

Aus dem Charité Centrum 13
Med. Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
(einschl. Ernährungsmedizin)
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Zeitz

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Innere Medizin

Einfluss der epithelialen Apoptose auf die
Barrierefunktion im physiologischen und entzündlich
veränderten intestinalen Epithel

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Christian Bojarski
Berlin

Eingereicht: September 2011
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus F. Neurath, Erlangen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler, Zürich

Der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift liegen folgende 5 Arbeiten zugrunde:

2001

- Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, Fromm M, Schulzke JD. Permeability of HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *Journal of Physiology (London)* 2001; 535(2): 541-552

2002

- Bürgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002; 123 (2): 433-443

2004

- Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke JD, Florian P, Fromm M, Tauber R, Huber O. The specific fate of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 2097-2107
- Zeissig S*, Bojarski C* (*geteilte Erstautorenschaft), Bürgel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by TNF α antibody treatment. *Gut* 2004; 53: 1295-1302

2005

- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter JF, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129 (2): 550-564

Abkürzungen:

Annexin V	Synonym: Annexin 5, zelluläres Protein
aPKC	atypische Proteinkinase C
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1,
BAX, BAK	pro-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie
Bcl-2, Bcl-xL	anti-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie
Bcl-2	B-Zell Lymphom-2, Protein, gleichnamige Proteinfamilie
Caco-2	humane Kolonkarzinomzelllinie
Caspase	Cysteinyl-Aspartat Spezifische Protease, Zysteinprotease, die bei Apoptose C-terminal von Aspartat spaltet
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff
DISC	death-inducing signaling complex, Komplex aus Todesrezeptor/Ligand
EPEC	enteropathogene Escherichia coli
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAS	Fas-Rezeptor (FasR), Todesrezeptor, Synonyme: CD95, Apo-1, TNFRsf6 (TNF receptor superfamily, member 6)
FACS	fluorescence activated cell sorting, durchflusszytometrisches Verfahren
FITC	Fluorescein Isothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FLICE	zu Caspase-8 homologes Protein
GvHD	Graft-versus-Host Disease
FLIP	FLICE-inhibitory protein, anti-apoptisches Protein
HT-29/B6	humane Kolonkarzinomzelllinie, die hohe transepitheliale Widerstände ausbildet
IL-13	Interleukin-13
JAM	Junctional Adhesion molecule, Protein der <i>Tight Junctions</i>
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney, Zelllinie aus der Hundeniere
MLCK II	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase II, Enzym, das in der aktivierten Form ATP spaltet und die leichte Kette des Myosins phosphoryliert
NF-κB	Nukleärer Faktor-kappa-B, Transkriptionsfaktor
p53	Protein, das in vielen entarteten Zellen erhöht ist und in vielen Tumoren als Tumorsuppressor fungiert
PARP-1	Poly [Adenosindiphosphat-Ribose] Polymerase 1, Enzym, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist
PEG	Polyethylenglycol, in der Pharmazie als Macrogol bezeichnet
RIP-1	Receptor-Interacting Protein 1,
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAMP	TNF receptor-related apoptosis-mediating protein
TUNEL	Terminal Desoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling, Färbemethode zur Darstellung von Zellkernen bei Apoptose
VACO-330	humane Kolonadenomzelllinie
ZO-1/ZO-2	Zonula Occludens-1/-2, Proteine der <i>Tight Junctions</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1	Struktur und Funktion der <i>Tight Junction</i> Proteine.....	6
1.2	Regulation von <i>Tight Junction</i> Proteinen	7
1.3	Degradation von <i>Tight Junction</i> Proteinen.....	8
1.4	<i>Tight Junction</i> Proteine bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	9
1.5	Bedeutung der epithelialen Apoptose für die Erhaltung der Barrierefunktion	10
1.6	Regulation von Apoptose im intestinalen Epithel.....	11
1.7	Nachweismethoden von Apoptose im intestinalen Epithel.....	12
2.	Ergebnisse.....	14
2.1	Einfluss von Apoptose auf die epitheliale Barriere	14
2.2	Degradation von <i>Tight Junction</i> Proteinen bei Apoptose	15
2.3	Herabregulation von Apoptose bei Morbus Crohn nach TNF- α Antikörpertherapie	16
2.4	Mechanismen der Diarrhöentstehung bei kollagener Kolitis.....	17
2.5	Interleukin-13 beeinflusst die epitheliale Apoptose bei Colitis ulcerosa	18
3.	Diskussion.....	19
3.1	Apoptose im physiologischen und entzündlich veränderten intestinalen Epithel.....	19
3.2	Funktionelle Bedeutung einer veränderten Apoptose auf die intestinale Barrierefunktion	21
3.3	Veränderungen der <i>Tight Junctions</i> durch epitheliale Apoptose.....	23
3.4	Ausblick: In vivo Diagnostik von Apoptose durch Endomikroskopie	24
4.	Zusammenfassung.....	27
5.	Literatur	29
6.	Danksagung	35
7.	Erklärung	36

1. Einleitung

Fortschritte in der Diagnostik und Therapie entzündlicher Darmerkrankungen basieren auf dem Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen. In diesem Zusammenhang stehen Proteine der *Tight Junctions* im Mittelpunkt, da sie apikale Zell-Zellkontakte ausbilden und eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion spielen. Apoptose im humanen intestinalen Epithel ist bis zu einem gewissen Grad physiologisch und trägt bei entzündlichen Erkrankungen zu Störungen der epithelialen Barriere bei. Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift beginnt mit Forschungsarbeiten zum Einfluss von Apoptose auf die intestinale Barrierefunktion. In den ersten Arbeiten wurden dabei die Auswirkungen verschiedener pro-apoptotisch wirkender Substanzen auf die Proteine der *Tight Junctions* und deren direkter Einfluss auf die epitheliale Barrierefunktion im Zellkulturmodell genauer untersucht. Die funktionelle Relevanz dieser Experimente zeigte sich im Nachweis einer erhöhten epithelialen Apoptoserate bei akutem Morbus Crohn, nach Gabe von TNF- α Antikörpern bildete sich die Apoptose zurück auf physiologische Werte. Die Pathomechanismen der kollagenen Kolitis, die zum Hauptsymptom der wässrigen Diarrhö beitragen, sind bis heute nicht vollständig verstanden. Nach den vorliegenden Daten spielt die Apoptose des intestinalen Epithels bei dieser seltenen Ursache der Diarrhö jedoch keine entscheidende Rolle. Interleukin-13 ist eines der zentralen Zytokine der Th2-Immunantwort und hat ebenfalls direkte Auswirkungen auf die Proteine der *Tight Junctions*. Interleukin-13 führt darüber hinaus dosisabhängig zu einer erhöhten Apoptoserate im Zellkulturmodell. Daraus lässt sich folgern, dass neben dem Morbus Crohn auch bei der Colitis ulcerosa die Beeinträchtigung der Barrierefunktion durch Apoptose zumindest teilweise mitverursacht wird.

1.1 Struktur und Funktion der *Tight Junction* Proteine

Durch die Elektronenmikroskopie war es erstmals möglich, die strukturellen Bestandteile der Zell-Zellkontakte genauer zu charakterisieren, dabei identifizierten Farquhar & Palade *Tight Junctions*, Adherens Junctions und Desmosomen [1]. *Tight Junctions* sind komplex aufgebaute Zellkontaktstrukturen epithelialer und endothelialer Zellen. Sie sind als strukturelle Komponenten nicht nur an der Aufrechterhaltung einer epithelialen Barriere beteiligt, sondern fungieren als wichtige Bindungsstelle für eine steigende Zahl von zytoplasmatischen Proteinen, die eng mit den *Tight Junctions* assoziiert sind. *Tight Junction*-Proteine/Komponenten sind Zielstrukturen verschiedener regulatorischer Proteine und darüber hinaus an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Am Aufbau der *Tight Junctions* sind neben den „Tight Junction-assoziierten Marvel Proteinen“ Occludin, Tricellulin und Marvel3D die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sowie die „junctional adhesion molecules“ (JAMs) und die Claudine beteiligt, von denen bislang 24 „Familienmitglieder“ identifiziert wurden [2-5]. In den letzten Jahren sind vor allem weitere wichtige Erkenntnisse über die Funktion einzelner Claudine veröffentlicht worden. Danach lassen sich diese Proteine in zwei große Gruppen entsprechend ihres Effektes auf die Erhaltung der Barrierefunktion einteilen: Die Claudine-1, -3, -4, -5, -8, -11, -14 und -19 tragen eher zu einer Stabilisierung der Barriere bei, Claudin-2 und -10 führen als Porenbildner zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität [6]. Occludin und die Claudine bilden im Gegensatz zu den JAMs sogenannte *Tight Junction*-strands (= elektronenmikroskopisch sichtbare Strukturen, am ehesten den Loop-Domänen entsprechend) aus [7]. Die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sind auf der zytoplasmatischen Seite mit Occludin und Claudinen assoziiert und ZO-1/ZO-2 fungieren als „Linker“ zwischen dem Aktinzytoskelett und Occludin sowie den Claudinen [8] und interagieren eng mit einer großen Zahl von membranären Ionenkanälen und Transportern [9].

Die *Tight Junctions* erfüllen in polarisierten Epithelien zwei Hauptfunktionen: Sie tragen erstens über ihre „Fence“-Funktion zur Erhaltung der Zellpolarität bei. Dabei verhindern sie, dass apikale Membranproteine wie der Na⁺/K⁺-Transporter durch laterale Diffusion in der Plasmamembran in die basolaterale Domäne wandern können. Durch ihre „Gate“-Funktion (Synonym: Barrierefunktion) sorgen *Tight Junctions* zweitens für eine Trennung von Soluten und „dichten“ den Interzellularspalt gegenüber dem Darmlumen ab, dadurch übernehmen sie eine wichtige Rolle z. B. für die Erhaltung der intestinalen Barriere und der Transportregulation. Unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, kommt es u. a. als Folge von Veränderungen der *Tight Junctions* zu einer intestinalen Barrierschädigung [7, 10]. Mit Interleukin-13 wurde ein für

die Entstehung des Barrieredefekts bei Colitis ulcerosa zentrales Zytokin identifiziert [11]. Infektiöse Erkrankungen wie Lambliasis oder Norovirus-Infektion beeinflussen die epitheliale Barrierefunktion über eine Herabregulierung einzelner *Tight Junction*-Proteine einhergehend mit einer Erhöhung der epithelialen Apoptose. Diese Prozesse begünstigen die Entstehung der sog. „Leck-flux“-Diarrhö [12, 13].

