen wurden in den vergangenen Jahren als Maus-Infektionsmodelle entwickelt (Murphy *et al.* 2011, Otto *et al.* 2012, Haag *et al.* 2012a). Auch in unserem *in vivo*-Maus-Modell kam es nach der Infektion mit *C. jejuni* zu einer Reduktion des epithelialen Widerstands (R^{epi}) und des transmuralen Widerstands (R^t) sowie zu einem gesteigerten Fluorescein-Flux, was erstmalig im Rahmen dieser Arbeit in Ussingkammern belegt werden konnte (Lobo de Sá *et al.* 2019, Mousavi, Lobo de Sá *et al.* 2019, Heimesaat, Lobo de Sá *et al.* 2020, Lobo de Sá *et al.* 2021b). Basierend auf den Widerstands- und Permeabilitätseffekten *in vitro* und *in vivo* besteht eine starke Evidenz für *C. jejuni*-induzierte Barriere-defekte, jedoch war der Zusammenhang von Zelltodmechanismen und TJ-Veränderungen bisher nur unzureichend charakterisiert.

Erste durch eine *C. jejuni*-Infektion verursachte Veränderungen von Barriere-bildenden TJ-Proteinen zeigte eine Studie in SCBN-Epithelzellen (Lamb-Rosteski *et al.* 2008). In dieser Studie kam es zu einer Umverteilung des Barriere-bildenden TJ-Proteins Claudin-4 (Lamb-Rosteski *et al.* 2008). Humane Kolonbiopsien von *C. jejuni*-infizierten Patienten zeigten

dann später TJ-Expressionsänderungen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene für weitere Barriere-bildende Claudine (Claudin-1, -3, -4, -5 und -8) (Bücker *et al.* 2018). Diese Änderungen konnten zum Teil in unseren *in vitro*-Modellen nachgeprüft werden. Sowohl in der Monokultur als auch in der Co-Kultur B erhöht sich die Proteinexpression von Claudin-1, obwohl paradoxerweise gleichzeitig der TER sank (Lobo de Sá *et al.* 2019, Lobo de Sá *et al.* 2021b). Das gleiche Phänomen wurde in den humanen Kolonbiopsien der *C. jejuni*-Patienten beobachtet und wurde als Claudin-1-Paradoxon bezeichnet (Bücker *et al.* 2018). Eine solche Claudin-1-Induktion konnte auch bei *C. fetus*- und *C. coli*-Infektionen in HT-29/B6-Zellen (Bücker *et al.* 2017) und bei einer proinflammatorischen Zytokinstimulation von HT-29/B6-Zellen z. B. mit TNF- α beobachtet werden (Amasheh *et al.* 2010, Rosenthal *et al.* 2017). Die Erklärung für dieses Paradoxon ist, dass Claudin-1 zwar vermehrt gebildet wird, funktionell aber nicht in die epithelialen TJ-Stränge assembliert, sondern in intrazellulären Kompartimenten verbleibt (Bücker *et al.* 2018). Dies könnte durchaus auch als Beginn einer Kontra- bzw. Erholungsreaktion nach der primären infektionsmedierten TJ-Dysregulation in der ersten Infektionsphase interpretiert werden. Im Widerspruch zur TER-Reduktion und der erhöhten Permeabilität steht weiterhin auch die verminderte Proteinexpression des Poren-bildenden Claudin-2 in der hier verwendeten Monokultur (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die mRNA-Expression von Claudin-2 in der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten als auch die Proteinexpression von Claudin-2 in der *C. jejuni*-infizierten Co-Kultur A (Bücker *et al.* 2018, Butkevych, Lobo de Sá *et al.* 2020). Die weiteren untersuchten Barriere-bildenden TJ-Proteine, Claudin-3, -4, -5, -7, -8 und Occludin, zeigten keine signifikanten Veränderungen in unserer Monokultur. Jedoch kam es zu einer tendenziellen Herunterregulierung von Claudin-5 und Claudin-8. Diese Claudin-5-Regulierung ging zudem mit einer Umverteilung aus den TJ-Strängen nach intrazellulär einher, was mikroskopisch ebenso für Occludin beobachtet werden konnte (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Eine solche Umverteilung Barriere-bildender TJ-Proteine konnte auch in anderen *in vitro*-Infektionsmodellen (Chen *et al.* 2006, Rees *et al.* 2008), sowie in der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten beobachtet werden (Bücker *et al.* 2018, Harrer *et al.* 2019) und trägt ursächlich zur Störung der epithelialen Barrierefunktion bei.

Im IL-10^{-/-}-Mausmodell verringerte sich die Proteinexpression der TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, -5 und -7. Diese verminderte Proteinexpression in den *C. jejuni*-infizierten Mäusen ging mit erhöhten Apoptoseraten sowie einer vermehrten Immunaktivierung einher, welche synergistisch die akute Enterokolitis mit wässriger und zum Teil blutiger Diarrhö und dem schlechten klinischen Bild der Tiere sechs bis sieben Tagen nach der Infektion mit

C. jejuni erklären (Haag *et al.* 2012a). Die Histopathologie der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Mäuse zeigte bei den Versuchen von Yu *et al.* (2016) zudem starke Infiltrationen von Immunzellen, epitheliale Ulzerationen, Becherzellabbau sowie submuköse Ödeme und Kryptenabszesse (Yu *et al.* 2016).

Neben der subzellulären Expressions- und Lokalisationsänderung der TJ-Proteine spielen Apoptosen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer Barrieredysfunktion. Sowohl in der Monokultur als auch in der Co-Kultur B kam es nach der Infektion mit *C. jejuni* zu einer Verdreifachung der Apoptose-Ereignisse (Lobo de Sá *et al.* 2019, Lobo de Sá *et al.* 2021b). Diese Ergebnisse bestätigen die *in vivo* gewonnenen Daten in *C. jejuni*-infizierten IL-10^{-/-}-Mäusen (Haag *et al.* 2012a) sowie in der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten (Bücker *et al.* 2018). Dieser nachgewiesene Anteil an Apoptose-Events ist bereits Barriere-relevant (Bojarski *et al.* 2004, Butkevych, Lobo de Sá *et al.* 2020) und kann partiell die funktionelle Störung der epithelialen Barriere erklären. Frühe durch *C. jejuni*-induzierte Barriere-defekte in der ersten Phase der Infektion basieren überwiegend auf Apoptose-Ereignissen (Butkevych, Lobo de Sá *et al.* 2020). Epitheliale Apoptosen sowie die Bildung von fokalen Lecks konnten funktionell durch die Anwendung der Impedanzspektroskopie nachgewiesen werden, da es auch in der humanen Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten zu einer Verringerung des Widerstands sowie einer Erhöhung der Permeabilität von Fluorescein kam, während der 4 kDa Dextran-Flux unverändert war (Bücker *et al.* 2018). Aus der Synopsis dieser Befunde wurde bei der *C. jejuni*-induzierten Diarrhö in erster Linie auf eine Diarrhö basierend auf den *leak pathway* geschlossen (Bücker *et al.* 2018). Die *C. jejuni*-Infektion beeinflusst aber nicht nur die Störung des TJ-abhängigen *leak pathway*, sondern auch durch Barriere-relevante Zytotoxizität die unbeschränkte Passage von Makromolekülen und Wasser durch den *unrestricted pathway* (Abbildung 25) (Lobo de Sá *et al.* 2021a).

4.2 Die *Campylobacter jejuni*-induzierte Immunantwort hat einen Einfluss auf die Barrierefunktion

Campylobacter jejuni-Infektionen lösen eine akute mukosale Immunreaktion mit einer vermehrten Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren aus. Der Einfluss des Immunsystems auf die Barriestörung wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung des neu etablierten Co-Kultur-Modells B isoliert – ohne die direkten *C. jejuni*-induzierten Barrierschäden – betrachtet. Dafür wurden die Epithelzellen auf Filtern mit kleinen Porengrößen (0,4 µm) kultiviert, um sicherzustellen, dass die Bakterien nur im basalen Kompartiment verbleiben und nicht die Epithelzellen erreichen.

Selbst 48 Std. nach der basalen Infektion waren in dem vorliegenden experimentellen Setting der Co-Kultur B im apikalen Kompartiment keine Bakterien nachweisbar. In der Monokultur der HT-29/B6-GR/MR-Zellen auf Filtern mit 0,4 μm Porengröße veränderte sich der TER nach der basalen Infektion mit *C. jejuni* nicht. Eine direkte Wirkung der Bakterien auf die Epithelzellen (wie im Co-Kultur-Modell A mit 3 μm Filter-Porengröße) konnte so ausgeschlossen werden. 48 Std. nach der basalen Infektion mit *C. jejuni* in Anwesenheit der Immunzellen sank der TER dann aber, was nur durch die ausgelöste Immunreaktion verursacht worden sein konnte, da frühere Studien eine signifikante Verringerung des TER nach einer basalen Infektion mit *C. jejuni* auf 3 μm großen Poren zeigten und dies somit nicht auflösen konnten (Chen *et al.* 2006). Parallel zur Reduktion des TER stieg die Permeabilität für Fluorescein, was auf die Möglichkeit des Einstroms von kleinen Antigenen hindeutet (*leak pathway*). Im weiteren Verlauf der Infektion könnte es durch diese Schädigung aber auch zum Eintritt weiterer Antigene oder sogar ganzer Bakterien kommen (*unrestricted pathway*), welche die Barriere passieren, tieferliegende Zellen erreichen und somit die Immunreaktion potenzieren. Dies führt wiederum rückkoppelnd zu einer Schädigung der Barriere und zum Verlust der Barriereintegrität (Backert *et al.* 2013, Bücker *et al.* 2018). Es manifestiert sich dadurch auch eine Leckflux-Diarrhö, welche den Hauptdurchfallmechanismus bei der Campylobacteriose darstellt.

Die Regulierung der epithelialen Barrierefunktion kann in drei Mechanismen untergliedert werden (zusammengefasst in Lobo de Sá *et al.* 2021a). Dabei sind der *pore pathway* sowie der *leak pathway* TJ-abhängig beteiligt (Shen *et al.* 2011), wohingegen der *unrestricted pathway* TJ-unabhängig betroffen ist (France und Turner 2017). Unabhängig von der Ladung passieren größere Moleküle bis zu 63 Å den parazellulären *leak pathway* (Buschmann *et al.* 2013). Eine vermehrte Permeabilität von kleinen Makromolekülen basiert auf der Schädigung bizellulärer TJ-Proteine, wie den Claudinen. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde eine Herunterregulation von Tricellulin beobachtet, die mit einer gesteigerten Permeabilität von kleinen Makromolekülen durch die trizelluläre TJ begleitet wurde und die IL-13-Rezeptor- $\alpha 2$ vermittelt ist (Krug *et al.* 2018). Pathogene wie *C. jejuni* sind dabei generell in der Lage, sowohl den *leak pathway* als auch den *unrestricted pathway* zu öffnen, was auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Es wurde in dieser Arbeit konkret gezeigt, dass die *C. jejuni*-induzierte Apoptose-Induktion Barriere-relevant ist und dass die Barriestabilisierenden TJ-Proteine durch die *C. jejuni*-Infektion umverteilt werden, sowie deren Expression verändert wird. Diese beiden Mechanismen können neben dem Leckflux-Mechanismus der Diarrhö auch den Antigeneinstrom der Immunreaktion und der daraus resultierenden Barrierschädigung, das *Leaky Gut*-Phänomen, erklären. Die durch *C. jejuni*-in-

duzierte Diarrhömechanismen wurden in einem Buch „*Combating Campylobacter infections: towards a One Health approach*“ des Springer Verlages in der Reihe „*Current Topics in Microbiology and Immunology*“ im Rahmen dieser Arbeit in dem Kapitel „*Diarrheal mechanisms and the role of intestinal barrier dysfunction in Campylobacter infections*“ jüngst zusammengefasst (Lobo de Sá *et al.* 2021a). In diesem Kapitel wurde auch die nachfolgend dargestellte modifizierte Übersicht der mehrstufigen *C. jejuni*-induzierten Barrierestörung publiziert (Abbildung 25).

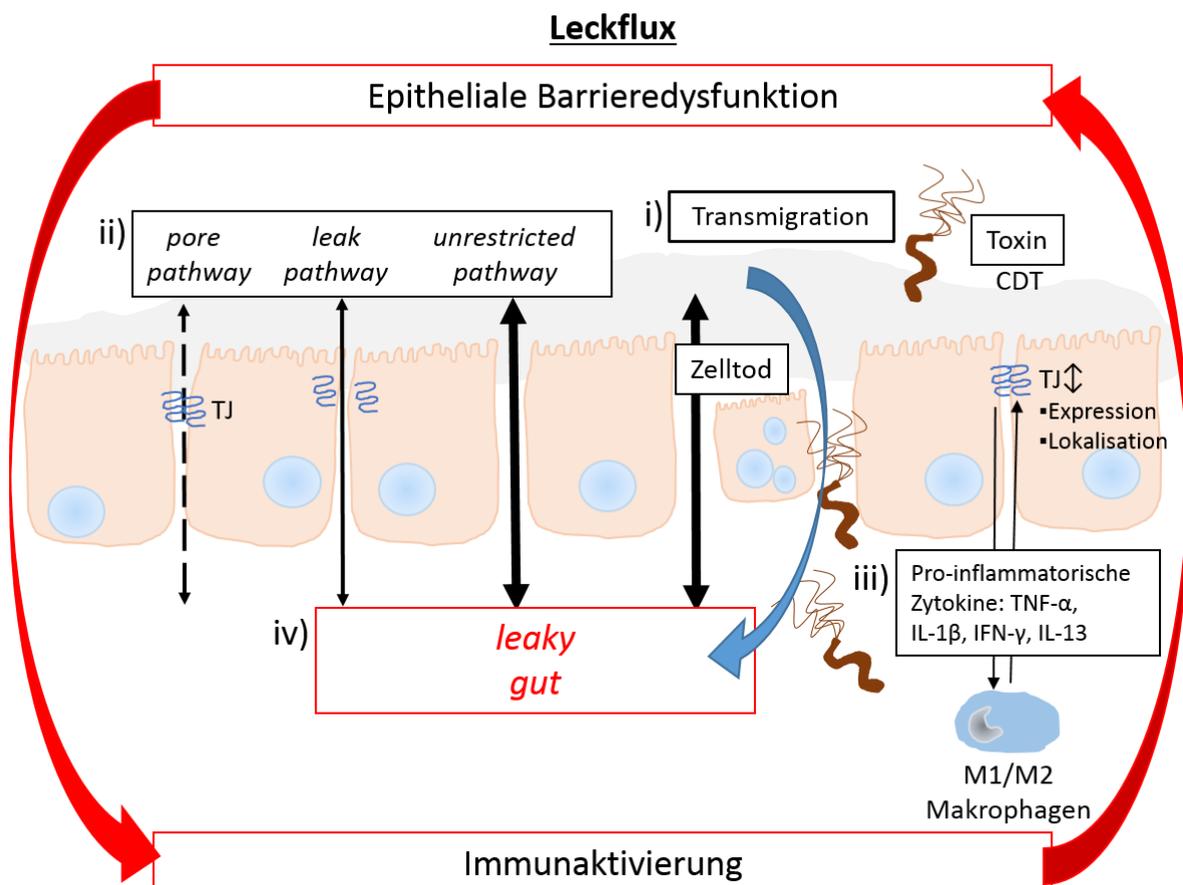


Abbildung 25: Mehrstufige Events während der durch *Campylobacter jejuni*-induzierten Barrieredysfunktion. Im undichten Darm passieren gelöste Stoffe und insbesondere Makromoleküle, wie Antigene, die kompromittierte Epithelbarriere. Dabei bilden die Mechanismen des *leak pathway* (Unterbrechung der TJ und insbesondere der trizellulären TJ) und des *unrestricted pathway* (Epithelschädigung) die Grundlage für den Antigeneinstrom und die damit einhergehende Immunaktivierung. i) Initiale Transmigration durch *C. jejuni* (parazelluläre und/oder transzelluläre Translokation über Transzytose). ii) Öffnung des *leak pathway* und des *unrestricted pathway* (direkte Epithelzellinteraktion). iii) Induktion einer subepithelialen Zytokinfreisetzung durch Immunzellen, was zur Öffnung des *pore pathway* und des *unrestricted pathway* führt (indirekte Immunzell-Epithelzellinteraktion). iv) Mukosaler Zytokinsturm mit potenziertem Barrieredysfunktion durch Antigeneinstrom (*leaky gut*). CDT: *cytolethal distending Toxin*; TJ: *Tight Junction* (modifiziert nach Lobo de Sá *et al.* 2021a).

