

**Die protektive Wirkung von Zink auf *Escherichia coli*  
 $\alpha$ -Hämolysin-induzierte Darm-Läsionen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades der  
Doktorin der Biologie (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von  
Stephanie Wiegand  
aus Berlin

2017

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von PD Dr. Roland Bücke von März 2012 bis Dezember 2016 im Institut für Klinische Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

**Erstgutachter: PD Dr. Roland Bücke**  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Institut für Klinische Physiologie  
Hindenburgdamm 30  
12200 Berlin  
Tel.: +49 (0) 30 450 514546  
E-Mail: roland.buecker@charite.de

**Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel**  
Freie Universität Berlin  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Institut für Biologie  
Königin-Luise-Str. 12-16  
14195 Berlin  
Tel.: +49 (0) 30 838 53116  
E-Mail: rupert.mutzel@fu-berlin.de

Disputation am 6. April 2017

Meinen Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1	Die intestinale epitheliale Barriere .....	9
1.1.1	Funktion des Darmepithels .....	9
1.1.2	Störung der intestinalen Barriere und pathophysiologische Konsequenzen.....	9
1.1.3	Bakterielle Translokation.....	11
1.1.4	Tight Junctions.....	13
1.1.5	Tight Junctions als Effektor multipler Invasionsstrategien .....	15
1.2	Die intestinale Mikrobiota.....	16
1.2.1	Das keimfreie Tiermodell .....	17
1.2.2	<i>Escherichia coli</i> .....	18
1.2.3	Alpha-Hämolysin (HlyA).....	19
1.3	Zink .....	23
1.3.1	Zink Therapie bei gastrointestinalen Erkrankungen.....	24
1.4	Fragestellung der Arbeit.....	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1	Geräte, Materialien, Reagenzien .....	27
2.1.1	Geräte .....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.3	Laborchemikalien.....	29
2.1.4	Lösungen und Puffer.....	31
2.1.5	Effektoren und parazelluläre Marker.....	33
2.1.6	Kits und Lösungen .....	33
2.2	Fütterungs- und Infektionsmodell in der Maus.....	34
2.2.1	Haltung und Fütterung der Mäuse der Zinkstudie.....	34
2.2.2	Bakterienkultur und Darmkolonisationsmodell.....	34
2.2.3	Körpergewicht der Tiere.....	35
2.2.4	Keimzahlbestimmung.....	35

---

2.2.5	Analyse der Zn <sup>2+</sup> -Konzentrationen im Darminhalt.....	36
2.3	Klinische Parameter.....	36
2.3.1	Klinischer Kolitis-Score .....	36
2.3.2	Histopathologie .....	37
2.4	Elektrophysiologische Methoden .....	38
2.4.1	Ussing-Technik .....	38
2.4.2	Messvorbereitungen für die Ussing-Kammer.....	40
2.4.3	Permeabilität des Kolonepithels gegenüber Makromolekülen.....	40
2.4.4	Messung des transepithelialen Widerstands eines Zellmonolayers .....	41
2.5	Zellbiologische Methoden .....	41
2.5.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	41
2.5.2	Zellmonolayer auf Filtermembranen .....	41
2.5.3	Bakterielles Infektionsmodell <i>in vitro</i> .....	42
2.5.4	Bakterienproliferation in zinkhaltigem Medium .....	42
2.6	Biochemische Methoden.....	43
2.6.1	Proteinextraktion .....	43
2.6.2	Bestimmung der Proteinquantität.....	43
2.6.3	SDS-PAGE .....	44
2.6.4	Western Blotting und Immundetektion .....	44
2.6.5	Calprotectin Bestimmung mittels ELISA .....	45
2.7	Histochemische Methoden.....	45
2.7.1	Fixierung .....	45
2.7.2	H&E-Färbung .....	46
2.7.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	46
2.7.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	48
2.7.5	<i>Live Cell Imaging</i> .....	48
2.7.6	Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in humanen Kolon Epithelzellen.....	49

---

---

2.8	Statistische Auswertungen.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1	Die protektive Wirkung von Zink auf HlyA <sup>+</sup> - <i>E. coli</i> -536-induzierte Barriere-defekte im Mausmodell.....	51
3.1.1	Epitheliale Barriere, mukosale Integrität und Markerfluxe .....	51
3.1.2	Bestimmung der luminalen Zn <sup>2+</sup> Konzentration .....	53
3.1.3	Zink verringert fokale Läsionen im α-Hämolysin <i>E. coli</i> -infizierten Mauskolon ...	54
3.1.4	Zink hemmt die Translokation von intestinalen <i>E. coli</i> .....	57
3.1.5	Detektion von Calprotectin.....	58
3.1.6	Zink mildert die Kolitis-Aktivität in HlyA <sup>+</sup> <i>E. coli</i> kolonisierten Mäusen.....	59
3.1.7	Histopathologie .....	60
3.2	Analyse des protektiven Zinkeffektes an Zellkulturmodellen <i>in vitro</i> .....	62
3.2.1	Zink schützt gegen HlyA <sup>+</sup> -induzierte Barrierschäden in einem humanen Epithelzellmodell. ....	62
3.2.2	Zink hat keinen Effekt auf die bakterielle Proliferation .....	64
3.2.3	Zink zeigt keinen Einfluss auf den Proteingehalt von HlyA in HT-29/B6 Zellen...	65
3.2.4	Zink hemmt die HlyA-induzierte Erhöhung von intrazellulärem Ca <sup>2+</sup> und den anschließenden Barriere-defekt. ....	66
3.2.5	Der HlyA <sup>+</sup> -vermittelte Barriere-defekt wird durch Erhöhung von [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> induziert. ....	67
3.2.6	Die HlyA-induzierte intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> Erhöhung verursacht epitheliale Exfoliation und zelluläre Extrusion in HT-29/B6 Epithelzellen .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1	Die Zink-Supplementierung inhibiert HlyA <sup>+</sup> -induzierte Barriereeffekte im Mauskolon	69
4.2	Zink mindert die Translokation von HlyA <sup>+</sup> <i>E. coli</i> im Mauskolon .....	70
4.3	Hypothesen zu den Mechanismen der Zinkwirkung am Epithel .....	72
4.4	Zinkdosen, Zinkmangel.....	80
4.5	Die Wahl des keimfreien Tiermodells bei Entzündungsvorgängen .....	81
4.6	Ausblick.....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>

---

---

<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

AerA	Aerolysin aus <i>Aeromonas hydrophila</i>
Akt/PKB	Akt/Proteinkinase B
AIDA	engl. <i>Advanced Image Data Analyzer</i>
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
C.I.	Konfidenzintervall
Ca	Calcium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
cAMP	engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CAR	engl. Coxsackievirus and Adenovirus Receptor
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Cl	Chlor
Cldn	Claudin
CNF1	cytotoxischer nekrotisierender Faktor 1
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNBS	Dinitrobenzolsulfonsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
E-cad	E-cadherin
ELISA	Enzymimmunoassay (enzyme linked immunosorbent assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETEC	enterotoxisches <i>E. coli</i>
EtOH	Ethanol
FD4	FITC-Dextran 4 kDa
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GALT	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (gut associated lymphoid tissue)
GI	gastrointestinal
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HDM	Hämolysin-defiziente-Mutante
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
Hg	Quecksilber
HlyA	α-Hämolysin
HRP	Horseradish Peroxidase
IBD	engl. <i>Inflammatory bowel disease</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAM	junctionales Adhäsionsmolekül
K	Kalium
KBE	Koloniebildende Einheit
La	Lanthan
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LB	Luria Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MFPs	Membranfusions Proteine
MT	Metallothionein

---

MW	Mittelwert
N	Anzahl
Na	Natrium
NF-κB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Occl	Occludin
OVA	Ovalbumin A
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
P2X	Purinerger Rezeptor, ATP aktiviert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCF	polycarbonate filter
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFT	engl. <i>pore forming toxin</i>
Pic	protease involved in intestinal colonisation
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	engl. <i>radio immuno precipitation assay</i>
Rpm	Rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RTX	engl. <i>Repeat in toxin</i>
SARS	schweres akutes respiratorisches Syndrom
Sat	sezernierte Autotransporter-Toxin
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i>
SFB	Sonderforschungsbereich
SPATE	Serinproteasen-Autotransporter der <i>Enterobacteriaceae</i>
T1SS	engl. <i>Type 1 secretion system</i>
TAMP	TJ-assoziierte MARVEL-Proteine
TBST	engl. <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TER	Transepithelialer Widerstand (Resistance)
TMEM	Calcium-aktivierter Chlorid-Kanal
TNF	Tumornekrosefaktor
ToIC	engl. <i>tolerance to colicins (outer membrane protein)</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	engl. <i>transient receptor potential</i>
U	Units, Enzymeinheit
ü/N	über Nacht
UC	engl. <i>ulcerative colitis</i>
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
w/	mit (engl. <i>with</i> )
w/o	ohne (engl. <i>without</i> )
WHO	Weltgesundheitsbehörde
x g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
ZIP	engl. <i>Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like Proteins</i>
Zn	Zink
ZnAc	Zinkacetat
ZnO	Zinkoxid
ZnT	Zinktransporter
ZO lat.	<i>Zonula occludens</i>

---

---

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: Zusammensetzung der Spezialdiät mit 15- oder 500 mg Zink/kg Supplementierung</b>	<b>.34</b>
<b>Tabelle 2: Klinischer Kolitis-Score, modifiziert* nach Araki et al.</b>	<b>.....37</b>
<b>Tabelle 3: Additiver histopathologischer Entzündungsscore, nach Katakura et al.</b>	<b>.....38</b>
<b>Tabelle 4: Bestimmung der luminalen Zink-Konzentration im Darminhalt.</b>	<b>.....53</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die epitheliale Barriere bei intestinaler Entzündung. ....	13
Abbildung 2: Epitheliale Interzellularkontakte.....	14
Abbildung 3: $\alpha$ -Hämolysin-Domänenstruktur und Funktionen. ....	21
Abbildung 4: <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ -Hämolysin (HlyA)-induzierte fokale Läsionen im Kolonepithel. .....	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer mit eingespannter Gewebeprobe (Epithel) nach Altmeyer 2016. ....	39
Abbildung 6: Effekt von Zink auf HlyA <sup>+</sup> -induzierte Barrieredefekte im Mauskolon. ....	52
Abbildung 7: Zink reduziert Anzahl und Größe von HlyA <sup>+</sup> -induzierten fokalen Läsionen im Mauskolon.....	55
Abbildung 8: Zink schützt vor Translokation von <i>E. coli</i> in andere Organe.....	57
Abbildung 9: Calprotectin in den Fäzes der Tiere.....	58
Abbildung 10: Klinischer Kolitis Score. ....	59
Abbildung 11: Histopathologischer Score der mit HlyA <sup>+</sup> - <i>E. coli</i> kolonisierten Mauskolon- Mukosa mit und ohne Zink. ....	61
Abbildung 12: Schützende Wirkung von Zink und Barium auf HlyA <sup>+</sup> -infizierte humane Kolonzellen. ....	63
Abbildung 13: Zink beeinflusst nicht die Proliferation von <i>E. coli</i> 536. ....	64
Abbildung 14: HlyA <sup>+</sup> Proteinexpression und -sekretion wird in zinkhaltigem Medium nicht beeinflusst.....	65
Abbildung 15: Zink mildert die HlyA <sup>+</sup> -induzierte Zunahme von intrazellulärem Ca <sup>2+</sup> . ....	66
Abbildung 16: Verhinderung des Barriere-Effekts in HlyA <sup>+</sup> -behandelten Zellen unter dem Ca <sup>2+</sup> - Chelator BAPTA-AM.....	67
Abbildung 17: Live Cell Imaging. ....	68
Abbildung 18: Einfluss von PFTs auf die Wirtzell-Biologie.....	76
Abbildung 19: Sequenzielle Ereignisse implizieren die Entstehung der HlyA-induzierten fokalen Läsionen und die protektive Wirkung von Zink auf die intestinale Barrierefunktion. ....	80

---

# 1 Einleitung

## 1.1 **Die intestinale epitheliale Barriere**

Intestinale Epithelien grenzen das Körperinnere vom Lumen, also der Außenwelt, ab und repräsentieren dabei gleichzeitig eine Struktur mit zwei wesentlichen Funktionen: Die effiziente Regulation des Stofftransportes zwischen internem und externem Milieu und die Formierung einer Schutzbarriere gegenüber Noxen, wie Toxinen oder mikrobiellen Antigenen.

### 1.1.1 Funktion des Darmepithels

Der menschliche Darm besitzt die größte epitheliale Fläche, an der sich der Organismus mit potentiell pathogenen Einflüssen der Umwelt auseinandersetzen muss. Im Laufe der Evolution entwickelten sich diverse Schutzmechanismen, welche in ihrer Gesamtheit als „intestinale Barriere“ bezeichnet werden. Diese setzt sich aus physiologischen luminalen und epithelialen Darmmikroorganismen, dem Epithel mit Mukusschicht und Teilen des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT; "gut associated lymphoid tissue") zusammen, außerdem ist die Sekretion antimikrobieller Peptide wie Defensine oder Lysozym dabei von Bedeutung. Die Epithelschicht besteht aus einer para- und einer transzellulären Barriere und fungiert als Permeabilitätsschranke. Zwei Wege der Passage sind durch das Epithel möglich: Der transzelluläre Weg durch die apikale und basolaterale Zellmembran und der parazelluläre Weg durch den Interzellularspalt und die Tight Junctions.

### 1.1.2 Störung der intestinalen Barriere und pathophysiologische Konsequenzen

Verschiedene Erkrankungen sind mit einer epithelialen Barrierestörung und einer resultierenden erhöhten Permeabilität für verschiedene Stoffe assoziiert. Die gestörte Transport- und Barrierefunktion interferiert mit den normalen absorbierenden und sekretorischen Funktionen des Darmepithels und bedingt eine pathologisch gesteigerte Ionenpermeabilität. So diffundieren Solute und Wasser teilweise ungehindert aus der systemischen Zirkulation in das intestinale Lumen, was sich klinisch in Durchfällen manifestieren kann (Leckflux-Diarrhoe) (Sandle et al., 1990). Infektiöse Erreger oder deren Toxine können einerseits die Transport- und Barrierefunktion des Epithels direkt manipulieren (Fasano & Nataro 2004; Stephen 2001), andererseits ist eine Störung der Barrierefunktion oft Ursache oder auch Folge von Entzündungen der Darmmukosa. Makromoleküle und Antigene aus dem intestinalen Lumen können auf Grund einer

---

durchlässigen intestinalen Barriere in den Organismus übertreten und dort zur Entstehung oder Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen beitragen (*Leaky Gut*-Konzept). Beispiele hierfür sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) (Powell, 1981; Hollander, 1999). Der Begriff CED fasst verschiedene Krankheitsbilder unterschiedlicher Genese zusammen, als die beiden wichtigsten sind hierbei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu nennen. Es wird angenommen, dass CED durch eine inadäquate Reaktion des Immunsystems auf die luminale Mikrobiota ausgelöst werden. Dabei scheinen sowohl primäre als auch sekundäre Barrierestörungen für die Erkrankungen eine Rolle zu spielen, d.h. primäre Barrieredefekte mit einer vermehrten Exposition luminaler Antigene und eine sekundäre Barrierestörung in Folge der gesteigerten Immunaktivität auf die luminalen Antigene. Für die Entstehung werden verschiedene Faktoren diskutiert: Genetische Prädispositionen, Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, Mikrozirkulationsstörungen in der Darmmukosa, pathologische Veränderungen im Immunsystem. Belastungsfaktoren, wie Infektionen, Schadstoffe und die spezifische Ernährung können ebenfalls ursächlich sein (McKay, 1999). Der Konsum einer westlichen Ernährung in Kombination mit der intestinalen Mikrobiota und einer genetischen Anfälligkeit kann die Beschleunigung der IBD-Pathogenese bewirken (Dixon et al., 2015). Bei CED werden Diarrhoen im Wesentlichen durch eine reduzierte aktive Resorption (Malabsorption) und einen gesteigerten Leckflux aufgrund einer gestörten Tight Junction-Funktion verursacht und nicht durch eine gesteigerte Anionensekretion, die z.B. für die Cholera-toxin-bedingte Diarrhoe bekannt ist (Bürgel et al., 2002).

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und im Krankheitsverlauf der CED (Braegger & MacDonald, 1994). Im menschlichen Dünn- und Dickdarm werden diese Botenstoffe von verschiedenen Zellen gebildet. Sie vermitteln verschiedene Funktionen im Intestinaltrakt, wie die Steuerung und Regulation von Entzündungsprozessen sowie die Regulation von Wundheilungsvorgängen. Im Zusammenhang der CED unterscheidet man pro-inflammatorische Mediatoren, die eine Entzündung verursachen und potenzieren können und anti-inflammatorische Zytokine, die eine Entzündungsreaktion abschwächen und beenden können. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-1, IL-8, IL-12, IL-13 und IL-18, zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem IL-2, IL-4, IL-10 und IL-11. Bei CED ist das Gleichgewicht zwischen pro-entzündlichen und anti-entzündlichen Zytokinen dahingehend gestört, dass die entzündungsfördernden Mechanismen überwiegen. Als Beispiel dafür kann in einem Mausmodell eine Kolitis experimentell erzeugt werden (Oxazolone-Colitis) und damit eine Colitis ulcerosa ähnelnde CED simuliert werden, wobei die Wirkung von IL-13 auf die Epithelzellen des Kolons von besonderer Bedeutung ist (Heller et al., 2005). IL-13 führt

---

unter Beteiligung von PKC Isoformen zu einer Modulation der Tight Junction (Ceponis et al., 2000). Der Effekt von IL-13 konnte in einer humanen Kolonepithelzelllinie (HT-29/B6) in vitro nachvollzogen werden. Es zeigten sich Veränderungen der Tight Junction, eine Erhöhung der Apoptoserate und eine verlangsamte Wundheilung durch Hemmung der Zellmigration (Heller et al., 2005).

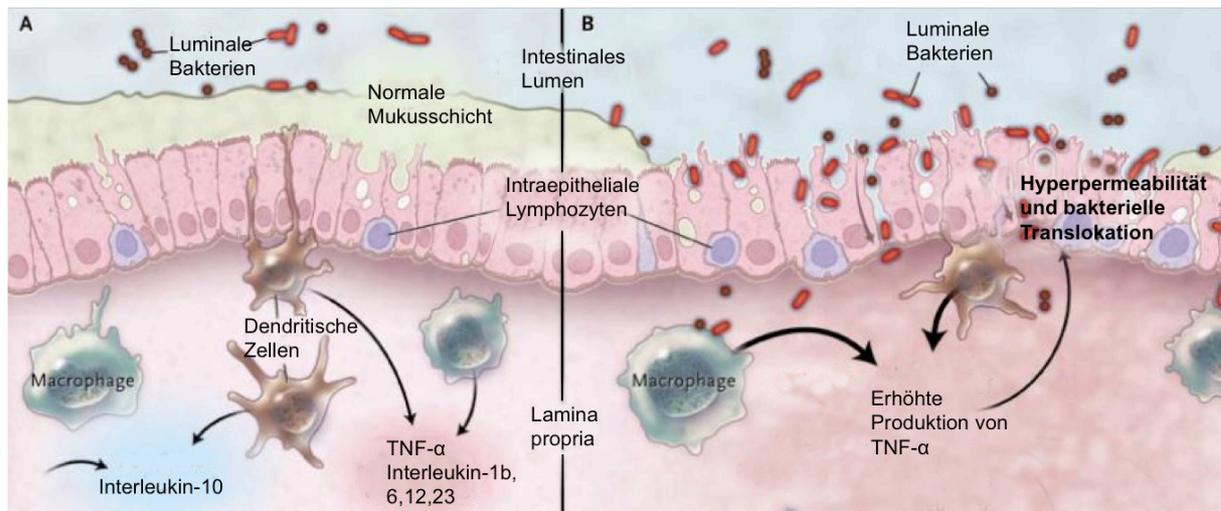
Die Barriereintegrität kann durch Zelltodmechanismen vorübergehend oder langfristig beeinträchtigt werden. Der Zelltod kann nach seinem morphologischen Erscheinungsbild (das apoptotisch, nekrotisch, autophagisch oder mit einer Mitose assoziiert sein kann), mittels enzymologischer Kriterien (mit und ohne die Caspasen, Calpaine, Cathepsine und Transglutaminasen), nach funktionellen Aspekten (programmiert oder zufällig, physiologisch oder pathologisch) oder nach immunologischen Eigenschaften (immunogen oder nicht immunogen) klassifiziert werden. Der Zelltod beendet normale zelluläre Funktionen, einschließlich der Atmung, des Metabolismus, des Wachstums und der Proliferation. Als Folge von Verletzungen oder Traumata existieren auch nicht-programmierte Zelltodmechanismen. Arten des programmierten Zelltods schließen Anoikis, Apoptose, Autophagie, Nekrose, Nekroptose und Pyroptose ein (Kroemer et al., 2009).

### 1.1.3 Bakterielle Translokation

Der Darm stellt neben seiner Funktion als Verdauungs- und Ausscheidungsorgan ebenfalls ein wichtiges immunologisches Organ dar. Über 80% des immunologischen Gewebes des Körpers ist im Gastrointestinaltrakt lokalisiert und 90% der im Blut zirkulierenden Antikörper sind spezifisch für intestinale Bakterien (Eckmann et al., 1995). Im intestinalen Lumen existieren je nach Darmabschnitt sehr hohe Bakterienzahlen, die in distalen Darmkompartimenten bis zu  $10^{12} - 10^{14}$  Bakterien/ml Fäzes erreichen können (Simon & Gorbach, 1986), was die Notwendigkeit einer effizienten Barriere gegenüber benachbarten angrenzenden funktionalen Systemen wie Blut und Lymphe verdeutlicht. Das Phänomen der Passage von Bakterien oder bakteriellen Produkten aus dem intestinalen Lumen durch die Darmwand wird als bakterielle Translokation definiert (Berg & Garlington, 1979). Dabei wandern lebende Bakterien durch den epithelialen Teil der Mukosa in die Lamina propria, in mesenteriale Lymphknoten und in andere extraintestinale Organe. Gramnegative als auch grampositive Bakterien und Pilze können die mukosale Barriere überwinden (Lemaire et al., 1997), aber auch abgestorbene Mikroorganismen und ihre Produkte (z.B. Endotoxine) sowie Makromoleküle vermögen zu translozieren. Pathogene Bakterien, die fakultativ intrazelluläre Erreger darstellen, wie z.B. *Listeria monocytogenes* (Lecuit et al., 2001), *Neisseria meningitidis* (Barille et al., 2015), *Yersinia enterocolitica* (Pha & Navarro, 2016) oder von

---

Keimen sezernierte Proteine, wie das Anthrax-Toxin des *Bacillus anthracis* (Brown et al., 2011) verfügen über die Fähigkeit zur transmembranalen Translokation durch die Barrieren des Körpers. Auch Anteile der normalen enteralen Mikrobiota vermögen unter bestimmten Umständen vermehrt aus dem Gastrointestinaltrakt in andere Kompartimente des Körpers zu translozieren. Die Fähigkeit zur Translokation ist in der residenten Mikrobiota des Intestinaltraktes heterogen verteilt. Anaerobe Bakterien kommen mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:100 häufiger vor als Aerobier, translozieren aber selten und nur dann, wenn das Gewebe vorgeschädigt wurde (Wells et al., 1987). Im Gegensatz dazu passieren gramnegative Aerobier (bzw. fakultative Anaerobier) die intestinale Barriere vergleichsweise leicht, sogar durch intaktes intestinales Epithel (Wells, 1990). Verschiedene Faktoren begünstigen die bakterielle Translokation, wie Veränderungen der normalen intestinalen Mikrobiota, physische Störung der mukosalen Darmbarriere sowie ein supprimiertes Immunsystem. Eine physikalisch oder chemisch gereizte oder geschädigte Mukosa scheint dabei eine essentielle Voraussetzung für eine pathologische Translokation kommensaler Mikroorganismen zu sein (Abbildung 1) (Stein & Bolder, 2000). Dabei muss zwischen pathologischer und nichtpathologischer Translokation unterschieden werden, da sowohl luminale Antigene als auch lebende Bakterien im Gastrointestinaltrakt durch das GALT überprüft werden. Die Translokation von kommensalen Bakterien, Antigenen und Makromolekülen über eine intakte intestinale Barriere ist aber sehr gering. Innerhalb spezifischer Regionen des Gastrointestinaltraktes können M-Zellen, das Follikel-assoziierte Epithel sowie transepitheliale Ausläufer Antigen-präsentierender Immunzellen zur Translokation von Bakterien und Antigenen beitragen. Translozierte Mikroorganismen oder Antigene werden auf diesem Weg gewöhnlich durch Lymphozyten, Makrophagen und IgA-produzierende Plasmazellen abgefangen (Abbildung 1).

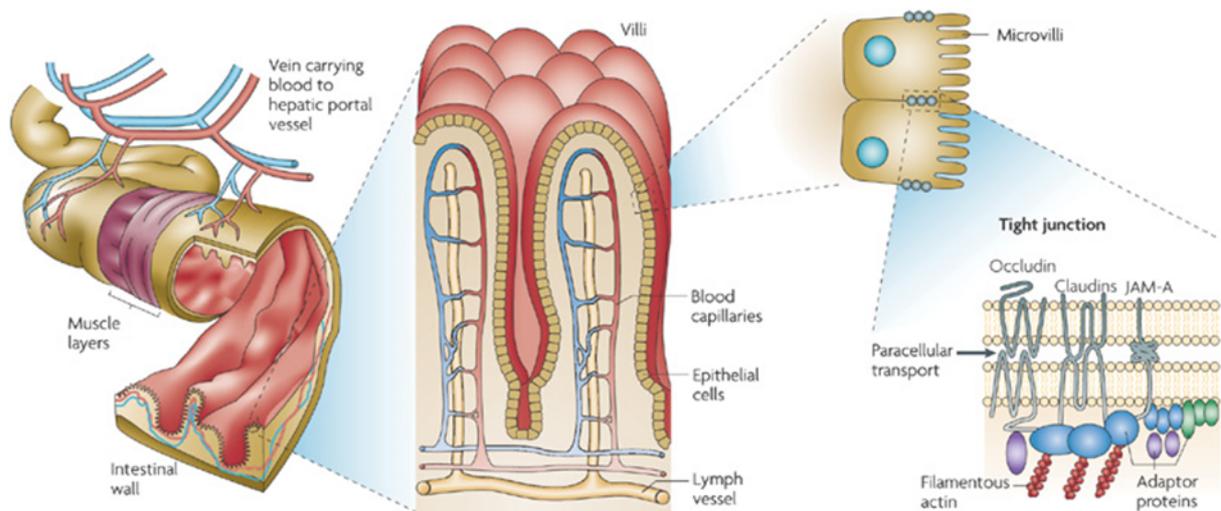


**Abbildung 1: Die epitheliale Barriere bei intestinaler Entzündung.**

Die Lamina propria enthält normalerweise verschiedene Immunzellen und sezernierte Zytokine. Dazu gehören entzündungshemmende sowie proinflammatorische Mediatoren aus angeborenen und adaptiven Immunzellen, die den exzessiven Eintrag von Darmmikrobiota begrenzen und gegen Pathogene verteidigen. Bei einer intestinalen Entzündung tragen mehrere Faktoren zu einer erhöhten bakteriellen Exposition bei: Störung der Mukusschicht, Dysregulation von epithelialen Tight Junctions, erhöhte Darmpermeabilität und erhöhte bakterielle Adhärenz an Epithelzellen (modifiziert nach Abraham & Cho, 2009).

#### 1.1.4 Tight Junctions

Zwischen benachbarten Epithelzellen existieren verschiedene Zell-Zell-Kontakte, die funktionell voneinander unterschieden werden und maßgeblich zur Integrität des Epithels beitragen: Gap Junctions ermöglichen den interzellulären Austausch, Desmosomen und Adherens Junctions vermitteln strukturelle Kontinuität des Zellverbandes und die epithelialen „Schlussleisten“, auch „Tight Junctions“ genannt, gewährleisten die Abdichtung zwischen den Epithelzellen. Die Eigenschaften des Epithels zur Ausbildung einer Zellpolarität (engl. *fence function*) und selektiven Limitierung des parazellulären Solutfluxes (engl. *gate function*) werden durch Proteine der Tight Junctions vermittelt (Abbildung 2). Gap Junction und Adherens Junction initiieren und stabilisieren die Assemblierung der Tight Junctions, welche die Epithelzelle apikolateral wie ein Gürtel umgeben (Gumbiner 1987; Kojima et al., 2007; Maiers et al., 2013).



**Abbildung 2: Epitheliale Interzellularkontakte.**

Die Absorptionsfläche des Darms wird durch die in Falten gelegte Darmsubmukosa, die Organisation der Mukosa in Zotten und Krypten und die Ausbildung der Mikrovilli auf Epithelzellen maximiert. Auf der Basalmembran befindet sich eine einzelne Schicht polarisierter Epithelzellen, unterhalb derer sich die dünne Schicht des vaskulären Bindegewebes, die Lamina propria, befindet. Der apikale Teil der lateralen Membran der Darm-Epithelzellen enthält die Tight Junctions, die zwischen der luminalen und serosalen Seite eine regulierbare Barriere bilden (Barrierefunktion). Die Tight Junctions halten durch die Limitierung der Beweglichkeit apikaler und basolateraler Komponenten der Epithelzellmembran (*fence function*) die Polarität aufrecht und unterstützen dabei die gerichtete Bewegung von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen (Viswanathan et al., 2009).

Die Tight Junction repräsentiert kein statisches System, das den parazellulären Weg abdichtet, sondern eine Struktur, welche flexibel eine Diffusionsbarriere reguliert und dynamisch auf verschiedene physiologische und pathologische Bedingungen reagieren kann (Anderson & van Itallie, 1995). Tight Junctions bestehen aus transmembranalen Proteinen der Claudinfamilie (Claudin-1 bis -27), sowie Occludin und Tricellulin. Als strukturelle Gemeinsamkeit besitzen sie vier transmembranale Regionen und zwei extrazelluläre Schleifen. Sie haben bezüglich der Barrierebildung sehr verschiedene Funktionen: Viele sind abdichtend, während einige andere gegenteilig wirken und parazellulär verlaufende Kanäle bilden (Claudin-2, -10a, -10b, -15, -17) (Günzel et al., 2009; Rosenthal et al., 2010). Zu den Tight Junction-Proteinen zählt auch JAM (*junctional adhesion molecule*), das nur einen transmembranalen Durchgang aufweist. Zellseitig sind sie mit Tight Junction-assoziierten Proteinen, wie ZO-1, -2 und -3 (ZO = *zonula occludens protein*) und Cingulin sowie mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden (Mitic & Anderson, 1998; Heiskala et al., 2001). Pathogene Wirkungen vieler Bakterien, wie z.B. *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Bacteroidis fragilis* und *Vibrio cholerae* beruhen auf Veränderungen der intestinalen Permeabilität gegenüber

---

lonen und kleinen Makromolekülen, hervorgerufen durch eine initiale Modulation der epithelialen Tight Junctions (Fasano & Nataro, 2004). Barrieredefekte bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen resultierten ebenfalls aus Veränderungen an der Tight Junction im Darmepithel (Gitter et al., 2001; Zeissig et al., 2004; Prasad et al., 2005).

#### 1.1.5 Tight Junctions als Effektor multipler Invasionsstrategien

Eine durchlässige Darmbarriere ist häufig durch eine Modulation der epithelialen Tight Junction bedingt, aber auch andere pathologische Veränderungen des Darmepithels wie Apoptosen, Erosionen und Ulzerationen können ursächlich sein. Medikamente und chemische Verbindungen sind ebenfalls in der Lage, die epitheliale Barriere direkt zu beeinflussen. Dazu zählen pro-inflammatorisch wirksame Substanzen, wie FMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Peptidglykane, Lipopolysaccharide, Toxine mit Proteaseaktivität, sekundäre Gallensäuren und Abbauprodukte von Gallensäuren (Buyse et al., 2002; Ogata et al., 2003). Infektionen mit enteropathogenen Erregern oder auch therapeutische Maßnahmen (Antibiotikatherapie, Radiotherapie) können eine intakte Barriere beeinträchtigen (Sartor et al., 2003; Smale & Bjarnason, 2003). Infektionen mit Salmonellen, Shigellen, enteropathogene *E. coli* oder Yersinien stellen vor allem in Entwicklungsländern aber auch in den Industrienationen ein großes Gesundheitsproblem dar. In den letzten zwei Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass solche typischen enteralen Durchfallerreger die epitheliale Barriere auf unterschiedlichste Weisen stören können. Neben der Stimulation von Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion sind hier die Induktion lokaler Zellschäden, wie Apoptosen, Nekrosen oder fokaler Läsionen (Troeger et al., 2007; Bücken et al., 2009; Epple et al., 2009), die Aktivierung inflammatorischer Kaskaden und insbesondere die Störung der epithelialen Tight Junction-Integrität zu nennen (Berkes et al., 2003).