1.2 Regulation von *Tight Junction* Proteinen

Mittlerweile sind wichtige, *Tight Junctions* regulierende Proteine und deren Bedeutung für die Organisation der *Tight Junctions* identifiziert. Es lassen sich dabei Proteine charakterisieren, die sowohl vom Zellinneren in Richtung auf den *Tight Junction* Komplex (inside-out) als auch vom *Tight Junction Komplex* in Richtung auf das Zellinnere (outside-in) gerichtet sind [14].

Zu den „inside-out“ signalisierenden Proteinen gehören u. a. Proteinkinase A, heterotrimere G-Proteine (z. B. $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{12}$), Mitglieder der Proteinkinase C-Familie, GTPasen aus der Rho Familie sowie FAK. Über die Rolle der Proteinkinase A gibt es in der Literatur teilweise gegensätzliche Daten. Über die Beteiligung von G-Proteinen dagegen gibt es inzwischen gesicherte Hinweise. Diese haben gezeigt, dass durch Bindung von $G\alpha_{12}$ an ZO-1 die parazelluläre Leitfähigkeit gesteigert werden kann [15]. In einer weiteren Arbeit konnte von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass an diesem Prozess Src Tyrosinkinasen beteiligt sind [16]. Zur Gruppe der Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen zählt auch die „focal adhesion kinase“ (FAK), neben ihren bekannten Funktionen bei der Regulation zellulärer Prozesse wie beispielsweise Zellmigration, -proliferation und -überleben wurde insbesondere im Kolon kürzlich auch eine zentrale Bedeutung der FAK während der mukosalen Wundheilung beschrieben [17]. Ferner sind sowohl die atypischen Proteinkinasen C [aPKCs; PKC ζ , λ and PRK (PKC-related kinases)], als auch GTPasen der Rho-Familie an der Regulation von *Tight Junction* Proteinen beteiligt. aPKCs bilden mit den sog. PAR-Proteinen (v. a. PAR3 und PAR6) einen Komplex, regulieren dadurch den Aufbau und Zusammenbau der *Tight Junctions* und unterstützen die Ausbildung der Zellpolarität [18]. Die Identifizierung von weiteren an der *Tight Junction* Regulation beteiligten Effektorproteinen der Rho-GTPasen steht im Mittelpunkt derzeitiger Forschungsarbeiten [19]. Kürzlich erst konnte gezeigt werden, dass das Protein p114RhoGEF den Signalweg von RhoA aktiviert und damit ein wichtiger Regulator der *Tight Junction*-Funktion zu sein scheint [20].

Darüber hinaus ist bekannt, dass die p160ROCK/Rho-Phosphorylierung des C-Terminus von Occludin dessen Interaktion mit dem Aktinzytoskelett und damit selektiv die parazelluläre Leitfähigkeit beeinflussen kann [21].

Zu den „outside-in“ signalisierenden Proteinen gehört beispielsweise das Crumbs Protein, ein Mitglied einer Familie von hoch konservierten Proteinen, von denen als einziges Protein bislang Crumbs 3 in epithelialen Zellen zu finden ist. Es lokalisiert entlang der apikalen Zellmembran und steht damit in enger Beziehung zu *Tight Junctions* [22]. Von den Effektorproteinen des Ras-Signalweges sind Raf-Kinasen und Afadin/AF-6 mit *Tight Junctions* assoziiert [23]. *Tight Junctions* beeinflussen ferner die Regulation der Genexpression, Proliferation und Differenzierung. Dies belegen z. B. Experimente, bei denen Proteine der *Tight Junctions* durch Mutagenese verändert wurden. Durch mutiertes ZO-1 oder inhibierende Peptide gegen die extrazelluläre Domäne von Occludin konnte eine partielle Dedifferenzierung erreicht werden [24].

1.3 Degradation von *Tight Junction* Proteinen

Verschiedene pathologische Veränderungen des Gastrointestinaltraktes führen zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere mit direkter oder indirekter Auswirkung auf den Zusammenhalt der *Tight Junction*-Proteine. Fragmentation und Degradation von Proteinen der *Tight Junctions* sind bereits vor mehr als 10 Jahren durch unterschiedliche Mechanismen beschrieben. So wurde nach Inhibition von Tyrosinphosphatasen durch Phenylarsinoxid in Endothelzellen die Entstehung eines proteolytischen 50 kDa Fragments von Occludin beobachtet. Nach Zugabe des Metalloproteinaseinhibitors Phenantrolin wurde dieser proteolytische Abbau gehemmt [25]. Die extrazellulären Loops des Transmembranproteins Occludin können Zielstruktur für Serin- und Cysteinproteasen sein und zu einem Verlust der Integrität von Occludin und Claudin-1 führen [26]. Das Allergen *Derp1* der Hausstaubmilbe z. B. führt zu einer solchen proteolytischen Spaltung. Dieser Mechanismus kann in respiratorischen Epithelien an der Entstehung von Asthmaerkrankungen beteiligt sein [27]. Ein bislang wenig untersuchtes bakterielles Zytotoxin des Choleraerregers Hemagglutinin/Protease (HA/P) bewirkte in MDCK Zellen die Spaltung von Occludin in zwei Fragmente, ZO-1 bleibt hiervon dagegen unbeeinflusst. Diese Degradation war in Gegenwart eines spezifischen Inhibitors bakterieller Metalloproteasen abgeschwächt [28]. Wir haben im Zellkulturmodell die Spaltung von *Tight Junction*-Proteinen im Rahmen der epithelialen Apoptose im Jahre 2004 erstmals beschrieben [29]. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass nicht alle Proteine der *Tight Junction* während der Apoptose gespalten bzw. degradiert

werden, so konnte mit Claudin-1 ein gegenüber Apoptose recht widerstandsfähiges Protein gefunden werden.

1.4 *Tight Junction* Proteine bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die Symptome Abdominalschmerzen und Diarrhö klinisch führend. Die Integrität der mukosalen Barriere ist durch den chronischen Entzündungsprozess beeinträchtigt, in diesem Zusammenhang stehen die apikal gelegenen Proteine des *Tight Junction*-Komplexes als mögliche Zielstrukturen im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Die Rolle von Occludin für die Erhaltung der Barrierefunktion wird bis heute jedoch kontrovers diskutiert. Ein Grund hierfür ist die Diskrepanz zwischen den zahlreichen *in vitro* Experimenten und der Tatsache, dass bei der Occludin Knock-out-Maus zwar verschiedene phenotypische Veränderungen vorliegen, die Integrität des intestinalen Epithels und damit der Barrierefunktion in diesem Modell jedoch intakt sind [30, 31].

Verschiedene Zellkulturexperimente belegen jedoch den klaren Zusammenhang von Occludin auf die Erhaltung der Barrierefunktion, so konnten bei Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen erhöhte transepitheliale Widerstände gemessen werden [32]. Wenn Occludin durch RNA-Interferenz in seiner Funktion ausgeschaltet wird, so wurde zwar, ebenfalls in MDCK Zellen, eine intakte parazelluläre Permeabilität beobachtet, die Aktivierung der Rho-GTPase RhoA unterblieb jedoch vollständig. Diese Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass Occludin eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung spielt [33].

Die Reduktion bzw. Strangbrüche der mittels Gefrierbruchtechnik elektronenmikroskopisch sichtbaren *Tight Junction*-Stränge bei Colitis ulcerosa [7] und Morbus Crohn [34] belegen, dass die beeinträchtigte intestinale Barriere insbesondere mit einer Herabregulation von Proteinen der *Tight Junctions* einhergeht. Beim Morbus Crohn spielen insbesondere die Zytokine TNF- α und Interferon- γ eine bedeutende Rolle [35]. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Occludin, Claudin-5 und -8 bei Morbus Crohn herabreguliert waren, die Claudin-1 und -4 Expression dagegen unverändert blieb [36]. Auch bei Colitis ulcerosa kommt es zu einer Reduktion der *Tight Junction*-Stränge [7]. Die zugrunde liegenden Regulatoren unterscheiden sich jedoch erheblich von denjenigen bei Morbus Crohn. So konnte mit Interleukin-13 das zentrale Zytokin bei Colitis ulcerosa identifiziert werden. IL-13 führt bei der Colitis u. a. zu einer Hochregulation von Claudin-2 und induziert epitheliale Apoptose mit in der Folge der Entstehung eines Barrieredefektes [11].

1.5 Bedeutung der epithelialen Apoptose für die Erhaltung der Barrierefunktion

Über die Apoptose als wichtigen Schritt in der Zellbiologie wurde erstmals 1972 berichtet [37]. Im Jahre 2002 wurde der Nobelpreis für Medizin und Physiologie an die Forscher Sydney Brenner (geb. 1927), Howard Robert Horwitz (geb. 1947) und John Edward Sulston (geb. 1942) für „ihre Entdeckungen betreffend der genetischen Regulierung der Organentwicklung und programmiertem Zellsterben“ verliehen. Apoptose ist somit ein physiologischer Vorgang und im Gegensatz zur Nekrose, die passiv abläuft, ein aktiver ATP-abhängiger aktiver zellbiologischer Prozess. Für eine Reihe von Erkrankungen sind erhöhte Apoptoseraten beschrieben worden, so beispielsweise für die alkoholtoxische Hepatitis [38] oder die frühe Infektion mit HIV [39], letztere ist u. a. durch das Auftreten eines frühen Barrieredefektes gekennzeichnet. Fast alle nicht chirurgischen Therapien von Tumoren zielen auf die gezielte Auslösung von Apoptose in den Tumorzellen ab.