Durch die basale Infektion der Co-Kultur mit *C. jejuni* wurden von den Immunzellen Zytokine sezerniert (Lobo de Sá *et al.* 2019), welche ebenfalls in der Kolonmukosa der *C. jejuni*-

infizierten Patienten identifiziert wurden (Bücker *et al.* 2018). Dazu gehören die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β . *C. jejuni*-Infektionen von Epithelzellen führten zudem zu einer starken Ausschüttung von NF- κ B-abhängigen inflammatorischen Mediatoren, wie IL-1 β und IL-6 (Yu *et al.* 2016). Weitere in unserer Co-Kultur sezernierte Zytokine, wie IL-6, zeigten in der RNA-Seq der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten ebenfalls eine vermehrte Expression (Bücker *et al.* 2018). Diese proinflammatorischen Zytokine haben nachweislich einen signifikanten Einfluss auf die Barriereintegrität wie es in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien für TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-13 und Chemokine verdeutlicht wurde (Schmitz *et al.* 1999, Adams *et al.* 1993, Barmeyer *et al.* 2004, Wang *et al.* 2007, Heller *et al.* 2005, Hu und Hickey 2005).

TNF- α spielt in verschiedenen infektiösen Entzündungsprozessen eine Schlüsselrolle. Werden verschiedene intestinale Epithelzellen mit TNF- α stimuliert, kommt es zu einer Reduktion des TER, zu einer Erhöhung des Fluxes von Ionen und anderen Molekülen oder aber auch zu einer Expressions- und Lokalisationsänderung von Occludin, Claudin-1 und Claudin-2 (Schmitz *et al.* 1999, Gitter *et al.* 2000a, Mankertz *et al.* 2000, Amasheh *et al.* 2010, Luettig *et al.* 2016, Hatayama *et al.* 2018). Ebenso zählt IFN- γ zu den Schlüsselmediatoren während der *C. jejuni*-induzierten Immunantwort, das ebenso wie TNF- α an der Ausbildung der Barrieredefekte beteiligt ist (Madara und Strafford 1989, Adams *et al.* 1993, Mankertz *et al.* 2000). Die schädigende Wirkung auf die Barriere konnten wir sowohl für IFN- γ als auch für den Zytokin-Cocktail bestehend aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β durch einen erhöhten Fluorescein-Flux darstellen (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Zudem führt die Behandlung mit IFN- γ zu einer Expressionsänderung von TJ-Proteinen und zu ihrer Umverteilung nach intrazellulär (Mankertz *et al.* 2000, Bruewer *et al.* 2003). Interessanterweise konnten in unserem Co-Kultur-Modell B modellspezifisch keine erhöhten IFN- γ -Konzentrationen nachgewiesen werden. Im Co-Kultur-Modell A wurden vergleichbare Ergebnisse bereits 22 Std. nach einer *C. jejuni*-Infektion wie im Modell B beobachtet (Butkevych, Lobo de Sá *et al.* 2020), obwohl in anderen epithelialen *in vitro*-Modellen erhöhte IFN- γ -Sekretionen nach *C. jejuni*-Infektionen nachgewiesen werden konnten (Al-Salloom *et al.* 2003), jedoch ebenfalls dort nicht für unsere THP-1-Zellen. THP-1-Zellen sezernieren generell im Vergleich zu frisch isolierten mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell*; PBMC) sowohl geringere Zytokinkonzentrationen als auch ein geringeres Zytokinspektrum (Kermandeh *et al.* 2019). Weitere sezernierte Zytokine nach der *C. jejuni*-Infektion in unserem Co-Kultur-Modell B sind IL-1 β und IL-6 (Lobo de Sá *et al.* 2019). Beide proinflammatorischen Zytokine sind nachweislich an der Schädigung der Barrierefunktion beteiligt und spielen eine wesentliche Rolle in der Ausprägung anderer gastrointestinaler entzündlicher Erkrankungen (Barmeyer *et al.* 2004, Wang *et al.* 2007, Bücker *et al.* 2018). Ebenso schwächt

IL-13 die intestinale Barriere (Heller *et al.* 2005, Schulzke *et al.* 2009), jedoch konnte in unserem Co-Kultur-Modell keine veränderte IL-13-Konzentration nachgewiesen werden. Ob Virulenzfaktoren, wie CDT oder das Flagellumprotein Flagellin, für die Zytokinproduktion oder die direkte Öffnung des *unrestricted pathway* eine entscheidende Rolle spielen, konnte in unseren Studien nicht unterschieden werden, da ausschließlich mit dem Referenzstamm *C. jejuni* 81-176 gearbeitet wurde, der diese Virulenzfaktoren exprimiert.

4.3 Verminderung der *Campylobacter jejuni*-induzierten Barrierestörung durch Resveratrol und Curcumin

Basierend auf der RNA-Seq-Analyse der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten (Bücker *et al.* 2018), ergaben die IPA-Vorhersagen für die Upstream-Regulatoren die Resultate Resveratrol und Curcumin. Das IPA-Programm vergleicht differentiell exprimierte Gene bei verschiedenen Krankheiten in unserem Campylobacteriose-Datensatz mit einer Datenbank zahlreicher verfügbarer Expressionsdatensätze aus der Literatur. Dabei zeigte Resveratrol vergleichbare Werte im *P*-Wert und im negativen *Z*-Score wie auch Curcumin. Negative *Z*-Scores deuten hierbei auf inhibierte *pathways* bzw. inhibierte *downstream targets* hin. Dies wurde als Hinweis interpretiert, dass die Zugabe von Resveratrol oder Curcumin die *C. jejuni*-induzierten Veränderungen an der Kolonmukosa gegenregulieren könnte. Im Gegensatz dazu zeigten proinflammatorische Zytokine positive *Z*-Scores sowie vergleichbare *P*-Werte. Die Zytokine IFN- γ und TNF- α zeigten die höchste Signifikanz aktivierender *pathways*, was experimentell auch konformiert werden konnte.

Der inhibitorische Effekt der beiden Polyphenole auf die *C. jejuni*-induzierten Barrierestörungen wurde in unterschiedlichen *in vitro*-Modellen sowie in dem IL-10^{-/-}-Mausmodell analysiert. Resveratrol in der *C. jejuni*-infizierten Monokultur, Curcumin in der *C. jejuni*-infizierten Co-Kultur B und beide Substanzkandidaten *in vivo* im Mausmodell konnten die *C. jejuni*-induzierte Barrierschädigung inhibieren. Somit stellen beide Polyphenole vielversprechende Phytopharmaka im Kampf gegen *C. jejuni*-Infektionen mit einem möglichen Einsatz in der Medizin dar.

In den Infektionsexperimenten wurden pharmakologisch relevante Konzentrationen verwendet, welche lediglich auf die Epithelbarriere wirken und keinen direkten antibakteriellen Einfluss ausüben. So zeigten minimale Hemmkonzentrationsuntersuchungen (MHK) eines kooperierenden Labors, dass die von uns verwendete Curcumin-Konzentration von 50 μ M unter der MHK von 87 μ M (bei einem pH 7,4) lag (Lobo de Sá *et al.* 2019). Für Resveratrol konnte in der Literatur eine MHK von 1304 μ M recherchiert werden (Klančnik *et al.* 2017,

Heimesaat, Lobo de Sá *et al.* 2020). Somit lag die MHK ebenso über der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 100 μ M.

Die antiapoptotischen Eigenschaften von Resveratrol und Curcumin spielen eine wesentliche Rolle im Erhalt der durch *C. jejuni*-geschwächten Barrierefunktion. Resveratrol zeigte beispielsweise auch in H₂O₂-stimulierten Caco-2-Zellen antiapoptotische Effekte (Wang *et al.* 2016). Auch in *C. jejuni*-infizierten IL-10^{-/-}-Mäusen, reduzierten sich in den Resveratrol-behandelten Tieren die Apoptose-Ereignisse und es kam zur Erhöhung proliferierender Zellen (Heimesaat, Lobo de Sá *et al.* 2020). Jedoch verdeutlichen mehrere experimentelle und klinische Studien, dass sowohl Resveratrol als auch Curcumin die Apoptose in Krebszellen induzieren können (Singh *et al.* 2017, El-Kott *et al.* 2019, Berman *et al.* 2017, Mortezaee *et al.* 2019). *Campylobacter jejuni*-Infektionen und die daraus resultierende subepitheliale Immunaktivierung verursachen also eine intestinale Barrieredysfunktion die zum erheblichen Teil Apoptosen-abhängig ist. Dies konnte auch in Inhibitor-Versuchen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph *in vitro* verifiziert und weiter quantitativ analysiert werden (Butkevych, Lobo de Sá *et al.* 2020).

Neben der Apoptose-Induktion tragen ebenso TJ-Protein-Expressionsänderungen und subzelluläre Umverteilungen von TJ-Proteinen zur Beeinträchtigung der Barrierefunktion bei (Chen *et al.* 2006, Bücken *et al.* 2018). Beide untersuchten Polyphenole inhibierten die Umverteilung der untersuchten Barriere-bildenden TJ-Proteine und verbesserten partiell die durch *C. jejuni*-induzierten TJ-Proteinexpressionsänderungen (Lobo de Sá *et al.* 2019, Lobo de Sá *et al.* 2021b). Somit trägt eine Resveratrol- bzw. Curcumin-Behandlung zur Barriestabilisierung bei. Die Behandlung mit Resveratrol verbesserte sowohl im Barriere-kompromittierten Kolon von *high-fat-diet*-konditionierten Mäusen als auch in H₂O₂-stimulierten intestinalen Epithelzellen und im *dextran sulfat sodium* (DSS)-induzierten Kolitis-Modell die Expression von Occludin, Claudin-1 und ZO-1 (Chen *et al.* 2020, Wang *et al.* 2016, Zhuang *et al.* 2019, Pan *et al.* 2020). In einem anderen Experiment konnte gezeigt werden, dass die TJ-Struktur von ZO-1, Claudin-3 und -7 unter der Gabe von Resveratrol bei der Kolitis DSS-induzierter Mäuse erhalten blieb (Mayangsari und Suzuki 2018). Vergleichbare positive Effekte auf die TJ-Stabilität zeigten auch unterschiedliche *in vitro*- und *in vivo*-Studien während der Gabe von Curcumin (Ma *et al.* 2004, Kim und Kim 2014, Wang *et al.* 2017), welche zusammengekommen die hier gewonnenen Daten zu den Barriere-protectiven Charakteristika unterstützen.

Campylobacter jejuni aktiviert den NF- κ B-Signalweg (Chen *et al.* 2006), welcher durch Resveratrol (Tsai *et al.* 1999) und Curcumin (Goel *et al.* 2008, Moghadamtousi *et al.* 2014)

supprimiert werden kann. Um die Rolle des NF- κ B-Signalweges im Erhalt der Barrierefunktion während einer *C. jejuni*-Infektion zu untersuchen, erfolgten NF- κ B-Inhibitor-Versuche mit dem NF- κ B-Inhibitor BAY 11-7082 (BAY). Eine BAY-Behandlung inhibierte sowohl den *C. jejuni*-induzierten Abfall im TER als auch die Erhöhung der Permeabilität für Fluorescein im Co-Kultur-Modell B – möglicherweise mediiert durch die Inhibierung der Zytokinsekretion, was geringere Barrierschäden zur Folge hätte. Dies verdeutlicht, dass NF- κ B in der Regulierung der epithelialen Barrierefunktion involviert zu sein scheint (Lobo de Sá *et al.* 2019). Ähnliche Ergebnisse wurden für den bioaktiven Ingwer-Scharfstoff 6-Shogaol nach einer TNF- α -Stimulation in Caco-2-Zellen beobachtet (Luettig *et al.* 2016).

Resveratrol und Curcumin sind trotz ihrer schwachen Bioverfügbarkeit potente antiinflammatorische Polyphenole *in vitro* (Weiskirchen und Weiskirchen 2016, Wang *et al.* 2017). Die in der Co-Kultur B durch *C. jejuni* vermehrt sezernierten proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-6 konnten durch die Behandlung mit Curcumin herunterreguliert werden (Lobo de Sá *et al.* 2019). Die Vorstimulation mit Curcumin von 24 bis 48 Std. beugte in einer anderen Studie ebenso einer LPS-induzierten Barriestörung in Caco-2-Zellen vor, sodass ZO-1, Claudin-1, Claudin-7 und die Aktinfilamente keine Expressions- und Lokalisationsänderung anzeigten (Wang *et al.*, 2017). Ähnliches konnten Wang *et al.* (2017) auch in HT-29-Zellen beobachten. Zudem konnte Curcumin als Claudin-4 Induktor in Caco-2-Zellen auf Genexpressionsebene identifiziert werden (Watari *et al.* 2012). Da Resveratrol adverse Effekte auf die THP-1-Immunzellen ausübt (Feng *et al.* 2019), wurde die Immunantwort in der Monokultur durch eine Zytokin-Stimulation (Zugabe von IFN- γ , TNF- α und IL-1 β) simuliert (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Rees und Kollegen zeigten, dass 100 U/mL IFN- γ synergistisch die *C. jejuni*-induzierte Barrieredysfunktion in Caco-2-Zellen schädigten (Rees *et al.* 2008). Außerdem ist in der IPA der IFN- γ *pathway*, der am signifikantesten aktivierte Signalweg unter den Zytokin-Signalwegen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die HT-29/B6-Zellen mit IFN- γ bzw. mit einem Zytokin-Cocktail stimuliert. Die IFN- γ -induzierten Barrierschäden konnten durch die Behandlung mit Resveratrol inhibiert werden. Im Gegensatz dazu konnten die durch den Zytokin-Cocktail-mediierten Störungen nicht durch Resveratrol aufgehoben werden (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Ähnliche Ergebnisse konnten in Lymphozyten generiert werden, bei denen die Zytokinproduktion nach der Behandlung mit Resveratrol sogar anstieg (Gao *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu regulierte Resveratrol die IL-6-Sekretion von Makrophagen herunter (Zhong *et al.* 1999), ähnlich zur IL-6-Ausschüttung in Mäusen mit einer DSS-induzierten Kolitis, wobei Resveratrol jedoch nicht das TNF- α -Level beeinflusste (Mayangsari und Suzuki 2018). Dennoch kam es durch die Resveratrol-Behandlung zu einer Verbesserung der DSS-induzierten Kolitis in diesen Tieren (Mayangsari und Suzuki 2018). Die im Rahmen dieser Arbeit

neu gewonnenen Daten deuten nun darauf hin, dass die pharmakologische Effektivität von Resveratrol, im Gegensatz zu der von Curcumin, mehr direkt auf Barriere-protective und weniger auf den antiinflammatorischen Eigenschaften beruht bzw. dass Resveratrol in unseren Experimenten eher als immunmodulierende Substanz und nicht als Immunsuppressivum agiert. Dabei liegt die Wirkung auf schwach betroffenen Zytokinwegen und Resveratrol wirkt teilweise mit inhibitorähnlichen Eigenschaften auf Signalwege, wie z. B. auf IL-6 (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Daher könnte die *C. jejuni* LOS-induzierte Immunaktivierung über Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4), wie sie aus dem hier verwendeten Mausmodell bekannt ist (Stephenson *et al.* 2013, Mousavi *et al.* 2020), durch Resveratrol moduliert oder teilweise gehemmt werden und dadurch zur Wiederherstellung der Barrierefunktion beitragen sowie das *Leaky Gut*-Phänomen abschwächen oder verhindern.