Zahlreiche Pathogene benutzen die Tight Junction als Effektor multipler Invasionsstrategien, wobei die Effekte auf Struktur und Funktion der Tight Junction zwischen den verschiedenen Pathogenen variiert. Tight Junction-Proteine selbst können Rezeptoren für Mikroorganismen darstellen, wie beispielsweise die Claudine -3 und -4 für das bakterielle *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE), welche sie aus der Tight Junction aussortieren und damit die Barrierefunktion kompromittieren (Sonoda et al., 1999). Spezifische bakterielle und virale Erreger haben mit ihren Pathogenitätsfaktoren oder einer induzierten Expression Tight Junction-modulierender Proteine indirekte Invasionsstrategien entwickelt. Auf diese Weise vermitteln beispielsweise enteropathogene *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae* bzw. Rotaviren eine Umlagerung des Cytoskeletts in der Wirtszelle. Diese Veränderungen an perijunctionalen Myosin-Aktinfilamenten führt zur Dissoziation von ZO-1, Occludin und

---

Claudin-1 bzw. -3 aus der Tight Junction heraus (Goldblum et al., 2011; Muza-Moons et al., 2004; Nava et al., 2004). Bakterien haben sich die Tight Junction auch zum direkten Angriffspunkt gemacht, indem bakterielle Proteasen die Transmembranproteine degradieren oder biochemische Prozesse wie Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Tight Junction Proteinen die Funktion beeinträchtigen (Wu et al., 1998). Auch Viren vermögen die Tight Junction direkt zu modulieren. So präsentieren JAM und CAR jeweils spezifische Strukturen, an denen Reoviren bzw. Adeno- und Coxsackieviren binden können und folglich internalisiert werden (Guttman & Finlay, 2009). SARS (schweres, akutes respiratorisches Syndrom)-Viren, Coronaviren und Rhesus Papillomaviren hemmen durch ihren Eingriff in das Zellpolarität-*Signalling* die Tight Junction Assemblierung (Javier & Rice, 2011). Die enorme Vielfalt an bakterieller und viraler Invasionsmodalität speziell über die Tight Junction erklärt die Fokussierung eines Tight Junction-vermittelten Barriereerhalts innerhalb vieler therapeutischer und präventiver Strategien (Hering et al., 2012; John et al., 2011).

## 1.2 Die intestinale Mikrobiota

Bakterien und andere Mikroorganismen, einschließlich Viren, Pilzen und Einzellern zählen zur intestinalen Mikrobiota und kommen als Kommensale im Darmlumen vor. Gemeinsam bilden sie einen Komplex, der zusammen mit dem Immunsystem eine stabile Homöostase bildet. Viele Bakterien sind symbiotische Darmbewohner und unterstützen die Verdauung, synthetisieren wichtige Stoffwechselprodukte und Vitamine, verhindern die Ansiedlung von Pathogenen und stabilisieren das Immunsystem (Lozupone et al., 2012). Im Dickdarm kommen durchschnittlich 500-1000 verschiedene Bakterienspezies vor. Mit durchschnittlich  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  pro Gramm Darminhalt im Dickdarm stellen Bakterien sowohl quantitativ einen enormen Anteil des Koloninhaltes dar (Eckburg et al., 2005) als auch hinsichtlich ihrer Vielfältigkeit. Die Bakterienzusammensetzung ist von Individuum zu Individuum verschieden und je nach körperlicher Konstitution, Immunsystem und Ernährung variabel. Die verschiedenen luminalen Bakterienstämme lassen sich wenigen Phyla zuordnen: *Bacteroidetes* und *Firmucites* sind die Hauptvertreter bei Erwachsenen, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobia* bilden prozentual eher einen geringen Anteil. Nur sehr wenige Bakterien werden in fast jedem Mikrobiom gefunden, so z.B. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* und *Bacteroides uniformis* (Quin et al., 2010). Auch *Escherichia coli* kann häufig nachgewiesen werden, sein Anteil an der Gesamtzahl der Bakterien beträgt jedoch nur 0,1% (Eckburg et al., 2005). Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota in ihrer Komplexität und Zusammensetzung beginnt in den ersten Lebensjahren und ist erst im Erwachsenenalter komplettiert. Bei Säuglingen und Kindern sind vermehrt

---

*Bifidobacteriaceae* zu finden und Genprodukte für Enzyme, welche für die Folsäurebiosynthese wichtig sind (Yatsunenko et al., 2012). Durch Muttermilch, Antibiotikagaben und eine Geburt mittels Sectio kann die Entwicklung der späteren intestinalen Mikrobiota beeinflusst werden. Eine Dysbiose, also eine Störung im Gleichgewicht der intestinalen Mikrobiota, konnte im Zusammenhang mit Übergewicht, Mangelernährung, Medikamentenmissbrauch, CED, Karzinomen, neurologischen und immunologischen Erkrankungen aufgezeigt werden (Round & Mazmanian, 2009). In der vorliegenden Studie wurde ein keimfreies Mausmodell verwendet, um die Kolonisierung mit *E. coli* zu kontrollieren und um monoassoziative Effekte innerhalb einer Infektionsstudie mit Therapiesupplementierung zu beleuchten.

### 1.2.1 Das keimfreie Tiermodell

Im Jahr 1895 berichteten Nuttal & Thierfelder über die ersten keimfreien Meerschweinchen durch eine Geburt mittels Sectio in eine sterile Umgebung (Nuttal & Thierfelder, 1895). Die später entwickelte Erzeugung keimfreier Mäuse vermittelte die Grundlage zur Fähigkeit Wirts-Mikroben sowie Mikroben-Mikroben-Wechselwirkungen zu untersuchen und das durch die gezielte Kolonisation mit ausgewählten Mikroorganismen oder mikrobiellen Gemeinschaften. Keimfreie Mäuse zeigen anatomische Veränderungen zusammen mit histologischen, physiologischen und metabolischen Unterschieden im Vergleich zu Tieren, welche eine normale Mikrobiota von Geburt an besitzen (Leshner et al., 1964, Thompson und Trexler, 1971). So zeigen keimfreie Nagetiere kleinere Herzen, Lungen und Lebern im Vergleich zu normal kolonisierten Tieren. Sie haben auch ein kleineres Herzzeitvolumen (Gordon et al., 1963) und verwenden bei gleichem Körpergewicht weniger Sauerstoff pro Körpergewicht (Wostmann & Bruckner-Kardoss, 1979). In der Regel wiegt der Magen-Darm-Trakt eines keimfreien Tieres weniger (Meshn et al., 1973). Dieses Defizit resultiert hauptsächlich aus einer Verringerung der Dicke des Lamina propria Gewebes. Bei keimfreien Ratten und Mäusen wird die Oberfläche des Dünndarms auf etwa zwei Drittel reduziert. Morphologische und funktionelle Charakteristika können zu Absorptionsunterschieden im Dünndarm führen. Ebenfalls können die Mikrovilli von keimfreien Tieren kleiner sein. Durch die fehlende mikrobielle Hydrierung der verschiedenen ungesättigten Fettsäuren im Kolon werden in keimfreien Ratten deutlich mehr der ungesättigten Fettsäuren mit dem Fäzes ausgeschieden. Eine der makroskopisch auffälligsten morphologischen Veränderung ist die Vergrößerung des Caecums. Sie beginnt während der Säuglingsperiode und scheint aus keinem Nährstoffmangel zu resultieren (Wostmann & Bruckner-Kardoss, 1959). Die Volumenzunahme des Caecums wird durch die

---

Anhäufung von Mukus (Gemisch von makromolekularen, sulfathaltigen Glykoproteinen) verursacht, welcher normalerweise durch die intestinale Mikrobiota des unteren Darms abgebaut wird. Die Cecalvergrößerung führt zu einer verlängerten Darmtransitzeit (Tennant et al., 1971), einer verminderten lokalen Peristaltik durch reduzierten Muskeltonus (Abrams & Bishop, 1967) und einer Verzögerung der Magenentleerung. Das Vorhandensein oder Fehlen einer physiologischen Entzündung, die durch die Mikrobiota normal kolonisierter Tiere vermittelt wird, ist am prominentesten im Magen-Darm-Trakt. Keimfreie Tiere besitzen unterentwickelte systemische Immunsysteme, charakterisiert durch reduzierte Serum-Leukozyten und Antikörper (Bauer et al., 1963; Horowitz et al. 1964; Thompson & Trexler, 1971).

### 1.2.2 *Escherichia coli*

*E. coli* ist ein kommensales, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, welches erstmals 1885 von Theodor Escherich beschrieben wurde (Escherich, 1885). Die meisten Stämme dieser Spezies sind nicht krankheitsauslösend, jedoch gibt es auch pathogene Varianten. Diese pathogenen *E. coli* Stämme können zwei Gruppen zugeordnet werden: Durchfall- und intestinale Entzündungen auslösende *E. coli* oder außerhalb des Gastrointestinaltraktes (extraintestinal)-krankheitsauslösende *E. coli* (Kaper et al., 2004). Die verschiedenen humanpathogenen *E. coli* Stämme werden acht Pathovaren zugeordnet. Als Pathovare werden Bakterienstämme bezeichnet, welche innerhalb der Art aufgrund ihrer unterschiedlichen Pathogenität voneinander abgegrenzt werden können. Innerhalb der Diarrhoe-auslösenden *E. coli* kann zwischen dem enteropathogenen *E. coli*, dem enterohämorrhagischen *E. coli*, dem enteroinvasiven *E. coli*, dem enteroaggregativen *E. coli* und dem diffus-adhärenenten *E. coli* unterschieden werden. Das adhärenent-invasive *E. coli* scheint eine wichtige Rolle beim Morbus Crohn zu spielen und wird zurzeit intensiv beforscht (Croxen et al., 2010). Das uropathogene *E. coli* (UPEC) und das neonatale Meningitis *E. coli* werden zu den extraintestinalen *E. coli* gezählt. Jedes Pathovar besitzt eine bestimmte Ausstattung verschiedener Virulenzfaktoren, wobei diverse dieser Virulenzfaktoren von mehreren Pathovaren geteilt werden. Das in dieser Arbeit verwendete  $\alpha$ -Hämolysin (HlyA)-produzierende *E. coli* 536 wird den UPEC zugeordnet. UPEC-Infektionen spielen eine große Rolle bei Harnwegsinfekten, so sind etwa bei 80% aller Zystitiden oder Pyelonephritiden UPECs nachweisbar. Ebenfalls befinden sie sich jedoch häufig in der Darmschleimhaut von Patienten mit CED (Schulz, 2014). Um eine Infektion der Harnwege zu etablieren, muss *E. coli* verschiedene Verteidigungsstrategien des Wirts, einschließlich des Urinflusses, der Exfolierung von Urothelzellen, endogenen antimikrobiellen Faktoren und eindringenden

---

Neutrophilen, überwinden. So haben UPECs eine Reihe von Virulenz- und Fitnessfaktoren, die es dem Bakterium ermöglichen, diesen unterschiedlichen Abwehrmechanismen zu widerstehen und diese zu überlisten. Fimbrien für die Adhäsion und Invasion in die Wirtszellen, sowie Pili des Typs 1 sind essenziell für eine erfolgreiche Infektion der Harnwege. Flagellen und Toxine ermöglichen die Bakterienverbreitung, während verschiedene Eisen-Aquirierungs-Systeme das bakterielle Überleben in der eisenlimitierten Umgebung der Harnwege ermöglichen. Die Immunantwort auf UPECs wird hauptsächlich durch Toll-like Rezeptoren vermittelt, die Lipopolysaccharide, Flagellen und andere bakterielle Strukturen erkennen. UPECs haben die Fähigkeit, diese Immunantwort des Wirts durch aktive Beeinflussung auf inflammatorische Signalwege oder durch Maskierung immunogener Strukturen zu manipulieren. Alle UPEC Stämme produzieren neben HlyA u.a. noch weitere Toxine: den cytotoxischen nekrotisierenden Faktor 1 (CNF1), das zu den Serinproteasen-Autotransporter der *Enterobacteriaceae* (SPATE) zählende Pic (protease involved in intestinal colonisation) und das sezernierte Autotransporter-Toxin (Sat) (Croxen et al., 2010). Mittels einer Bindung an  $\alpha$ 3- und  $\beta$ 1-Integrine gelingt dem Bakterium nach der Adhäsion die Invasion in die Zielzelle (Burns et al., 1999). Intrazellulär sezerniertes HlyA hemmt durch den Einbau in die Zellmembran der Wirtszelle und resultierendem konsekutivem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die Aktivierung von Akt (Protein Kinase B) (Wiles et al., 2008). Durch die fehlende Akt-Aktivierung kommt es zur Apoptose und zur Exfoliation und Shedding des Zellverbandes im Blasenepithel (Eto et al., 2007).

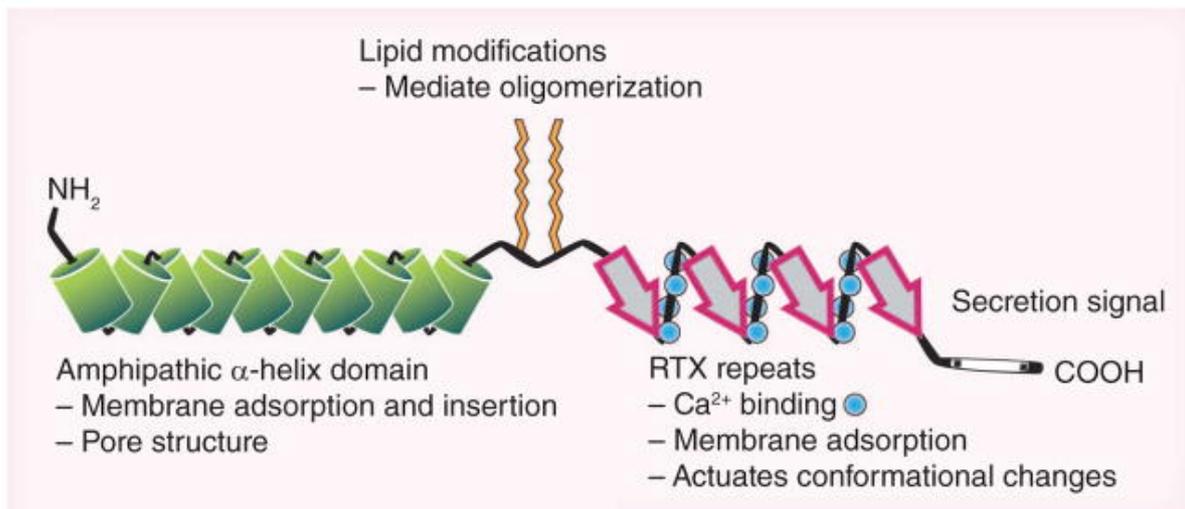
### 1.2.3 Alpha-Hämolysin (HlyA)

Das *E. coli*  $\alpha$ -Hämolysin wird zur Familie der repeat-in-toxin (RTX)-Toxine gezählt und ist ein porenbildendes Toxin (pore forming toxin, PFT). PFTs repräsentieren die größte Klasse von bakteriellen Toxinen und werden von vielen pathogenen Bakterien produziert, als wichtiger Bestandteil ihres Virulenzarsenals (Los et al., 2013). Während der bakteriellen Infektion fördern PFTs durch das Aufbrechen von epithelialen Barrieren und Wechselwirkungen mit dem Immunsystem das Wachstum und die Verbreitung von Pathogenen. Dabei verändern PFTs die Plasmamembranpermeabilität ihrer Zielzellen, was möglicherweise zum Zelltod führt, aber auch zu einer subtileren Manipulation zellulärer Funktionen führen kann (Alves et al., 2014). PFTs können in zwei große Gruppen klassifiziert werden: Die  $\alpha$ -PFTs und  $\beta$ -PFTs, welche basierend auf einer Sekundärstrukturanalyse ihrer Membranelemente aus  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Sheets bestehen (Iacovache et al., 2010). Die Porenbildung, die durch die meisten PFTs verursacht wird, führt zu einem Abfall der intrazellulären Kalium-Konzentration, durch Mechanismen, die noch nicht ausreichend geklärt sind. Die Zellen reagieren durch

---

Aktivierung mehrerer Signalwege. Eine Inflammasom-Aktivierung wurde von verschiedenen PFTs, einschließlich Aerolysin, *Vibrio cholerae* Cytolysin, *Clostridium* B-Toxin und *Staphylococcus aureus* Hämolyysin berichtet. Aktivierung von MAPKs ebenso wie Autophagie wurde für mehrere PFTs, wie z. B. jüngst für HlyA von *S. aureus* gezeigt (Gonzalez et al., 2011, Mestre & Colombo, 2012, Mestre & Colombo, 2013). Viele PFTs permeabilisieren auch die Plasmamembran für Calcium. Calcium ist ein wichtiger second messenger, die resultierende Erhöhung der Konzentration von intrazellulärem Calcium kann die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden auslösen (Bischofberger et al., 2012).

Das Operon hlyCABD für das 1024 Aminosäuren lange und 110-kDa große Multidomänen-Polypeptid HlyA gliedert sich in Toxin (HlyA), aktivierende Acyltransferase (HlyC) und Transportproteine (HlyB und HlyD). Typ-1-Sekretionssysteme (T1SS) sind unter Gram-negativen Bakterien weit verbreitet, so wird das hämolytische Toxin HlyA aus uropathogenen *E. coli* Stämmen über T1SS sezerniert. Die Sekretion wird in einem einzigen Schritt direkt vom Cytosol zum extrazellulären Raum erreicht. Die Sekretionsmaschinerie besteht aus drei Membranproteinen, zwei in der inneren Membran und ein drittes in der äußeren Membran. Die inneren Membranproteine HlyB und HlyD gehören zu den ABC-Transporter- und Membranfusionsproteinfamilien (MFPs), während die äußere Membrankomponente TolC ein porinähnliches Protein ist. Der Aufbau der drei Proteine wird durch Akkumulation des Transportsubstrats (HlyA) im Cytoplasma ausgelöst, um einen kontinuierlichen Kanal zu bilden, der das Periplasma überbrückt und schließlich nach außen mündet. Eine spezifische Sequenz am äußersten C-Terminus enthält alle notwendigen Informationen für das *Targeting* des Polypeptids auf den Sekretionskanal (Thomas et al., 2014). Dabei wird HlyA in ungefalteter Form ausgeschleust (Bakkes et al., 2010) und das Sekretionssignal besitzt eine zweite Funktion, die autokatalytisch wirkt, um die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Faltung von HlyA auf der Zelloberfläche zu fördern (Jumpertz et al., 2010). Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Cytoplasma der Bakterienzelle reicht für das Falten nicht aus, während die hohe extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration das Falten des Toxins auf der Zelloberfläche fördert (Naseem et al., 2009) (Abbildung 3).



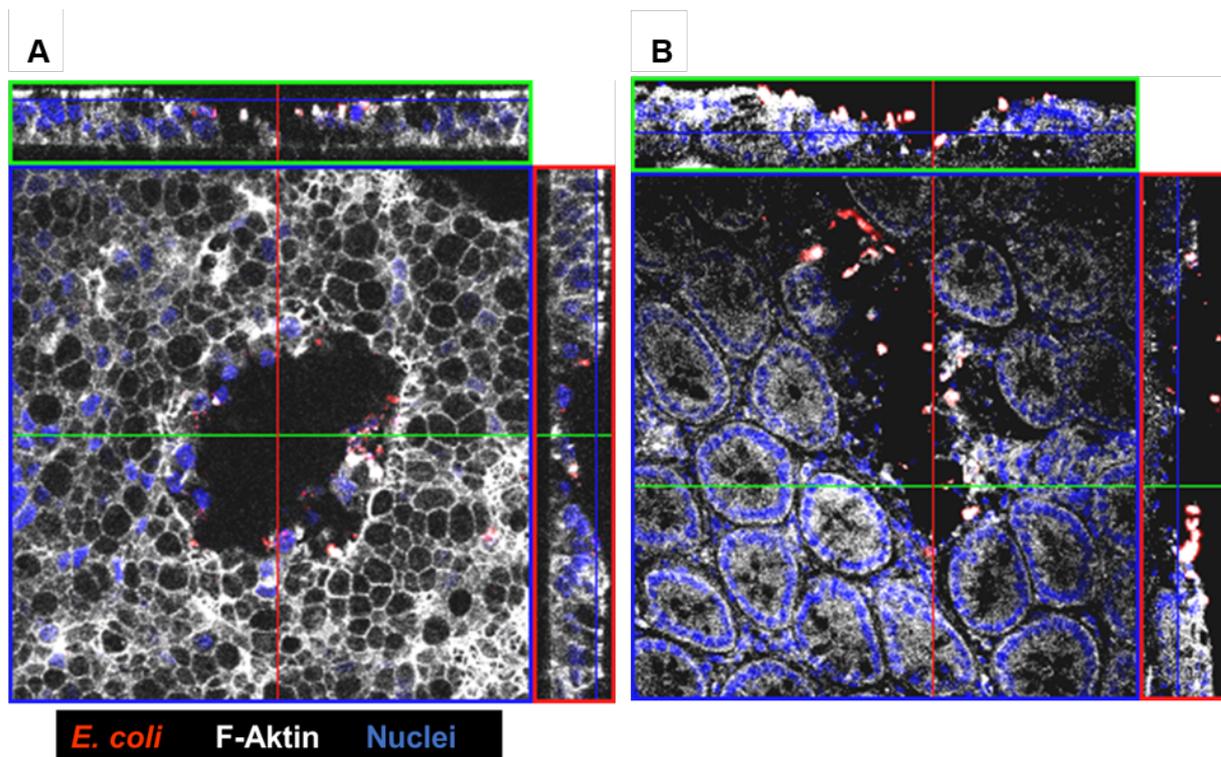
**Abbildung 3: α-Hämolyisin-Domänenstruktur und Funktionen.**

HlyA ist ein 110-kDa-Multidomain-Polypeptid, das aus der Bakterienzelle durch einen Sekretionsmechanismus vom Typ I freigesetzt wird (Linhartova et al., 2010). Der C-Terminus enthält ein ungespaltenes Sekretionssignal und die markante RTX-Domäne. Diese Region, sobald sie  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden hat, löst eine Konformationsänderung aus, die das Toxin stabilisiert als auch Wechselwirkungen mit der Wirtszellmembran ermöglicht (Sánchez-Magraner et al., 2010). Der N-Terminus besteht aus zehn positiv geladenen amphipathischen  $\alpha$ -Helices. Es wird angenommen, dass diese Region die irreversible Verankerung von HlyA an der Plasmamembran vermittelt (Valeva et al., 2008). Zwei interne Lysin-Reste werden post-translational im bakteriellen Cytosol vor der Sekretion acyliert. Obwohl für die Sekretion nicht erforderlich, sind diese Modifikationen für die Umwandlung des harmlosen pro-HlyA-Proteins in die für die Porenbildung kompetente toxische Form wesentlich (Stanley et al., 1994). (Abbildung aus Wiles & Mulvey, 2013).

#### 1.2.3.1 Pathologische Eigenschaften des HlyA

In den frühen 1960er Jahren wurden erstmals Toxine für die hämolytische Wirkung einiger *Escherichia* Spezies identifiziert. Später wurde gezeigt, dass das *E. coli* HlyA an der Glycophorin-reichen Erythrozytenoberfläche angreift und hämolytisch wirkt. Dabei scheint die Zelllyse zur Erhöhung der umgebenden Eisenkonzentration zu dienen. Eine viel größere Spezifität besitzt HlyA für Leukozyten (Bauer et al., 1996; Smith, 1963). *E. coli* HlyA zählt zur Gruppe der  $\beta$ -Poren-bildende Toxine ( $\beta$ -PFT), welche sich selbst rezeptorunabhängig in Zellmembranen der Zielzelle einfügen (Bhakdi et al., 1988). Dort bildet HlyA Kation-permeable Kanäle in der Wirtszellmembran mit einem Innendurchmesser von 20 Å (Benz et al., 2014). Es wurde für hämolytische Bakterien gezeigt, dass sie eine intestinale Malabsorption (Songserm et al., 2002), aktive Sekretion (Raimondi et al., 1995) und epitheliale Läsionen durch Nekrose und/oder erhöhte Apoptoserate induzieren können (Hutto

& Wannemuehler, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass HlyA "fokale Läsionen" in HT-29/B6-Epithelzellen induziert. Innerhalb dieser epithelialen Läsionen akkumuliert *E. coli* vor der Translokation (Troeger et al., 2007). Im Kolonepithel von Mäusen verzögerten HlyA-haltige Überstände die epitheliale Restitution nach Induktion von Einzelzell-Läsionen, was auf eine Hemmung von epithelialen Reparaturmechanismen hinweist (Günzel et al., 2006). Vor kurzem konnten wir in Mauskolonisierungsmodellen zeigen, dass *E. coli* HlyA die intestinale Barrierefunktion durch eine fokale Läsionsinduktion im Kolonepithel beeinträchtigt, wodurch die Antigenaufnahme verstärkt und eine intestinale Entzündung ausgelöst wird (Abbildung 4) (Bücker et al., 2014).



**Abbildung 4: *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hämolysin (HlyA)-induzierte fokale Läsionen im Kolonepithel.** Whole mount Immunfluoreszenz Färbung der Mukosa von infizierten Mäusen oder Epithelzellen. (A) Fokale Läsion in einem humanen Kolon-Epithel-Monolayer der Zelllinie HT-29/B6 und (B) fokale Läsion in einer *E. coli*-536-kolonisierten Wildtyp-Maus (Kolon). Die gefärbten Bakterien (rot) deuten eine begleitende bakterielle Invasion im Mauskolon an (Bücker et al., 2014).

Bisherige Studien konnten aufzeigen, dass Zinkionen und andere zweiwertige sowie dreiwertige Kationen Poren schließen können, die durch PFTs gebildet werden, weswegen die Zinksupplementierung ein interessantes therapeutisches Modell innerhalb einer HlyA-induzierten Barriestörung darstellt.

---

### 1.3 Zink

Zink, ein zweiwertiges Kation ( $\text{Zn}^{2+}$ ), spielt eine wichtige Rolle innerhalb diverser Mechanismen im Körper. Dieses essentielle Spurenelement ist an der DNA-Replikation und Transkription (über Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren), Metalloproteinase-Katalyse, Schutz vor oxidativem Stress (wenn gebunden an Metallothioneine), Regulation der Apoptose, Zell-Homöostase und Immunfunktion beteiligt (Stefanidou et al., 2006; Kondoh et al., 2003; Seve et al., 2002; Wellinghausen et al., 1997). Proteine mit einer Zinkbindedomäne benutzen Zink als zentralen Bestandteil und/oder Cofaktor für katalytische, regulative als auch strukturelle Funktionen (Cousins et al., 2006). Die chemischen Eigenschaften von Zink macht dieses Spurenelement zu einem effektiven Bindungspartner von Thiol- und Imidazolgruppen, wodurch beispielsweise die Strukturgebung von Zinkfingerproteinen durch Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  an Cystein- und Histidinreste gewährleistet wird (Weitzel, 1956). Aus diesem Grund liegt Zink sowohl intra- als auch extrazellulär häufig proteingebunden vor (Krebs, 2000). Etwa 70% des zirkulierenden Zinks im Blut ist an Albumin gebunden. Jeder Zustand, der die Serumalbuminkonzentration verändert, kann eine sekundäre Wirkung auf den Serumzinkspiegel haben. Obwohl der Serumzinkgehalt nur 0,1% des gesamten Körpers an Zink darstellt, kann das zirkulierende Zink schnell reagieren, um Gewebebedürfnisse zu erfüllen (WHO, 2004; Tubek, 2007). Die Aufnahme von Spurenelementen erfolgt durch die apikale Oberfläche der Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts, wobei die Absorption in der Regel durch Löslichkeitssteigernde Bedingungen begünstigt wird. Ein Großteil der Zinkabsorption findet im Dünndarm statt, jedoch haben Lokalisierungs- und Expressionsstudien von Zinktransportern gezeigt, dass einige dieser Proteine im Epithel des gesamten Gastrointestinaltraktes zu finden sind, was für eine Zink-Absorption im gesamten GI-Trakt spricht (Cousins, 2010). Für den Erhalt der zellulären Zinkhomöostase ist ein komplexes Zusammenspiel von Zinktransportern und dem intrazellulären Puffermolekül Metallothionein verantwortlich. Die Zusammenstellung dieses Systems ist gewebespezifisch (Cousins et al., 2006). Zinktransporter werden in zwei Familien eingeteilt, ZnT mit 10 Mitgliedern und ZIP mit 14 Vertretern. Eine gesteigerte ZnT-Proteinexpression verringert dabei die zelluläre Zinkkonzentration während diese von ZIP-Proteinen erhöht wird. Der Transporter ZIP4 wird über den gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert und fungiert als Haupteffektor um Zink aus der Nahrung über die apikale Membran des Darmepithels aufzunehmen. ZIP4 und andere ZIP Mitglieder werden in Zeiten der Zink-Restriktion hochreguliert. Dies sorgt für eine leistungsfähige homöostatische Kontrolle. Durch proinflammatorische Faktoren innerhalb des Gastrointestinaltraktes wird ebenfalls der Transporter ZIP14 hochreguliert. Intrazelluläre Transporter wie ZnT7 beeinflussen die transzelluläre Bewegung von Zink über das intestinale Epithel.

---

Der Körper verfügt über keine zell- und gewebespezifischen Zinkspeicher (anders als z.B. bei Eisen oder Calcium), deshalb ist der tägliche Zinkbedarf durch eine ausreichende tägliche Zinkaufnahme zu decken. Ernährungsspezifische luminale Faktoren haben einen großen Einfluss auf die Zinkverfügbarkeit über die apikale Membran von Enterozyten. So hat Phytat, das in Grundnahrungsmitteln wie Getreide, Mais, Soja und Reis vorhanden ist einen starken negativen Effekt auf die Zinkabsorption bei zusammengesetzten Mahlzeiten (Lønnerdal, 2000). Eine beeinträchtigte Darmintegrität reduziert nicht nur die Zink Absorption, sondern führt auch zu einem erhöhten endogenen Verlust an Zink. Die fäkale Ausscheidung von Zink wird bei einer akuten Diarrhoe erhöht (Brown et al., 1998), wobei nicht klar ist, in welchem Ausmaß dabei das unabsorbierte Zink oder Zink endogenen Ursprungs eine Rolle spielt (IZiNCG, 2004; Roohani et al., 2013).

### 1.3.1 Zink Therapie bei gastrointestinalen Erkrankungen

Zink, sowohl in elementarer als auch in seiner Salzform, wird seit Jahrhunderten als therapeutische Modalität verwendet. Topische Präparate wie Zinkoxid, Calamin oder Zinkpyrithion wurden als Photoprotektions-, Beruhigungsmittel oder selbst als Wirkstoff von Antischuppenshampoos eingesetzt (Gupta et al., 2014). Orale Zink-Supplementierung bei Kindern in Entwicklungsländern hat die Prävalenz, Morbidität und Mortalität von Diarrhoe verringert (Fischer Walker & Black, 2007). So zeigen Kinder mit akutem Durchfall, die mit Zink behandelt wurden, eine Abnahme der Inzidenz und Dauer der Diarrhoe (Dutta et al., 2011) sowie einen verminderten Bedarf an Antibiotika im Vergleich zu Kontrollen (die typischerweise mit oraler Rehydratation und/oder Vitaminpräparaten behandelt wurden) (Awasthi 2006). Bei infektiösem oder entzündlichem Durchfall gibt es typischerweise eine erhöhte intestinale Permeabilität (beobachtet als eine Erhöhung des Lactulose/Mannitol-Verhältnisses) (Zhang et al., 2000), die in experimentellen Studien durch Zink-Supplementierung verbessert werden konnte (Alam et al., 1994; Sturniolo et al., 2001; Sturniolo et al., 2002). Bei Ferkeln konnte gezeigt werden, dass die Zink-Supplementierung die Expression bestimmter Gene vermindert, die mit der Immunfunktion assoziiert sind, wenn sie mit einem enterotoxischen *E. coli* infiziert wurden. Dabei verringert die Zinkgabe ETEC-induzierte Diarrhoen und Entzündungen (Sargeant et al., 2010). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt die Behandlung von Durchfallerkrankungen bei Kindern mit Zink-Tabletten zusammen mit oralen Rehydrierungslösungen als Teil des ersten Therapieansatzes (Unger et al., 2014). Zink zeigte auch eine direkte antimikrobielle Wirkung auf infektiöse enterische Bakterien wie *E. coli*, *Shigella* sp. und verschiedene Stämme von *Salmonella* in vitro (Surjawidjaja et al., 2010). So verwendet das angeborene

---

Immunsystem eigens Zink für seine antimikrobiellen Wirkungen (z. B. Calprotectin) (Liu et al., 2012).

Sekundär kann aus einer intestinalen Hyperpermeabilität (*Leaky Gut*), wie bei einer CED, ein Zinkmangel resultieren, was zu Durchfall führt. Es existieren vermehrt Ansätze, Zink und andere therapeutische Nahrungsergänzungsmittel als potentielle Alternativen zum Einsatz von Steroiden und Anti-Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF)-Prinzipien wie in der CED-Therapie einzusetzen (Goh et al., 2003). Auch in der Landwirtschaft wird Zink präventiv und therapeutisch gegen Durchfallerkrankungen bei Nutztieren eingesetzt, um den Antibiotikaeinsatz zu minimieren (Taylor et al., 1982).

#### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Untersuchungen zu Zink-Supplementierungen bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen sowohl beim Menschen als auch im Tier haben gezeigt, dass die Dauer und Schwere der Episode von infektiösem Durchfall vermindert werden kann. Auf zellulärer Ebene bedingt eine Durchfallerkrankung eine Störung der intestinalen Barrierefunktion. Das *E. coli* HlyA, ein  $\beta$ -PFT, ist in der Lage *in vivo* und *in vitro* fokale Läsionen zu induzieren, wodurch die epitheliale Integrität des Darms beeinträchtigt wird und der Durchtritt von Bakterien durch das Epithel hindurch ermöglicht wird. Kürzlich wurde auch der Einfluss HlyA-produzierender Bakterien auf entzündliche Darmerkrankungen im Mausmodell belegt, indem fokale Läsionen eine Entzündung des Darms potenzieren. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zinkionen Poren schließen können, die durch PFTs gebildet werden.

Die Frage dieser Dissertation, die sich aus diesen Vorarbeiten ableitet, lautet:

Ist eine Behandlung mit Zink effektiv, um epitheliale Schädigung und Entzündungsinduktion durch bakterielle  $\beta$ -PFTs, wie das *E. coli* HlyA, abzuwehren? Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effekte von Zink auf die HlyA-geschädigte intestinale Barrierefunktion *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren.

Die Wirkung einer therapeutisch hohen Zink-Supplementierung im Futter von HlyA-infizierten keimfreien Mäusen wurde analysiert, um potentielle barrierefördernde Wirkungen von Zink aufzudecken. Zu diesem Zweck erhielten keimfreie Mäuse vorab entweder eine definiert normale oder eine therapeutisch hohe Zinkdosierung und wurden mit HlyA-produzierenden *E. coli* 536 oder zur Kontrolle mit der Hämolyisin-defizienten Mutante (HDM) kolonisiert. Ziel des Versuches war, die Barriere Eigenschaften der Kolon-Mukosa zu untersuchen, sowie die bakterielle Translokation und HlyA-induzierte Formierung fokaler Läsionen zu quantifizieren,

---

um vermeintliche therapeutische Wirkungen von Zink aufzuzeigen. Zur Untersuchung einer möglichen zinkvermittelten Verminderung klinischer Symptome wurde ein klinischer Entzündungsscore erhoben. Darüber hinaus erfolgte eine histopathologische Beurteilung und die Auswertung eines luminalen Entzündungsparameters (Calprotectin).

Mithilfe komplementärer *in vitro*-Untersuchungen zur Auswirkung einer Zinkapplikation auf HlyA-induzierte Barrieredefekte epithelialer Kolonkarzinomzellen erfolgte eine eingehende Analyse der Zinkeffekte auf die epitheliale Barrierefunktion, um mögliche Wirkungsmechanismen und Signaltransduktionswege zu beleuchten.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 **Geräte, Materialien, Reagenzien**

#### 2.1.1 Geräte

Amicon Ultrafilter 50 k	Merck Millipore, Darmstadt
Atomabsorptionsspektrometer AAS vario 6	Analytik, Jena
Brutschrank, begast, B 5060 EC-02	Heraeus, Hanau
Drainagesauger Medap P 4010	Maquet, Rastatt
Electrochemical Interface 1286	Solartron, Farnborough, Großbritannien
Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3	Bio-Rad, München
Elektrophoretische Transferzelle Mini Trans-Blot®	Bio-Rad, München
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gewebehomogenisator (Potter), 3 ml, manuell	Wheaton, USA
Hamilton-Spritze Hamilton	Reno, Nevada, USA
Heizblöcke	
Accu Block™ Labnet	Edison, New Jersey, USA
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Lumineszenzbildanalysatoren	
LAS-1000	FujiFilm, Düsseldorf
Fusion FX 7	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Magnetrührer/Heizplatte IKA®-Combimag Reo	IKA, München
Magnetrührfische	Merck, Darmstadt
Messelektroden STX2, manuell	World Precision Instruments, Berlin
Messelektroden STX2, manuell, automatisiert	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité
Mikroskope	
Konf. Laser Scanning-Mikroskop LSM 510 META	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Elektronenmikroskop Zeiss 902 A	Zeiss, Jena
Mikrotiterplattenlesegeräte	
Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
Infinite M200	Tecan, Crailsheim
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim

---

Netzgerät Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Ohmmeter	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité
pH-Meter HI 9017 microprocessor	Hanna Instruments, Kehl
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra, Fernwald
Schüttler	
IKA®-Schüttler MTS 4	IKA, München
WT 12/17	Biometra, Göttingen
Reversed-Phase-Absorptionskolonne 8B-S100-FBJ	Phenomenex, Aschaffenburg
Sterilwerkbank BSB 4	Gelaire, Sydney, Australien
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultraschallstab UP50H	Hielscher, Teltow
Ussing-Kammern (Zellkultur, Gewebe)	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité
Voltage-Clamp-Apparaturen CVC6/8	Fiebig, Berlin
Vortex-Geräte	Pharmacia Biotech, Freiburg
Waage 1204 MP	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Ussingstände	Haake, Berlin
Zentrifugen:	
Beckmann Zentrifuge JA-12	Beckmann, Krefeld
Z 200 A	Hermle, Wehingen
Z 233 MK-2	Hermle, Wehingen
Mini-Zentrifuge SproutTM	Heathrow Scientific, Illinois, USA
2.1.2 <u>Verbrauchsmaterialien</u>	
Blutagarplatten Columbia	Merck Millipore, USA
Cryoröhrchen (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialysekammern Slide-A-Lyzer® (0,5 - 3 ml)	Thermo Scientific, Schwerte
Filterpapier (3 MM)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Kanülen (26G 3/8", 25G ×1", 20G 1.")	Becton Dickinson, Frankreich
Mikrotiterplatten	
transparent, Rundboden	Roth, Karlsruhe
schwarz, Flachboden, halbe Fläche Greiner	Bio-One, Frickenhausen
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda- Königshofen

---

---

Parafilm Pechiney	Menasha, Wisconsin, USA
Petrischalen	
ø 6 cm Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen (± gestopft, 0,5 - 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Plexiglas <sup>TM</sup> -Ringe	Charité
PVDF-Membran Perkin	Elmer, Rodgau
Reaktionsgefäße	
0,2, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
1,5, 4,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
15, 50 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Skalpelle Feather	Osaka, Japan
Spritzen	
5, 20 ml	B. Braun, Melsungen
Stabpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson, Frankreich
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Wellplatten (6, 12, 24)	Nunc, Karlsruhe
Zellkulturfiltermembranen	
Millicell <sup>®</sup> -PCF (0,4, 3,0 µm; 0,6 cm <sup>2</sup> )	Merck Millipore, Darmstadt
Transwell <sup>®</sup> PC (0,4 µm; 1,12 cm <sup>2</sup> )	Corning, Amsterdam, Niederlande
Transwell <sup>®</sup> PTFE (0,4, 3,0 µm; 1,12 cm <sup>2</sup> , coated)	Corning, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Frankreich
<u>2.1.3 Laborchemikalien</u>	
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar 100 Agar	Scientific, Essex, Großbritan.
Agarose	Serva, Heidelberg
Alcianblau 8 GS	Roth, Karlsruhe
Amylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Amersham, München
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Cacodylsäure Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Linde, Berlin
CellMask <sup>TM</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
D(+)-Mannose	Fluka, Seelze
Dako-Stift	Dako, Glostrup, Dänemark

---

---

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM/F-12/HAM	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT (Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGTA (Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Formalin (Roti <sup>®</sup> -Histofix 4%)	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)	Fluka, Seelze
Histokleber Histoacryl <sup>®</sup>	B. Braun, Melsungen
Hoechst 33342	Thermo Scientific, Schwerte
Isopropanol	T. J. Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Fluka, Seelze
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
PBS+/-Ca/Mg	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (100×)	PAA, Cölbe
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
PFA-Lösung (Paraformaldehyd, 16%)	Science Services, München

---

---

Phalloidin-Atto 647N	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProTaq Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
Probenecid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserum (FBS)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Seelze
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Sukrose	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
TissueTek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
TRIS-Lösung, pH x	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser (steril, RNase-frei)	Biochrom, Berlin
Xylol	Roth, Karlsruhe
Goat Serum (GS)	PAA, Cölbe
$\beta$ -Hydroxybutyrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
<u>2.1.4 Lösungen und Puffer</u>	
Alcianblaulösung	0,1 % Alcianblau <i>ad</i> 3% Essigsäure
Blockierlösung (Western Blot)	5 % BSA 0,04 % Natriumazid <i>ad</i> TBST
Blockierlösung (Immunfluoreszenz)	5 % Goat Serum 1 % BSA <i>ad</i> PBS+Ca/Mg
Citratpuffer	10 mM Natriumcitrat pH 6,0 (NaOH)
EDTA-Puffer	1 mM EDTA pH 8,0 (NaOH)
EPHO-Puffer	10 % West-Puffer (10 $\times$ ) 0,1 % SDS
Fura-2-AM Stocks	5 mM in DMSO
Fura/Live Cell Puffer	HEPES-Ringerlösung

---

---

	2 mM Probenecid
	2 g/l Glukose
	1 % P/S
HEPES-Ringerlösung	134,6 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	21 mM NaHCO <sub>3</sub>
	2,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,2 mM CaCl <sub>2</sub>
	1,2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10,6 mM HEPES
	mit Carbogen begast, pH 7,4
Luria Bertani Medium	10 g/L Trypton
	5 g/L Hefe Extrakt
	5 g/L NaCl
Laemmli-Probenpuffer (5×)	125 mM TRIS-Puffer pH 6,8
	500 mM DTT
	50 % Glycerol
	10 % SDS
	0,001 % Bromphenolblau
Ringerlösung	113,6 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	21 mM NaHCO <sub>3</sub>
	2,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,2 mM CaCl <sub>2</sub>
	1,2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ohne D(+)-Glukose	
10 mM D(+)-Glukose	
	mit Carbogen begast, pH 7,4
mit Zinkacetat	500 mM Zinkacetat-Dihydrat
RIPA-Puffer	25 mM HEPES pH 7,6
	2 mM EDTA
	25 mM NaF
	1 % SDS
	pro 10 ml 1 Tabl. Proteaseinhibitor
Sammelgel	5,1 % Acrylamid

---

---

	125 mM TRIS-Puffer pH 6,8
	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,1 % TEMED
TAE-Puffer	40 mM TRIS
	20 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
	pH 8,5
TBST	20 mM TRIS
	500 mM NaCl
	0,1 % Tween 20
Transferpuffer	10 % West-Puffer (10×)
	10 % Methanol
Trenngel	12,5 % Acrylamid
	350 mM TRIS-Puffer pH 8,8
	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,1 % TEMED
West-Puffer (10×)	1,9 M Glycin
	0,25 M TRIS
	pH 8,1 - 8,4

#### 2.1.5 Effektoren und parazelluläre Marker

Bariumchlorid	Merck, Darmstadt
FITC-Dextran 4000	TdB, Uppsala, Schweden
Fluoreszein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluo-4-AM	Invitrogen, Massachusetts
Fluo-Zin3	Invitrogen, Massachusetts
Fura-2-AM	Invitrogen, Massachusetts
TEA (Tetraethylammonium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinkacetat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.1.6 Kits und Lösungen

LumiLightPlus Western Blotting Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
Pierce® BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Schwerte

---

## 2.2 Fütterungs- und Infektionsmodell in der Maus

### 2.2.1 Haltung und Fütterung der Mäuse der Zinkstudie

Für die Kolonisationsexperimente wurden die keimfreien C3H/HeJ Wildtypmäuse unter Reinraumbedingungen mit freiem Zugang zu sterilem Wasser und sterilem Mausefutter gehalten. Das Futter enthielt entweder eine physiologisch geringe Zinkdosierung aus Zinkhydroxidcarbonat ( $[\text{ZnCO}_3]_2 \cdot [\text{Zn}(\text{OH})_2]_3$ ) mit 15 mg Zink/kg Futter oder eine therapeutisch hohe Zinkdosierung mit 500 mg Zink/kg Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Futterpellets mit 15 mg Zink/kg enthalten eine niedrigere, aber noch physiologische Zinkkonzentrationen. Die genaue Zusammensetzung der Versuchsdiäten ist Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Spezialdiät mit 15- oder 500 mg Zink/kg (aus Zn-Hydroxidcarbonat) Supplementierung, sterilisiert**

Inhaltsstoffe	%	Zusatzstoffe	per kg
Rohprotein	17.6	Vitamin A (IU/IE)	15,000
Rohfett	5.1	Vitamin D2 (IU/IE)	1,500
Rohfaser	5.0	Vitamin E (mg)	150
Rohasche	5.3	Vitamin K2 (mg)	20
Stärke	36.1	Vitamin C (mg)	30
Zucker	11.0	Kupfer (mg)	14
		<b>Zink (mg)</b>	<b>15 / 500</b>

### 2.2.2 Bakterienkultur und Darmkolonisationsmodell

HlyA-produzierende *E. coli*-536-HlyA<sup>+</sup> sowie eine Hämolyysin-defiziente Mutante (HDM) *E. coli*-536-HlyA<sup>-</sup> (*E. coli*-536 $\Delta$ hlyI $\Delta$ hlyII: cat) (50) wurden in Luria-Bertani (LB) -Nährlösung bei 37°C über Nacht (ü/N) kultiviert bis die späte log-Phase des Bakterienwachstums erreicht wurde. Acht bis zwölf Wochen alte keimfreie C3H/HeJ Wildtyp-Mäuse (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME., USA) wurden in der Medizinische Hochschule Hannover (Institut für Labortierkunde) als keimfreie Tiere gezüchtet und untergebracht. Zur Kolonisation des Darms wurden *E. coli*-536- oder *E. coli*-536-HDM-ü/N Kulturen in LB

---

Medium auf  $10^5$  KBE/100  $\mu$ l verdünnt und über eine orale Magenschlundsonde (200  $\mu$ l) den Mäusen appliziert (Bücker et al., 2014). Die Studie wurde konform zum Tierschutzgesetz und den ARRIVE-Richtlinien (Kilkenny et al., 2010) durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo Berlin) unter der LAGeSo-Genehmigungsnummer G0273/14 tierschutzrechtlich genehmigt. Die Mäuse wurden innerhalb einer Woche nach der Infektion für die Messungen mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach Ermittlung des Körpergewichtes und Dokumentation der Kotkonsistenz jeder Maus wurde das proximale Kolon entfernt und direkt für elektrophysiologische- und Permeabilitäts-Messungen in der Ussing-Kammer verwendet. Parallel dazu wurden weitere Proben für die histologischen Färbungen fixiert. Proben von Fäzes, Milz und Leber wurden in verschiedenen Verdünnungen auf Blutagarplatten für die Zählung der Koloniebildenden Einheit (KBE) ausplattiert. Der Darminhalt aus dem Dickdarm (Caecum, Kolon) wurde entnommen, um die luminalen Zinkkonzentrationen zu bestimmen.

### 2.2.3 Körpergewicht der Tiere

Die Tiere wurden beim Umsetzen in die sterilen Käfige vor der Infektion und nach der Inkubation von maximal einer Woche am Tag der Messung (Sektion) jeweils einmal gewogen. Die so ermittelte potentielle Gewichtsreduktion der Mäuse ist ein Parameter zur Berechnung des Aktivitätsgrades der Kolitis (klinischer Kolitis-Score).

### 2.2.4 Keimzahlbestimmung

Um den Kolonisationserfolg der inokulierten Bakterien zu prüfen, wurden die Bakterien im Fäzes der Tiere auf Agarplatten kultiviert. Ein Übertritt von Bakterien (Translokation) aus dem Darm in andere Organe (Leber, Milz) wurde ebenfalls über Kultivierung aus den entsprechenden Organproben detektiert. Die Bestimmung von KBE von *E. coli*-536 in den Fäzes-, Milz und Leberproben der Mäuse erfolgte mithilfe des Oberflächenverfahrens. Hierfür wurden die Proben zunächst mit 500  $\mu$ l PBS verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit einem feinen Gewebemörser homogenisiert. Daraufhin wurde unter sterilen Bedingungen eine dekadische Verdünnungsreihe, ebenfalls mit PBS als Verdünnungsmedium, hergestellt. Im Oberflächen-Ausplattierungsverfahren wurden jeweils 50  $\mu$ l einer Verdünnungsstufe auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Nach eintägiger Inkubation bei 37°C unter aeroben Bedingungen wurden die geeigneten Verdünnungsstufen ausgezählt und die koloniebildenden Einheiten berechnet.

$$\text{KBE / mg Probe} = \frac{20 \times \text{Summe der gezählten Kolonien}}{\text{Summe der ausgezählten Verdünnungsstufen}}$$

---

### 2.2.5 Analyse der Zn<sup>2+</sup>-Konzentrationen im Darminhalt

Nach einer Hydrolyse der Probenfraktionen in Salzsäure (37%) für 90 min bei 250°C wurde das Gesamtzink des Darminhaltes in einem Atomabsorptionsspektrometer (AAS vario 6, Analytik Jena, Deutschland) bestimmt. Zur Feststellung des gesamten unlöslichen Zinks wurden die Proben 1 h bei RT homogenisiert, in zweifach destilliertem Wasser verdünnt (1:2) und 10 min bei 14.000×g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, auf polymere Reversed-Phase-Absorptionskolonnen gegeben und die Elutionsmittel auf die gesamte freie anorganische Zinkmenge untersucht. Nach der Elution mit Acetonitril / Wasser (4: 6), Acetonitril / Ameisensäure (7:3) und dem Abdampfen der organischen Phase durch Vakuum-Zentrifugation wurde das Protein-assoziierte Zink definiert. Hierbei kann man die an Proteingebundenen und ungebundenen Zinkionen bestimmen.

## **2.3 Klinische Parameter**

### 2.3.1 Klinischer Kolitis-Score

Die Ausprägung der Krankheitsaktivität der Kolitis (als Modell für das menschliche Krankheitsbild einer Colitis ulcerosa) konnte anhand verschiedener klinischer Parameter im symptomatischen Verlauf der infizierten Mäuse (nach Araki et al., 2005) evaluiert werden. Im verwendeten Score wurden für verschiedene klinische Auffälligkeiten kumulativ Punkte vergeben (Tabelle 1). Drei Parameter werden für die Bestimmung der Krankheitsaktivität zugrunde gelegt: Gewichtsverlust, Konsistenz des Kots und das Auftauchen von Blut im Kot, wobei pro Parameter jeweils 0 bis 4 Punkte zu vergeben sind. Diese Punkte werden addiert und durch 3 dividiert. Die nun berechnete Punktzahl gibt eine Einschätzung der Krankheitsausprägung der Kolitis von 0 (nicht entzündet) bis 4 (sehr entzündet) wieder.

**Tabelle 2: Klinischer Kolitis-Score von 0 (nicht entzündet) bis 4 (sehr entzündet) Punkten modifiziert\* nach Araki et al.**

<b>Kriterium</b>	<b>Punkte</b>
<b>Gewichtsverlust</b>	<b>0 - 4</b>
kein Gewichtsverlust	0
Verlust von 1 bis 5 % des Ausgangsgewichts	1
Verlust von 5 bis 10 % des Ausgangsgewichts	2
Verlust von 10 bis 15 % des Ausgangsgewichts	3
Verlust mehr als 15 % des Ausgangsgewichts	4
<b>Kotkonsistenz</b>	<b>0 - 4</b>
klar geformte Pellets	0
weicher, halbgeformter Kot ohne Adhärenz an den Anus	2
flüssiger, ungeformter Kot mit Adhärenz an den Anus	4
<b>Blutung</b>	<b>0 - 4</b>
keine Blutung	0
okkultes Blut im Kot, Haemokkult positiv	2
sichtbares Blut im Kot	4

\*Modifikation: es werden mehr als 15% Gewichtsverlust als schwere Belastung mit 4 Punkten bewertet und nicht wie ursprünglich mehr als 20% Verlust des Ausgangsgewichts (Araki et al., 2005), weil Letzteres eine zu schwere Belastung für die Tiere bedeuten würde, was im Sinne der Reduktion der Belastungen des Versuchstieres und gemäß den Tierschutzbestimmungen zu vermeiden ist.

### 2.3.2 Histopathologie

Formalin-fixierte Kolon-Gewebeproben der Maus wurden in Paraffin eingebettet und in 4 µm dicken konsekutiven Schnitten mit Haematoxylin und Eosin (H&E) gefärbt (siehe 3.5). Die pathologische Befundung unter dem Lichtmikroskop wurde verblindet durchgeführt. Die entzündlichen Epithelveränderungen wurden (nach Katakura et al., 2005) zwischen 0 (gesund) und 12 (entzündet) eingeordnet. Dabei konnten 0 bis 6 Punkte für den Epithelschaden vergeben werden und 0 bis 6 Punkte für die Gewebeeinfiltration mit Immunzellen (Tabelle 2).

**Tabelle 3: Additiver histopathologischer Entzündungsscore bei Kolitis von 0 bis 12 Punkten nach Katakura et al.**

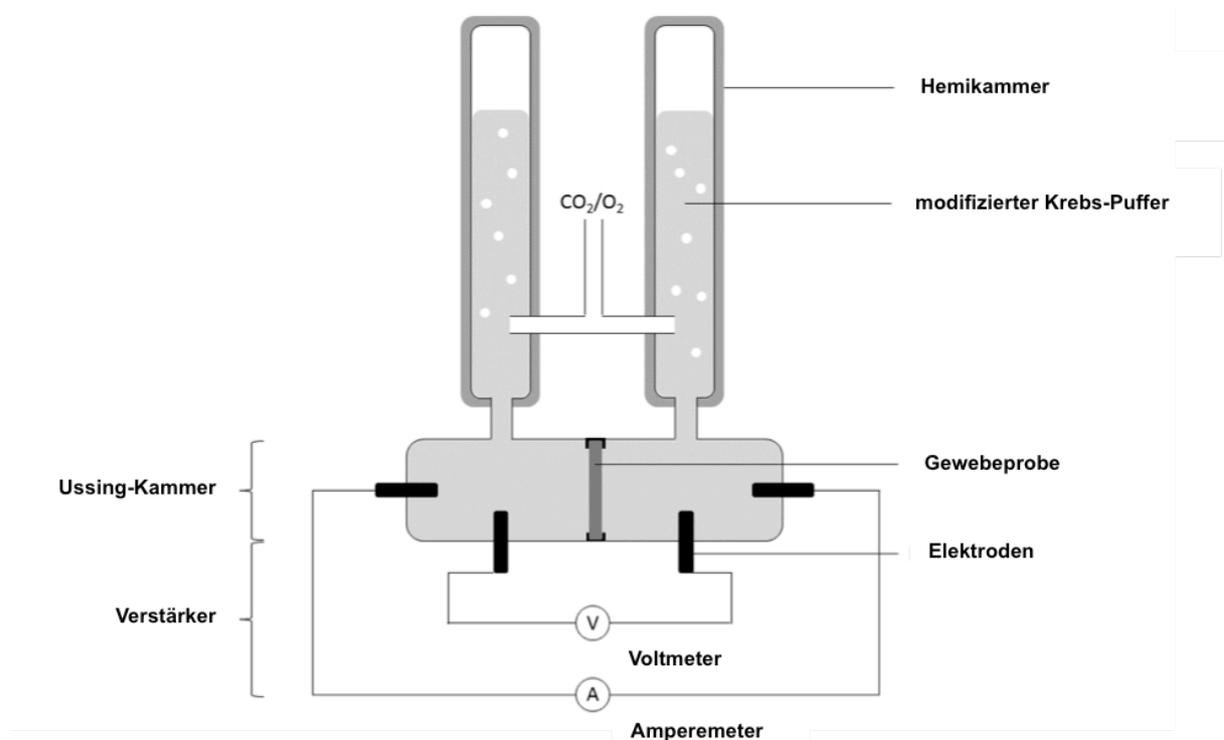
<b>Kriterium</b>	<b>Punkte</b>
<b>Epithelschaden</b>	<b>0 - 6</b>
normales Epithel	0
epitheliale Hyperproliferation, irreguläre Krypten, Becherzellverlust	1
gering- bis mittelgradiger Kryptenverlust	2
schwergradiger Kryptenverlust	3
kompletter Kryptenverlust, Epithel intakt	4
Ulkus, klein bis mittelgradig (Größe < 10 Krypten)	5
Ulkus, groß (Größe > 10 Krypten)	6
<b>Gewebeinfiltration mit Immunzellen</b>	<b>0 - 6</b>
Mukosa	0 - 3
normal	0
geringgradig	1
mittelgradig	2
schwergradig	3
Submukosa	0 - 2
normal	0
gering- bis mittelgradig	1
schwergradig	2
Serosa	0 - 1
normal	0
gering- bis schwergradig	1

## **2.4 Elektrophysiologische Methoden**

### **2.4.1 Ussing-Technik**

Die Ussing-Kammer (nach dem dänischen Physiologen Hans Henrikson Ussing, 1911- 2000) ermöglicht an *ex vivo* Gewebeexplantaten und *in vitro* Zelllayern die Bestimmung folgender elektrophysiologischer Parameter: Transepitheliale Spannung und transepithelialer Widerstand (TER). Die Durchführung von Permeabilitätsmessungen durch transepitheliale

Fluxe von Tracermolekülen (Ussing & Zeran, 1951) ist ebenfalls in der Ussing-Kammer möglich. Die beiden mit Ringerlösung gefüllten Ussing-Kammerhälften sind durch das zu vermessende Epithel getrennt. Ein Stoffaustausch zwischen beiden Kammerhälften kann nur über das Epithel erfolgen. Stoffkonzentration und Füllhöhe sind in beiden Kammern identisch, somit werden Konzentrationsgradienten und hydrostatische Kräfte innerhalb des Systems, die den transepithelialen Transport beeinflussen würden, ausgeschaltet. Physiologische Bedingungen, wie die Temperatur der Ringerlösung (37°C) und der pH-Wert von 7,4 durch Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) werden so konstant gehalten. Die Carbogen-Begasung bewirkt zudem eine permanente Zirkulation der Ringerlösungen. Beide Kammerhälften sind über Agarbrücken (3% Agar in einer 1,8% NaCl-Lösung) mit einer in Kaliumchloridlösung (3 M KCl) stehenden epithelnahen Spannungs- und epithelfernen Stromelektrode verbunden. Mit einem Voltmeter wird die transepitheliale Potentialdifferenz zwischen beiden Spannungselektroden (KCl/Kalomel) gemessen. Die Stromelektroden (Ag/AgCl) stehen in Verbindung mit einem Amperemeter und einer variablen Gleichstromquelle. Die Applikation eines Stroms verursacht über dem Epithel eine Potentialdifferenz, wodurch gemäß des Ohm'schen Gesetzes (Widerstand = Spannung / Stromstärke) der TER berechnet werden kann. Die Ussing-Kammern wurden institutsintern gebaut und zwar von der Firma Haake Berlin.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer mit eingespannter Gewebeprobe (Epithel) nach Altmeyer 2016.**

---

#### 2.4.2 Messvorbereitungen für die Ussing-Kammer

Vor der elektrophysiologischen Vermessung jedes Kolonpräparates wurden die Leerwerte gemessen, d.h. die Potentialdifferenz der Spannungselektroden und der Widerstand der mit Badlösung gefüllten Ussing-Kammer (ohne Gewebe) bezogen auf die später exponierte Epithelfläche (0,28 cm<sup>2</sup>). Diese Offset-Werte wurden von denen mit Gewebe erhobenen Messwerten subtrahiert. Die herauspräparierten Kolonabschnitte wurden auf Plexiglas-Ringe mittels Gewebekleber geklebt und in die Ussing-Kammer montiert. Beide Kammerhälften wurden zeitgleich mit modifizierter Ringerlösung (5 ml) befüllt und bis zum Erreichen konstanter Widerstände 30 Minuten lang äquilibriert.

#### 2.4.3 Permeabilität des Kolonepithels gegenüber Makromolekülen

Die Bestimmung der epithelialen Permeabilität für Makromoleküle mit 4000 Da Molekulgewicht (FITC-Dextran 4 kDa; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat) wurde durch Fluxmessungen über dem Epithel in serosaler Richtung in der Ussing-Kammer durchgeführt. Währenddessen konnte der TER als Maß der Barriereintegrität verfolgt werden. Durch die kontinuierliche Zirkulation der Badlösung wurde das Auftreten von epithelnahen höheren Marker-Konzentrationen vermieden. Der zu applizierende fluoreszierende Molekülmarker FITC-Dextran 4 kDa (FD4) wurde zuvor drei Tage lang bei 4 °C gegen Kochsalzlösung dialysiert (Slide-A-Lyzer), somit erhielt man eine FD4 Lösung, in der kleinere fluoreszierende Bruchstücke entfernt sind. Eine unmarkierte Dextran-4-kDa-Lösung mit definierter Dextran-4-kDa-Konzentration wurde analog ohne Dialyse angesetzt. Markiertes FD4 wurde auf die mukosale Seite des Gewebes gegeben mit einer Endkonzentration von 0,2 mM. Zur serosalen Seite wurde die unmarkierte Dextran-4kDa-Lösung mit gleicher Konzentration hinzugefügt. Die Proben wurden aus der basolateralen Hemikammer in 30-minütigen Intervallen entnommen und das entnommene Volumen wurde mit Badlösung aufgefüllt. Die Fluoreszenz wurde in einem Spektrofluorimeter gemessen. Hierfür wurde aus der FD4-Stammlösung (20 mM) und der verwendeten modifizierten Ringerlösung eine Standardreihe hergestellt. Von den auf serosaler Seite entnommen Proben wurden jeweils 130 µL pro *Well* auf einer 96-*Well* Platte (Greiner bio-one) doppelt eingesetzt. Die Bestimmung der Emissionsintensität des FD4 wurde bei 538 nm Wellenlänge im Mikrotiterplattenlesegerät (Spektrofluorimeter, Infinite M200, Tecan) durchgeführt. Die Permeabilität wurde aus dem Flux geteilt durch die Konzentrationsdifferenz berechnet.

---

#### 2.4.4 Messung des transepithelialen Widerstands eines Zellmonolayers

Der transepitheliale Gesamt-Widerstand (TER) eines Zelllayers gibt Auskunft über dessen Barriere Eigenschaften. Dazu wurde der TER von epithelialen Zelllinien, welche auf permeablen Trägern in Kulturschalen zu einem Monolayer wuchsen, mit Hilfe einer mechanischen Elektrodenvorrichtung (Ing. grad. Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF) gemessen. Das Eintauchen beider Elektroden in das auf 37°C temperierte apikale und basolaterale Kulturmedium wurde automatisiert gewährleistet (Kreusel et al., 1991). In Verbindung mit einem Ohmmeter ergab sich der TER gemäß dem Ohm'schen Gesetz aus der Spannungsänderung, welche durch einen Rechteckstrom ( $\pm 10 \mu\text{A}$ , 21 Hz) induziert wurde. Der Eigenwiderstand eines unbewachsenen Filters wurden vom Messwert subtrahiert und der resultierende TER mit der Filterfläche multipliziert. So konnten TER-Werte auf die Epithelfläche normiert, in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  verglichen werden. Um Aussagen zur TER-Entwicklung nach Behandlung von Zelllayern zu machen, wurden entsprechende Werte prozentual auf den TER zum Zeitpunkt  $t=0$  bezogen. Die Messelektroden wurden vor und nach Gebrauch in 80%igen Ethanol getaucht, sodass die TER-Messung beliebig oft unter sterilen Bedingungen einer Sterilwerkbank erfolgen konnte.

### **2.5 Zellbiologische Methoden**

#### 2.5.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Untersuchungen wurden mit humanen Kolon-Karzinomzelllinien (HT-29/B6 oder T84) durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium für die HT-29/B6 Kolon-Epithelzellen (Kreusel et al., 1991) diente Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI; 1640, Sigma-Aldrich, mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum). T84 Kolon-Epithelzellen (ATCC CCL-248) wurden in einem 1:1-Gemisch aus Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium und Ham's F-12-Medium (DMEM/F-12, Sigma-Aldrich), ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) kultiviert. Die Kultivierung wurde bei 37°C in einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt.

#### 2.5.2 Zellmonolayer auf Filtermembranen

Die Zellen wurden für elektrophysiologische Messungen und für weitere Untersuchungen auf Filtermembranen ausgesät. Diese Membran ist für das eingesetzte Kulturmedium permeabel, jedoch teilt ein konfluenter Zelllayer auf der Membran das Kultursystem in ein

---

apikales (oberhalb der Filtermembran) und ein basolaterales Kompartiment (die Zellkulturschale) auf, zwischen denen der Transport von Molekülen untersucht werden kann. Jeweils drei bis vier stehende Millicell PCF-Filter (Millipore, MA, USA, Membranfläche 0,6 cm<sup>2</sup>, Porengröße 0,4 oder 3 µm) wurden in einer Kulturschale (ø 6 cm) platziert. Die Zellen wurden mit einer durchschnittlichen Konzentration von 7×10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf die Filter ausgesät. Die Zellen wurden im konfluenten Zustand passagiert. Hierzu wurde das Medium in der Kulturflasche abgenommen, der Zellrasen mit PBS (w/o Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und anschließend Trypsin-EDTA (0,05%/ 0,02%) zugegeben und durch leichtes Schwenken so verteilt, dass der Zellrasen komplett bedeckt war. Die Zellkulturflaschen wurden ca. 1 h bis zum Ablösen der Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und entweder auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt oder gezählt und für die Versuche in den entsprechenden Zellzahlen ausgesät.

