

**Die epitheliale Barriere als Zielstruktur  
pathogener und probiotischer Bakterien:  
Wirkmechanismen von *Y. enterocolitica* und *E. coli* Nissle**

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

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

vorgelegt von  
**Nina A. Hering**  
aus Berlin

September 2010

Diese Arbeit wurde von Februar 2007 bis September 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke in der Medizinischen Klinik für Allgemeinmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, Charité – Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Krauß, Freie Universität Berlin

Disputation am 14.12.2010

# Inhalt

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die epitheliale Barriere</b>	<b>1</b>
1.1.1 Adherens Junctions und Desmosomen	2
1.1.2 Tight Junctions	3
1.1.3 TJ-assoziierte Proteine	6
<b>1.2. Barrierestörung und pathophysiologische Bedeutung</b>	<b>7</b>
<b>1.3 <i>Yersinia enterocolitica</i></b>	<b>8</b>
1.3.1 Klinisches Bild der <i>Y. enterocolitica</i> -Infektion (Pathogenese)	9
1.3.2 Virulenzfaktoren	9
1.3.3 Infektionsmodell	13
<b>1.4 Wirkung von Probiotika auf die intestinale Barriere</b>	<b>15</b>
<b>1.5 <i>E. coli</i> Nissle 1917</b>	<b>16</b>
1.5.1 Stammspezifische Charakteristika	16
1.5.2 Wirkmechanismen an der epithelialen Barriere	17
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Geräte und Materialien</b>	<b>20</b>
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Laborchemikalien und Reagenzien	22
2.1.4 Antibiotika	23
2.1.5 Medien	23
2.1.6 Puffer und Lösungen	24
2.1.7 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen	27
2.1.8 Antikörper	27
2.1.9 Inhibitoren	28
2.1.10 TaqMan Gene Expression Assays	29
2.1.11 siRNAs	29
2.1.12 Zytokine	29
2.1.13 Software	29
<b>2.2 Biologisches Material</b>	<b>30</b>
2.2.1 Bakterienstämme	30
2.2.2 Zelllinien	30

<b>2.3 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Anzucht von <i>Y. enterocolitica</i> .....	30
2.3.2 Anzucht von <i>E. coli</i> Nissle.....	30
2.3.3 Stammhaltung.....	31
<b>2.4 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.4.1 Zellkultur .....	31
2.4.2 Epithelmodell auf Zellkulturfiltern .....	31
<b>2.5 Elektrophysiologische Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.5.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands.....	35
2.5.2 Ussingtechnik .....	36
2.5.3 Messung von Kurzschlussströmen nach Stimulation und Hemmung der Chloridsekretion.....	38
2.5.4 Fluxmessungen .....	39
2.5.5 Messung von NaCl-Dilutionspotentialen.....	41
2.5.6 Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie .....	42
2.5.7 Conductance-Scanning.....	45
<b>2.6 Biochemische Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.6.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellkulturen .....	47
2.6.2 Proteinbestimmung.....	47
2.6.3 Western Blot-Analysen .....	48
2.6.4 Bestimmung der Proteinstabilität.....	50
2.6.5 Bestimmung der Apoptoserate mittels TUNEL-Färbung.....	50
2.6.6 LDH-Release-Assay (Zytotoxizitätsassay) .....	51
<b>2.7 Mikroskopische und immunfluoreszenzoptische Analysen.....</b>	<b>51</b>
2.7.1 Biotinylierung und Immunfluoreszenzfärbung von Tight Junction-Proteinen.....	51
2.7.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Claudin-14 .....	52
2.7.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie.....	53
2.7.4 Messung einer <i>Y. enterocolitica</i> induzierten Calcium-Antwort in HT-29/B6 .....	53
2.7.5 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie .....	56
<b>2.8 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>57</b>
2.8.1 RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen .....	57
2.8.2 Quantitative RNA-Bestimmung .....	58
2.8.3 Reverse Transkription.....	58
2.8.4 Real-Time-quantitative-PCR .....	58
2.8.5 Transfektion von siRNA .....	59
<b>2.9 Statistische Auswertung .....</b>	<b>60</b>

<b>3.1 Identifikation <i>Y. enterocolitica</i>-spezifischer Pathomechanismen an der epithelialen Barriere.....</b>	<b>61</b>
3.1.1 Verminderung des transepithelialen Widerstands durch <i>Y. enterocolitica</i> im Infektionsmodell.....	61
3.1.2 Charakterisierung der Barriestörung .....	62
3.1.3 Identifikation von <i>leaky regions</i> .....	64
3.1.4 Parazelluläre Leitfähigkeit und Tight Junction Defekte .....	66
3.1.5 Lokalisierung von TJ-Proteinen in <i>leaky regions</i> .....	70
3.1.6 Rolle bekannter <i>Y. enterocolitica</i> -Virulenzfaktoren.....	74
3.1.7 Zytotoxizität und Apoptose.....	80
3.1.8 Identifizierung regulatorischer Prozesse .....	83
<b>3.2 Einfluss von <i>E. coli</i> Nissle auf die Tight Junction-medierte Barrierefunktion.....</b>	<b>91</b>
3.2.1 Einfluss von <i>E. coli</i> Nissle auf den transepithelialen Widerstand.....	91
3.2.2 Charakterisierung des parazellulären Barriereeffekts.....	93
3.2.3 Funktion von Claudin-14 .....	98

<b>4.1 Pathomechanismen der <i>Y. enterocolitica</i>-Infektion .....</b>	<b>100</b>
4.1.1 Elektrophysiologische Charakteristika der Barriestörung .....	101
4.1.2 Störung der TJ-Integrität in <i>leaky regions</i> .....	101
4.1.3 Nekrose- und Apoptoseinduktion .....	103
4.1.4 Interaktionsmechanismen und Regulation .....	104
4.1.5 <i>Y. enterocolitica</i> -spezifische Mechanismen der Barriestörung .....	106
<b>4.2 Stärkung der TJ-medierten Barriere durch <i>E. coli</i> Nissle .....</b>	<b>107</b>
4.2.1 Wirkung von <i>E. coli</i> Nissle und aktivem Kulturüberstand auf den transepithelialen Widerstand im HT-29/B6-Zellkulturmodell.....	107
4.2.2 Einfluss von EcNK auf TJ-Proteine .....	108
4.2.3 Claudin-14-vermittelte Abdichtung der parazellulären Barriere .....	110
4.2.4 TJ-Modulation als EcN-spezifischer Wirkmechanismus .....	110

<b>7 LITERATUR</b>	<b>114</b>
--------------------	------------

---

<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>129</b>
--------------------------------	------------

---

<b>9 ANHANG</b>	<b>131</b>
-----------------	------------

---

Publikationen .....	131
Lebenslauf .....	132
Danksagung .....	133

# 1 Einleitung

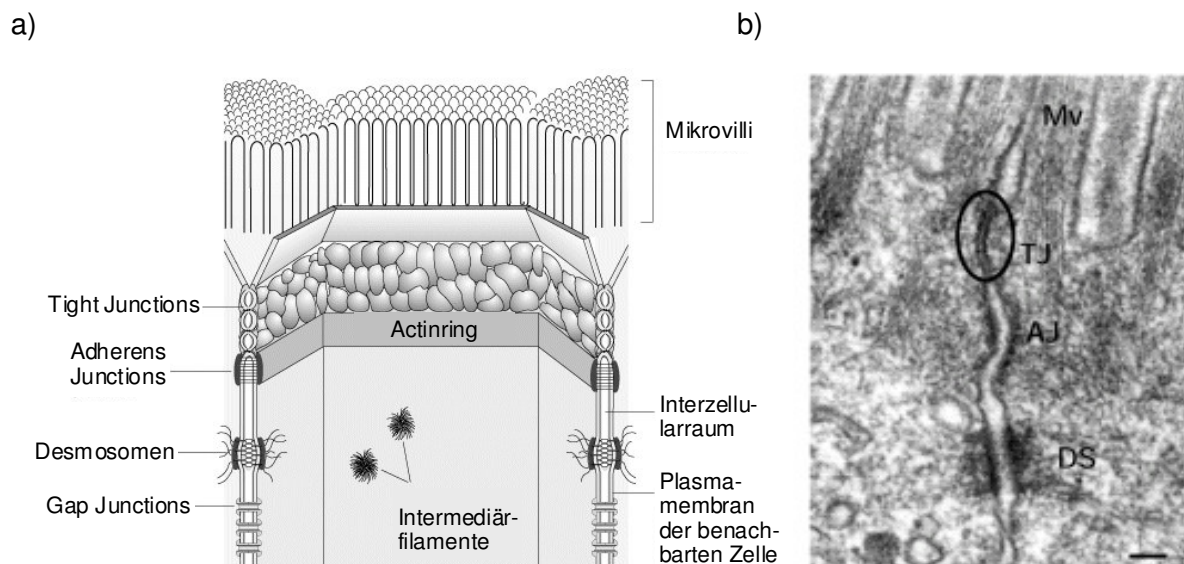
## 1.1 Die epitheliale Barriere

Komplexe, multizelluläre Organismen treten über spezialisierte Oberflächen mit dem externen Milieu in Kontakt. Diese Interaktion dient in erster Linie dem Stofftransport und erfolgt insbesondere über die Mukosa der Mundhöhle, der Luftwege, der Haut, des Urogenitaltrakts und des Verdauungstraktes. Darüber hinaus spielen diese exponierten Oberflächen eine entscheidende Rolle für die Immunregulation, da es hier zum Erstkontakt zwischen Mukosa-assoziiertem Lymphgewebe (MALT) und der Umwelt kommt. Die intensivste Interaktion findet im Gastrointestinaltrakt statt, da dieser die größte mukosale Oberfläche des Körpers aufweist und sich in kontinuierlichem Kontakt mit Nahrungsbestandteilen, Antigenen und diversen Mikroorganismen befindet.

Mukosale Oberflächen werden von polarisierten Epithelzellen gebildet, die eine Barriere zwischen internem und externem Milieu erzeugen. Derartige Barrieren müssen verschiedenen Ansprüchen gerecht werden. Zum einen muss der Stoffaustausch, das heißt die Absorption von Nahrungsbestandteilen sowie die Sekretion von Stoffwechselprodukten, gewährleistet werden. Zum anderen muss aber auch die Abgrenzung zwischen internem und externem Milieu gesichert sein, um sowohl einen Rückfluss bereits absorbierter bzw. sezernierter Partikel zu verhindern als auch den Eintritt luminaler Antigene, Mikroorganismen und von deren Stoffwechselprodukten. Dies wird bewerkstelligt, indem Epithelien selektive Barrieren ausbilden, über die ein Solut- und Wassertransport erfolgen kann und essentielle, gewebespezifische Prozesse reguliert werden. Beispielsweise variiert die Ionenpermeabilität stark in den verschiedenen Nephronsegmenten der Niere (Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002) und im Darm nimmt die Permeabilität für größere Solute von der Krypte zum Villus hin ab (Fihn *et al.*, 2000). Überdies ist die parazelluläre Permeabilität verschiedener Gewebe nicht konstant, sondern kann durch extrazelluläre Stimuli wie Nahrungsbestandteile, Bakterien oder Zytokine beeinflusst werden. Zusätzlich sind viele epitheliale Gewebe mit einer Mukusschicht aus Mucinen, die von Becherzellen sezerniert werden, bedeckt. Der Mukus bildet eine zusätzliche Barriere gegenüber Soluten und größeren Partikeln, wie zum Beispiel Bakterien (Johansson *et al.*, 2008).

Solute und Wasser können Epithelien auf zwei Wegen passieren, entweder transzellulär vor allem über Kanäle und Carrier durch die Zellen hindurch oder aber parazellulär zwischen den Zellen hindurch. Abgesehen vom Transport durch Kanäle und Carrier in der Plasmamembran sind die Epithelzellen selbst nahezu impermeabel für hydrophile Solute. Dementsprechend führt ihre direkte Zerstörung, zum Beispiel durch zytotoxische Agenzien, zu einem Verlust der Barrierefunktion.

Die Abdichtung des Interzellularspalts zwischen den Epithelzellen wird durch den apikalen junctionalen Komplex (Abb.1.1) gewährleistet, der sich aus den Tight Junctions (Schlussleisten, Zonula occludens), den darunter liegenden Adherens Junctions (gürtelförmige Desmosomen, Zonula adhaerens) und fleckförmigen Desmosomen (Macula adhaerens) aufbaut. Bei diesen interzellulären Strukturen handelt es sich um Zell-Zell-Verbindungen, die zum einen die transepitheliale Diffusion verhindern bzw. regulieren (Tight Junctions) und zum anderen den mechanischen Zusammenhalt benachbarter Epithelzellen vermitteln (Adherens Junctions und Desmosomen). Zu den Zell-Zell-Verbindungen gehören auch die unterhalb des junctionalen Komplexes gelegenen Gap Junctions (Nexus bzw. Maculae communicantes), die kanalartige Verbindungen zwischen benachbarten Zellen herstellen, aber keine transepitheliale Barrierefunktion aufweisen.



**Abb. 1.1: Aufbau des junctionalen Komplexes.** a) Das Modell zeigt den schematischen Aufbau des junctionalen Komplexes aus Tight Junction, Adherens Junction und Desmosomen im Interzellularspalt zwischen Epithelzellen (modifiziert aus Kompaktlexikon der Biologie; Spektrum Verlag). b) Elektronenmikroskopische Aufnahme des junctionalen Komplexes (TJ = Tight Junction, AJ = Adherens Junction, DS = Desmosomen, Mv = Mikrovillus) (Furuse *et al.*, 2001)

### 1.1.1 Adherens Junctions und Desmosomen

Gürtelförmige Desmosomen (Adherens junctions) und fleckförmige Desmosomen bilden eine starke adhäsive Verbindung zwischen den Epithelzellen und sorgen somit für eine mechanische Stabilisierung. Adherens Junctions bestehen aus Cadherinen, einer Familie von Transmembranproteinen, die homotypische Interaktionen mit Molekülen benachbarter Zellen ausbilden. Im Fall des epithelialen Cadherins (E-Cadherin) sind diese Interzellulärverbindungen calciumabhängig reguliert (Hyafil *et al.*, 1981). Eine Schädigung der Adherens Junction



verursacht eine Auflösung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, beeinträchtigt die Zellpolarisierung und Differenzierung und induziert Apoptose. Darüber hinaus ist die Präsenz einer intakten Adherens Junction Voraussetzung für den Aufbau und die Erhaltung der Tight Junction (Gumbiner, 1987; Hermiston & Gordon, 1995).

### 1.1.2 Tight Junctions

Die Tight Junction (TJ) ist am apikalen Ende der lateralen Plasmamembran lokalisiert und grenzt funktionell die apikale von der basolateralen Zellmembran ab. Sie stellt die limitierende Struktur für die parazelluläre Permeabilität des Epithels dar. Einerseits schränkt sie den Solutflux entlang des parazellulären Spalts ein, was als *gate function* bezeichnet wird. Andererseits verhindert sie die Diffusion von transmembranären Proteinen oder Lipiden innerhalb der Zellmembranen zwischen apikaler und basolateraler Seite. Diese sogenannte *fence function* dient der Aufrechterhaltung der apikal-basolateralen Polarität, was unter anderem für die Lokalisation von Transportproteinen in der Membran entscheidend ist.

Tight Junctions weisen in verschiedenen Organen und sogar in den Segmenten von Organen eine unterschiedliche Dichtigkeit auf. Während sie in der Harnblase den parazellulären Spalt fast vollständig abdichten, bilden sie in einigen Nierensegmenten parazelluläre Kationen- und Anionen-spezifische Poren (Amasheh *et al.*, 2002; Colegio *et al.*, 2002; Colegio *et al.*, 2003). Der Transport von größeren Soluten, wie Proteinen oder Lipopolysacchariden (LPS), kann nur über eine lecke Route erfolgen (Watson *et al.*, 2005; Van Itallie *et al.*, 2008). Obwohl die maximale Partikelgröße bisher noch nicht explizit bestimmt wurde, wird eine Passage intakter Bakterienzellen allerdings ausgeschlossen. Die Ladungs- und Größenselektivität sowie die Dichtigkeit der TJ können individuell oder durch physiologische oder pathophysiologische Stimuli reguliert werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die TJ als Netzwerk von zahlreichen kontinuierlichen Strängen, die sich aus intramembranären Partikeln zusammensetzen (Staehein, 1973). Tight Junctions sind Multiproteinkomplexe, die von vier verschiedenen Typen von Transmembranproteinen gebildet werden, nämlich Occludin, junctionalen Adhäsionsmolekülen (JAMs), verschiedenen Claudinen und Tricellulin. Diese Proteine interagieren sowohl untereinander als auch mit peripheren Membranproteinen (ZO-1, ZO-2, ZO-3 und Zingulin) sowie diversen Zytoskelett-assoziierten (Actin, Myosin) und regulatorischen Komponenten (z.B. Kinasen), was für die strukturelle Organisation des junctionalen Komplexes und für die Signaltransduktion von Bedeutung ist (Izumi *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2001).

#### Occludin

Occludin wurde als erstes TJ-Protein entdeckt und identifiziert (Furuse *et al.*, 1993). Es handelt sich hierbei um ein Tetraspan-Protein mit zwei extrazellulären Schleifen und drei intra-

zellulären Bereichen (Abb. 1.2a). Die drei bekannten Occludin-Isoformen besitzen eine Größe zwischen 62 und 83 kDa (Mankertz *et al.*, 2002). Die physiologische Rolle von Occludin ist bisher weniger gut verstanden. Die Ausbildung intakter TJ-Stränge ist in Occludin-defizienten embryonalen Stammzellen nicht beeinträchtigt (Morita *et al.*, 1998). Auch Occludin-defiziente Mäuse weisen keine Beeinträchtigung der Barrierefunktion auf (Saitou *et al.*, 2000), zeigen aber einen Verlust der Parietalzellen und der H<sup>+</sup>-Sekretionsfähigkeit des Magenepithels (Schulzke *et al.*, 2005). Eine Überexpression resultiert hingegen in einem Anstieg des transepithelialen Widerstands (McCarthy *et al.*, 1996).

### Tricellulin

Das erst 2005 entdeckte Tricellulin weist Sequenzhomologien zu Occludin auf (Abb. 1.2b) und ist vorwiegend an trizellulären Zellkontaktpunkten lokalisiert. In der Erstbeschreibung wurde mittels RNA-Interferenz gezeigt, dass eine Suppression von Tricellulin zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere führt (Ikenouchi *et al.*, 2005). In einer Überexpressionsstudie konnte gezeigt werden, dass Tricellulin für die Abdichtung der trizellulären TJ gegenüber Makromolekülen essentiell ist (Krug *et al.*, 2009).

### Claudine

Die Familie der Claudine bildet in Säugetieren mit bisher 24 bekannten Mitgliedern die größte Gruppe von Transmembranproteinen. Diverse Funktionsstudien sowie die Phänotypisierung von auf Claudinmutationen beruhenden Erkrankungen konnten die funktionelle Relevanz der Claudine für die Regulation des selektiven, parazellulären Transports in den letzten Jahren zunehmend bestätigen. Obwohl die Funktion vieler Mitglieder noch weitgehend unbekannt ist, konnten einzelnen Claudinen bereits abdichtende oder porenbildende Eigenschaften zugeschrieben werden.

Strukturell sind die zwischen 20 und 27 kDa großen Claudine durch vier Transmembrandomänen sowie eine erste große und eine zweite kleinere extrazelluläre Schleife (ECL1 und ECL2) charakterisiert. Sowohl der N- als auch der wesentlich längere C-Terminus sind im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 1.2c). Für die Barriere- bzw. Kanaleigenschaften ist vorwiegend die ECL1 ausschlaggebend, während der ECL2 hauptsächlich Bindungs- und Rezeptorfunktionen zukommen (Krause *et al.*, 2008). Die größte strukturelle Heterogenität zwischen den verschiedenen Claudinen offenbart sich im C-Terminus, der in einem PDZ-Bindemotiv endet. Über dieses ist eine Interaktion mit verschiedenen Gerüstproteinen wie z.B. ZO-1 und -2, die eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen oder anderen TJ-assoziierten Komponenten möglich (Itoh *et al.*, 1999; Hamazaki *et al.*, 2002).

Die strukturelle und molekulare Ebene, auf der Claudine zur Porenbildung oder Abdichtung des parazellulären Spalts miteinander interagieren, ist noch nicht vollständig verstanden. Es

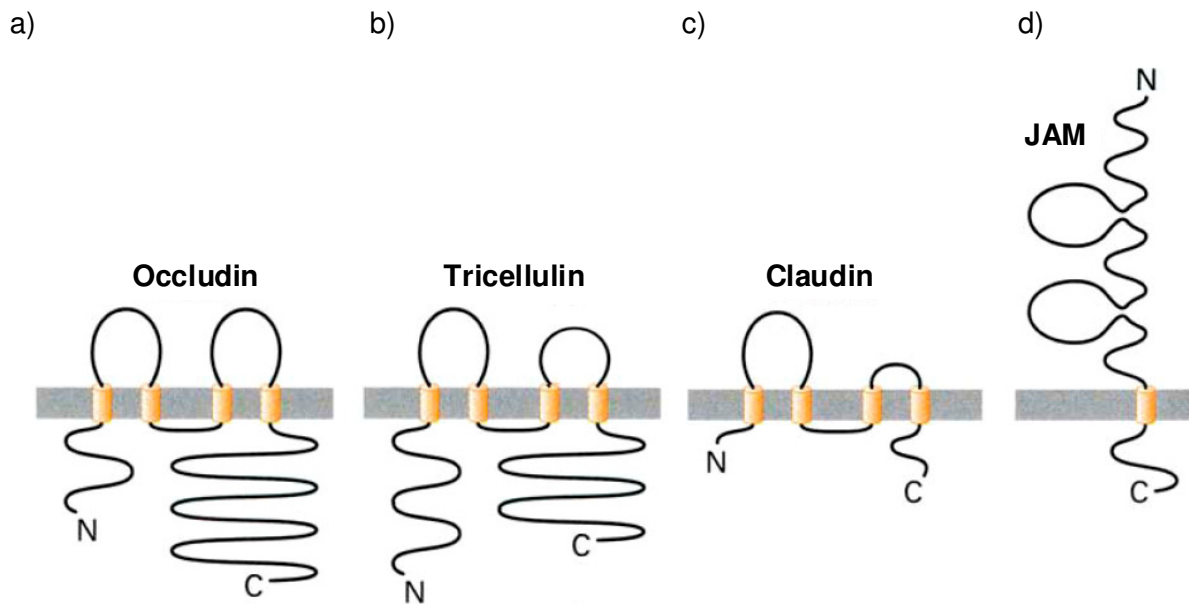
bestehen Interaktionen zwischen verschiedenen Claudinmolekülen (heterophil) als auch zwischen Molekülen eines Claudintyps (homophil) (Furuse *et al.*, 1999). Diese Interaktionen können in der Plasmamembran derselben Zelle (*cis*-Interaktion) oder zwischen den Membranen sich gegenüberliegender Zellen (*trans*-Interaktion) stattfinden (Krause *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass mindestens zwei – möglicherweise bis zu sechs – interagierende Claudine die unterschiedlichen Barriere- bzw. Kanaleigenschaften bestimmen. Somit ergeben sich die jeweiligen Eigenschaften der Claudine erst im Zusammenhang der *cis*- oder *trans*-Interaktionen mit benachbarten gleichen oder anderen Claudinen (Heiskala *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2006; Angelow *et al.*, 2007; Krause *et al.*, 2008).

Die Funktion einzelner Claudine konnte durch Überexpression, *Silencing* oder *Knock-out* charakterisiert werden. So zeigte sich, dass Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 eindeutig abdichtende Funktion haben (Van Itallie *et al.*, 2001; Furuse *et al.*, 2002; Amasheh *et al.*, 2005; Amasheh *et al.*, 2008; Milatz *et al.*, 2010). Andere Claudine, wie z.B. Claudin-2, -10b und -15, fungieren als parazelluläre Kationenkanäle (Amasheh *et al.*, 2002; Gunzel *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2010), während Claudin-10a Eigenschaften eines Anionenkanals aufweist (Van Itallie *et al.*, 2006). Für Claudin-2 konnte darüberhinaus nachgewiesen werden, dass es einen parazellulären Wasserkanal bildet (Rosenthal *et al.*, 2010).

Die Claudin-Zusammensetzung ist gewebespezifisch, kann aber in Hinblick auf verschiedene Stimuli, wie Umwelteinflüsse, Entwicklungsprozesse oder physikalische Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte angepasst bzw. verändert werden. Dieses kann sowohl auf dem Level der Genexpression oder auch durch posttranslationale Modifikationen erfolgen. Letzteres wird insbesondere über Phosphorylierung des C-Terminus durch verschiedene Kinasen (z.B. Proteinkinase A und C, MAP-Kinasen oder Rho-Kinasen (Fujibe *et al.*, 2004; D'Souza *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2008)) oder auch durch Palmitoylierung bewirkt (Van Itallie *et al.*, 2005).

#### JAM (Junctional Adhesion Molecule)

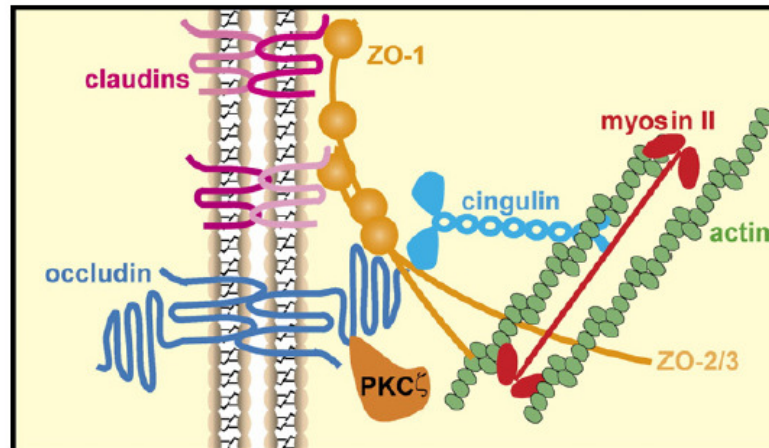
Die 36 bis 41 kDa großen JAM-Proteine gehören zur Superfamilie der Immunoglobuline. Im Vergleich mit anderen TJ-Proteinen durchspannen sie die Zellmembran nur einmal (Martin-Padura *et al.*, 1998) (Abb. 1.2d). Anhand der Länge des zytoplasmatischen C-Terminus und der jeweiligen Bindungsmotive werden zwei Untergruppen unterschieden, die einerseits JAM-A, JAM-B und JAM-C und andererseits CAR (*cox sackie and adenovirus receptor*), E-SAM (*endothelial cell-selective adhesion molecule*) und JAM-4 umfassen. Funktionell weisen diese Proteine keine Barrierefunktion auf, spielen aber unter anderem eine Rolle für die Zell-Zell-Adhäsion und tragen zur Ausbildung der TJ-Struktur in Epithelien und Endothelien bei (Ebnet *et al.*, 2004).



**Abb.1.2: Molekulare Strukturen von TJ-Proteinen.** a) Occludin, b) Tricellulin, c) Claudine und d) JAM (modifiziert nach Tsukita *et al.*, 2001)

### 1.1.3 TJ-assoziierte Proteine

An der Assemblierung, Aufrechterhaltung und Regulation der TJ sind verschiedene Proteine beteiligt, die über multiple Interaktionsdomänen mit den TJ-Proteinen assoziiert sind (Abb. 1.3). Typische Mitglieder dieser Familie sind unter anderem die Zonula occludens Proteine (ZO-1 bis -3), Zingulin, MUPP1 (*multi-PDZ-domain protein 1*) oder Mitglieder der MAGUK-Familie (*membrane-associated guanylate kinases*). Diesen kommt entweder eine regulatorische Funktion zu oder sie agieren als Gerüstproteine (*scaffold proteins*), wie beispielsweise ZO-1. Dieses periphere Membranprotein besitzt drei PDZ-Domänen und eine Aktin-Binderegion, über die es die verschiedenen Transmembranproteine an das Myosin-Aktin-Zytoskelett (Hartsock & Nelson, 2008) koppeln und in der Membran verankern kann (Fanning & Anderson, 2009). Ferner ist die strukturelle und funktionale Integrität der TJ von der Präsenz des perijunctionalen Myosin-Aktinrings abhängig, der ebenfalls zur parazellulären Permeabilität beitragen kann (Bentzel *et al.*, 1980; Sheff *et al.*, 2002).