Der Gastrointestinaltrakt als Organ mit relativ schnell teilender Zellpopulation eignet sich sehr gut für die Erforschung von Apoptosevorgängen. Wir konnten im normalen nicht entzündeten humanen Kolonepithel eine Apoptoserate von 1% ermitteln [40]. In der Literatur findet man Angaben, dass beim Menschen pro Stunde ca. 200 Epithelzellen pro mm^2 abgestoßen werden [41]. Für die Charakterisierung der bei Apoptose zugrundeliegenden Pathomechanismen eignen sich zunächst Versuche in Zellkultursystemen. Im häufig verwendeten Zellkulturmodell HT-29/B6 liegt eine basale Apoptoserate mit 3.5% dagegen erwartungsgemäß höher [42], da es sich hierbei um eine Kolonkarzinomzelllinie handelt, die bereits einer pathologischen Regulierung des Zellzyklus unterliegt. Bei verschiedenen pathologischen Veränderungen ist die Integrität der Barriere des gastrointestinalen Epithels gestört und die Durchlässigkeit für kleinere oder mittelgroße Solute verändert. Als Folge dieser Prozesse kann eine Diarrhö entstehen. Normalerweise werden die winzigen Epitheldefekte, die durch Einzelzellapoptosen entstehen, rasch durch die umgebenden Zellen wieder aufgefüllt. Dennoch lassen sich bereits in der Umgebung von Einzelzellapoptosen lokale Veränderungen der Leitfähigkeit mittels Conductance Scanning messen. Das pro-inflammatorische Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ induzierte im Zellkulturmodell über 50% der Permeabilitätszunahme. Die zweitgrößte Ursache hierfür war die Degradation von *Tight Junction*-Proteinen in der Umgebung des Epitheldefektes [43]. Diese Beobachtungen machen verständlich, warum der klinisch seit Jahren eingesetzte $\text{TNF-}\alpha$ -Blocker Infliximab (Remicade®) bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu einem „mucosal healing“ und damit zu einer frühen Wiederherstellung der Integrität der epithelialen Barriere führt [44]. Neben Apoptose induziert $\text{TNF-}\alpha$ auch physiologisches „Shedding“ einzelner epithelialer Zellen der gastrointestinalen Mukosa. Die zugrunde liegenden Mechanismen zur

Erhaltung der Barrierefunktion sind komplex und im Wesentlichen durch eine Re-Organisation von Occludin und ZO-1 in der Umgebung des Zelldefektes zu erklären [45].

In welcher Weise die Proteine der *Tight Junctions* an der Initialisierung der Apoptosekaskade beteiligt sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Erst kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Inaktivierung von Occludin dieses einen Komplex formiert mit dem extrinsischen Todesrezeptor FAS mit der Folge der Ablösung von apoptotischen Zellen aus dem intakten Monolayer [46].

1.6 Regulation von Apoptose im intestinalen Epithel

Bei der Aktivierung der Apoptose-Kaskade in intestinalen Epithelzellen können zwei unterschiedliche Signalwege unterschieden werden: Eine Aktivierung von Apoptose über den extrinsischen Signalweg erfolgt über die Todesrezeptoren an der Zelloberfläche, der bekannteste Rezeptor ist der CD95-Rezeptor, der zusammen mit weiteren Rezeptoren (z. B. TNF-R1, TRAIL-R1/R2, TRAMP) zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört und bereits 1997 bei der Colitis ulcerosa als möglicher Mechanismus für die Induktion der Barrierefunktionsstörung erstmals beschrieben wurde [47]. Die Aktivierung des CD95-Rezeptors durch seinen Liganden (CD95L) bewirkt die Bildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes, genannt DISC [48]. Zu diesem Signalkomplex gehören noch das FADD sowie die Procaspase-8 [49]. Die Aktivierung eines Todesrezeptor-Ligand-Komplexes führt nicht unwillkürlich zur Aktivierung der Apoptose, beschrieben sind auch anti-apoptotische Eigenschaften. Beispielsweise wurde für den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) gezeigt, dass dieser nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Bildung anti-apoptotischer Proteine wie zum Beispiel FLIP oder Bcl-2 induzieren kann [50]. Das Adaptermolekül TRADD spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle, da es einerseits über FADD den DISC initiieren kann und auf diesem Wege pro-apoptotisch wirkt, auf der anderen Seite aber auch durch die Kinase RIP-1 den NF- κ B aktiviert und damit anti-apoptotische Signale setzt [51, 52]. Die Initiatorcaspasen 8 bzw. 10 bewirken in der Folge die Aktivierung sogenannter Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), die wiederum zur Apoptose führen.

Der intrinsische Signalweg wird über die Proteinfamilie der Bcl-2 Proteine gesteuert und spielt sich überwiegend in den Mitochondrien der Zelle ab, auslösende Faktoren sind „zellulärer Stress“ mit der Folge der Entstehung von DNA-Schäden. Die Perturbation der mitochondrialen Membran durch pro-apoptotische Signale führt zur Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma der Zelle. Dieses bindet an APAF-1 sowie in der Folge an Procaspase-9. Der Komplex von Cytochrom C, APAF-1 und aktivierter Caspase-9 wird Apoptosom genannt analog zur Aktivierung von Caspase-8 im DISC. Über die aktivierte Initiatorcaspase 9 können nun die bekannten Effektorcaspasen (s.o.) aktiviert werden. Eine

Balance der pro-apoptischen Bcl-2 Proteine BAX und BAK mit den anti-apoptischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-xL entscheidet über die Aktivierung von Apoptose oder das Überleben der Zelle. Das humane Tumorsuppressorprotein p53 [53] ist ein Schlüsselprotein für die Regulation des Zellzyklus und die Tumorsuppression. Nach Translokation von p53 in den Zellkern kann die Bildung pro-apoptischer Proteine initiiert werden [54].

1.7 Nachweismethoden von Apoptose im intestinalen Epithel

Apoptose kann auf vielfältige Weise nach Entnahme von Gewebeproben aus dem Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Wir unterscheiden histologische, durchflusszytometrische, proteinbiochemische sowie immunhistochemische Verfahren. Das biochemische Hauptmerkmal der Apoptose ist die Aufspaltung der DNA in 180-200 Basenpaarfragmente [55, 56]. Trägt man Zelllysat auf einem Agarosegel auf und legt eine Spannung an, so lässt sich bei Apoptose die charakterische DNA-Leiter (sog. DNA-laddering) nachweisen. Die DNA-Leiter entsteht dadurch, dass die DNA im Bereich der Nukleosomen vor dem Abbau durch Endonukleasen weitgehend geschützt ist, dagegen können die Bereiche zwischen den Nukleosomen hydrolysiert werden. Bei der Nekrose entsteht dagegen keine DNA-Leiter, sondern ein Schmierfilm von unterschiedlichen Proteinen zufälliger Größe.

Ein sehr einfaches Verfahren zur Detektion der Kernfragmentierung am histologischen Schnitt ist das Färbeverfahren mit dem Farbstoff DAPI, der überwiegend DNA bindet und als einer der am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe gilt. Die DAPI-Färbung ist kostengünstig und daher weit verbreitet. Die DNA-Spezifität des Farbstoffes gilt streng genommen nur für die Emission bei 461 nm (blau).

Mithilfe der TUNEL-Färbung werden ebenfalls die apoptotischen Zellkerne angefärbt, die normalen Zellen bleiben dagegen ungefärbt. Die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) fügt normalerweise Nukleotide an das 3'-terminale Ende der DNA. Im TUNEL Kit werden diese Nukleotide mit Fluoreszenz markiert. Diese Methode wurde erstmals 1992 beschrieben [57]. In den folgenden Jahren wurden geringe Modifizierungen zur Verbesserung der Sensitivität vorgenommen [58].

Poly (ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) ist ein wichtiges DNA-Reparaturenzym. Der proteolytische Abbau von PARP durch die Caspase-3 ist ein zentraler Schritt bei der Apoptose, hierdurch treten Strangbrüche der DNA auf, die bei inaktiver PARP-1 nicht mehr repariert werden können. Ein kommerziell erhältlicher Antikörper detektiert das 89 kDa Spaltfragment von PARP, meist lässt sich begleitend dazu eine Reduktion des Volllängen-Proteins (115 kDa) nachweisen.

Indirekt lässt sich Apoptose auch durch den Einsatz diverser Apoptose-Inhibitoren detektieren. So können Zellen zum Beispiel mit dem Caspase-Inhibitor Z-DEVD-Fluoromethylketon (FMK) behandelt werden. Dieser Inhibitor blockiert die Caspasen-3 und -7, damit ist die typische Spaltstelle der Caspasen, die DEVD-Sequenz, gegenüber pro-apoptischen Substanzen weitgehend geschützt. Eine Reihe weiterer Inhibitoren sind verfügbar, deren Unterschiede in der spezifischen Hemmung anderer pro-apoptischer Enzyme liegen.

Caspasen können durch Kombination eines Antikörpers gegen Caspase mit einem Fluorochrom (z. B. FITC) auch direkt am histologischen Präparat gefärbt werden (Immunhistochemie).

Mittels Durchflusszytometrie können beispielsweise fluoreszenz-markierte Zellen nach Passage eines fokussierten Laserstrahls sortiert und damit separat analysiert werden. Die FACS-Analyse ist mittlerweile ein etabliertes zytometrisches Verfahren. Moderne Zytometriergeräte können bis zu 14 Parameter gleichzeitig analysieren und bis zu 4 zelluläre Subpopulationen gleichzeitig sortieren. Phosphatidylserin befindet sich in der gesunden Zellmembran an der dem Zyoplasma zugewandten Seite der Zelle, während der Apoptose transloziert dieses an die äußere Zellmembran [59]. Durch Markierung dieser Phosphatidylserine mittels FITC-markiertem Annexin V können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch oder histologisch nachgewiesen werden.