Neben einer Co-Kultur-Infektion und der direkten Zytokin-Stimulation *in vitro*, zählen Tier-Modelle zum Standardrepertoire der Forschung, um Informationen über das Immunsystem nach der Beeinträchtigung der Darmbarriere bei enteropathogenen Infektionsversuchen zu gewinnen (Gölz *et al.* 2015, von Klitzing *et al.* 2017). In unserem sekundär abiotischen *Campylobacter*-IL-10^{-/-}-Mausmodell entwickeln infizierte Tiere innerhalb einer Woche eine akute Enterokolitis, welche vor allem durch eine blutige Diarrhö gekennzeichnet war (Haag *et al.* 2012a). Die zugrundeliegende massive Immunüberreaktion basiert auf dem subepithelialen Zytokinsturm, der durch das Lipooligosaccharid (LOS) der invasiven *Campylobacter* induziert wird. Dies leitet sich dadurch ab, dass die Pathogenität von *C. jejuni* weniger toxinabhängig ist, sondern überwiegend auf dem translozierten LOS in das Subepithel basiert, wobei der zusätzliche Antigeneinstrom durch LOS von weiteren Bakterien aus dem Lumen in der *Leaky-Gut*-Situation die mukosale Entzündung erheblich verschlimmern kann. In Anbetracht der Tatsache, dass das LOS von *C. jejuni* auf den TLR4 abzielt, wurde die wichtige Rolle des LOS bei der Induktion und dem Fortschreiten der Campylobacteriose durch den Befund unterstützt, dass eine *C. jejuni*-Infektion in TLR4-defizienten Mäusen signifikant weniger Symptome einer Enterokolitis auslöste als in TLR4-kompetenten Mäusen (Lobo de Sá *et al.* 2021b). Dies wurde unabhängig voneinander von verschiedenen Forschergruppen in ihren individuellen murinen Modellen der Campylobacteriose bestätigt (Otto *et al.* 2012, Haag *et al.* 2012a, Stahl *et al.* 2014, Stahl und Vallance 2015, Mousavi *et al.* 2020). Am wichtigsten ist, dass ein allgemeiner pharmazeutischer Wirkmechanismus gegen die durch *C. jejuni*-induzierte Entzündung die Blockade oder die Antagonisierung von TLR4-Signalwegen beinhaltet, was den pathologischen Folgen des *Leaky Gut* entgegenwirken sollte. Diese Art der Immuninduktion über einen TLR4-abhängigen Signalweg könnte in unseren Mausexperimenten sowohl durch Resveratrol als auch durch Curcumin

gehemmt werden, wobei Curcumin als ein TLR4-Antagonist gilt und die LOS-medierte Immunantwort inhibieren kann (Zhao *et al.* 2011, Lobo de Sá *et al.* 2019, Heimesaat, Lobo de Sá *et al.* 2020, Lobo de Sá *et al.* 2021b).

Darüber hinaus könnte spekuliert werden, dass epitheliale Abwehrmechanismen durch Resveratrol und Curcumin verstärkt werden können. Generell kann die mukosale Abwehr gegen Mikroorganismen durch erhöhte Expression von Muzinen, TJ-Proteinen, Sekretion von Chemokinen und Zytokinen oder Freisetzung von direkten antimikrobiellen Substanzen wie β -Defensinen und Cathelicidin moduliert werden. Dabei gehören Defensine und Cathelicidin zu den Hauptkomponenten der angeborenen Abwehr des Wirtes gegen Bakterien an der gastrointestinalen Oberfläche. Eine vermehrte Expression von Defensinen und Cathelicidin konnte beispielsweise in *C. jejuni*-infizierten epithelialen Monokulturen, wie Caco-2 und HT-29-Zellen, nachgewiesen werden (Zilbauer *et al.* 2005). Curcumin führte in U937-Zellen zu einer vermehrten Expression der mRNA von Cathelicidin (Guo *et al.* 2013). Zudem zeigte das antimikrobielle Peptide Cathelicidin auch in Anwesenheit von Probiotika in einem Kolitis-Modell eine vermehrte Expression (Wu *et al.* 2015).

4.4 Potenzielle synergistische Effekte von Resveratrol, Curcumin und weiteren anti-inflammatorischen und Barriere-protectiven Substanzen

Weltweit stellen Campylobacteriosen ein ernst zu nehmendes medizinisches Problem dar. Aus diesem Grund ist der Bedarf nach neuen Strategien zur Prävention, Kontrolle und Behandlung der Zoonose umso größer. Verschiedene Barriere-protective und/oder antiinflammatorische Substanzen könnten im Kampf gegen *Campylobacter*-Infektionen eingesetzt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Kombinationstherapie aus Barriere-protectiven, antiinflammatorischen und/oder immunmodulierenden und antimikrobiellen Substanzen deutlich effektiver ist als eine einfache *Single-Compound*-Behandlung, sodass in einem multimodalen Therapieansatz positive Synergien entstehen und so die Ausbildung eines *Leaky Guts* vermieden wird. Ebenso können Substanzen wertvoll sein, die die bakterielle Motilität hemmen oder die Transmigration von *C. jejuni* durch das Epithel stören. Neben der Kombination aus den in dieser Arbeit getesteten Substanzen, Resveratrol und Curcumin, kommen weitere Substanzkandidaten zur Bekämpfung der *Campylobacter*-Infektion in Frage. Eine kürzlich erschienene Publikation verdeutlicht die protectiven Eigenschaften einer Kombination aus Resveratrol und Curcumin in Ferkeln mit Darm-entzündungen in ihrer antiinflammatorischen, Bakterien-regulierenden und synergistischen Wirkung (Gan *et al.* 2019).

Weitere pflanzenbasierte Substanzen könnten die *C. jejuni*-geschwächte Barriere stärken. Dabei sind insbesondere Barriere-protective Substanzen von großem Interesse. Beispielsweise zeigt Quercetin (ein Flavonoid aus Zwiebeln, Kohl oder Äpfeln) Barriere-stärkende Eigenschaften durch eine erhöhte Claudin-4-Expression in Caco-2-Zellen (Amasheh *et al.* 2008). In *Salmonella* Typhimurium-infizierten Zellen störte Quercetin direkt das bakterielle Typ-III-Sekretionssystem und interferiert somit direkt mit dem bakteriellen Virulenzfaktor (Tsou *et al.* 2016). Eine Interferenz von Quercetin mit Adhärenz- oder Virulenzfaktoren könnte auch bei *Campylobacter* denkbar sein. Für das Polyphenol Curcumin zeigte sich allerdings bereits, dass es keinen Einfluss auf die horizontale DNA-Aufnahme von *C. jejuni* hat und somit die bakterielle Fitness sowie genetische Rekombination von *C. jejuni* durch die Curcumin-Behandlung unbeeinflusst bleibt (Lobo de Sá *et al.* 2019). Ein weiterer Hinweis für die Effektivität gegen *Campylobacter*-Infektionen zeigte eine Studie bei der das Wachstum verschiedener *Campylobacter*-Stämme in Anwesenheit von Quercetin inhibiert war (Campana *et al.* 2009).

In der Traditionellen Chinesischen Medizin wird Berberin zur Behandlung infektiöser Diarrhöen, Gastroenteritis und Bauchschmerzen verwendet (Zhou und Mineshita 2000). Berberin, ein Pflanzenalkaloid aus der Berberitze-Pflanze (*Berberis vulgaris*), zeigte antiinflammatorische Eigenschaften in TNF- α - und IFN- γ -induzierter Barrieredysfunktionen in Caco-2-Zellen (Amasheh *et al.* 2010) und reduzierte zudem auch die IL-8-Sekretion und somit die Immunantwort in einer Trinitrobenzolsulfonsäure (TNB)-induzierten Kolitis in Mäusen (Zhou und Mineshita 2000). Neben seinen antiinflammatorischen Eigenschaften wirkt Berberin auch antimikrobiell gegen *Escherichia coli* (CCTCC AB91112) und in hohen Konzentrationen auch gegen *Bacillus subtilis* (Kong *et al.* 2012). Bisher gibt es noch keine publizierten Daten, ob Berberin auch gegen *Campylobacter* spp. wirksam ist.

Vitamin D ist ein lipophiles Prohormon, welches vor allem im Knochenmetabolismus, in der Immunregulation aber auch in der Funktion des Gastrointestinaltraktes, wie der Mikrobiomregulation, eine wesentliche Rolle spielt (Ooi *et al.* 2013). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃; Calcitriol) ist die biologisch aktive Form des Vitamin D und wird über den nukläer lokalisierten Vitamin D Rezeptor (VDR) und den Retinoid-X-Rezeptor (RXR) kontrolliert (Barbalho *et al.* 2016). Über den VDR-Signalweg kann die Immunantwort von Immunzellen reduziert werden, sodass weniger Zytokine sezerniert werden (Froicu und Cantorna 2007). Insbesondere in Kombination mit Calcium zeigte Vitamin D Barriere-protective Eigenschaften in *in vivo* CED-Modellen (Zhu *et al.* 2005). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass VDR-*knockout* Mäuse leichter eine DSS-Kolitis entwickeln und Bakterien schneller in den systemischen Kreislauf gelangen (Froicu und Cantorna 2007). Korrelierend dazu inhibiert die Vitamin D-Behandlung die Ausbildung einer DSS-Kolitis (Ooi *et al.* 2013). Durch

die Überexpression des VDR kommt es zu einer verbesserten Barriereintegrität *in vivo* (Zhu *et al.* 2005). Auch schützt die Vitamin D-Behandlung *in vitro* vor Ethanol-induzierter (Chen *et al.* 2015b) sowie TNF- α -induzierter Barrierschädigung (Chen *et al.* 2015a). Es konnte speziell gezeigt werden, dass der Vitamin D-Signalweg in Campylobacteriosen eine Rolle spielen könnte und dass die Gabe von Vitamin D die *C. jejuni*-induzierte Verringerung der Zellviabilität sowie die TER-Reduktion *in vitro* aufhebt (Bücker *et al.* 2018). Auch unsere erste *in vivo*-Studie dazu zeigte, dass Vitamin D-behandelte *C. jejuni*-infizierte IL-10^{-/-}-Mäuse einen milderen Krankheitsverlauf hatten im Vergleich zu den Placebo-behandelten Mäusen (Mousavi, Lobo de Sá *et al.* 2019). Dies war mit einer reduzierten Translokation der *C. jejuni* in extraintestinale Kompartimente sowie einer schwächeren Entzündung sowohl intestinal als auch extraintestinal begleitet (Mousavi, Lobo de Sá *et al.* 2019). So konnten bereits synergistische Effekte von Resveratrol und Vitamin D auf die Heterodimerisierung von VDR-RXR-Kernfaktoren gezeigt werden (Dampf-Stone *et al.* 2015).

Für die meisten gastrointestinalen Infektionen stellen auch Probiotika geeignete Interventionsstrategien dar (Mohan 2015). Probiotika sind Darmflora-stärkende und somit gesundheitsfördernde Mikroorganismen, die Lebensmittelprodukten zugesetzt werden und vielversprechende Ergebnisse zur Reduzierung der Kolonisierung mit *Campylobacter* gezeigt haben. *Lactobacillus salivarius* SMXD51 beispielsweise sezerniert Bakterizid-ähnliche Produkte, welche hochwirksam gegen *C. jejuni* sind, und stärkt zudem die intestinale Barriere, was durch einen erhöhten TER angezeigt wurde (Messaoudi *et al.* 2012). In Anwesenheit von *Lactobacillus* spp. reduzierte sich außerdem die Adhäsion, Invasion und Translokation von *Campylobacter* in Schweine- und Hühner-Zellen (Šikić Pogačar *et al.* 2020). Eine Studie mit dem Probiotikum *L. plantarum* 0407, kombiniert mit Oligofruktose, *Bifidobacterium bifidum* Bb12 und Xylo-Oligosacchariden hemmte das Wachstum von *C. jejuni* in Fermentationsstudien (Fooks und Gibson 2003). Ein weiterer möglicher probiotischer Kandidat bei *C. jejuni*-Infektionen ist *E. coli* Nissle 1971, welcher die Invasion und das intrazelluläre Überleben von *C. jejuni* reduzierte (Helmy *et al.* 2017). VSL#3 als probiotische Mischung verhinderte des Weiteren in DSS-Kolitis-induzierten Mäusen die Alteration der TJ-Expression und -Lokalisation von Occludin, Claudin-1, -3, -4, -5 und ZO-1 sowie die Entzündungsreaktion und Apoptose-Induktion (Mennigen *et al.* 2009) und könnte somit auch bei *C. jejuni*-induzierten Barrierschäden therapeutisch wirksam sein. Angesichts des allgemein schlechten Verständnisses sowohl des *C. jejuni*- als auch Probiotika-Metabolismus könnten Metabolom-Analysen attraktive Techniken darstellen, um den Stoffwechsel und resultierende Metabolite detaillierter zu charakterisieren.

Probiotika alleine oder in Kombination mit den oben erläuterten Substanzen, die der Ernährung von Nutztieren zugesetzt werden, stellen eine einfache und wirksame neue Strategie

dar, um die Besiedlung mit *C. jejuni* zu verhindern und infolgedessen das Auftreten von Campylobacteriosen beim Menschen zu reduzieren.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit identifizierte die beiden Polyphenole Resveratrol und Curcumin als effektive Substanzen und mögliche Präventiva und Therapeutika zur Behandlung *C. jejuni*-induzierter intestinaler Barrierschäden. Es kann angenommen werden, dass Resveratrol und Curcumin auch bei anderen infektiösen, akuten sowie chronischen gastrointestinalen Erkrankungen oder sogar bei anderen extraintestinalen Krankheiten therapeutisch wirksam sein könnten. Dies sollte in verschiedenen *in vitro*, *in vivo* und klinischen Studien untersucht werden. So konnte Curcumin bereits in einer klinischen Studie als komplementäre Therapie zur CED-Therapie mit Sulfasalazin oder Mesalamin die Remissioninduktion und –erhaltung unterstützen (Hanai *et al.* 2006).

Da epitheliale 2D-Monokultur-Modelle nicht die Komplexität des Organismus widerspiegeln und Tierversuche möglichst nach dem 3R-Prinzip reduziert werden sollen, sollten neue Methoden wie 3D-Organoiden, *precision-cut tissue slices* oder die *organ-on-a-chip*-Technologie genutzt werden, um Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen, systemische Wirkmechanismen sowie die Pharmakokinetik betrachten zu können. Mit diesen Methoden können mögliche Substanzkandidaten identifiziert und weitere Details im Pathomechanismus der *C. jejuni*-Infektion und Virulenzfaktoren definiert und charakterisiert werden. Zudem können auch Toxizitätsstudien, die Pharmakokinetik (inkludiert Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion) und die Wirksamkeit von Arzneimitteln analysiert werden, sodass klinische Studien beschleunigt und somit Kosten gespart werden können.

Potenziell effektive Substanzen und Kombinationstherapien aus Barriere-protektiven, anti-inflammatorischen und/oder immunmodulierenden und antiapoptotischen Wirkungsweisen könnten in Zukunft nicht nur für die Humanmedizin von Interesse sein, sondern auch als Strategie für die Minimierung der *Campylobacter*-Kolonisation und der Bakterienlast bei Tieren in der Nahrungsmittelproduktion angewendet werden, was bereits im Zoonosenforschung-Konsortium PAC-*Campylobacter* (PAC-CAMPY) an Hühnern getestet wird. Zu den vielversprechenden Substanzkandidaten gehören neben Probiotika phenolische Bakterienmetabolite, wie Carvacrol, und weitere Phytopharmaka, wie Berberin und Quercetin. Ebenfalls interessant ist die Wirkungsweise von Vitamin D und welchen Einfluss *C. jejuni* auf den Vitamin D-Signalweg hat. Während des Bearbeitungszeitraumes dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit von Vitamin D auf *C. jejuni*-induzierte Barriestörungen untersucht

und die Rolle des Vitamin D-Signalwegs während der *C. jejuni*-Infektion analysiert. Die dazu generierten Daten werden zeitnah zur Publikation eingereicht.

5 Zusammenfassung

Campylobacter jejuni-Infektionen stellen ein gravierendes Gesundheitsproblem dar und zählen weltweit zu den häufigsten Ursachen für eine lebensmittelbedingte Gastroenteritis. Während *Campylobacter* die meisten Tiere als Kommensale besiedelt, löst das Bakterium im Menschen wässrige bis blutige Diarrhöen aus, die häufig von Fieber und Bauchkrämpfen begleitet werden. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, das protektive Potenzial von Resveratrol und Curcumin für *C. jejuni*-induzierte intestinale Barrierschäden zu untersuchen.

C. jejuni induzierte eine epitheliale Barriedysfunktion, welche zunächst mit Adhäsion, Invasion und Transmigration der Bakterien beginnt. Diese Barrierschädigung konnte *in vitro* und *in vivo* durch einen reduzierten TER, welcher mit einem Anstieg in der Permeabilität für Fluorescein (332 Da) begleitet wurde, dargestellt werden. Zusätzlich wurde die Expression sowie Lokalisation von Proteinen der *Tight Junction* (TJ) durch die Infektion mit *C. jejuni* beeinflusst, wodurch sowohl der *pore pathway* als auch der *leak pathway* beeinflusst wurden. Diese Expressions- und Lokalisationsänderung der TJ-Proteine wurde mittels Western Blot-Analyse quantifiziert und mit konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie visualisiert. Des Weiteren kommt es durch die *C. jejuni*-Infektion zur Apoptose-Induktion, wodurch eine Passage auch von größeren Molekülen durch das Epithel ermöglicht wird (Öffnung des *unrestricted pathway*). Als letzten entscheidenden Mechanismus im Hinblick auf die *C. jejuni*-induzierte Barriestörung konnte die aus der bakteriellen Interaktion resultierende Immunantwort mit einer Zytokinsekretion gezeigt werden, die wiederum die epitheliale Barriere schwächt und somit den Teufelskreis des *Leaky Gut*-Phänomens mit weiterem Antigen-einstrom hervorruft. Der Einfluss der Immunantwort wurde zum einen mit einem neu etablierten Co-Kultur-Modell, bestehend aus Epithel- und Immunzellen charakterisiert, und zum anderen mittels Zytokin-Stimulation untersucht.