**Abb.1.3: Molekulare Zusammensetzung der TJ.** Für den strukturellen Aufbau und die Funktion der epithelialen TJ sind drei Hauptgruppen von Proteinen relevant: Transmembranproteine wie Claudine, Occludin oder Tricellulin, zytoplasmatische Gerüstproteine wie ZO-1, ZO-2, ZO-3 sowie weitere Komponenten des Zytoskeletts und Signalproteine wie zum Beispiel PKC $\zeta$  (Yu & Turner, 2008).

## 1.2. Barrierestörung und pathophysiologische Bedeutung

Die Störung der epithelialen Barrierefunktion hat zwei Folgen: Einerseits erlaubt eine leckere Barriere eine Diffusion von Ionen und Wasser aus der Zirkulation in das intestinale Lumen und bedingt somit eine sogenannte Leckflux-Diarrhö. Andererseits können Antigene und Makromoleküle aus dem intestinalen Lumen in die Zirkulation übertreten und dort insbesondere zur Entstehung oder Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen beitragen. Beispiele hierfür sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Immunzellen der Darmmukosa werden hier durch eine leckere Barriere verschiedenen Antigenen aus dem Darmlumen ausgesetzt, was im Krankheitsfall zu einer nicht adäquaten Immunantwort führt (Fiocchi, 1998; Podolsky, 2002) und eine chronische Inflammation des Darmepithels hervorruft (Sandle *et al.*, 1990). Normalerweise ist die Translokation von Bakterien, Antigenen und Makromolekülen über die intakte intestinale Barriere sehr gering. In bestimmten Regionen des Gastrointestinaltraktes können M-Zellen, das Follikel-assoziierte Epithel oberhalb der Peyerschen-Plaques sowie transepitheliale Ausläufer Antigen-präsentierender Zellen zur Translokation von Antigenen beitragen. Einzelne auf diesem Weg translozierte Mikroorganismen oder Antigene werden gewöhnlich durch Lymphozyten, Makrophagen und IgA-produzierende Plasmazellen abgefangen.

Eine leckere Darmbarriere wird häufig durch eine veränderte Struktur, Zusammensetzung und/oder Funktion der epithelialen TJ bedingt. Aber auch andere strukturelle Veränderungen des Darmepithels wie Apoptosen, Erosionen und Ulcerationen können ursächlich sein. Induziert werden solche Schädigungen des Darmepithels insbesondere durch Infektionen mit enteropathogenen Erregern oder auch durch bestimmte therapeutische Maßnahmen (Antibiotikatherapie, Radiotherapie).

Intestinale Infektionen, die zum Beispiel durch bakterielle Erreger, wie Salmonellen, Shigellen, enteropathogene *E. colis* (EPEC) oder Yersinien hervorgerufen werden, 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 Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion sind hier die Induktion lokaler Zellschäden, wie Apoptosen, Nekrosen oder fokaler Läsionen (Troeger *et al.*, 2007; Bucker *et al.*, 2009; Epple *et al.*, 2009), die Aktivierung inflammatorischer Kaskaden und insbesondere die Störung der epithelialen TJ-Integrität zu nennen (Berkes *et al.*, 2003).

Die Einflussnahme auf die Struktur und Funktion der TJ variiert zwischen den verschiedenen Pathogenen. EPEC oder auch *Clostridium difficile* induzieren beispielsweise eine Umlagerung des Zytoskeletts in der Wirtszelle. Dieses führt wiederum zu Veränderungen im perijunctionalen Myosin-Aktinring und hat somit indirekt Auswirkungen auf die Regulation der epithelialen TJ. Einzelne TJ-Proteine können jedoch auch direkt betroffen sein und von bakteriellen Proteasen degradiert oder durch biochemische Prozesse wie Phosphorylierung oder Dephosphorylierung in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Wu *et al.*, 1998). So ist bekannt, dass Claudin-3 und -4 dem *C. perfringens* Enterotoxin CPE als Rezeptoren dienen (Sonoda *et al.*, 1999). Das milde bis moderate Diarrhöen verursachende zweite Enterotoxin ZOT (*zonula occludens toxin*) des Cholera-Erregers *Vibrio cholerae* bewirkt dagegen eine Umverteilung von ZO-1 aus der TJ heraus (Fasano *et al.*, 1991).

Im Vergleich zu den genannten Beispielen sind die Mechanismen anderer Durchfallerreger weniger gut verstanden. So wurde bereits vor mehreren Jahren in einem Mausmodell beobachtet, dass die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* in einem Widerstandsabfall des Dünndarmepithels resultierte. Zwar konnten elektrogene Chloridsekretion oder Malabsorption als Ursache ausgeschlossen werden, die molekularen Mechanismen der *Y. enterocolitica*-induzierten Barrierestörung sind bislang jedoch nicht entschlüsselt (Gogarten *et al.*, 1994).

### **1.3 *Yersinia enterocolitica***

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und umfasst derzeit 10 Arten. Von diesen gelten neben dem Pesterreger *Yersinia pestis* auch *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* als humanpathogen.

*Y. enterocolitica* ist ein gramnegatives, enteropathogenes, psychrotolerantes Stäbchenbakterium, dessen Wachstumsoptimum bei ca. 27 °C liegt. Aufgrund biochemischer Eigenschaften werden *Y. enterocolitica* in 6 Biotypen (1A, 1B, 2, 3, 4, und 5) unterteilt (Wauters *et al.*, 1987). Zusätzlich erfolgt anhand von Oberflächenantigenen eine Unterscheidung verschiedener Serotypen. In Europa sind die Serotypen O:3, O:9 und O:5,27 medizinisch relevant, in Nordamerika die Serotypen O:3, O:8, O:13, O:20 und O:21. Diese obligat pathogenen

Stämme zählen zu den Biotypen 1B und 2 bis 5. Der Biotyp 1A umfasst hingegen verschiedene primär apathogene Serotypen, die in der Umwelt, als Saprophyten im Darm oder gelegentlich auch als Opportunisten bei Wundinfektionen vorkommen.

*Y. enterocolitica* ist weit verbreitet und kommt insbesondere in warmblütigen Wild-, Nutz- und Heimtieren sowie Reptilien, Fischen, Muscheln, Insekten und aquatischen Habitaten vor. Das Schwein gilt als Hauptreservoir für die humanpathogenen Biotypen 2 bis 4 (Bottone, 1997), ist aber selbst symptomfrei. Somit stellen fäkal kontaminierte Nahrungsmittel tierischer Herkunft oder aber auch verunreinigtes Trinkwasser die primären Infektionsquellen für den Menschen dar. Nosokomiale Übertragungen oder parenterale Infektionen durch Bluttransfusionen sind weniger häufig (Cover & Aber, 1989; Aleksic & Bockemuhl, 1990). Für die Prävention ist insbesondere die Psychrotoleranz von *Y. enterocolitica* problematisch, da aufgrund dessen eine Vermehrung auch bei intakter Kühlkette erfolgt.

### 1.3.1 Klinisches Bild der *Y. enterocolitica*-Infektion (Pathogenese)

Intestinale Infektionen mit *Y. enterocolitica* verursachen beim Menschen in erster Linie Darmerkrankungen wie akute Enteritis und Enterokolitis, mesenteriale Lymphadenitis oder terminale Ileitis. Die Inkubationszeit liegt zwischen drei und sieben Tagen. Während Kleinkinder häufiger an einer Enterokolitis leiden und Jugendliche eher eine mesenteriale Lymphadenitis entwickeln, kommt es beim Erwachsenen typischerweise zu einer Ileitis oder Enterokolitis sowie zu einer wässrigen Diarrhö. In den meisten Fällen verläuft die *Yersinia*-induzierte Diarrhö innerhalb von wenigen Tagen bis (selten) vier Wochen selbstlimitierend, so dass es meist keiner Antibiose bedarf. Chronische Verläufe sind weniger häufig zu beobachten und treten insbesondere bei Kindern unter fünf Jahren auf.

Abhängig von Alter und Immunstatus des Patienten können intestinale Infektionen jedoch Auslöser für extraintestinale, immunologisch bedingte Folgeerkrankungen sein (Koornhof *et al.*, 1999; Smego *et al.*, 1999). Hier sind vor allem reaktive Arthritis und seltener Myokarditis, Glomerulonephritis, Thyroiditis, Uveitis oder Erythema nodosum zu nennen. Patienten mit reaktiver Arthritis weisen im Blut erhöhte IgA-Titer auf, was auf eine Persistenz der Erreger im Körper hindeutet (de Koning *et al.*, 1989). Allerdings sind bei diesen Patienten ausschließlich *Y. enterocolitica*-Antigene (z.B. LPS oder *Yersinia heat shock antigen*), nicht aber lebende Yersinien oder deren DNA in den entzündeten Gelenken nachweisbar (Granfors *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde *Y. enterocolitica* sogar auch schon als Auslöser für chronisch entzündliche Darmerkrankungen diskutiert (Saebo *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Virulenzfaktoren

Als Faktoren, die zur Virulenz von *Y. enterocolitica* beitragen, werden sowohl chromosomal- als auch plasmidkodierte Proteine verantwortlich gemacht.

Lange Zeit wurden Stämme, die das *Yersinia* Virulenzplasmid pYV tragen, als obligat pathogen und solche, denen es fehlt, als apathogen (Stämme des Biotyp 1A) eingestuft. Mittlerweile sind jedoch auch Fälle sowie einzelne nosokomiale Ausbrüche mit Biotyp-1A-Stämmen bekannt, die sich in ihrem Verlauf nicht wesentlich von Infektionen mit virulenzplasmidtragenden Stämmen der übrigen Biotypen unterscheiden (Ratnam *et al.*, 1982; Tennant *et al.*, 2003).

### Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren

Die Biotypen 1B und 2 bis 5 tragen das ca. 70 kb große Virulenzplasmid pYV. Ein großer Teil der auf diesem Plasmid kodierten genetischen Information dient dem Aufbau eines Typ-III-Protein-Sekretions- und Translokationssystems (*Type Three Secretion System: TTSS*). Neben den strukturellen Komponenten des Sekretionsapparates (*Yersinia secretion: Ysc*) sind hier das *Yersinia adhesion protein A*, sechs Effektorproteine und ihre Chaperone sowie verschiedenen regulatorische Faktoren kodiert.

#### *Yersinia adhesin A (YadA)*

YadA ist ein Protein der äußeren Membran, das ausschließlich bei 37 °C exprimiert wird. Neben der Wirtszelladhäsion vermittelt es auch Resistenz gegenüber Opsonierung (El Tahir & Skurnik, 2001).

#### *Yersinia outer proteins*

Bei Kontakt von *Y. enterocolitica* mit der eukaryotischen Zelle wird der Sekretionsapparat (Injektisom) aufgebaut und Effektorproteine, die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops) werden über den Kanal in die Wirtszelle injiziert. Ein effizienter Export ist dabei von der Anwesenheit verschiedener zytosolischer Chaperone (z.B. SycE, SycT und SycH) abhängig. Die in die Wirtszelle translozierten Yops interferieren mit verschiedenen Targetproteinen (Aktin, kleine GTPasen) und Signalkaskaden (u.a. MAPK und NF- $\kappa$ B). Sie verhindern bzw. verzögern durch Destruktion des Aktinzytoskeletts, Inhibition der Phagozytose (YopE, YopT, YopH, YopO), Hemmung des *chemoattractant protein* MCP1 (Yop H) oder auch durch Inhibition der Zytokinproduktion und Depletion von NK-Zellen (YopM) sowohl die angeborene als auch die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort (Viboud & Bliska, 2005; Matsumoto & Young, 2009).

#### *Regulation der Expression*

Die Regulation der Genexpression auf dem Virulenzplasmid erfolgt temperaturabhängig. Wird die Wachstumstemperatur von 27 auf 37 °C erhöht, kommt es zu einer Verlangsamung des Wachstums und die Transkription der *yop*-Gene wird durch den Transkriptionsaktivator



VirF induziert (Cambronne *et al.*, 2000). Die Gene zur Regulation, Sezernierung und Translokation von Yops sind in der *lcr*-Region (*low calcium response*) des pYV kodiert, die sich aus den fünf Hauptloci *virA*, *virB*, *virC*, *virF* und *virG* zusammensetzt. Als negative Regulatoren der *yop*-Transkription sind *YscM1* und *YscM2* bekannt (Stainier *et al.*, 1997).

### Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren

#### *Invasin*

Die Expression von Invasin, einem weiteren Protein der äußeren Bakterienmembran, erfolgt hauptsächlich bei Temperaturen unter 30 °C in der frühen stationären Wachstumsphase (Revell & Miller, 2000). Solche Bedingungen finden sich beispielsweise in gekühlten Nahrungsmitteln, mit denen *Y. enterocolitica* aufgenommen wird.

Invasin ist insbesondere für die erste Phase der Infektion von Bedeutung, da es eine effiziente Translokation des Erregers über das intestinale Epithel in die darunter liegenden Peyerschen-Plaques vermittelt (Kinder *et al.*, 1993; Pepe & Miller, 1993; Kampik *et al.*, 2000).

Das Invasinprotein, das von beiden enteropathogenen Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* exprimiert wird, ist in der Lage mit hoher Affinität an auf der Zelloberfläche exponierte  $\beta$ 1-Integrine zu binden (Isberg, 1990). Interessanterweise weist Invasin eine wesentlich höhere Affinität zu Integrin auf, als der eigentliche Ligand Fibronectin (Hamburger *et al.*, 1999). Die Invasin-vermittelte Internalisierung des Erregers erfolgt über den sogenannten Reißverschlussmechanismus, der durch eine Invasin-Oligomerisierung und anschließende Zusammenlagerung der Integrine auf der Zelloberfläche induziert wird. Eine daraus resultierende Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden (*focal adhesion kinase*, Src, Rac und Phosphoinositol 3-Kinase) bewirkt eine Umlagerung des Aktinzytoskeletts und schließlich die Aufnahme des Bakteriums (Alrutz & Isberg, 1998).

Von typischen Epithelzellen wird *Y. enterocolitica* *in vivo* kaum internalisiert (Hanski *et al.*, 1989; Hanski *et al.*, 1990). Im Darm erfolgt eine durch Invasin vermittelte Aufnahme insbesondere über zwischen den Enterozyten lokalisierte M-Zellen. Als Grund hierfür wird spekuliert, dass differenzierte, polarisierte Epithelzellen im Gegensatz zu M-Zellen  $\beta$ 1-Integrine ausschließlich basolateral exponieren (Pepe *et al.*, 1995; Schulte & Autenrieth, 1998; Kampik *et al.*, 2000). Im Mausmodell sind Invasin-defiziente Mutanten 80-fach weniger invasiv als der Wildtyp und können erst mit einer Verzögerung von drei bis vier Tagen die Peyerschen-Plaques kolonisieren (Pepe & Miller, 1993; Pepe *et al.*, 1995). Plasmidlose, Invasin-exprimierende *Y. enterocolitica* sind hingegen in der Lage an das Epithel effizient zu adhären und dieses zu internalisieren (Schulte *et al.*, 1996).

### *Ail*

Dem membranassoziierten Ail-Protein (*attachment and invasion locus*) werden zwei Funktionen zugeschrieben. Einerseits spielt es eine Rolle für die Adhäsion und Internalisierung von Wirtszellen, wobei jedoch angenommen wird, dass es nicht wie Invasin für die Initiierung, sondern im späteren Verlauf der Infektion für die Dissemination im Wirt von Bedeutung ist (Miller & Falkow, 1988; Miller *et al.*, 1989). Darüber hinaus vermittelt Ail, wie auch YadA, Serumresistenz (Bliska & Falkow, 1992). Das Expressionsmaximum von Ail liegt bei 37 °C (Pierson & Falkow, 1993).

### *Flagellen*

Bei Temperaturen unter 30 °C, bei denen *Y. enterocolitica* typischerweise aus der Umwelt aufgenommen wird, ist der Erreger peritrich begeißelt und somit motil. Bei 37 °C sind Yersinien hingegen nicht flagelliert und unbeweglich (Kapatral & Minnich, 1995). Zudem wurde gezeigt, dass die Motilität von *Y. enterocolitica* für die Initiierung der Wirtszellinvasion benötigt wird (Young *et al.*, 2000).

### *Lipopolysaccharide*

Bei gramnegativen Bakterien gelten die in der äußeren Membran verankerten LPS insbesondere als initialer Stimulus für Sepsis (Schletter *et al.*, 1995; Ulevitch & Tobias, 1995). Hierbei sind freigesetzte LPS als Endotoxin in der Blutbahn wesentlich wirksamer als bakteriengebundene LPS.

*Y. enterocolitica* bildet in Abhängigkeit von der Temperatur raue, kurzkettige (37 °C) oder glatte, langkettige LPS (< 30 °C) aus. Hinsichtlich der Virulenz sind die drei LPS-Komponenten (Oligosaccharidkern, Lipid-A und Polysaccharidseitenketten) in unterschiedlichem Ausmaß involviert und spielen unter anderem auch eine Rolle für die Vermittlung von Serumresistenz (Skurnik & Zhang, 1996; Najdenski *et al.*, 2003; Skurnik & Bengoechea, 2003).

### *Enterotoxin Yst-A*

Die Rolle des hitzestabilen Enterotoxins Yst-A (*Yersinia-heat-stable enterotoxin*) für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* ist bisher nicht geklärt.

Sowohl im Mäusedarm als auch in Zellkulturen stimuliert Yst-A die Guanylatcyclase und bewirkt einen Anstieg intrazellulärer cGMP-Level (Rao *et al.*, 1979; Inoue *et al.*, 1983). Jüngere Arbeiten zeigen eine Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern über eine Erhöhung der Inositoltrisphosphat (IP3)-Level (Saha *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2009). Allerdings wird das *ystA*-Gen vorwiegend bei Temperaturen unter 30 °C transkribiert. Allerdings konnte durch eine Anhebung der Osmolarität und des pH-Wertes auf das im Ileum vorherrschende

Niveau auch eine Synthese bei 37 °C *in vitro* beobachtet werden (Mikulskis *et al.*, 1994). Eine tatsächliche Produktion unter physiologischen Bedingungen im humanen Wirt wurde bisher doch nicht nachgewiesen. Auch die Induktion von Diarrhöen durch enterotoxinnegative *Y. enterocolitica* (Schiemann, 1981) sprechen bisher gegen eine Involvierung des Toxins.

Einen Überblick über die Virulenzfaktoren gibt Tabelle 1.1.

**Tabelle 1.1: *Y. enterocolitica*-Virulenzfaktoren.**

Virulenzfaktor	Lokalisierung	Funktion	Expressionstemperatur
<b>Ail</b>	Chromosom	Adhäsion, Schutz	37 °C
<b>Flagellin</b>	Chromosom	Motilität	< 30 °C
<b>Invasin</b>	Chromosom	Internalisierung	< 30 °C
<b>LPS</b>	Chromosom	Endotoxin	< 30 °C und 37 °C
<b>TTSS</b>	pYV	Yop-Translokation	37 °C
<b>YadA</b>	pYV	Adhäsion, Schutz	37 °C
<b>Yops</b>	pYV	Wirtszellparalyse	37 °C
<b>Yst-A</b>	Chromosom	Chloridsekretion ?	< 30 °C

### 1.3.3 Infektionsmodell

Das in Abb. 1.4 gezeigte Modell gibt den hypothetischen Infektionsweg von *Y. enterocolitica* wieder (Grassl *et al.*, 2003).

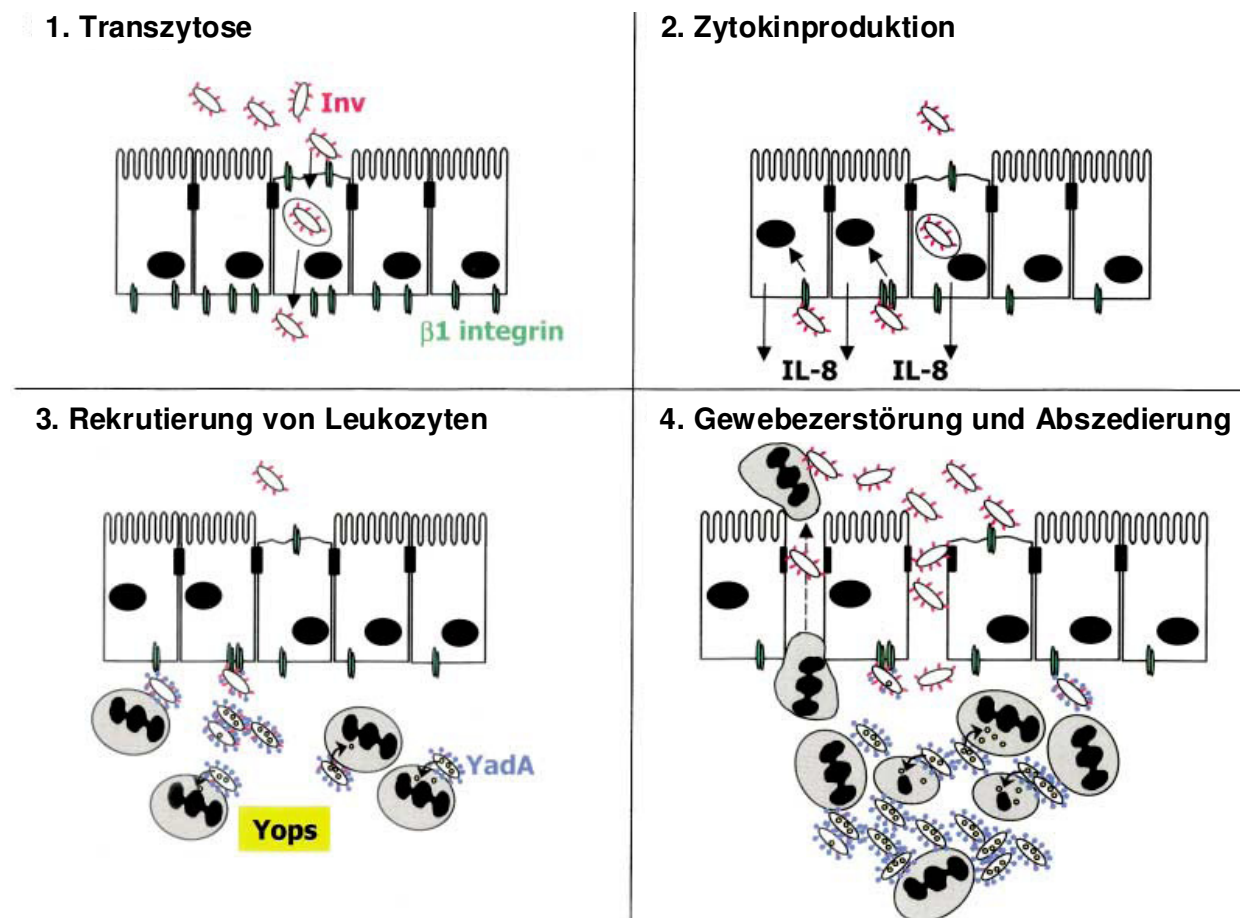
Wird der Erreger fäkal-oral oder über kontaminierte Nahrung bzw. Wasser aufgenommen, passiert er den Magen und gelangt in den Darm, wo er die epitheliale Barriere primär über die zwischen den Enterozyten gelegenen M-Zellen durchquert. Diese spezialisierten Epithelzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, Partikel oder Makromoleküle zu binden, aufzunehmen und in Vesikeln oder Vakuolen verpackt zu transportieren. Dieses wird von *Y. enterocolitica* als auch von anderen enteropathogenen Erregern genutzt, um in die Peyerschen Plaques zu gelangen. Die Internalisierung von *Y. enterocolitica* erfolgt Invasin-vermittelt über den Reißverschlussmechanismus. Auf der serosalen Seite werden die Bakterien aus den M-Zellen freigesetzt (Kraehenbuhl & Neutra, 2000).

Hier wird spekuliert, dass *Y. enterocolitica* die Expression von inflammatorischen und chemotaktischen Zytokinen durch Interaktion mit den Epithelzellen an der basolateralen Zelloberfläche stimuliert (Kampik *et al.*, 2000). Ferner können Mikroabzesse und granulomatöse, inflammatorische Läsionen induziert werden (Hanski *et al.*, 1989; Autenrieth & Firsching, 1996).

Außerdem kommt es zur Replikation des Erregers und zur Expression plasmidkodierter Faktoren, wie YadA, TTSS und Yops. Die Expression von Invasin wird bei physiologischen Temperaturen herunterreguliert. Durch die Translokation von Yops in Immunzellen kann *Y.*

*enterocolitica* einer Phagozytose entgehen, Apoptose induzieren und schließlich eine adäquate Immunantwort unterdrücken (Aepfelbacher *et al.*, 2007).

Das Einwandern von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) über die epitheliale Barriere führt zur Zerstörung, was wiederum die Translokation von *Y. enterocolitica* (und auch anderen potentiellen Antigenen) in die Peyerschen-Plaques verstärkt. Letztlich kommt es zu einer Dissemination des Erregers in die mesenterialen Lymphknoten und Organe des retikulo-endothelialen Systems wie Leber und Milz (Autenrieth *et al.*, 1996; Trulzsch *et al.*, 2007).



**Abb. 1.4: Model der *Y. enterocolitica*-Infektion.** (1) *Y. enterocolitica* passiert die epitheliale Darmbarriere über die zwischen den Enterozyten befindlichen M-Zellen. Die Internalisierung wird durch Bindung von bakteriellem Invasin an die apikal exponierten  $\beta 1$ -Integrine der Zelle induziert. (2) Die Freisetzung der Bakterien aus den M-Zellen erfolgt in den Peyerschen-Plaques, wo sie sich vermehren und die Ausschüttung von inflammatorischen und chemotaktischen Zytokinen stimulieren. (3) Bei 37 °C exprimiert *Y. enterocolitica* antiphagozytotische Proteine, wie YadA und Yops. Durch die Translokation von Yops in das Zytoplasma von Immunzellen werden diese parallelisiert und eine Immunantwort unterdrückt. (4) Das Einwandern von PMNs über die epitheliale Barriere führt zur Zerstörung und die Translokation von *Y. enterocolitica* in die Peyerschen-Plaques wird verstärkt (modifiziert nach Grassel *et al.*, 2003).

## 1.4 Wirkung von Probiotika auf die intestinale Barriere

Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die nach Verabreichung in adäquaten Dosen eine positive, gesundheitsfördernde Wirkung auf den Organismus haben. Das Wort probiotisch ist aus dem Griechischen abgeleitet (*pro bios*) und lässt sich mit „für das Leben“ übersetzen. Bekannte und zum Teil bereits gut untersuchte probiotische Spezies umfassen verschiedene Lactobazillen, Bifidobakterien, Enterokokken, *E. coli*-Bakterien und Hefen. Neben diversen experimentellen Untersuchungen an Zell- und Tiermodellen konnte auch in klinischen Studien eine positive Wirkung von Probiotika auf die Darmgesundheit nachgewiesen werden. Therapeutische Effekte zeigten sich bei CED, Diarrhö, Reizdarmsyndrom, Glutenintoleranz, Gastroenteritis und Darmkrebs (Broekaert & Walker, 2006; Yan & Polk, 2006; Yan & Polk, 2010). Zwar werden Probiotika mitunter zur alternativen Behandlung genutzt, die Einsatzmöglichkeiten sind jedoch noch nicht ausreichend evaluiert, da insbesondere die spezifischen Wirkmechanismen bislang nicht vollständig identifiziert und verstanden sind.

Als potentielle Wirkmechanismen werden verschiedene probiotische Eigenschaften diskutiert, die die intestinale Epithelzellfunktionen auf zellulärer und molekularer Ebene regulieren. So ist bekannt, dass Probiotika antibakterielle oder zytoprotektive Substanzen (Bakteriozine, Säuren) produzieren. Einige *Lactobacillus*-Stämme hemmen zum Beispiel das Wachstum von *Salmonella enterica* durch Milchsäureproduktion (Makras *et al.*, 2006). Andere Laktobazillen oder auch verschiedene Bifidobakterien können mit Pathogenen um Adhäsionsstellen an der Wirtszelle kompetieren (Moroni *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). *Saccharomyces boulardii* inhibiert im Zellmodell die Translokation von EPEC (Czerucka *et al.*, 2000) und auch die Invasion von Salmonellen (Martins *et al.*, 2010).