2. Ergebnisse

2.1 Einfluss von Apoptose auf die epitheliale Barriere

Die Apoptoserate im menschlichen Kolon liegt bei ca. 1% (s. 2.4). Das Zellkulturmodell HT-29/B6 eignet sich durch Ausbildung transepithelialer Widerstände hervorragend für die Erforschung von physiologischen Eigenschaften der epithelialen Barriere. In diesem Zellkulturmodell konnten wir zeigen, dass die Auslösung von Apoptose durch den Topoisomerasehemmer Camptothecin zu einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg der DNA-Fragmentierung und damit der Apoptoserate führt. Dieser Effekt führt zu einem ebenfalls zeit- und dosisabhängigen Anstieg der epithelialen Leitfähigkeit. Substanzen wie Irinotecan und Topotecan sind Weiterentwicklungen vom Camptothecin und aufgrund besserer Verträglichkeit beim Menschen inzwischen als Chemotherapeutika zugelassen. Die beobachteten physiologischen Effekte des Camptothecins am intestinalen Epithel erklären die während einer Chemotherapie z. B. mit Irinotecan als Nebenwirkung auftretende Diarrhö. In Experimenten in der Ussingkammer konnte die durch Apoptose induzierte Undichtigkeit des epithelialen Layers genauer charakterisiert werden, dabei fand sich eine erhöhte transepitheliale Fluxrate für radioaktiv-markiertes Mannitol (182 Dalton, Da) und Lactulose (244 Da), nicht jedoch für PEG (4000 Da). Mittels der in der Arbeitsgruppe etablierten Methode des Conductance Scanning konnte die lokalisiert über einzelnen Zellen abgeleitete lokale Leitfähigkeit direkt gemessen werden, diese zeigte einen Leitfähigkeitsabfall innerhalb eines Radius von 30 μm um die apoptotische Zelle. Ab einer Apoptoserate von 12% wurde das ehemals mitteldichte Zellepithel HT-29/B6 zu einem sogenannten „lecken“ Epithel und übernahm die Eigenschaft z. B. von Nierenepithelien.

2.2 Degradation von *Tight Junction* Proteinen bei Apoptose

Während der epithelialen Apoptose werden die Proteine der Zell-Zell-Verbindungen auf unterschiedliche Weise degradiert. Bereits zuvor waren Proteine der Adherens Junctions sowie der Desmosomen als Zielproteine von Caspasen identifiziert worden. Da die apikal gelegenen *Tight Junctions* als weitere mögliche Ziele für pro-apoptotische Signale in Frage kamen, lag es nahe, diese Frage in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Zellkulturmodellen experimentell zu bearbeiten. Wir fanden heraus, dass die Transmembranproteine Occludin sowie ZO-1 und ZO-2 durch eine oder mehrere Caspasen fragmentiert bzw. gespalten werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der erste extrazelluläre Loop von Occludin zusätzlich durch eine Metalloproteinase gespalten wird. Dieser Effekt war durch verschiedene Inhibitoren sowie durch Mutageneseexperimente teilweise bzw. vollständig inhibierbar. Die vorgelegten Daten belegten erstmals die Mechanismen und Angriffspunkte pro-apoptotischer Substanzen am *Tight Junction*-Komplex. Entgegen bisherigen Vermutungen, dass während der epithelialen Apoptose grundsätzlich alle Moleküle einem Abbau bzw. einer Spaltung unterliegen, konnte darüber hinaus auch dargelegt werden, dass die Expression von Claudin-1 während der Apoptose sogar ansteigt und dass dieses Protein weitgehend apoptose-resistent ist.

2.3 Herabregulation von Apoptose bei Morbus Crohn nach TNF- α Antikörpertherapie

Die Gabe von TNF- α Antikörpern bei akuter Exazerbation eines Morbus Crohn nach Versagen der klassischen Steroid- oder immunsuppressiven Therapie ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Eine zugrunde liegende Barrierefunktionsstörung beruht auf verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen, u. a. auf einer veränderten Regulation von *Tight Junction*-Proteinen. Bei Patienten mit Morbus Crohn vor und nach einer anti-TNF- α Therapie konnten Biopsien aus dem Colon sigmoideum zeigen, dass die epitheliale Apoptoserate vor der Therapie deutlich erhöht war und sich die Apoptoserate 14 Tage nach Gabe der Antikörper nahezu normalisierte. Die funktionelle Rolle der epithelialen Apoptose auf die Barrierefunktion wurde durch zusätzliche Zellkulturexperimente untermauert. Hierfür wurde die Zelllinie HT-29/B6, eine hohe transepitheliale Widerstände ausbildende Kolonkarzinomzelllinie, nach Gabe von Camptothecin, einem Topoisomerase I-Inhibitor und potentem Induktor von Apoptose, elektrophysiologisch untersucht. Der Abfall des transepithelialen Widerstandes parallel zur Induktion von epithelialen Apoptosen belegte den Grad der funktionellen Beeinträchtigung der epithelialen Barriere.

2.4 Mechanismen der Diarrhöentstehung bei kollagener Kolitis

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen der wässrigen Diarrhö, die das Hauptsymptom der kollagenen Kolitis darstellt, sind bis heute weitgehend ungeklärt. Humane Kolonbiopsien von Patienten mit kollagener Kolitis wurden im Rahmen dieser Arbeit elektrophysiologisch untersucht. Dabei fand sich eine ausgeprägte Erniedrigung des transepithelialen Natrium- und Chloridtransports. Der gemessene Anstieg des Kurzschlussstroms reflektierte die Aktivierung einer aktiven elektrogenen Chloridsekretion. Diese Transportveränderungen wurden von einer Herabregulation von Occludin sowie Claudin-4 begleitet. Eine Beeinträchtigung der epithelialen Apoptoserate fand sich bei Patienten mit kollagener Kolitis nicht. Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich im menschlichen Kolon durch Einsatz zweier etablierter Färbetechniken (TUNEL-Assay und DAPI-Färbung) histologisch eine physiologische Apoptoserate von ca. 1% ermitteln. Aufbauend auf den bislang überwiegend in Zellkulturexperimenten herausgearbeiteten Daten bestätigt diese Arbeit die bereits zuvor ermittelte Apoptoserate von 1-3% im menschlichen Kolon. Zusammenfassend kommt die Arbeit zu dem Schluss, dass die „Leck-flux“-Diarrhö durch den Zusammenbruch von Proteinen des *Tight Junction*-Komplexes entsteht und nicht durch eine erhöhte Apoptoserate beeinflusst wird.

2.5 Interleukin-13 beeinflusst die epitheliale Apoptose bei Colitis ulcerosa

Eine Hypothese zur Pathogenese der Colitis ulcerosa sieht den Zusammenbruch der epithelialen Barriere des Darmes als zentral an, die durch eine genetisch determinierte Imbalance zwischen der kommensalen intestinalen Flora und dem darmassoziierten Immunsystem bedingt sein soll. Bei Colitis ulcerosa liegt im Gegensatz zum Morbus Crohn nach derzeitigen Erkenntnissen eine Th2-vermittelte Immunantwort vor, als Schlüsselzytokin wurde bislang das Interleukin-4 angesehen. Im Rahmen der Immunantwort waren keine direkt die intestinale Barrierefunktion beeinflussenden Zytokine identifiziert worden. Das vorliegende Manuskript belegt einen direkten Zusammenhang zwischen der Barrierefunktionsstörung bei Colitis ulcerosa und IL-13. Die mononukleären Zellen der Lamina propria von Patienten mit Colitis ulcerosa produzieren signifikant höhere Mengen von IL-13 verglichen mit Kontrollpatienten. Im HT-29/B6-Zellkulturmodell hatte die Gabe von IL-13 einen dosisabhängigen Effekt auf die Reduktion des transepithelialen Widerstands zur Folge. Weiterhin ist die Störung der epithelialen Barriere durch den Einfluss von IL-13 auf einzelne Moleküle des *Tight Junction*-Komplexes zu erklären, so kommt es zu einer Hochregulation des Porenbildners Claudin-2. Die durch IL-13 vermittelte Erhöhung der epithelialen Apoptoserate um den Faktor 6 gegenüber der physiologischen Apoptoserate belegt den Einfluss von IL-13 auf die epitheliale Apoptose.

Eine Verzögerung der epithelialen Restitution durch IL-13 konnte im Zellkulturmodell ebenfalls gefunden werden. Diese Erkenntnisse identifizierten wichtige pathophysiologische Mechanismen, die zur Barrierefunktionsstörung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere bei der Colitis ulcerosa, beitragen. Mit IL-13 wurde darüber hinaus das bislang für die Beeinträchtigung der Barrierefunktion wichtigste Zytokin bei der Colitis ulcerosa gefunden, hierdurch könnten sich zukünftig wichtige Ansatzpunkte für die Therapie dieser Erkrankung ergeben, über erste Erfolge in der anti-IL-13 Therapie entzündlicher pulmonaler Erkrankungen wurde bereits berichtet (s. 3.1). Derzeit wird der Einsatz dieses Antikörpers bei mittelschwerer und schwerer refraktärer Colitis ulcerosa diskutiert, Daten hierzu liegen jedoch noch nicht vor.