RNA-Seq-Daten der Kolonmukosa *C. jejuni*-infizierter Patienten, die mit der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)-Software analysiert wurden, sagten die Wirksamkeit der beiden Polyphenole Resveratrol und Curcumin vorher. Diese Vorhersage wurde in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen überprüft. Das neu etablierte Co-Kultur-Modell erlaubte eine isolierte Betrachtung des Einflusses der *C. jejuni*-induzierten Immunreaktion bzw. die Beurteilung der kombinierten Effekte aus direkten bakterienmedierten und indirekten immuninduzierten Barrierschäden. Mit diesem Modell konnten insbesondere antiinflammatorische bzw. immunmodulatorische Eigenschaften der Testsubstanzen genauer analysiert werden.

Zusammenfassend konnte sowohl Resveratrol als auch Curcumin die durch die *C. jejuni*-Infektion ausgelöste intestinale Barrierschädigung in unseren verwendeten Modellen aufhalten. Die untersuchten Substanzen stellen somit vielversprechende Kandidaten für die Behandlung der *C. jejuni*-induzierten Gastroenteritis im Menschen dar und könnten die Kolonisation von Tieren in der Nahrungsmittelproduktion reduzieren.

6 Summary

Campylobacter jejuni infections are a serious health problem and are the most common causes for foodborne gastroenteritis worldwide. While *Campylobacter* colonizes animals as a commensal, the bacterium causes watery to bloody diarrhea in humans, which is often accompanied by fever and abdominal cramps. The main objective of the present work was to investigate the protective potential of resveratrol and curcumin in *C. jejuni*-induced intestinal barrier dysfunction.

C. jejuni induced an epithelial barrier dysfunction, which initially starts with bacterial adhesion, invasion, and transmigration. This barrier damage could be presented *in vitro* and *in vivo* by a reduced TER, which was accompanied by an increase in permeability to fluorescein (332 Da). In addition, tight junction (TJ) expression as well as localization was affected by *C. jejuni* infection, consequently both the pore pathway and the leak pathway are affected. This change in expression and localization of TJ proteins was quantified by Western blot analysis and visualized by confocal laser scanning microscopy. Furthermore, apoptosis induction occurs by *C. jejuni* infection, which enables the unrestricted passage of molecules through the epithelium (opening of the unrestricted pathway). As a final crucial mechanism with regard to the *C. jejuni*-induced barrier disruption, the immune response resulting from the bacterial interaction was shown to involve cytokine secretion, which in turn weakens the epithelial barrier and thus induces the vicious cycle of the leaky gut phenomenon with further antigen influx. On the one hand the influence of the immune response was characterized with the newly established co-culture model consisting of epithelial cells and immune cells and on the other hand investigated by cytokine challenge.

RNA-Seq data of the colon mucosa of *C. jejuni*-infected patients analyzed with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software predicted the efficacy of the two polyphenoles resveratrol and curcumin. This prediction was tested in different *in vitro* and *in vivo* models. The new established co-culture model allowed an isolated consideration of the influence of the *C. jejuni*-induced immune response or an assessment of the combined effects from direct bacteria-mediated and indirect immune-induced barrier disturbance. In particular, anti-inflammatory or immunomodulatory properties of the test compounds can be analyzed with this model.

In summary, both resveratrol and curcumin were able to restore the intestinal barrier dysfunction induced by *C. jejuni* infection in our models. Thus, the investigated compounds represent promising candidates for the treatment of *C. jejuni*-induced gastroenteritis in humans and may reduce colonization of animal food products.

7 Literaturverzeichnis

- Adams RB, Planchon SM, Roche JK (1993)** IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol.* 150(6): 2356-63.
- Alexandre MD, Lu Q, Chen YH (2005)** Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci.* 118(Pt 12): 2683-93. Doi: 10.1242/jcs.02406.
- Alrafas HR, Busbee PB, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2019)** Resveratrol modulates the gut microbiota to prevent murine colitis development through induction of Tregs and suppression of Th17 cells. *J Leukoc Biol.* 106(2): 467-480. Doi: 10.1002/JLB.3A1218-476RR.
- Al-Salloom FS, Al Mahmeed A, Ismaeel A, Botta GA, Bakhiet M (2003)** *Campylobacter*-stimulated INT407 cells produce dissociated cytokine profiles. *J Infect.* 47(3): 217-24. Doi: 10.1016/s0163-4453(03)00076-8.
- Alzheimer M, Svensson SL, König F, Schweinlin M, Metzger M, Walles H, Sharma CM (2020)** A three-dimensional intestinal tissue model reveals factors and small regulatory RNAs important for colonization with *Campylobacter jejuni*. *PloS Pathog.* 16(2): e1008304. Doi: 10.1371/journal.ppat.1008304.
- Amasheh M, Fromm A, Krug SM, Amasheh S, Andres S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2010)** TNF α -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and Nf κ B signaling. *J Cell Sci.* 123(Pt 23): 4145-55. Doi: 10.1242/jcs.070896.
- Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2008)** Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr.* 138(6): 1067-73. Doi: 10.1093/jn/138.6.1067.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002)** Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 115(Pt 24): 4969-76. Doi: 10.1242/jcs.00165.
- Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Günzel D, Amasheh M, Fromm M (2009)** Tight junction proteins as channel formers and barrier builders. *Ann N Y Acad Sci.* 1165: 211-9. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04439.x.

- Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M (2005)** Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 321(1): 89-96. Doi: 10.1007/s00441-005-1101-0.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A (2005)** Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(26): 9247-52. Doi: 10.1073/pnas.0502040102.
- Anderson JM (2001)** Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci.* 16: 126-30. Doi: 10.1152/physiolgyonline.2001.16.3.126
- Anggakusuma, Colpitts CC, Schang LM, Rachmawati H, Frentzen A, Pfaender S, Behrendt P, Brown RJ, Bankwitz D, Steinmann J, Ott M, Meuleman P, Rice CM, Ploss A, Pietschmann T, Steinmann E (2014)** Tumeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut.* 63(7): 1137-49. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-304299.
- Backert S, Boehm M, Wessler S, Tegtmeyer N (2013)** Transmigration Route of *Campylobacter Jejuni* Across Polarized Intestinal Epithelial Cells: Paracellular, Transcellular or Both? *Cell Commun Signal.* 11: 72. Doi: 10.1186/1478-811X-11-72.
- Balda MS, Matter K (2009)** Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1788(4): 761-7. Doi: 10.1016/j.bbamem.2008.11.024.
- Barbalho SM, Bechara MD, de Alves Goulart R, Quesada K, Gasparini RG, de Cássio Alves de Carvalho A, Fiorini AM (2016)** Reflections About Inflammatory Bowel Disease and Vitamins A and D. *J Med Food.* 19(12): :1105-1110. Doi: 10.1089/jmf.2016.0101.
- Barmeyer C, Amasheh S, Tavalali S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2004)** IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon. *Biochem Biophys Res Commun.* 317(2): 500-7. Doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.072.
- Beltinger J, del Buono J, Skelly MM, Thornley J, Spiller RC, Stack WA, Hawkey CJ (2008)** Disruption of colonic barrier function and induction of mediator release by strains of *Campylobacter jejuni* that invade epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 14(48): 7345-7352. Doi: 10.3748/wjg.14.7345.

- Berden JH, Muytjens HL, van de Putte LB (1979)** Reactive arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *Br Med J.* 1(6160): 380-1. Doi: 10.1136/bmj.1.6160.380-a.
- Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kühl AA, Dasti JI, Zautner AE, Muñoz M, Loddenkemper C, Groß U, Göbel UB, Heimesaat MM (2011a)** Novel Murine Infection Models Provide Deep Insights into the “Ménage à Trois” of *Campylobacter jejuni*, Microbiota and Host Innate Immunity. *PLoS One.* 6(6): e20953. Doi: 10.1371/journal.pone.0020953.
- Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kühl AA, Loddenkemper C, Göbel UB, Heimesaat MM (2010)** Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One.* 5(12): e15099. Doi: 10.1371/journal.pone.0015099.
- Bereswill S, Plickert R, Fischer A, Kühl AA, Loddenkemper C, Batra A, Siegmund B, Göbel UB, Heimesaat MM (2011b)** What you eat is what you get: Novel *Campylobacter* models in the quadrangle relationship between nutrition, obesity, microbiota and susceptibility to infection. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 1(3): 237-48. Doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.3.8.
- Bergann T, Plöger S, Fromm A, Zeissig S, Borden SA, Fromm M, Schulzke JD (2009)** A colonic mineralocorticoid receptor cell model expressing epithelial Na⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(2): 280-5. Doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.006.
- Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK (2017)** The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol.* 1: 35. Doi: 10.1038/s41698-017-0038-6.
- Besançon F, Przewlocki G, Baró I, Hongre AS, Escande D, Edelman A (1994)** Interferon-gamma downregulates CFTR gene expression in epithelial cells. *Am J Physiol.* 267(5 Pt 1): C1398-404. Doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1398.
- Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N (2011)** Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *J Agric Food Chem.* 59(5): 2056-61. Doi: 10.1021/jf104402t.
- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ (1988)** Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis.* 157(3): 472-9. Doi: org/10.1093/infdis/157.3.472.

- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J (2007)** Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev.* 87(2): 545-64. Doi: 10.1152/physrev.00012.2006.
- Boehm M, Hoy B, Rohde M, Tegtmeyer N, Bæk KT, Oyarzabal OA, Brøndsted L, Wessler S, Backert S (2012)** Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. *Gut Pathog.* 4(1): 3. Doi: 10.1186/1757-4749-4-3.
- Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke JD, Florian P, Fromm M, Tauber R, Huber O (2004)** The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117(Pt 10): 2097-107. Doi: 10.1242/jcs.01071.
- Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE (2007)** Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(6): 1246-52. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0022.
- Borrmann E, Berndt A, Hänel I, Köhler H (2007)** *Campylobacter*-induced interleukin-8 responses in human intestinal epithelial cells and primary intestinal chick cells. *Vet Microbiol.* 124(1-2): 115-24. Doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.041.
- Brás AM, Ketley JM (1999)** Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. *FEMS Microbiol Lett.* 179(2): 209-15. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08729.x.
- Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A (2003)** Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol.* 171(11): 6164-72. Doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6164.
- Bücker R, Krug SM, Fromm A, Nielsen HL, Fromm M, Nielsen H, Schulzke JD (2017)** *Campylobacter fetus* impairs barrier function in HT-29/B6 cells through focal tight junction alterations and leaks. *Ann N Y Acad Sci.* 1405(1): 189-201. Doi: 10.1111/nyas.13406.
- Bücker R, Krug SM, Moos V, Bojarski C, Schweiger MR, Kerick M, Fromm A, Janßen S, Fromm M, Hering NA, Siegmund B, Schneider T, Barmeyer C, Schulzke JD**

- (2018) *Campylobacter jejuni* impairs sodium transport and epithelial barrier function via cytokine release in human colon. *Mucosal Immunol.* 11(2): 575-577. Doi: 10.1038/mi.2017.78.
- Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, Lingaraju A, Zha J, Abbott E, McAuley EM, Breskin LA, Wu L, Anderson K, Turner JR, Weber CR (2013)** Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell.* 24(19): 3056-68. Doi: 10.1091/mbc.E12-09-0688.
- Butkevych E, Lobo De Sá FD, Natramilarasu PK, Bücken R (2020)** Epithelial apoptosis and subepithelial immune responses in *Campylobacter jejuni*-induced barrier disruption. *Front Microbiol.* 11: 344. Doi: 10.3389/fmicb.2020.00344.
- Campana R, Patrone V, Franzini IT, Diamantini G, Vittoria E, Baffone W (2009)** Antimicrobial activity of two propolis samples against human *Campylobacter jejuni*. *J Med Food.* 12(5): 1050-6. Doi: 10.1089/jmf.2008.0173.
- Carrasco-Pozo C, Morales P, Gotteland M (2013)** Polyphenols protect the epithelial barrier function of Caco-2 cells exposed to indomethacin through the modulation of occludin and zonula occludens-1 expression. *J Agric Food Chem.* 61(22): 5291-7. Doi: 10.1021/jf400150p.
- Charoenphandhu N, Nakkrasae LI, Kraidith K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon N, Krishnamra N (2009)** Two-step stimulation of intestinal Ca(2+) absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(3): E609-19. Doi: 10.1152/ajpendo.00347.2009.
- Chen DY, Shien JH, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, Lee YJ, Chan KW, Hsu WL (2010)** Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food Chemistry.* 119: 1346-1351. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.011.
- Chen K, Zhao H, Shu L, Xing H, Wang C, Lu C, Song G (2020)** Effect of resveratrol on intestinal tight junction proteins and the gut microbiome in high-fat diet-fed insulin resistant mice. *Int J Food Sci Nutr.* 71(8): 965-978. Doi: 10.1080/09637486.2020.1754351.
- Chen ML, Ge Z, Fox JG, Schauer DB (2006)** Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 74(12): 6581-9. Doi: 10.1128/IAI.00958-06.

- Chen S, Zhu J, Chen G, Zuo S, Zhang J, Chen Z, Wang X, Li J, Liu Y, Wang P (2015a)** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 preserves intestinal epithelial barrier function from TNF- α induced injury via suppression of NF- κ B p65 mediated MLCK-P-MLC signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460(3): 873-878. Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.125.
- Chen SW, Ma YY, Zhu J, Zuo S, Zhang JL, Chen ZY, Chen GW, Wang X, Pan YS, Liu YC, Wang PY (2015b)** Protective effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on ethanol-induced intestinal barrier injury both *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Lett.* 237(2): 79-88. Doi: 10.1016/j.toxlet.2015.06.006.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N (2008)** Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 1778(3): 588-600. Doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.017.
- Chimento A, De Amicis F, Sirianni R, Sinicropi MS, Puoci F, Casaburi I, Saturnino C, Pezzi V (2019)** Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *Int J Mol Sci.* 20(6): 1381. Doi: 10.3390/ijms20061381.
- Cho JA, Park E (2015)** Curcumin utilizes the anti-inflammatory response pathway to protect the intestine against bacterial invasion. *Nutr Res Pract.* 9(2): 117-122. Doi: 10.4162/nrp.2015.9.2.117.
- Chudzińska M, Rogowicz D, Wołowiec Ł, Banach J, Sielski S, Bujak R, Sinkiewicz A, Grześk G (2020)** Resveratrol and cardiovascular system – the unfulfilled hopes. *Ir J Med Sci.* Doi: 10.1007/s11845-020-02441-x.
- Claude P (1978)** Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol.* 39(2-3): 219-32. Doi: 10.1007/bf01870332.
- Claude P, Goodenough DA (1973)** Fracture faces of zonulae occludentes from “tight” and “leaky” epithelia. *J Cell Biol.* 58(2): 390-400. Doi: 10.1083/jcb.58.2.390.
- Colgan SP, Parkos CA, Matthews JB, D’Andrea L, Awtrey CS, Lichtman AH, Delp-
Archer C, Madara JL (1994)** Interferon-gamma induces a cell surface phenotype switch on T84 intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 267(2 Pt 1): C402-10. Doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.2.C402.
- Dai J, Gu L, Su Y, Wang Q, Zhao Y, Chen X, Deng H, Li W, Wang G, Li K (2018)** Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and epithelia pneumonia via oxidative

- stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF- κ B pathways. *Int Immunopharmacol.* 54: 177-187. Doi: 10.1016/j.intimp.2017.11.009.
- Dampf-Stone A, Batie SF, Sabir MS, Jacobs ET, Lee JH, Whitfield GK, Haussler MR, Jurutka PW (2015)** Resveratrol potentiates vitamin D and nuclear receptor signaling. *J Cell Biochem.* 116(6):1130-43. Doi: 10.1002/jcb.25070.
- Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner A, Groß U (2010)** *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol.* 300(4): 205-11. Doi: 10.1016/j.ijmm.2009.07.002.
- de Graaf IA, Olinga P, de Jager MH, Merema MT, de Kanter R, van de Kerkhof EG, Groothuis GM (2010)** Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat Protoc.* 5(9): 1540-51. Doi: 10.1038/nprot.2010.111.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013)** STAR: ultrafast universal RNA-Seq aligner. *Bioinformatics.* 29(1): 15-21. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- El-Kott AF, Shati AA, Ali Al-Kahtani M, Alharbi SA (2019)** The apoptotic effect of resveratrol in ovarian cancer cells is associated with downregulation of galectin-3 and stimulating miR-424-3p transcription. *J Food Biochem.* 43(12): e13072. Doi: 10.1111/jfbc.13072.
- Everest PH, Goossens H, Butzler JP, Lloyd D, Knutton S, Ketley JM, Williams PH (1992)** Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J Med Microbiol.* 37(5): 319-25. Doi: 10.1099/00222615-37-5-319.
- Farquhar MG, Palade GE (1963)** Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17(2): 375-412. Doi: 10.1083/jcb.17.2.375.
- Feng L, Yasmeen R, Schoene NW, Lei KY, Wang TTY (2019)** Resveratrol differentially modulates immune responses in human THP-1 monocytes and macrophages. *Nutr Res.* 72: 57-69. Doi: 10.1016/j.nutres.2019.10.003.
- Ferraris RP, Diamond J (1997)** Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev.* 77(1): 257-302. Doi: 10.1152/physrev.1997.77.1.257.