Ferner weisen viele probiotische Stämme immunmodulatorische Fähigkeiten auf. Die Induktion einer adäquaten Immunantwort kann über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder auch durch Internalisierung über M-Zellen und Interaktionen mit Dendritischen Zellen erfolgen. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass einige Probiotika inhibitorische Effekte auf die Produktion von inflammatorischen Zytokinen haben. So vermindern *Bifidobacterium animalis* und auch *Lactobacillus* GG eine durch enterotoxische *E. coli*s stimulierte Expression von Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-8 und -1 $\beta$  (Roselli *et al.*, 2006).

Wie bereits unter 1.2 erörtert, ist die Integrität der epithelialen TJ für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion essentiell. Verschiedene Studien haben belegt, dass Probiotika in der Lage sind, die epitheliale Barrierefunktion zu stärken oder auch die Reparatur einer geschädigten Barriere zu initiieren. *Lactobacillus casei* verhindert beispielsweise eine durch EPEC induzierte Zunahme der parazellulären Permeabilität und Delokalisierung von ZO-1 (Parassol *et al.*, 2005). *Bifidobacterium infantis* sezerniert einen aktiven Faktor, der im epithelialen T84-Zellkulturmodell einerseits die Expression von ZO-1 und Occludin verstärkt und andererseits das porenbildende Claudin-2 in seiner Expression reduziert (Ewaschuk *et al.*,

2008). In einem murinen Colitis-Modell konnte die probiotische-Mixtur VSL#3 eine Umverteilung und Verminderung der Proteinlevel von Occludin, ZO-1, Claudin-1, -3, -4, und -5 verhindern (Mennigen *et al.*, 2009).

Von besonderem Interesse der gegenwärtigen Forschung ist der probiotische Stamm *Escherichia coli* Nissle 1917. Dieses Bakterium gilt als Multitalent, da ihm immunmodulatorische, barriestabilisierende und auch kompetitive Fähigkeiten gegenüber Pathogenen zugeschrieben werden.

## 1.5 *E. coli* Nissle 1917

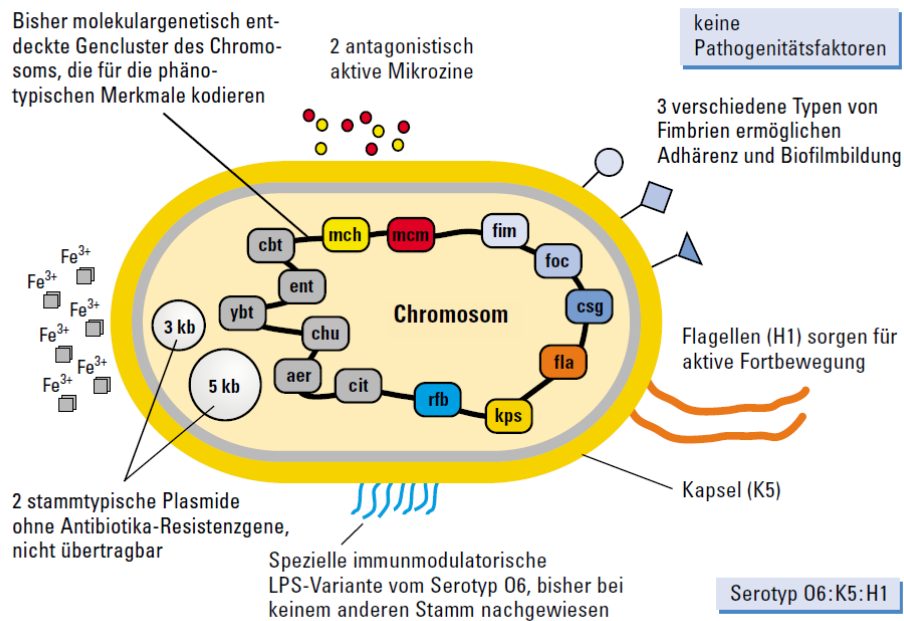
*E. coli* Nissle wurde im Jahr 1917 während des 1. Weltkriegs von Professor Alfred Nissle aus der Fäzes eines Soldaten isoliert, der im Unterschied zu seinen Kameraden nicht an Enterocolitis erkrankt war (Nissle, 1918). Daher trägt dieser seit über 90 Jahren therapeutisch erprobte Stamm den Namen *E. coli* Nissle 1917, kurz EcN. Gegenwärtig erfolgt seine Vermarktung unter dem Namen Mutaflor® in Form von Kapseln, die die Bakterien in lyophilisierter Form enthalten und nach oraler Verabreichung im terminalen Ileum freisetzen. In klinischen Studien konnten die probiotischen Effekte dieses gramnegativen Stäbchenbakteriums bei einer Reihe von gastrointestinalen Erkrankungen, wie zum Beispiel Colitis ulcerosa (Schutz, 1989; Kruis *et al.*, 1997), Morbus Crohn (Malchow, 1997), Kollagener Kolitis (Tromm *et al.*, 2004) oder Colon irritabile (Plassmann & Schulte-Witte, 2007) nachgewiesen werden. Unter anderem kann durch Applikation von EcN eine drastische Verkürzung des Diarrhöverlaufs erreicht werden (Henker *et al.*, 2007) sowie einem Rezidiv bei Colitis ulcerosa-Patienten genauso effektiv vorgebeugt werden wie durch das Standardmedikament Mesalazin (Kruis *et al.*, 2004).

### 1.5.1 Stammspezifische Charakteristika

Die therapeutische Wirksamkeit von EcN wird sowohl auf strukturelle Besonderheiten des Bakteriums als auch auf die Produktion verschiedener Signalstoffe zurückgeführt (Abb.1.5).

EcN gilt als relativ sicheres Arzneimittel, da dieser Stamm im Vergleich zu anderen *E. coli*-Stämmen nicht invasiv ist und keine Virulenzfaktoren besitzt. Die speziellen LPS vom Typ O6 weisen stark verkürzte Ketten auf, die zwar immunmodulatorisch wirksam, aber nicht immuntoxisch sind und keine Sepsis auslösen können (Grozdanov *et al.*, 2002). Des Weiteren besitzt EcN diverse Fitnessfaktoren, die ihm optimale Überlebenschancen im Darm verschaffen. Durch seine Fähigkeit zur Biofilmbildung (auch bei 37 °C) kann EcN das Darmepithel kolonisieren und somit einer schnellen Ausscheidung entgegenwirken bzw. Persistenz im Darm forcieren. Die Adhäsion an das Darmepithel sowie die Vernetzung werden durch die F1A-, F1C- und Curli-Fimbrien vermittelt. Weitere Kolonisationsvorteile bieten sich auch durch die Expression effektiver Eisenaufnahmesysteme und die Produktion und Frei-

setzung von Mikrozininen (Mikrozin M und H47), die als Bakteriozine insbesondere eine antibakterielle Wirkung auf nah verwandte Keime haben. Die Flagellen des H1-Typs sichern dem Bakterium in erster Linie eine aktive Fortbewegung durch den Mukus. Strukturell ist EcN von einer Polysaccharid-Kapsel des Typs K5 umgeben.



**Abb.1.5: Stammspezifische Charakteristika von *E. coli* Nissle 1917.** (Ardeypharm GmbH, modifiziert nach Blum-Oehler *et al.*, 2000)

### 1.5.2 Wirkmechanismen an der epithelialen Barriere

Zu den bereits publizierten probiotischen Effekten von EcN gehören die Induktion immunmodulatorischer Komponenten, die Homeostase und Regulation der intestinalen Mikroflora und Antagonisierung der Kolonisierung und Invasion des Darmepithels durch pathogene Mikroorganismen (Altenhoefer *et al.*, 2004) sowie die Stärkung und Regeneration der epithelialen Barrierefunktion (Zyrek *et al.*, 2007). Diese Prozesse werden sowohl durch eine intensive Kommunikation mit den Zellen des Darmepithels (*crossstalk*) als auch durch Interaktion mit der gegenwärtigen Darmflora induziert.

Im Hinblick auf eine verminderte Produktion immunprotektiver Komponenten in CED-Patienten ist der vor einigen Jahren veröffentlichte Induktionseffekt von EcN auf die Synthese des humanen  $\beta$ -Defensins-2, einem antimikrobiell wirkenden Peptid, von besonderer Bedeutung (Wehkamp *et al.*, 2004). Defensine bilden einen Teil der angeborenen Immunität der Darmmukosa und tragen somit zu einer generellen Stärkung der mikrobiellen Abwehr des Darmepithels bei. Die Stimulation erfolgt durch das Geißel-Strukturprotein Flagellin über einen NF $\kappa$ B- und AP-1-abhängigen Signalweg (Schlee *et al.*, 2007). Das Filament der Flagelle polymerisiert aus rund 20.000 Untereinheiten des Proteins Flagellin (FliC). Welche Beson-

derheit das EcN-Flagellin im Vergleich zum sehr ähnlich aufgebauten Flagellin anderer Enterobakterien aufweist, ist bisher jedoch ungeklärt.

Auch die das Bakterium umgebende Polysaccharid-Kapsel hat immunstimulatorische Eigenschaften. Wie erst kürzlich publiziert, spielt sie sowohl eine Rolle für die Anregung der Chemokinexpression als auch für die Expression von TLR-5 und seiner Adapterproteine MyD88 und TRIF (Hafez *et al.*, 2009; Hafez *et al.*, 2010).

Darüber hinaus kann EcN die Darmepithelzellen vor einer Invasion durch pathogene enteroinvasive Mikroorganismen schützen. Da hierfür weder ein direkter Kontakt zu den Epithelzellen noch zu den enteroinvasiven Erregern nötig ist, wird angenommen, dass dieses Phänomen durch sezernierte Signalmoleküle vermittelt wird. Die EcN-typischen Mikroazine spielen hierfür allerdings keine Rolle (Altenhoefer *et al.*, 2004).

Mehrere Beobachtungen stützen schließlich die Vermutung, dass EcN in der Lage ist, die epitheliale Barriere durch Regulation barriereassoziiertes Proteine zu stabilisieren bzw. wiederherzustellen. Diesbezüglich wurden bereits mehrfach stimulatorische Effekte von EcN auf die Expression und Lokalisierung von Zonula Occludens-Proteinen nachgewiesen.

Microarray-Analysen zeigen in mit EcN inkubierten T84-Zellen eine Hochregulation der Expression von ZO-2 und des Desmosomenproteins Penin (Cichon *et al.*, 2004). Ferner ist publiziert, dass EcN einer durch EPEC induzierten Barrierestörung durch Distribution von ZO-2 aus dem Zytoplasma in die Zellmembran entgegenwirken kann (Zyrek *et al.*, 2007). Im Maus-Kolitismodell führt die orale Verabreichung des Probiotikums zu einer deutlichen Absenkung der mukosalen Permeabilität, was mit einer Wiederherstellung der ZO-1-Proteinlevel einhergeht. Überdies ist eine Zunahme der ZO-1-Expression im Darmepithel auch in gnotobiotischen Mäusen nach Besiedlung mit EcN beschrieben (Ukena *et al.*, 2007). Eine direkte Einflussnahme auf barriererelevante TJ-Proteine wie Claudine oder Tricellulin ist für dieses Probiotikum bisher jedoch nicht beschrieben worden.



## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung von *Y. enterocolitica*-spezifischen Pathomechanismen an der epithelialen Barriere.

Obwohl die für *Y. enterocolitica* typischen Virulenzeigenschaften und -strategien zur Invasion des Darmepithels und zur Immunabwehr in den letzten Jahren entschlüsselt werden konnten, war der Diarrhö- und Barrierestörung-auslösende Mechanismus dieses typischen Durchfallerregers bislang noch ungeklärt.

Für die Untersuchungen wurde das etablierte HT-29/B6-Zellkultursystem genutzt, wobei der Versuchsansatz in der Infektion von auf Filtermembranen kultivierten epithelialen Zellmonolayern bestand. Wie bereits gezeigt werden konnte, verursacht *Y. enterocolitica* im murinen Modell einen Widerstandsabfall am Dünndarmepithel. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der transepitheliale Widerstand des Zellmonolayers als Maß für die Barriereintegrität genutzt. Neben ihren Permeabilitätseigenschaften sollten die infizierten Zellschichten auf lokale Zellschäden und insbesondere auf Veränderungen des Expressions- und Verteilungsmusters von TJ-Proteinen hin analysiert werden. Durch Einsatz spezifischer Inhibitoren war eine Aufklärung von eukaryotischen Signalkaskaden vorgesehen, über die die erregerspezifischen Effekte vermittelt werden. Zusätzlich wurde auch die Identifizierung eines ursächlichen Virulenzfaktors angestrebt.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Wirkung des Probiotikums *E. coli* Nissle 1917 auf die TJ-medierte Barriere. Die mildernde Wirkung dieses Bakteriums bei gastrointestinalen Störungen wie Diarrhöen wird unter anderem auf eine Stabilisierung der epithelialen Darmbarriere zurückgeführt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. So konnten zwar Effekte auf TJ-assoziierte Strukturkomponenten nachgewiesen werden, ein direkter Einfluss auf barrierebildende TJ-Proteine war bislang jedoch nicht bekannt. Daraus ergab sich die Fragestellung des zweiten Teilprojekts der vorliegenden Arbeit.

Da aus Vorarbeiten bereits bekannt war, dass vitale EcN oder aktiver Kulturüberstand einen Anstieg des transepithelialen Widerstands im HT-29/B6-Zellkulturmodell induzierten, wurde dieses für die Analyse potentieller TJ-Effekte genutzt.

Nach Stimulation der epithelialen Monolayer mit EcN-Kulturüberstand war zunächst eine funktionelle Charakterisierung durch Bestimmung elektrophysiologischer Parameter vorgesehen. In diesem Zusammenhang sollte auch die Barrierewirksamkeit des immunstimulatorischen EcN-Flagellins beleuchtet werden. Anschließend waren eine detaillierte Expressionsanalyse diverser TJ-Proteine und gegebenenfalls weiterführende molekulare Untersuchungen involvierter Proteine vorgesehen.

Beide Projekte dieser Arbeit wurden unabhängig voneinander durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Geräte

AD-Wandler	HEKA, Lambrecht
Begasungsbrutschrank, B5060 EC / CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Begasungsbrutschrank, Revco Ultima II	Thermo Electron, Karlsruhe
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
β-Counter: Tri-Carb2100TR	Packard, Frankfurt
Denton DV-502	Denton Vacuum Inc., New Jersey, USA
Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage R 200 D	Sartorius, Göttingen
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Fluoreszenz-Spektrometer SpectraMaxGemini	Molecular Devices, Ismaning
FRENCH <sup>®</sup> Press	ThermoSpectronic, Cambridge, UK
Heizblock Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Lambda 2, Spektrophotometer	Perkin Elmer, USA
Lumineszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer IKA-Combimag	Janke & Kunkei KG, Staufen i.Breisgau
Magnetrührstäbchen	Merck, Darmstadt
Messelektroden (STX-2)	World Precision Instruments, Berlin
Mikroskope:	
Elektronenmikroskop Zeiss 902	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Tokio, Japan
Konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 META	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop CK2	Olympus, Tokio, Japan
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Mikrotiterplattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Grödig, Österreich
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München
Mini-Trans-Blot-Zelle	Bio-Rad, München
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad, München
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim

Nucleofektionsgerät	Nucleofector II Amaxa, Köln
Photomultiplier	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Real-Time PCR-Cycler 7500 Fast	Applied Biosystems, Mannheim
Schüttelinkubator Aerotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttelinkubator Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach
Spektrophotometer Nano Drop 1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilwerkbank BSB4	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Mannheim
Ussing-Kammer	Institut f. Klin. Physiologie, Charité CBF Berlin
Verstärker (EPC9)	HEKA, Lambrecht
Voltage-Clamp-Apparaturen CVC6/8	Fiebig, Berlin
Vortex-Gerät	Pharmacia Biotech, Freiburg
Widerstandsmessgerät	Institut f. Klin. Physiologie, Charité CBF, Berlin
Wippe WT12	Biometra, Göttingen
Semi-Dry Transferzelle	Bio-Rad, München
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Wasserbad	Haake, Karlsruhe
Xenonlampe XPO, 75 W/2	Osram, München
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge Z233 MK	Hermle, Wehingen
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Mikrotiterplatten-Zentrifuge LMC-3000	Biosan, Riga, Lettland
Zentrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge AvantiJ25	Beckman, Krefeld

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-15	Millipore, Schwalbach
Centricon Plus 20	Millipore, Schwalbach
Cryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Filterpapier (3 mm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Glas-Vials	Perkin Elmer, Weiterstadt
Millicell PCF Filter	Millipore, Schwalbach
6-, 24-, 96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht

Objektträger: Menzel Gläser	Menzel, Braunschweig
optische 96-Loch-Platten	Perkin Elmer, Weiterstadt
PCR-Reaktionsgefäße (8-strip, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsplatten (MicroAmp Fast Optical 96-well)	Applied Biosystems, Mannheim
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rundboden-Röhrchen (14 ml)	Greiner Bio-One, Essen
Stabpipetten	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterilfilter (Sterivex 0,22 µm)	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter (ME DynaGard® 0,2 µm)	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
Transfer-Membran PVDF	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen, Ø 6 cm	Nunc, Wiesbaden

### 2.1.3 Laborchemikalien und Reagenzien

30% Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Amylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BAPTA-AM	Calbiochem, Darmstadt
BSA (100 ×)	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI	Boehringer, Mannheim
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande
Freon 22	Du Pont, Bad Homburg
FITC-Dextran 4000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fluoreszein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fura-2-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutaraldehyd (25%)	Serva, Heidelberg
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Mannitol	Merck, Darmstadt

[ <sup>3</sup> H]-Mannitol	Biotrend, Köln
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhypochlorit	KMF-Laborchemie-Handels-GmbH, Berlin
PBS <sup>+Ca/Mg</sup> -Lösung	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PBS <sup>-Ca/Mg</sup> -Lösung	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PBS-Tabletten	Life Technologies, Darmstadt
ProTaq MountFluor	Biocyc GmbH & Co. KG, Luckenwalde
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
SabSimplex	Parke-Davis GmbH, Berlin
Scintillationslösung Ultima Gold	Perkin Elmer, Weiterstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Life Technologies, Darmstadt
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Biorad, München
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Biorad, München
Triton X-100	Roche, Mannheim
Trypsin-EDTA	Gibco, Großbritannien
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

#### 2.1.4 Antibiotika

Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gentamycin	Gibco, Großbritannien
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Probenicid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

#### 2.1.5 Medien

Luria-Bertani (LB)	MP Biomedicals, Illkirch
Bacto-Agar	BD Bioscience, Frankreich
RPMI 1640	Biochrom KG, Berlin

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

### Anodenpuffer 1

300	mM	Tris/HCl, pH 9,4
-----	----	------------------

### Anodenpuffer 2

30	mM	Tris/HCl, pH 9,4
----	----	------------------

### BSA-Blockierungslösung

2,5	g	BSA
10	mg	Natriumazid

ad 50 ml PBS/Tween

### Elektrophoresepuffer

100	ml	10 × Puffer West
0,1	%	SDS

ad 1 l Aqua bidest.

### Gesamtlysepuffer

10	mM	Tris-Cl pH 7,5
150	mM	NaCl
0,5	%	Triton X-100
0,1	%	SDS

### Kathodenpuffer

25	mM	Tris/HCl, pH 9,4
40	mM	Aminocarbonsäure
0,1	%	SDS

### 5 × Laemmli Puffer

0,32	M	Tris pH 6,8
44	%	Glycerol
25	%	Merkaptoethanol
12,5	%	SDS
0,001	%	Bromphenolblau

## Lysepuffer A

10	mM	Imidazol
100	mM	KCl
300	mM	Saccharose
2	mM	MgCl <sub>2</sub>
10	mM	EGTA
1	mM	NaF
1	mM	NaVO <sub>2</sub>
1	mM	Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub>

## Mannitol-Ringer

21	mM	NaHCO <sub>3</sub>
238	mM	Mannitol
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,2	mM	CaCl <sub>2</sub>
3	mM	HEPES
10	mM	Glukose

## PBST

2	Tbl.	PBS
1	ml	Tween

ad 1 l Aqua bidest.

## Phospholysepuffer-Puffer

20	mM	Tris (pH 7,5)
150	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	mM	EGTA
1	mM	β-Glycerolphospat
2,5	mM	Natrium-Pyrophosphat
1	mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
1	%	Tritonx-100
1	µg/ml	Leupeptin (frisch zugeben)
1	mM	PMSF

## Ringerlösung

21	mM	NaHCO <sub>3</sub>
119	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,2	mM	CaCl <sub>2</sub>
3	mM	HEPES
10	mM	Glukose

## RIPA-Puffer

120	mM	NaCl
25	mM	Hepes pH 7,6
2	mM	EDTA
25	mM	NaF
1	%	Triton X-100

## Sammelgel

5	%	Acrylamid-Bis
125	mM	Tris-HCl Puffer pH 6,8
0,1	%	SDS
0,1	%	APS
0,1	%	TEMED

## Transferpuffer

100	ml	10 × Puffer West
100	ml	Methanol

ad 1 l Aqua bidest.

## Trenngel

0,35	mM	Tris-HCl Puffer pH 8,8
0,1	%	SDS
0,1	%	APS
0,05	%	TEMED

12,5%, 8,5% oder 7,5% Acrylamid-Bis

## Tris-Puffer

34	g	Tris-HCl
4,5	g	Tris-Base



44 g NaCl  
 5 ml Tween 20  
 ad 5 l Aqua bidest.

#### 10 × Puffer West

144 g Glycin  
 30,4 g HCl  
 ad 1 l Aqua bidest.

#### ZONAPSE-Puffer

0,1 % Triton X-100  
 0,15 M NaCl  
 5 mM EDTA  
 20 mM HEPES, pH 7,5  
 0,02 % NaN<sub>3</sub>

### 2.1.7 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

amaxa biosystems siRNA Kit	Lonza, Köln
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn
Cell Surface Protein Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL)	Roche, Mannheim
LumiLightPlus Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
peqGold TriFast	peQLaB, Erlangen
High-Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Mannheim
2xTaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Mannheim
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.8 Antikörper

**Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Spezies	Herkunft
Claudin-1	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Claudin-2	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Claudin-3	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Claudin-4	Maus	Zymed Laboratories, USA
Claudin-5	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Claudin-7	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Claudin-8	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Claudin-10	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA

Claudin-14	Ziege	Lifespan Biosciences, USA
Occludin	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
Tricellulin	Kaninchen	Huber, AG Klin. Chemie, CBF
ZO-1	Maus	Zymed Laboratories, USA
ZO-1 (polyklonal)	Kaninchen	Zymed Laboratories, USA
$\beta$ -Aktin	Kaninchen/Maus	Zymed Laboratories, USA
p38 MAPK	Kaninchen	Cell Signaling, USA
P~p38 MAPK	Kaninchen	Cell Signaling, USA
JNK MAPK	Kaninchen	Cell Signaling, USA
P~JNK MAPK	Kaninchen	Cell Signaling, USA
ERK 1/2 MAPK	Kaninchen	Cell Signaling, USA
P~ERK 1/2 MAPK	Kaninchen	Cell Signaling, USA
Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 anti-Ziege IgG	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin Alexa Fluor 594 konj.	<i>S. avidinii</i>	Thermo Fisher Scientific, Bonn
H1 (Antiserum)	Kaninchen	Statens Serum Institut, Kopenhagen

## 2.1.9 Inhibitoren

**Tabelle 2.2: Verwendete Inhibitoren**

Inhibitor	Ziel	Applikation	Herkunft
Bay11-7082	I $\kappa$ B- $\alpha$ -Kinase	10 $\mu$ M beidseitig	Calbiochem, Darmstadt
Calphostin C	PKC	0,1 $\mu$ M beidseitig	Calbiochem, Darmstadt
Complete <sup>EDTA frei</sup>	Proteasen	1 Tablette/10 ml	Roche, Mannheim
Genestein	PTK	50 $\mu$ M beidseitig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Leupeptin	Cys/Ser-Protease	1 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ly294002	IP3K	10 $\mu$ M basolateral	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ML-7	MLCK	10 $\mu$ M beidseitig	Enzo Life Sciences, Lörrach
PMSF	Serin-Protease	1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
SB202190	p38 MAPK	10 $\mu$ M beidseitig	Calbiochem, Darmstadt
SP600125	JNK MAPK	10 $\mu$ M beidseitig	Calbiochem, Darmstadt
L-JNKi1	JNK MAPK	2,5 $\mu$ M beidseitig	Enzo Life Sciences, Lörrach
U0126	ERK1/2 MAPK	10 $\mu$ M beidseitig	Calbiochem, Darmstadt

## 2.1.10 TaqMan Gene Expression Assays

**Tabelle 2.3: TaqMan Gene Expression Assays**

Gen	Assay-Nummer	Herkunft
claudin-2	Hs00252666_s1	Applied Biosystems, Mannheim
claudin-3	Hs00265816_s1	Applied Biosystems, Mannheim
claudin-8	Hs00273282_s1	Applied Biosystems, Mannheim
claudin-10	Hs00199599_m1	Applied Biosystems, Mannheim
claudin-14	Hs00273267_s1	Applied Biosystems, Mannheim
zonula occludens-1	Hs00268480_m1	Applied Biosystems, Mannheim

## 2.1.11 siRNAs

Claudin-14 siRNA (h): sc-60391	Santa Cruz, Heidelberg
GFP siRNA	amaxa biosystems siRNA Kit

## 2.1.12 Zytokine

IL-13	R&D Systems, Wiesbaden
TNF $\alpha$	TEBU, Offenbach
IFN $\gamma$	TEBU, Offenbach

## 2.1.13 Software

Auswertung von Calciummessungen	
Software TIDA 3.0	HEKA, Lambrecht
Auswertung von Mikrotiterplattendaten	
Easywin Fitting Version V6.0a	Tecan, Grödig, Österreich
Erstellung von Grafiken	
XACT Version 8.05	SciLab GmbH, Leipzig
Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	
LSM510 Version 3.2 SP2	Zeiss, Jena
Image J	<i>freeware</i>
Real-time PCR Software	
SDS Sequence Detection Software 7500	
Fast Version 1.4.0.25	Applied Biosystems, Mannheim
Software zur densitometrischen Auswertung	
AIDA Advanced Image Data Analyzer	Raytest Isotopenmessgeräte
Version 3.21.001	GmbH, Straubenhardt
Elektronenmikroskopie	
iTEM, Olympus Soft Imaging Solution, Veleta	Olympus Soft Imaging Solutions Corp., New York; USA

## 2.2 Biologisches Material

### 2.2.1 Bakterienstämme

**Tabelle 2.4: Bakterienstämme**

Stamm	Beschreibung	Referenz / Herkunft
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
YeO9	Serotyp O:9; Klinikisolat	R. Ignatius
WA-P	Serotyp O:8; Klinikisolat; WA-314 pYVO8 <sup>+</sup>	(Heesemann & Laufs, 1983)
WA-C	Virulenzplasmid defizientes Derivat von WA-P, NaI <sup>R</sup>	(Heesemann & Laufs, 1983)
WA-P inv <sup>-</sup>	WA-P $\Delta$ inv, NaI <sup>R</sup>	(Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996)
WA-C inv <sup>-</sup>	Virulenzplasmid defizientes Derivat von WA-P $\Delta$ inv, NaI <sup>R</sup>	(Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996)
<i>Escherichia coli</i> Nissle		
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 O6:K5:H1	Mutaflor <sup>®</sup> , Ardeypharm GmbH
EcN $\Delta$ fliA	Sigmafaktor FliA defizientes EcN-Derivat, Kan <sup>R</sup>	L. Wieler und P. Schierack

### 2.2.2 Zelllinien

**Tabelle 2.5: Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Referenz / Herkunft
HT-29/B6	humane Kolonkarzinom-Zelllinie, Klon B6	Institut für Klinische Physiologie, Charité, Berlin

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Anzucht von *Y. enterocolitica*

*Y. enterocolitica* wurde generell in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten aerob bei 27 °C kultiviert. Nur um den Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Virulenz im Infektionsmodell zu testen wurde *Y. enterocolitica* bei 37 °C gezogen. Mutanten-Stämme wurden durch Zugabe von 10 µg/ml Nalidixinsäure selektiert.

### 2.3.2 Anzucht von *E. coli* Nissle

*E. coli* Nissle wurde in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten aerob bei 37 °C gezogen. Für die Anzucht der  $\Delta$ fliA-Mutante wurden dem Medium 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

### 2.3.3 Stammhaltung

Von allen Stämmen wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl Glycerol in einem Cryo-Röhrchen vermischt und bei -80 °C aufbewahrt. Eine kurzzeitige Lagerung der Bakterien auf LB-Agar-Platten erfolgte bei 4 °C.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Zellkultur

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 wurde in RPMI 1640 Medium (RPMI) kultiviert unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin), in 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank. Es wurden Zellpassagen zwischen der 9. und der 25. Passage verwendet.