### 2.5.3 Bakterielles Infektionsmodell *in vitro*

Die Bakterien wurden aus Glycerolstocks auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37°C ü/N kultiviert. Die *E. coli*-536- und *E. coli*-536-HDM-ü/N-Kulturen wurden mit frischem LB-Medium resuspendiert. Für die Infektion von menschlichen Kolonepithelzellen wurden die Bakterien auf 10<sup>6</sup> KBE in LB-Bouillon verdünnt, zentrifugiert und in dem jeweiligen epithelialen Zellkulturmedium resuspendiert. Für Inhibitionsexperimente wurde Zinkacetat-Dihydrat (ZnAc, 500 mM) gleichzeitig mit der bakteriellen Infektion appliziert. Zur Herstellung des konzentrierten Überstandes, der HlyA aus *E. coli*-536 enthielt, wurden die Bakterien auf Blutagarplatten bei 37°C ü/N kultiviert, danach in Zellkulturmedium suspendiert und zur logarithmischen Phase angezogen. Der bakterielle Überstand wurde durch Zentrifugation (3000×g für 5 min) gesammelt und über Ultrafiltration (Amicon 50k, Ultra-Zentrifugalfiltereinheiten, Merck Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert. Um sicherzustellen, dass der Überstand weiterhin HlyA enthält, wurde die Proteinexpression des HlyA im Western Blot überprüft.

### 2.5.4 Bakterienproliferation in zinkhaltigem Medium

Um einen möglichen Zn<sup>2+</sup>-bedingten bakteriostatischen oder bakteriziden Effekt in der Bakterienkultur zu prüfen, wurden in Vorversuchen Proliferationsuntersuchungen durchgeführt, um Zink-Effekte auf das Bakterienwachstum auszuschließen. Zur Quantifizierung bakterieller Populationen innerhalb einer Nährsuspension verwendeten wir das Oberflächen-Ausplattierungsverfahren. Dafür wurden Bakterien in zinkfreiem und in zinkhaltigem Medium angezüchtet (sowohl der Hämolyisin-produzierende als auch der Hämolyisin-defiziente Stamm). ZnAc wurde analog zu den *in vitro* Experimenten in der

---

gleichen Konzentration dem LB-Medium zugesetzt (500  $\mu\text{M}$ ). Die beiden Bakterienstämme HDM und HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* 536 wurden je in zinkfreien und in zinkhaltigem LB bei 37°C für 6 h kultiviert. Die initiale Menge an Bakterien im angeimpften Medium wurde auf  $8 \times 10^5$  bestimmt. Nach 6 h wurden die Wachstumssuspensionen seriell verdünnt und auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach 24 h wurden die KBE auf den Platten ausgezählt. Die Anzahl der KBE ergibt die Anzahl der Bakterien, die unter den spezifischen Inkubationsbedingungen mit und ohne ZnAc wachsen.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Proteinextraktion

PCF-Filter mit konfluenten HT-29/B6 Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS<sup>+Ca/Mg</sup> gewaschen und danach mit 1 ml auf RT temperiertem RIPA-Puffer versetzt. Dieser hoch denaturierende RIPA (engl. radio immuno precipitation assay)-Puffer schließt Multimerisierung von Proteinen und eine Unzugänglichkeit von Epitopen aus. Der Zelloberflächenlayer wurde nach 2 min Inkubation auf Eis mit einem Spatel vom Filter gelöst und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die Resuspension des Lysates sowie eine 30-minütige Inkubation erfolgten auf Eis durch einen Vortex-Homogenisierer. Darauf folgend wurde das Lysat aliquotiert und mit einem Ultraschallstab (UP50H, Hielscher) 10 mal 1 s lang sonifiziert und dreimal durch eine 20 Gauge Nadel und dann dreimal durch eine 26 Gauge Nadel gezogen. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.6.2 Bestimmung der Proteinquantität

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte mittels BCA (engl. bicinchoninic acid)-Methodik nach Angaben des Herstellers (Pierce<sup>®</sup>, Thermo Scientific). Das Prinzip basiert darauf, dass Proteine in alkalischem Milieu Cu<sup>2+</sup> quantitativ zu Cu<sup>+</sup> reduzieren, das mit Bicinchoninsäure Komplexe bildet, was durch einen Farbumschlag von grün nach violett sichtbar wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte jeweils in Doppelbestimmungen. Ein Volumen von 10  $\mu\text{l}$  jeder Probe (ggf. mit RIPA-Puffer verdünnt), des reinen RIPA-Puffers und der BSA-Kalibrierungslösungen (0; 0,2; 0,8 und 1,2 mg BSA/ml) wurden in Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt, bevor 190  $\mu\text{l}$  der BCA-Gebrauchslösung dazu pipettiert wurden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C und eine anschließende Messung der Absorption bei 562 nm im Mikrotiterplattenlesegerät (Spektrofluorimeter, Infinite M200). Unter Erstellung einer Eichgeraden wurden die zu bestimmenden Proteinkonzentrationen der Lysate ermittelt.

---

### 2.6.3 SDS-PAGE

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dafür wurden die Lysate in 1× Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden Lysate mit 20 µg Protein pro Probe in Geltaschen des 1,5 mm flachen Gelsystems geladen. Außerdem wurden in jeweils eine Tasche 5 µl eines Größenstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) appliziert, mit dem die spätere Größenordnung der Proben-Banden gewährleistet wurde. Im Anschluss daran erfolgte die Gelelektrophorese im Mini-Protean® 3 Elektrophoresesystem (Bio-Rad) bei einer Spannung von 100 V für etwa 1,5 h.

### 2.6.4 Western Blotting und Immundetektion

Für den immunologischen Nachweis der aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel mussten diese zunächst auf eine Membran übertragen werden. Dies wurde mittels Western Blotting im Nassblotverfahren durchgeführt. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde dafür in Methanol aktiviert und danach wie alle weiteren Komponenten des Blot-Sandwiches in Transferpuffer äquilibriert, wonach das Blot-Sandwich wie folgt geschichtet wurde: Anode (-), Schwamm, Filterpapier, SDS-Polyacrylamidgel, PVDF-Membran Filterpapier, Schwamm Kathode (+). In der elektrophoretischen Transferzelle Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) erfolgte der Proteintransfer in Transferpuffer und unter gleichmäßiger Kühlung bei 100 V für 1 h. Im Anschluss an das Blotting wurden freie Proteinbindstellen auf der Membran durch 2-stündige Inkubation in Blockierlösung (5 % BSA; 0,04 % Natriumazid; ad TBST) geblockt. Anschließend wurde die Membran in Blockierlösung angesetztem Primärantikörper (rabbit anti-HlyA, bereitgestellt durch Lothar Beutin, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) ü/N bei leichtem Schwenken und 4°C inkubiert und danach dreimal in TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde daraufhin für 1,5 h bei RT mit dem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper goat-anti-rabbit in einer 1:1000 Verdünnung (in 1% Milchpulverlösung; in TBST gelöst) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST und der Einwirkung der LumiLightPlus-Entwicklerreagenzien fand die Detektion der Chemilumineszenzsignale, resultierend aus der Luminolreaktion, am Lumineszenzbildanalysator Fusion FX 7 statt. Zur Überprüfung der Menge geladenen Proteins wurden β-Aktin Primärantikörper im Anschluss an die Entwicklung auf die Membran gegeben, erneut mit TBST gewaschen und anschließend mit Sekundärantikörpern und Entwicklerreagenzien behandelt und detektiert. Die densitometrische Auswertung der

---

Western Blot-Signale erfolgte unter Verwendung der Software AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest, Straubenhardt, Deutschland).

### 2.6.5 Calprotectin Bestimmung mittels ELISA

Calprotectin wird von neutrophilen Granulozyten und Monozyten gebildet und ist ein Marker für gastrointestinale Erkrankungen entzündlicher Genese. Die 5 mg Stuhlproben wurden zunächst 1:50 mit Extraktionspuffer extrahiert, wodurch das Calprotectin in eine Pufferbase überführt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (3000xg für 10 min) konnte 100 µl des Überstandes spezifisch im Assay auf Calprotectin getestet werden. Der Test (Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) benutzt zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die in der Lage sind murines Calprotectin zu erkennen. Die 96-Well-Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalen anti-Maus Calprotectin Antikörper beschichtet. Nach 5-maligem Waschen der Wells mit Waschpuffer wurden die Teststandards, Kontrollen und Mausstuhlproben pipettiert und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Dabei wurde das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Der Inhalt der Wells wurde verworfen und 5 mal mit Waschpuffer gespült und daraufhin mit dem Detektionsantikörper für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe des Konjugates (Extravidin, Peroxidase markiert) für 1 h bei 37°C. So bildete sich ein Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte, der sich wie folgend zusammensetzte: Fängerantikörper - murines Calprotectin - Detektionsantikörper - Peroxidase Konjugat. Nach wiederholtem Waschen mit Waschpuffer wurde das Peroxidasesubstrat (Tetramethylbenzidin) für 5 bis 15 min in die Wells pipettiert und abschließend mit einer Stopplösung versetzt. Die Zugabe von Säure stoppt die Enzymreaktion und es erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Diese Verbindung konnte photometrisch bei 450 nm gemessen werden, wobei die Intensität der Farbe dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional entspricht. Parallel wurde eine Standardkurve der optischen Dichte (OD) gegen Standardkonzentrationen erstellt, aus der die Konzentration der Proben ermittelt wurde.

## **2.7 Histochemische Methoden**

### 2.7.1 Fixierung

Die Fixierung der Zellschichten und des Gewebes diente der Konservierung der Präparate, um spätere mikroskopische Analysen durchführen zu können, wobei die Fixierungsagenzien auf die weitere Verwendung abgestimmt wurden. Kultivierte HT-29/B6 Monolayer wurden mit

---

PBS<sup>+Ca/Mg</sup> gewaschen und entweder in eiskaltem Methanol bei -20 °C für 10 min oder mit 2% Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS<sup>+Ca/Mg</sup> wurden die Filter mit den Zellmonolayer aus dem Filtrerrahmen gestanzt und bis zur Immunfluoreszenzfärbung in 24-Wellplatten in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> aufbewahrt. Auf Plexiglas-Ringe geklebtes Gewebe aus Ussing-Kammerversuchen wurde 2 h in 4% Formalin bei RT fixiert und ü/N in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> inkubiert. Anschließend wurden die Ringe vom Gewebe entfernt, welches entwässert und nach der Paraffineinbettung geschnitten wurde. Die Schnitte wurden für H&E-Färbungen bei RT gelagert. Für ungeschnittene Gewebeschnitte (*whole mount staining*) wurde zur apikalen Quantifizierung der fokalen Läsionen PFA verwendet. Die Inkubation erfolgte für 4 h in 2% PFA und über Nacht in 50 mM Glycin. Das fixierte Gewebe wurde anschließend für jeweils 1 h in einer aufsteigenden Sukrosereihe (10%, 20% und 30%) bei 4°C entwässert. Das ungeschnittene Gewebe wurde auf Objektträger gezogen und bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei -20 °C gelagert.

### 2.7.2 H&E-Färbung

H(ämatoxylin)&E(osin)-Färbung sind Übersichtsfärbungen, bei denen Hämatoxylin saure Molekülgruppen wie Desoxyribonukleinsäuren im Gewebe (z. B. Zellkerne) blau anfärbt und Eosin basische Strukturen (z. B. cytoplasmatische Proteine und Kollagen) rot färbt. Initial wurden die Paraffingewebeschnitte in zwei Schritten für 10 min je 30 s in Xylol entparaffiniert. Danach folgte die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 30 s in 100%, 96%, 70%, 30% Ethanol, und dann Aqua bidest). Nach 1-minütiger Inkubation in Hämatoxylin wurden die Schnitte in lauwarmem Leitungswasser gebläut und im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydratisiert (1 min Aqua bidest; je 30 s in 30%, 70%, 96% Ethanol). Nach 30 s Inkubation in Eosin erfolgte ein kurzes Eintauchen der Schnitte in 96% Ethanol. Die abschließende Dehydratisierung erfolgte in 100% Ethanol sowie die Klärung in Xylol für je zweimal 30 s, woraufhin die Schnitte mit Pertex eingedeckt wurde. Mit einem konventionellen Lichtmikroskop (IMt-2, Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden bei 10-facher Vergrößerung Aufnahmen der ausgehärteten Schnitte aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines histopathologischen Entzündungsstandard ausgewertet.

### 2.7.3 Immunfluoreszenzfärbung

Über eine Antigen-Antikörper-Bindung mit Kopplung des Antikörpers an einen Fluoreszenzfarbstoff lassen sich Verteilungsmuster zellulärer Proteine spezifisch markieren und anschließend fluoreszenzoptisch visualisieren. Eine simultane Färbung mehrerer

---

Proteine ist möglich, wenn die applizierten Protein-spezifischen Primärantikörper aus verschiedenen Arten (Maus, Kaninchen, Ziege) stammen und die anschließend eingesetzten Spezies-spezifischen, Fluorophor-markierten Sekundärantikörper selektiv nur den Primärantikörper der gleichen Art erkennen und mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt sind. Neben dieser indirekten immunologischen Proteinmarkierung kann ein Protein ebenfalls immunologisch über einen Fluorophor-markierten Primärantikörper visualisiert werden. Zur Orientierung wurden zusätzlich zum Zielprotein ein Referenzprotein (E-Cadherin, Zonula occludens protein-1 (ZO-1) oder Aktin) sowie der Zellkern markiert. Letzteres basiert auf der Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) mit der DNS. Die Darstellung von Aktinfilamenten wurde mittels Färbung mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin durchgeführt. Phalloidin ist ein Mykotoxin, das mit hoher Affinität an F-Aktin bindet. Für die Immunfluoreszenzfärbung des Zielproteins HlyA und eines Referenzproteins im HT-29/B6 Zellmodell wurde der Primärantikörper mit 0,5% Triton X-100 in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> 1:1000 verdünnt und in einem Volumen von 300 µl/Filter/Well einer 24-Wellplatte für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Somit erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 sowie die Antikörperbindung. Nach einem 1-minütigen und 2x 10-minütigen Waschen mit PBS<sup>+Ca/Mg</sup> wurden die Zellschichten mit einem in 0,5% Triton X-100 und 1 µg/ml DAPI in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> entsprechend verdünnten Mix aus Sekundärantikörpern bzw. Phalloidin-Atto 647N (1:200, Sigma-Aldrich) für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nach einem 1-minütigen und 2x 10-minütigen Waschen mit PBS<sup>+Ca/Mg</sup> schloss sich die Inkubation in Aqua bidest an. Die Filter wurden leicht abgetupft und mit einem Tropfen ProTaq Mount Fluor (Biocyc, Luckenwalde, Deutschland) beträufelt und blasenfrei eingedeckt. Die Objektträger wurden bis zur Mikroskopie im Dunkeln bei RT gelagert. Die Färbung des ungeschnittenen Gewebes erfolgte wie bei Bratz et al. 2013 beschrieben. Das fixierte Gewebe wurde 2 h bei 37°C in 1% Triton X-100 in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> permeabilisiert und anschließend 3 h bei RT in einer Blockierungslösung (10% Goat-Serum, 1% Rinder-Serum Albumin, 0,8% Triton X-100 in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in der Blockierungslösung und anschließendem 4-maligem Waschen für jeweils 1 h mit der Blockierungslösung. Über Nacht wurde erneut bei 4°C mit einem spezifischen Sekundärantikörper inkubiert und am folgenden Tag 4-mal gewaschen. Die Färbung mit DAPI und Phalloidin-AlexaFluor647N (jeweils 1:1000) erfolgte für 30 min bei RT. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden folgende Antikörper verwendet: anti-HlyA, anti-*E. coli*-O (1:200, Lothar Beutin, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin), anti-Occludin (1:100), anti-E-cadherin (1:250), AlexaFluor<sup>-488</sup> goat-anti-mouse, AlexaFluor<sup>-488</sup> goat-anti-rabbit, AlexaFluor<sup>-594</sup> goat-anti-mouse oder AlexaFluor<sup>-594</sup> goat-anti-rabbit IgG (1:500, Invitrogen,

---

Karlsruhe). Die Sensitivität der Antikörper wurde zuvor an *E. coli*-536-infizierten HT-29/B6 Zellkulturen evaluiert.

#### 2.7.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die optische Darstellung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM, Zeiss LSM510META, Jena, Deutschland) mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss). Mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie können optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten visualisiert werden. Dabei wird eine Probe von einem Laserstrahl definierter Wellenlänge Punkt für Punkt bestrahlt und die Fokusebene zeilenweise abgerastert (x- und y-Achse). Das von der Fokusebene emittierte Licht sowie emittiertes Streulicht darunter und darüber liegender Probenebenen treffen auf eine Lochblende variablen Durchmessers, durch welche Streulicht von der Detektion weitestgehend ausgeschlossen wird. Die betrachtete Probenebene wird so von einem konfokalen LSM in einem Bild höherer Auflösung dargestellt als es mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop möglich ist. Für die Aufnahme immunfluoreszenzgefärbter Proben wurden Fluorophore mit Laserlicht einer passenden Wellenlänge (Exzitation) angeregt und das emittierte Licht im angegebenen Wellenlängenbereich (Emission) detektiert. Die 2 mm tiefe Darstellung des Gewebes erfolgte in zweidimensionaler XY- Schnitfführung durch viele Schnittebenen (Z-stacks) kombiniert zu einem dreidimensionalen mikroskopischen Bild. Die Präsentation der Aufnahmen erfolgte mit der LSM 510 META-spezifischen Software (Zeiss).

#### 2.7.5 Live Cell Imaging

Zur Erfassung des Calcium-Signalings und einer Beobachtung der möglichen Veränderungen der Zellmorphologie und des Zellverbandes unter HlyA-Inkubation in HT-29/B6 Epithelzellen wurden lebende, auf Filtern wachsende Zellmonolayer gefärbt und analysiert. Dazu wurde das Äquivalent von 1 cm<sup>2</sup> einer konfluenten Zellkulturschale am Boden eines invertierten Filterträgers (Millicell 12 mm, Porengröße: 0,4 µm, Millipore, Deutschland) ausgesät und bis zur Bildanalyse 7 bis 11 Tage kultiviert. Die Zellen wurden am Versuchstag einmal mit HEPES/Ringer-Puffer gewaschen. Das Calcium-Signaling wurde mit dem permeablen Ca<sup>2+</sup> Chelator Fluo4-AM analysiert. Dafür wurden die Zellen 1 h bei 37°C mit 4 mM Fluo-4-Acetoxymethylester (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA) inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde der HT-29/B6 Monolayer zeitgleich mit 2 µM Hoechst 33342 (Thermo Fischer Waltham, MA., USA) apikal im HEPES/Ringer-Puffer gefärbt und zum Aufzeigen der Zellgrenzen wurde apikal 5µg/ml CellMask Deep Red-

---

Plasmamembranfärbung (Invitrogen) appliziert. Nach gründlichem Waschen (3x5 min) mit HEPES/Ringer-Puffer wurde ein erstes Bild (0 min) aufgenommen (Zeiss LSM780, Jena). Unmittelbar nach Zugabe von 200 µl eines präparierten HlyA-Überstandes wurden alle 2 Minuten Bilder mit einem 40x Wasser-Immersionsobjektiv aufgenommen. Die Inkubationskammer wurde während des Experimentes konstant auf 37°C erwärmt.

#### 2.7.6 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in humanen Kolon Epithelzellen

Die Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von HlyA<sup>+</sup>- und Zinkacetat zu kultivierten Zellmonolayern wurde mit ratiometrischer Calciummessung unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA., USA) beurteilt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde als zell-permeabler AM Ester verabreicht. Das Verhältnis der bei 510 nm emittierten Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 340 nm und der Fluoreszenzintensität bei 510 nm nach Anregung bei 380 nm (340/380) spiegelt Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wider. T84-Zellen wurden bis zur Konfluenz in Poly-L-lysinbeschichteten 96-Well-Platten gezüchtet, mit HEPES/Krebs-Lösung gewaschen, die 2 g/l Glucose und 2 mM Probenecid enthielt (HEPES = 4- (2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinethansulfonsäure). Probenecid ist ein Inhibitor für organische Anionentransporter, die sich in den Zellmembranen befinden. Diese Transporter extrudieren häufig fluoreszierende Indikatoren aus Zellen und tragen so zu einer schlechten Farbstoffretention bei. Dieses Phänomen verursacht gewöhnlich einen hohen Hintergrund in den Versuchen, die eine gute Retention von Farbstoffindikatoren innerhalb der Zellen erfordern. Die Verwendung von Probenecid zur Hemmung der Aktivitäten von Transportern und somit zur Verringerung des Austretens von intrazellulären Farbstoffindikatoren ist ein übliches Verfahren zur Verringerung des Fluoreszenzhintergrunds in Calciumuntersuchungen. Nach 1h Inkubation mit Fura-2-AM bei 37°C (25 µM, 2 mM Probenecid, in HEPES mit 2 g/l Glucose) wurde das restliche extrazelluläre Fura-2 durch gründliches Waschen entfernt (2x2 min und 2x5 min bei 37°C). Die Messungen wurden in 100 µl Volumen je Well in einem Plattenlesegerät (Spektrofluorimeter, Infinite M200) bei 37°C durchgeführt. Nach einer Baseline-Beurteilung wurde frischer Puffer, der Hämolyisin oder kein Hämolyisin und 100 µM Zinkacetat enthielt, als Ersatz für die vorherige gebrauchte Pufferlösung zugegeben. HDM-infizierte Monolayer dienten als Kontrollen. Fura-2 hat sich ebenso als geeignet erwiesen, kleine Zunahmen an intrazellulärem Zink zu messen (Cheng et al., 1998), aufgrund seiner hohen Affinität für divalente Kationen. Da Fura-2 auch  $\text{Zn}^{2+}$  bindet und ein  $\text{Zn}^{2+}$ -maskierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg ausgeschlossen werden sollte, führten wir  $\text{Zn}^{2+}$ -Messungen mit dem  $\text{Zn}^{2+}$ -spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-Zin3 (Invitrogen) durch.

---

## 2.8 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Graphpad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA., USA). Alle Experimente wurden n-fach durchgeführt und die ermittelten Werte als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte innerhalb normalverteilter Daten mittels zweiseitigem Student's T-Test (ANOVA) oder dem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test für nicht-parametrische Daten. Die statistische Auswertung mit dem Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur erfolgte bei nominalskalierten Werten. Eine ermittelte Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 5% ( $P < 0,05$ ) wurde als statistisch signifikant bewertet.

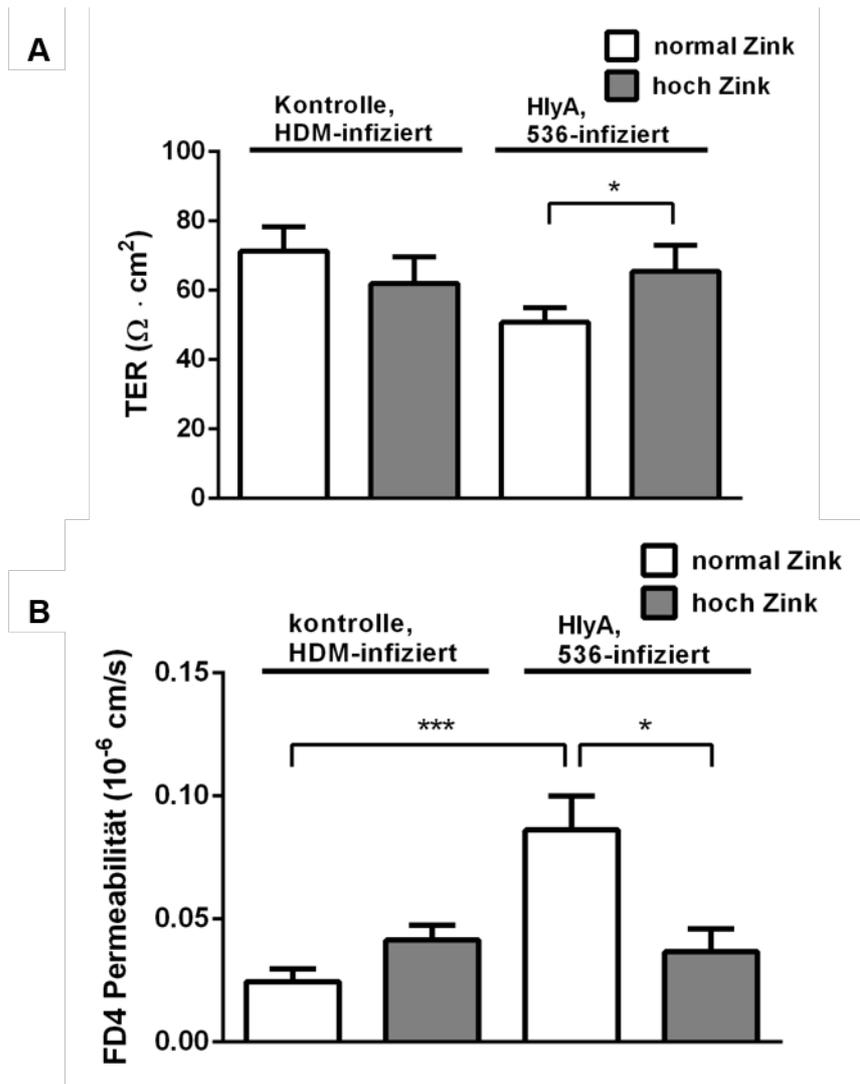
---

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 **Die protektive Wirkung von Zink auf HlyA<sup>+</sup>-*E. coli*-536-induzierte Barrieredefekte im Mausmodell.**

##### 3.1.1 Epitheliale Barriere, mukosale Integrität und Markerfluxe

Die orale Infektion mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* und dem isogenen Hämolysin-defizienten Mutanten (HDM)-Stamm mittels Schlundsonde erzielte eine erfolgreiche Kolonisation des Gastrointestinaltrakts der keimfreien Mäuse in beiden Versuchsgruppen (Zinkdosis: 500 mg/kg = hoch-Zinkfutter oder 15 mg/kg = normal-Zinkfutter). 48 h nach Infektion betrug die Anzahl der entsprechenden Bakterien zwischen 10<sup>8</sup> und 10<sup>9</sup> KBE pro g Fäzes. Die Barrierefunktion des Mauskolon-Epithels wurde mit Hilfe von Ussing-Kammer-Experimenten untersucht. Dadurch ist es möglich, die Integrität des Gewebes durch den transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) und zeitgleich Permeabilitätsmessungen mit Marker-Fluxen verschiedener Molekülgrößen festzustellen. Innerhalb der Kontrollgruppe von Mäusen, welche physiologische Zinkkonzentrationen (normal-dosiertes Zinkfutter) erhielten, wurde ein Abfall des Gesamt-TER (transmuraler Widerstand, an anderer Stelle in der Literatur auch mit R<sup>t</sup> abgekürzt) festgestellt, wenn die Tiere mit dem HlyA-tragendem *E. coli*-536 Stamm kolonisiert wurden im Vergleich zu Mäusen, die mit dem HDM-Stamm kolonisiert wurden. Unter einer therapeutischen Zinkdiät zeigten Mäuse, die mit HlyA-produzierendem *E. coli* infiziert waren, jedoch keinen Abfall des TER gegenüber mit HDM-Stamm infizierten Mäusen, was auf eine Verminderung der Epitheldefekte im Vergleich zur Normal-Zink-HlyA-Gruppe hindeutet (Abbildung 6 A). Darüber hinaus wurden makromolekulare Permeabilitätsmessungen mit 4 kDa FITC-Dextran (FD4) als Indikator für Barrieredefekte wie große Epithelläsionen durchgeführt. In der als normal definierten Zinkgruppe waren die FD4-Fluxe von *E. coli*-HlyA<sup>+</sup>-Mäusen im Vergleich zu den HDM-Kontrollen erhöht. Bei Mäusen, die therapeutisch hohe Zinkdosis erhielten, konnte keine erhöhte FD4-Permeabilität festgestellt werden, wenn sie mit HlyA-produzierenden *E. coli* infiziert wurden, verglichen mit HDM-infizierten Mäusen (Abbildung 6B, n = 5, jeweils P<0,05).



**Abbildung 6: Effekt von Zink auf HlyA<sup>+</sup>-induzierte Barriere-defekte im Mauscolon.**

**(A) Zink-Supplementierung schützt vor HlyA<sup>+</sup>-induzierten Barriere-defekten im Mauscolon.** Der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) wurde gemessen, um die Barrierefunktion des Kolons der Tiere unter den verschiedenen Bedingungen darzustellen. Die therapeutische Gruppe (500 mg Zink/kg Futter-behandelt) zeigte reduzierte Epitheldefekte nach Infektion mit HlyA<sup>+</sup>-positiven *E. coli*, was durch einen fehlenden TER-Abfall erkennbar war, verglichen mit der entsprechenden HDM-infizierten Maus-Gruppe. \*P<0,05, n = 6, ANOVA. Auch war der TER nach Infektion mit HlyA<sup>+</sup>-positiven *E. coli* in Mäusen mit therapeutischer Zinkfütterung kleiner als bei Fütterung mit physiologischem Zinkgehalt. **(B) Zink-Supplementierung verhindert eine Erhöhung der epithelialen Permeabilität gegenüber FD4 bei HlyA<sup>+</sup> kolonisierten Mäusen.** Mukosal-nach-serosale Permeabilität für das Makromolekül 4 kDa FITC-Dextran (FD4) im Mausekolonepithel nach Infektion mit HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-536 und gleichzeitiger Anwendung von normalem Zink oder hoher Zinkdiät. *E. coli*-HDM diente als Kontrollstamm. \*P<0,05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; n = 6, ANOVA.

---

### 3.1.2 Bestimmung der luminalen Zn<sup>2+</sup> Konzentration

Die Menge an proteingebundenem und ungebundenem Zink im Lumen des Dickdarms der Tiere wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie gemessen und in mg pro kg Darmgehalt (Gesamtfeststoffe) umgerechnet. Die Bestimmung des Zinkgehaltes wurde in Kooperation mit Dr. Robert Pieper (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) durchgeführt. Mäuse, die eine Diät mit 15 mg Zink/kg Futter erhielten, zeigten einen geringeren Anteil an freiem Zn<sup>2+</sup> im Lumen sowie eine geringere mit Proteinen-assoziierte Zn<sup>2+</sup>-Menge (n = 4), als Mäuse, die eine hohe Zink-Diät mit 500 mg Zink/kg Mausfutter erhielten (n = 6). Somit enthielten Darminhalte von Mäusen, die mit hohen Zink-Diäten gefüttert wurden, ein viel höheres Reservoir an ungebundenem Zn<sup>2+</sup> (P<0,0001), das als ein potentieller Inhibitor des bakteriellen porenbildenden Toxins HlyA<sup>+</sup> zur Verfügung stand (Tabelle 4). Mit der ausgewählten Konzentration im Tierversuch wurde eine adäquate und ähnlich hohe Zinkdosis von ca. 500 µM am Darmepithel erzielt wie in den *in vitro* Versuchen (siehe unten, Punkt 3.2).