- Ferreira S, Silva F, Queiroz JA, Oleastro M, Domingues FC (2014)** Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions. *Int J Food Microbiol.* 180: 62-8. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.004.
- Fooks LJ, Gibson GR (2003)** Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe.* 9(5): 231-42. Doi: 10.1016/S1075-9964(03)00043-X.
- France MM, Turner JR (2017)** The mucosal barrier at a glance. *J Cell Sci.* 130(2): 307–314. Doi: 10.1242/jcs.193482.
- Froicu M, Cantorna MT (2007)** Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol.* 8: 5. Doi: 10.1186/1471-2172-8-5.
- Fromm M (2019)** Transport in Membranen und Epithelien. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF (eds) *Physiologie des Menschen*, 32. Aufl. Springer, Berlin. Doi: 10.1007/978-3-662-56468-4.
- Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H (2008)** Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca²⁺ Absorption between Enterocytes. *Mol Biol Cell.* 19(5): 1912–1921. Doi: 10.1091/mbc.E07-09-0973.
- Furuse M, Fujita K, Hிராgί T, Fujimoto K, Tsukita S (1998)** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141(7): 1539-50. Doi: 10.1083/jcb.141.7.1539.
- 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): 1099-111. Doi: 10.1083/jcb.200110122.
- 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(6 Pt 2): 1777-88. Doi: 10.1083/jcb.123.6.1777.
- Gan Z, Wei W, Li Y, Wu J, Zhao Y, Zhang L, Wang T, Zhong X. (2019)** Curcumin and Resveratrol Regulate Intestinal Bacteria and Alleviate Intestinal Inflammation in Weaned Piglets. *Molecules.* 24(7): 1220. Doi: 10.3390/molecules24071220.

- Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC (2001)** Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol.* 62(9): 1299-1308. Doi: 10.1016/s0006-2952(01)00775-4.
- García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J (2006)** Acute Gastroenteritis is Followed by an Increased Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 130(6): 1588-94. Doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.004.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M (2000a)** Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci.* 915: 193–203. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05242.x.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M (2000b)** Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J.* 14(12): 1749-53. Doi: 10.1096/fj.99-0898com.
- Gitter AH, Fromm M, Schulzke JD. (1998)** Impedance analysis for the determination of epithelial and subepithelial resistance in intestinal tissues. *J Biochem Biophys Methods.* 37(1-2): 35-46. Doi: 10.1016/s0165-022x(98)00016-5.
- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB (2008)** Curcumin a “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 75(4): 787-809. Doi: 10.1016/j.bcp.2007.08.016.
- Gölz G, Karadas G, Alutis ME, Fischer A, Kühl AA, Breithaupt A, Göbel UB, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM (2015)** *Arcobacter butzleri* Induce Colonic, Extra-Intestinal and Systemic Inflammatory Responses in Gnotobiotic IL-10 Deficient Mice in a Strain-Dependent Manner. *PLoS One.* 10(9): e0139402. Doi: 10.1371/journal.pone.0139402.
- González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008)** Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1778(3): 729-56. Doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.018.
- Grant CC, Konkel ME, Cieplak WJr, Tompkins LS (1993)** Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun.* 61(5): 1764–1771. Doi: 10.1128/IAI.61.5.1764-1771.1993.

- Groschwitz KR, Hogan SP (2009)** Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 124(1): 3-20; quiz 21-2. Doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE (2016)** Antibacterial effects of curcumin: An *in vitro* minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health.* 32(2): 246-50. Doi: 10.1177/0748233713498458.
- Günzel D (2017)** Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling. *Pflugers Arch.* 469(1): 35-44. Doi: 10.1007/s00424-016-1909-3.
- Günzel D, Fromm M (2012)** Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol.* 2(3): 1819-52. Doi: 10.1002/cphy.c110045.
- Günzel D, Krug SM, Rosenthal R, Fromm M (2010)** Biophysical Methods to Study Tight Junction Permeability. *Curr Top Membr.* 65: 39–78. Doi: 10.1016/S1063-5823(10)65003-X.
- Günzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, Müller D (2009)** Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci.* 122(Pt 10): 1507-17. Doi: 10.1242/jcs.040113.
- Günzel D, Yu AS (2013)** Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 93(2): 525-69. Doi: 10.1152/physrev.00019.2012.
- Guo C, Rosoha E, Lowry MB, Borregaard N, Gombart AF (2013)** Curcumin induces human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression through a vitamin D receptor-independent pathway. *J Nutr Biochem.* 24(5): 754-9. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.002.
- Gurney MA, Laubitz D, Ghishan FK, Kiela PR (2017)** Pathophysiology of Intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 3(1): 27-40. Doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.09.010.
- Ha ES, Sim WY, Lee SK, Jeong JS, Kim JS, Baek IH, Choi DH, Park H, Hwang SJ, Kim MS (2019)** Preparation and Evaluation of Resveratrol-Loaded Composite Nanoparticles Using a Supercritical Fluid Technology for Enhanced Oral and Skin Delivery. *Antioxidants* (Basel). 8(11): 554. Doi: 10.3390/antiox8110554.

- Haag LM, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kühl AA, Göbel UB, Bereswill S, Heimesaat MM (2012a)** *Campylobacter jejuni* Induces Acute Enterocolitis in Gnotobiotic IL-10^{-/-} Mice via Toll-Like-Receptor-2 and -4 Signaling. *PLoS One*. 7(7): e40761. Doi: 10.1371/journal.pone.0040761.
- Haag LM, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kühl AA, Göbel UB, Bereswill S, Heimesaat MM (2012b)** Intestinal microbiota shifts towards elevated commensal *Escherichia coli* loads abrogate colonization resistance against *Campylobacter jejuni* in mice. *PLoS One*. 7(5): e35988. Doi: 10.1371/journal.pone.0035988.
- Haddad N, Maillart G, Garénaux A, Jugiau F, Federighi M, Cappelletti JM (2010)** Adhesion Ability of *Campylobacter jejuni* to HT-29 Cells Increases with the Augmentation of Oxidant Agent Concentration. *Curr Microbiol*. 61(6): 500–505. Doi: 10.1007/s00284-010-9644-z.
- Hamza E, Kittl S, Kuhnert P (2017)** Temporal Induction of Pro-Inflammatory and Regulatory Cytokines in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *PLoS One*. 12(2): e0171350. Doi: 10.1371/journal.pone.0171350.
- Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y (2006)** Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 4(12): 1502-6. Doi: 10.1016/j.cgh.2006.08.008.
- Harrer A, Bücker R, Boehm M, Zarzecka U, Tegtmeyer N, Sticht H, Schulzke JD, Backert S (2019)** *Campylobacter jejuni* enters gut epithelial cells and impairs intestinal barrier function through cleavage of occludin by serine protease HtrA. *Gut Pathog*. 11:4. Doi: 10.1186/s13099-019-0283-z.
- Hatayama S, Shimohata T, Amano S, Kido J, Nguyen AQ, Sato Y, Kanda Y, Tentaku A, Fukushima S, Nakahashi M, Uebanso T, Mawatari K, Takahashi A (2018)** Cellular Tight Junctions Prevent Effective *Campylobacter jejuni* Invasion and Inflammatory Barrier Disruption Promoting Bacterial Invasion from Lateral Membrane in Polarized Intestinal Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 8: 15. Doi: 10.3389/fcimb.2018.00015.

- Heimesaat MM, Grundmann U, Alutis ME, Fischer A, Bereswill S (2017)** Small Intestinal Pro-Inflammatory Immune Responses Following *Campylobacter Jejuni* Infection of Secondary Abiotic IL-10^{-/-} Mice Lacking Nucleotide-Oligomerization-Domain-2. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 7(2): 138–145. Doi: 10.1556/1886.2017.00005.
- Heimesaat MM, Mousavi S, Escher U, Lobo de Sá FD, Peh E, Schulzke JD, Kittler S, Bücken R, Bereswill S (2020)** Resveratrol Alleviates Acute *Campylobacter jejuni*-Induced Enterocolitis in a Preclinical Murine Intervention Study. *Microorganisms*. 8(12): E1858. Doi: 10.3390/microorganisms8121858.
- Heimesaat MM, Mrazek K, Stefan Bereswill (2019)** Murine Fecal Microbiota Transplantation Alleviates Intestinal and Systemic Immune Responses in *Campylobacter jejuni* Infected Mice Harboring a Human Gut Microbiota. *Front Immunol*. 10: 2272. Doi: 10.3389/fimmu.2019.02272.
- 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. Doi: 10.1016/j.gastro.2005.05.002.
- Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD (2008)** Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol*. 1 Suppl 1: S58-61. Doi: 10.1038/mi.2008.46.
- Helmy YA, Kassem II, Kumar A, Rajashekara G (2017)** *In Vitro* Evaluation of the Impact of the Probiotic *E. coli* Nissle 1917 on *Campylobacter jejuni*'s Invasion and Intracellular Survival in Human Colonic Cells. *Front Microbiol*. 8: 1588. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01588.
- Hering NA, Fromm A, Kikhney J, Lee IF, Moter A, Schulzke JD, Bücken R (2016)** *Yersinia enterocolitica* Affects Intestinal Barrier Function in the Colon. *J Infect Dis*. 213(7): 1157-62. Doi: 10.1093/infdis/jiv571.
- Hering NA, Fromm A, Kikhney J, Lee IM, Moter A, Schulzke JD, Bücken R (2015)** *Yersinia enterocolitica* Affects Intestinal Barrier Function in the Colon. *J. Infect. Dis*. 123(7): 1157-1162. Doi: 10.1093/infdis/jiv571.

- Hering NA, Richter JF, Krug SM, Günzel D, Fromm A, Bohn E, Rosenthal R, Bücken R, Fromm M, Troeger H, Schulzke JD (2011)** *Yersinia enterocolitica* induces epithelial barrier dysfunction through regional tight junction changes in colonic HT-29/B6 cell monolayers. *Lab Invest.* 91(2): 310-24. Doi: 10.1038/labinvest.2010.180.
- Hickey TE, Baqar S, Bourgeois AL, Ewing CP, Guerry P (1999)** *Campylobacter jejuni*-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. *Infect Immun.* 67(1): 88-93. Doi: 10.1128/IAI.67.1.88-93.1999.
- Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL, Guerry P (2000)** *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 68(12): 6535-41. Doi: 10.1128/iai.68.12.6535-6541.2000.
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2008)** Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest.* 118: 619–628. Doi: 10.1172/JCI33970.
- Hu L, Bray MD, Osorio M, Kopecko DJ (2006)** *Campylobacter jejuni* Induces Maturation and Cytokine Production in Human Dendritic Cells. *Infect Immun.* 74(5): 2697–2705. Doi: 10.1128/IAI.74.5.2697-2705.2006.
- Hu L, Hickey TE (2005)** *Campylobacter jejuni* induces secretion of proinflammatory chemokines from human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 73(7): 4437-40. Doi: 10.1128/IAI.73.7.4437-4440.2005.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S (2005)** Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171(6): 939-45. Doi: 10.1083/jcb.200510043.
- Jain D, Prasad KN, Sinha S, Vishwakarma AL (2009)** Cell cycle arrest & apoptosis of epithelial cell line by cytolethal distending toxin positive *Campylobacter jejuni*. *Indian J Med Res.* 129(4): 418-23.
- Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL (2001)** JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol.* 39(5): 1225-36. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2001.02294.x.

- Johnson WM, Lior H (1988)** A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog.* 4(2): 115-26. Doi: 10.1016/0882-4010(88)90053-8.
- Jones MA, Töttemeyer S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA (2003)** Induction of Proinflammatory Responses in the Human Monocytic Cell Line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 71(5): 2626–2633. Doi: 10.1128/IAI.71.5.2626-2633.2003.
- Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM (2015)** Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 28(3): 687-720. Doi: 10.1128/CMR.00006-15.
- Kämpfer AAM, Urbán P, Gioria S, Kanase N, Stone V, Kinsner-Ovaskainen A (2017)** Development of an *in Vitro* Co-Culture Model to Mimic the Human Intestine in Healthy and Diseased State. *Toxicol In Vitro.* 45(Pt 1): 31-43. Doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.011.
- Kanwar RK, Ganguly NK, Kanwar JR, Kumar L, Walia BN (1994)** Impairment of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity following enterotoxigenic *Campylobacter jejuni* infection: changes in Na⁺, Cl⁻ and 3-O-methyl-D-glucose transport *in vitro*, in rat ileum. *FEMS Microbiol Lett.* 124(3): 381-5. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07312.x.
- Kermanizadeh A, Brown DM, Stone V (2019)** The variances in cytokine production profiles from non- or activated THP-1, Kupffer cell and human blood derived primary macrophages following exposure to either alcohol or a panel of engineered nano-materials. *PloS One.* 14(8): e0220974. Doi: 10.1371/journal.pone.0220974.
- Ketley JM (1997)** Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology.* 143 (Pt 1) : 5-21. Doi: 10.1099/00221287-143-1-5.
- Kim CY, Kim KH (2014)** Curcumin prevents leptin-induced tight junction dysfunction in intestinal Caco-2 Bbe cells. *J Nutr Biochem.* 25(1): 26-35. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.08.011.
- Klančnik A, Šikić Pogačar M, Trošt K, Tušek Žnidarič M, Mozetič Vodopivec B, Smole Možina S (2017)** Anti-*Campylobacter* activity of resveratrol and an extract from waste Pinot noir grape skins and seeds, and resistance of *Camp. Jejuni* planktonic and biofilm cells, mediated via the CmeABC efflux pump. *J Appl Microbiol.* 122(1): 65-77. Doi: 10.1111/jam.13315.

- Kong WJ, Xing XY, Xiao XH, Zhao YL, Wei JH, Wang JB, Yang RC, Yang MH (2012)** Effect of berberine on *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and their mixtures as determined by isothermal microcalorimetry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(2): 503-10. Doi: 10.1007/s00253-012-4302-y.
- Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE Jr, Cieplak W Jr (1997)** Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol.* 24(5): 953-63. Doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4031771.x.
- Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J (2004)** Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol.* 186(11): 3296-303. Doi: 10.1128/JB.186.11.3296-3303.2004.
- Konkel ME, Mead DJ, Hayes SF, Cieplak W Jr (1992)** Translocation of *Campylobacter jejuni* Across Human Polarized Epithelial Cell Monolayer Cultures. *J Infect Dis.* 166(2): 308-15. Doi: 10.1093/infdis/166.2.308.
- Koushiki M, Amiri-Dashatan N, Ahmadi N, Abbaszadeh HA, Rezaei-Tavirani M (2018)** Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. *Food Sci Nutr.* 6(8): 2473-2490. Doi: 10.1002/fsn3.855.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008)** Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 1778(3): 631-45. Doi: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.
- Krause-Gruszczynska M, van Alphen LB, Oyarzabal OA, Alter T, Hänel I, Schliephake A, König W, van Putten JP, Konkel ME, Backert S (2007)** Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 274(1): 9-16. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00802.x.
- 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. Doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.4.C574.
- Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Günzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M (2009)** Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell.* 20(16): 3713-3724. Doi: 10.1091/mbc.e09-01-0080.