3. Diskussion

3.1 Apoptose im physiologischen und entzündlich veränderten intestinalen Epithel

Der Begriff „Apoptose“ wurde erstmals 1972 durch Kerr und Mitarbeiter als eine besondere Form des programmierten Zelltodes mit charakteristischen morphologischen Veränderungen beschrieben [37]. Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und -abstoßung ist die Apoptose insbesondere im sich schnell teilenden Gewebe wie dem gastrointestinalen Epithel ein für den regelhaften Zellumsatz notwendiger Prozess und wesentlich bedeutender als der nicht-apoptotische Zellverlust durch Zellabschilferung bzw. Shedding [60]. In der vorliegenden Arbeit wurde Apoptose experimentell sowie klinisch ausschließlich in der gastrointestinalen Mukosa untersucht. Die epitheliale Apoptose und die daran beteiligten Mechanismen und Strukturen müssen in Bezug auf die intestinale Barrierefunktion unterschieden werden von den Apoptose-vermittelnden Strukturen und Prozessen in der Lamina propria, in der hauptsächlich die T-Lymphozyten pro- oder antiapoptotische Signale vermitteln und ein komplexes System von Zytokinen und anderen Botenstoffen diese Vorgänge regulieren [61]. Der große Unterschied der Apoptose zur Nekrose ist neben den typischen intrazellulären Veränderungen das Fehlen jeglicher begleitender Entzündungsreaktion in der Umgebung einzelner apoptotischer Zellen sowie die rasche Deckung des Einzelzelldefektes durch benachbarte Zellen des Zellverbandes. Die normale epitheliale Apoptoserate im menschlichen Organismus ist abhängig vom Organsystem und der Zellproliferation. Im menschlichen Kolon erfolgen die Proliferation an der Kryptenbasis und das Abstoßen der Zellen durch Apoptose an der Oberfläche der Krypten. Im humanen Kolon kennen wir Apoptoseraten von ca. 1 % [40] wobei es nach einer Literaturübersicht selbst im nicht-entzündeten Kolon eine bemerkenswerte Variabilität von 0.11% bis 11% gibt [62]. Einschränkend muss zu den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch gesagt werden, dass in den untersuchten Studien sehr unterschiedliche Definitionen über die zur Apoptose zählenden zellulären Veränderungen verwendet wurden. Auch innerhalb der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes gibt es Unterschiede in der Apoptoserate [63]. In den wesentlich intensiver studierten humanen Kolonkarzinomzelllinien sind basale Apoptoseraten von 3.5% in HT-29/B6 Zellen [42] bis zu 10% in Caco-2 Zellen [64] beschrieben worden, allerdings kennt man auch in Nicht-Tumorzellen wie der Kolonadenomzelllinie VACO-330 spontane Apoptoseraten von immerhin 6.2% [65]. Viele Beobachtungsstudien kommen zu dem Schluss, dass eine niedrige Apoptoserate im unteren Gastrointestinaltrakt zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen führt. Daraus ließe sich ableiten, zur Prävention des Kolonkarzinoms die mukosale Apoptoserate

durch spezielle Diäten oder Medikamente gezielt zu erhöhen. Hierfür sind jedoch Interventionsstudien nötig, die derzeit nicht oder nicht in ausreichendem Maße vorliegen [66].

Apoptose spielt jedoch im Kolon nicht nur eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Adenom-Karzinom-Sequenz. Apoptose tritt weiterhin auf bei akut oder chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie als Nebeneffekt einer Medikamententherapie. Verschiedene akute entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes gehen mit einer erhöhten Apoptoserate einher. Bei bakteriellen und viralen Gastroenteritiden wie der Salmonellen-, Lamblien- oder Norovirus-Infektion [67, 12, 13] geht man von einer durch Apoptose des intestinalen Epithels ausgelösten Barrierefunktionsstörung als einen wichtigen Pathomechanismus dieser Erkrankungen aus. Bei der Yersinia-Infektion [68] oder der kollagenen Kolitis [40] dagegen wurde keine Erhöhung der epithelialen Apoptoserate gefunden.

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa, ist komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Sowohl bei Morbus Crohn [69] als auch bei der Colitis ulcerosa [70] sind erhöhte Raten epithelialer Apoptose beschrieben worden. Die seit Jahrzehnten eingesetzten Aminosalicylate (5-ASA Präparate) werden bei Patienten mit langjähriger Colitis ulcerosa chemopräventiv eingesetzt und induzieren unter anderem Apoptose sowie reduzieren die Proliferation und führen somit zu einer Reduktion der spontanen Mutationsrate [71]. Ein weiterer therapeutischer anti-inflammatorischer Ansatzpunkt bei diesen Erkrankungen ist die Beeinflussung der erhöhten Zytokinspiegel beispielsweise durch die Gabe von anti-TNF- α Substanzen wie Infliximab oder Adalimumab. Diese sogenannten Biologika hemmen die epitheliale Apoptose, induzieren allerdings Apoptose in den mononukleären Zellen der Lamina propria und tragen damit insgesamt zu einer epithelialen Restitution und damit zum „mucosal healing“ bei [72]. Zwischen den verschiedenen und seit Jahren etablierten anti-TNF- α Substanzen scheint es keinen Unterschied in der Effektivität der Apoptosereduktion zu geben [73]. Die zentrale Bedeutung von IL-13 bei Colitis ulcerosa lässt vermuten, dass eine anti-IL-13-Therapie die intestinale Entzündung günstig beeinflussen kann. Bislang existiert mit Tralokinumab ein anti-IL-13 Antikörper, dieser wurde in ersten klinischen Studien jedoch zunächst bei Patienten mit Asthma bronchiale bzw. schwerer chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung eingesetzt [74]. Ein möglicher Einsatz dieser Substanz bei mittelschwerer und schwerer Colitis ulcerosa wird derzeit aber bereits diskutiert, so dass in den kommenden Jahren auch bei dieser Indikation Ergebnisse von ersten klinischen Studien zu erwarten sein werden.

Bei Patienten mit Zöliakie ist ebenfalls eine erhöhte epitheliale Apoptoserate beschrieben worden [75], die sich unter glutenfreier Diät nahezu normalisierte. Die Atrophie der Dünndarmmukosa wurde im Wesentlichen auf eine Induktion von Apoptose durch Aktivierung des Fas-Rezeptors über den

extrinsischen Weg in den Enterozyten zurückgeführt. Dies wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass nach Blockierung des Fas-Rezeptors durch Antikörper auch die Apoptose in der Mukosa effektiv geblockt wurde [76]. Vermutlich ist die Barrierefunktionsstörung bei Zöliakie jedoch geringfügig oder nur zu einem kleinen Teil durch die epitheliale Apoptose der Dünndarmenterozyten bedingt, wie eine aktuelle Arbeit zeigen konnte [77].

Bei akuter HIV-Infektion [39] wurden erhöhte epitheliale Apoptoseraten beschrieben, für die akute intestinale GvHD [78] sind sie geradezu charakteristisch. Bei beiden Erkrankungen sind dadurch die klinisch häufig auftretenden Diarrhöen zu erklären. Moderne endoskopische Verfahren ermöglichen durch in-vivo Mikroskopie die Detektion apoptotischer Zellen bei Patienten mit akuter intestinaler GvHD bereits während einer normalen Endoskopie [79]. Die Methode der Endomikroskopie bzw. konfokalen Laserendomikroskopie wurde 2004 durch Prof. Dr. Kiesslich in Mainz weltweit eingeführt [80], diese Methode zählt heute zu den wichtigsten endoskopischen Innovationen der letzten 10 Jahre.

Wie bereits erwähnt führen auch medikamentöse Therapien, zum Beispiel mit Immunsuppressiva [81] oder Protonenpumpeninhibitoren [82], zu erhöhter epithelialer Apoptose. Vor allem Letztere gehören zu den am häufigsten rezeptierten Medikamenten in der Gastroenterologie überhaupt. Chemotherapeutika lösen ebenfalls Apoptose aus, hierdurch ist die häufige medikamenteninduzierte Diarrhö zu erklären, zugrunde liegende Mechanismen der vermehrten Durchlässigkeit der epithelialen Barriere fanden sich in den Zellkulturexperimenten durch den Einsatz von Camptothecin [42].

3.2 Funktionelle Bedeutung einer veränderten Apoptose auf die intestinale Barrierefunktion

Lange Zeit wurde kritisch diskutiert, ob der an sich physiologische Vorgang der epithelialen Apoptose zu einer funktionell relevanten Störung der intestinalen Barriere führen kann. Auch in den vergangenen Jahren gab es immer wieder einzelne Arbeiten, in denen ein funktioneller Effekt der durch Apoptose induzierten epithelialen Lücken bezweifelt wurde [83]. Andererseits induziert die vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine epitheliale Apoptose mit daraus folgenden Auswirkungen auf die intestinale Barrierefunktion [84, 85]. Moderne elektrophysiologische Methoden und insbesondere die Conductance Scanning Technologie ermöglichen jedoch eine Messung isolierter Leitfähigkeiten über einzelnen Zellen. Mit dieser Technik konnten Gitter und Mitarbeiter bereits im Jahre 2000 erstmals zeigen, dass die spontane und TNF- α induzierte

epitheliale Apoptose zu isolierten lokalen messbaren Leitfähigkeitsänderungen führt und die intakte Barriere damit durchlässiger wird [43]. Mit der Arbeit von Gitter et al. wurde ein bis dahin lange existierendes Dogma der „perfekten Abdichtung“ [86] der epithelialen Barriere eindeutig widerlegt, da der durch TNF- α induzierte dramatische Anstieg der Leitfähigkeit deutlich von der durch spontane Apoptose hervorgerufenen basalen Leitfähigkeitszunahme abgegrenzt werden konnte. Durch die getrennte Analyse der trans- und parazellulären Leitfähigkeitsänderungen war es möglich, etwas über die Beteiligung der *Tight Junction*-Proteine auszusagen, da nur die parazelluläre Leitfähigkeitsänderung Ausdruck einer Funktionsstörung der *Tight Junctions* ist. Die in der Folge durchgeführten Zellkulturexperimente an der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6, die sich durch die Ausbildung von hohen transepithelialen Widerständen besonders für die elektro-physiologische Analyse eigneten, erbrachten weitere Einblicke in die durch Apoptose ausgelösten Leitfähigkeitsänderungen an einem epithelialen Monolayer. Wichtigste Fragestellung dieser Experimente war, welche Molekülgröße die durch Apoptose entstandenen epithelialen „Leaks“ noch passieren kann. Während Moleküle bis 344 Da durch das Epithel noch problemlos parazellulär transportiert wurden, konnten 4000 Da Moleküle (< 1.2 nm) diesen Transportweg nicht passieren [42]. Hiermit wurde belegt, dass vermutlich nur sehr kleine Moleküle (z. B. Haptene) ohne vollständige Antigeneigenschaften und damit weder Bakterien noch Viren die parazelluläre Route für den Transport von der Epitheloberfläche nutzen können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das „dichte“ Kolonepithel mit einem Verhältnis von transzellulärer zu parazellulärer Leitfähigkeit von 10:1 und einer spontanen Apoptoserate von 3.5% durch Erhöhung der Apoptoserate auf 12% die Eigenschaft eines „durchlässigen“ Epithels, vergleichbar mit Nierenepithel, annahm [42]. Weitere Experimente belegten, dass neben TNF- α als einem der die Th1-Immunantwort vermittelnden Zytokin mit IL-13 ein weiterer potenter Auslöser epithelialer Apoptose bei der Th2-Immunantwort gefunden werden konnte [11]. Durch die bis dahin durchgeführten Experimente konnten wesentliche pathophysiologisch relevante Aspekte der Barrierefunktionsstörung sowohl beim Morbus Crohn [35] als auch bei der Colitis ulcerosa [11] experimentell nachgewiesen und funktionell charakterisiert werden.