**Tabelle 4: Bestimmung der luminalen Zink-Konzentration im Chymus.**

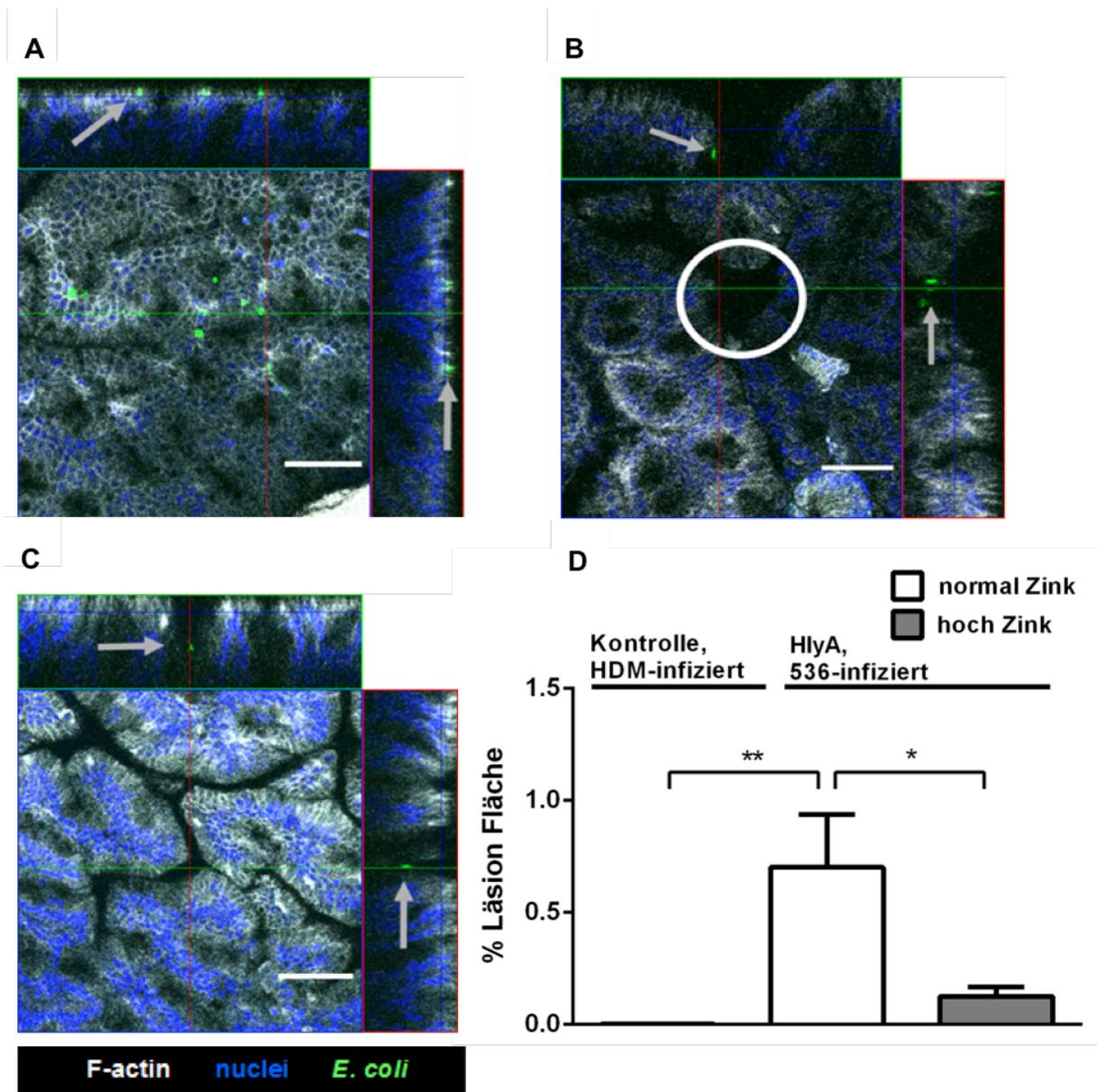
Der Darminhalt von Mäusen, welche im Versuch eine therapeutisch hohe Zink-Supplementierung erhielten, verfügte über eine 200-fache Menge an freien Zn<sup>2+</sup> gegenüber der Normal-Zink-Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert in mg/kg und der SEM.

	<b>Tiere mit Zinkdiät von 15mg ZnCO<sub>3</sub>/kg (HlyA<sup>+</sup>, HDM)</b>	<b>Tiere mit Zinkdiät von 500mg ZnCO<sub>3</sub>/kg (HlyA<sup>+</sup>Zn, HDMZn)</b>
<b>Zinkgehalt Caecum</b> mg/kg Darminhalt		
<b>ungebunden, Zn<sup>2+</sup></b>	<b>1,5 ± 0,3 (= 22 µM)</b>	<b>29 ± 2 (= 460 µM)</b>
<b>Protein-assoziiertes Zink</b>	<b>30 ± 4</b>	<b>831 ± 11</b>

---

### 3.1.3 Zink verringert fokale Läsionen im $\alpha$ -Hämolyisin *E. coli*-infizierten Mauskolon

In diesem Teil der Studie wurde mikroskopisch unter Verwendung von Immunfluoreszenz-(IF)–Whole mount-Färbungen intaktes ungeschnittenes Mauskolon analysiert, um fokale Läsionen und bakterielle Signale zu identifizieren. Die IF-färbungsbasierte Charakterisierung von Läsionen und/oder Erosionen in der Kolonmukosa von HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-kolonisierten Mäusen erfolgte durch eine Befundung der Läsionen-Form (trichterförmige Tunnel), der Co-Lokalisation von *E. coli* innerhalb der Läsion und der Abwesenheit normaler epithelialer Oberflächenintegrität (z.B. Fehlen des Tight Junction-Signals oder Cytoskeletts und/oder fehlende Zellkerne etc.). Fokale Läsionen konnten in HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-kolonisierten und normal-Zink-gefütterten Mäusen nachgewiesen werden, fehlten jedoch in der HDM-kolonisierten Mukosa. HlyA<sup>+</sup>-Mäuse, die eine hohe Zink-Supplementierung erhielten, zeigten deutlich kleinere fokale Läsionen sowie eine verringerte Gesamtanzahl an epithelialen Defekten im Vergleich zu den Mäusen, welche Normal-Zink-Futter erhielten. Für die mikroskopische Quantifizierung wurden fokale Läsionen gezählt, digital umzeichnet und vermessen. Die Quantifizierung der Läsionsgröße bei Mäusen, die mit HlyA<sup>+</sup> *E. coli* infiziert waren, zeigte eine Verringerung in der kumulativen Größe der Läsionen nach hoher Zinkzufuhr im Vergleich zu Läsionen im Kolon von Mäusen, welche mit einer Normal-Zink-Diät versorgt wurden. HDM-kolonisierte Mäuse wiesen überhaupt keine Läsionen auf (Abbildung 7 A). Innerhalb der HlyA<sup>+</sup>-Mäuse, welche Normal-Zink-Futter erhielten, wurden je Leistungsfeld ein bis drei große Läsionen mit einem Größenbereich zwischen 1.600 und 15.000  $\mu\text{m}^2$  und einer mittleren Läsionsfläche von 7.000  $\mu\text{m}^2$  detektiert. Dies entspricht etwa 0,8% des jeweiligen Gewebebereichs. Mäuse, die mit hohem Zinkgehalt supplementiert und mit HlyA<sup>+</sup> *E. coli* kolonisiert wurden, zeigten eine starke Verringerung der fokalen Läsionsfläche auf 0,1% (Abbildung 7 D).



**Abbildung 7: Zink reduziert Anzahl und Größe von HlyA<sup>+</sup>-induzierten fokalen Läsionen im Mauskolon.**

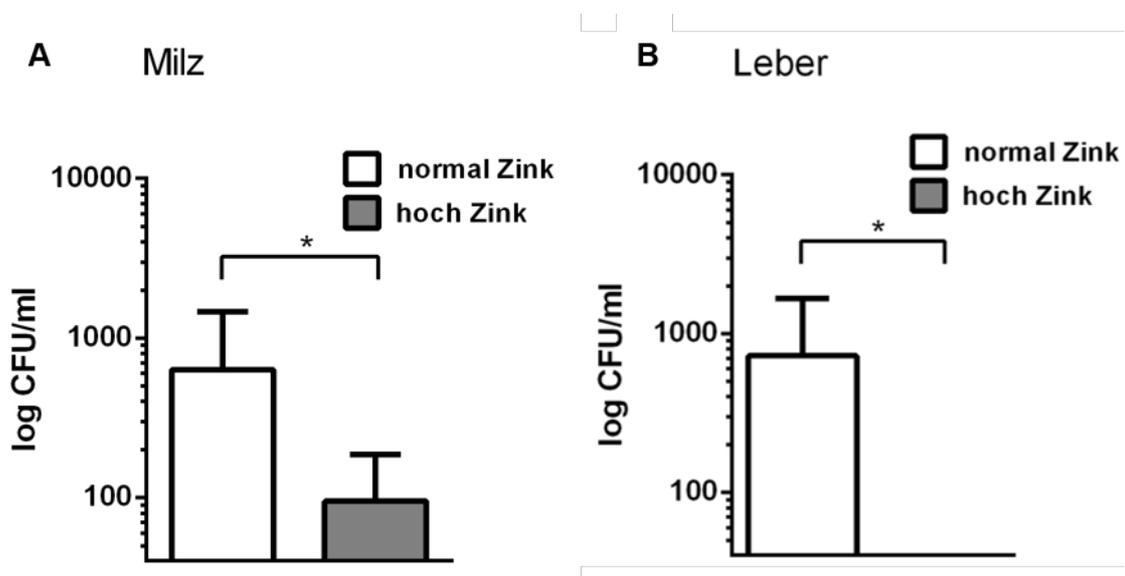
Whole mount-Immunfluoreszenzfärbung von (A) normaler Dickdarmschleimhaut mit apikal adhäsiven HDM-Bakterien (grün) ohne Zellschädigung als Kontrollbedingung. Färbung von (B) Dickdarmschleimhaut von Mäusen, welche eine physiologische Zink Dosis erhielten (Normal-Zink-Gruppe) nach *E. coli*-536-Kolonisation mit einer repräsentativen fokalen Läsion (weißer Kreis) und Bakterien innerhalb der Läsion (Pfeile weisen auf Bakterien). Eine fokale Läsion wurde durch die Form (trichterförmig), die Co-Lokalisation von *E. coli*-Signalen (grün) innerhalb der Läsion und das Fehlen einer normalen epithelialen Integrität identifiziert (cytoskeletales F-Aktin = weiß, Zellkerne = blau). (C) In der Mausgruppe, welche eine therapeutische Zinkdosis erhielt (Hoch-Zinkgruppe), konnten einzelne eingedrungene Bakterien identifiziert werden, aber die Läsionen fehlten oder waren reduziert (wenig kleine Läsionen). Weiße Balken = 50 µm. Die Läsionen wurden digital markiert und mit der Zeiss LSM Image Examiner Software zur Läsionsflächengrößenberechnung gemessen (Bücker et al., 2014).

---

(D) Quantifizierung der Läsionsfläche in % des gesamten untersuchten Mauskolonprobe. Der Beobachtungsbereich von etwa 0,2 cm<sup>2</sup> wurde mikroskopisch auf fokale Läsionen untersucht. Identifizierte Läsionen wurden digital in einer tiefen Fokusebene markiert, und die Gesamtanteilsfläche der einzelnen Läsionen wurde durch die gesamte beobachtete Probenoberfläche geteilt. Bei *E. coli*-HDM-behandelten Mäusen waren fokale Läsionen nicht evident, während im Kolon von Mäusen, die mit dem HlyA<sup>+</sup> *E. coli* kolonisiert wurden, Läsionen zu finden waren. In der Hoch-Zinkgruppe waren die fokalen Läsionsflächen im Vergleich zur Normal-Zink-Gruppe reduziert. n = 5, \*P<0,05, \*\*P<0,01, Student's t-Test.

### 3.1.4 Zink hemmt die Translokation von intestinalen *E. coli*

In einer früheren Studie wurde die Akkumulation von *E. coli* der B2-Phylogruppe innerhalb von fokalen Läsionen beobachtet (Troeger et al., 2007). Innerhalb dieser Läsionen mit einem Durchmesser von 5 bis 50  $\mu\text{m}$  konnte bereits eine Translokation von Bakterien nachgewiesen werden (Troeger et al., 2007). In unserem aktuellen Mausmodell wurden Leber und Milz für die bakterielle Translokation homogenisiert, verdünnt und auf Blut-Agar-Platten ausplattiert. Nach 24 h konnten die KBE beurteilt und ausgezählt werden. Eine verminderte bakterielle Translokation in Leber und Milz wurde bei HlyA<sup>+</sup>-kolonisierten Mäusen mit einem hohen Zink-Gehalt im Futter festgestellt, im Vergleich zur Mausgruppe, welche ebenfalls HlyA<sup>+</sup>-kolonisiert war, aber eine Diät mit niedrigerem Zinkgehalt bekamen (Abbildung 8).



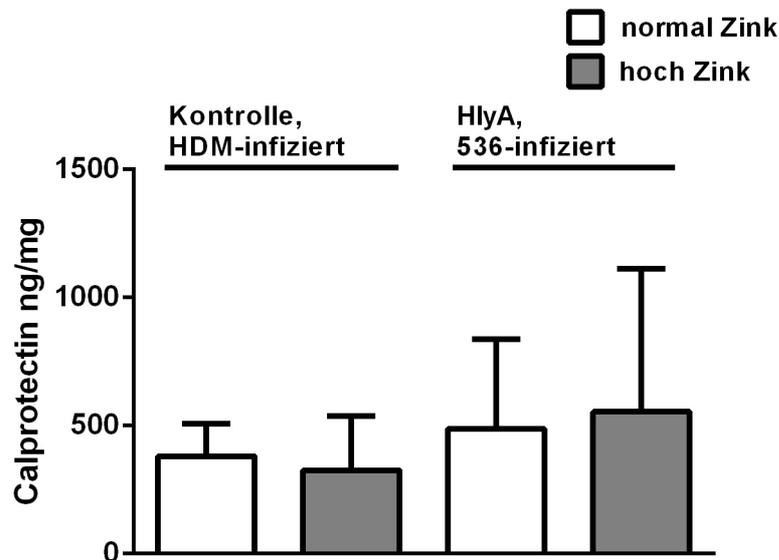
**Abbildung 8: Zink schützt vor Translokation von *E. coli* in andere Organe.**

Bakterielle Translokation in Mäusen wurde durch die Oberflächen-Ausplattierungsmethode und KBE Zählung quantifiziert. Eine erhöhte bakterielle Invasion und Translokation zu (A) Milz und (B) Leber wurde bei *E. coli*-infizierten Mäusen beobachtet, die mit einer normalen Zink Diät gefüttert wurden. Mäuse unter einer normalen Zink-Supplementierung (weißer Balken) wurden mit den therapeutisch hohen Zink Dosen verglichen. Um eine fehlerhafte KBE Auszählung als Folge der Verdünnung zu vermeiden, wurde eine Schwelle auf 20 KBE als untere Nachweisgrenze gesetzt. Jede Gruppe n = 5, \*P<0,05, Chi-Quadrat-Test.

---

### 3.1.5 Detektion von Calprotectin

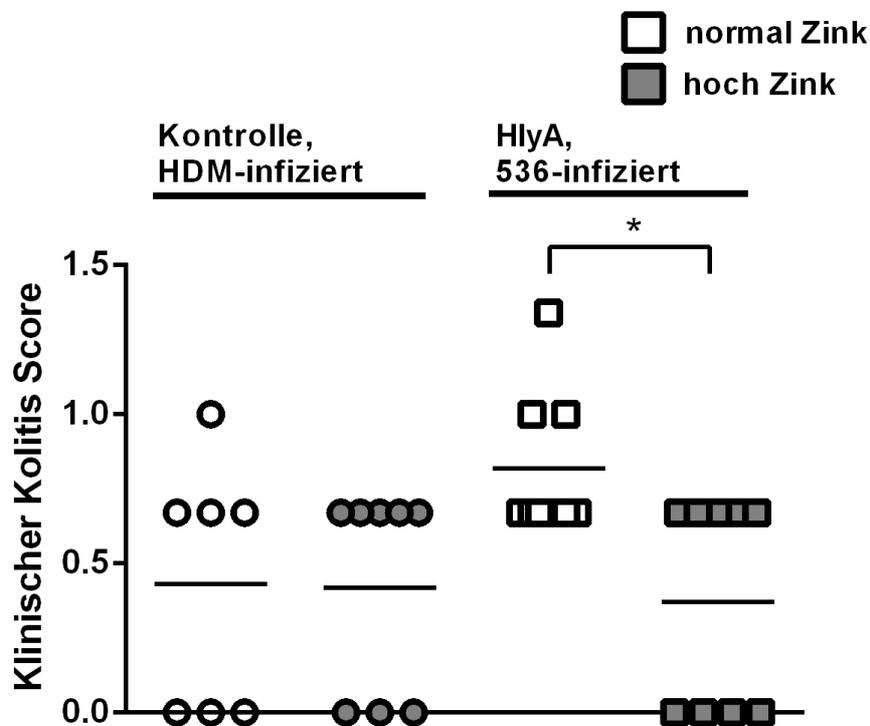
Das angeborene Immunsystem umfasst Zellen und Abwehrmechanismen, die den Wirt vor einer Infektion durch andere Organismen schützen. Während einer Entzündung wird zur Verteidigung gegen Mikroorganismen Calprotectin abgegeben. Calprotectin ist ein häufiges Protein aus Leukozyten mit der Funktion, Zink und Mangan als antimikrobielle Wirkstoffe freizusetzen (Liu et al., 2012). Unter Verwendung des Calprotectin-Assays war eine anfängliche Entzündungsreaktion bei HlyA<sup>+</sup>-Mäusen am Tag 2 bis Tag 4 post infectionem (p.i.) messbar, erreichte jedoch keine Signifikanz gegenüber der HDM-Kontrolle, da HDM-infizierte Mäuse ebenfalls angeborene Immunantworten aufgrund der erstmaligen bakteriellen Kolonisation zeigten. Bei unkolonisierten keimfreien Mäusen wurde ein Calprotectin Spiegel von 190 ng je mg Stuhl detektiert, was eine Tendenz zu erhöhten Werten bei kolonisierten Tieren impliziert (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Calprotectin in den Fäzes der Tiere.** Der Calprotectin-Assay zeigt eine Entzündungsreaktion bei HlyA<sup>+</sup>-Mäusen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gegenüber der HDM-Kontrolle gefunden.

### 3.1.6 Zink mildert die Kolitis-Aktivität in HlyA<sup>+</sup> *E. coli* kolonisierten Mäusen

Bei allen erfolgreich kolonisierten Mäusen wurde der klinische Kolitis Score ermittelt. Hierbei wurden Körpergewichtsveränderungen, Kotkonsistenz und das Vorkommen von okkultem Blut im Kot ermittelt. Das verwendete keimfreie Mausmodell zeigte hierbei sehr homogene Effekte innerhalb der Symptomatik, sowohl unter der Infektion mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* als auch mit HDM-*E. coli*. Zugleich sollte damit eine frühe Phase einer intestinalen Entzündung experimentell erzeugt werden, weshalb die klinischen Symptome in der Hoch- und Normal-Zink-Gruppe schwach ausgeprägt waren. HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* kolonisierte Mäuse, die eine therapeutisch hohe Zink-Supplementierung erhielten, zeigten dennoch einen signifikanten Unterschied zu Mäusen, die eine Normal-Zink-Diät bekamen und mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* kolonisiert worden waren (Abbildung 10).

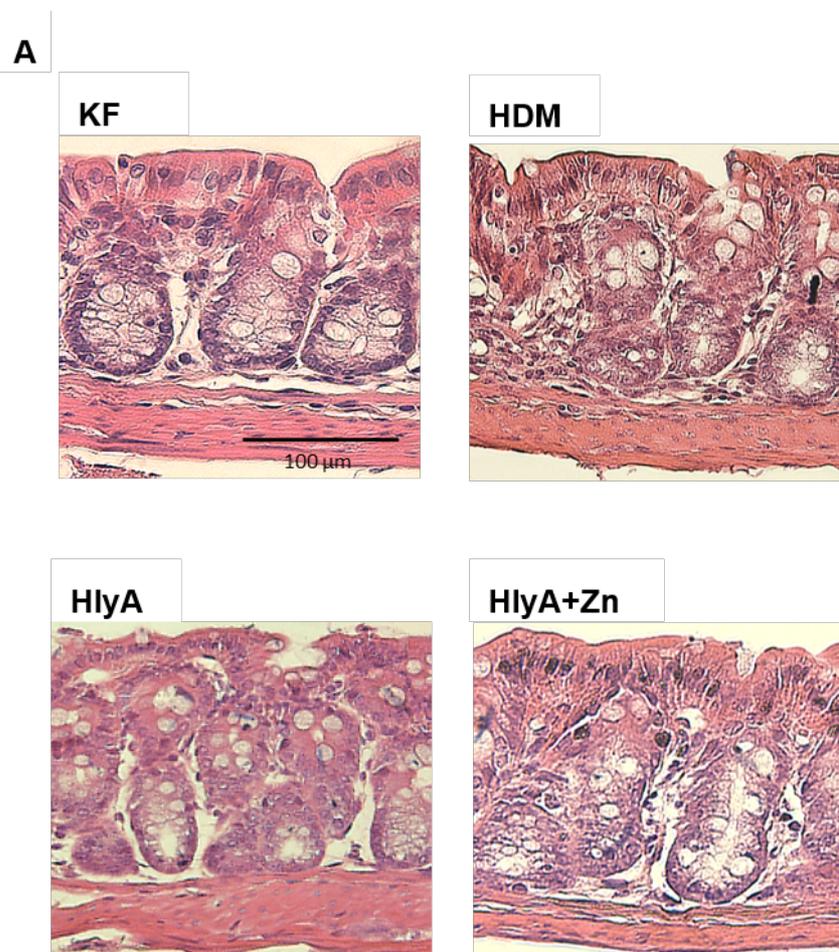


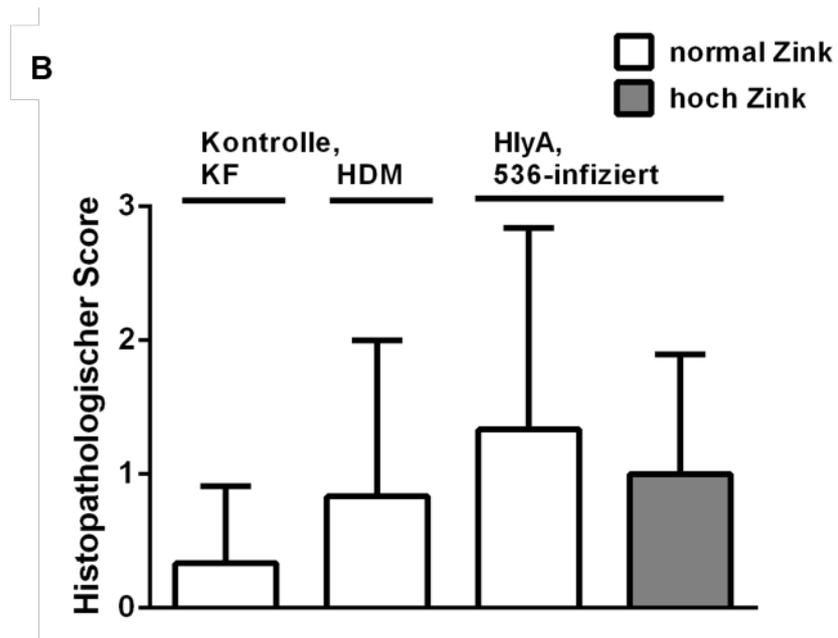
**Abbildung 10: Klinischer Kolitis Score.** Zink bewirkt eine Abschwächung der initialen intestinalen Entzündung im Mausmodell. Erfasst wurden Mäusen nach Kolonisation mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli*, verglichen mit dem HlyA-defizienten Kontrollstamm (HDM). Grau hinterlegte Formen repräsentieren Mäuse mit einer hohen Zink Diät, weiße Formen die Mäuse der Normal-Zink-Gruppe. Die dargestellten Punkte entsprechen Einzelwerten, die Striche repräsentieren die Mittelwerte von 0 (gesund) bis 4 (maximale Kolitis-Aktivität). n = 5 bis 9, \*P<0,05, Student's T-Test.

---

### 3.1.7 Histopathologie

Die Ergebnisse im klinischen Kolitis Score ließen sich auch histopathologisch nachzeichnen. Auch hier sind die Effekte auf Grund des initialen Zeitpunktes der Entzündung nur mild ausgeprägt. In allen infizierten Mausgruppen unabhängig ob HlyA<sup>+</sup> oder HDM bzw. Normal-Zink- oder Hoch-Zink-Diät, zeigten die Mäuse minimale histopathologische Auffälligkeiten. Die Mukosa der Mäuse zeigte milde Anzeichen von Entzündung in Form von leichter epithelialer Atrophie, Irregularität von Krypten, vereinzelt vergrößerte Lymphfollikel und einer leicht erhöhten lymphozytären Infiltration in die Mukosa, was jedoch in der statistischen Auswertung des histopathologischen Scores in keiner der Gruppe signifikante Unterschiede erbrachte (Abbildung 11), auch wenn mit einem Histo-Score von 1,2 bei HlyA<sup>+</sup>-*E. coli*-kolonisierten Mäusen (unter eine Normal-Zink-Diät) gegenüber 0,8 bei den beiden anderen Gruppen eine Tendenz zur Zunahme bestand.





**Abbildung 11: Histopathologischer Score der mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* kolonisierten Mauskolon-Mukosa mit und ohne Zink.**

Dargestellt sind (A) repräsentative Darstellungen aus H&E-gefärbten Schnitten des mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* kolonisierten Mauskolons, aus denen die (B) histopathologischen Ergebnisse ermittelt wurden. Der grau markierte Balken repräsentiert Mäuse mit einer hohen Zink Diät, weiße Balken repräsentieren die Mäuse der Normal-Zink-Supplementierung mit HlyA-*E. coli*-Infektion oder HDM-infizierte und keimfreie-unkolonisierte (KF) Mauskolon Abschnitte zum Vergleich. Charakterisiert mit einem additiven histopathologischen Entzündungsscore bei Kolitis von 0 bis 12 Punkten nach Katakura et al. sind alle kolonisierten Mauskolon-Mukosa gering entzündet im Vergleich zur unkolonisierten KF Kontrollgruppe, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Zinkdosisgruppen. n = 5, nicht signifikant, Student's T-Test.

---

## 3.2 Analyse des protektiven Zinkeffektes an Zellkulturmodellen *in vitro*

### 3.2.1 Zink schützt gegen HlyA<sup>+</sup>-induzierte Barrierschäden in einem humanen Epithelzellmodell.

In Abwesenheit von Zink zeigten HT-29/B6-Monolayer *in vitro* eine Abnahme des epithelialen elektrischen Widerstandes (TER), wenn sie mit dem HlyA-produzierenden *E. coli*-536 infiziert wurden im Vergleich zu Zellen, die mit dem HDM-Kontrollstamm infiziert waren. Bei HT-29/B6-Monolayern, die gleichzeitig mit HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* infiziert und mit einer Zinkdosis von 500 µM Zinkacetat inkubiert wurden, zeigte sich eine Inhibition des Effekts auf den TER (Abbildung 12 A). In parallelen Experimenten an demselben HT-29/B6-Zellmodell wurde ein identisches Protokoll mit einem aufkonzentrierten Überstand von HlyA<sup>+</sup>, anstelle der HlyA<sup>+</sup> *E. coli* 536 Bakterien, durchgeführt. Dafür wurde eine 4 h Schüttelkultur des HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* 536 oder des HDM-Stammes in RPMI (10<sup>5</sup> KBE/100 µl) zunächst in der Beckmann Zentrifuge JA-12 für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und das Bakterienpellett verworfen. Anschließend wurde der Überstand im Amicon 50K Ultrafilter 60 min bei 5000 g aufkonzentriert. Der Einsatz von 50 µl des erhaltenen Ultrafiltrat führte zu identischen Effekten auf den TER wie der Einsatz der Bakterien (Abbildung 12 B). Darüber hinaus konnte die Zugabe des divalenten Kations Barium (500 µM Bariumchlorid) den TER-Abfall in HlyA<sup>+</sup>-*E. coli*-infizierten HT-29/B6-Zellen ebenfalls aufhalten (Abbildung 12 C).

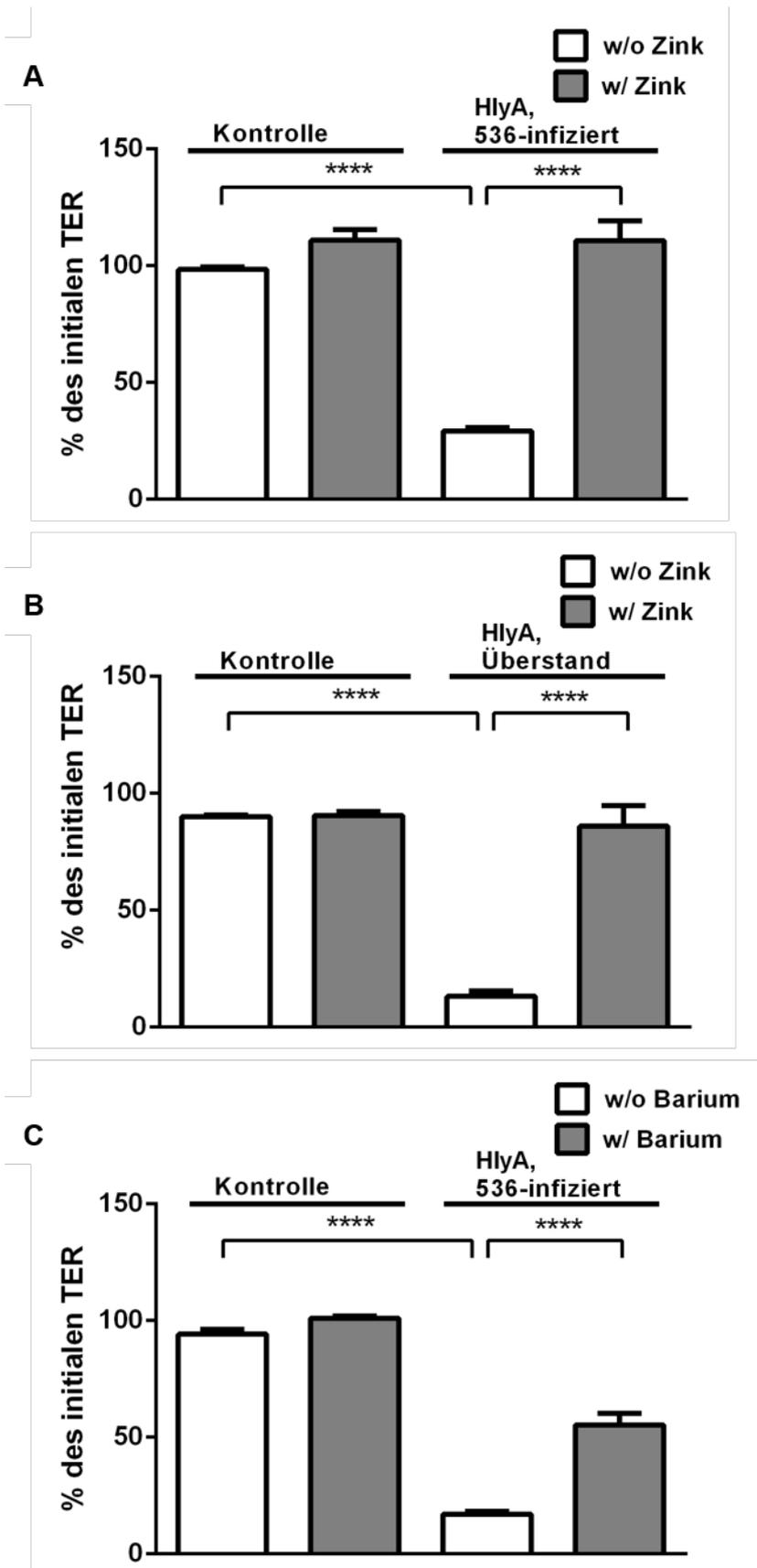


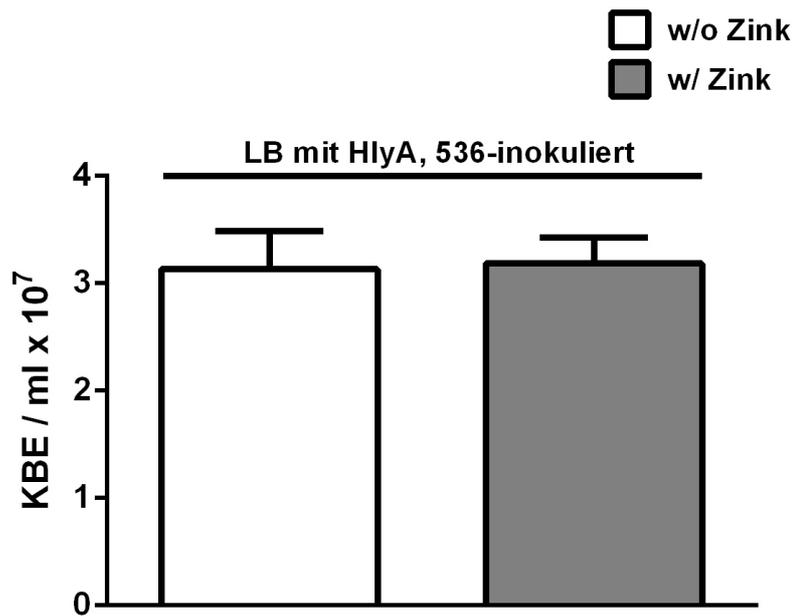
Abbildung 12: Schützende Wirkung von Zink und Barium auf HlyA<sup>+</sup>-infizierte humane Kolonzellen.

---

HT-29/B6-Monolayer wurden 4 h mit (A, C)  $10^6$  KBE HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-536 Bakterien pro Filter und (B) 50  $\mu$ l konzentriertem HlyA-produzierenden *E. coli*-536-Überstand mit oder ohne Zink inkubiert im Vergleich zu unbehandelten HT-29/B6 mit (w/) oder ohne (w/o) Zugabe von Zink (A, B) oder Barium (C). Jede Gruppe n = 6, \*\*\*\* P < 0,0005, Student's t-Test.

### 3.2.2 Zink hat keinen Effekt auf die bakterielle Proliferation

Der protektive Effekt von Zink auf die HlyA-geschädigte Barriere im Zellkulturmodell könnte durch eine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung von Zink verursacht sein. Um das zu überprüfen wurde ein *E. coli* Wachstums- und Proliferationsanalyse durchgeführt. Ein Zn<sup>2+</sup>-bedingter bakteriostatischer oder bakterizider Effekt in der Bakterienkultur konnte ausgeschlossen werden. Die initiale HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-536 Konzentration von  $8 \times 10^5$  per ml LB Medium wuchs im zinksupplementierten Medium ebenso stark heran wie im LB Medium ohne Zink-Zusatz ( $3,2 \times 10^7$  per ml LB Medium innerhalb von 6 h, n=3, P>0.05). Die Proliferationsuntersuchungen zeigten demnach keine Zink-Effekte auf das Bakterienwachstum von *E. coli*-536 (Abbildung 13).