- Krug SM, Bojarski C, Fromm A, Lee IM, Dames P, Richter JF, Turner JR, Fromm M, Schulzke JD (2018)** Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor $\alpha 2$, affects macro-molecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunol.* 11(2): 345-356. Doi: 10.1038/mi.2017.52.
- Krug SM, Günzel D, Conrad MP, Rosenthal R, Fromm A, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M (2012)** Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci.* 69(16): 2765-78. Doi: 10.1007/s00018-012-0949-x.
- Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, Bokemeyer B, Esters P, Herrlinger K, Kannengiesser K, Kienle P, Langhorst J, Lügering A, Schreiber S, Stallmach A, Stein J, Sturm A, Teich N, Siegmund B (2018)** Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol.* 56(9): 1087-1169. Doi: 10.1055/a-0651-8174.
- Kunzelmann K, Mall M (2001)** Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implication for Disease. *Physiol Rev.* 82(1): 245-89. Doi: 10.1152/physrev.00026.2001.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-5. Doi: 10.1038/227680a0.
- Lal-Nag M, Morin PJ (2009)** The claudins. *Genome Biol.* 10(8): 235. Doi: 10.1186/gb-2009-10-8-235.
- Lamb-Rosteski JM, Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG (2008)** Epidermal growth factor inhibits *Campylobacter jejuni*-induced claudin-4 disruption, loss of epithelial barrier function, and *Escherichia coli* translocation. *Infect Immun.* 76(8): 3390-8. Doi: 10.1128/IAI.01698-07.
- Lang A, Salomon N, Wu JC, Kopylov U, Lahat A, Har-Noy O, Ching JY, Cheong PK, Avidan B, Gamus D, Kaimakliotis I, Eliakim R, Ng SC, Ben-Horin S (2015)** Curcumin in Combination With Mesalamine Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 13(8): 1444-9.e1. Doi: 10.1016/j.cgh.2015.02.019.
- Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DE (2006)** Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med.* 6: 10. Doi: 10.1186/1472-6882-6-10.

- Lee A, O'Rourke JL, Barrington PJ, Trust TJ (1986)** Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect Immun.* 51(2): 536-46. Doi: 10.1128/IAI.51.2.536-546.1986.
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. (2003)** Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 309(4): 1017-26. Doi: 10.1016/j.bbrc.2003.08.105.
- Li F, Han Y, Cai X, Gu M, Sun J, Qi C, Goulette T, Song M, Li Z, Xiao H (2020)** Dietary resveratrol attenuated colitis and modulated gut microbiota in dextran sulfate sodium-treated mice. *Food Funct.* 11(1): 1063-1073. Doi: 10.1039/c9fo01519a.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019)** The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 47(8): e47. Doi: 10.1093/nar/gkz114.
- Lindmark B, Rompikuntal PK, Vaitkevicius K, Song T, Mizunoe Y, Uhlin BE, Guerry P, Wai SN (2009)** Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 9: 220. Doi: 10.1186/1471-2180-9-220.
- Ling KH, Wan ML, El-Nezami H, Wang M. (2016)** Protective Capacity of Resveratrol, a Natural Polyphenolic Compound, against Deoxynivalenol-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Bacterial Translocation. *Chem Res Toxicol.* 29(5): 823-33. Doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00001.
- Liu J, Zhang X, Yan T, Wang F, Li J, Jia L, Jia J, Hu G (2020)** Screening of an Endophyte Transforming Polydatin to Resveratrol from *Reynoutria Japonica* Hoult and the Optimization of Its Transformation Parameters. *Molecules.* 25(20): 4830. Doi: 10.3390/molecules25204830.
- Lobo de Sá FD, Butkevych E, Natramilarasu PK, Fromm A, Mousavi S, Moos V, Golz JC, Stingl K, Kittler S, Seinige D, Kehrenberg C, Heimesaat MM, Bereswill S, Schulzke JD, Bückner R (2019)** Curcumin Mitigates Immune-Induced Epithelial Barrier Dysfunction by *Campylobacter jejuni*. *Int J Mol Sci.* 20:p11: E4830. Doi: 10.3390/ijms20194830.
- Lobo de Sá FD, Heimesaat MM, Bereswill S, Natramilarasu PK, Schulzke JD, Bückner R (2021b)** Resveratrol prevents *Campylobacter jejuni*-induced leaky gut by restoring occludin and claudin-5 in the paracellular leak pathway. *Front Pharmacol.* In press.

- Lobo de Sá FD, Schulzke JD, Bücker R (2021a)** Diarrheal Mechanisms and the Role of Intestinal Barrier Dysfunction in *Campylobacter* Infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 431: 203-231. Doi: 10.1007/978-3-030-65481-8_8.
- Louwen R, Heikema A, van Belkum A, Ott A, Gilbert M, Ang W, Endtz HP, Bergman MP, Nieuwenhuis EE (2008)** The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. *Infect Immun.* 76(10): 4431-8. Doi: 10.1128/IAI.00321-08.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014)** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15(12): 550. Doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke JD (2015)** Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers.* 3(1-2): e977176. Doi: 10.4161/21688370.2014.977176.
- Luettig J, Rosenthal R, Lee IM, Krug SM, Schulzke JD (2016)** The ginger component 6-shogaol prevents TNF- α -induced barrier loss via inhibition of PI3K/Akt and NF- κ B signaling. *Mol Nutr Food Res.* 60(12): 2576-2586. Doi: 10.1002/mnfr.201600274.
- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM (2004)** TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286(3): G367-76. Doi: 10.1152/ajpgi.00173.2003.
- MacCallum A, Hardy SP, Everest PH (2005)** *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. *Microbiology.* 151(Pt 7): 2451–2458. Doi: 10.1099/mic.0.27950-0.
- MacCallum AJ, Harris D, Haddock G, Everest PH (2006)** *Campylobacter jejuni*-infected human epithelial cell lines vary in their ability to secrete interleukin-8 compared to *in vitro*-infected primary human intestinal tissue. *Microbiology.* 152(Pt 12): 3661-3665. Doi: 10.1099/mic.0.29234-0.
- Madara JL, Stafford J (1989)** Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest.* 83(2): 724-7. Doi: 10.1172/JCI113938.
- Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ (2002)** Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res.* 22(6C): 4179-81.

- Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G (1993)** Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature*. 361(6412): 552-5. Doi: 10.1038/361552a0.
- Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD (2000)** Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci*. 113 (Pt 11): 2085-90.
- Marathe SA, Balakrishnan A, Negi VD, Sakorey D, Chandra N, Chakravortty D (2016)** Curcumin Reduces the Motility of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by Binding to the Flagella, Thereby Leading to Flagellar Fragility and Shedding. *J Bacteriol*. 198(13): 1798-1811. Doi: 10.1128/JB.00092-16.
- Masashi O, Nishida A, Sugitani Y, Nishino K, Inatomi O, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A (2017)** Nanoparticle curcumin ameliorated experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. *PloS One*. 12(10): e0185999. Doi: 10.1371/journal.pone.0185999.
- Mayangsari Y, Suzuki T (2018)** Resveratrol Ameliorates Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice and Intestinal Cells. *J Agric Food Chem*. 66: 12666-12674. Doi: 10.1021/acs.jafc.8b04138.
- McCardell BA, Madden JM, Lee EC (1984)** *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Production of a Cytotoxic Toxin Immunologically Similar to Cholera Toxin. *J Food Prot*. 47(12): 943-949. Doi: 10.4315/0362-028X-47.12.943.
- McSweegan E, Walker RI (1986)** Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect Immun*. 53(1):141-8. Doi: 10.1128/IAI.53.1.141-148.1986.
- Mellits KH, Mullen J, Wand M, Armbruster G, Patel A, Connerton PL, Skelly M, Connerton IF (2002)** Activation of the transcription factor NF-kappaB by *Campylobacter jejuni*. *Microbiology (Reading)*. 148(Pt 9): 2753-2763. Doi: 10.1099/00221287-148-9-2753.
- Menco BP (1988)** Tight-junctional strands first appear in regions where three cells meet in differentiating olfactory epithelium: a freeze-fracture study. *J Cell Sci*. 89 (Pt 4): 495-505.
- Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M (2009)** Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction

protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 296(5): G1140-9. Doi: 10.1152/ajpgi.90534.2008.

Messaoudi S, Madi A, Prévost H, Feuilleley M, Manai M, Dousset X, Connil N (2012)

In vitro evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe.* 18(6): 584–589. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.004.

Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Günzel D, Müller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M (2010)

Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta.* 1798(11): 2048-57. Doi: 10.1016/j.bbamem.2010.07.014.

Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., Zandi, K (2014)

A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int.* 2014: 18684. Doi: 10.1155/2014/186864.

Mohan V (2015)

The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34(8): 1503-13. Doi: 10.1007/s10096-015-2392-z.

Monteville MR, Konkel ME (2002)

Fibronectin-Facilitated Invasion of T84 Eukaryotic Cells by *Campylobacter jejuni* Occurs Preferentially at the Basolateral Cell Surface. *Infect Immun.* 70(12): 6665–6671. Doi: 10.1128/IAI.70.12.6665-6671.2002.

Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-Mahyari H, Motevaseli E, Najafi M, Farhood B, Rosengren RJ, Sahebkar A (2019)

Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. *J Cell Physiol.* 234(8): 12537-12550. Doi: 10.1002/jcp.28122.

Mousavi S, Bereswill S, Heimesaat MM (2020)

Novel Clinical *Campylobacter jejuni* Infection Models Based on Sensitization of Mice to Lipooligosaccharide, a Major Bacterial Factor Triggering Innate Immune Responses in Human *Campylobacteriosis*. *Microorganisms.* 8(4): 482. Doi:10.3390/microorganisms8040482.

Mousavi S, Lobo de Sá FD, Schulzke JD, Bückner R, Bereswill S, Heimesaat MM (2019)

Vitamin D in Acute *Campylobacteriosis*-Results From an Intervention Study Applying a Clinical *Campylobacter jejuni* Induced Enterocolitis Model. *Front Immunol.* 10: 2094. Doi: 10.3389/fimmu.2019.02094.

- Murphy H, Cogan T, Hughes R, Humphrey T (2011)** Porcine intestinal epithelial responses to *Campylobacter* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34(6): 489-95. Doi: 10.1016/j.cimid.2011.08.005.
- Nakajima S, Ishimaru K, Kobayashi A, Yu G, Nakamura Y, Oh-Oka K, Suzuki-Inoue K, Kono K, Nakao A (2019)** Resveratrol inhibits IL-33-mediated mast cell activation by targeting the MK2/3-PI3K/Akt axis. *Sci Rep.* 9(1): 18423. Doi: 10.1038/s41598-019-54878-5.
- Nattramilarasu PK, Bücker R, Lobo de Sá FD, Fromm A, Nagel O, Lee IM, Butkevych E, Mousavi S, Genger C, Kløve S, Heimesaat MM, Bereswill S, Schweiger MR, Nielsen HL, Troeger H, Schulzke JD (2020)** *Campylobacter concisus* Impairs Sodium Absorption in Colonic Epithelium via EnaC Dysfunction and Claudin-8 Disruption. *Int J Mol Sci.* 21(2): 373. Doi: 10.3390/ijms21020373.
- Negoro S, Shimohata T, Hatayama S, Sato Y, Matsumoto M, Iba H, Aihara M, Uebanso T, Hamada Y, Nishikawa Y, Yamasaki S, Mawatari K, Takahashi A (2014)** *Campylobacter jejuni* infection suppressed Cl⁻ secretion induced by CFTR activation in T-84 cells. *J. Infect. Chemother.* 20(11): 682-8. Doi: 10.1016/j.jiac.2014.07.007.
- Newell DG, McBride H, Dolby JM (1985)** Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. *J Hyg (Lond).* 95(2): 217-27. Doi: 10.1017/s002217240006265.
- Nielsen HL, Nielsen H, Ejlersen T, Engberg J, Günzel D, Zeitz M, Hering NA, Fromm M, Schulzke JD, Bücker R (2011)** Oral and fecal *Campylobacter concisus* strains perturb barrier function by apoptosis induction in HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *PloS One.* 6(8): e23858. Doi: 10.1371/journal.pone.0023858.
- Oh YC, Kang OH, Choi JG, Chae HS, Lee YS, Brice OO, Jung HJ, Hong SH, Lee YM, Kwon DY. (2009)** Anti-inflammatory effect of resveratrol by inhibition of IL-8 production in LPS-induced THP-1 cells. *Am J Chin Med.* 37(6): 1203-14. Doi: 10.1142/S0192415X09007600.
- Ohno M, Nishida A, Sugitani Y, Nishino K, Inatomi O, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A (2017)** Nanoparticle curcumin ameliorated experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory t cells. *PloS One.* 12(10): e0185999. Doi: doi: 10.1371/journal.pone.0185999.

- Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT (2013)** Vitamin D Regulates the Gut Microbiome and Protects Mice from Dextran Sodium Sulfate–Induced Colitis. *J Nutr.* 143(10): 1679-86. Doi: 10.3945/jn.113.180794.
- Otto B, Haag LM, Fischer A, Plickert R, Kühl AA, Göbel UB, Heimesaat MM, Bereswill S (2012)** *Campylobacter jejuni* induces extra-intestinal immune responses via Toll-like-receptor-4 signaling in conventional IL-10 deficient mice with chronic colitis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2(3): 210–219. Doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.3.7.
- Pan HH, Zhou XX, Ma YY, Pan WS, Zhao F, Yu MS, Liu JQ (2020)** Resveratrol alleviates intestinal mucosal barrier dysfunction in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by enhancing autophagy. *World J Gastroenterol.* 26(33): 4945-4959. Doi: 10.3748/wjg.v26.i33.4945.
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG (2000)** The Genome Sequence of the Food-Borne Pathogen *Campylobacter Jejuni* Reveals Hypervariable Sequences. *Nature.* 403 (6770): 665-8. Doi: 10.1038/35001088.
- Pawłowska B, Sobieszkańska BM (2017)** Intestinal Epithelial Barrier: The Target for Pathogenic *Escherichia Coli*. *Adv Clin Exp Med.* 26(9): 1437-1445. Doi: 10.17219/acem/64883.
- Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ, Kopecko DJ, Bourgeois AL, Fauchere JL, Blaser MJ (1998)** Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun.* 66(3): 938-43. Doi: 10.1128/IAI.66.3.938-943.1998.
- Pei ZH, Ellison RT 3rd, Blaser MJ (1991)** Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem.* 266(25): 16363-9.
- Poly F, Guerry P (2008)** Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr Opin Gastroenterol.* 24(1): 27-31. Doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f1dcb1.
- Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD (2002)** The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer.* 86(5): 774-8. Doi: 10.1038/sj.bjc.6600197.

- 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(7): 1200-13. Doi: 10.1091/mbc.e09-08-0734.
- Rees LE, Cogan TA, Dodson AL, Birchall MA, Bailey M, Humphrey TJ (2008)** *Campylobacter* and IFN γ interact to cause a rapid loss of epithelial barrier integrity. *Inflamm Bowel Dis*. 14(3): 303–309. Doi: 10.1002/ibd.20325.
- Renaud S, de Lorgeril M. (1992)** Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 339(8808): 1523-6. Doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-f.
- Rivera-Amill V, Kim BJ, Seshu J, Konkel ME (2001)** Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J Infect Dis*. 183(11): 1607-16. Doi: 10.1086/320704.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2018)** Letzter Zugriff: 22. Februar 2021 https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html;jsessionid=BB52B35DBFE006FF33442AD04E533994.internet092.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2020)** Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019. Stand: 01.März 2020. Letzter Zugriff: 04. März 2021 https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2019.pdf?__blob=publicationFile.
- Rosenthal R, Günzel D, Piontek J, Krug SM, Ayala-Torres C, Hempel C, Theune D, Fromm M (2020)** Claudin-15 forms a water channel through the tight junction with distinct function compared to claudin-2. *Acta Physiol*. 228(1): e13334. Doi: 10.1111/apha.13397.
- Rosenthal R, Luettig J, Hering NA, Krug SM, Albrecht U, Fromm M, Schulzke JD (2017)** Myrrh exerts barrier-stabilising and –protective effects in HT-29/B6 and Caco-2 intestinal epithelial cells. *Int J Colorectal Dis*. 32(5): 623-634. Doi: 10.1007/s00384-016-2736-x.
- 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(Pt 11): 1913-21. Doi: 10.1242/jcs.060665.