Die Myosin-leichte-Ketten-Kinase II (MLCK II) wurde von anderen Arbeitsgruppen inzwischen als weitere zentrale Schaltstelle identifiziert, die den Anstieg der parazellulären Permeabilität bei der TNF- α induzierten Barrierefunktionsstörung partiell mit verursacht [87]. Diese Kinase ist eine Kalzium-Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Kinase, die nach Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins über Aktomyosin zu einer Erhöhung der parazellulären Leitfähigkeit führt. Hierdurch trägt das Aktinzytoskelett viel stärker als bislang vermutet [88] zu der Aufrechterhaltung der

epithelialen Barriere bei. Es gilt mittlerweile als akzeptiert, dass bei der durch TNF- α induzierten parazellulären Leitfähigkeitserhöhung weder die epitheliale Apoptose noch die *Tight Junction* Dysregulation als zentrale Regulatoren anzusehen sind, sondern der MLCK-II Weg über das Aktinzytoskelett zu einer rascheren Öffnung der Interzellularspalte führt [89]. Dagegen bilden beide Mechanismen die Grundlage für das Verständnis von Barrierefunktionsstörungen, da sie die Integrität der epithelialen Barriere beeinträchtigen und pathophysiologisch relevante Transportprozesse erklären. Dagegen sind epithelphysiologische Veränderungen, die zur Barrierschädigung bei der IL-13-induzierten Colitis führen, MLCK-unabhängig [90]. Die Endozytose von Proteinen der *Tight Junctions*, hauptsächlich von Occludin, ist in den vergangenen Jahren als zusätzlicher Mechanismus identifiziert worden [91].

3.3 Veränderungen der *Tight Junctions* durch epitheliale Apoptose

Zu den zentralen Komplexen der Zell-Zell-Verbindungen zählen neben den apikal lokalisierten Proteinen der *Tight Junctions* auch die Proteine der Adherens Junctions sowie die Desmosomen. Die parazelluläre Route für den Transport von Ionen und hydrophilen Soluten wird durch eine intakte Struktur der *Tight Junctions* maßgeblich reguliert. Während der epithelialen Apoptose tritt neben den bekannten morphologischen Zellveränderungen auch ein Verlust der Zellpolarität auf. In diesem Zusammenhang waren die Adherens Junctions und die Desmosomen bereits als Substrate für Caspasen beschrieben worden [92, 93]. Über das Schicksal der *Tight Junction* Proteine während der Apoptose war lange nichts bekannt. Im Zellkultursystem konnte erstmals gezeigt werden, dass Occludin am C-Terminus durch eine Caspase und am ersten extrazellulären Loop durch eine Metalloproteinase proteolytisch gespalten wird und die Proteine ZO-1 und ZO-2 sowie Claudin-2, nicht jedoch Claudin-1, ebenfalls einem Spaltungsprozess unterliegen [29]. Die beschriebenen Veränderungen auf Proteinebene erklären die zuvor im Rahmen der elektrophysiologischen Experimente unter 3.2 detailliert diskutierte Apoptose-induzierte Barrierefunktionsstörung. Dieser Pathomechanismus spielt vermutlich bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [11, 35] aber auch bei einer bakteriellen [12] bzw. viralen Gastroenteritis [13] eine wichtige Rolle für die Beeinträchtigung der epithelialen Barriere. In nahezu allen genannten Erkrankungen folgt daraus das klinische Symptom Diarrhö. Studien anderer Arbeitsgruppen konnten die während der Apoptose beobachteten Veränderungen an den Proteinen der *Tight Junctions* beispielsweise durch bakterielles Lipopolysaccharid [94] oder EPEC-Infektion [95] bestätigen. Andere Arbeiten beschreiben (siehe 1.4) eine Inaktivierung von Occludin ohne begleitende Barrierefunktionseinschränkung, sehen aber eine

Co-Lokalisation von Occludin mit den Proteinen des DISC. Die Autoren dieser Arbeit vermuten in diesem Zusammenhang, dass Occludin als Signalmolekül fungiert [46].

Ein weiterer Pathomechanismus, der nach heutigen Erkenntnissen zumindest bei der durch TNF- α induzierten Barrierefunktionsstörung eine zentrale Rolle spielt, wurde in den folgenden Jahren mit der Phosphorylierung der MLCK II identifiziert [87]. Damit bedient sich TNF- α eines bereits existierenden physiologischen Signalweges zur Regulation der parazellulären Leitfähigkeit und berücksichtigt das Aktinzytoskelett stärker als bislang angenommen für die Regulation des parazellulären Transportweges.

3.4 Ausblick: In vivo Diagnostik von Apoptose durch Endomikroskopie

Die diagnostische Endoskopie des Gastrointestinaltraktes hat in den letzten 10 Jahren unter anderem durch die Entwicklung neuer innovativer Technologien wie den in vivo mikroskopischen Verfahren eine neue Dimension der optischen Auflösung erreicht. Während normale Endoskope mit ca. 30-facher Vergrößerung arbeiten, konnte durch Zuhilfenahme optischer Zoom-Funktionen (Zoom-Endoskopie) eine etwa 100-fache Vergrößerung erreicht werden. Die neuen in vivo mikroskopischen Verfahren erlauben erstmals eine 1000-fache Vergrößerung und eine Oberflächenanalyse der gastrointestinalen Mukosa auf Einzelzellniveau. Lediglich limitiert durch die Gewebeeindringtiefe von 250 μm ist es möglich, makroskopisch nicht sichtbare aber vorhandene Veränderungen auf zellulärer Ebene mikroskopisch zu erfassen. Weltweit wurde diese Technologie an der Universitätsklinik in Mainz 2004 unter dem Begriff der konfokalen Laserendoskopie [80] eingeführt. Aus dieser Klinik stammen nicht nur die meisten bislang veröffentlichten klinischen Studien, hier wurde auch der Grundstein für die Erforschung der molekularen Bildgebung gelegt [96]. Der Terminus „konfokale Laserendomikroskopie“ wurde im Laufe der Jahre immer wieder modifiziert, der Einfachheit halber hat sich der Begriff Endomikroskopie weltweit durchgesetzt. Die Charité wurde 2006 als zweite Klinik in Deutschland mit einem Endomikroskopie-System ausgestattet. Derzeit befinden sich auf dem Markt zwei konkurrierende Systeme: Zum einen gibt es das stationäre und 2004 eingeführte Endomikroskopie-System der Firma Pentax®, Tokio, dieses erfordert ein eigenes Endoskop, das entweder für den oberen Gastrointestinaltrakt als Gastroskop (EG-3870 CIK) oder für den unteren Gastrointestinaltrakt als Koloskop (EC-3870CIFK) kommerziell erhältlich ist und einen separaten PC inkl. zweitem Monitor benötigt. Zum anderen ist das sondenbasierte System Cellvizio® von Mauna Kea Technologies, Paris, auf dem Markt und erlaubt einen universellen Einsatz an jedem Endoskop mit einem genügend großen Arbeitskanal von mindestens 2,8 mm [97]. Auch für dieses System wird

ein zweiter separater PC mit Monitor benötigt, um die mikroskopischen Befunde darzustellen. Der Einsatz der konfokalen Sonde ist somit völlig unabhängig vom verwendeten Endoskopie-System und damit mobil einsetzbar. Die optische Auflösung der konfokalen Sonde ist der Auflösung des stationären konfokalen Systems leicht unterlegen, durch die dynamische Erfassung bewegter zellulärer Strukturen bei der Nutzung des sondenbasierten Systems kann die Beurteilung während der Untersuchung zusätzlich leicht eingeschränkt sein. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist die limitierte Haltbarkeit des sondenbasierten Systems, die beschränkt ist auf ca. 20-50 Untersuchungen. Für die Anwendung in vivo mikroskopischer Verfahren muss Fluorescein intravenös verabreicht werden. Der Einsatz von Fluorescein 10% während einer Endoskopie ist nebenwirkungsarm und nach einer großen retrospektiven Studie in 16 Zentren an über 2200 Patienten als sicher zu bewerten [98]. Als bekannte Nebenwirkungen treten eine vorübergehende leichte Gelbfärbung der Haut und des Urins auf, bei Niereninsuffizienz mit erhöhtem Kreatininspiegel im Serum wird die Fluoresceindosis halbiert. Als zusätzlicher Farbstoff wird Akriflavin in einer Dosierung von 0.05 % als topischer Sprühfarbstoff eingesetzt. Diese Substanz ist nicht für die Anwendung am Menschen zugelassen, da eine potenzielle DNA-Schädigung im Zellkulturmodell beschrieben wurde und somit das geringe Risiko der Mutagenese besteht [99]. Eine neuere Arbeit kommt jedoch zu dem Ergebnis, das insgesamt wenig Evidenz über das tatsächliche Mutagenitätsrisiko durch Akriflavin vorliegt [100]. Akriflavin betont einerseits die zellulären Grenzen und bindet andererseits an nukleäre DNA, so dass mit diesem Farbstoff erstmals Apoptose während einer Endoskopie untersucht werden kann.