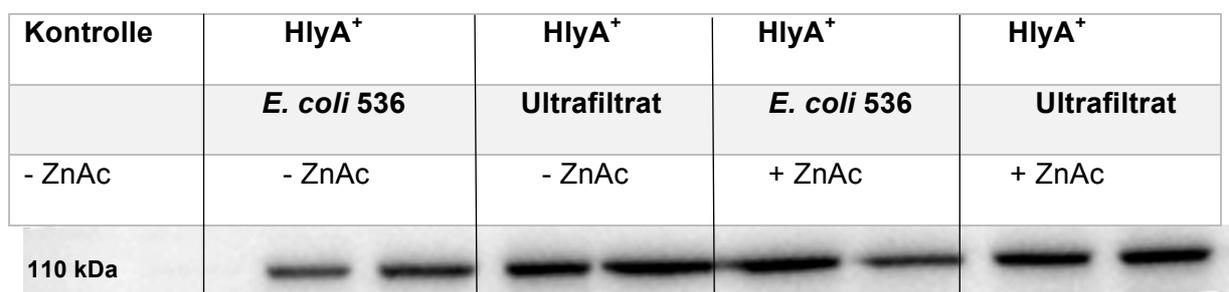
**Abbildung 13: Zink beeinflusst nicht die Proliferation von *E. coli* 536.**

Die Proliferation des Bakteriums HlyA *E. coli* 536 in zinksupplementiertem LB (500 $\mu$ M) und in zinkfreiem LB Medium wurde mittels KBE Zählung nach 24 h analysiert. n=3, P>0.05.

---

### 3.2.3 Zink zeigt keinen Einfluss auf den Proteingehalt von HlyA in HT-29/B6 Zellen

Um zu überprüfen, ob die protektive Wirkung von Zink durch einen inhibitorischen Einfluss auf die Sekretion des RTX-Toxins HlyA<sup>+</sup> bedingt sein könnte oder auf einer zinkvermittelten Modulation der Toxin-Assemblierung und Membraninsertion beruhen könnte, was zu einem verminderten HlyA<sup>+</sup> Gehalt der infizierten Zelle führen würde, wurde mittels Western Blot der HlyA<sup>+</sup> Gehalt der infizierten Zellen quantitativ ermittelt. Dafür wurden infizierte HT-29/B6 Zellen lysiert und HlyA<sup>+</sup> immunologisch detektiert (Western Blot). Auch mit Monolayern, welche mit einem HlyA<sup>+</sup> Überstand (Konzentrat) behandelt wurden, wurde so verfahren. Dabei wurde die Infektion der Kolon Zell-Monolayer mit dem Bakterium als auch mit dem Überstand jeweils mit und ohne 500 µM ZnAc durchgeführt. Die HT-29/B6 Zellen wurden 3 h nach Inkubation mit dem Bakterium/Überstand lysiert. Die HlyA<sup>+</sup>-Expression im Western Blot ist bei allen Konditionen vorhanden und wird durch die Applikation von Zink nicht beeinflusst. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurden die bakteriellen HlyA Signale der infizierten Epithelzellen mit β-Aktin Signalen der Zellen dargestellt (Abbildung 14). Des weiteren bestätigt die Protein-Detektion auch das Vorhandensein von HlyA im präparierten aufkonzentrierten Überstand (n=3).



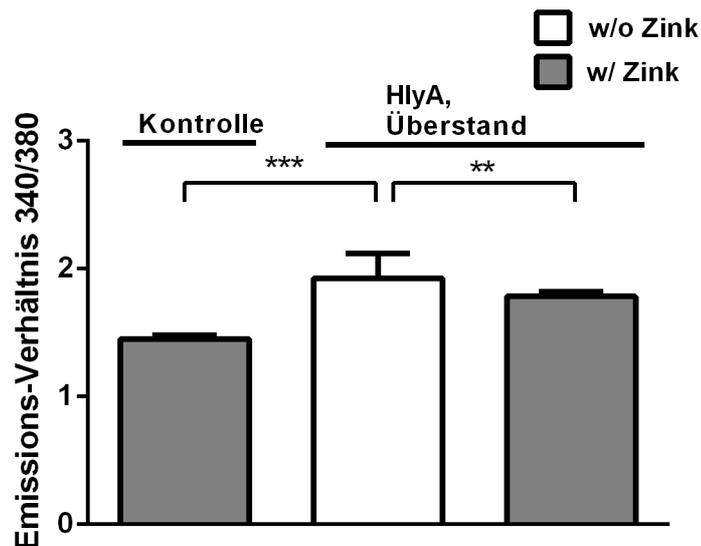
**Abbildung 14: HlyA<sup>+</sup> Proteinexpression und -sekretion wird in zinkhaltigem Medium nicht beeinflusst.**

Lysate von HT-29/B6 Zellmonolayern wurden nach *E. coli* HlyA<sup>+</sup> Infektion oder Behandlung mit einem HlyA<sup>+</sup> Überstand mittels Western Blot-Analyse beurteilt und die Blot-Signale gegenüber β-Aktin kontrolliert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus Western Blot-Analysen von drei verschiedenen Zellpassagen.

---

### 3.2.4 Zink hemmt die HlyA-induzierte Erhöhung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> und den anschließenden Barrieredefekt.

Da bekannt ist, dass viele PFTs die Plasmamembran für Calcium permeabilisieren und Calcium als ein wichtiger second messenger die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden auslösen kann, welche eventuell einen Pathomechanismus der HlyA<sup>+</sup> induzierten fokalen Läsions-Entstehung beschreiben, wurde der Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) bestimmt. Die Calciumsignal-Analyse wurde nach HlyA<sup>+</sup>-Exposition (bakterieller Überstand) in Gegenwart und Abwesenheit von 100 µM Zinkacetat unter Verwendung des fluoreszierenden intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelators Fura-2 durchgeführt. In Abwesenheit von Zink führte die Behandlung mit HlyA<sup>+</sup> zu einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Dieser Effekt von HlyA<sup>+</sup> konnte in Gegenwart von Zink nicht mehr beobachtet werden. Das Fura-2-Signal war hierbei nicht signifikant erhöht gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 15). Parallele Messungen mit dem Zn<sup>2+</sup> spezifischen Fluo-Zin3 verdeutlichten, dass keine Interferenzen zwischen der Ca<sup>2+</sup>-Detektion und der Zn<sup>2+</sup>-Detektion bestehen.

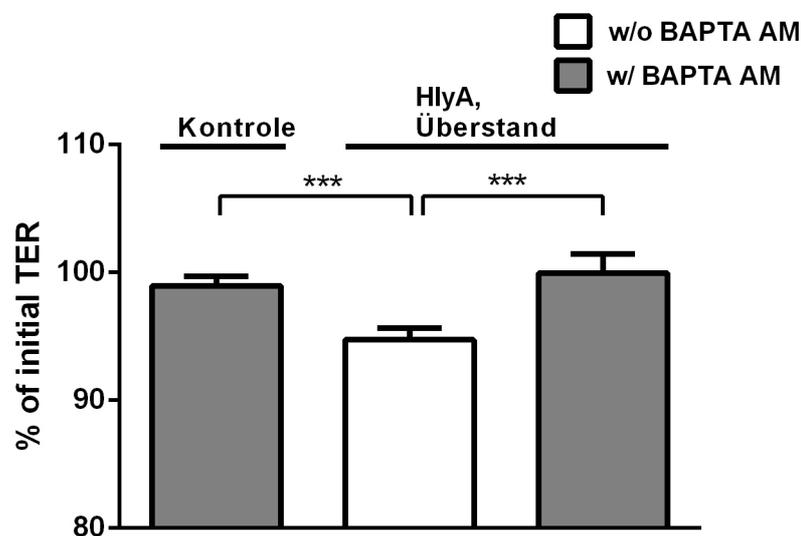


**Abbildung 15: Zink mildert die HlyA<sup>+</sup>-induzierte Zunahme von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>.**

Aufkonzentrierter Überstand von HlyA<sup>+</sup>-produzierendem *E. coli*-536 wurde apikal auf epitheliale T84-Zellmonolayer gegeben und für 2 h inkubiert. Intrazelluläre Calciums Signale wurden bestimmt und mit denen von Monolayern verglichen, die gleichzeitig mit Überständen von HlyA<sup>+</sup> inkubiert waren und eine Zn<sup>2+</sup>-Supplementierung (100 µM) erhielten. Als Kontrolle diente die Inkubation mit Überständen des HDM-Stammes. Der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels wurde nach Zugabe von Fura-2-AM ratiometrisch gemessen. n = 8, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Student's t-Test.

### 3.2.5 Der HlyA<sup>+</sup>-vermittelte Barrieredefekt wird durch Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induziert.

Um zu zeigen, dass das *Inkrement* im [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> als Signal für die pathogenen Konsequenzen in Richtung einer defekten Epithelbarriere verantwortlich ist, untersuchten wir den Effekt der Hemmung dieser HlyA<sup>+</sup>-induzierten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Zunahme auf den TER in unserem HT-29/B6-Monolayer-Zellmodell mit dem zellpermeablen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM (Abbildung 15). BAPTA-AM wurde verwendet, um das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Niveau zu kontrollieren. Die initiale Abnahme des TER nach HlyA-Exposition konnte durch BAPTA-AM-Behandlung vollständig blockiert werden. Somit konnte die zinkvermittelte Hemmung der Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> den nachfolgenden Barrieredefekt verhindern.



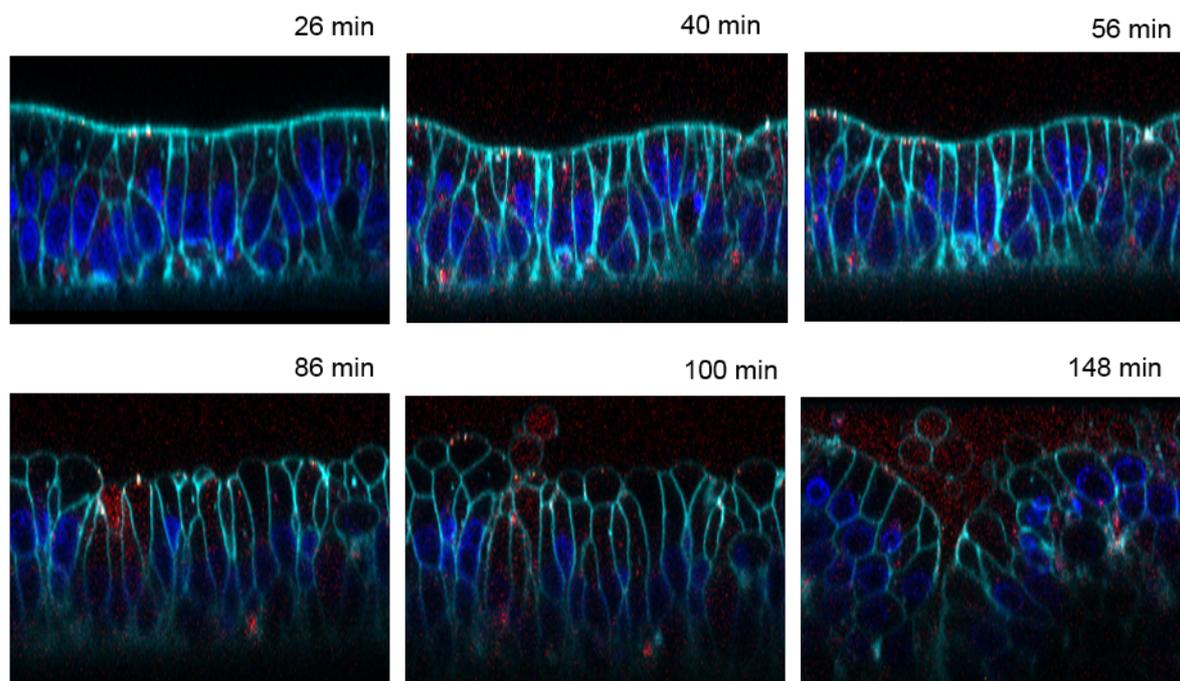
**Abbildung 16: Verhinderung des Barriere-Effekts in HlyA<sup>+</sup>-behandelten Zellen unter dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM.**

HT-29/B6-Monolayer wurden mit 20 µl konzentriertem HlyA-produzierenden *E. coli*-536-Überstand mit (w/) oder ohne (w/o) BAPTA-AM (10 µM) inkubiert im Vergleich zu nicht-infizierten BAPTA-AM-Monolayern. n = 3, \*\*\*P<0,001, Student's t-Test

---

### 3.2.6 Die HlyA-induzierte intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ Erhöhung verursacht epitheliale Exfoliation und zelluläre Extrusion in HT-29/B6 Epithelzellen

Um aufzuzeigen, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Erhöhung pathogene Effekte induziert, welche konsekutiv epitheliale Barriere-defekte fördern, untersuchten wir den Effekt der HlyA<sup>+</sup>-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme morphologisch mit *Live Cell Imaging* im HT-29/B6-Zellmodell, simultan mit dem zellpermeablen  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoff Fluo4-AM (Abbildung 17). Die Morphologie des Epithelverbandes veränderte sich mit der Zeit unter HlyA-Inkubation, vor allem zeigten sich unter Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Zellmembran-Auswölbungen und Extrusionen mit finaler Exfoliation einzelner Epithelzellen. Zu erkennen sind ebenfalls rote Signale an der apikalen Zellmembran, potentielle HlyA-induzierte Poren, durch welche  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle gelangt. Auffällig ist eine extrazelluläre Färbung von  $\text{Ca}^{2+}$  ab der 75. Minute, was eine Freigabe des Farbstoffes aus den abgeschnürten Exosomen impliziert.



Zellgrenzen   nuclei   Calcium

**Abbildung 17: Live Cell Imaging.** Repräsentative Zeitreihe einer Immunfluoreszenzfärbung eines HT-29/B6 Monolayers mit appliziertem HlyA-Überstand. Initial zeigte der Epithelverband der HT-29/B6 Zellen einen intakten Monolayer. Über die Zeit wurde dann alle 2 min eine Aufnahme des Epithels aufgenommen. Zu erkennen ist die Extrusion einzelner Zellen und die intrazelluläre Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  (Zellmembran = türkis, Kerne = blau,  $\text{Ca}^{2+}$  = rot).

---

## 4 Diskussion

Eine gestörte epitheliale Barrierefunktion ist ein pathogenetisches Prinzip sowohl bei infektiösen Darmerkrankungen als auch bei entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa (engl. *ulcerative colitis*, UC). Bei Colitis ulcerosa ermöglicht die Barrieredysfunktion einen Antigen-Eintritt in die Mukosa, was zu einer Entzündung des Darms führt (*Leaky Gut*-Konzept) (Almer et al., 1993). Bakterielle Toxine, insbesondere  $\beta$ -PFTs, können eine wichtige Rolle bei der Induktion oder Aufrechterhaltung von Barrieredefekten bei diesen Krankheiten spielen (Los et al., 2013). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass pathogene HlyA<sup>+</sup>-produzierende *E. coli* im entzündlichen Krankheitsschub von UC-Patienten vermehrt im Dickdarm vorkommen (Martinez-Medina et al., 2009; Vejborg et al., 2011). Es wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt, dass eine Zink-Ergänzung die Dauer und Schwere von Diarrhoe-Episoden verbessert bzw. Diarrhoe-Episoden präventiv verhindert (Bhutta et al., 2000; Awasthi, 2006). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt Kindern 20 mg Zink für 10-14 Tage zusammen mit einer Rehydrationslösung während Diarrhoe-Episoden (WHO Richtlinien, 2006) zu verabreichen. Unsere Studie konnte zeigen, dass eine Zink-Supplementierung in einem (ex-keimfreien) monokolonisierten Mausmodell die durch HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-induzierten Barrieredefekte des Darms hemmt. Die Hemmung des Toxins durch Zinkionen inhibiert die durch HlyA<sup>+</sup>-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentrationen.

### 4.1 Die Zink-Supplementierung inhibiert HlyA<sup>+</sup>-induzierte Barriereeffekte im Mauskolon

Die epitheliale Barriereintegrität des Kolons von Mäusen mit einer normalen Zink-Diät, die eine physiologische Zinkkonzentration enthielt, wurde nach der Infektion mit dem HlyA<sup>+</sup>-produzierenden *E. coli* beeinträchtigt. Wenn jedoch Mäuse eine definiert hohe Zink-Supplementierung in ihrem Futter erhielten, konnte eine intakte Barrierefunktion auch nach der Kolonisierung von HlyA<sup>+</sup> *E. coli* erhalten bleiben. Das konnte sowohl durch die Messung des TER als auch durch Permeabilitätsmessungen mit FD4 bestätigt werden. Makromolekulare Marker wie FD4, Ovalbumin A (OVA) oder Meerrettichperoxidase (HRP) eignen sich zur Detektion eines verstärkten Antigen-Einstroms durch grobe Epitheldefekte wie fokale Läsionen oder Erosionen (Schürmann et al., 1999), wobei FD4 auch als Marker für defekte trizelluläre Tight Junctions geeignet ist, während OVA und HRP diese nicht passieren. In einer anderen Studie wurde eine Kolitis durch intrarektale Injektion von

---

Essigsäure bei Ferkeln induziert. In diesem Modell konnte die intestinale Barriere-Integrität auch durch eine Diosmectit-Zinkoxid-Supplementierung aufrecht erhalten werden, wie die Abnahme der FD4-Fluxe zeigt im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kolitis-Ferkeln) ohne Zinkgabe (Song et al., 2015). Interessanterweise zeigten Ratten in einer anderen Studie, die für drei Tage mit einer adäquaten Dosis von Zink (30 mg/kg) vor der Kolitisinduktion durch intrarektales DNBS (Dinitrobenzolsulfonsäure) vorbehandelt wurden, signifikant weniger Tight Junctions, die für Lanthan durchlässig waren, und keinen Gewichtsverlust, wobei eine niedrigere Zinkdosis (2 mg/kg, Zinkdefizienz) diesen Effekt nicht aufweisen konnte (Sturniolo et al., 2002). In unserer Studie erhielten die Mäuse das Futter zwei Tage vor der *E. coli* Infektion. Das Auftreten von HlyA<sup>+</sup>-induzierten fokalen Läsionen und der Anstieg des hochmolekularen Antigen-Influx-Markers FD4 deuten auf eine Darmbarriere-Dysfunktion gegenüber Antigenen hin (*Leaky Gut*). Ergebnisse einer Studie zeigten, dass eine Zink-Supplementierung Permeabilitätsänderungen, detektiert durch das Lactulose/Mannitol-Verhältnis, bei Patienten mit Morbus Crohn in Remission beheben kann und die intestinale Barrierefunktion zu verbessern vermag (Sturniolo et al., 2001).

#### **4.2 Zink mindert die Translokation von HlyA<sup>+</sup> *E. coli* im Mausolon**

Als zweites Hauptresultat unserer Studie konnte die Zink-Supplementierung die Translokation von *E. coli* über die Mukosa des Mauskolons verhindern. Der Übertritt von pathogenen Bakterien durch die Mukosa hindurch ist ein relevanter Mechanismus für die Entwicklung von Darmentzündungen. Dabei scheinen diese Bakterien HlyA<sup>+</sup>-unabhängig invasiv zu sein, da beobachtet wurde, dass auch HDM-*E. coli* zwar zu einem wesentlich geringeren Anteil, aber trotzdem ebenfalls in die Milz translozieren. Ein solcher Bakterien-Übertritt wie durch HDM, was auch im intakten Epithel in einem geringen Maße stattfinden kann, ist im allgemeinen Antigen-Erkennungsprogramm des Immunsystems vorgesehen. Die erhöhte Wahrscheinlichkeit zur bakteriellen Translokation könnte im keimfreien Modell dadurch bedingt sein, dass hier ein bisher ungeschultes Immunsystem vorliegt (*innate immune response* im keimfreien erwachsenen Tier siehe 4.5.) und die Darmbarriere unter der keimfreien Aufzucht nicht komplett ausgebildet ist. Erste Vorversuche zur Invasion der Bakterien durch einen *Gentamycin Protection Assay* zeigten sowohl bei dem HlyA-produzierenden *E. coli*, als auch bei der HlyA-defizienten Mutante eine generelle Invasionsfähigkeit in HT-29/B6 Kolonepithelzellen, bei dem HDM-Stamm aber im kleineren Ausmaß (Daten nicht gezeigt). Die HlyA-induzierte Läsionsformierung ist in

---

Anzahl und Größe in der Hoch-Zinkgruppe reduziert, was mit der verminderten Translokationsrate korreliert. Die Abwesenheit anderer Bakterienspezies der Darm-assoziierten Mikrobiota im keimfreien Tiermodell und damit die Verfügbarkeit von freien Nischen impliziert einen vereinfachten Zugang von *E. coli* zum Epithel, während die verstärkte Bildung von Mukus im Darm von keimfreien Tieren gegen eine leichte Adhäsions- und Invasionsmöglichkeit von *E. coli* spricht. Epitheliale Widerstandseffekte (TER) von HlyA<sup>+</sup>-infizierten HT-29/B6 Kolonepithelzellen mit dem Invasionsinhibitor Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin zeigten auf, dass durch Hemmung der Invasion der barriere-degradierende Effekt des HlyA<sup>+</sup> aufgehalten werden konnte (Richter, 2007). Untersuchungen der Barriere mit dem HlyA<sup>+</sup>-haltigen Überstand zeigten aber auch einen barriere-mindernden Effekt ohne Bakterieninvasion. Somit ist es vorstellbar, dass das HlyA<sup>+</sup> vom Lumen her in die Zellmembran eingebaut wird, aber nach bakterieller Invasion auch intrazellulär in der Wirtszelle sezerniert werden kann und wirksam wird, sowie nach dem Durchtritt der Bakterien durch das Epithel hindurch sezerniertes HlyA<sup>+</sup> von der serosalen Seite aus wirken kann. Gegenstand aktueller Untersuchungen in unserem Labor sind Invasionsstudien des HlyA<sup>+</sup>-*E. coli* 536 an HT-29/B6 Kolonepithelzellen, um aufzuklären, ob Zink in der Lage ist die *E. coli* Invasion zu inhibieren. Eine Sepsis, ein kritischer Zustand des Organismus, welcher durch eine schwere systemische Immunantwort auf Infektionen entsteht, kann aus einer pathogenen Translokation resultieren. Klinische Daten deuten indirekt darauf hin, dass eine Zink-Supplementierung eine potentiell wirksame therapeutische Strategie in der Sepsis sein kann (Nowak & Wong, 2011). In einer anderen Studie wurde die Hypothese, dass eine prophylaktische Zink-Supplementierung vorteilhaft bei Mäusen ist, in einem Peritonitis-induzierten Sepsis-Modell bestätigt (Nowak et al., 2012). Interessanterweise zeigte die gemessene *ex vivo* Phagozytose von *E. coli* und *S. aureus* durch peritoneale Makrophagen in diesem Versuch Unterschiede. Peritoneale Makrophagen aus zinksupplementierten Mäusen zeigten eine wesentlich größere Phagozytose-Rate, sowohl für *E. coli* als auch für *S. aureus*, verglichen mit peritonealen Makrophagen aus infizierten Mäusen ohne Zinkergänzung (Nowak et al., 2012).

---

### 4.3 Hypothesen zu den Mechanismen der Zinkwirkung am Epithel

Die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse implizieren einen multifaktoriellen Wirkmechanismus des Spurenelementes Zink. Entweder existieren direkte Zink-Effekte auf das *E. coli* Bakterium selbst und/oder auf sein sezerniertes HlyA<sup>+</sup> oder indirekte Auswirkungen über die Veränderung von Signaltransduktionswege in der Epithelzelle. Für die Zinkeffekte auf die HlyA<sup>+</sup>-induzierten Barrieredefekte können folgende Mechanismen postuliert werden: (1) einen Einfluss auf die Proliferation von *E. coli*, also eine antibakterielle Wirkung, oder (2) Auswirkungen auf den Sekretionsvorgang des Toxins und seine Oligomerisierung, was zu Interferenzen in der Poren-Assemblierung und Membranintegration führen kann, oder (3) Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>-aktivierten zytotoxischen Effekte, ausgelöst durch einen HlyA<sup>+</sup>-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom oder (4) Beschleunigung des epithelialen Läsionsverschlusses und der Restitution durch Einfluss auf das Cytoskelett der Epithelzellen oder (5) protektive Epithelwirkung durch Regulation von Tight Junction-Proteinen (Abbildung 19).

In Bezug auf Punkt (1) beeinflusste Zink in unserer Studie nicht die Proliferation oder den vitalen Status von *E. coli*, da der Proliferationsassay keine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung zeigte (siehe Kap.3.2.2.). Eine Wechselwirkung zwischen Zink und der Bakterienzellmembran, um die Sekretion des HlyA<sup>+</sup> und den Zugang des Toxins zur Wirtsmembran zu verhindern, ist aber denkbar. Gram-negative Bakterien wie *E. coli* besitzen eine äußere Membran aus Lipopolysacchariden (LPS). Die äußere Bakterienmembran wird durch Magnesium- und Calciumionen stabilisiert, diese zweiwertigen Kationen überbrücken die negativ geladenen Zucker der LPS. Die Zugabe von Kationen führt zu einer Beschädigung der äußeren Bakterienmembran und erleichtert das Eindringen von Molekülen aus der äußeren Umgebung (Shai-Matsuzaki-Huang-Modell) (Zasloff, 2002). Somit könnte Zink als zweiwertiges Kation die Fähigkeit der HlyA<sup>+</sup>-Sekretion durch das Typ 1-Sekretionssystem (T1SS) verhindern. TER-Effekte von HlyA<sup>+</sup>-haltigen Bakterienüberständen auf Epithelzellen unter Bezugnahme auf Punkt (2) zeigten sich allerdings zinkempfindlich, auch ohne Vorhandensein des Bakteriums. Ebenfalls verdeutlichen Western Blots keinen Einfluss auf die Expression von HlyA<sup>+</sup>, auch wenn Bakterien in zinkhaltigem Medium angezogen wurden. Somit können wir in unserer vorliegenden Arbeit eher nicht auf dominierende Einflüsse auf die bakterielle Membran oder das bakterielle Sekretionssystem schließen.

So interagiert Zink eventuell direkt mit HlyA, um seine biologische Aktivität an der Wirtszellmembran zu stören. Bisherige Arbeiten an Erythrozyten haben gezeigt, dass Zn<sup>2+</sup> und andere zweiwertige Kationen (Hg<sup>2+</sup>) sowie dreiwertige Kationen (La<sup>3+</sup>) Poren

---

schließen können, die durch PFTs gebildet werden, aber nicht die durch hypoosmotischen Schock verursachte Lyse hemmen (Bashford et al., 1989). Die zytotoxische Wirkung von HlyA wird durch ATP-Freisetzung, vermutlich durch die HlyA-Pore (Skals et al., 2014) mit anschließender P2X-Rezeptor-Aktivierung, massiv verstärkt. In Erythrozyten wurden P2X1- und P2X7-Rezeptoren zusammen mit einer HlyA-induzierten Hämolyse impliziert und die Blockierung von einem dieser Rezeptoren resultierte in einer reduzierten Hämolyse (Skals et al., 2009; Larson et al., 2011). Somit ist eine direkte Zinkwirkung an der HlyA-Pore vorstellbar. Dem HlyA fehlt eine gut definierte Transmembran-Domäne und primär wird HlyA aus Wirtsmembranen als Monomer isoliert, was die Frage aufwirft, wie ein einziges HlyA-Polypeptid eine Pore bilden kann. Spätere Studien zeigten, dass mehrere Reste innerhalb des amphipathischen  $\alpha$ -Helix-reichen N-Terminus von HlyA vollständig in die Lipiddoppelschicht eindringen können und als putative Transmembran-Domäne dienen und möglicherweise zur Porenbildung beitragen (Valeva et al., 2008). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Plasmamembran HlyA oligomerisieren kann, ein Prozess, der als dynamisch und abhängig von der Zeit, der Toxinkonzentration und der Membranfluidität verstanden wird (Herlax et al., 2009; Moayeri & Welch 1994). Der Prozess der Porenbildung wird initiiert, wenn HlyA-Monomere, gebunden durch  $\text{Ca}^{2+}$ , an die Zielzellmembran über elektrostatische Wechselwirkungen andocken (Lally et al., 1999; Ostolaza et al., 1997). Sobald sie assoziiert sind, kann jedes HlyA-Monomer vermutlich durch Konformationsänderungen mit der Zielmembran in engeren Kontakt gebracht werden (Soloaga et al., 1999; Herlax et al., 2007; Bakas et al., 2006). Diese Insertionsphase beinhaltet die irreversible Verankerung von Teilen der  $\alpha$ -helikalen Domänen in der Wirtsmembran (Herlax et al., 2009). Schließlich werden in Abhängigkeit vom lokalen Mikrodomänen- und Lipid-Raft-Gehalt der Wirtszellmembran Monomere konzentriert und dynamisch zu Poren oligomerisiert. Die Möglichkeiten, dass Zink das Andocken, die Konformationsformierung oder die Oligomerisierung von HlyA stört, sind vorstellbar. Kürzlich zeigten Studien, dass Kationen wie Zink, Zellen gegen Membranschäden schützen, die durch hämolytische Agenzien induziert wurden durch Wirkung der Kationen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran (Bashford et al., 1989). Die Effekte der Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  auf das HlyA-Monomer sind interessant. Eine ziemlich große Anzahl von Zink-Ionen, etwa 14, scheint das HlyA zu binden (Ostolaza et al., 1995), was in der Folge eine Konformationsänderung bewirken kann, wodurch HlyA die Membran als ein extrinsisches Protein bindet und als solches zumindest teilweise entfernt wird, so dass es nicht in der Lage ist, eine funktionelle Pore zu inserieren (Bakas et al., 1998). Quantitative Analysen der HlyA-Proteinexpression in Zink-behandelten Zellen zeigen keinen Unterschied zu

---

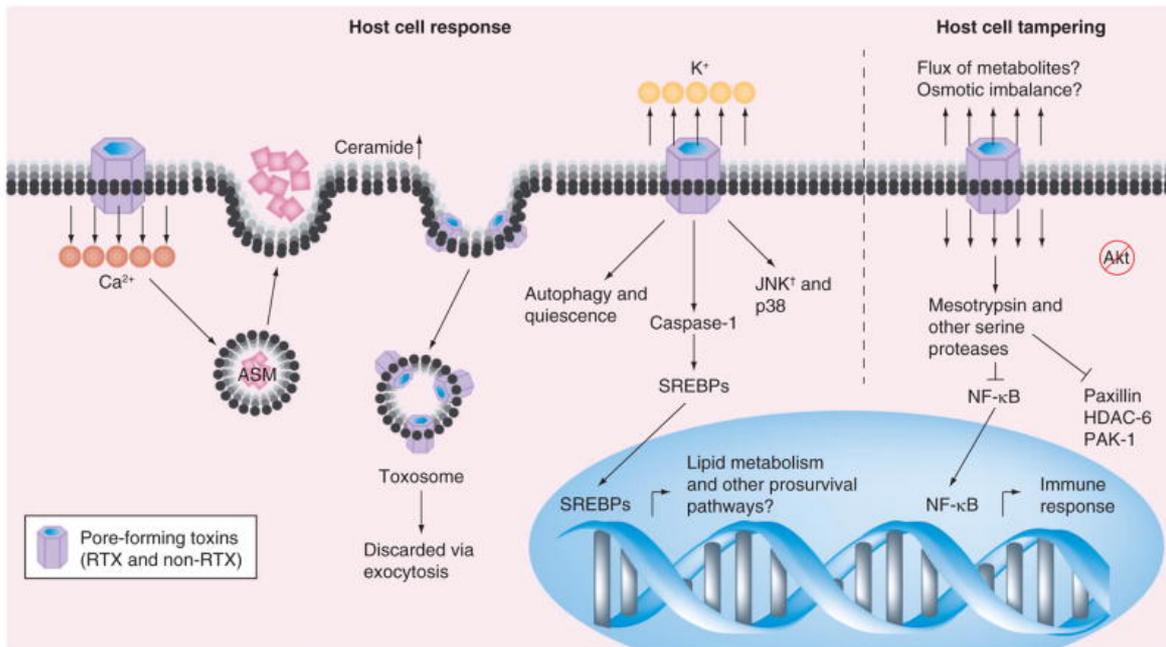
unbehandelten Zellen. Aussagen zur Oligomerisierung wären im nativen Western Blot-Verfahren zu überprüfen.