- Ruiz-Palacios GM, Torres J, Torres NI, Escamilla E, Ruiz-Palacios BR, Tamayo J (1983)** Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterisation and clinical significance. *Lancet*. 2(8344): 250-3. Doi: 10.1016/s0140-6736(83)90234-9.
- Sakaguchi T, Köhler H, Gu X, McCormick BA, Reinecker HC (2002)** *Shigella Flexneri* Regulates Tight Junction-Associated Proteins in Human Intestinal Epithelial Cells. *Cell Microbiol*. 4(6): 367-81. Doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00197.x.
- Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato IV, Floch P, Benejat L, Chaves P, Pereira T, Seixas E, Machado J, Guerreiro AS (2015)** Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. *Nutrients*. 7(1): 306-20. Doi: 10.3390/nu7010306.
- Sawada N (2013)** Tight junction-related human diseases. *Pathol Int*. 63(1): 1-12. Doi: 10.1111/pin.12021.
- Schiborr C, Kocher A, Behnam D, Jandasek J, Toelstede S, Frank J (2014)** The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Mol Nutr Food Res*. 58(3): 516-27. Doi: 10.1002/mnfr.201300724.
- 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.
- Schmitz H, Fromm M, Bode H, Scholz P, Riecken EO, Schulzke JD (1996)** Tumor necrosis factor-alpha induces Cl⁻ and K⁺ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E₂. *Am J Physiol*. 271 (4 Pt 1): G669-74. Doi: 10.1152/ajpgi.1996.271.4.G669.
- Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M (2006)** Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1072: 288-99. Doi: 10.1196/annals.1326.027.
- 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. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04062.x.

- Seukep JA, Sandjo LP, Ngadjui BT, Kuete V (2016)** Antibacterial and antibiotic-resistance modifying activity of the extracts and compounds from *Nauclea pobeguini* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complement Altern Med.* 16: 193. Doi: 10.1186/s12906-016-1173-2.
- Shen L, Su L, Turner JR (2009)** Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Dig Dis.* 27(4): 443-9. Doi: 10.1159/000233282.
- Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR (2011)** Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 73: 283-309. Doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142150.
- Shi J, Barakat M, Chen D, Chen L (2018)** Bicellular Tight Junctions and Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 19(12): 3862. Doi: 10.3390/ijms19123862.
- Šikić Pogačar M, Langerholc T, Mičetić-Turk D, Možina SS, Klančnik A (2020)** Effect of *Lactobacillus* spp. on adhesion, invasion, and translocation of *Campylobacter jejuni* in chicken and pig small-intestinal epithelial cell lines. *BMC Vet Res.* 16(1): 34. Doi: 10.1186/s12917-020-2238-5.
- Singh SK, Banerjee S, Acosta EP, Lillard JW, Singh R (2017)** Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget.* 8(10): 17216-17228. Doi: 10.18632/oncotarget.15303.
- Singla V, Pratap Mouli V, Garg SK, Rai T, Choudhury BN, Verma P, Deb R, Tiwari V, Rohatgi S, Dhingra R, Kedia S, Sharma PK, Makharia G, Ahuja V (2014)** Induction with NCB-02 (curcumin) enema for mild-to-moderate distal ulcerative colitis – a randomized, placebo-controlled, pilot study. *J Crohns Colitis.* 8(3): 208-14. Doi: 10.1016/j.crohns.2013.08.006.
- Skardal A, Murphy SV, Devarasetty M, Mead I, Kang HW, Seol YJ, Zhang YS, Shin SR, Zhao L, Aleman J, Hall AR, Shupe TD, Kleensang A, Dokmeci MR, Lee SJ, Jackson JD, Yoo JJ, Hartung T, Khademhosseini A, Soker S, Bishop CE, Atala A (2017)** Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Sci Rep.* 7(1):8837. Doi: 10.1038/s41598-017-08879-x.
- Skirrow MB (1982)** *Campylobacter* enteritis – the first five years. *J Hyg (Lond).* 89(2): 175-84. Doi: 10.1017/s0022172400070704.

- Skirrow MB (1994)** Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J Comp Pathol.* 111(2): 113-49. Doi: 10.1016/s0021-9975(05)80046-5.
- Smith MC, Gheux A, Coton M, Madec S, Hymery N, Coton E (2018)** *In Vitro* Co-Culture Models to Evaluate Acute Cytotoxicity of Individual and Combined Mycotoxin Exposures on Caco-2, THP-1 and HepaRG Human Cell Lines. *Chem Biol Interact.* 281: 51-59. Doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.004.
- Speed B, Kaldor J, Cavanagh P (1984)** Guillain-Barré syndrome associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect.* 8(1): 85-6. Doi: 10.1016/s0163-4453(84)93516-3.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR (2000)** Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut.* 47: 804-11. Doi: 10.1136/gut.47.6.804.
- Staehein LA (1974)** Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol.* 39: 191-283. Doi: 10.1016/s0074-7696(08)60940-7.
- Stahl M, Ries J, Vermeulen J, Yang H, Sham HP, Crowley SM, Badayeva Y, Turvey SE, Gaynor EC, Li X, Vallance BA (2014)** A Novel Mouse Model of *Campylobacter jejuni* Gastroenteritis Reveals Key Pro-inflammatory and Tissue Protective Roles for Toll-like Receptor Signaling during Infection. *PLoS Pathog.* 10(7): e1004264. Doi: 10.1371/journal.ppat.1004264.
- Stahl M, Vallance BA (2015)** Insights into *Campylobacter jejuni* colonization of the mammalian intestinal tract using a novel mouse model of infection. *Gut Microbes.* 6(2): 143-8. Doi: 10.1080/19490976.2015.1016691.
- Stange EF, Schroeder BO (2019)** Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 13(10): 963-976. Doi: 10.1080/17474124.2019.1671822.
- Stephenson HN, John CM, Naz N, Gundogdu O, Dorrell N, Wren BW, Jarvis GA, Bajaj-Elliott M (2013)** *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide sialylation, phosphorylation, and amide/ester linkage modifications fine-tune human Toll-like receptor 4 activation. *J Biol Chem.* 288(27): 19661-72. Doi: 10.1074/jbc.M113.468298.
- Sugi K, Musch MW, Field M, Chang EB (2001)** Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by interferon gamma down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function. *Gastroenterology.* 120(6): 1393-403. Doi: 10.1053/gast.2001.24045.

- Tafazoli F, Magnusson KE, Zheng L (2003)** Disruption of Epithelial Barrier Integrity by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Requires Geranylgeranylated Proteins. *Infect Immun.* 71(2): 872–881. Doi: 10.1128/IAI.71.2.872-881.2003.
- Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada W, Noda T, Watanabe M, Suzuki Y, Tsukita S (2011)** Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 140: 913-923. Doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.006.
- Tanaka H, Yamamoto Y, Kashihara H, Yamazaki Y, Tani K, Fujiyoshi Y, Mineta K, Takeuchi K, Tamura A, Tsukita S (2016)** Claudin-21 has a paracellular channel role at tight junctions. *Mol Cell Biol.* 36(6): 954-64. Doi: 10.1128/MCB.00758-15.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999)** Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NfκB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol.* 126(3): 673-80. Doi: 10.1038/sj.bjp.0702357.
- Tsou LK, Lara-Tejero M, RoseFigura J, Zhang ZJ, Wang YC, Yount JS, Lefebvre M, Dossa PD, Kato J, Guan F, Lam W, Cheng YC, Galán JE, Hang HC (2016)** Antibacterial Flavonoids from Medicinal Plants Covalently Inactivate Type III Protein Secretion Substrates. *J Am Chem Soc.* 138(7): 2209-18. Doi: 10.1021/jacs.5b11575.
- Ussing HH (1949)** Distinction by means of tracers between active transport and diffusion. *Acta physiol. Scand.* 19: 43-56. Doi: 10.1111/j.1748-1716.1949.tb00633.x.
- Van Itallie CM, Anderson JM (2014)** Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol.* 36: 157-65. Doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.011.
- van Spreeuwel JP, Duursma GC, Meijer CJ, Bax R, Rosekrans PC, Lindeman J (1985)** *Campylobacter colitis*: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut.* 26(9): 945-51. Doi: 10.1136/gut.26.9.945.
- von Klitzing E, Ekmekci I, Kühl AA, Bereswill S, Heimesaat MM (2017)** Intestinal, extra-intestinal and systemic sequelae of *Toxoplasma gondii* induced acute ileitis in mice harboring a human gut microbiota. *PLoS One.* 12(4): e0176144. Doi: 10.1371/journal.pone.0176144.
- Wadström T, Baloda SB, Krovacek K, Faris A, Bengtson S, Walder M (1983)** Swedish isolates of *Campylobacter jejuni/coli* do not produce cytotoxic or cytotoxic enterotoxins. *Lancet.* 2(8355): 911. Doi: 10.1016/s0140-6736(83)90893-0.

- Wang J, Ghosh SS, Ghosh S (2017)** Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 312(4): C438-C445. Doi: 10.1152/ajpcell.00235.2016.
- Wang L, Srinivasan S, Theiss AL, Merlin D, Sitaraman SV (2007)** Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *J Biol Chem.* 282(11): 8219-27. Doi: 10.1074/jbc.M604068200.
- Wang N, Han Q, Wang G, Ma WP, Wang J, Wu WX, Guo Y, Liu L, Jiang XY, Xie XL, Jiang HQ (2016)** Resveratrol Protects Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Upregulating Heme Oxygenase-1 Expression. *Dig Dis Sci.* 61(9): 2522-34. Doi: 10.1007/s10620-016-4184-4.
- Wassenaar TM (1997)** Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev.* 10(3): 466–476. Doi: 10.1128/CMR.10.3.466-476.1997.
- Watari A, Yagi K, Kondoh M (2012)** A simple reporter assay for screening Claudin-4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun.* 426(4): 454-60. Doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.083.
- Watson RO, Galán JE. (2005)** Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. *Cell Microbiol.* 7(5): 655-65. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00498.x.
- Watson RO, Novik V, Hofreuter D, Lara-Tejero M, Galán JE (2007)** A MyD88-deficient mouse model reveals a role for Nramp1 in *Campylobacter jejuni* infection. *Infect Immun.* 75(4): 1994–2003. Doi: 10.1128/IAI.01216-06.
- Weiskirchen S, Weiskirchen R (2016)** Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv Nutr.* 7(4): 706-18. Doi: 10.3945/an.115.011627.
- Welkos SL (1984)** Experimental gastroenteritis in newly-hatched chicks infected with *Campylobacter jejuni*. *J Med Microbiol.* 18(2): 233-48. Doi: 10.1099/00222615-18-2-233.
- Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL (1988)** *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun.* 66(5): 1934-40. Doi: 10.1128/IAI.66.5.1934-1940.1998.
- Wine E, Chan VL, Sherman PM (2008)** *Campylobacter Jejuni* Mediated Disruption of Polarized Epithelial Monolayers Is Cell-Type Specific, Time Dependent, and Correlates

With Bacterial Invasion. *Pediatr Res.* 64(6): 599-604. Doi: 10.1203/PDR.0b013e31818702b9.

Workman MJ, Gleeson JP, Troisi EJ, Estrada HQ, Kerns SJ, Hinojosa CD, Hamilton GA, Targan SR, Svendsen CN, Barrett RJ (2017) Enhanced Utilization of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids Using Microengineered Chips. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 5(4): 669-677.e2. Doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.008.

World Health Organization (2011) Zinc supplementation in the management of diarrhea. Letzter Zugriff: 04. März 2021. https://www.who.int/elena/titles/bbc/zinc_diarrhoea/en/

Wu S, Yoon S, Zhang YG, Lu R, Xia Y, Wan J, Petrof EO, Claud EC, Chen D, Sun J (2015) Vitamin D receptor pathway is required for probiotic protection in colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 309(5): G341-9. Doi: 10.1152/ajpgi.00105.2015.

Young KT, Davis LM, Dirita VJ (2007) *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 5(9): 665-79. Doi: 10.1038/nrmicro1718.

Yu ZT, Nanthakumar NN, Newburg DS (2016) The Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Quenches *Campylobacter jejuni*-Induced Inflammation in Human Epithelial Cells Hep-2 and HT-29 and in Mouse Intestinal Mucosa. *J Nutr.* 146(10): 1980-1990. Doi: 10.3945/jn.116.230706.

Zhao L, Lee JY, Hwang DH (2011) Inhibition of pattern recognition receptor-mediated inflammation by bioactive phytochemicals. *Nutr Rev.* 69(6): 310-20. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00394.x.

Zheng J, Meng J, Zhao S, Singh R, Song W (2008) *Campylobacter*-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires *Campylobacter*-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB. *Infect Immun.* 76(10): 4498-508. Doi: 10.1128/IAI.01317-07.

Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT (1999) Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine.* 6(2): 79-84. Doi: 10.1016/S0944-7113(99)80039-7.

Zhou H, Mineshita S (2000) The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats *in vivo* and *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(3): 822-9.

- Zhu Y, Mahon BD, Froicu M, Cantorna MT (2005)** Calcium and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol.* 35(1): 217-24. Doi: 10.1002/eji.200425491.
- Zhuang Y, Wu H, Wang X, He J, He S, Yin Y (2019)** Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019: 7591840. Doi: 10.1155/2019/7591840.
- Zilbauer M, Dorrell N, Boughan PK, Harris A, Wren BW, Klein NJ, Bajaj-Elliott M (2005)** Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. *Infect Immun.* 73(11): 7281-9. Doi: 10.1128/IAI.73.11.7281-7289.2005.
- Zilbauer M, Dorrell N, Elmi A, Lindley KJ, Schüller S, Jones HE, Klein NJ, Núñez G, Wren BW, Bajaj-Elliott M (2007)** A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol.* 9(10): 2404-16. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00969.x.

I. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAY	BAY 11-7082
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
ca.	circa
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CBF	Campus Benjamin Franklin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CDT	<i>Cytolethal distending toxin</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cia	<i>Campylobacter invasive antigen</i>
CJT	<i>Campylobacter jejuni</i> Enterotoxin
CLSM	<i>Confocal laser-scanning microscopy</i> (Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie)
CMC	Carboxymethylcellulose
CpM	<i>Counts per million</i>
CT	Choleratoxin
Curc	Curcumin
DAPI	4'-6-Diamidin-2'-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DRA	<i>Down regulated in adenoma</i>
DSS	<i>Dextran sulfat sodium</i> (Natrium Dextran Sulfat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i> (epithelialer Natrium Kanal)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometer)
FBS	<i>Fetal bovin serum</i> (Fötale Kälberserum)
GR	Glukokortikoid
GS	<i>Goat serum</i> (Ziegenserum)
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (mitrogenaktivierte Protein-kinase)

MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MH	Müller Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
MR	Mineralokortikoid
MW	<i>Molecular weight</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
OMV	<i>Outer membrane vesicles</i>
ORS	<i>Oral rehydration solution</i>
P	Permeabilität
P/S-Lösung	Penicillin/Streptomycin-Lösung
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBS ⁺	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung) mit Magnesium und Calcium
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i> (Mustererkennungsrezeptoren)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP-40	Polyvinylpyrrolidone
QVD	Q-VD-Oph
R ^{epi}	Epithelialer Widerstand
Resv	Resveratrol
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
R ^t	Transepithelialer Widerstand
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Std.	Stunde
T-25	Zellkulturflasche mit 25 cm ² Wachstumsfläche
T-75	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Wachstumsfläche
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i> (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20)
TdT	Terminale desoxynucleotidyl transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> (Transepithelialer elektrischer Widerstand)
TJ	<i>Tight Junction</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>

TNB	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	<i>Units</i>
VDR	Vitamin D Rezeptor
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WST	<i>Water soluble tetrazolium</i>
ZO-1	Zonula Occludens Protein-1