Wir haben mit der akuten intestinalen Graft-versus-Host Disease (GvHD) eine wichtige klinische Indikation für die Durchführung einer Endomikroskopie gefunden [79]. Eine akute intestinale GVHD ist eine seltene aber schwere Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation [101]. Sie tritt 2-10 Wochen nach Stammzelltransplantation mit akuter Diarrhö und Abdominalbeschwerden auf. Neben dem Darm können auch die Haut und die Leber betroffen sein. Im Kolon ist die Detektion von Apoptose bei Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer akuten intestinalen GvHD nach Stammzelltransplantation selbst für den Goldstandard, die klassische Histologie, vor allem bei den niedriggradigen GvHD-Formen eine große Herausforderung [102]. Bisläng konnte die Diagnose nur histologisch im Rahmen einer Sigmoidoskopie mit Biopsieentnahme sicher gestellt werden. Bis zum Vorliegen einer endgültigen Histologie vergehen selbst bei optimalen Transportbedingungen und guter Anbindung an das Institut für Pathologie mindestens zwei Tage. Die möglichst frühzeitige Steigerung der immunsuppressiven Therapie ist jedoch bei Patienten mit GvHD entscheidend für die Abwehr der Abstoßungsreaktion. Hier kann die Endomikroskopie einen wichtigen Beitrag zu einer

raschen Diagnose leisten und darüber hinaus dem behandelnden Hämatologen unmittelbar nach der Untersuchung eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer GvHD geben [79].

Problematisch bleibt der für die zusätzliche Beurteilung der Zellkerne durch Endomikroskopie unverzichtbare Einsatz zusätzlicher Kontrastfarbstoffe, die für die Anwendung am Menschen bislang nicht zugelassen sind. Sowohl mit Akriflavin [79] als auch mit Kresylviolett [103] liegen potenziell geeignete und diagnostisch wertvolle Kontrastfarbstoffe vor. Für eine Zulassung dieser Substanzen als diagnostische Arzneimittel sind jedoch hohe gesetzliche Auflagen zu erfüllen, deren Antragstellung und -verfahren zeitaufwändig und kostenintensiv sind. Im Rahmen von klinischen Studien nach Erteilung eines Ethikvotums oder nach spezieller Aufklärung der Patienten über den sogenannten Off-Label-Use dürfen diese Farbstoffe bei bestimmten Indikationen jedoch verwendet werden.

4. Zusammenfassung

Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes spielt als Barriere zwischen dem mukosalen und serosalen Kompartiment eine zentrale Rolle für die Koordination von Transportprozessen und sichert eine ausreichende Abwehr von schädlichen Substanzen und Mikroorganismen. Von besonderer Bedeutung ist diese Barriere – neben der Erhaltung einer Homöostase beim gesunden Menschen – vor allem bei Auftreten einer Barriestörung, beispielsweise bei Infektionen oder chronischen Entzündungen des oberen oder unteren Gastrointestinaltraktes. Darüber hinaus gehört das Mukosa-assoziierte Immunsystem des Gastrointestinaltraktes zu einem komplexen Netzwerk interagierender Immunzellen und bildet mit diesen das größte immunologische Organ innerhalb des menschlichen Organismus aus.

Proteine der *Tight Junctions* gehören zu den am dichtesten unterhalb der Oberfläche der Mukosa gelegenen Zell-Zell-Kontaktstrukturen. Eine Fehlregulation dieses aus einer Vielzahl von Proteinen bestehenden Komplexes hat dramatische Konsequenzen für den gerichteten Transport von Wasser und anderen Soluten in das Körperinnere oder von dort in das Darmlumen. Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der insbesondere in dem sich rasch teilenden Darmepithel notwendig ist, um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Eine Fehlregulation der physiologischen Apoptose führt ebenfalls zu dramatischen Veränderungen der Integrität des mukosalen Zellverbandes.

Im Rahmen der in dieser Habilitationsschrift vorgestellten Untersuchungen wurde ein Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion der *Tight Junction*-Proteine bei der epithelialen Apoptose geleistet. Erstmals wurde gezeigt, welchen Einfluss Apoptose auf die Leitfähigkeitsveränderungen im Darm hat und wieviel Apoptose ein epithelialer Zellverband toleriert, um seine zentrale Eigenschaften eines mitteldichten Epithels noch zu behalten oder bereits Eigenschaften von durchlässigen („lecken“) Epithelien anzunehmen. Erstmals wurden Zielproteine der epithelialen Apoptose unter den *Tight Junction*-Proteinen identifiziert, die spezifisch von Caspasen und Metalloproteinasen gespalten werden. Im Gegensatz zur weitläufigen Meinung, dass während der Apoptose grundsätzlich alle Proteine proteolytisch fragmentiert werden, fand sich mit Claudin-1 ein Protein des *Tight Junction*-Komplexes, das äußerst widerstandsfähig gegenüber Apoptosesignalen ist. In den letzten Jahren haben andere Arbeitsgruppen zeigen können, dass die Dysregulation der *Tight Junctions* und die erhöhte epitheliale Apoptose nicht die einzigen Faktoren der Leitfähigkeits-

änderungen sind, sondern weitere Enzyme wie MLCK II oder Mechanismen wie Endozytose von Proteinen der *Tight Junctions* zur Entstehung einer Barrierefunktionsstörung beitragen.

Die in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse konnten im Weiteren auch für die Untersuchung an humanen Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei kollagener Kolitis genutzt werden. Bei der kollagenen Kolitis fanden sich mehrere Diarrhömechanismen sowie eine Herabregulation von Proteinen der *Tight Junctions*, jedoch keine erhöhte Apoptoserate. Bei akutem Morbus Crohn spielt eine hochregulierte epitheliale Apoptoserate in der Mukosa eine bedeutende Rolle und führt zu einer Störung der intestinalen Barriere. Diese Barriestörung bildet sich innerhalb von 2 Wochen nach Therapie mit TNF- α Blockern zurück und geht einher mit einem deutlichen Rückgang der Apoptoserate.

Im Gegensatz zum Morbus Crohn spielt bei der Th2-vermittelten Immunantwort der Colitis ulcerosa das Interleukin-13 als Schlüsselzytokin eine entscheidende Rolle. Auch IL-13 induziert im Zellkulturmodell epitheliale Apoptosen und erklärt zusammen mit der Hochregulation von Claudin-2 als Porenbilder sowie einer verzögerten epithelialen Restitution die typischen epithelphysiologischen Veränderungen bei akuter Colitis. Medikamentöse anti-TNF- α Strategien werden bereits seit mehreren Jahren zur Therapie von refraktären Verläufen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verfolgt. Die Ergebnisse kommender Studien müssen nun zeigen, ob auch eine anti-IL-13-Therapie, wie sie kürzlich bei Patienten mit Asthma bronchiale und chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung in klinischen Studien vorgestellt wurde, eine weitere Therapieoption bei Patienten mit refraktären Verläufen bei Colitis ulcerosa darstellt.

5. Literatur

1. Farquhar M, Palade G. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17: 375-412.
2. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions, *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293.
3. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005; 171 (6): 939-945.
4. Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E, Danese S. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008; 135 (1): 173-184.
5. Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR. Tight junction-associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* 2010; 21 (7): 1200-1213.
6. Amasheh S, Fromm M, Günzel D. Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 201 (1): 133-140.
7. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; 116 (2): 301-309.
8. Rajasekaran AK & SA Rajasekaran. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 2003, 285: F388-F396.
9. Rajasekaran SA, Beyenbach KW, Rajasekaran AK. Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778 (3): 757-769.
10. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 119-144.
11. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129 (2): 550-564.
12. Tröger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 2007; 56 (3): 328-335.
13. Tröger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2009; 58 (8): 1070-1077.
14. Matter K & MS Balda. Signalling to and from tight junctions. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003, 4: 225-236.
15. Meyer TN, Schwesinger C, Denker BM. Zonula occludens-1 is a scaffolding protein signaling molecules. *J Biol Chem* 2002, 277: 24855-24858.
16. Meyer TN, Hunt J, Schwesinger C, Benker BM. Gα12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 285: C1281-C1293.
17. Owen KA, Abshire MY, Tilghman RW, Casanova JE, Bouton AH. FAK Regulates Intestinal Epithelial Cell Survival and Proliferation during Mucosal Wound Healing. *PLoS One* 2011; 6(8): e23123. Epub 2011 Aug 24.
18. Balda MS and Matter K. Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* 2008; 121: 3677-3682.
19. Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25 (1): 16-26.

20. Terry SJ, Zihni C, Elbediwy A, Vitiello E, Leefa Chong San IV, Balda MS, Matter K. Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 2011; 13 (2): 159-166.
21. Hirase T, Kawashima S, Wong EYM, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM. Regulation of tight junction permeability and occluding phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001, 276: 10423-10431.
22. Lemmers C, Médina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, Le Bivic A. hINADI/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 2002, 277: 25408-25415.
23. Buchert M, Poon C, King JA, Baechi T, D'Abaco G, Hollande F, Hovens CM. AF6/s-afadin is a dual residency protein and localizes to a novel subnuclear compartment. *J Cell Physiol* 2007; 210 (1): 212-223.
24. Reichert M, Müller T, Hunziker W. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of madin-darby canine kidney I cells. *J Biol Chem* 2000, 275: 9492-9500.
25. Wachtel M, Frei K, Ehler E, Fontana A, Winterhalter K, Gloor SM. Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* 1999, 112: 4347-4356.
26. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C. Der p1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999, 104: 123-133.
27. Wan H, Winton HL, Soeller C, Gruenert DC, Thompson PJ, Cannell MB, Stewart GA, Garrod DR, Robinson C. Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy* 2000; 30 (5): 685-698.
28. Wu Z, Nybom P, Magnusson KE. Distinct effects of vibrio cholerae haemagglutinin/protease on the structure and localisation of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cellular Microbiology* 2000, 2: 11-17.
29. Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke JD, Florian P, Fromm M, Tauber R, Huber O. The specific fate of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2097-2107.
30. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 4131-4142.
31. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1669: 34-42.
32. Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996; 134: 1031-1049.
33. Yu AL, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Knock down of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C1231-C1241.
34. Marin ML, Greenstein AJ, Geller SA, Gordon RE, Aufses AH Jr. A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am J Gastroenterol* 1983; 78 (9): 537-547.