Das Medium wurde drei Mal wöchentlich erneuert. Konfluent bewachsene Flaschen wurden mit PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium gewaschen und mit Hilfe von 1 ml 0,05% Trypsin-EDTA bei 37 °C enzymatisch abgelöst. Die vollständig abgelösten Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen und mit der Pipette sorgfältig vereinzelt. Für die Weiterkultivierung wurden 1,5 ml Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt. Für elektrophysiologische und morphologische Studien wurden 7·10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> auf Millicell-PCF-Zellkulturfilter mit einer effektiven Fläche von 0,6 cm<sup>2</sup> und einer Porengröße von 3 µm ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter den oben genannten Bedingungen in konventionellen Zellkulturschalen, wobei der Zellkulturfilter mit 500 µl und die Zellkulturschale mit 10 ml Vollmedium gefüllt wurden. Konfluenz wurde innerhalb von ca. 5 Tagen erreicht und entsprach einer Zellzahl von 4 bis 5·10<sup>6</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup>. Zellzählungen erfolgten stets lichtmikroskopisch unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer. Für die Aussaat auf Deckgläschen wurden ebenfalls 7·10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> eingesetzt. Hier erfolgte die Kultivierung in 12-Wellplatten.

### 2.4.2 Epithelmodell auf Zellkulturfiltern

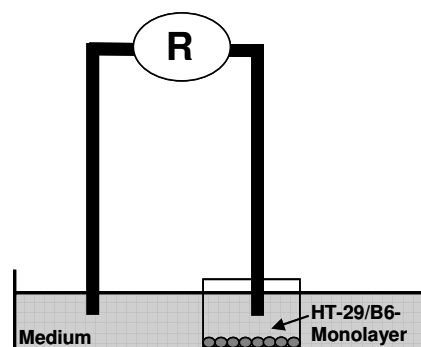
Die HT-29/B6 Kolonkarzinom-Zelllinie ist durch die Ausbildung hochdifferenzierter, polarisierter Monolayer mit intrazellulären Tight Junctions, apikalem Bürstensaum und einer Mukusschicht charakterisiert und stellt auf Grund dieser Eigenschaften ein geeignetes Zellsystem für die Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion dar.

Durch die Aussaat der Zellen auf Zellkulturfilter wurde eine Trennung in ein apikales Kompartiment, den Zellkulturfilter, und in ein basolaterales Kompartiment, die Zellkulturschale, erreicht (Abb. 2.1). Die verwendeten transparenten Millicell-PCF-Filter wiesen eine ausreichende Durchlässigkeit für das Kulturmedium und die Inkubationssubstanzen auf. Lösung,

Messanordnung und Zellkulturfilter hatten einen geringen Eigenwiderstand ( $132 \Omega$  bei einer Messung bei  $37^\circ\text{C}$ ).

Infektionsversuche mit *Y. enterocolitica* wurden am 6. bis 8. Tag, mit *E. coli* Nissle bzw. Nisslekonzentrat am 7. oder 8. Tag nach Aussaat durchgeführt, vorausgesetzt ein Mindestwiderstand von  $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$  war gegeben.

Vor Infektion oder Zugabe von Substanzen, wurden die Zellkulturfilter gewaschen und in serumfreies RPMI-Medium transferiert. Für die Behandlung mit Nisslekonzentrat wurden dem Medium  $100 \mu\text{g/ml}$  Gentamycin zugesetzt. Die vorbereiteten Zellkulturfilter wurden, wenn nicht anders beschrieben bei  $37^\circ\text{C}$  im Begasungsbrutschrank für eine Stunde äquilibriert. Kurz vor Infektion oder Substanzzugabe erfolgte die Messung des Ausgangswiderstands.



**Abb. 2.1: Epithelmodell auf Zellkulturfiltern.** Epitheliale HT-29/B6-Monolayer werden auf Millicell-PCF-Filtern kultiviert, die in einer Zellkulturschale platziert sind. Somit wird eine Trennung in ein apikales und basolaterales Kompartiment erreicht. Die Messung des transepithelialen Widerstands ( $R^1$ ) wird in Abschnitt 2.5.1 dargestellt.

### Einstellung der Infektionsdosis

Für Infektionsversuche wurden  $4 \text{ ml}$  LB-Medium  $1:8$  aus einer Übernachtskultur angeimpft. Das Bakterienwachstum wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von  $578 \text{ nm}$  bestimmt. Wenn nach ca. zwei Stunden eine  $\text{OD}_{578}$  von 1 erreicht war, wurde  $1 \text{ ml}$  der Kultur abzentrifugiert ( $2 \text{ min}$  bei  $5000 \times g$ ). Das Pellet wurde mit  $1 \text{ ml}$  serum- und antibiotikafreiem RPMI-Medium gewaschen und schließlich in RPMI zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 2 resuspendiert.

### Infektion von HT/29-B6

Die Infektion von HT-29/B6 erfolgte durch Applikation von  $10$  oder  $100 \mu\text{l}$  der auf  $\text{OD}_{578} = 2$  eingestellten Bakterienkultur pro Filter. Dieses entsprach  $10^7$  oder  $10^8$  colony forming units (CFU) woraus sich wiederum eine multiplicity of infection (MOI) von  $10$  bzw.  $100$  ergab. Das entsprechende Volumen an Medium wurde vor der Applikation aus dem Zellkulturfilter abgenommen. Die Inkubation erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  in einer Atmosphäre von  $95\%$  Luft und  $5\%$   $\text{CO}_2$  im Begasungsbrutschrank. Um den Einfluss der Kultivierungstemperatur zu untersuchen, wurde diese in einem Versuchsansatz mit *Y. enterocolitica* auf  $27^\circ\text{C}$  reduziert.  $2,5$  Stunden

*post infectionem* (p.i.) wurden die Bakterien durch Zugabe von 100 µg/ml Gentamycin in beide Kompartimente abgetötet.

#### CFU-Bestimmung und Gentamycin-Protektionsassay

Um die Zellzahl der im Versuch eingesetzten Bakterien zu ermitteln, wurden 100 µl der untersuchten Bakterienkultur ( $OD_{578} = 2$ ) auf 900 µl  $PBS^{+Ca+Mg}$ -Puffer gegeben. Davon ausgehend, wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  pipettiert. Von den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  wurden je 100 µl auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C oder RT inkubiert. Für die Bestimmung der Invasionsraten 48 h p.i. wurde das gentamycin-haltige Medium durch Waschen von den infizierten Monolayern entfernt und die Bakterien durch Zugabe von 200 µl 1%igem Triton X-100 aus den Zellen freigesetzt. Zur Bestimmung der CFU im Zellysate wurden Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$  auf LB ausplattiert. Die CFU wurden nach Inkubation gezählt und zur Infektionsdosis ins Verhältnis gesetzt.

#### Hitzeinaktivierungen

In RPMI-Medium zu  $OD_{578} = 2$  resuspendierte *Y. enterocolitica* wurden für 15 min bei 56 °C oder 95 °C inkubiert. Die Zellschichten wurden anschließend mit 100 µl dieser Suspension pro Filter behandelt. *E. coli* Nisslekonzentrat wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 95 °C inaktiviert.

#### Herstellung von *Y. enterocolitica* Kulturüberständen und Filterüberständen

Für die Überprüfung der Wirksamkeit von *Y. enterocolitica*-Kulturüberstand wurden die Bakterien in 50 ml farblosem, serum- und antibiotikafreiem RPMI-Medium bei 27 °C bis zu einer  $OD_{578}$  von 1,0 gezogen und anschließend bei  $5000 \times g$  pelletiert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen und darin verbliebene Bakterien durch anschließende Zentrifugation bei  $20000 \times g$  für 30 min bei 4 °C entfernt. Im Folgenden wurde der Kulturüberstand durch einen 0,2 µm Sterilfilter gepresst (ME DynaGard® Syringe Tip Filter) und das Filtrat mittels Amicon Ultra-15 Zentrifugationseinheiten aufkonzentriert. Hierbei kamen Zentrifugationseinheiten mit molekularen Ausschlussgrößen  $> 100$  kDa und  $> 3$  kDa zum Einsatz. 100 µl des jeweiligen Konzentrats wurden auf HT-29/B6-Zellkulturfilter gegeben und 100 µg/ml Gentamycin umgehend zugesetzt. Der  $R^1$ -Verlauf wurde über 48 Stunden verfolgt. Das Konzentrat wurde auf lebende Bakterien durch Ausstreichen auf LB-Agar-Platten kontrolliert. Außerdem diente hitzebehandeltes Konzentrat (56 °C) als Negativkontrolle im  $R^1$ -Experiment.

Konfluente HT-29/B6-Monolayer wurde wie beschrieben mit *Y. enterocolitica* infiziert und die apikalen Filterüberstände (~ 500 µl) 48 h p.i. von infizierten bzw. unbehandelten Kontrollmonolayern abgenommen und direkt auf frische HT-29/B6-Zellschichten transferiert.

### Aufschluss von *Y. enterocolitica* mittels FRENCH® Press

FRENCH® Press-Lysat (FPL) wurde aus 250 ml Kultur erzeugt. Hierfür wurden die Yersinien in serum- und antibiotikafreiem, farblosem RPMI-Medium bei 27 °C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1 kultiviert. Die Kultur wurde bei 8000 × g für 15 min pelletiert und in 15 ml kaltem RPMI resuspendiert. Die Bakterien wurden unter einem Druck von 1000 bis 1400 bar langsam in der FRENCH® Press aufgebrochen. Nach drei Durchgängen waren mikroskopisch keine intakten Bakterienzellen mehr nachzuweisen. 100 µl des Lysats wurden pro Zellkulturfilter eingesetzt. Die Gentamycingabe erfolgte parallel.

### Herstellung von *E. coli* Nissle-Kulturfiltrat und Nisslekonzentrat (EcNK)

Das Präparationsverfahren wurde von Dr. Jan F. Richter am Institut für Klinische Physiologie, CBF entwickelt. *E. coli* Nissle wurde über Nacht in 4 ml LB-Medium bei 37 °C gezogen und am nächsten Morgen in 20 ml LB-Medium überimpft, so dass die Anfangs-OD<sub>578</sub> 0,4 betrug. Die Vorkultur 1 wurde bis zum Erreichen von einer OD<sub>578</sub> von mindestens 1,0 gezogen und dann wieder in frisches Kulturmedium zu einer Anfangs-OD<sub>578</sub> von 0,3 überimpft. Wenn die OD<sub>578</sub> dieser Vorkultur 2 über 1,0 lag, wurden die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 × g pelletiert und das LB-Medium entfernt. Das Bakterienpellet wurde gewaschen und schließlich in kaltem farblosem RPMI-Medium (ohne Phenolrot) zu einer OD<sub>578</sub> von 2,0 resuspendiert. Diese eingeeengte Bakteriensuspension wurde zur Inokulation der präparativen Kultur eingesetzt, wobei 200 ml vorgewärmtes, farbloses RPMI-Medium zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 angeimpft wurden. Das Wachstum erfolgte bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1,5, woraufhin die Bakterien bei 4 °C durch 15-minütige Zentrifugation bei 8000 × g pelletiert und der Kulturüberstand vorsichtig abgenommen wurde. Um übrige Bakterien aus dem Kulturüberstand zu entfernen, wurde dieser bei 4 °C durch einen Sterilfilter (Sterivex-GV 0,22 µm) gepresst. Die Wirksamkeit des Kulturfiltrats wurde auf HT-29/B6-Monolayern getestet, wofür 100 µl pro Filter apikal appliziert und der R<sup>t</sup>-Verlauf über 24 Stunden beobachtet wurde. Das restliche Kulturfiltrat konnte bei -80 °C gelagert werden. Die Aufkonzentrierung des Kulturfiltrats erfolgte unter Verwendung von Centricon Plus-20 Zentrifugationseinheiten nach Angaben des Herstellerprotokolls. Aus 200 ml präparativer Kultur konnten auf diese Weise ca. 1,5 ml EcNK erzeugt werden. Aliquots wurden bei -20 oder -80 °C gelagert.

### Inkubation mit Nisslekonzentrat

Für die Inkubation mit EcNK wurden die HT-29/B6-Zellkulturfilter in serumfreies RPMI-Medium mit 100 µg/ml Gentamycin gesetzt. 10 µl EcNK wurden apikal zugegeben und der R<sup>t</sup>-Verlauf über 24 Stunden registriert.



### Inhibition von Signalkaskaden

Um eine mögliche *Y. enterocolitica*-induzierte Aktivierung von Signalkaskade zu untersuchen, wurden folgende Signalkomponenten in HT-29/B6 durch die Zugabe der entsprechenden in Tabelle 2.2 gelisteten Inhibitoren gehemmt: MAP-Kinasen (MAPK), Rho-Kinasen, Protein-Tyrosinkinasen (PTK), Inositoltriphosphat-Kinase (IP3K), Phosphokinase A und C (PKA und PKC), Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) und NF $\kappa$ B. Zur Stabilisierung der Zellen wurde RPMI-Medium mit 2% Serum verwendet. Die Inhibitoren wurden zwei Stunden vor der Infektion appliziert und die Zellen im Begasungsbrutschrank vorinkubiert.

### R<sup>t</sup>-Messung nach Applikation von BAPTA-AM

Ein direkter Einfluss des intrazellulären Calciumlevels auf den Widerstandsverlauf wurde nach Applikation von BAPTA-AM im Infektionsversuch auf Zellkulturfiltern untersucht.

BAPTA-AM ist membranpermeabel und reichert sich intrazellulär nach Abspaltung der Azetoxymethylgruppe an. Um eine Aufnahme des Chelators in die Zellen zu gewährleisten wurden die Zellkulturfilter eine Stunde vor der Infektion mit 10<sup>-5</sup> M BAPTA-AM in serum- und antibiotikafreiem RPMI-Medium vorinkubiert. In einem ersten Versuchsansatz wurde BAPTA-AM beidseitig appliziert. Extrazellulär verbliebene Moleküle wurden kurz vor der Infektion durch einen Mediumwechsel entfernt. In einem zweiten Ansatz wurde BAPTA-AM nur in das basolaterale Medium gegeben und ein Mediumwechsel im basolateralen Kompartiment erst fünf Stunden nach der Infektion durchgeführt.

## **2.5 Elektrophysiologische Methoden**

### 2.5.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands

Der transepitheliale Widerstand (R<sup>t</sup>) eines Zellmonolayers diente als Maß für die Barriereintegrität und wurde durch Messung mit Hilfe eines Ohmmeters bestimmt (Kreusel *et al.*, 1991). Das Widerstandsmessgerät für die R<sup>t</sup>-Bestimmung von Zellkulturen auf Filtereinheiten ist eine Eigenentwicklung (D. Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie). Die Messung wurde in den Zellkulturschalen bei einer Temperatur von 37 °C mit Hilfe von zwei fixierten Elektroden durchgeführt. Das Eintauchen der Elektroden erfolgte automatisiert, wobei eine Elektrode apikal direkt über dem Zellmonolayer und die andere im basolateralen Zellkulturmedium platziert wurde. Der R<sup>t</sup> ergab sich entsprechend dem Ohm'schen Gesetz aus der Spannungsänderung, die durch einen Rechteckstrom ( $\pm 10 \mu\text{A}$ , 21 Hz) hervorgerufen wurde. Die Messwerte wurden um den Eigenwiderstand des leeren Zellfilters korrigiert und von der exponierten Filterfläche (0,6 cm) auf 1 cm<sup>2</sup> umgerechnet ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Messdaten auf den Ausgangswiderstand, der stets zu Beginn einer Stimulation gemessen wurde, normiert und prozentual angegeben. Da die Elektroden vor

und nach jeder Messung mit 80%igem Ethanol desinfiziert und die Messungen selbst unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden, war die  $R^t$ -Erfassung beliebig oft über einen längeren Zeitraum möglich, ohne dass Kontaminationen auftraten. Zwischen den Einzelmessungen wurden die Zellen unter Standardbedingungen im Begasungsbrutschrank weiterkultiviert.

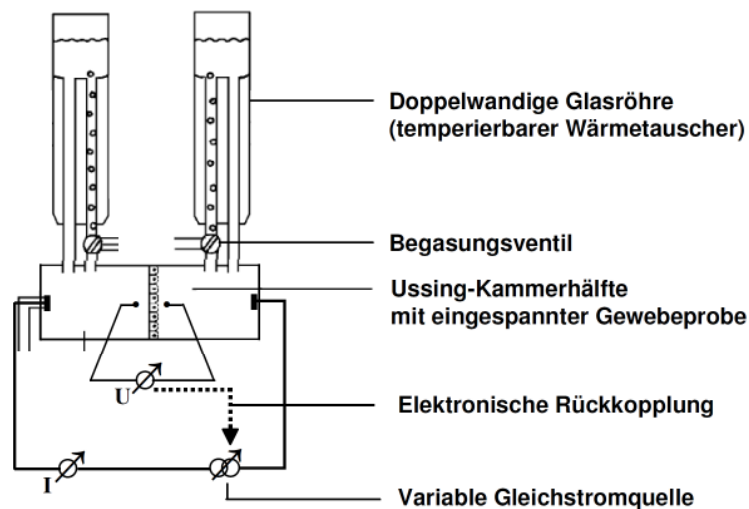
### 2.5.2 Ussing-Technik

Die Ussing-Technik wurde in den 1940er Jahren vom dänischen Physiologen Hans Ussing entwickelt und ermöglicht die Messung elektrophysiologischer Barriere- und Transportfunktionen am lebenden Epithel.

Transepithelialer Stofftransport wird durch drei äußere Kräfte angetrieben: hydrostatischer Druck, Konzentrationsgradienten und transepitheliale Spannung. Soll der aktive Transport oder der passive Durchtritt von Molekülen am Epithel gemessen werden, müssen diese drei Gradienten ausgeschaltet werden. Diese Voraussetzung wird von der Ussing-Technik erfüllt. Hydrostatische Kräfte und Konzentrationsgradienten werden durch gleiche Füllvolumina und Zusammensetzung der Lösung auf beiden Seiten des Epithels vermieden. Durch Applikation eines Kurzschlussstroms ( $I_{SC}$ ), der die spontane transepitheliale Potentialdifferenz auf 0 mV kurzschließt, herrscht kein treibender elektrischer Gradient mehr. Darüber hinaus entspricht der angelegte Strom der Netto-Summe aller aktiven elektrogenen Ionentransporte des Epithels. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, durch gezielte Stimulation oder Hemmung von Ionenkanälen oder elektrogenen Transportern Aussagen über die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Barrierefunktion des Epithels zu treffen.

#### Aufbau

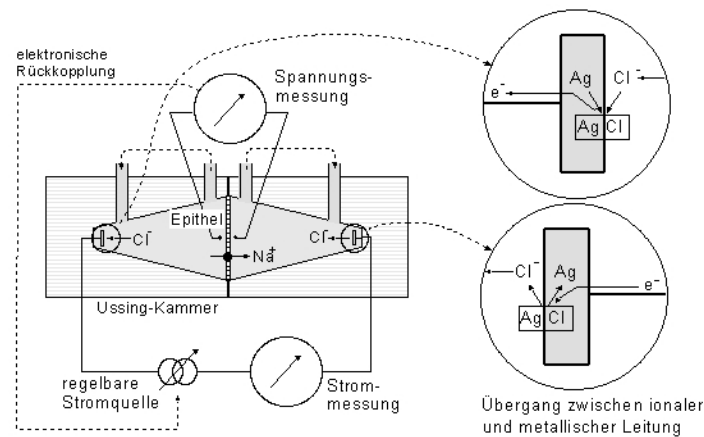
Zentrales Element der Messapparatur stellte die Ussing-Messkammer dar. Diese bestand aus zwei gleichartigen Kammerhälften, die durch das Epithel im Zellkulturfilter von einander getrennt wurden. Dadurch wurde erreicht, dass für den Stoff- und Flüssigkeitsaustausch sowie für elektrische Ströme, außer durch das Epithel selbst, keine Verbindung zwischen apikaler und basolateraler Kammerhälfte bestand. Die Kammern wurden auf beiden Seiten mit dem gleichen Volumen an physiologischer Badlösung gefüllt und über einen komplexen Wärmeaustauscher konstant auf 37 °C temperiert. Über entsprechende Zuleitungen erfolgte eine Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), was zugleich die Zirkulation der Lösung antrieb. Die hydrostatischen Druck-, Temperatur- und Begasungsverhältnisse in den beiden Hälften der Kammer waren somit gleich (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Ussing-Versuchsstand.** Der epitheliale Monolayer ist zwischen den beiden Ussing-Kammerhälften eingespannt und wird von 37 °C warmer Badlösung umspült. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über einen Wärmetauscher, die Zirkulation der Lösung wird durch aufsteigende Gasbläschen aufrechterhalten. Mithilfe zweier Elektrodenpaare wird die Potentialdifferenz registriert und der Kurzschlussstrom appliziert (modifiziert nach Li *et al.*, 2004).

### Elektrische Messanordnung

Die elektrische Messanordnung entsprach in dieser Arbeit der 4-Elektroden-Messanordnung nach Ussing und Zerahn (Ussing & Zerahn, 1951). Als leitende Verbindung zwischen den Elektroden und dem Inneren der Messkammer dienten Agarbrücken (0,3 g/ml Agar-Agar, 0,18 g/ml NaCl), deren Enden durch die entsprechenden Bohrungen in das Kammerlumen geschoben wurden und am anderen Ende in gesättigte KCl-Lösung tauchten. Die trans-epitheliale Potentialdifferenz wurde mittels Voltmeter zwischen zwei „Spannungselektroden“ (KCl-Kalomelektroden) gemessen. Die verbindenden Agarbrücken waren hierfür in der jeweiligen Kammerhälfte epithelnah positioniert, um die Messstrecke durch die Flüssigkeitsschicht möglichst gering zu halten. Die mit den „Stromelektroden“ (Ag/AgCl-Elektroden), über die der Klemmstrom appliziert wurde, um die epitheliale Spannung auf 0 mV kurzzuschließen, in Verbindung stehenden Agarbrücken befanden sich hingegen in möglichst großem Abstand zum Epithel. Somit konnte eine gleichmäßige Verteilung des elektrischen Feldes über dem Epithel erreicht werden. Diese Elektroden waren an eine variable Gleichstromquelle ( $I$ ) angeschlossen, und ein Amperemeter in Reihe geschaltet (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Elektrische Messanordnung.** Durch die Generierung eines externen Stromflusses wird das durch Ionentransporte über das eingespannte Epithel erzeugte Potential kurzgeschlossen. Zwischen den Spannungselektroden wird die transepitheliale Spannung gemessen und über die Stromelektroden der  $I_{SC}$  appliziert, der die Spannung auf 0 V „klemmt“. Der Übergang zwischen ionaler und elektrischer Leitung erfolgt mit Hilfe von Ag/AgCl-Elektroden (nach Prof. M. Fromm, Inst. für Klin. Physiologie, Praktikumsskript).

In dieser Arbeit wurde die Ussing-Technik neben der Messung des elektrischen Widerstands und von Kurzschlussströmen auch für die Untersuchung von Chloridsekretion, Molekül- und Ionenpermeabilitäten genutzt.

Zu Beginn jedes Experiments wurde der Widerstand der Kammer ohne Zellfilter gemessen und von den anschließend gemessenen Werten subtrahiert. Anschließend wurden die Zellfilter mit den lebenden Epithelzellen in die Ussing-Kammer eingesetzt. Für die Messung an mit Nisslekonzentrat behandelten Monolayern wurden zur Stabilisierung des Widerstands zusätzlich 30  $\mu$ l Nisslekonzentrat in die apikale Kammerhälfte appliziert. Zur Verminderung der Oberflächenspannung wurde hier zuvor beidseitig SabSimplex gegeben. Die eigentliche Messung wurde nach einer 20-minütigen Äquilibrationsphase gestartet.

### 2.5.3 Messung von Kurzschlussströmen nach Stimulation und Hemmung der Chloridsekretion

In gleichmäßigen Abständen wurden die transepitheliale Spannung, der elektrische Widerstand und der Kurzschlussstrom von einer computergesteuerten Spannungsklemmeinrichtung erfasst. Die Potentialdifferenz über dem Epithel wurde auf 0 mV geklemmt und der resultierende  $I_{SC}$  registriert. Stimulation bzw. Inhibition bestimmter Ionenkanäle im Epithel führen zu einer Änderung des  $I_{SC}$ . Durch basolaterale Applikation von  $10^{-5}$  M Forskolin wurde in mit *Y. enterocolitica* infizierten Monolayern sowie in Kontrollmonolayern eine Chloridsekretion induziert und die jeweilige Änderung des  $I_{SC}$  aufgezeichnet. Forskolin ist ein Wirkstoff aus dem Harfenkraut (*Coleus forskohlii*) und führt über Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, wodurch eine Chloridsekretion ausgelöst wird. In gleicher Weise wurde die Änderung des  $I_{SC}$  nach Hemmung der Chloridsekretion

durch basolaterale Applikation von  $10^{-5}$  M Bumetanid, dessen spezifischer Wirkungsmechanismus in der Hemmung des  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-/\text{K}^+$ -Carriers besteht, erfasst (Kreusel *et al.*, 1991).

#### 2.5.4 Fluxmessungen

Die Permeabilität von Epithelien für Markermoleküle kann in der Ussing-Kammer durch Messungen der unidirektionale Fluxe dieser Moleküle ermittelt werden.

Für die verwendeten Markermoleküle [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol, Fluoreszein und FITC-Dextran existieren in Epithelien keine transzellulären Transportmechanismen, so dass diese den Zellmonolayer nur durch den parazellulären Weg passieren können.

Die Experimente wurden in der Ussing-Kammer unter Kurzschlussstrombedingungen durchgeführt. Nach der Äquilibrierungsphase wurde eine Leerwertprobe entnommen und dann das zu untersuchende Markermolekül in die apikale Kammerhälfte gegeben. Proben wurden in definierten Zeitabständen aus der basolateralen Kammerhälfte entnommen. Um hydrostatische Gradienten zu vermeiden, wurde das entnommene Volumen jeweils durch frische Badlösung ersetzt.

#### Messung von Mannitol-Fluxen

Mannitol ist ein parazellulärer Marker mit einer Größe von 182 Da. Als Badlösung diente Ringerlösung, der 10 mM Mannitol zugesetzt wurde, um osmotische Effekte auszuschließen. Für die Messung wurde [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol in einer Finalkonzentration von 25 kBq/ml auf der mukosalen Seite appliziert. Es wurden jeweils vier „kalte“ Proben mit einem Volumen von je 1 ml in Abständen von 10 min basolateral abgenommen. Außerdem wurden zwei „heiße“ Proben mit einem Volumen von je 100  $\mu\text{l}$  von der mukosalen Seite entnommen und für die Messung 1:10 mit Badlösung verdünnt. Unter „kalten“ Proben versteht man hierbei Abnahmen aus der nicht radioaktiv markierten Kammerhälfte, in der sich der Anteil an Markermolekül nachweisen lässt, der innerhalb einer Fluxperiode von einer Epithelseite auf die andere gelangt ist. „Heiße“ Proben entsprechen Abnahmen von der mit [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol markierten Kammerhälfte und dienen der Bestimmung der Ausgangsaktivität. Die Proben wurden in Glas-Vials pipettiert und mit 4 ml Szintillationslösung (Ultima Gold high flash-point liquid scintillation cocktail) versetzt. Die Zählung erfolgte im  $\beta$ -Counter. Die Fluxrate von Mannitol wurde wie folgt berechnet:

$$J \left[ \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \right] = \frac{c_{\text{Standard}} \cdot (V_{\text{K}}/V_{\text{hP}}) \cdot V_{\text{K}} \cdot (Z_{\text{kalt2}} - Z_{\text{leer}}) - (V_{\text{K}} - V_{\text{kP}}) \cdot (Z_{\text{kalt1}} - Z_{\text{leer}})}{Z_{\text{heiß}} \cdot \Delta t \cdot A_{\text{K}}}$$

<b><math>c_{\text{Standard}}</math></b>	Referenzkonzentration für Mannitol (10 mM)
<b><math>V_{\text{K}}</math></b>	Kammervolumen (10 ml)
<b><math>V_{\text{hP}}</math></b>	Volumen der heißen Probe (0,1 ml)
<b><math>Z_{\text{kalt1}}</math></b>	Zählrate der ersten kalten Probe (cpm)
<b><math>Z_{\text{kalt2}}</math></b>	Zählrate der zweiten kalten Probe (cpm)

<b>Z<sub>leer</sub></b>	Zählrate der Kalt-Probe vor der Heiß-Zugabe (cpm)
<b>V<sub>kP</sub></b>	Volumen der kalten Probe (1 ml)
<b>Z<sub>heiß</sub></b>	Zählrate der heißen Probe (cpm)
<b>Δt</b>	Zeit zwischen der ersten und der zweiten Abnahme der Kalt-Proben (min)
<b>A<sub>K</sub></b>	Kammerfläche / Zellfilterfläche (0,6 cm <sup>2</sup> )

### Messung von Fluoreszein-Fluxen

Die 332 Da großen Fluoreszein-Moleküle werden fluoreszenzoptisch nachgewiesen.