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transportwege durch die Epithelschicht.....	2
Abbildung 2: Darstellung des junctionalen Komplexes.....	3
Abbildung 3: Funktionen der epithelialen Barriere.....	4
Abbildung 4: Mechanismen der sekretorischen und malabsorptiven Diarrhö, die bei einer <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion wirksam werden können..	12
Abbildung 5: Chemische Struktur des trans-Resveratrol.....	16
Abbildung 6: Chemische Struktur des Curcumins.....	18
Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer Ussingkammer.....	47
Abbildung 8: Resveratrol minimiert den durch <i>Campylobacter jejuni</i> - induzierten Barrieredefekt..	55
Abbildung 9: Einfluss von <i>Campylobacter jejuni</i> und Resveratrol auf den Makromolekülfluss..	56
Abbildung 10: Einfluss der <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion und Resveratrol- Behandlung auf die Proteinexpression der Epithelzellen.....	57
Abbildung 11: <i>Tight Junction</i> -Lokalisation nach der <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion und Resveratrol-Behandlung.....	60
Abbildung 12: Apoptose-Induktion in <i>Campylobacter jejuni</i> -infizierten HT-29/B6- GR/MR-Zellen und der antiapoptotische Einfluss von Resveratrol.....	61
Abbildung 13: Einfluss der Zytokin-Stimulation und Resveratrol-Behandlung auf die Fluorescein-Permeabilität.....	62
Abbildung 14: Experimentelles Setting des neu etablierten Co-Kultur-Modells mit HT-29/B6-GR/MR-Epithelzellen und THP-1-Immunzellen..	63
Abbildung 15: <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion von Epithelzell-Monokulturen (HT-29/B6-GR/MR) und von Co-Kulturen (HT-29/B6-GR/MR zusammen mit THP-1-Makrophagen).....	64
Abbildung 16: Curcumin inhibiert den durch <i>Campylobacter jejuni</i> - induzierten Barrieredefekt <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	66
Abbildung 17: Curcumin verbessert die <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierte Erhöhung der Permeabilität für Fluorescein.....	67
Abbildung 18: Zytokinsekretion der Co-Kultur nach <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion und Curcumin-Behandlung.....	68
Abbildung 19: <i>Tight Junction</i> -Proteinexpression der Epithelzellen aus der Co-Kultur.....	69
Abbildung 20: <i>Tight Junction</i> -Proteinexpression im Kolangewebe von IL-10 ^{-/-} -Mäusen....	70
Abbildung 21: Claudin-Verteilung in der Co-Kultur nach <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion und Curcumin-Behandlung.....	73

Abbildung 22: Apoptose-Induktion in <i>Campylobacter jejuni</i> -infizierten Co-Kulturen.....	74
Abbildung 23: Barriere-relevante Apoptose-Induktion durch die <i>Campylobacter jejuni</i> -Infektion.....	75
Abbildung 24: Der NF- κ B-Signalweg ist Barriere-relevant.....	76
Abbildung 25: Mehrstufige Events während der durch <i>Campylobacter jejuni</i> -induzierten Barrieredysfunktion.....	84
Abbildung 26: Exemplarischer Occludin-Western Blot <i>C. jejuni</i> -infizierter Resveratrol-behandelter HT-29/B6-GR/MR-Zellen.....	X
Abbildung 27: Exemplarische HE-Färbung der <i>C. jejuni</i> -infizierten und Curcumin-behandelten IL-10 ^{-/-} -Mäuse.....	X
Abbildung 28: <i>C. jejuni</i> -induzierte Zytokinsekretion in der Co-Kultur.....	XI

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und zugehörige Hersteller	21
Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien.....	25
Tabelle 3: Verwendete Geräte und zugehörige Hersteller	28
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	31
Tabelle 5: Verwendete gebrauchsfertige Kits	35
Tabelle 6: Primärantikörper.....	36
Tabelle 7: Sekundärantikörper	37
Tabelle 8: Verwendete Software	38
Tabelle 9: Auszug der Upstream-Regulator-Analyse mittels IPA von Kolonbiopsien von <i>Campylobacter jejuni</i> -infizierten Patienten.....	53
Tabelle 10: Einfluss von <i>Campylobacter jejuni</i> und Resveratrol auf die <i>Tight</i> <i>Junction</i> -Proteinexpression der Epithelzellen.....	57
Tabelle 11: Upstream-Regulator-Analyse mittels IPA von Epithelzellen aus der <i>Campylobacter jejuni</i> -infizierten Co-Kultur.....	77
Tabelle 12: Upstream-Regulator-Analyse mittels IPA von Epithelzellen aus der <i>Campylobacter jejuni</i> -infizierten mit 50 µM Curcumin behandelten Co-Kultur.....	78

IV. Verzeichnis der Publikationen

Mousavi S, Lobo de Sá FD, Schulzke JD, Bücken R, Bereswill S, Heimesaat MM (2019)

Vitamin D in Acute Campylobacteriosis-Results From an Intervention Study Applying a Clinical Campylobacter jejuni Induced Enterocolitis Model. *Front Immunol.* 10: 2094. Doi: 10.3389/fimmu.2019.02094.

Lobo de Sá FD, Butkevych E, Nattramilarasu PK, Fromm A, Mousavi S, Moos V, Golz

JC, Stingl K, Kittler S, Seinige D, Kehrenberg C, Heimesaat MM, Bereswill S, Schulzke JD, Bücken R (2019) Curcumin Mitigates Immune-Induced Epithelial Barrier Dysfunction by *Campylobacter jejuni*. *Int J Mol Sci.* 20(19): 4830. Doi: 10.3390/ijms20194830.

Nattramilarasu PK, Bücken R, Lobo de Sá FD, Fromm A, Nagel O, Lee IM, Butkevych

E, Mousavi S, Genger C, Kløve S, Heimesaat MM, Bereswill S, Schweiger MR, Nielsen HL, Troeger H, Schulzke JD (2020) *Campylobacter concisus* Impairs Sodium Absorption in Colonic Epithelium via ENaC Dysfunction and Claudin-8 Disruption. *Int J Mol Sci.* 21(2): 373. Doi: 10.3390/ijms21020373.

Butkevych E, Lobo de Sá FD, Nattramilarasu PK, Bücken R (2020) Contribution of Epithelial Apoptosis and Subepithelial Immune Responses in *Campylobacter jejuni*-Induced Barrier Disruption. *Front Microbiol.* 11: 344. Doi: 10.3389/fmicb.2020.00344.

Heimesaat MM, Mousavi S, Escher U, Lobo de Sá FD, Peh E, Schulzke JD, Kittler S,

Bücken R, Bereswill S (2020) Resveratrol Alleviates Acute *Campylobacter jejuni*-Induced Enterocolitis in a Preclinical Murine Intervention Study. *Microorganisms.* 8(12): 1858. Doi: 10.3390/microorganisms8121858.

Nattramilarasu PK, Lobo de Sá FD, Schulzke JD, Bücken R (2021) Immune-mediated

Aggravation of the *Campylobacter concisus*-induced Epithelial Barrier Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 22(4): 2043. Doi: 10.3390/ijms22042043.

Lobo de Sá FD, Schulzke JD, Bücken R (2021) Diarrheal Mechanisms and the Role of

Intestinal Barrier Dysfunction in *Campylobacter* Infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 431: 203-231. Doi: 10.1007/978-3-030-65481-8_8.

Lobo de Sá FD, Heimesaat MM, Bereswill S, Nattramilarasu PK, Schulzke JD, Bücken

R (2021) Resveratrol prevents from *Campylobacter jejuni*-induced leaky gut by restoring occludin and claudin-5 in the paracellular leak pathway. *Front Pharmacol.* In press.

Lobo de Sá FD, Backert S, Böhm M, Natramilarasu PK, Mousavi S, Bereswill S, Heimesaat MM, Schulzke JD, Bücker R. Suppression of vitamin D receptor signaling by *Campylobacter jejuni* and recovery of epithelial barrier dysfunction by vitamin D treatment. In preparation.

V. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen erscheint der Lebenslauf nicht in der Online-Version.

VI. Anhang

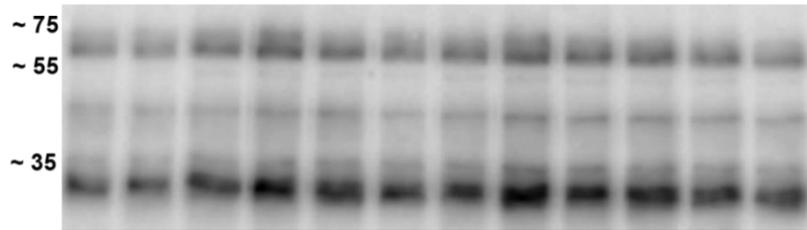


Abbildung 26: Exemplarischer Occludin-Western Blot *C. jejuni*-infizierter Resveratrol-behandelter HT-29/B6-GR/MR-Zellen. HT-29/B6-GR/MR-Zellen wurden 48 Std. mit *C. jejuni* inkubiert und mit 100 μ M Resveratrol-behandelt. Das Protein aus Gesamtzellysate wurde isoliert und mittels Western Blot-Technik wurde die Proteinexpressionsänderung des TJ-Proteins Occludin quantifiziert. Banden von links nach rechts: 1.1 Kontrolle, 2.1 *C. jejuni*, 3.1 Resveratrol, 4.1 Resveratrol + *C. jejuni*. Es folgt die zweite und dritte Probe: 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 1.3, 2.3, 3.3, 4.3.

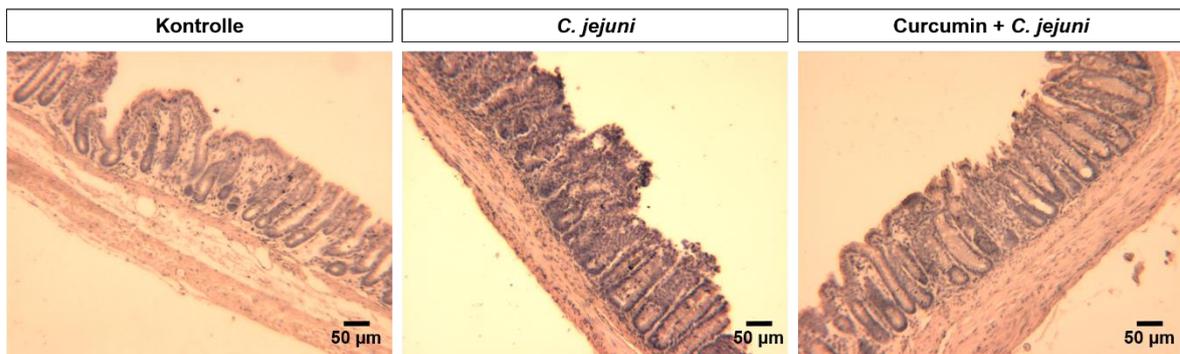


Abbildung 27: Exemplarische HE-Färbung der *C. jejuni*-infizierten und Curcumin-behandelten IL-10^{-/-}-Mäuse. Formalin-fixierte Kolonbiopsien der *C. jejuni*-infizierten und Curcumin-behandelten IL-10^{-/-}-Mäuse wurden mittels HE-Färbung und Durchlichtmikroskopie visualisiert (10-fache Vergrößerung). Mithilfe der Image J-Software wurde die mukosale Oberfläche anhand der Kryptenbreite, -länge und -anzahl berechnet. Der Widerstand der *C. jejuni*-infizierten und Curcumin-behandelten Tiere resultierte aus dem gemessenen Widerstand, welcher mit dem Korrekturfaktor verrechnet wurde. Maßstab 50 μ m.

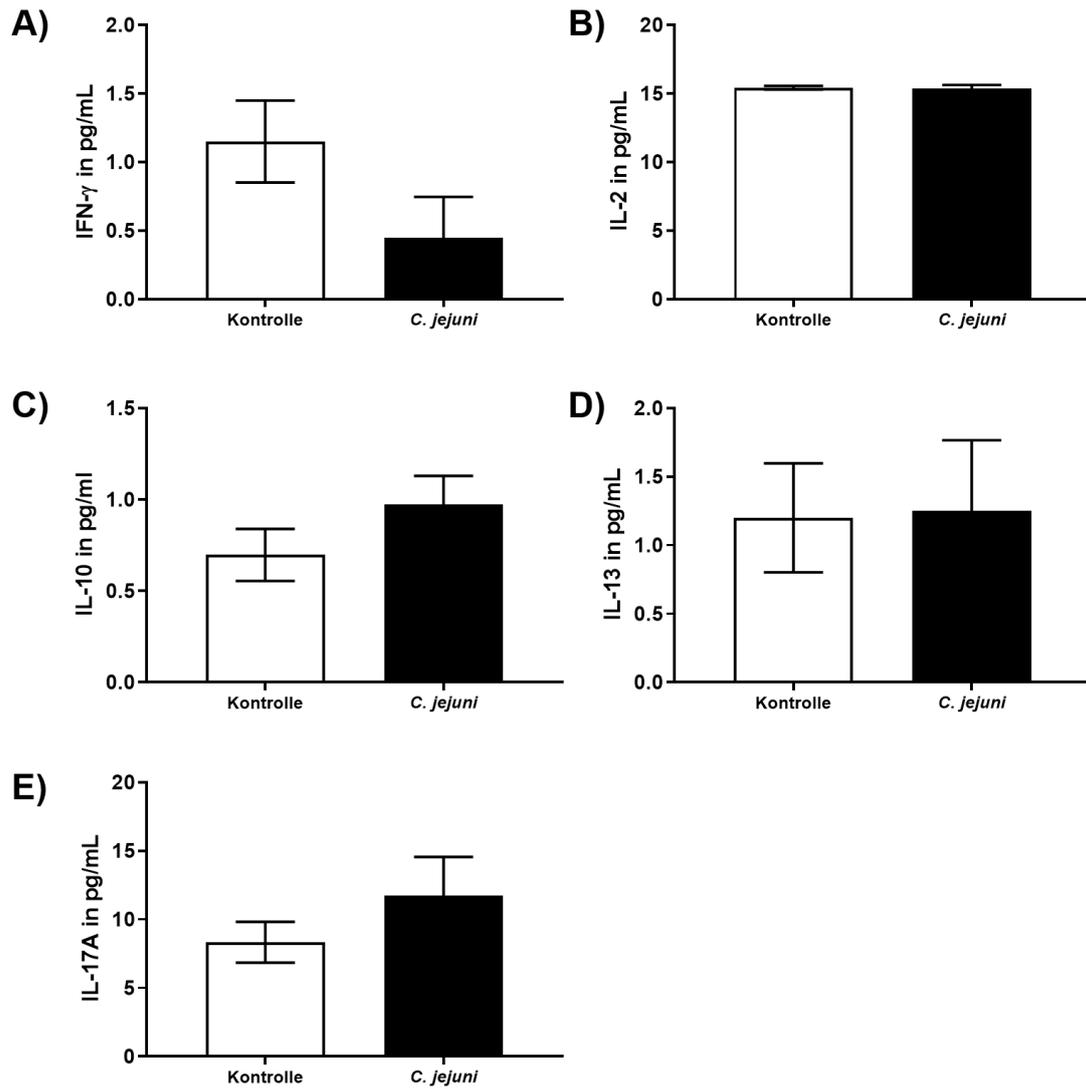


Abbildung 28: *C. jejuni*-induzierte Zytokinsekretion in der Co-Kultur. Das Co-Kultur-Modell B bestehend aus HT-29/B6-GR/MR und THP-1 wurde mit *C. jejuni* infiziert. Die Zytokine **A)** IFN- γ , **B)** IL-2, **C)** IL-10, **D)** IL-13, **E)** IL-17A wurden 48 Std. nach der Infektion in den Überständen mittels Cytometric Bead Array und dem FACS Canto II quantifiziert.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei gebührt ein besonderer Dank Herrn PD Dr. Roland Bücken und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke für die Vergabe dieses überaus spannenden Themas, für ihre großartige fachliche Unterstützung, ihre immer offen stehende Tür und die sehr gute Zusammenarbeit. Ebenso geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber für die universitäre Betreuung und die konstruktiven Diskussionen. Prof. Dr. Michael Fromm danke ich für seine anregenden Ideen, die Durchsicht von Publikationen sowie dieser Arbeit.

Für die Förderung möchte ich mich beim BMBF und das PAC CAMPY-Konsortium bedanken. Ein besonderer Dank geht ebenso an PD Dr. Rita Rosenthal und Prof. Dr. Dorothee Günzel für die hilfreichen Anregungen und kreativen Diskussionen sowie die Möglichkeit diese Arbeit in Assoziation zum Graduiertenkollege TJ-Train DFG GRK2318 anzufertigen.

Anja Fromm, In-Fah Maria Lee, Britta Jebautzke und Claudina Heldt danke ich herzlich für die hervorragende technische Assistenz, die vielen guten Tipps bei der Durchführung von Experimenten und ihre hilfsbereite Unterstützung.

Unseren Kooperationspartner PD Dr. Markus M. Heimesaat und Prof. Dr. Stefan Bereswill danke ich, für die angenehme Zusammenarbeit bei den *in vivo*-Versuchen. Bei Frau Prof. Dr. Michal-Ruth Schweiger möchte ich mich für die RNA-Sequenzierung und bei Oliver Nagel für die bioinformatische Auswertung bedanken.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden von Herzen bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle aus fremden Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommenen Aussagen sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Berlin, den _____

Fábia Daniela Lobo da Fonseca de Sá