In dieser Arbeit konnte Zink als ein wichtiger Faktor für die Barrierenintegrität bei einer Barrieredysfunktion identifiziert werden. Auch die hämolytischen Wirkungen von Polyalkylpyridiniumpolymeren, einem PFT des marinen Schwamms *Reniera sarai*, konnte durch Zinkionen inhibiert werden (Malovrh et al., 1999). In der vorliegenden Studie konnte Zink die Wirkung von HlyA<sup>+</sup> sowohl auf den transepithelialen Widerstand als auch auf die Erhöhung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> und dessen pathophysiologischen Konsequenzen abschwächen. Extrazelluläres Zink und andere zweiwertige Kationen konnten Erythrozyten vor Membranschäden durch eine Vielzahl von Substanzen einschließlich  $\beta$ -PFTs schützen (Bashford et al., 1989). Interessanterweise führt die Insertion einer HlyA-Pore nicht zu einer sofortigen Zellschwellung und Ruptur, sondern HlyA löst eine akute Erythrozyten Schrumpfung aus, die von Ca<sup>2+</sup>-aktiviertem Efflux von K<sup>+</sup> über den Kaliumkanal KCa3.1 und von Cl<sup>-</sup> über den Chloridkanal TMEM16A abhängt (Skals et al., 2010). In unserem Zellmodell wurde Fura-2 verwendet, um Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration nach HlyA-induzierter Porenbildung zu messen. Wenn Zink zugegeben wurde, erfolgte ein verminderter Anstieg von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Als Limitation der ratiometrischen Messmethode mit Fura-2-AM könnte man annehmen, dass es zu einem Artefakt bei der Wirkung von HlyA durch Zellschrumpfung kommen könnte. Es konnte aber in der Fura-2-AM-Messung ausgeschlossen werden, dass ein intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Anstieg bzw. eine Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes ein sekundärer Effekt einer Zellschrumpfung ist, da mit Fura-2 eine ratiometrische Messung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> durchgeführt wurde. Die Untersuchung der absoluten Anregungszustände von Fura-2 bei 340 nm und 380 nm schließen Effekte von Volumenänderungen auf die Ca<sup>2+</sup>-Signale bei den HlyA<sup>+</sup>-inkubierten HT-29/B6 Epithelzellen aus. In Kombination mit den elektrophysiologischen Daten deuten die Untersuchungen mit Fura-2 darauf hin, dass Zink die fokale Läsionsfläche reduziert und zwar durch die Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Anstieges. Diese These unterstützt den Mechanismus von Punkt (3).

Schnelle Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen wurden schon früher in Nierenepithelzellen als Antwort auf HlyA von UPECs beschrieben, welche mit einem pathologischen Mechanismus bei der Entstehung einer Pyelonephritis verknüpft worden sind (Uhlen et al., 2000). Darüber hinaus wurden bei HlyA<sup>+</sup> UPEC-Infektionen eine extensive Abschilferung des Uroepithels und Blutungen im Harnblasengewebe bei Mäusen beobachtet. Auch diese morphologischen Veränderungen im Epithel könnten mit einer Ca<sup>2+</sup>-Dysregulation

---

verknüpft sein (Smith et al., 2008). Auch wir beobachteten im *Live Cell Imaging* eine  $\text{Ca}^{2+}$ -assoziierte Exfoliation des HT-29/B6 Zellmonolayers. Die morphologischen Eigenschaften der epithelialen Exfoliation sind im Zusammenhang mit Zelltod, Extrusion, Abschilfern und Ablösung der Epithelzellen zu sehen. Enterozyten, die sich einer Extrusion unterziehen, zeigen eine basolaterale Bewegung von Tight Junctions mit der geteilten Plasmamembran benachbarter Enterozyten. Die benachbarten Zellen verlängern cytoplasmatische Prozesse unterhalb der Zelle, welche exfoliert und den Monolayer verlässt, um Tight Junctions zu formieren und eine epitheliale Kontinuität zu erhalten. Pathologische Exfoliationsphänomene wurden bei Menschen mit entzündlicher Darmerkrankung (IBD) beobachtet und bei Mäusen nach systemischer TNF-Applikation (Kiesslich et al., 2007). Im Kontext der pathologischen Epithelzellexfoliation im Darm von Patienten mit IBD konnte gezeigt werden, dass Exfoliationsereignisse mit Permeabilitätsdefekten für Fluorescein korrelieren (Kiesslich et al., 2012). Auch in der vorliegenden Studie könnte das pathologische HlyA-induzierte Exfolieren mit konsekutiver Wundheilungsstörung einen möglichen Pathomechanismus zur Entstehung der fokalen Läsionen darstellen. Interessanterweise erscheint der Farbstoff Fluo-4 nach 70 min vermehrt extrazellulär, was für eine Degradierung der abgeschnürten Vesikel im Extrazellulärraum spricht. Vermutlich aktivieren die HlyA<sup>+</sup>-Zellmembraninteraktion und die HlyA<sup>+</sup>-Poreninsertion mit konsekutivem  $\text{Ca}^{2+}$  Influx zunächst Schutzmechanismen der Zelle, das Toxin zu entfernen mittels Exozytose von gebildeten Toxosomen bis hin zum pathologischen Abschilfern des gesamten Epithels. Andere infektiöse Bakterien, z.B. *Staphylococcus aureus*, sezernieren  $\alpha$ -Hämolysine mit einer hohen strukturellen Ähnlichkeiten zu dem *E. coli*  $\alpha$ -Hämolysin. In den Harnblasenepithelzellen zeigten diese  $\alpha$ -Hämolysine ebenfalls einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom, aber auch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit anschließender Inaktivierung der Akt/Protein-Kinase B-Signalisierung und anderer Signalwege (Wiles et al., 2008) (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Einfluss von PFTs auf die Wirtszell-Biologie.**

Wirtszellreaktion: Der PFT induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom stimuliert die exozytotische Abgabe einer neuen Membran und des Enzyms ASM an die Zelloberfläche. Der konsekutive  $\text{K}^{+}$ -Efflux löst Autophagie, die lipogene Caspase-1/SREBP-Signalachse und Aktivierung der MAPK p38 aus. Wirtszellmanipulation: Der Flux weiterer unbekannter Metabolite oder osmotischer Stress löst die Inaktivierung von Akt und einen Serin-Protease-vermittelten Abbau von NF- $\kappa$ B, Paxillin, HDAC-6 und PAK-1 aus, was zu einer Immunsuppression und einer beeinträchtigten Cytoskelettfunktion führt. ASM: Säurespingomyelinase; SREBP: Sterol-regulatorisches Element-bindendes Protein. (Wiles & Mulvey, 2013).

Die Auswertung einer Zink-Supplementierungsstudie an Ferkeln mit Essigsäure-induzierter Kolitis wies eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression nach sowie eine ERK1/2- und Akt-Aktivierung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $\text{Zn}^{2+}$  die intestinalen Barriere-defekte in diesem Kolitis-Modell abmildern kann und zwar durch Hemmung der epithelialen Apoptose und Verbesserung der Proliferation der intestinalen Epithelzellen als Folge der Modulation von TGF- $\beta$ 1-, ERK1/2- und Akt-Signaltransduktionswegen (Song et al., 2015). In unserem mit *E. coli* HlyA infizierten HT-29/B6-Zellmodell beobachteten wir dagegen eine Zunahme der Akt/Protein-Kinase B-Phosphorylierung (Aktivierung) durch HlyA<sup>+</sup> (Bücker et al., 2014). Welche Zelltyp-spezifischen Signalwege durch HlyA induziert werden, muss in künftigen komparativen Studien eruiert werden. Ob die HlyA-induzierten fokalen Barriere-defekte durch Zelltod initiiert werden, muss weiter untersucht werden. Viele Zelltodmechanismen sind eng mit einer  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase assoziiert.  $\text{Ca}^{2+}$ -

---

abhängige Prozesse sind eng mit den Haupteffektoren der Apoptose-ausführenden Caspasen verknüpft und Studien zeigen, dass störende Einflüsse auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des endoplasmatischen Retikulums (ER) ausreichen, um die Apoptose der Zelle als Teil einer Stressreaktion auszulösen. Zusätzlich können  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse rekrutiert werden, welche die endgültige Beseitigung von toten oder sterbenden Zellen durch Förderung ihrer Phagozytose und/oder ihrer Lyse hervorrufen. Caspasen wiederum können über zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung Nekrose fördern, die durch die Spaltung und Hemmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokasen vermittelt wird (Orrenius et al., 2003). Dafür ist es essentiell, den Pathomechanismus des HlyA zu beleuchten. Analysen der aktivierten Caspase-3 in immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen HlyA-infizierter Mäuse zeigten keine Erhöhung des Apoptose-Markers Caspase-3 (Bücker et al., 2014), was eine Untersuchung der Zinkwirkung auf Caspase-Induktion in der vorliegenden Arbeit obsolet machte. Die Daten der vorliegenden Studie implizieren eine pathologische HlyA-induzierte Exfoliation als ein potentieller Pathomechanismus zur Entstehung der fokalen Läsionen.

Ein anderes  $\beta$ -PFT, das Hämolysin Aerolysin (AerA) aus *Aeromonas hydrophila*, induziert eine Reduktion des epithelialen Widerstandes und eine erhöhte aktive Anionensekretion (Epple et al., 2004). Darüber hinaus wurde in den AerA-behandelten HT-29/B6-Monolayern ein intrazellulärer Calciumanstieg festgestellt, der zu einer Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase führte. Dies wiederum führte zu einer Kontraktion des perijunktionalen Cytoskeletts mit nachfolgender Tight Junction-Protein-Umverteilung (nach intrazellulär) und des weiteren führte Letzteres auch zur Hemmung der zellulären Restitution von epithelialen Läsionen. Diese Phänomene leiten uns zu Punkt (4) des  $\beta$ -PFT-Effekts und den Mechanismen der postulierten Zinkeffekte, die durch zwei unabhängige Untersuchungen unterstützt werden. Erstens war die Restitution von experimentell induzierten kleinen epithelialen Läsionen durch *E. coli* HlyA<sup>+</sup> im Mauskolon verzögert (Günzel et al., 2006). Zweitens konnte Zink den defekten Wundverschluss von epithelialen Einzelzell-Läsionen im HT-29/B6-Zellmonolayer nach der AerA-Exposition (Bücker et al., 2011) tatsächlich wiederherstellen, was ein direkter Hinweis für die Existenz eines derartigen protektiven zellulären Mechanismus ist. Mehrere Studien haben gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Schlüsselrolle bei der räumlichen und zeitlichen Regulation des Aktin-Cytoskeletts spielen (Prevarskaya et al., 2011, Tsai et al. 2014). Die Auswirkungen auf die Zellmigration sind aber Kanal- und Zelltyp-spezifisch sehr variabel. Beispielsweise stimuliert die Aktivierung von TRP Kanälen (Transienter Rezeptor Potential Kanal) wie TRPC5 (Tian et al., 2010) und TRPV2 (Monet et al., 2010) die Zellmigration, wohin gegen die Aktivierung von TRPC6 (Tian et al., 2010) die

---

Zellmigration reduziert. Eine TRPM7-Aktivierung erhöht die Migration von Krebszellen (Wei et al., 2009), hemmt aber die endotheliale Zellmigration (Zeng et al., 2015). Kürzlich berichtete eine Studie über die Aktivierung von TRPM2-Kanälen in PC-3 und HeLa-Zellen, wodurch die cytosolische Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  aber auch von  $\text{Zn}^{2+}$  erhöht wurde.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  scheinen die Aktin-Cytoskelettdynamik und die Zellmigration reziprok zu regulieren, wobei  $\text{Zn}^{2+}$  eine dominierende Rolle spielt (Li et al., 2016).

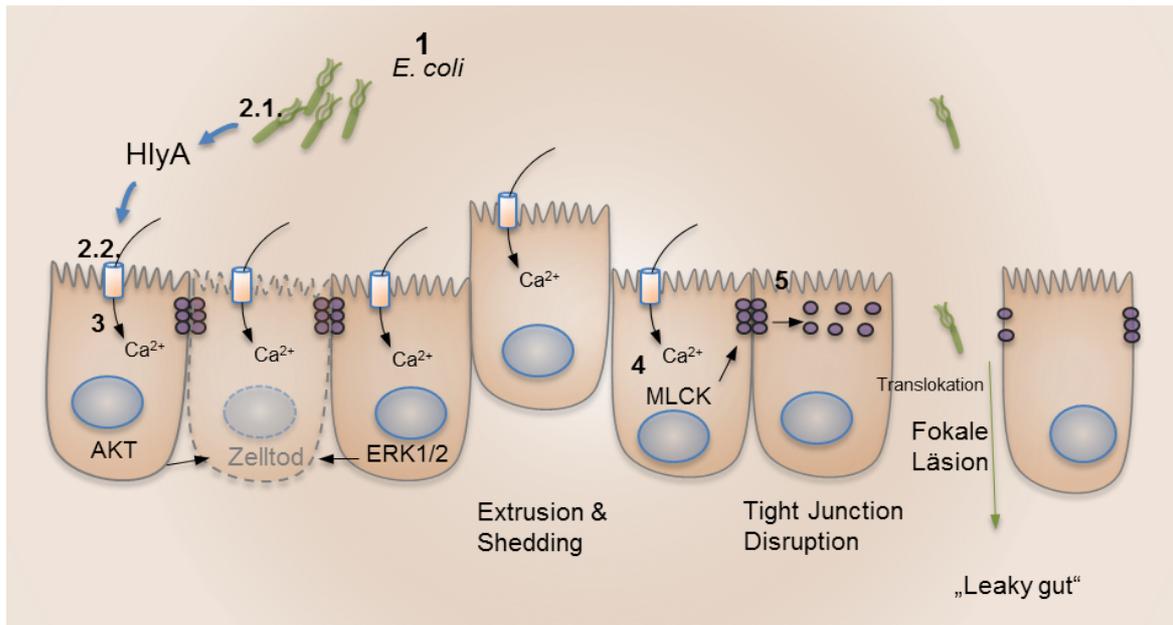
Untersuchungen an Poren, die durch eine Vielzahl von Amyloidpeptiden aus neurodegenerativen Erkrankungen und anderen Malignitäten gebildet wurden, haben eine Blockade von Poren durch Zink mit einem Mangel an Ionenselektivität und Poren-Spannungsabhängigkeit gezeigt. Die molekulare Struktur der Amyloidporen ähnelt der  $\beta$ -Fass-Struktur von PFTs, welche von bakteriellen Toxinen wie Staphylokokken- $\alpha$ -Hämolyysin, Anthrax-Toxin und clostridiales Perfringolysin formiert werden (Kagan, 2012). Das Pathogen *Clostridium perfringens* Typ A, welches als Lebensmittelvergifter bekannt ist, produziert ein Enterotoxin (CPE), das Durchfall hervorruft. CPE ist in der Lage Kationen-permeable Poren in der apikalen Membran von humanen intestinalen epithelialen Caco-2-Zellen zu bilden. Der CPE-vermittelte Effekt konnte durch Zinkionen inhibiert werden (Hardy et al., 1999). So bestätigen Studien zur bakteriellen Pathologie von PFTs, dass deren schädigende Effekte durch eine ausreichende Inhibitor-Konzentrationen des Spurenelementes Zink wirksam inhibiert wurden. Auch innerhalb anderer infektiöser Diarrhoen wirkt Zink therapeutisch. *Vibrio cholera* verursacht Durchfall durch Erhöhung der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Produktion, wodurch der Darm  $\text{Cl}^-$  und Wasser absondert und die Absorption von  $\text{Na}^+$  gehemmt wird (Qadir et al., 2013). Interessanterweise beeinträchtigt Zink-Supplementierung die cAMP-regulierte Sekretion von  $\text{Cl}^-$  über basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle, was die Wirksamkeit bei der Verringerung der Dauer von Cholera-induzierten Diarrhoen erklärt (Hoque et al., 2005; Bzik et al., 2012). Bei Ferkeln konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zink-Supplementierung die Expression bestimmter Gene vermindert, die mit Immunfunktionen assoziiert sind, wenn Ferkel mit dem enterotoxischen *E. coli* (ETEC) infiziert wurden. Dabei verringert die Zinkgabe eine ETEC-induzierte Diarrhoe und Entzündung. Diese Wirkung ist teilweise auf eine Abnahme der MUC4-Expression zurückzuführen, welches möglicherweise ein ETEC-K88-Rezeptor sein könnte (Sargeant et al., 2010). In Caco-2-Zellen konnte generell gezeigt werden, dass eine Zink-Supplementierung die  $\text{Ca}^{2+}$ - und NO-vermittelte Ionensekretion hemmt, die beide für pathogeninduzierte Diarrhoen bekannt sind.

Im Bezug auf die Wirkung auf Tight Junction Proteine (Hypothese 5) konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Spurenelemente Zink, Quercetin, Butyrat, Indol und

---

Berberin eine Remodellierung von epithelialen Tight Junctions induzieren und die Barriereintegrität im unbehandelten Caco-2-Epithelzellmodell verbessern (Valenzano et al., 2015). Alle fünf dieser chemisch sehr unterschiedlichen Spurenelemente erhöhten den TER signifikant. Jedes der fünf Mikronährstoffe induzierte auf spezifische Art und Weise Veränderungen in der Tight Junction-Proteinzusammensetzung, was auf multiple Wege und eine unterschiedliche Tight Junction-Assemblierung und -Lokalisierung hindeutet, wodurch die Tight Junction-abhängige Barrierefunktion gesteigert werden kann. In dieser Studie konnte eine Abnahme der Expression von Claudin-2 um bis zu 90% beobachtet werden und eine Zunahme von über 300% für die Claudine-5 und -7 in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der Caco-2-Epithelzellen (Valenzano et al., 2015). Kürzlich berichteten andere Studien über eine denkbare Regulation der Occludin-Proteolyse und Transkription anderer Tight Junction-Proteine, wie Claudin-3 (Miyoshi et al., 2016). Es ist bis jetzt noch weitgehend unbekannt, wie Zink die Bildung von Poren oder Läsionen durch HlyA<sup>+</sup> blockiert, aber eine Zink-induzierte Tight Junction-Regulation zur Stabilisierung der Barrierefunktion ist vorstellbar und muss weiter untersucht werden.

Zusammenfassend ist die Entstehung der fokalen Läsionen durch HlyA als auch die Hemmung durch Zink ein mehrschichtiger multifaktorieller Prozess, der noch näher untersucht werden muss. Zu den Interventionen von Zink auf die HlyA-induzierte Barriestörung an der Plasmamembran kommen additive Zinkwirkungen, welche zuträgliche barrieresteigernde Prozesse induzieren oder barriereprotektive Wirkungen zeigen, die zusammenfassend in Abbildung 19 dargestellt sind (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Sequenzielle Ereignisse implizieren die Entstehung der HlyA-induzierten fokalen Läsionen und die protektive Wirkung von Zink auf die intestinale Barrierefunktion.**

Aus Überlegungen der vorliegenden Arbeit erzeugte Abbildung zu den Hypothesen der Zinkwirkung: 1) direkter bakterizider Effekt auf *E. coli* (z.B. durch Stressresponse), 2.1.) Auswirkungen auf den Sekretionsprozess und 2.2.) Aktivierungsvorgang des Toxins und Membranintegration, (3) Inhibierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung und konsekutive zytotoxische Effekte (Zelltod, Shedding, Tight Junction Protein-Umverteilung, Translokation, Fokale Läsionen), (4) Beschleunigung des epithelialen Läsionsverschlusses durch Cytoskelettmodellierung und Zellmigration bei Restitutionsvorgängen (5) protektive Epithelwirkung durch Regulation von Tight Junction-Proteinen. Zusätzlich reguliert Zink die Phagozytose von *E. coli* durch Makrophagen.

#### 4.4 Zinkdosen, Zinkmangel

Bei der Betrachtung des Themas Zink vor dem Hintergrund gastrointestinaler Erkrankungen müssen mehrere ernährungsphysiologische Aspekte berücksichtigt werden. Ein Zinkmangel im Darm kann aus einer allgemeinen Zinkinsuffizienz des Organismus entstehen, d.h. die tägliche Ernährung enthält einen zu geringen Zinkgehalt oder Inhaltsstoffe der Nahrung, wie z.B. Phytate, interferieren mit der Zinkaufnahme im Darm. Die von Gesundheitsbehörden empfohlene essentielle tägliche Zinkzufuhr verdeutlicht umso mehr die Probleme, die mit einer Zinkinsuffizienz einhergehen, da der Körper nur einen kleinen verfügbaren Zinkspeicher besitzt. Auch können chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) eine gastrointestinale Malabsorption generieren

---

und wiederum zu einem Zinkmangel führen (Skrovanek et al., 2014). Die WHO empfiehlt für einen gesunden Organismus täglich eine Zink-Supplementierung von 11 mg (Institute of Medicine, 2002), wobei kurzfristig auch höhere Dosen tolerierbar sind. Studien zu Hochdosen über einen längeren Zeitraum zeigen einen toxischen Effekt, bedingt durch die Entwicklung einer schwerwiegenden Kupferdefizienz und einer Anämie (Porter et al., 1977; Prasad et al., 1978). Sekundär kann ein Zinkmangel auch aus einer intestinalen Hyperpermeabilität (*Leaky Gut*) resultieren, beispielsweise durch erhöhtes Stickstoffmonoxid oder oxidativen Stress, wodurch in der Folge eine noch stärkere Diarrhoe resultieren kann (Hambidge, 1992). Ein Zinkmangel bei Mäusen kann bereits mit einem Futter mit einem Zinkgehalt unter 10 mg Zink/kg erreicht werden. Die standardisierten Tierfutter-Pellets für eine Labormaus enthalten meist eine Zink-Supplementierung im Bereich von 50 mg Zink/kg Futter, weswegen wir eine definiert-normale physiologische Dosierung von 15 mg Zink/kg Futter wählten, um Unterschiede zur Gruppe der supplementierten Mäuse detektieren zu können. Dabei entspricht die gewählte Dosis der empfohlenen täglichen Zinkzufuhr im Menschen. Die Hoch-Zinkgruppe hingegen erhielt mit 500 mg Zink/kg Futter eine therapeutisch-hohe Zink-Dosis. Die Analyse des luminalen Zinkgehaltes im Darminhalt zeigte eine freie Verfügbarkeit von Zinkionen, welche identisch war zu jener in Zellkulturexperimenten (460  $\mu\text{M}$  im Darm der Mäuse und 500  $\mu\text{M}$  eingesetzte Zinkkonzentration *in vitro*). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass hohe Zink-Supplementierung in der Landwirtschaft die Antibiotikaresistenz von *E. coli* fördert, was eine langfristige präventive Hochdosis-Zink-Gabe in der Tierhaltung zur Reduzierung der Infektionslast ausschließt (Bednorz et al., 2013).

#### **4.5 Die Wahl des keimfreien Tiermodells bei Entzündungsvorgängen**

Der Gastrointestinaltrakt ist die primäre Instanz von Interaktionen zwischen dem Immunsystem des Wirts und den Mikroorganismen, sowohl symbiotischer als auch pathogener Natur. Die Entwicklung des adaptiven Immunsystems wird enorm durch eine bakterielle Besiedlung des Darms beeinflusst (Round & Mazmanian, 2009). Keimfreie Tiere, geboren und aufgewachsen unter sterilen Bedingungen, zeigen Entwicklungsdefekte des Darmgewebes, reduzierte vaskuläre, ernährungsphysiologische und endokrine Funktionen. Auch sind sie anfälliger für Infektionen als normal kolonisierte Tiere (Falk et al., 1998; Bouskra et al., 2008). Die gastrointestinale sowie die systemische Immunantwort sind unterentwickelt in der Abwesenheit der Kommensalmikroorganismen.

---

Die unterentwickelten Immunsysteme keimfreier Mäuse, charakterisiert durch reduzierte CD4<sup>+</sup> T-Zellentwicklung (Inagaki et al., 1996), erklären die Tatsache, dass auch HDM-Mäuse eine Entzündungsreaktion nach Erstkolonisation mit *E. coli* zeigten, bedingt durch die alleinige Interaktion des weniger-pathogenen Bakteriums mit den GI-Immunzellen. In Hinblick auf das Inflammationsgeschehen könnten gnotobiotische Mäuse, bei denen zuvor die kommensale Darmmikrobiota mittels Breitspektrumantibiotika-Therapie eradiziert wurde, einen besseren Einblick auf das Entzündungsgeschehen geben, da diese ein bereits ausgebildetes Immunsystem besitzen (Fiebiger et al., 2016). Diese abiotischen Tiere mit normal entwickelten Immunsystem, können nach oraler Infektion mit HlyA<sup>+</sup> *E. coli* eine Entzündung induzieren. Über die Fähigkeit des HlyA<sup>+</sup> *E. coli* hinaus, mittels Läsioninduktion eine Barrierestörung zu induzieren, wurde kürzlich gezeigt, dass eine Infektion mit HlyA<sup>+</sup>-produzierenden Bakterien die Entwicklung einer intestinalen Entzündung beschleunigt und intensiviert (Bücker et al., 2014). Sowohl die Auswertung der klinischen Parameter für eine Kolitis als auch die entsprechenden histologischen Befunde zeigten in unserer aktuellen Studie nur leichte initiale Entzündungsreaktionen. Das liegt zum einen am früh gesetzten Zeitpunkt der Barriere-Untersuchung. Wir wählten ein Intervall von 2-4 Tagen p.i., damit initiale Aspekte der Pathogenität des HlyA identifizierbar waren. Das Kolongewebe wurde so in einem Zustand erhalten, der valide vermessbar war und es wurde darüberhinaus damit vermieden, dass die Tiere eventuell eine Sepsis erleiden.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass eine Zink-Supplementierung die HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-induzierten Barrieredefekte im Dickdarm abschwächen kann und dadurch die bakterielle Translokation und der Antigeneintritt durch das Barriere-gestörte Dickdarm-Epithel verringert wird, was die Induktion der Immunantwort abschwächt (Leaky-Gut-Konzept). Die Ergebnisse zeigen, dass eine therapeutische Zinkergänzung geeignet sein könnte, um PFT-induzierte Barrieredefekte zu verbessern, wodurch Folgeerkrankungen eventuell verhindert werden könnten. Solche Folgeerkrankungen umfassen im Einzelnen enterische Komplikationen wie ein postinfektiöses Reizdarmsyndrom oder chronische extraintestinale Entzündungen wie einer reaktiven Arthritis (Connor & Riddle, 2013).

---

## 4.6 Ausblick

Die Studie konnte Zink als ein wirksames Therapeutikum gegen eine *E. coli* HlyA<sup>+</sup>-induzierte Barrierestörung mit bakterieller Translokation in der Maus belegen, hinsichtlich eines *Leaky Gut* auch in der Tendenz einer Wirkung gegen eine Darmentzündung. Nun wäre es interessant zu prüfen, ob eine Studie mit gleichen Modalitäten in einem anderen Modell ähnliche Ergebnisse erzielen würde. Beispielsweise induziert Dextransulfat in der immunkompetenten BALB/c Maus ein nahezu identisches klinisches und histologisches Bild wie eine Colitis ulcerosa. Spannend wären dabei auch Mausmodelle mit einer spezifischen bakteriellen Kolonisation, welche die Mikrobiota-Zusammensetzung einer CED widerspiegelt. Da Zink auch therapeutisch wirkt innerhalb von abakteriell induzierten Kolitis-Modellen, wie der Dextransulfat- oder der Essigsäure-induzierten Kolitis, könnte man in Folgeexperimenten das Augenmerk verstärkt auf die inflammatorischen Prozesse und die konsekutiven Eigenschaften von therapeutischem Zink richten, z.B. in der Zellkultur mit Applikation von Zink bei einer TNF $\alpha$ -induzierten Barrierestörung oder in Mausmodellen mit einer humanisierten Darmmikrobiota. Ein häufigeres Screenen des Zinkgehaltes im Serum bei Colitis ulcerosa- oder Morbus Crohn-Patienten könnte sinnvoll sein, da eine Zinkdefizienz häufig ist und oft unerkannt bleibt. Auch wäre die Behandlung einfach und wirksam.

Da Zink zum einen bei sehr vielen  $\beta$ -PFTs effektiv protektiv wirkt und zum anderen auch bei Noxen mit einer ähnlichen Struktur wirksam ist, liegt die Vermutung nahe, Zink auch in anderen Krankheitsmodellen zu testen, wie Alzheimer oder Arthritis. Zink konnte bei jungen Ratten mit Aluminium-induzierter Demenz die Integrität der Blut-Hirn-Schranke schützen und die Reduktion der Expression des Tight-Junction-Proteins Occludin und des Cytoskelett-Proteins F-Aktin in der Blut-Hirn-Schranke verhindern (Yang et al., 2008). Die Untersuchung der Zinkwirkung auf die Tight Junction am Darmepithel im Zuge einer massiven HlyA<sup>+</sup> *E. coli*-Infektion (Überbesiedlung) könnte Aufschluss über eine Barrierestörung, die das gesamte Epithel betrifft, geben und eventuell Barriere-erhaltende Regulationen durch eine Zink-Supplementierung aufzeigen. Im vorliegenden Modell wurde die Tight Junction als bakterielles Target nicht erstrangig fokussiert, da die Tight Junction nicht über das gesamte Epithel betroffen zu sein scheint, sondern große HlyA<sup>+</sup>-vermittelte Barriereläsionen ursächlich für die Barrierestörung sind.

Auch die klinische Bedeutung des UPECs bei Harnwegsinfekten impliziert Zink als eine Therapieoption z.B. bei einer Blasenentzündung. Mit einer hohen Inzidenz ist die Zystitis vor allem bei Frauen relevant. Bei 80% der Blasenentzündungen ist eine *E. coli* Infektion

---

ursächlich. Allerdings besitzen UPECs eine Vielzahl von weiteren Virulenzfaktoren, z.B. zur Adhäsion oder Persistenz im Blasenepithel. Vor allem Zellkultur-Experimente an Blasenepithelzellen könnten Aufschluss geben, ob ein protektiver Effekt von Zink in diesem Infektionsmodus aufzeigbar ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen auch über die Humanmedizin hinaus weitere Anwendungsgebiete für die Zink-Supplementierung als möglich erscheinen. So wurden etwa kürzlich aufbauend auf unseren Ergebnissen Messungen an Zink-supplementierten Schweinedärmen durchgeführt, deren Auswertung in Kürze weitere Aufschlüsse über die dahingehende Nutzbarkeit liefern werden.

---

## 5 Zusammenfassung

Zinkmangel und Zinkergänzung können eine wichtige Rolle bei der Ätiologie und Therapie von verschiedenen Magen-Darm-Erkrankungen spielen. Klinische Studien belegen, dass eine Zink-Supplementierung die Dauer und Intensität von Durchfallerepisoden mindert.  $\alpha$ -Hämolysin-(HlyA)-produzierende *E. coli* können fokale Läsionen im Kolon-Epithel hervorrufen, durch die Bakterien und Antigene translozieren, wodurch HlyA als ein Virulenzfaktor für die Pathogenese von Kolitis entlang des *Leaky-Gut*-Konzeptes charakterisiert werden kann. Ziel dieser Studie war, das therapeutische Potenzial von Zink in einer HlyA-induzierten, gastrointestinalen Erkrankung zu charakterisieren und die Fähigkeit von Zink aufzuzeigen, intestinale fokale Läsionen in einem Infektions-Mausmodell und in infizierten Kolon-Zelllinien zu verhindern.

Um die Effekte von Zink als eine Therapieoption in einem Tiermodell mit einer HlyA-induzierten Darmbarrierestörung zu analysieren, führten wir *in vivo* Experimente durch. Keimfreie Mäuse wurden oral mit HlyA-exprimierendem *E. coli*-536 oder der  $\alpha$ -Hämolysin-defizienten Mutante (HDM) als Kontrollgruppe kolonisiert und mit einer definiert-normalen oder therapeutisch hoch gewählten Zink-Diät ( $\text{ZnCO}_3$  mit 15 bzw. 500 mg/kg Nahrung) versorgt. Die Barriere Eigenschaften der Mäusdärme wurden in Ussing-Kammer-Experimenten untersucht. Das Auftreten von fokalen Läsionen im Dickdarm wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und die bakterielle Translokation durch Koloniezählung charakterisiert. Entzündungsparameter wurden klinisch, histologisch und mit einem Calprotectin-ELISA erfasst. HlyA-inkubierte Kolon-Epithelzellen, die mit Zink behandelt wurden, konnten hinsichtlich der Barriereintegrität durch den transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) beurteilt werden. Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> wurde durch Fura-2 gemessen und im *Live Cell Imaging* mittels Fluo-4 visualisiert.

Ergebnisse des monokolonisierten Mausmodells, welches mit HlyA-produzierendem *E. coli*-536 infiziert war und eine physiologische Dosierung von Zink erhielt, zeigte eine beeinträchtigte Barriereintegrität im Vergleich zu der HDM-Kontrollgruppe. Bei HlyA-produzierenden *E. coli*-536-kolonisierten Mäusen, die therapeutisch hoch Zink-supplementiert waren, konnten die Epitheldefekte gemindert werden, was durch erhöhte TER-Werte und eine reduzierte Permeabilität für Makromoleküle (4 kDa FITC-Dextran) im Vergleich zu HlyA-infizierten Mäusen mit einer normalen Zinkverabreichung evident wurde. Verringerte Größe und Anzahl von epithelialen Läsionsflächen und eine verminderte bakterielle Translokation in Leber und Milz wurden bei HlyA<sup>+</sup>-infizierten Hoch-Zink-Mäusen im Vergleich zur Norm-Zinkgruppe beobachtet. Die Auswertung der

---

Entzündungsindikatoren konnte eine Tendenz zu einer verminderten Inflammation in der Mukosa der Hoch-Zink-Gruppe aufzeigen. Darüber hinaus verhinderte die Anwendung von zweiwertigen Kationen wie Zink oder Barium auf HT-29/B6-Zellmonolayer den TER-Abfall, der bei HlyA<sup>+</sup>-*E. coli*-behandelten Zellen beobachtet wurde. Calciummessungen zeigten eine Zunahme des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in HlyA-inkubierten Zellmonolayern, wohingegen mit Zink behandelte, infizierte Zellen nur einen verminderten Anstieg zeigten. Ebenfalls konnte die intrazelluläre HlyA-induzierte Ca<sup>2+</sup> Erhöhung mit einer Exfoliation des Epithels assoziiert werden.