Die Kammerhälften wurden mit je 10 ml Ringerlösung befüllt und Fluoreszein mit einer Endkonzentration von 0,2 mM apikal zugesetzt. In 10-minütigen Intervallen erfolgten fünf Abnahmen von 300 µl-Proben aus der basolateralen Kammerhälfte. Die Fluoreszeinkonzentration der Proben wurde mittels Spectrofluorimeter bei 520 nm gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine definierte Eichreihe (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005 und 0,001 µM) mitgeführt. Der Flux wurde folgendermaßen ermittelt:

$$J = \frac{(c_1 - c_2) \cdot V_{Kammer}}{\Delta t \cdot A_{Filter} \cdot \left( \frac{V_{Zugabe}}{V_{Kammer}} \right)}$$

<b>J</b>	Flux
<b>c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub></b>	Konzentration zum Zeitpunkt 1 bzw. 2
<b>Δt</b>	Zeitdifferenz von t <sub>1</sub> zu t <sub>2</sub>
<b>V</b>	Volumen der Kammer, Zugabevolumen
<b>A</b>	zugängliche Fläche (Filterfläche)

Die Permeabilität für Fluoreszein ergibt sich aus Flux und Konzentration:

$$P = \frac{J}{\Delta c}$$

<b>Δc</b>	Konzentrationsdifferenz
-----------	-------------------------

### Messung von FITC-Dextran-4000-Fluxen

Vor der Messung wurde das 4000 Da große Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markierte Dextran-Molekül dialysiert, um kleinere FITC-Dextranfragmente nicht fälschlicherweise mit zu analysieren. Im Versuch wurde je Kammerhälfte 5 ml Ringerlösung mit 0,2 mM Dextran eingesetzt. Nach apikaler Zugabe von FITC-Dextran-4000 (Endkonzentration 0,2 mM) wurden vier 300 µl-Proben im Abstand von 15 min basolateral abgenommen. Die Bestimmung der FITC-Dextrankonzentration sowie die Berechnung der Fluxe und Permeabilitäten erfolgten wie für die Fluoreszein-Fluxe beschrieben.

## 2.5.5 Messung von NaCl-Dilutionspotentialen

Das Dilutionspotential dient der Ermittlung der partiellen, parazellulären Leitfähigkeit von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>. Ersetzt man die NaCl-Ionen in einer Kammerhälfte durch Mannitol, das einen osmotischen Ausgleich gewährleistet, so stellt sich über dem Epithel ein Diffusionspotential ein, das Dilutionspotential (U<sub>m</sub>). Dieses berechnet sich nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung folgendermaßen:

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na} [Na]^{ap} + P_{Cl} [Cl]^{ap}}{P_{Na} [Na]^{bl} + P_{Cl} [Cl]^{bl}}$$

<b>U<sub>m</sub></b>	Dilutionspotential
<b>R</b>	allgemeine Gaskonstante
<b>T</b>	absolute Temperatur
<b>F</b>	Faradaykonstante
<b>P<sub>Na</sub>, P<sub>Cl</sub></b>	Permeabilität der Natrium- bzw. Chlorid-Ionen
<b>[Na]<sup>ap</sup></b>	apikale Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ([Cl] <sup>m</sup> )
<b>[Na]<sup>bl</sup></b>	basolaterale Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ([Cl] <sup>s</sup> )

Die partielle Leitfähigkeit für Na<sup>+</sup> (P<sub>Na</sub>) und Cl<sup>-</sup> (P<sub>Cl</sub>) wird nach Umformung der Permeabilitäts-Gleichung bestimmt:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} \cdot [Cl]^{ap} - [Cl]^{bl}}{[Na]^{ap} - e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} \cdot [Na]^{bl}}$$

Werden die beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer mit den verschiedenen Badlösungen (Standard-Ringer und isotone NaCl-reduzierte Mannitol-Ringer) gefüllt, entsteht ein Potential, das sich durch die ungleiche Zusammensetzung der Lösungen beider Seiten einstellt. In weiteren Rechnungen muss dieses Elektrodenpotential berücksichtigt und vom Dilutionspotential abgezogen werden.

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Cl-ap} - a_{Cl-bl}}{a_{Na-ap} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Na-bl}}$$

$$\Delta E = E_{bl} - E_{ap}, \text{ mit Korrektur für das Liquid Junction-Potential } s = 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F}$$

**a<sub>Na-ap</sub>** bzw. **a<sub>Cl-ap</sub>** apikale Ionenaktivität für Natrium bzw, Chlorid

**a<sub>Na-bl</sub>** bzw. **a<sub>Cl-bl</sub>** basolaterale Ionenaktivität für Natrium bzw, Chlorid

(berechnet über Debye-Hückel-Formalismus und Konstante aus Meier 1982)

Aus der relativen Permeabilität für Natrium und der Gesamtleitfähigkeit (G<sup>†</sup>) des Epithels lässt sich die partielle Leitfähigkeit für Natrium (P<sub>Na</sub>) berechnen. Die Gesamtleitfähigkeit des

Epithels entspricht dem Kehrwert des transepithelialen Widerstands ( $R^t$ ), der direkt gemessen wird:

$$G^t = \frac{1}{R^t}$$

$$P_{Na} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[NaCl]} \cdot \frac{1}{1 + P_{Na} / P_{Cl}} \cdot \frac{P_{Na}}{P_{Cl}}$$

$$P_{Cl} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[NaCl]} \cdot \frac{1}{1 + P_{Na} / P_{Cl}}$$

Bei einer Temperatur von 37 °C sind verschiedene elektrogene Kanäle im Zellmonolayer aktiv. Um dieses zu umgehen, wurden die NaCl-Dilutionspotentiale bei einer Temperatur von 14 °C gemessen. Jede Kammerhälfte wurde mit 10 ml Ringerlösung befüllt und nach der Äquilibrierungsphase erfolgte apikal bzw. basolateral der Austausch von 5 ml Ringerlösung gegen 5 ml isotoner NaCl-reduzierte Mannitol-Ringer. Spannung und  $R^t$  wurden bis zur Einstellung eines Potentialplateaus erfasst.

### 2.5.6 Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Der transepitheliale Gesamtwiderstand ( $R^t$ , TER) eines Epithels ergibt sich aus zwei Komponenten, dem epithelialen ( $R^{epi}$ ) und dem subepithelialen Widerstand ( $R^{sub}$ ).

$$R^t = R^{epi} + R^{sub}$$

$R^t$  transepithelialer (Gesamt-)Widerstand

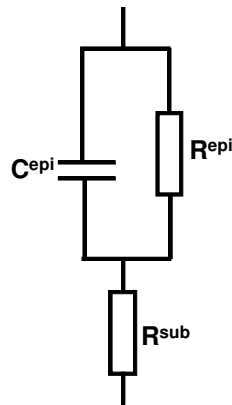
$R^{epi}$  epithelialer Widerstand

$R^{sub}$  subepithelialer Widerstand

$R^{epi}$  repräsentiert den Widerstand des Epithels. In Geweben ergibt sich  $R^{sub}$  aus allen nicht-epithelialen Anteilen wie Collagenfasern, Bindegewebe- und Muskelschichten. Auch im Zellkultursystem existiert neben dem durch den Zellmonolayer bestimmten  $R^{epi}$  ebenfalls ein  $R^{sub}$ , der durch den Zellkulturfilter verursacht wird.

Die Ein-Wege-Impedanzspektroskopie ermöglicht eine Diskriminierung zwischen  $R^{epi}$  und  $R^{sub}$ . In einem elektrischen Ersatzschaltkreis kann das Subepithel als reiner Ohm'scher Widerstand betrachtet werden, während der Zellmonolayer durch die Parallelschaltung eines Ohm'schen Widerstands mit einer apparenten Kapazität dargestellt wird und mit dem Subepithel in Reihe geschaltet ist (Schifferdecker & Fromter, 1978; Fromm *et al.*, 1985) (Abb. 2.4). Die apparente Kapazität ( $C^{epi}$ ) repräsentiert hierbei die kapazitiven Eigenschaften der apikalen und basolateralen Zellmembran (Schifferdecker & Fromter, 1978).

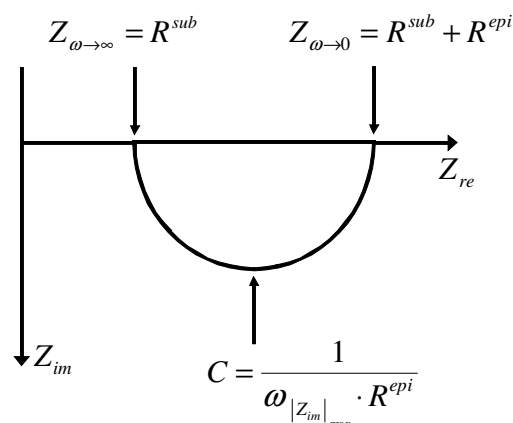




**Abb. 2.4: Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells.** Verwendung in der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie

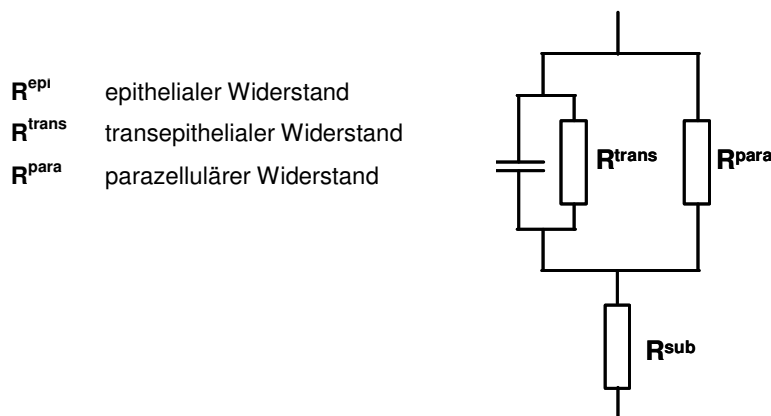
Appliziert man in diesem System einen Wechselstrom ansteigender Frequenz, so ergeben sich zwei Extrempunkte. Bei einer Frequenz von null ist der kapazitive Blindwiderstand unendlich groß. Das heißt, es fließt kein Strom durch den Kondensator, sondern nur durch den parallel geschalteten  $R^{epi}$ . Der unter diesen Bedingungen gemessene Widerstand entspricht demnach  $R^t$ . Bei sehr hoher Frequenz fließt der gesamte Strom unter Umgehung von  $R^{epi}$  durch den Kondensator, so dass der gemessene Widerstand allein  $R^{sub}$  entspricht.

Die ermittelten Impedanzwerte werden in einem Nyquist-Diagramm dargestellt (Abb. 2.5), wobei die Imaginärteile der komplexen Impedanzen ( $Z_{im}$ ) auf der Ordinatenachse gegen die Realteile ( $Z_{re}$ ) auf der Abszissenachse aufgetragen werden. Hierbei gibt der Realteil den Ohm'schen Widerstand und der Imaginärteil die kapazitiven Eigenschaften des Epithels wieder. Anhand der Schnittpunkte des Halbkreises mit der Abszissenachse können aus dem Diagramm bei niedrigen Frequenzen  $R^t$  und bei hohen Frequenzen  $R^{sub}$  abgelesen werden. Die Kapazität C kann über den Imaginärteil der Impedanz berechnet werden.



**Abb. 2.5: Nyquist-Diagramm einer Modellmessung.** Aus der graphischen Auftragung der Impedanzwerte ergibt sich ein Halbkreis, dessen Schnittpunkt mit der Abszissenachse bei hohen Frequenzen ( $\omega \rightarrow \infty$ ) den subepithelialen Widerstand und bei sehr niedrigen Frequenzen ( $\omega \rightarrow 0$ ) den transepithelialen Widerstand  $R^t = R^{sub} + R^{epi}$  ergeben. Die Kapazität C kann anhand der Frequenz des Kreisbogenminimums ( $\omega_{|Z_{im}|_{max}}$ ) berechnet werden.

$R^{\text{epi}}$  setzt sich aus einem transzellulären ( $R^{\text{trans}}$ ) und einem parazellulären Anteil ( $R^{\text{para}}$ ) zusammen:  $\frac{1}{R^{\text{epi}}} = \frac{1}{R^{\text{trans}}} + \frac{1}{R^{\text{para}}}$  (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6: Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells.** Verwendung in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Da es mit der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie nicht möglich ist, zwischen  $R^{\text{trans}}$  und  $R^{\text{para}}$  zu differenzieren, wurde die Methode am Institut für Klinische Physiologie zur Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie weiterentwickelt (Krug *et al.*, 2009). Hierbei werden  $R^{\text{trans}}$  und  $R^{\text{para}}$  durch Fluxmessungen des parazellulären Markers Fluoreszein vor und nach Öffnung des parazellulären Weges bestimmt. Die TJ, die den parazellulären Widerstand ausmacht, wird hierbei durch den Entzug von extrazellulärem Calcium reversibel geöffnet (Martinez-Palomo *et al.*, 1980). Dieses wird durch Verabreichung des Calciumchelators EGTA erreicht. Mit Hilfe der erhaltenen Fluxverhältnisse vor und nach EGTA-Applikation kann aus den Impedanzmessungen vor und nach Öffnung der TJ der parazelluläre vom transzellulären Widerstand unterschieden werden.

### Durchführung der Impedanzmessung

Für die Messung wurden die vorinkubierten Zellkulturfilter in modifizierte Ussing-Kammern eingespannt. Diese so genannten Impedanzkammern sind mit gut abgeschirmten Elektroden ausgestattet, so dass sie auch bei hohen Messfrequenzen kaum Störpotentiale aufweisen (Krug *et al.*, 2009). Die Kammerhälften wurden mit je 10 ml Ringerlösung befüllt und mit Carbogen begast. In Abständen von 10 min erfolgten Impedanzmessungen, wobei ein sinusförmiger Wechselstrom ( $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) mit 48 verschiedenen Frequenzen zwischen 1,3 Hz (entsprechend der Extrapolation gegen null) und 65 kHz (entsprechend der Extrapolation gegen  $\infty$ ) angelegt wurde. Die durch den Strom erhaltenen Spannungsänderungen konnten über phasensensitive Verstärker (402 frequency response analyzer, Beran Instruments; 1286 electrochemical interface; Solartron Schlumberger) erfasst und die resultierenden Impedanzwerte  $Z_{\text{re}}$  und  $Z_{\text{im}}$  aufgezeichnet werden. Zwischen den eigentlichen Impedanzmessungen wurden die transepithelialen Potentiale auf 0 mV geklemmt. Nach der ersten Messung

wurde Fluoreszein apikal appliziert. Proben mussten in regelmäßigen Abständen abgenommen und die Fluxe bestimmt werden. Die EGTA-Zugabe erfolgte beidseitig nach der dritten Impedanzmessung (Endkonzentration 1,3 mM).

### 2.5.7 Conductance-Scanning

Mit der Conductance-Scanning-Technik kann die Leitfähigkeitsverteilung in flächigen Epithelien und an epithelialen Zellkulturen quantifiziert werden (Kockerling *et al.*, 1993; Gitter *et al.*, 1997). Dieses am Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin entwickelte Messverfahren erlaubt den Nachweis lokaler Defekte im Epithel (Kockerling *et al.*, 1993). Somit können zum Beispiel Apoptosen oder auch lecke Schlussleisten als elektrische Lecks gemessen werden. Eine parallele lichtmikroskopische Erfassung ermöglicht zudem eine Zuordnung der lokal gemessenen Leitfähigkeiten zu morphologischen Strukturen.

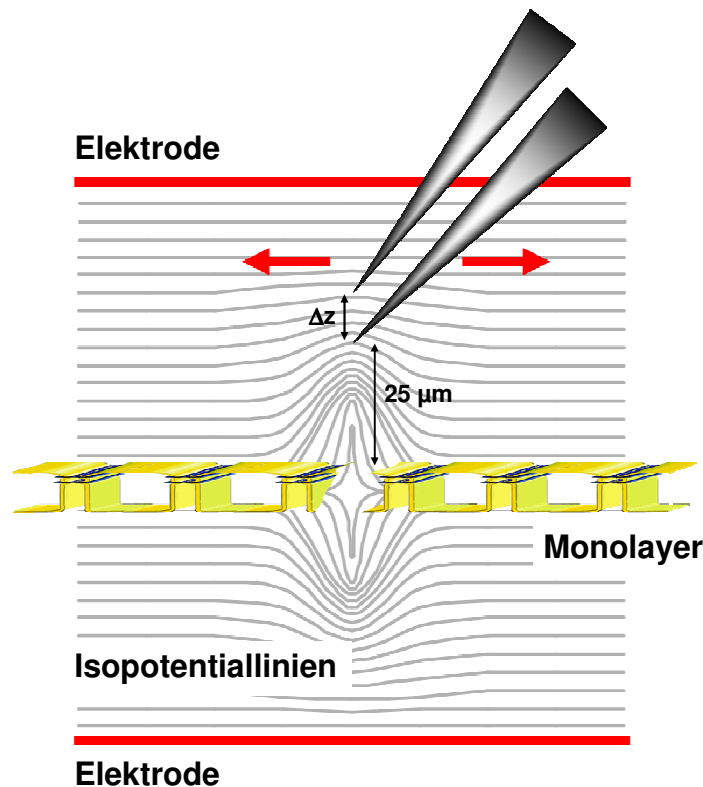
Das Grundprinzip der Technik besteht in der Messung von lokalen Potentialdifferenzen, die dicht über dem Epithel mit einem Mikroelektrodenpaar erfasst werden. Das Epithel befindet sich hierbei in einem induzierten elektrischen Feld. Leitfähigkeitsänderungen im Epithel haben eine Verschiebung der Isopotentiallinien zur Folge, was wiederum als Spannungsänderung von den Mikroelektroden registriert werden kann (Abb. 2.7).

Die Durchführung des Conductance-Scannings erfolgte in Zusammenarbeit mit PD. Dr. Dorothee Günzel aus dem Institut für Klinische Physiologie, CBF.

Die Filtermembran mit dem epithelialen Monolayer wurde 48 Stunden p.i. mit dem Skalpell vorsichtig aus der Ringhalterung der Filtereinheit gelöst und horizontal in einer miniaturisierten 4-Elektroden-Ussing-Kammer (Gitter *et al.*, 1997) platziert. Als Versuchslösung diente Ringerlösung. Über dem Monolayer wurde ein sinusförmiger Klemmstrom ( $100 \mu\text{A cm}^{-2}$ , 24 Hz) angelegt und das resultierende elektrische Feld dicht über dem Epithel mit einem Mikroelektrodenpaar detektiert. Dabei wurde das Mikroelektrodenpaar mit einem konstanten Abstand von  $25 \mu\text{m}$  parallel über die apikale Epitheloberfläche geführt. Dieser Abstand wurde auf jedem Filter definiert, in dem die Elektrodenspitzen bis zum Kontakt auf das Epithel abgesenkt und dann schrittweise zurückgezogen wurden. Der vertikale Abstand  $\Delta z$  zwischen den beiden Mikroelektroden betrug 20 bis  $40 \mu\text{m}$  und wurde durch eine Messung des Widerstands zwischen beiden Elektroden in einer Kontrollelektrolytlösung bekannten spezifischen Widerstands  $\rho$ , durch Berechnung genau ermittelt.

$$\Delta z = \frac{\Delta V \cdot A^{\text{Kammer}} \cdot k}{I}$$

$\Delta V$	zwischen Mikroelektroden gemessene Potentialdifferenz
$A^{\text{Kammer}}$	Fläche der Messkammer
$I$	Amplitude des applizierten Stroms
$k$	spezifische Leitfähigkeit der Kontrollelektrolytlösung



**Abb 2.7: Schematische Darstellung des Conductance-Scanning-Prinzips.** Der epitheliale Monolayer ist in einer Kammer zwischen zwei Elektroden platziert. Ein elektrischer Strom wird appliziert und das resultierende elektrische Feld mit einem Mikroelektrodenpaar detektiert (modifiziert nach PD Dr. D. Günzel, Inst. für Klin. Physiologie).

Da die Größe der zwischen den beiden Mikroelektroden gemessenen Potentialdifferenz  $\Delta V$  von der lokalen Leitfähigkeit am Messort abhängig ist, waren lokale Leitfähigkeitsänderungen leicht zu registrieren. Der gemessene Spannungsabfall wurde in die apparente Leitfähigkeit  $G_A$  umgerechnet:

$$G_A = \frac{\Delta V / \Delta z}{\rho \cdot U}$$

$\Delta V$	zwischen Mikroelektroden gemessene Potentialdifferenz
$U$	transepitheliale Spannung
$\Delta z$	Elektrodenabstand
$\rho$	spezifischer Widerstand der Elektrolytlösung

Auf jedem Filter wurde ein Areal von  $1 \text{ mm}^2$  in  $100 \text{ }\mu\text{m}$ -Schritten gescannt. Die Grundleitfähigkeit jeder Probe ergab sich durch Mittlung der Messwerte aus Arealen mit homogener Leitfähigkeitsverteilung. Areale erhöhter Leitfähigkeit wurden in horizontaler und vertikaler Richtung gescannt. Der Leitwert  $G$  dieser Bereiche wurde durch genäherte räumliche Integration der Leitfähigkeitswerte über die gescannte Fläche errechnet, wobei die Grundleitfähigkeit jeweils abgezogen wurde.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellkulturen

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellkulturfilter aus der Zellkulturschale genommen, das apikale Medium entfernt und die Monolayer mit PBS gewaschen. Zur Proteinextraktion wurden drei verschiedene Puffer verwendet. Vor Gebrauch wurde in 10 ml Puffer stets eine Tablette Complete Mini EDTA<sup>frei</sup> (Proteaseinhibitor-Cocktail) gelöst.

#### Proteinextraktion mit Gesamtlysepuffer

Zur Analyse der Claudin-Expression wurden 150 µl eiskalter Gesamtlysepuffer pro Filter eingesetzt, die Zellen mit einem Rührspatel von der Filtermembran geschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer in einer 15-minütigen Zentrifugation bei  $14000 \times g$  pelletiert und der Überstand für die weitere Analyse abgenommen.

#### Proteinextraktion mit Lysepuffer A

Zur Analyse der Claudin-14-Expression wurde Lysepuffer A verwendet. Vor Gebrauch wurden diesem 0,2% TritonX-100 frisch zugesetzt. Die Proteinisolierung erfolgte auf gleiche Weise wie mit Gesamtlysepuffer.

#### Proteinextraktion mit RIPA-Puffer

Für die Expressionsanalyse von Zytoskelle-assoziierten Proteinen erfolgte die Proteinextraktion mit RIPA Puffer. Die Zellen wurden mit 200 µl Puffer vom Filter gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt, für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Vortexen inkubiert und anschließend ultrabeschallt.

#### Proteinextraktion mit Phospholysepuffer-Puffer

Zum Nachweis des Phosphorylierungsstatus von MAP-Kinasen erfolgte die Proteinpräparation mit 150 µl eiskaltem Phospholyse-Puffer pro Filter. Die Zellen wurden dazu 5 min auf Eis mit Lysepuffer inkubiert und anschließend vom Filter gekratzt. Die weitere Präparation erfolgte analog wie zum Gesamtlysat.

Proteine wurden bis zur weiteren Analyse bei  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  aserviert.

### 2.6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit der BCA-Methode im Mikrotitermaßstab von der Firma Pierce Perbio Science durchgeführt (Smith *et al.*, 1985). Proteine bilden mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in

alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion) und werden zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert, die wiederum mit Bicinchoninsäure (BCA-Reagenz) einen stabilen violetten Farbkomplex bilden. Die Proteinmenge einer Probe kann somit photometrisch ermittelt werden.

Als Eichreihe wurde ein Albumin Standard mit 0, 0,2, 0,8 und 1,2 mg BSA/ml genutzt. 10  $\mu\text{l}$  der Eichlösung bzw. der gegebenenfalls verdünnten Probe wurden in einer 96-Loch-Platte mit je 190  $\mu\text{l}$  der BCA-Gebrauchslösung versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 562 nm im Mikrotiterplattenreader (Spectra) gemessen. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 2.6.3 Western Blot-Analysen

#### Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese dient zur Auftrennung von Proteingemischen und erfolgt im Gel fast ausschließlich nach der relativen Molekülmasse unabhängig von der Gesamtladung oder der Konformation. Dieses wird durch eine vorherige Denaturierung der Proteine mit dem Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) erreicht. Bei der Gel-Elektrophorese wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid zum Pluspol. Acrylamid bildet in einer Kettenreaktion lange Polymere, die durch Bisacrylamid miteinander vernetzt werden. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit von freien Radikalen (Radikalbildner APS) sowie durch einen Katalysator (TEMED) unterstützt.

In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese nach Laemmli unter Verwendung des Mini-Protean 3 Elektrophorese-Systems bei einer Spannung von 100 V durchgeführt.

Die Konzentrierung der Proteine an der Lauffront erfolgte im Sammelgel mit einer Acrylamid-Bis-Konzentration von 5% und einem pH-Wert von 6,8. Entsprechend des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proteine enthielten Trenngele 12,5% (Claudine), 10% (MAP-Kinasen) oder 8% (Occludin, Tricellulin) Acrylamid-Bis bei einem pH-Wert von 8,6.

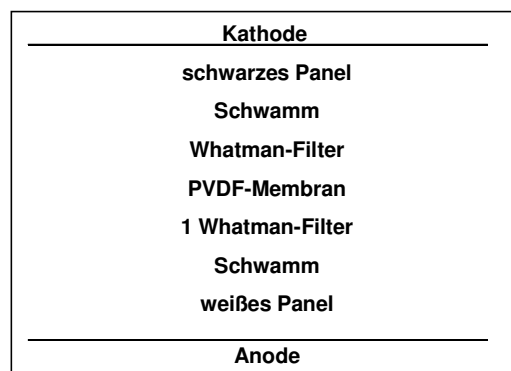
Vor der Gelbeladung wurden alle Proben mit 5  $\times$  Laemmli Puffer versetzt und 5 bzw. 10 min lang bei 95 oder 65 °C denaturiert. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 10 bis 20  $\mu\text{g}$  Protein in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  pro Tasche eingesetzt. Um das relative Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können wurden stets 5  $\mu\text{l}$  des Protein Molecular Weight Markers (Molekulargewicht kDa: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17 und 11) mitgeführt.

#### Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, mussten die Proteine zunächst elektrophoretisch aus dem Gel auf eine proteinbindende PVDF-Membran transferiert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Blot-Verfahren angewendet.

### Tank-Blot-Verfahren

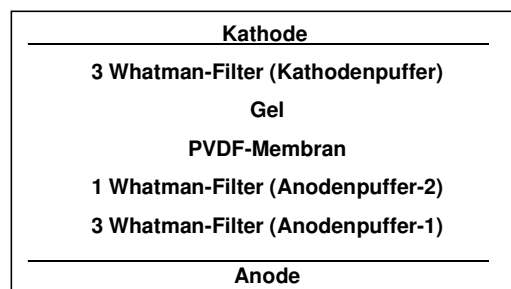
Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotvorgang mit absolutem Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit Gel und Whatman-Filterpapieren in methanolhaltigem Transferpuffer vorinkubiert. Methanol entfernt das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen und erhöht somit die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran. Das SDS-Gel wurde zwischen zwei Whatman-Filterpapieren auf eine PVDF-Membran gelegt und Luftblasen ausgestrichen (Abb. 2.8). Der Proteintransfer erfolgte in Transferpuffer im Mini Protean 3 Elektrophorese-System bei 100 V für eine Stunde oder für den Transfer sehr großer Proteine für zwei Stunden. Ein Kühlakku verhinderte eine Überhitzung beim Transfer-Vorgang. Ein Magnet-Rührer sorgte für eine gleichmäßige Kühlung.