35. Zeissig S, Bojarski C, Bürgel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by TNF- α antibody treatment. *Gut* 2004; 53: 1295-1302.
36. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56 (1): 61-72.
37. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4): 239-257.
38. Reuben A. Alcohol and the liver *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24 (3): 328-338.
39. Epple HJ, Allers K, Tröger H, Kühl A, Erben U, Fromm M, Zeitz M, Lodenkemper C, Schulzke JD, Schneider T. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology* 2010; 139 (4): 1289-1300.
40. Bürgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002; 123 (2): 433-443.
41. Johnson IT (2002). Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem Toxicol* 2002; 40 (8): 1171-1178.
42. Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, Fromm M, Schulzke JD. Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol (Lond.)* 2001; 535 (2): 541-552.
43. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- α -induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000; 14 (12): 1749-1753.
44. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Esser D, Wang Y, Lang Y, Marano CW, Strauss R, Oddens BJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lichtenstein GR, Present D, Sands BE, Sandborn WJ. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]
45. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Edelblum KL, Duckworth CA, Guan Y, Montrose MH, Turner JR, Watson AJ. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* 2011, 140 (4): 1208-1218.
46. Beeman NE, Baumgartner HK, Webb PG, Schaack JB, Neville MC. Disruption of occludin function in polarized epithelial cells activates the extrinsic pathway of apoptosis leading to cell extrusion without loss of transepithelial resistance. *BMC Cell Biol* 2009; 10: 85.
47. Sträter J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Möller P. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997, 113: 160-167.
48. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14 (22): 5579-5588.
49. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118: 265–267, 2005.
50. Sheikh MS, Huang Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* 2003; 2 (6): 550-552.
51. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* 1995; 81 (4):495-504.
52. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296 (5573): 1634-1635.
53. Jin S, Martinek S, Joo WS, Wortman JR, Mirkovic N, Sali A, Yandell MD, Pavletich NP, Young MW, Levine AJ. Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97 (13): 7301-7306.

54. Vousden KH & Lu X. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (8): 594-604. Live or let die: the cell's response to p53.
55. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* 1997; 28 (4): 485-942.
56. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284 (5756): 555-556.
57. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119 (3): 493-501.
58. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996; 44 (9): 959-968.
59. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148 (7): 2207-2216.
60. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hoppwood DJ. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-3577.
61. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut* 2007; 56: 293-303.
62. Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, de Vries EG, Kleibeuker JH. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev of Oncol Hematol* 2003; 45: 37-53.
63. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rümmele P, Woenckhaus M, Schölmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (6): 1421-1428.
64. Giovannini C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, De Vincenzi M. Induction of apoptosis in Caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology* 2000; 145: 63-71.
65. Wang CY, Eshleman JR, Willson JK, Markowitz S. Both transforming growth factor-beta and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Research* 1995; 55: 5101-5105.
66. West NJ, Courtney ED, Poullis AP, Leicester RJ. Apoptosis in the colonic crypt, colorectal adenomata, and manipulation by chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18 (6): 1680-1687.
67. Paesold G, Guiney DG, Eckmann L, Kagnoff MF. Genes in the Salmonella pathogenicity island 2 and the Salmonella virulence plasmid are essential for Salmonella-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4(11): 771-781.
68. Hering NA, Richter JF, Krug SM, Günzel D, Fromm A, Bohn E, Rosenthal R, Bücken R, Fromm M, Troeger H, Schulzke JD. Yersinia enterocolitica induces epithelial barrier dysfunction through regional tight junction changes in colonic HT-29/B6 cell monolayers. *Lab Invest* 2011; 91 (2): 310-324.
69. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Cifone MG, Solcia E, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 2003; 46 (11): 1498-1507.
70. Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180 (2): 152-159.
71. Rodenburg RJ, Ganga A, van Lent PL, van de Putte LB, van Venrooij WJ. The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor- α expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (9): 1941-1950.

72. Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J. TNF- α neutralization ameliorates the severity of murine Crohns-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 8366-8371.
73. Fries W, Muja C, Crisafulli C, Costantino G, Longo G, Cuzzocrea S, Mazzon E. Infliximab and etanercept are equally effective in reducing enterocyte Apoptosis in experimental colitis. *Int J Med Sci* 2008; 5 (4): 169-180.
74. Walsh GM. Tralokinumab, an anti-IL-13 mAb for the potential treatment of asthma and COPD. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11 (11): 1305-1312.
75. Moss SF, Attia L, Scholes JV, Walters JR, Holt PR. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut* 1996; 39: 811-817.
76. Maiuri L, Ciacci C, Raia V, Vacca L, Ricciardelli I, Raimondi F, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut* 2001; 48(3): 418-424.
77. Schumann M, Günzel D, Buergele N, Richter JF, Troeger H, May C, Fromm A, Sorgenfrei D, Daum S, Bojarski C, Heyman M, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut* 2011 Aug 24. [Epub ahead of print]
78. Sale GE, Shulman HM, McDonald GB, Thomas ED. Gastrointestinal graft-versus-host disease in man: a clinicopathologic study of the rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 291-293.
79. Bojarski C, Günther U, Rieger K, Heller F, Loddenkemper C, Grünbaum M, Uharek L, Zeitz M, Hoffmann JC. In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. *Endoscopy* 2009; 41 (5): 433-438.
80. Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004; 127 (3): 706-713.
81. Papadimitriou JC, Cangro CB, Lustberg A et al. Histologic features of mycophenolate mofetil-related colitis: a graft-versus-host disease-like pattern. *Int J Sur Pathol* 2003; 11: 295-302.
82. Welch DC, Wirth PS, Goldenring JR et al. Gastric graft-versus-host disease revisited: does proton pump inhibitor therapy affect endoscopic gastric biopsy interpretation? *Am J Sur Pathol* 2006; 30: 444-449.
83. Watson AJ, Chu S, Sieck L, Gerasimenko O, Bullen T, Campbell F, McKenna M, Rose T, Montrose MH. Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers. *Gastroenterology* 2005; 129 (3): 902-912.
84. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112(1): 137-146.
85. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286 (3): G367-376.
86. Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 1997; 273: G1176-G1188.
87. Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: 422-30.
88. Walsh SV, Hopkins AM, Chen J, Narumiya S, Parkos CA, Nusrat A. Rho Kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia; *Gastroenterology* 2001; 121: 566-579.
89. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol*. 2011; 73: 283-309.

90. Weber CR, Raleigh DR, Su L, Shen L, Sullivan EA, Wang Y, Turner JR. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem*. 2010; 285 (16): 12037-12046.
91. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR 2nd, Raleigh DR, Guan Y, Watson AJ, Montrose MH, Turner JR. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol* 2010; 189: 111–126.
92. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 4972-4980.
93. Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 41175-41181.
94. Yu LC, Flynn AN, Turner JR, Buret AG. SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *FASEB J*. 2005; 19 (13): 1822-1835.
95. Flynn AN, Buret AG. Caspases-3, -8, and -9 are required for induction of epithelial cell apoptosis by enteropathogenic *E. coli* but are dispensable for increased paracellular permeability. *Microb Pathog*. 2008; 44 (4): 311-319.
96. Götz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, and Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010; 138: 435-446.
97. Wallace MB, Fockens P. Probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastroenterology* 2009; 136 (5): 1509-1513.
98. Wallace MB, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehke S, Roesch T, Lightdale CJ, Pohl H, Carr-Locke D, Lühr M, Coron E, Filoche B, Giovannini M, Moreau J, Schmidt C, Kiesslich R. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31 (5): 548-552.
99. Ferenc T, Janik-Spiechowicz E, Bratkowska W, et al. Genotoxicity assessment of new synthesized acridine derivative--3,6-diamino-10-methyl-9,10-dihydroacridine. *Mutat Res* 1999; 444: 463 – 470.
100. Wainwright M. Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes Pigments* 2008; 76: 582 – 589.
101. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, Steiner B, Berg E, Miehke S, Bornhäuser M, Schneider T, Zeitz M, Stein H, Thiel E, Duchmann R, Uharek L. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107: 1717–1723.
102. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E, Moresi JM, Greenson J, Janin A, Martin PJ, McDonald G, Flowers ME, Turner M, Atkinson J, Lefkowitz J, Washington MK, Prieto VG, Kim SK, Argenyi Z, Diwan AH, Rashid A, Hiatt K, Couriel D, Schultz K, Hymes S, Vogelsang GB. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 31–47.
103. Götz M, Watson A, Kiesslich R. Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases. *J Biophotonics* 2011; 4 (7-8): 498-508.

6. Danksagung

Prof. Dr. Michael Fromm danke ich für die anregende und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die ständige Bereitschaft zur Diskussion während der gesamten Zeit meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Über ihn bin ich bereits früh im Studium an das Institut für Klinische Physiologie gekommen.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, der mich bereits als Doktorand mit hohem Engagement betreute und bis heute meine wissenschaftliche und klinische Arbeit inhaltlich und freundschaftlich begleitet.

Mein erster Klinikchef, Prof. Dr. Ernst-Otto Riecken, hat mich als klinischer Lehrer aufgrund seiner Persönlichkeit sehr beeindruckt und ich danke ihm vor allem für die Unterstützung meines Antrags auf ein Forschungsstipendium bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Otmar Huber habe ich Methoden der Proteinbiochemie und Molekularbiologie erlernt und danke ihm für die hervorragende Betreuung meines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes.

Meinem zweiten Klinikchef, Prof. Dr. Martin Zeitz, danke ich sehr herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit sowie für seine ständige Unterstützung und Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung.

Priv. Doz. Dr. Siegbert Faiss danke ich, dass er mir die Möglichkeit zum klinisch-wissenschaftlichen Arbeiten mit der Endomikroskopie gegeben hat. Seinen Rat und seine Einschätzung zu allen Fragen der interventionellen Endoskopie schätze ich bis heute.

Bedanken möchte ich mich auch bei vielen weiteren hier nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Schulzke, Fromm und Huber sowie der Zentralen Endoskopie, ohne deren tatkräftige Hilfe viele Experimente bzw. klinische Studien nicht vorangekommen wären.

Schließlich danke ich von Herzen meiner Lebensgefährtin Susanne Malchow für ihr Verständnis während meiner gesamten klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit sowie meinen Eltern und meiner Familie für ihre Unterstützung in all den Jahren.

7. Erklärung

Nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

erkläre ich hiermit, dass

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

Berlin, den 23. September 2011

(Dr. med. Christian Bojarski)