Die Auswirkungen von *E. coli*-536 HlyA waren durch eine intestinale Barrierestörung mit epithelialen Läsionen, Intensivierung der bakteriellen Translokation, Antigenaufnahme (*Leaky-Gut*-Konzept) und pathologischer Exfoliation charakterisiert. Eine Zink-Supplementierung konnte vor HlyA-induzierten Läsionen *in vivo* und *in vitro* schützen, wodurch ein protektives Potential von Zink bei gastrointestinalen Störungen nachgewiesen wurde. Eine therapeutische Zinkergänzung beim Menschen mit intestinalen Barrierestörungen scheint demnach geeignet, wodurch eventuell auch nachfolgende Krankheitsepisoden verhindert werden könnten.

---

## 6 Summary

Zinc deficiency and zinc supplementation can play an important role in the etiology and therapy of various gastrointestinal disorders. Clinical studies showed that zinc supplementation reduces the duration and intensity of diarrheal episodes.  $\alpha$ -haemolysin (HlyA)-producing *E. coli* can induce focal leaks in the colonic epithelium through which bacteria and antigens translocate, whereby HlyA can be characterized as a virulence factor for the pathogenesis of colitis along the leaky-gut concept. The aim of this study was to characterize the therapeutic potential of zinc in a HlyA-induced gastrointestinal disease and to demonstrate the ability of zinc to prevent intestinal focal leaks in an infection mouse model and in infected colon cell lines.

In order to analyze the effects of zinc as a therapeutic option in a HlyA-induced intestinal barrier disturbance model, we performed *in vivo* experiments. Germ-free mice were colonized orally with HlyA-expressing *E. coli*-536 or the  $\alpha$ -haemolysin-deficient mutant (HDM) as a control group and treated with a defined-normal or therapeutically highly selected zinc diet (ZnCO<sub>3</sub> with 15 and 500 mg/kg, respectively). Barrier properties of the colonized mouse intestines were investigated in Ussing chamber experiments. The occurrence of focal leaks in the colon was characterized by confocal laser scanning microscopy and bacterial translocation by colony counting. Inflammation parameters were recorded clinically, histologically and with a calprotectin ELISA. HlyA-incubated colonic epithelial cells treated with zinc could be assessed for barrier integrity by transepithelial electrical resistance (TER). The intracellular Ca<sup>2+</sup> level [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured by Fura-2 and visualized using Fluo-4 in Live Cell Imaging.

Results of the monocolonized mouse model infected with HlyA-producing *E. coli*-536 and a physiological dose of zinc showed impaired barrier integrity compared to the HDM control group. In HlyA-producing *E. coli* 536 colonized mice, which were therapeutically highly zinc supplemented, the epithelial defects could be alleviated by increased TER values and reduced permeability to macromolecules (4 kDa FITC-dextran) compared to HlyA infected mice with a normal zinc administration. Reduced size and number of epithelial focal leak areas and decreased bacterial translocation in liver and spleen were observed in HlyA<sup>+</sup> infected high-zinc mice compared to the standard zinc group. The evaluation of the inflammatory indicators showed a tendency to a reduced inflammation in the mucosa of the high-zinc group. In addition, the use of divalent cations such as zinc or barium on HT-29/B6 cell monolayers prevented the TER drop observed in HlyA<sup>+</sup>-*E. coli*-treated cells. Calcium measurements showed an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in HlyA-incubated cell

---

monolayers, whereas zinc treated infected cells showed only a decreased elevation. The intracellular HlyA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevation was also associated with exfoliation of the epithelium.

The effects of *E. coli*-536 HlyA were characterized by intestinal barrier dysfunction with epithelial lesions, intensification of bacterial translocation, antigen uptake (leaky gut concept), and pathological exfoliation. Zinc supplementation was able to protect against HlyA-induced lesions *in vivo* and *in vitro*, demonstrating a protective potential of zinc in gastrointestinal disorders. Thus, a therapeutic zinc supplementation in humans with intestinal barrier defects seems appropriate, which could possibly also prevent subsequent disease seizures.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Abraham C & Cho JH (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 19;361(21).
- Abrams GD & Bishop JE (1967). Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:301-4
- Alam AN, Sarker SA, Wahed MA, Khatun M, Rahaman MM (1994). Enteric protein loss and intestinal permeability changes in children during acute shigellosis and after recovery: effect of zinc supplementation. *Gut* 1994; 35: 1707-1711.
- Almer S, Franzén L, Olaison G, Smedh K, Ström M (1993). Increased absorption of polyethylene glycol 600 deposited in the colon in active ulcerative colitis. *Gut.* 34(4): 509–513.
- Altmeyer S (2016). Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis* (ToyoCerin®) auf die intestinale Immunantwort beim Ferkel während der Phase des Absetzens. Doktorarbeit, Fu Berlin, Tierernährung.
- Alves GG, Machado de Avila RA, Chavez-Olortegui CD & Lobato FC (2014). Clostridium perfringens  $\epsilon$ -toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe* 30, 102–107.
- Anderson JM, van Itallie CM (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269: 467-475.
- Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, and Watanabe M (2005). MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 40(1): 16-23.
- Awasthi S (2006). Zinc supplementation in acute diarrhea is acceptable, does not interfere with oral rehydration, and reduces the use of other medications: a randomized trial in five countries. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 42(3), 300–5.
- Bakas L, Veiga MP, Soloaga A, Ostolaza H, Goni FM (1998). Calcium-dependent conformation of *E. coli*  $\alpha$ -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368:225–234
- Bakás L, Chanturiya A, Herlax V, Zimmerberg J (2006). Paradoxical lipid dependence of pores formed by the *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin in planar phospholipid bilayer membranes. *Biophys J.* 91:3748–3755.
- Bakkes PJ, Jenewein S, Smits SHJ, Holland IB, Schmitt L (2010) The Rate of Folding Dictates Substrate Secretion by the *Escherichia coli* Hemolysin Type 1 Secretion System. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 40573-40580.
- Barrile R, Kasendra M, Rossi-Paccani S, Merola M, Pizza M, Baldari C, Soriani M, Aricò B (2015) *Neisseria meningitidis* subverts the polarized organization and intracellular trafficking of host cells to cross the epithelial barrier. *Cellular Microbiology.* 1365–1375
- Bashford CL, Rodrigues L & Pasternak C A (1989). Protection of cells against membrane damage by haemolytic agents: divalent cations and protons act at the extracellular side of the plasma membrane. *Biochem Biophys Acta.* 983, 56-63.

- 
- Bauer H, Horowitz RE, Levenson SM, Popper H (1963). The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am J Pathol* 42:471–483
- Bauer ME & Welch RA (1996). Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* 64(11): 4665-72. 17.
- Bednorz C, Oelgeschläger K, Kinnemann B, Hartmann S, Neumann K, Pieper R, Bethe A, Semmler T, Tedin K, Schierack P, Wieler LH, Guenther S (2013). The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int J Med Microbiol.* 303(6-7):396-403.
- Benz R, Maier E, Bauer S. & Ludwig A (2014). The deletion of several amino acid stretches of *Escherichia coli* alpha-hemolysin (HlyA) suggests that the channel-forming domain contains beta-strands. *PLoS One.* 9(12): e112248.
- Berg RD, Garlington AW (1979). Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.* 23(2): 403-411.
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD & Hecht G (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52(3): 439-451.
- Bhakdi S. et al. (1988). The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur J Epidemiol.* 4, 135-143.
- Bhutta Z. A. et al. (2000) Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition.* 72(6), 1516–22.
- Bischofberger M, Iacovache I & van der Goot FG (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe* 12, 266–275.
- Bouskra, D et al. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507–510.
- Braegger CP, MacDonald TT (1994). Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann. Allergy.* 72(2): 135-141.
- Brown KH, Peerson JM, Allen LH (1998). Effect of zinc supplementation on children's growth: A meta-analysis of intervention trials. In: Sandström B, Walter P, editors. *Role of Trace Elements for Health Promotion and Disease Prevention.* California: S Karger Pub; pp. 76–83.
- Brown KH, Rivera JA, Bhutta Z, Gibson RS, King JC, et al. (2004). International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull.* 25:S99–203.
- Brown MJ, Thoren KL & Krantz BA (2011). Charge Requirements for Proton Gradient-driven Translocation of Anthrax Toxin. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 23189-23199.
- Bücker R et al. (2011). Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* perturbs tight junction integrity and cell lesion repair in intestinal epithelial HT-29/B6 cells. *J Infect Dis.* 204, 1283–92.

- 
- Bücker R et al. (2014).  $\alpha$ -Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut* 63, 1893–1901.
- Bücker R, Troeger H, Kleer J, Fromm M. & Schulzke JD (2009). *Arcobacter butzleri* Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells. *J Infect Dis*.
- Bürgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2002). Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroent*. 123(2): 433-443.
- Burns SM & Hull SI (1999). Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain. *Infect Immun* 67(8): 3757-62.
- Buyse M, Tsocas A, Walker F, Merlin D, Bado A (2002). PepT1-mediated fMLP transport induces intestinal inflammation in vivo. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283(6): 1795-1800
- Bzik VA, Medani M, Baird AW, Winter DC, Brayden DJ (2012). Mechanisms of action of zinc on rat intestinal epithelial electrogenic ion secretion: insights into its antidiarrhoeal actions. *J Pharm Pharmacol* 64: 644-653.
- Ceponis PJ, Botelho F, Richards CD, McKay DM (2000). Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J. Biol. Chem.* 275: 29132–29137.
- Cheng C, Reynolds, IJ. (1998). Calcium-sensitive fluorescent dyes can report increases in intracellular free zinc concentration in cultured forebrain neurons. *J Neurochem.* 71(6): 2401-2410.
- Connor BA & Riddle MS (2013). Post-infectious sequelae of travelers' diarrhea. Review. *Journal of Travel Medicine.* 20 (5).
- Cousins RJ (2010). Gastrointestinal Factors Influencing Zinc Absorption and Homeostasis. *Int J Vitam Nutr Res.* 80(0): 243–248.
- Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem* 281:24085-24089.
- Croxen MA & Finlay BB (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8(1): 26-38.
- Dixon LJ, Kabi A, Nickerson KB, McDonald C (2015). Combinatorial Effects of Diet and Genetics on Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 21(4): 912–922.
- Dutta P, Mitra U, Dutta S, Naik TN, Rajendran K, Chatterjee MK (2011). Zinc, vitamin A, and micronutrient supplementation in children with diarrhea: a randomized controlled clinical trial of combination therapy versus monotherapy. *J Pediatr* 2011; 159: 633-637.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, & Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728): 1635-8.
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J (1995). Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol.* 3(3): 118-120.

---

Epple HJ et al. (2004). *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). *Infect Immun.* 72, 4848-58.

Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, Amasheh M, Loddenkemper C, Fromm M, Zeitz M and Schulzke JD (2009). Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut* 58(2): 220-227.

Escherich T (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fort. Med.*3: 515-528, 547-554.

Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL & Mulvey MA (2007). Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 3(7): e100.

Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T & Gordon JI (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*62, 1157–1170.

FAO/WHO. (2004). Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements, Vitamin and mineral requirements in human nutrition: Report of joint FAO/WHO expert consultation; p. 341.

Fasano A, Nataro JP (2004). Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(6): 795-807.

Fiebiger U, Bereswill S, Heimesaat MM (2016). Dissecting the Interplay Between Intestinal Microbiota and Host Immunity in Health and Disease: Lessons Learned from Germfree and Gnotobiotic Animal Models. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 6(4):253-271.

Fischer Walker CL, Black RE (2007). Micronutrients and diarrheal disease. *Clin Infect Dis*; 45 Suppl 1: S73-S77.

Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD (2001). Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroent.* 121(6): 1320-1328.

Goh J, O'Morain CA (2003). Review article: nutrition and adult inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 307-320.

Goldblum SE, Rai U, Tripathi A, Thakar M, De Leo L, Di Toro N, Not T, Ramachandran R, Puche AC, Hollenberg MD, Fasano A (2011). The active ZOT domain (aa 288-293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *FASEB J* 25:144-158.

Gonzalez MR et al. (2011). Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell. Microbiol.* 13, 1026-1043.

Gordon HA, Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E (1963). Effects of microbial flora on cardiac output and other elements of blood circulation. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 1 14:301-4.

Gumbiner B (1987). Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 253:C749-758.

---

Günzel D et al. (2006). Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 290, R1496–507.

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* 122:1507-1517.

Gupta M, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS (2014). Zinc Therapy in Dermatology: A Review. *Dermatol Res Pract.* 2014:709152.

Guttman JA, Finlay BB (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta* 1788:832-841.

Hambidge KM (1992). Zinc and diarrhea. *Acta Paediatr Suppl* 381: 82-86.

Hardy SP, Denmead M, Parekh N & Granum PE (1999). Cationic currents induced by *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in human intestinal CaCO-2 cells. *J Med Microbiol.* 48(3), 235-43.

Heiskala M, Peterson PA, Yang Y (2001). The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2(2): 93-98.

Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter JF, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter A, Burgel 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. *Gastroent.* 129(2): 550-64.

Hering NA, Fromm M, Schulzke JD (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* 590:1035-1044.

Herlax V, Bakas L (2007). Fatty acids covalently bound to alpha-hemolysin of *Escherichia coli* are involved in the molten globule conformation: implication of disordered regions in binding promiscuity. *Biochemistry.* 46:5177–5184.

Herlax V, Maté S, Rimoldi O, Bakás L (2009). Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. *J Biol Chem.* 284:25199–25210.

Hollander D (1999). Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 1(5): 410-416.

Hoque KM, Rajendran VM, Binder HJ (2005). Zinc inhibits cAMP-stimulated Cl secretion via basolateral K-channel blockade in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G956-G963.

Horowitz RE, Bauer H, Paronetto F, Abrams GD, Watkins KC, Popper H (1964). The response of the lymphatic tissue to bacterial antigen. Studies in germfree mice. *Am J Pathol* 44:747–761.

Hutto DL & Wannemuehler MJ (1999). A comparison of the morphologic effects of *Serpulina hyodysenteriae* or its beta-hemolysin on the murine cecal mucosa. *Vet Pathol.* 36, 412–22.

Iacovache I, Bischofberger M & van der Goot FG (2010). Structure and assembly of pore-forming proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 241–246.

---

Inagaki H, Suzuki T, Nomoto K. & Yoshikai Y (1996). Increased susceptibility to primary infection with *Listeria monocytogenes* in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin+ CD44+ T cells in sites of inflammation. *Infect. Immun.* 64, 3280–3287.

Institute of Medicine (2002). Dietary reference intakes: vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Food and Nutrition Board. Washington, D.C.: National Academy Press.

Javier RT, Rice AP (2011). Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J Virol* 85:11544-11556.

John LJ, Fromm M, Schulzke JD (2011). Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal* 15:1255-1270.

Jumpertz T, Chervaux C, Racher K, Zouhair M, Blight MA, Holland IB, Schmitt L (2010). Mutations affecting the extreme C terminus of *Escherichia coli* haemolysin. A reduced haemolytic activity by altering the folding of the toxin. *Microbiology* 156, 2495–2505.

Kagan BL (2012). Membrane pores in the pathogenesis of neurodegenerative disease. Review. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 107, 295-325.

Kaper JB, Nataro JP & Mobley HL (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2): 123-40.

Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L & Raz E (2005). Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 115(3): 695-702.

Kiesslich R, Duckworth CA, Moussata D, et al. (2012). Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut.* 61(8):1146–1153.

Kiesslich R, Goetz M, Angus EM, et al. (2007). Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology.* 133(6):1769–1778.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6).

Kojima T, Murata M, Go M, Spray DC, Sawada N (2007). Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J Membr Biol* 217:13-19.

Kondoh M, Imada N, Kamada K, Tsukahara R, Higashimoto M, Takiguchi M, Watanabe Y, Sato M (2003). Property of metallothionein as a Zn pool differs depending on the induced condition of metallothionein. *Toxicol. Lett.* 142: 11-18.

Krebs NF (2000). Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 130:1374S-1377S.

Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD & Hegel U (1991). Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261:C574-582.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar

- 
- S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009). Classification of cell death. *Cell Death Differ.* 16(1): 3-11.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7:356–361.
- Larsen, C. K. et al. (2011). Python erythrocytes are resistant to  $\alpha$ -Hemolysin from *Escherichia coli*. *J Membr Biol* 244, 131-140.
- Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292(5522): 1722-1725.
- Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ (1997). Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br. J. Surg.* 84(10): 1340-1350.
- Leshner S, Walburg HE Jr, Sacher GA Jr (1964). Generation cycle in the duodenal crypt cells of germ-free and conventional mice. *Nature* 202:884–886.
- Li F, Abuarab N, Sivaprasadarao (2016). Reciprocal regulation of actin cytoskeleton remodelling and cell migration by  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ : role of TRPM2 channels. *J Cell Sci* 129:2016-2029.
- Linhartová I, Bumba L, Mašín J, et al. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev.* 34:1076–1112.
- Liu JZ et al. (2012). Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances salmonella growth in the inflamed gut. *Cell Host & Microbe.* 3, 227-239.
- Lönnerdal B (2000). Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *J. Nutr.* 130: 1378S—1383S
- Los FCO, Randis TM, Aroian RV, Ratner AJ (2013). Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. 77 no. 2 173-207.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK & Knight R (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489(7415): 220-30.
- Maiers JL, Peng X, Fanning AS, Demali KA (2013). ZO-1 recruitment to alpha-catenin – a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions. *J Cell Sci* 126:3904-3915.
- Malovrh P, Sepc̃ IC´ K, Turk T & Mac̃ EK P (1999). Characterization of hemolytic activity of 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 124, 221-226.
- Martinez-Medina M, Aldegue X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ & Darfeuille-Michaud A (2009). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 15(6): 872-82.

- 
- McKay DM (1999). intestinal inflammation and the gut microflora. *Can. J. Gastroenterol.* 13(6): 509-516.
- Meshn JC, Sacquet E, Guenet JL (1973). Action de la flore bacterienne sur la morphologie et la surface de la muguese de l'intestine grele du rat. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13:203-14.
- Mestre MB & Colombo MI (2012). Staphylococcus aureus promotes autophagy by decreasing intracellular cAMP levels. *Autophagy* 8, 1865–1867.
- Mestre MB & Colombo MI (2013). Autophagy and toxins: a matter of life or death. *Curr. Mol. Med.* 13, 241–251.
- Mitic LL, Anderson JM (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 121-142.
- Miyoshi Y, Tanabe S & Suzuki T (2016). Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occluding expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 311, 105-116.
- Moayeri M, Welch RA (1994). Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the Escherichia coli hemolysin. *Infect Immun.* 62:4124–4134.
- Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C (2010). Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res.* 70, 1225-1235.
- Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA (2004). Enteropathogenic Escherichia coli infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 6:783-793.
- Naseem R, Wann KT, Holland IB, Campbell AK (2009). ATP regulates calcium efflux and growth in E. coli. *Journal of Molecular Biology* 391, 42–56.
- Nava P, Lopez S, Arias CF, Islas S, Gonzalez-Mariscal L (2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci* 117:5509-5519.
- Nowak JE, Harmon K, Caldwell CC, and Wong HR (2012). Prophylactic zinc supplementation reduces bacterial load and improves survival in a murine model of sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 13(5): e323–e329.
- Nowak JS & Wong HR (2011). Novel therapeutic agents in pediatric sepsis - zinc. *The Open Inflammation Journal.* 4:107–111.
- Nuttal GHF, Thierfelder H (1895-1896). Thierisches Leben ohne Bacterienim Verdauungskanal. *Z. Physiol. Chem.* 21 : 1 09-2.
- Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S (2003). Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J. Surg. Res.* 115(1): 18-23.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003). Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Review Mol. cell bio. Nature* 4, 552-564.

- 
- Ostolaza H, Bakás L, Goñi FM (1997). Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* alpha-haemolysin. *J Membr Biol.* 158:137–145.
- Ostolaza H, Soloaga A, Goni FM (1995). The binding of divalent cations to *Escherichia coli* alpha-haemolysin, *Eur. J. Biochem.* 228:39–44
- Pha K & Navarro L (2016). *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J Biol Chem.* 7(1): 1–13.
- Porter KG, McMaster D, Elmes ME, Love AH(1977). Anaemia and low serum-copper during zinc therapy. *Lancet* 2: 774.
- Powell DW (1981). Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241(4): 275-288.
- Prasad AS, Brewer GJ, Schoomaker EB, Rabbani P (1978). Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *JAMA* 240:2166-2168.
- Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powel RM, Macdonald TT, Collins JE (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* 85(9): 1139-1162.
- Prevarskaya N, Skryma, Shuba Y (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* 11, 609-618.
- Qadir MI, Arshad A, Ahmad B (2013). Zinc: Role in the management of diarrhea and cholera. *World J Clin Cases* 1:140-142.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam A et al. (2010). Human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285): 59-65.
- Raimondi F et al. (1995). Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. *Gastroenterology* 109, 381–6.
- Richter JF (2007). Charakterisierung bakterieller Translokation am Kolonepithelmodell - Induktion von focal leaks durch *E.coli*-alpha-Hämolysin. Doktorarbeit, FU Berlin, Charité - Universitätsmedizin Berlin
- Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R (2013). Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci.* 2013 Feb; 18(2): 144–157.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 123:1913-1921.
- Round JL & Mazmanian SK (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 313-323.
- Sánchez-Magraner L, Cortajarena AL, García-Pacios M, et al. (2010). Interdomain Ca<sup>2+</sup> effects in *Escherichia coli* alpha-haemolysin: Ca<sup>2+</sup> binding to the C-terminal domain stabilizes both C- and N-terminal domains. *Biochim Biophys Acta.* 1798:1225–1233.
- Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ (1990). Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroent.* 99(1): 97-105.

- 
- Sargeant HR, McDowall KJ, Miller HM, Shaw MA (2010). Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: Transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. *Vet Immunol Immunopathol* 137: 120-129.
- Sartor RB (2003). Targeting enteric bacteria in treatment of inflammatory bowel diseases: why, how, and when. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 19(4): 358-365.
- Schürmann G, Brüwer M & Senninger N (1999). Ulcerative colitis: fate of pediatric ileoanal pouches. *Z Gastroenterol.* 37(9), 987-9.
- Seve M, Chimienti F, Favier A (2002). Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathol Biol (Paris)* 50: 212-221
- Simon GL, Gorbach SL (1986). The human intestinal microflora. *Dig. Dis. Sci.*31(9): 147-162.
- Skals M et al. (2010). Escherichia coli  $\alpha$ -hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via KCa3.1 and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure. *J Biol Chem.* 285, 15557-15565.
- Skals M et al. (2014). Bacterial RTX toxins allow acute ATP release from human erythrocytes directly through the toxin pore. *J Biol Chem.* 289, 19098-19109.
- Skals MG, Jorgensen NR, Leipziger J & Praetorius H A (2009).  $\alpha$ -hemolysin from Escherichia coli uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 4030-4035.
- Skrovanek S, DiGuilio K, Bailey R, Huntington W, Urbas R, Mayilvaganan B, Mercogliano G, Mullin JM (2014). Zinc and gastrointestinal disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5(4): 496-513.
- Smale S, Bjarnason I (2003). Determining small bowel integrity following drug treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56(3): 284-291.
- Smith HW (1963). The haemolysins of Escherichia coli. *J Pathol Bacteriol.* 85: 197-211.
- Smith YC, Rasmussen SB, Grande KK, Conran RM & O'Brien AD (2008). Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun.* 76, 2978-90.
- Soloaga A, Veiga MP, García-Segura LM, Ostolaza H, Brasseur R, Goñi FM (1999). Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol.* 31:1013–1024.
- Song ZH et al. (2015). Diosmectite-zinc oxide composite improves intestinal barrier restoration and modulates TGF- $\beta$ 1, ERK1/2, and Akt in piglets after acetic acid challenge. *J Anim Sci.* 93(4), 1599-607.
- Songserm T et al. (2002). Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combinations of reovirus, Escherichia coli, and treated homogenates obtained from broilers. *Avian Dis.* 46, 87–94.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y & Tsukita S (1999). "Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction

---

strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier." *J Cell Biol* 147(1): 195-204.

Stanley P, Packman LC, Koronakis V, Hughes C (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science*. 266:1992–1996.

Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C (2006). Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol* 80: 1-9.

Stein J, Bolder U (2000). Intestinale Funktionen beim kritisch kranken Patienten, *Chir. Gastroenterol.* 16(1): 13-22.

Sturniolo GC, Di Leo V, Ferronato A, D'Odorico A, D'Inca R (2001). Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 7: 94-98.

Sturniolo GC, Fries W, Mazzon E, Di Leo V, Barollo M, D'inca R (2002). Effect of zinc supplementation on intestinal permeability in experimental colitis. *J Lab Clin Med* 139:311-315.

Surjawidjaja JE, Hidayat A, Lesmana M (2010). Growth inhibition of enteric pathogens by zinc sulfate: an in vitro study. *Med Princ Pract* 13: 286-289.

Taylor MC, Demayo A, Taylor KW, and Brungs WA (1982). Effects of zinc on humans, laboratory and farm animals, terrestrial plants, and freshwater aquatic life. *Critical Reviews In Environmental Control* Vol. 12 , Iss. 2.

Tennant B, Reina-Guerra M, Harrold D (1971). Influence of microorganisms on intestinal absorption. *Ann. NY Acad. Sci* 176:262-72.

Thomas S , Holland B , Schmitt L (2014). The Type 1 secretion pathway — The hemolysin system and beyond. *BBA - Molecular Cell Research* 1843, 8: 1629–1641.

Thompson GR & Trexler PC (1971). Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* 12:230–235.

Tian D, Jacobo SMP, Billing D, Rozkalne A, Gage SD, Anagnostou T, Pavenstädt H, Hsu H-H, Schlondorff J, Ramos A, Greka A (2010). Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci. Signal.* 3, ra77.

Troeger H, Richter JF, Beutin L, Günzel D, Dobrindt U, Epple HJ, Gitter AH, Zeitz M, Fromm M & Schulzke JD (2007). *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. *Cell Microbiol* 9(10): 2530-2540.

Tsai F-C, Seki A, Yang HW, Hayer A, Carrasco S, Malmersjö S, Meyer T (2014). A polarized Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat. Cell Biol.* 16, 133-144.

Tubek S (2007). Selected zinc metabolism parameters in premenopausal and postmenopausal women with moderate and severe primary arterial hypertension. *Biol Trace Elem Res.* 116:249–56.

Uhlén P et al. (2000). Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 405, 694-7.

- 
- Unger CC, Salam SS, Sarker MS, Black R, Cravioto A, El Arifeen S (2014). Treating diarrhoeal disease in children under five: the global picture. *Arch Dis Child* 99: 273-278.
- Ussing HH, Zerahn K (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23:110-127.
- Valenzano MC, DiGiulio K, Mercado J, Teter M, To J, Ferraro B, et al. (2015). Remodeling of Tight Junctions and Enhancement of Barrier Integrity of the CACO-2 Intestinal Epithelial Cell Layer by Micronutrients. *PLoS ONE* 10(7): e0133926.
- Valeva A, Siegel I, Wylenzek M, et al (2008). Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation. *Biol Chem.* 389:1201–1207.
- Vejborg RM, Hancock V, Petersen AM, Krogfelt KA & Klemm P (2011). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* 12: 316.
- Viswanathan VK, Hodges K & Hecht G (2009). Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. *Nature Reviews Microbiology* 7, 110-119.
- Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song L-S, Cheng H (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457, 901-905.
- Weitzel G (1956). *Chemie und Physiologie biogener Zink-Verbindungen*. *Angewandte Chemie* 68:566-573.
- Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L (1997). The immunobiology of zinc. *Immunol Today* 18: 519-521
- Wells CL (1990). Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 87–93.
- Wells CL, Maddaus MA & Reynolds CM (1987). Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria. *Infect. Immun.* 55: 2689–2694.
- WHO. (2006) *Implementing the new recommendations of the clinical management of diarrhoea*. Geneva: World Health Organization.
- Wiles TJ & Mulvey MA (2013). The RTX pore-forming toxin  $\alpha$ -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiol.* 8: 73–84.
- Wiles TJ et al. (2008). Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell* 19, 1427–38.
- Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E (1959). Development of cecal distension in germfree baby rats. *Am. J. Physiol.* 197:1345-46.
- Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E (1979). Thyroid hormones in older germfree rats and mice. *Fed. Proc.* 38: 1030 (Abstr. 4243).
- Wu Z, Nybom P, Sundqvist T & Magnusson KE (1998). Endogenous nitric oxide in MDCK-I cells modulates the *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease (HA/P)-mediated cytotoxicity. *Microb Pathog* 24(5): 321-326.

---

Yang S, Yixue X, Xin L, Ping W, Libo L (2008). Effects of acute exposure to aluminum on blood-brain barrier and the protection of zinc. *Neurosci. Lett.* 445(1):42-6.

Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R & Gordon, JI (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486(7402): 222-7.

Zasloff M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389-95.

Zeissig S, Bojarski C, Buergel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2004). Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 53(9): 1295- 1302.

Zeng Z, Inoue K, Sun H, Leng T, Feng X, Zhu L, Xiong Z-G (2015). TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C308-C318.

Zhang Y, Lee B, Thompson M, Glass R, Cama RI, Figueroa D, Gilman R, Taylor D, Stephenson C (2000). Lactulose-mannitol intestinal permeability test in children with diarrhea caused by rotavirus and cryptosporidium. Diarrhea Working Group, Peru. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31: 16-21.

---

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeit

**Wiegand S** (2011) In Vivo-Analyse des Fingerphänotyps der Noggin-Mausmutante. Diploma thesis, Biology, Max-Planck-Institute of Molecular Genetics, Berlin

### Journal

**Wiegand S**, Zakrzewski SS, Eichner M, Schulz E, Günzel D, Pieper R, Rosenthal R, Barmeyer C, Bleich A, Dobrindt U, Schulzke J-D, Bücker R (2017). Zinc treatment is efficient against *Escherichia coli*  $\alpha$  haemolysin-induced intestinal leakage in mice. Scientific report (unter Begutachtung).

Hering NA, Luettig J, Krug SM, **Wiegand S**, Gross G, van Tolc EA, Schulzke J-D, Rosenthal R (2017). Lactoferrin protects against intestinal epithelial barrier dysfunction caused by inflammation or infection. ANYAS (eingereicht).

Bücker R, Schulz E, Günzel D, Bojarski C, Lee IM, John LJ, **Wiegand S**, Janssen T, Wieler LH, Dobrindt U, Beutin L, Ewers C, Fromm M, Siegmund B, Troeger H, Schulzke JD (2014).  $\alpha$ -Haemolysin of *Escherichia coli*: a potentiator of inflammatory activity in the colon. Gut 63, 1893–1901.

### Abstract/ Vortrag/ Poster

**Wiegand S**, Eichner M, Schulz E, Rosenthal R, Günzel D, Pieper 2, Bleich A, Dobrindt U, Schulzke JD, Bücker R (2016). Zinc treatment is efficient against *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin-induced intestinal leakage. Retreat der Gastroenterologie der Charité, Potsdam.

**Wiegand S**, Zakrzewski S, Fromm M, Schulzke JD, Bücker R (2012) Characterization of pathogenicity by *Campylobacter lari* & *Campylobacter coli* on intestinal epithelial cells. Abstract Mini Symposium “Biology of Nutrition” SFB 852: 29-30.

**Wiegand S**, Rosenthal R, Hering N, Fromm M, Schulzke JD, Bücker R (2013) Effects of probiotics and feed additives on epithelial barrier function and characterisation of pathogenicity of *Campylobacter spp.* Abstract Mini Symposium “Biology of Nutrition” SFB 852: 30-31

---

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Menschen bedanken, die zur erfolgreichen Umsetzung dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Klinischen Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin anfertigen zu können. Vielen Dank für die vielen Hinweise und Ideen zur Verbesserung dieser Arbeit. Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Roland Bücken, der mir die Möglichkeit geboten hat dieses interessante Dissertationsthema zu bearbeiten und mich fortwährend betreut und unterstützt hat. Für die Finanzierung und Bereitstellung der Forschungsmittel möchte ich mich beim Sonderforschungsbereich (SFB) 852, der Charité und der Sonnenfeldstiftung bedanken. Einen großen Dank auch an Dr. Rita Rosenthal für ihre ständige Bereitschaft zu konstruktiven Anregungen und kreativen Diskussionen. In Fah-Maria Lee danke ich für die hervorragende technische Assistenz und hilfsbereite Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinischen Physiologie bedanken für die freundliche Aufnahme, die kollegiale Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken für ihr bedingungsloses Vertrauen und die unermüdliche Unterstützung, auf die ich immer zählen kann.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf erscheint aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht in der Online-Version dieser Arbeit.

Der Lebenslauf erscheint aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht in der Online-Version dieser Arbeit.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit lag bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vor.

Berlin, den

---

Stephanie Wiegand