**Abb. 2.8: Aufbau beim Tankblot-Verfahren.**

### Semi-dry-Blot-Verfahren

Beim Semi-dry-Blot wird die Membran, sandwichartig eingerahmt von Whatman-Filterpapieren, direkt zwischen die Elektroden gelegt (Abb. 2.9). Die Whatman-Filter wurden in Anodenpuffer 1 bzw. 2 oder Kathodenpuffer eingeweicht. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und anschließend in Anodenpuffer-2 vorinkubiert. Der Transfer erfolgt in Abhängigkeit von der Proteingröße bei 180 mA. Claudin-14 wurde innerhalb von 25 min, ZO-1 innerhalb von einer Stunde transferiert.



**Abb. 2.9: Aufbau beim Semi-dry-Blot-Verfahren.**

### Immundetektion von Proteinen

Nach dem Protein-Transfer wurden die an der Membran fixierten Proteine durch spezifische Antikörper detektiert. Freie Proteinbindungsstellen wurden auf der Membran mit einer 5%igen BSA-Lösung für zwei Stunden unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation im Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer 5%igen BSA-PBST- oder BSA-TBST-Lösung (TJ-Proteine und MAP-Kinasen 1:1000,  $\beta$ -Actin 1:5000). Am nächsten Tag wurde der Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBST und/oder TBST vollständig entfernt. Für die Analyse von MAP-Kinase-Phosphorylierungen kam ausschließlich TBST zum Einsatz, um unspezifische Phosphorylierungen zu vermeiden. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein Maus-, Kaninchen- oder Ziegen-spezifischer Sekundärantikörper eingesetzt (1:1000), der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Nach zwei-stündiger Inkubation unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur wurde der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen in PBST und/ oder TBST entfernt. In einer anschließenden Inkubation mit Lumi-Light<sup>Plus</sup> Reagenz erfolgte eine durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysierte Luminol-Reaktion. Die dabei entstehende Chemolumineszenz wurde mit dem Luminiszenzbild-Analysator (LAS 1000) detektiert.

#### 2.6.4 Bestimmung der Proteinstabilität

Für eine Untersuchung der Claudin-8-Proteinstabilität wurde 24 Stunden nach Infektion mit *Y. enterocolitica* die Proteinneusynthese durch Zugabe von 100  $\mu$ g/ml Cycloheximid gehemmt. Der Claudin-8-Proteinpool wurde anschließend zu fünf verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Dazu wurde eine Proteinextraktion mit Gesamtysepuffer durchgeführt. Die erste Aufarbeitung erfolgte direkt nach der Cycloheximid-Zugabe (Zeitpunkt 0). Dieses Proteinlevel wurde als Ausgangswert auf 100% gesetzt. Weitere Proben wurden nach 6, 10 und 24 Stunden aufgearbeitet. Eine Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Technik. Die Proteinbandenstärke wurde densitometrisch ermittelt und die Proteinstabilität über eine lineare Regression bestimmt.

#### 2.6.5 Bestimmung der Apoptoserate mittels TUNEL-Färbung

Das Prinzip der TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) beruht auf einer Markierung von DNA-Strangbrüchen mit Fluoreszein-markierten Nukleotiden am freien 3'-OH Ende der DNA. Dieses wird durch die Terminale Desoxyribosyl-Transferase enzymatisch katalysiert.

Die Zellen wurden mit 0,5% Trypsin-EDTA bei 37 °C von der Filtermembran gelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem RPMI-Medium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen mit der Pipettenspitze sorgfältig vereinzelt. Die Zellsuspension wurde drei Mal mit PBS gewaschen und die DNA unter Verwendung des TUNEL, In Situ Cell Death Detection Kits laut



Angaben des Herstellerprotokolls markiert. Apoptotische Zellen wurden mittels FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) identifiziert und quantifiziert. Die Apoptoserate konnte anhand positiver Zellen prozentual im Gesamtzellpool berechnet werden.

Als Positivkontrolle wurden im HT-29/B6 Monolayer Apoptosen mit einer Kombination aus 500 U/ml TNF $\alpha$  und 10 ng/ml Interleukin-13 (IL-13) induziert. Die Zytokine wurden beidseitig zugegeben und die Monolayer bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert.

### 2.6.6 LDH-Release-Assay (Zytotoxizitätsassay)

Ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose ist die Zerstörung der Zytoplasmamembran, was die Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen in das Zellkulturmedium zur Folge hat. Im Gegensatz zu den meisten freierwerdenden Substanzen ist die in allen Zellen vorkommende Lactatdehydrogenase (LDH) auch außerhalb der Zelle sehr stabil. Dieses wird im LDH-Assay genutzt und die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes photometrisch nachgewiesen und quantifiziert.

Für die Detektion und Quantifizierung der *Yersinia*-induzierten Zytotoxizität wurde 48 h p.i. das apikale Medium, der Zellüberstand, abgenommen in ein Röhrchen überführt und bis zur Messung bei 4 °C gekühlt. Die Zellen wurden anschließend mit 2% Triton-X-100 (in RPMI) von der Filtermembran gelöst, ebenfalls in ein Röhrchen transferiert und mit der Pipette sorgfältig vereinzelt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität in Zellüberstand und Zellysat wurde im Zentrallabor der Klinischen Chemie am CBF durchgeführt. Die Gesamt-LDH-Aktivität wurde jeweils auf 100% festgesetzt und die LDH-Konzentration im Überstand prozentual ermittelt. Als Positivkontrolle wurde die LDH-Freisetzung auf HT-29/B6-Monolayern 72 h nach Inkubation mit 1000 U/ml INF $\gamma$  gemessen (Madara & Stafford, 1989).

## 2.7 Mikroskopische und immunfluoreszenzoptische Analysen

Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung können zelluläre Protein-Verteilungsmuster durch spezifische Markierung mit Antikörpern visualisiert und untersucht werden. Die verwendeten Antikörper sind entweder direkt mit einem Fluophor gekoppelt oder werden in einem nachfolgenden Schritt über einen zweiten Antikörper fluoreszenzmarkiert. Bei Verwendung von Primärantikörpern aus zwei verschiedenen Spezies und Sekundärantikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener Anregungswellenlängen können gleichzeitig zwei Proteine lokalisiert und verglichen werden. Die markierten Strukturen werden fluoreszenzoptisch abgebildet.

### 2.7.1 Biotinylierung und Immunfluoreszenzfärbung von Tight Junction-Proteinen

Für eine Visualisierung von undichten Arealen in HT-29/B6 Monolayern wurde Sulfo-NHS-SS-Biotin, ein Amin-reaktives Biotinylierungsreagenz, das an frei zugängliche primäre Aminogruppen bindet, eingesetzt. Auf dichten Monolayern sind nur die auf der apikalen Zellober-

fläche exponierten Proteine für das Biotin freizugänglich. Im Gegensatz dazu erlauben Defekte im Monolayer auch einen Durchtritt nach basolateral. Für die spezifische Detektion der biotinylierten Moleküle wurde die hohe Affinität von Biotin zu Streptavidin genutzt. Der Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Streptavidins ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Arealen mit erhöhtem Makromoleküldurchtritt.

Für die Färbung verblieben die Zellmonolayer auf den Zellkulturfiltern. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellkulturfilter wurden in 24-Wellplatten gesetzt und beidseitig mit PBS versorgt. Um einer Internalisierung des Biotins vorzubeugen, wurden die Zellen 30 min lang auf 4 °C gekühlt. Dann erst wurde der Puffer im apikalen Kompartiment durch 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin ersetzt. Die Biotin-Bindung erfolgte bei 4 °C für 30 min. Anschließend wurde das Biotin entfernt und die Restaktivität durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem 100 mM Glycin gelöscht. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit TBS und PBS an. Die Zellen wurden mit 2% Paraformaldehyd bei RT für 30 min fixiert und dieses anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Im Anschluss an die Fixierung erfolgte eine Immunfärbung von TJ-Proteinen auf den biotinylierten Monolayern. Die Primärantikörper wurden für die Inkubation mit PBS verdünnt (Claudine 1:100, Occludin und ZO-1 1:200) und zur Permeabilisierung 0,05% TritonX-100 zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 2 Stunden. Überschüssige Antikörper wurden wiederum in drei Waschschrten entfernt. Die sich anschließende 80-minütige Inkubation erfolgte mit den in PBS verdünnten Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG oder Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG (1:500) und Alexa Fluor 594 konjugiertem Streptavidin (1:100). Außerdem wurde zur Zellkernfärbung der Nukleinsäurefarbstoff DAPI (1 µg/ml) eingesetzt. Alle Filter wurden nach Durchführung der jeweiligen Färbeschritte vorsichtig mit Hilfe eines Skalpell aus der Ringhalterung getrennt, mit ddH<sub>2</sub>O und anschließend mit 98%igem Ethanol gespült und nach kurzem Trocknen auf dem Objektträger mit 30 µl Mount Fluor Pro-Tags mukosal überschichtet und durch Auflegen eines Deckgläschens eingedeckt. Die Objektträger wurden bis zur Mikroskopie bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

### 2.7.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Claudin-14

Die mit *E. coli* Nisslekonzentrat behandelten Monolayer wurden nach der Inkubationszeit mit eiskaltem PBS gewaschen und für 60 min bei -20 °C mit Methanol fixiert. Nach der Fixierung sowie zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Monolayer drei Mal 15 min lang unter leichtem Schütteln mit ZONAPSE-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit Primärantikörpern (Claudin-14 und ZO-1 je 1:200 in ZONAPSE-Puffer) sowie die mit Sekundärantikörpern (Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG und Alexa Fluor 594 anti-Ziege IgG je 1:500, DAPI 1:2000 in ZONAPSE-Puffer) erfolgte jeweils für zwei Stunden unter Schütteln (300 rpm) bei

Raumtemperatur. Vor dem Eindecken (siehe 2.7.1) wurden die Filter mit ddH<sub>2</sub>O gespült und für 60 min in Ethanol bei -20 °C inkubiert.

### 2.7.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Biotinylierung und Veränderungen im TJ-Netzwerk wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie visualisiert.

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird die Probe in einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM für *confocal laser scanning microscope*) punktuell bestrahlt und die hervorgerufene Fluoreszenz ebenso punktuell gemessen. Informationen über die gesamte Probe erhält man, wenn der Laserstrahl über die Probe bewegt und das Präparat Punkt für Punkt abgerastert wird. Ein vollständiges Bild wird aus den Lichtintensitäten der einzelnen gemessenen Punkte rechnerisch im Computer konstruiert. Eine in ihrem Durchmesser variable Blende blockiert Licht, welches von außerhalb der Objektebene kommt, wodurch das Streulicht reduziert und die Auflösung in der zu betrachtenden Ebene verbessert wird. Auf diese Weise ermöglicht die konfokale Laserscanning-Mikroskopie die Abbildung sehr dünner Probenschichten. Die Fluoreszenz unterschiedlicher Fluorophore wird durch von verschiedenen Lasern emittierte Wellenlängen angeregt und unter Verwendung passender Filter detektiert.

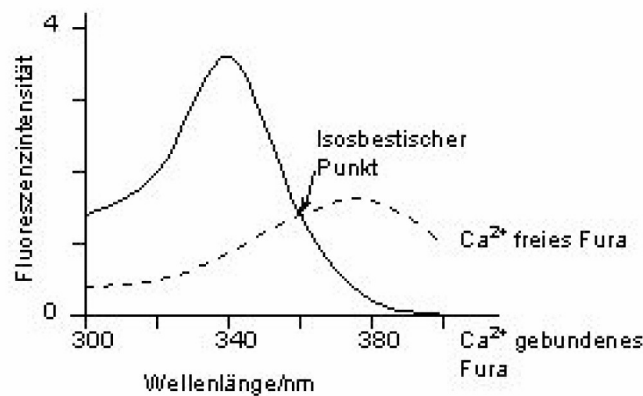
In dieser Arbeit wurden Anregungswellenlängen von 543 nm für Streptavidin-Biotin oder Claudin-14 (rot) und 488 nm für alle anderen TJ-Proteine (grün) eingesetzt. DAPI wurde mit einer Wellenlänge von 408 nm (blau) angeregt. Für die Aufnahmen wurde ein 40×/1,3 Oil Plan-Neofluar-Objektiv oder ein 63×/1,4 Oil Plan-Apochromat-Objektiv verwendet. Für Z-Scans wurden mehrere XY-Aufnahmen gemacht, die übereinander gelegt eine Seitenansicht der Z-Achse ermöglichen. Die Aufnahme und Auswertung erfolgte mit der LSM-Software LSM510 Version 3.2 SP2.

### 2.7.4 Messung einer *Y. enterocolitica* induzierten Calcium-Antwort in HT-29/B6-Zellen

Die Induktion einer typischerweise schnellen Calcium-Antwort wurde innerhalb der ersten 45 min nach Infektion mit *Y. enterocolitica* mittels Fura-Messung überprüft.

Die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration ist mit Hilfe des calciumsensitiven, fluoreszierenden Farbstoffs Fura-2 nach der von Grynkiewicz beschriebenen ratiometrischen Methode nachzuweisen (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Fura-2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) Chelatkomplexe bildet. Die Bindung ist reversibel und erfolgt konzentrationsabhängig. Da Fura-2 membranimpermeabel ist, werden die Zellen für die Messung mit einem Fura-2-Acetoxymethyl-(AM)-Ester beladen, der aufgrund seiner apolaren Eigenschaften die Zellmembran leicht überwinden kann. Intrazellulär wird die Azetoxy-

methylgruppe von Esterasen abgespalten, so dass Fura-2 die Zelle nicht mehr verlassen kann und sich intrazellulär anreichert. Fura-2 emittiert Licht der Wellenlänge 510 nm, wenn es mit Licht im UV-Spektrum angeregt wird. Die Fluoreszenzintensität ändert sich sowohl mit der Wellenlänge des Anregungslichts als auch mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Bei abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nimmt die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm zu, bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm dagegen ab. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und somit die Menge an mit  $\text{Ca}^{2+}$ -komplexiertem Farbstoff, nimmt die Intensität des emittierten Lichts bei der Anregungswellenlänge von 380 nm ab und bei 340 nm zu. Das heißt, bei Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ergeben sich gegenläufige Änderungen der Fluoreszenzintensität, eine Zunahme bei 340 nm und eine Abnahme bei 380 nm (Abb. 2.10).



**Abb. 2.10: Darstellung der Fluoreszenzeigenschaften des calciumsensitiven Farbstoffs Fura-2.** Durch Bindung von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  verändert sich die Intensität des emittierten Lichts bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Der isobestische Punkt stellt diejenige Wellenlänge dar, bei der sich die Emissionsintensität durch Änderung der Calciumkonzentration nicht verschiebt. Für Fura-2 liegt diese Wellenlänge bei 361 nm (Wohlleben, 2005).

Während einer Messung werden mit Fura-2 beladene Zellen in kurzer Folge abwechselnd mit UV-Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt. Das emittierte Licht wird für beide Wellenlängen getrennt registriert und für die Auswertung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können auf diese Weise über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Die Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt nach der Formel von Grynkiewicz. Die dafür benötigten Parameter werden durch Eichung ermittelt. Hierzu wird dem Farbstoff zuerst sämtliches Calcium entzogen, im Anschluss wird der Farbstoff mit Calcium gesättigt. Die hierbei gemessenen Emissionsintensitäten  $F_i$  und der minimale bzw. maximale Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm ( $R_{\min}$  und  $R_{\max}$ ) dienen als Eichpunkte und ermöglichen mit Hilfe der folgenden Gleichung (nach Grynkiewicz) die Berechnung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

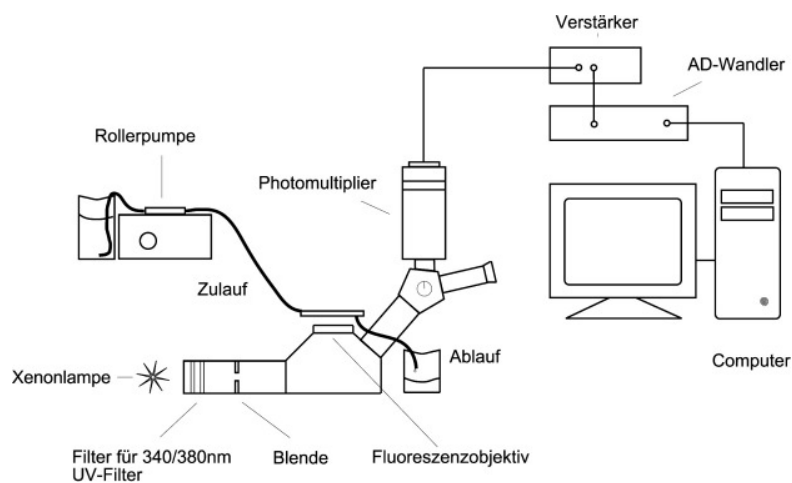
$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \frac{F_{i,380 \text{ Ca}^{2+}\text{frei}}}{F_{i,380 \text{ Ca}^{2+}\text{geb}}}$$

<b>K<sub>d</sub></b>	Dissoziationskonstante für Fura-2 und Ca <sup>2+</sup> (224 nmol/l) bei 37 °C
<b>R</b>	Fluoreszenzratio
<b>R<sub>min</sub></b>	Fluoreszenzratio bei 0 mM Ca <sup>2+</sup>
<b>R<sub>max</sub></b>	Fluoreszenzratio bei Ca <sup>2+</sup> Sättigung
<b>F<sub>i,380</sub></b>	Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm

### Aufbau der Versuchsanordnung

Der Messstand bestand aus einem inversen Mikroskop (Olympus), auf dessen Objektträgtisch eine eigens hierfür gebaute Perfusionskammer mit einem Glasboden montiert war. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden in die Kammer eingebracht und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe kontinuierlich mit Versuchslösung (siehe unten) bzw. Bakteriensuspension gespült. Um die Messung bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C durchführen zu können, wurde die Lösung über einen Wärmeaustauscher erwärmt und die Temperatur in der Versuchskammer über eine Kupferwärmeplatte konstant gehalten.

Das UV-Licht wurde mit einer Xenonlampe erzeugt. Ein computergesteuertes Filterrad erlaubte eine abwechselnde Anregung des intrazellulären Farbstoffs Fura-2 mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm. Das von dem Farbstoff emittierte Licht wurde durch einen Photomultiplier detektiert und über einen Verstärker und einen AD-Wandler an einen PC weitergeleitet. Die zur Steuerung des Filterrades und Aufzeichnung der Lichtemissionen verwendete Software war TIDA 3.0 (HEKA Elektronik; Lamprocht). Die gesamte Apparatur befand sich in einem abgedunkelten Raum, um Artefakte zu vermeiden. Der Aufbau der Versuchsanordnung ist in Abb. 2.11 dargestellt.



**Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Calciummessapparatur.** (modifiziert nach Wohlleben, 2005)

### Durchführung der Messung

Für die Messungen wurden mit HT-29/B6-Zellen konfluent bewachsene Deckgläser eingesetzt. Als Versuchslösung diente HEPES-Ringer. Die Zellen wurden in die Versuchslösung transferiert und für 60 min mit  $2 \times 10^{-5}$  M Fura-2-AM im Brutschrank bei 37 °C beladen. Anschließend wurden extrazelluläre Farbstoffreste durch Spülen mit Versuchslösung entfernt, das Deckglas in die Versuchskammer eingebracht und 15 min zur Äquilibrierung mit Versuchslösung perfundiert. Um einen aktiven Export von Fura-2 aus den Zellen über Anionentransporter zu verhindern (Di Virgilio *et al.*, 1989; Abrahamse & Rechkemmer, 2001) wurde der Versuchslösung für die Messung bei 37 °C 2 mM Probenecid zugesetzt.

Die Bakterien wurden in 200 ml LB-Medium wie unter 2.3.1 beschrieben gezogen, mit PBS gewaschen und in Versuchslösung entsprechend einer  $OD_{578}$  von 2 aufgenommen. Die Hitzeinaktivierung erfolgte wie beschrieben bei 95 °C. Zu Beginn eines Versuchs wurde 12 min in reiner Versuchslösung gemessen und anschließend mit vitaler bzw. hitzeinaktivierter Bakteriensuspension bis zu 45 min lang perfundiert. Die Perfusionsrate betrug 1,5 ml/min. Ein Versuch wurde bei RT durchgeführt, um eine Temperaturabhängigkeit möglicher Effekte auszuschließen. Für die Auswertung der Messungen mit Bakteriensuspension wurden die Änderungen des emittierten Lichts für beide Wellenlängen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zur Stimulation einer Calcium-Antwort wurden der Versuchslösung 300  $\mu$ M ATP zugesetzt. Bei diesen Versuchen wurde zur Konzentrationsbestimmung im Anschluss eine Eichung durchgeführt. Dazu wurde zuerst mit einer calciumfreien, EGTA-haltigen Lösung perfundiert. Diese enthielt das Ionophor Ionomycin, das einen Konzentrationsausgleich von intra- und extrazellulärem Calcium bewirkte. Die Folge war ein Absinken des intrazellulären Calciumgehalts auf nominell null, so dass Fura-2 in Calcium-freier Form vorlag und  $R_{\min}$  ermittelt werden konnte. Anschließend wurde ionomycinhaltige Versuchslösung mit definierter Calciumkonzentration (5 mM) in die Perfusionskammer geleitet, was zur Sättigung von Fura-2 mit Calcium führte und so  $R_{\max}$  bestimmt werden konnte. Die gemessene Fluoreszenzemission wurde ebenfalls zur Berechnung des intrazellulären Calciumlevels herangezogen.

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit PD. Dr. Rita Rosenthal aus dem Institut für Klinische Physiologie, CBF durchgeführt.

### 2.7.5 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie

Die Gefrierbruchtechnik ermöglicht es, Ultrastrukturen von Membranen in ihren natürlichen Dimensionen im Elektronenmikroskop zu analysieren. Die Herstellung von Gefrierbruchpräparaten sowie die anschließende Analyse am Transmissionselektronenmikroskop erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne M. Krug (Institut für Klinische Physiologie, CBF) im Rahmen des Z-Projekts der DFG-Forschergruppe FOR 721.

HT-29/B6-Monolayer wurden dazu 48 h p.i. mit Phosphat-gepuffertem 2%igem Glutaraldehyd für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Die Entwässerung der Proben wurde durch 30-minütige Inkubation in 10%iger und anschließend 30%iger Glycerollösung erreicht. Die Zellen wurden mit einem Skalpell vorsichtig von der Filtermembran herunter geschabt, in einen Gefrierbruchhalter überführt und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Freon 22 eingefroren. Die gefrorenen epithelialen Monolayer wurde in einem Gefrierbruchgerät (Denton Vacuum DV-502) unter Vakuum ( $2 \cdot 10^{-7}$  Torr) bei  $-100$  °C gebrochen. Durch Bedampfung der Bruchflächen mit einem dünnen Film aus Platin im schrägen Winkel wurden so genannte Replikas, aus Metall bestehende Abdrücke der darunter liegenden Strukturen, erzeugt, die das Oberflächenrelief des Gewebes durch eine unterschiedliche Dicke der Metallschicht abbilden. Durch eine zweite Bedampfung mit einer dünnen Schicht Kohlenstoff wurden die Replikas stabilisiert. Abschließend wurden die Replikas zur Eliminierung organischer Reste für eine Stunde in Natriumhypochlorit inkubiert, dann auf Kupfernetze übertragen und mit Amylacetat gespült.

Die so erzeugten Replika wurden unter dem Elektronenmikroskop (Zeiss 902A) transmissionselektronenmikroskopisch betrachtet und Bilder bei 51.000-facher Vergrößerung aufgenommen (iTEM, Olympus Soft Imaging Solution, Veleta). Zur morphometrischen Auswertung wurde ein Netzgitter mit 200 nm-Intervallen an den am weitesten apikal gelegenen TJ-Strang angelegt. Die Anzahl der horizontal orientierten Stränge an den Schnittpunkten des Gitters wurde bestimmt und die vertikale Netzwerkausdehnung gemessen. Weiterhin wurden die Strangdichte bestimmt und Strangunterbrechungen  $>20$  nm gezählt.

## 2.8 Molekularbiologische Methoden

### 2.8.1 RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen

Gesamt-RNA wurde über eine Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Fällung aus HT-29/B6-Monolayern mit Hilfe des gebrauchsfertigen Reagenz Trizol extrahiert. Die Methode basiert auf der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation (Chomczynski & Sacchi, 1987) und wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Die Zellkulturfilter wurden nach der jeweiligen Inkubationsdauer aus der Schale entnommen, das Kultumedium entfernt und die Monolayer auf der Filtermembran mit kaltem PBS gewaschen.

500  $\mu$ l des Reagenz wurden pro Filter eingesetzt, die Zellen mit einem Rührspatel von der Membran geschabt und das Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 100  $\mu$ l Chloroform (pro Ansatz) und anschließender Zentrifugation wurde das Homogenat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA war in der oberen wässrigen Phase enthalten, die DNA in der organischen und in der Interphase. Die Proteine befanden sich ausschließlich in der organischen Phase. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Eppen-

dorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 250 µl Isopropanol bei 4 °C für 15 min. Nach zweimaligem Waschen mit 75%igem Ethanol wurde die RNA luftgetrocknet und in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.8.2 Quantitative RNA-Bestimmung

Die Konzentration der präparierten RNA wurde über eine Messung der OD bei 260 nm im Spektrophotometer Nano Drop 1000 bestimmt.

### 2.8.3 Reverse Transkription

Für eine Quantifizierung von mRNA-Leveln musste die RNA zuvor mittels Reverser Transkriptase in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben werden. In der Natur dient das Enzym dem Retrovirus zur Replikation seines Genoms. In der Molekularbiologie hingegen wird es zur Synthese von DNA-Kopien (cDNA) aus RNA-Strängen, welche dem Enzym als Matrize dienen, verwendet. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) als Substrate und Energielieferant. Außerdem benötigt sie für ihre volle Aktivität  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  sowie Primer-Moleküle, an denen die Synthese der DNA-Kette beginnt.

Für die reverse Transkription von mRNA (aus gesamt-RNA) wurde der PCR High-Capacity cDNA Archive Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dabei dienten zufällig verteilte Hexamer-Nukleotide als Primer.

Es wurden 4 µg RNA in einem Volumen von 40 µl umgeschrieben.

40 µl Ansatz:	RT-Puffer (10×)	4 µl
	dNTPs (25×)	1,6 µl
	Random Hexamer Primers	4 µl
	RNase-Out (Inhibitor)	1 µl
	Reverse Transkriptase	2 µl
	RNA	x µl (entsprechend 4 µg)
	mit x µl ddH <sub>2</sub> O auf 40 µl aufgefüllt	
Inkubation:	10 min bei 25 °C, 2 h bei 37 °C	

### 2.8.4 Real-Time-quantitative-PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine etablierte Methode zur Genexpressionsanalyse, wobei die quantitative Bestimmung des Expressionsniveaus durch Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, erfolgt.

Neben der jeweiligen Primerkombination kommt bei diesem Verfahren eine jeweils spezifische TaqMan-Sonde zum Einsatz (Tabelle 2.3), die am 5'-Ende mit einem Reporter-



Fluorophor (FAM oder VIC) und am 3'-Ende mit einem Quencher (TAMRA) gekoppelt ist und an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet. Aufgrund der räumlichen Nähe wird das bei Anregung entstehende Fluoreszenzlicht sofort vom Quencher absorbiert. Erst wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aufweist, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Das heißt, die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

In dieser Arbeit wurden 10 µl 2×TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 µl Sonden bzw. Primergemisch verwendet und 2 µl der synthetisierten cDNA in einem PCR-Ansatz von 20 µl eingesetzt. Die Durchführung erfolgte in einem 7500 Fast Real-Time PCR-Cycler bei folgendem Temperaturverlauf: 95 °C 10 min, 45 Zyklen: 95 °C 15 Sekunden, 60 °C 60 Sekunden. Zur Normalisierung der CT-Werte (threshold cycle) des untersuchten Gens wurde stets eine endogene Kontrolle mitgeführt. Hier wurde das GAP-DH-Sondensystem bestehend aus einer Primerkombination und VIC/TAMRA-Fluorophor-gekoppelter Sonde genutzt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak & Schmittgen, 2001.

### 2.8.5 Transfektion von siRNA

Um untersuchen zu können, welche Funktionen Proteine in einer Zelle übernehmen, werden in der molekularbiologischen Forschung seit einigen Jahren synthetisch hergestellte siRNAs (*short interfering RNA*) eingesetzt, um durch RNA-Interferenz die Expression von spezifischen Zielgenen zu verringern. Die siRNA wird durch Transfektion in die Zellen eingebracht und baut dort die mRNA des Zielgens ab. Die resultierende Verringerung des Genprodukts ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Gens zu erhalten.

Konfluent bewachsene HT-29/B6-Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben, trypsinisiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und für die Transfektion pro Ansatz  $1 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt. Das Kulturmedium wurde durch Zentrifugation bei  $200 \times g$  entfernt, das Zellpellet in 100 µl Nucleofektionsreagenz R (amaxa biosystems siRNA Kit) vorsichtig resuspendiert und 10 µl Claudin-14 siRNA bzw. 5 µl GFP siRNA (als Kontrolle) zugesetzt. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation in einem Nucleofektionsgerät der Firma Amaxa nach Angaben des Herstellers (Programm W-017) durchgeführt. Nach dem Stromimpuls wurde sofort 500 µl vorgewärmtes Kulturmedium (RPMI mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) auf den Ansatz gegeben und dieser dann vorsichtig auf einen Zellkulturfilter überführt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37 °C im Begasungsbrutschrank über sechs Tage, alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Der  $R^t$  wurde täglich gemessen.

## 2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Grafiken wurden mit Xact08 erstellt, Tabellen mit Microsoft Word. Die Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben und – wenn nicht anders beschrieben – als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) angegeben. Zur Bestimmung von Signifikanzen wurde der Student's t-Test verwendet. Bei Mehrfach-Testung wurde der Bonferroni-Holm-Test abgeschlossen. Die probeweise Anwendung von ANOVA ergab erwartungsgemäß die gleichen Signifikanzlevel.

Bei nicht normalverteilten Grundgesamtheiten wurde der Median angegeben und die Signifikanz mit dem U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney getestet.

Ein  $P$ -Wert von  $P < 0,05$  wurde als signifikant gewertet (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifikation *Y. enterocolitica*-spezifischer Pathomechanismen an der epithelialen Barriere

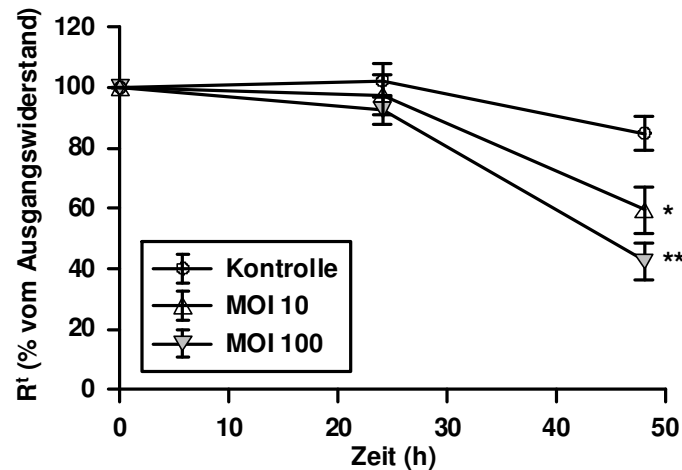
Im Folgenden wird zunächst die durch den enteropathogenen Durchfallerreger *Y. enterocolitica* verursachte Barriestörung im Zellkulturmodell dokumentiert. Die Identifizierung und Charakterisierung des Barrieredefekts erfolgte durch Analyse physiologischer sowie molekularer Eigenschaften des infizierten Zellschichtes mit Hilfe elektrophysiologischer, molekularbiologischer, konfokaler Laserscanning-mikroskopischer und zellbiologischer Methoden. Weiterführend werden Studien zur Identifizierung von ursächlichen Virulenzfaktoren sowie beteiligter Signalkaskaden dargestellt.

#### 3.1.1 Verminderung des transepithelialen Widerstands durch *Y. enterocolitica* im Infektionsmodell

Konfluente, auf Filtermembranen kultivierte epitheliale HT-29/B6-Zellmonolayer wurden mit *Y. enterocolitica* apikal infiziert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt bei 37 °C über 48 h. Um ein unkontrolliertes Überwuchern des Zellschichtes durch den Erreger zu verhindern, erfolgte 2,5 h nach der Infektion die Applikation von Gentamycin. Als Kontrolle wurden parallel unbehandelte HT-29/B6-Monolayer mitgeführt. Der transepitheliale Widerstand diente als Maß für die Barriereintegrität, wobei der Ausgangswiderstand direkt vor der Infektion erfasst und davon ausgehende Änderungen nach der Infektion über die Inkubationszeit verfolgt wurden.

Abb. 3.1 zeigt den Zeitverlauf nach Infektion mit  $1 \cdot 10^7$  (MOI 10) und  $1 \cdot 10^8$  (MOI 100) *Y. enterocolitica* über 48 h. Innerhalb der ersten 24 h waren keine signifikanten Änderungen vom Ausgangswiderstand zu vermerken. Nach 48 h wiesen nicht infizierte Kontrollmonolayer nur eine leichte Verminderung vom Ausgangswiderstand auf ( $85 \pm 6\%$ ;  $n = 6$ ). Im Gegensatz dazu resultierte die Infektion mit *Y. enterocolitica* 48 h p.i. in einem eindeutigen Widerstandsabfall.  $1 \cdot 10^7$  *Y. enterocolitica* reduzierten den Ausgangswiderstand auf  $60 \pm 8\%$  ( $P < 0,05$  versus Kontrolle;  $n = 6$ ) und  $1 \cdot 10^8$  *Y. enterocolitica* sogar auf  $40 \pm 6\%$  ( $P < 0,01$  versus Kontrolle;  $n = 6$ ). Eine in gleicher Weise durchgeführte Infektion mit dem *E. coli* K12-Stamm bewirkte 48 h p.i. nur eine leichte  $R^t$ -Verminderung, die sich nicht signifikant von den Kontrollwerten unterschied ( $71 \pm 2\%$  in K12-infizierten Monolayern versus  $89 \pm 10\%$  in Kontrollen;  $n = 4$ ).

Bemerkenswerterweise war die Induktion des  $R^t$ -Abfalls durch *Y. enterocolitica* unabhängig von der Expositionsdauer. Erfolgte die Gentamycingabe bereits 5 min statt 2,5 h nach der Infektion, war ebenfalls ein  $R^t$ -Abfall 48 p.i. auf  $32 \pm 5\%$  zu verzeichnen ( $P < 0,05$ ;  $n = 3$ ).



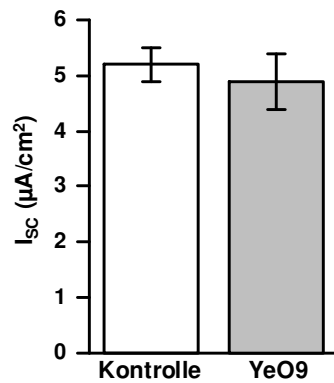
**Abb. 3.1: Verminderung des  $R^t$  durch *Y. enterocolitica*.** HT-29/B6-Monolayer wurden mit *Y. enterocolitica* (MOI 10 und MOI 100) infiziert und bei 37 °C inkubiert. 2,5 h p.i. wurden die Bakterien durch Antibiotikagabe abgetötet. Die  $R^t$ -Messung erfolgte über 48 h (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  versus Kontrolle;  $n = 6$ ).

Alle weiteren Analysen erfolgten an mit  $1 \cdot 10^8$  *Y. enterocolitica* infizierten Monolayern 48 h p.i. Als Referenz wurden, wenn nicht anderes beschrieben, nicht infizierte Kontrollmonolayer parallel mitgeführt.

### 3.1.2 Charakterisierung der Barrierestörung

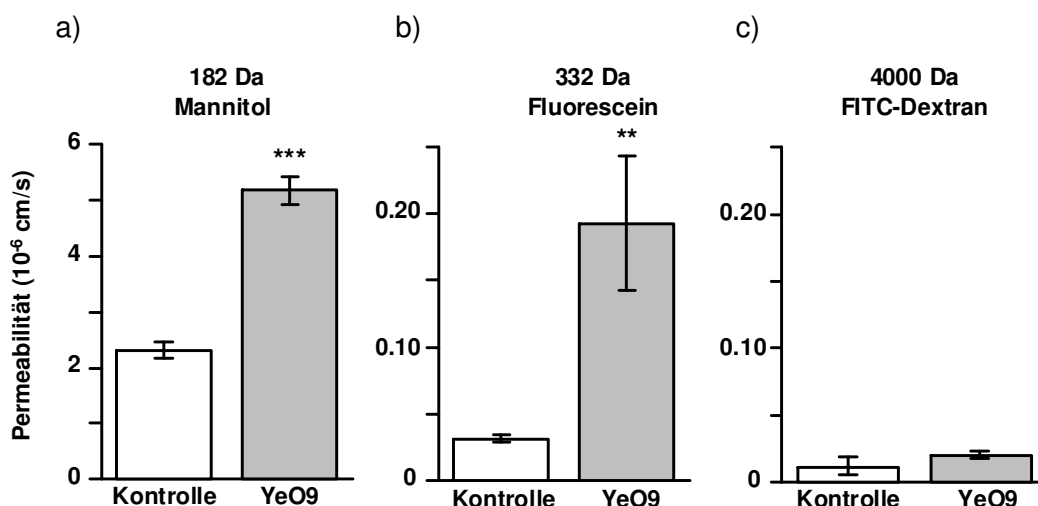
In einem ersten Ansatz zur Charakterisierung der epithelialen Barrierestörung wurde die Ussing-Technik zur Erfassung elektrophysiologischer Parameter eingesetzt. Dazu wurden die Filter 48 h p.i. in Ussing-Kammern eingespannt, der elektrische Widerstand ( $R^t$ ,  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) bestimmt, Kurzschlussströme ermittelt und unidirektionale Fluxmessungen von apikal nach basolateral mit markierten Molekülen verschiedener Größe ( $^3\text{H}$ -Mannitol, FITC-Dextran-400 und Fluoreszein) durchgeführt.

Wie Abb. 3.2 zu entnehmen ist, unterschieden sich die in Kontrollen und infizierten Monolayern gemessenen Kurzschlussströme nicht voneinander. Darüber hinaus zeigte sich, dass *Y. enterocolitica* keine aktive Chloridsekretion in HT-29/B6-Zellen induzierte. Änderungen des  $I_{\text{SC}}$  nach Stimulation oder Inhibition der Chloridsekretion waren nicht signifikant verschieden von denen in Kontrollmonolayern. Eine durch Forskolin induzierte Chloridsekretion resultierte in einer Zunahme des  $I_{\text{SC}}$  um das  $6,4 \pm 0,6$ -fache in infizierten Zelllayern und um das  $5,3 \pm 0,2$ -fache in Kontrollen ( $n = 3$ ). Eine durch Bumetanid vermittelte Inhibition der Chloridsekretion unstimulierter Monolayer verminderte den  $I_{\text{SC}}$   $1,3 \pm 0,04$ -fach in Kontrollen und  $1,2 \pm 0,1$ -fach in *Y. enterocolitica* infizierten Monolayern.



**Abb. 3.2: Messung von Kurzschlussströmen.** Die 48 h p.i. in Kontrollen und infizierten Monolayern gemessenen Kurzschlussströme waren nicht signifikant verschieden ( $n = 18$ ).

Die durchgeführten Fluxmessungen zeigten hingegen, dass der *Y. enterocolitica*-induzierte Widerstandsabfall mit einer parallelen Permeabilitätszunahme verknüpft war. Für das 182 Da große Mannitolmolekül (Radius 3,6 Å) ergab sich eine 2,3-fache Permeabilitätszunahme, nämlich von  $2,3 \pm 0,2$  in Kontrollen auf  $5,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$  cm/s in infizierten Monolayern ( $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ) (Abb. 3.3a). Eine 6-fache Steigerung der Permeabilität wurde für Fluorescein (332 Da, Radius 4,5 Å) gemessen. Die Permeabilität nahm hier von  $32 \pm 3$  in Kontrollen auf  $193 \pm 50 \cdot 10^{-9}$  cm/s in infizierten Monolayern zu ( $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ) (Abb. 3.3b). Hingegen zeigte die Permeation eines 4 kDa großen FITC-markierten Dextranmoleküls (Radius ~13 Å) keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle ( $10 \pm 7 \cdot 10^{-9}$  cm/s in Kontrollen versus  $20 \pm 3 \cdot 10^{-9}$  cm/s nach *Y. enterocolitica*-Infektion;  $n = 6$ ) (Abb. 3.3c).



**Abb. 3.3: Einfluss von *Y. enterocolitica* auf die Permeabilität in HT-29/B6-Monolayern.** Permeabilitäten wurden über Fluxmessungen in Ussing-Kammern ermittelt. Die Infektion mit *Y. enterocolitica* resultierte in einer Permeabilitätszunahme von **a)** 182 Da Mannitol ( $***P < 0,001$ ;  $n = 6$ ) und **b)** 332 Da Fluorescein ( $**P < 0,01$ ;  $n = 6$ ). **c)** Für ein 4000 Da großes FITC-Dextranmolekül waren beide Zelllayer annähernd impermeabel ( $n = 6$ ).

### 3.1.3 Identifikation von *leaky regions*

Um aufzuklären, ob die beobachtete Permeabilitäts- bzw. Leitfähigkeitszunahme homogen über den Zelloberflächen verteilt auftrat oder ein lokales Phänomen darstellte, kam die Conductance-Scanning-Technik zum Einsatz.

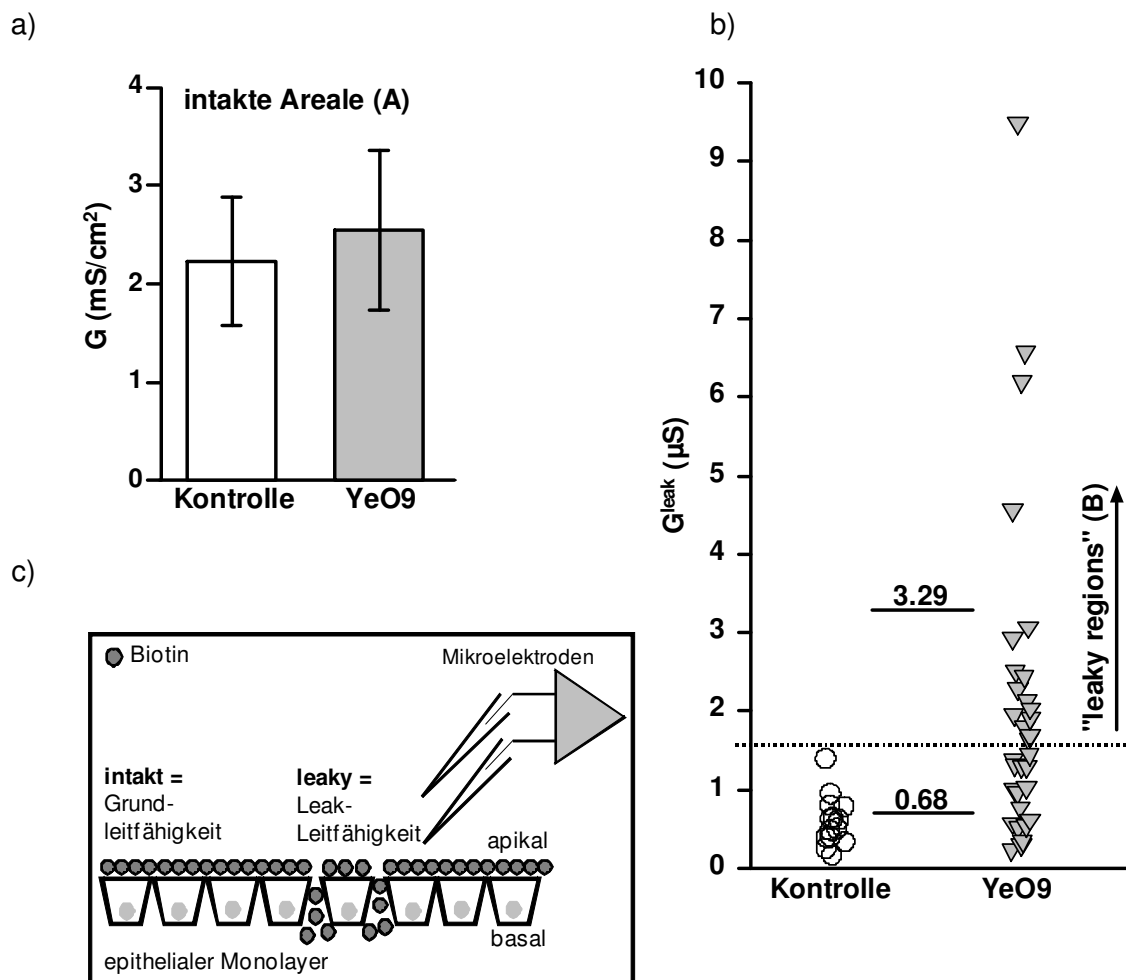
Auf jedem Monolayer wurde eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  in  $100 \text{ }\mu\text{m}$ -Schritten gescannt. Wie Abb. 3.4a zu entnehmen ist, war die Basalleitfähigkeit infizierter Monolayer unverändert ( $2,5 \pm 0,8 \text{ mS/cm}^2$  nach Infektion *versus*  $2,2 \pm 0,6 \text{ mS/cm}^2$  in Kontrollen;  $n = 7$ ). Bereiche dieses Leitfähigkeitsniveaus repräsentierten mutmaßlich intakte Areale des Zelloberflächen.

Auf der Spitze der Basalleitfähigkeit konnten inhomogen über den gesamten Zelloberflächen verteilt lokale Leitfähigkeitszunahmen detektiert und deren *Leak*-Leitfähigkeit ( $G_{\text{leak}}$ ,  $\mu\text{S}$ ) erfasst werden. Wie bereits veröffentlicht (Bojarski *et al.*, 2001), sind kleine lokale Leitfähigkeitszunahmen mit einer *Leak*-Leitfähigkeit im Bereich von  $0,72 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{S}$  auf Apoptosen im Zelloberflächen zurückzuführen. In dieser Arbeit konnten Apoptosen mit Hilfe einer parallel zur Leitfähigkeitsmessung durchgeführten lichtmikroskopischen Kontrolle anhand der charakteristischen Rosettenbildung der sie umgebenden Nachbarzellen, identifiziert werden. Die durch Apoptosen hervorgerufenen Leitfähigkeitserhöhungen wiesen hier eine mittlere *Leak*-Leitfähigkeit von  $0,68 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{S}$  auf und wurden in infizierten und Kontrollmonolayern mit gleicher Häufigkeit registriert (14 in Kontrollen und 15 pro  $\text{mm}^2$  in infizierten Monolayern). Da alle in Kontrollmonolayern detektierten Leitfähigkeitserhöhungen auf Apoptosen basierten, wurde für die Darstellung in Abb. 3.4b eine extrapolierte Linie in sicherem Abstand ( $1,6 \text{ }\mu\text{S}$ ) über diese Werte gezogen. In mit *Y. enterocolitica* infizierten Monolayern konnten darüber hinaus zusätzliche Regionen gefunden werden, deren lokale *Leak*-Leitfähigkeiten weit oberhalb des Limits der apoptotischen *Leak*-Leitfähigkeiten (Abb. 3.4b) lagen. Diese Regionen wurden als *leaky regions* definiert und wiesen mit einer mittleren *Leak*-Leitfähigkeit von  $3,3 \pm 0,6 \text{ }\mu\text{S}$  (Anzahl 16) gegenüber den Apoptosen eine fünffach höhere Leitfähigkeit auf.

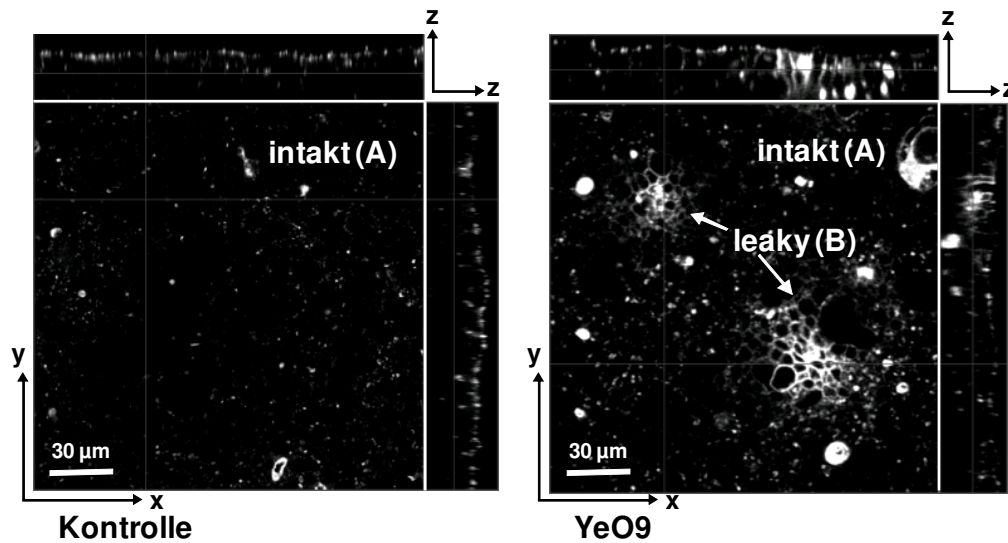
Bei allen in diesem Versuchsansatz analysierten Kontrollen lag der  $R^t$  im Mittel bei  $546 \pm 33 \text{ }\Omega\text{-cm}^2$ , was einer Gesamtleitfähigkeit von  $1,9 \pm 0,1 \text{ mS/cm}^2$  ( $G_{\text{con}}$ ) entsprach ( $n = 7$ ). In infizierten Monolayern wurde ein mittlerer  $R^t$  von  $299 \pm 30 \text{ }\Omega\text{-cm}^2$  gemessen, die Gesamtleitfähigkeit entsprach demnach  $3,5 \pm 0,3 \text{ mS/cm}^2$  ( $G_{\text{Ye}}$ ). Die Differenz zwischen  $G_{\text{con}}$  und  $G_{\text{Ye}}$  betrug  $1,6 \text{ mS/cm}^2$  ( $G\Delta$ ). Durch Division von  $G\Delta$  durch  $G_{\text{leak}}$  ( $1,6 \text{ mS/cm}^2 / 3,3 \pm 0,6 \text{ }\mu\text{S}$ ) wurde eine Anzahl von ca.  $300 \text{ leaky regions/cm}^2$  abgeschätzt.

Morphologische Besonderheiten oder Veränderungen der *leaky regions* konnten mit dem an den Conductance-Scanning-Messstand gekoppelten Lichtmikroskop nicht erfasst werden. Die Visualisierung hochpermeabler Areale wurde jedoch durch Biotinylierung und anschließende konfokale Laserscanning-Mikroskopie erreicht. Die zugrunde liegende experimentelle Idee des Conductance-Scannings und der Biotinpermeation über ein lokales Leck sind in

Abb. 3.4c schematisch dargestellt. Sulfo-NHS-Biotin, das mit hoher Affinität an die primären Aminogruppen frei zugänglicher Proteine bindet, wurde apikal auf die Monolayer gegeben. Durch anschließende Markierung mit Fluoreszenz-gekoppeltem Streptavidin konnte das gebundene Biotin visualisiert werden. Es zeigte sich, dass intakte HT-29/B6 Kontrollmonolayer keine Biotinpermeation von der apikalen Oberfläche zum basolateralen Spalt zuließen. Hier war ausschließlich die apikale Zelloberfläche markiert (Abb. 3.4d, (A)). Im Gegensatz dazu wiesen mit *Y. enterocolitica* infizierte Monolayer fokale Regionen mit intensiv gefärbten Zellgrenzen auf (Abb. 3.4d (B)). Hierbei handelte es sich nicht um tatsächliche, durch das Fehlen von Zellen charakterisierte Löcher, sondern um Areale stark erhöhter Permeabilität in denen das Biotin vom apikalen zum basolateralen Kompartiment durchtrat. Diese Areale waren unterschiedlich groß und ungleichmäßig über den gesamten Zelllayer verteilt. Die umgebenden Bereiche waren dagegen dicht und wie in Kontrollmonolayern ausschließlich auf der Zelloberfläche biotinyliert. Somit war davon auszugehen, dass es sich bei diesen hoch permeablen Arealen um die mittels Conductance-Scanning identifizierten *leaky regions* handelt.



d)

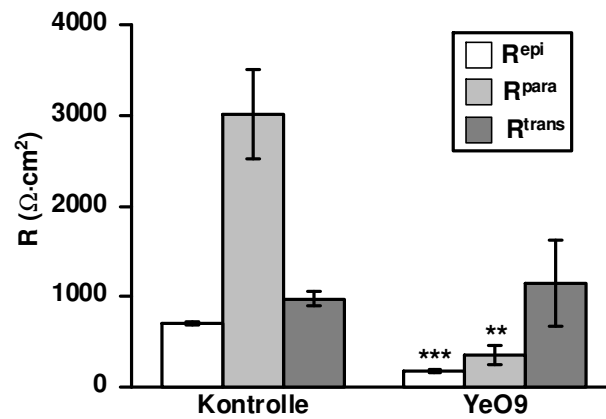


**Abb. 3.4: Diskontinuierliches Auftreten von Barriere-defekten.** **a)** Die Verteilung lokaler Leitfähigkeitsniveaus wurde auf infizierten und Kontrollmonolayer mittels Conductance-Scanning untersucht. Die Basalleitfähigkeit intakter Regionen war auf infizierten Monolayern mit der auf Kontrollmonolayern vergleichbar ( $n = 7$ ). **b)** Die epithelialen Zell-layer wurden auf lokale Leitfähigkeitserhöhungen untersucht ( $n = 7$ ) und kleine durch Apoptosen verursachte Leitfähigkeitserhöhungen durch eine gestrichelte Linie abgegrenzt. Leitfähigkeitserhöhungen oberhalb dieser Linie wurden als *leaky regions* definiert. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert der jeweiligen Gruppe an. **c)** Schematische Darstellung von Conductance Scanning und Biotinylierung in *leaky regions* und intakten Arealen. **d)** Visualisierung von *leaky regions* auf infizierten Monolayern mittels Biotinylierung und anschließender konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. Gezeigt sind *z-stacks* einer repräsentativen Kontrolle und eines infizierten Zelllayers. Intakte Regionen sind mit A und *leaky regions* mit B gekennzeichnet.

### 3.1.4 Parazelluläre Leitfähigkeit und Tight Junction-Defekte

Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Leitfähigkeitserhöhungen auf einen parazellulären Defekt zurückzuführen waren. Die Gesamtleitfähigkeit des Epithels ergibt sich aus der Summe der parazellulären und der transzellulären Leitfähigkeit. Diese Parameter können mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie durch Messung von Widerstandsänderungen erfasst werden. Neben dem epithelialen Widerstand ( $R^{\text{epi}}$ ), der im Zellsystem dem  $R^{\text{t}}$  entspricht (nach Korrektur der Filterwiderstände) wurden der parazelluläre ( $R^{\text{para}}$ ) und transzelluläre Widerstand ( $R^{\text{trans}}$ ) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 dargestellt. In Kontrollen betrug  $R^{\text{epi}}$   $704 \pm 21 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Die Infektion mit *Y. enterocolitica* resultierte in einer 3,8-fachen Verminderung von  $R^{\text{epi}}$  auf  $184 \pm 16 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ( $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ).  $R^{\text{para}}$  war gegenüber der Kontrolle ( $3012 \pm 496 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) 8,5-fach auf  $354 \pm 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$  reduziert ( $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ). Der transzelluläre Widerstand war hingegen nicht signifikant verändert ( $1147 \pm 477$  in infizierten Monolayern *versus*  $978 \pm 181 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in Kontrollmonolayern;  $n = 6$ ).



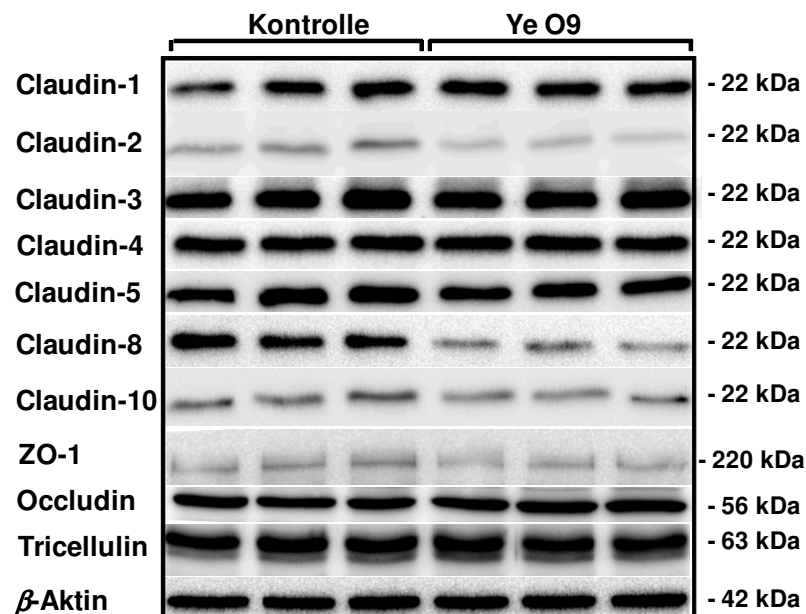


**Abb. 3.5: Verminderung des parazellulären Widerstands durch *Y. enterocolitica*.**

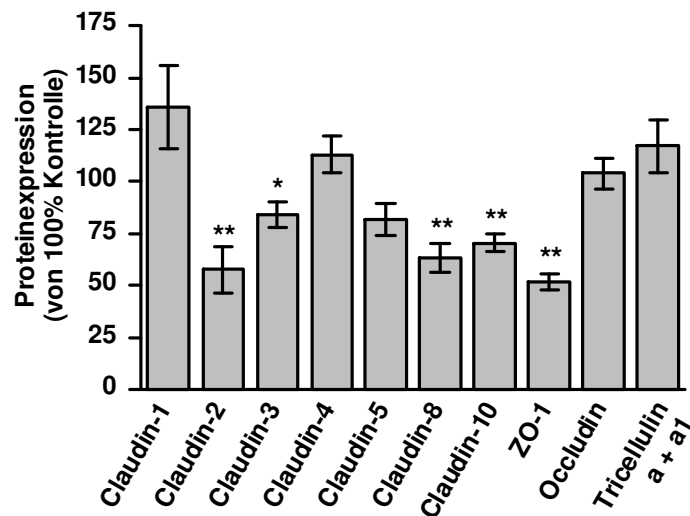
$R^{\text{epi}}$ ,  $R^{\text{trans}}$  und  $R^{\text{para}}$  wurden durch Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ermittelt. Sowohl  $R^{\text{epi}}$ , der dem gesamten epithelialen Widerstand entspricht, als auch  $R^{\text{para}}$  waren in mit *Y. enterocolitica* infizierten HT-29/B6-Monolayern vermindert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  (\*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  versus Kontrolle).

Die parazelluläre Barriere wird typischerweise durch die TJ vermittelt. Demzufolge wurde in einem nächsten Schritt das Expressionsmuster verschiedener TJ-Proteine, nämlich Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -8 und -10 sowie ZO-1, Occludin und Trizellulin in Western Blot-Analysen untersucht. Infizierte Monolayer zeigten eine verminderte Expression von Claudin-2 ( $58 \pm 11\%$ ,  $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ), Claudin-3 ( $84 \pm 7\%$ ,  $P < 0,05$ ;  $n = 6$ ), Claudin-8 ( $63 \pm 7\%$ ,  $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ) und Claudin-10 ( $70 \pm 4\%$ ,  $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ). Die Expression des Ankerproteins ZO-1 war ebenfalls reduziert ( $52 \pm 4\%$ ,  $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ). Die Proteinlevel von Occludin, Claudin-1, -4 und -5 waren nicht verändert ( $n = 6$ ). In Abb. 3.6a sind repräsentative Western Blots gezeigt. Die Proteinbanden wurden densitometrisch quantifiziert und gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert (Abb. 3.6b).

a)



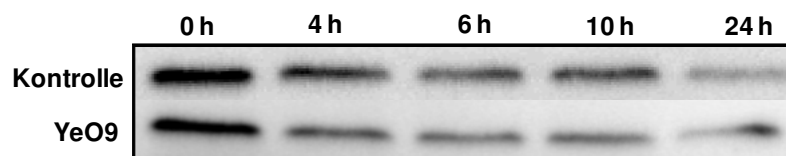
b)



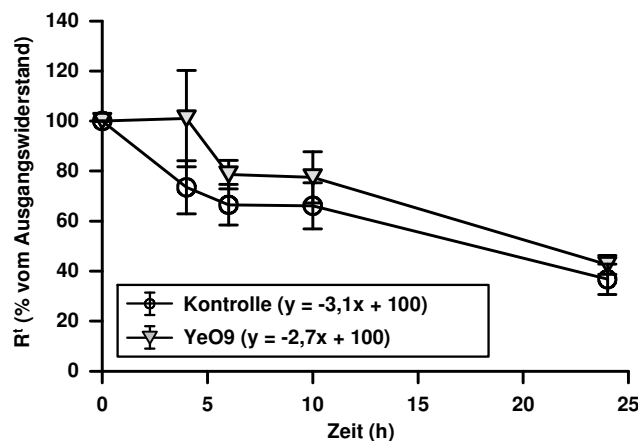
**Abb 3.6: Einfluss von *Y. enterocolitica* auf die Expression von TJ-Proteinen.** a) Repräsentative Western Blots zeigen eine Verminderung der Expression von Claudin-2 (n = 9), Claudin-3 (n = 9), Claudin-8 (n = 12) und Claudin-10 (n = 6) sowie von ZO-1 (n = 6) in infizierten HT-29/B6 Monolayern. b) Densitometrische Auswertung der TJ-Proteinexpression und Normalisierung mit  $\beta$ -Aktin (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ )

Die Verminderung des Proteinpools kann sowohl auf einer Abnahme der Expression beruhen als auch durch einen verstärkten Proteinabbau bedingt sein. Eine für Claudin-8 durchgeführte Proteinstabilitätsanalyse zeigte jedoch, dass die Degradation dieses TJ-Proteins durch die Infektion nicht beschleunigt wurde. Die Proteinneusynthese wurde 24 h p.i. durch Zugabe von Cycloheximid gehemmt und der Proteinpool nach einer Inkubationsdauer von 0, 4, 6, 10 und 24 h in Kontrollen und infizierten Zellen im Western Blot analysiert (Abb. 3.7a). Die densitometrisch quantifizierten Werte sind in Abb. 3.7b prozentual dargestellt, wobei der zum Zeitpunkt null ermittelte Wert jeweils auf 100% festgesetzt wurde. Die Claudin-8-Proteinstabilität konnte über eine Regression berechnet werden und ergab eine mittlere Lebensdauer von 16,2 h in Kontrollen und 18,4 h in infizierten Monolayern (n = 6).

a)

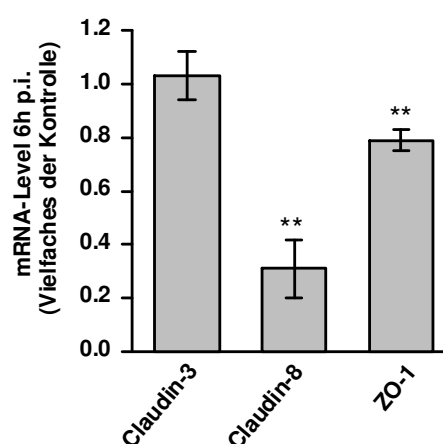


b)



**Abb. 3.7: Bestimmung der Claudin-8-Proteinstabilität.** HT-29/B6-Monolayer wurden mit *Y. enterocolitica* infiziert und 24 h p.i. die Proteinneusynthese durch Zugabe von Cycloheximid gehemmt. **a)** Repräsentative Western Blots zeigen die Proteinlevel 0, 4, 6, 10 und 24 h nach Cycloheximidgabe. **b)** Die hieraus mittels Densitometrie quantifizierten Daten sind prozentual dargestellt und ihrem jeweiligen Präparationszeitpunkt zugeordnet. Anhand der resultierenden Graphen konnte jeweils über eine lineare Regression die Proteinestabilität berechnet werden. Zu Gunsten einer übersichtlichen Abbildung wird hier nur die jeweilige Regressionsgleichung angegeben und auf eine Darstellung der Regressionsgeraden verzichtet.

Des Weiteren wurde mithilfe von Real-time RT-PCR eine mRNA-Expressionsanalyse für ZO-1, Claudin-3 und -8 durchgeführt. Die RNA-Isolation aus infizierten Zellen und Kontrollmonolayern erfolgte 6 h p.i. Während sich für Claudin-3 keine Änderung des mRNA-Expressionsniveaus zeigte, war das mRNA-Level von Claudin-8 auf das  $0,3 \pm 0,1$ -fache ( $n = 4$ ;  $P < 0,01$ ) und von ZO-1 auf das  $0,8 \pm 0,04$ -fache ( $n = 5$ ;  $P < 0,01$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Analyse des mRNA-Expressionsniveaus von Claudin-3, -8 und ZO-1 6h nach Infektion mit *Y. enterocolitica*.** Die Isolierung von RNA erfolgte 6 h p.i. aus infizierten HT-29/B6-Monolayern und Kontrollen. mRNA-Expressionslevel wurden mittels Realtime-RT-PCR bestimmt und die Expression des *Housekeeping*-Gens GAP-DH zur Normalisierung herangezogen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression des jeweiligen Gens gegenüber der Kontrolle ( $n = 4$  oder 5,  $**P < 0,01$ ).

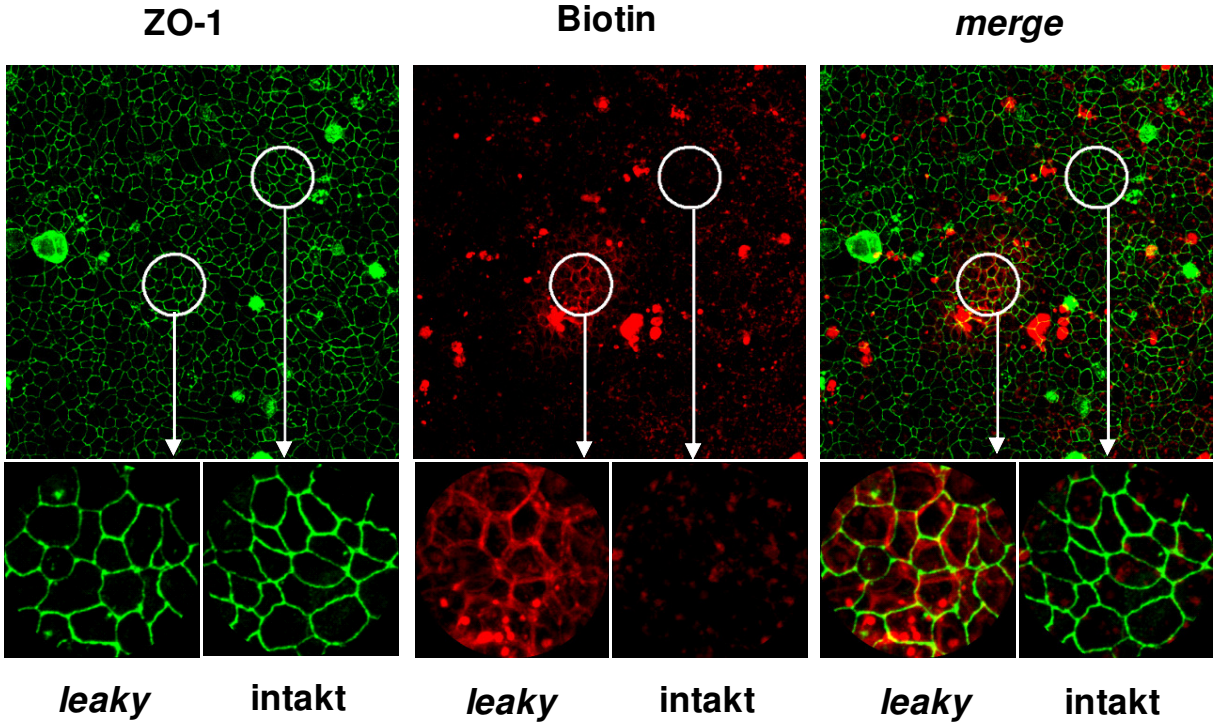
### 3.1.5 Lokalisierung von TJ-Proteinen in *leaky regions*

Neben dem Expressionsniveau ist auch die parazelluläre Distribution von TJ-Proteinen in den Schlussleisten für eine intakte Barrierefunktion entscheidend. Dementsprechend wurde die Lokalisation ausgewählter TJ-Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Um einen direkten Vergleich des TJ-Verteilungsmusters zwischen intakten Arealen und *leaky regions* zu ermöglichen, erfolgte dieses in Kombination mit der bereits beschriebenen Biotinylierung. Von besonderem Interesse waren hierbei barrierebildende Claudine. Neben den in ihrer Expression reduzierten Claudinen 3 und 8, wurden auch Claudin-4 und -5 angefärbt sowie das Ankerprotein ZO-1. Von allen Immunfärbungen wurden *z-stacks* aufgenommen. Da die Höhe der einzelnen Zellen des HT-29/B6-Monolayers stark variierte, mussten für die Auswertung und Darstellung Maximumprojektionen der x-y-Ebene erzeugt werden. In Abb. 3.9 sind repräsentative Übersichtsaufnahmen (Bildbereich: 250 × 250 µm) der jeweiligen Färbungen sowie daraus vergrößerte Ausschnitte einer typischen *leaky region* und von einem intakten Bereich (Ausschnittsradius: 20 µm) gezeigt.

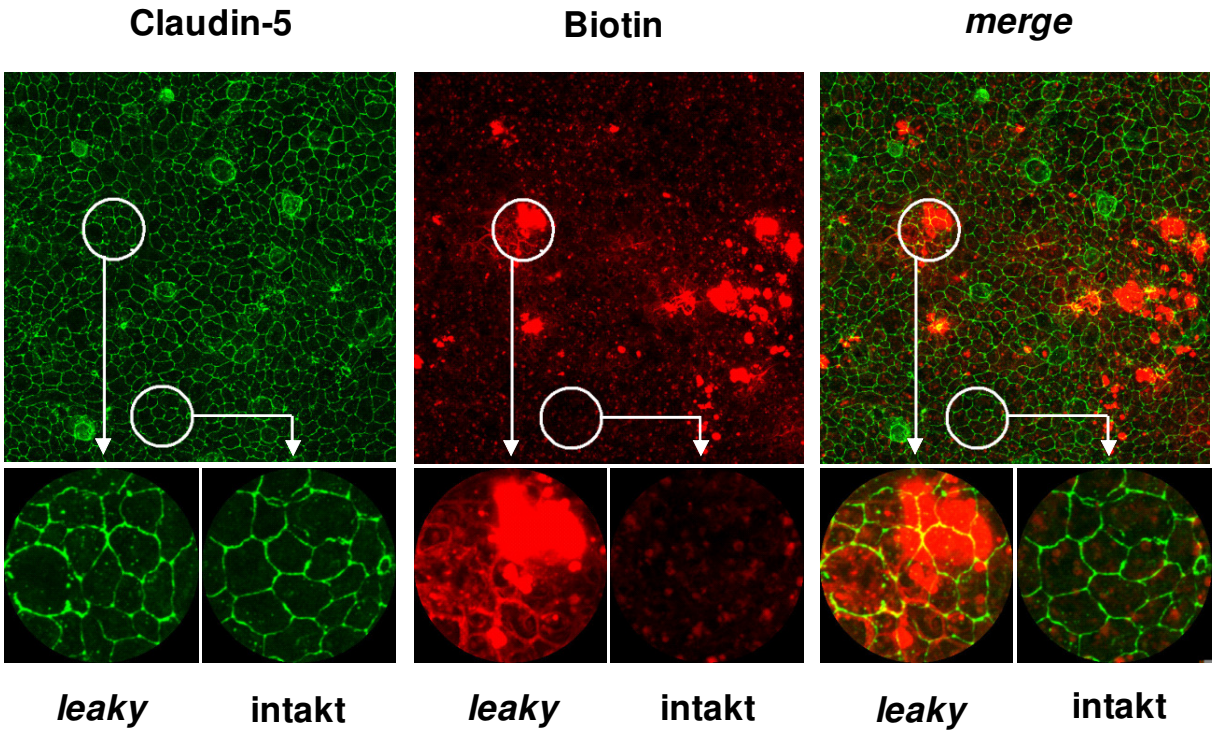
In infizierten Monolayern wiesen die intakten Areale die für TJ-Stränge typische Netzstruktur auf. In diesen, für Biotin impermeablen Bereichen, zeigten sich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (nicht gezeigt) keine Unterschiede im sub- und parazellulären Verteilungsmuster der untersuchten TJ-Proteine. Unregelmäßigkeiten oder Unterbrechungen waren nicht festzustellen (Abb. 3.9a-e, intakte Areale).

ZO-1 (Abb. 3.9a) sowie Claudin-5 (Abb. 3.9b) besaßen auch in den durch Biotindurchtritt gekennzeichneten *leaky regions* eine normale TJ-Struktur und ließen keine Veränderungen gegenüber intakten Bereichen erkennen. Im Gegensatz dazu unterschied sich das Verteilungsmuster von Claudin-3, -4 und -8 in den *leaky regions* deutlich von dem in umgebenden intakten Bereichen bzw. Kontrollen. Claudin-3 (Abb. 3.9c) als auch Claudin-4 (Abb. 3.9d) waren aus der Schlussleiste in subzelluläre Kompartimente umverteilt, was durch einen Verlust der charakteristischen Netzstruktur und ein verstärktes intrazelluläres Signal indiziert wurde. Die Veränderungen in der Claudin-8-Färbung waren allerdings noch stärker ausgeprägt. Hier erschien das Signal vollkommen diffus und ließ überhaupt keine Netzwerkstruktur mehr erkennen (Abb. 3.9e).

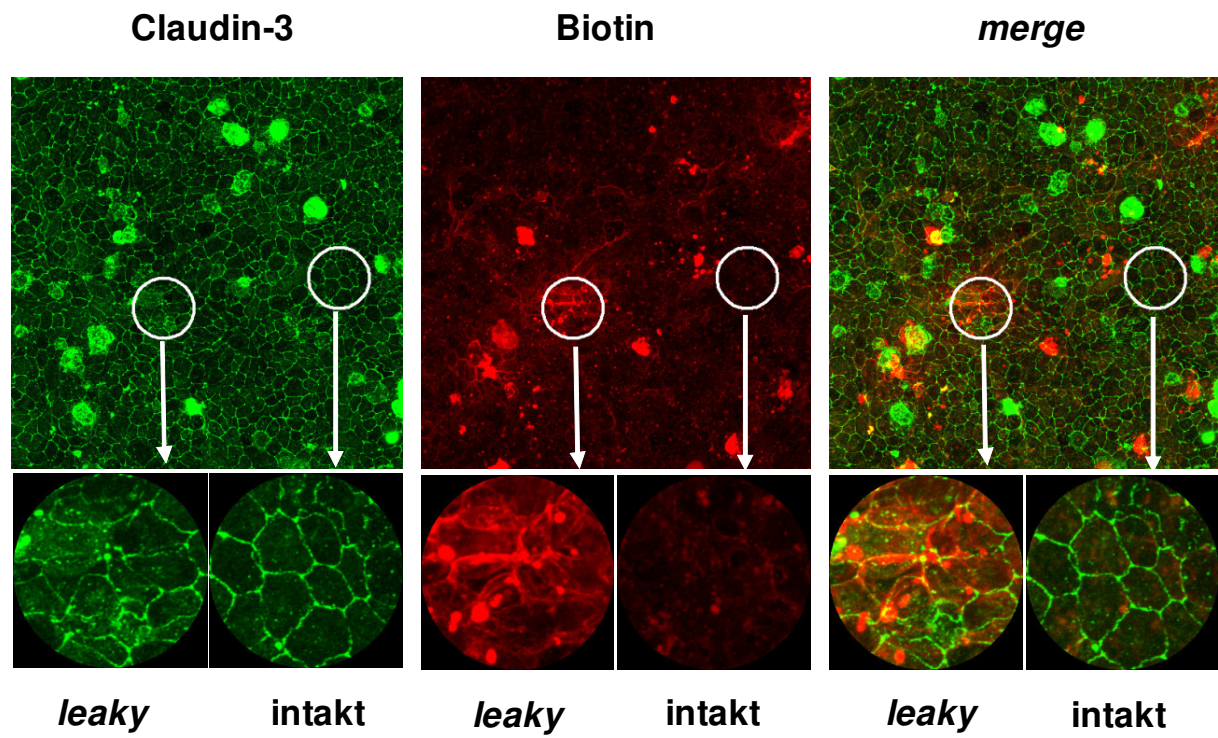
a)



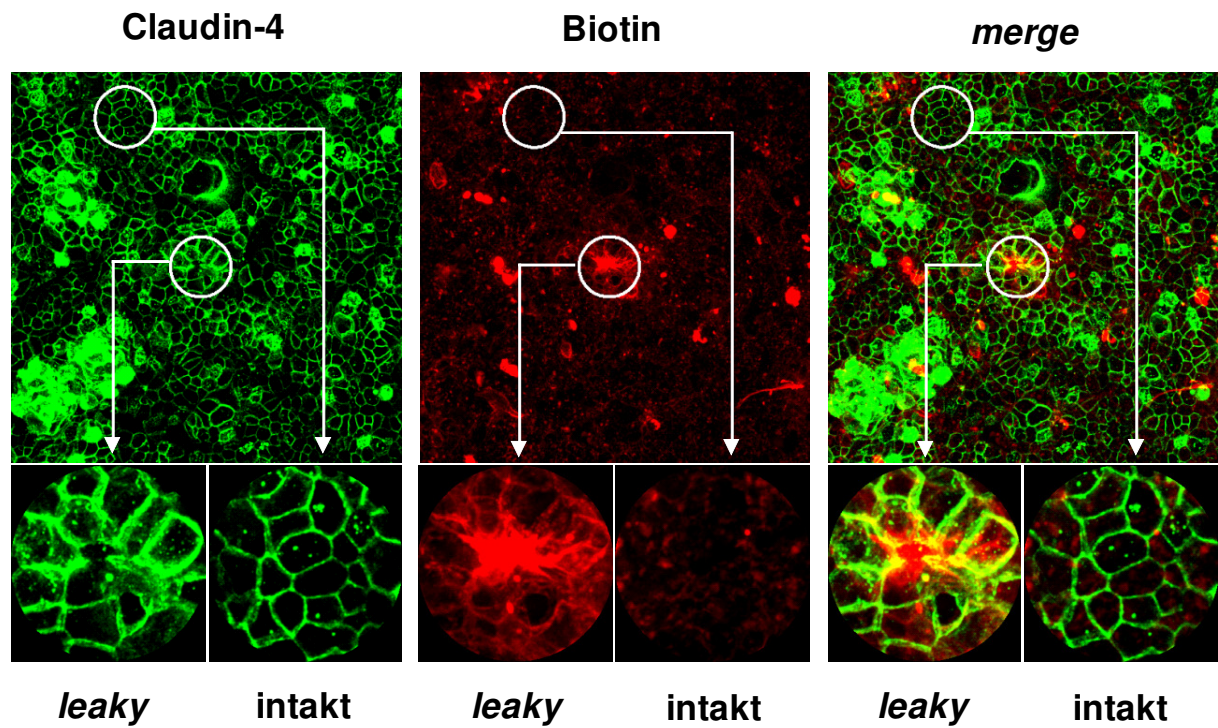
b)



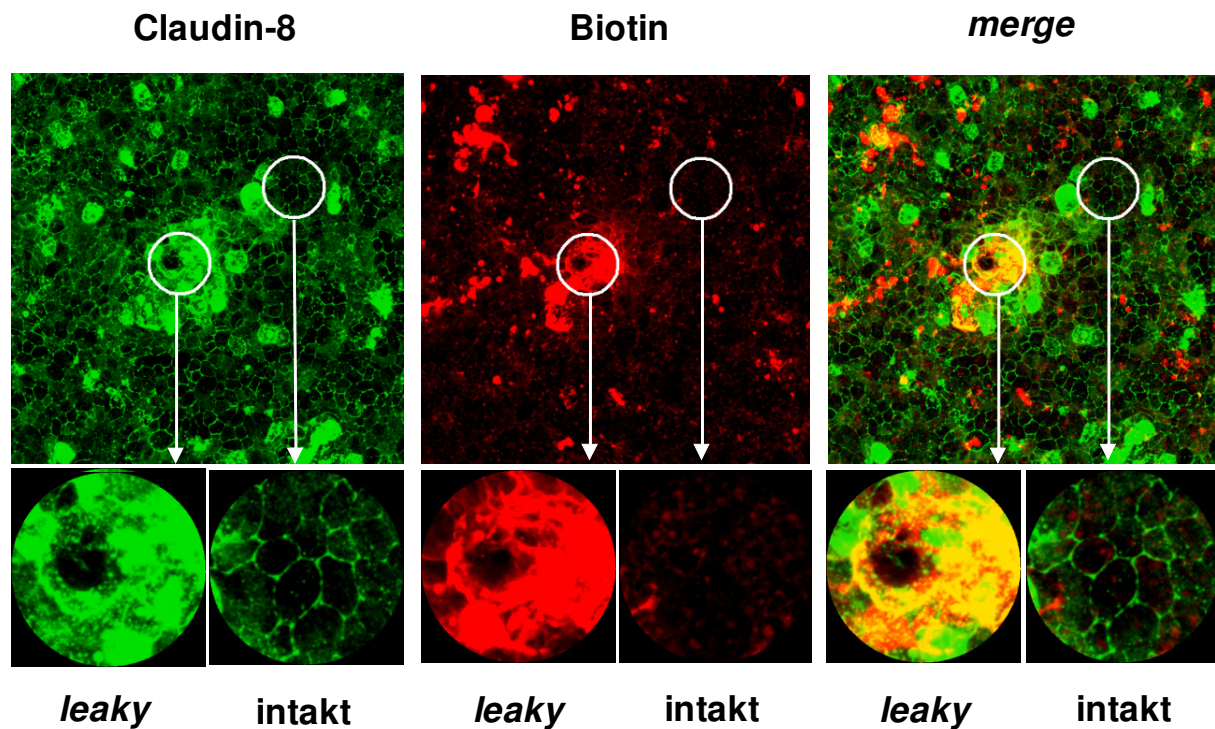
c)



d)

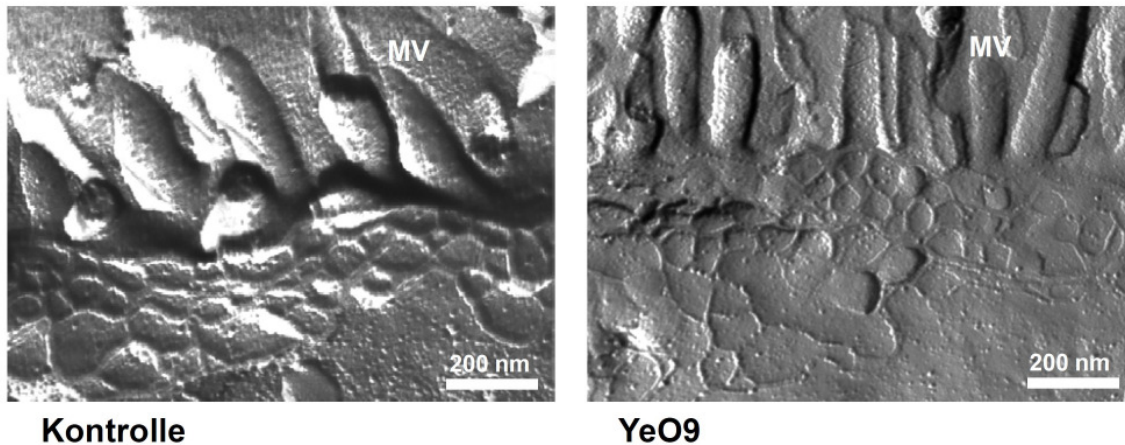


e)



**Abb. 3.9: Konfokale laserscanning-mikroskopische Analyse von TJ-Proteinen in *leaky regions* und intakten Bereichen.** Dargestellt sind Maximumprojektionen der x-y-Ebene von z-stacks infizierter Monolayer. Übersichtsaufnahmen ( $x = 250 \mu\text{m}$ ,  $y = 250 \mu\text{m}$ ) und daraus vergrößerte repräsentative *leaky regions* und intakte Regionen ( $r = 20 \mu\text{m}$ ) sind nach Fluoreszenzkanälen aufgeteilt abgebildet. *Leaky regions* sind durch eine intensive Biotinpermeation (rot) charakterisiert, die umgebenden intakten Areale weisen hingegen keine biotinylierten Zellgrenzen auf. Die dazu parallel durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen (grün) zeigen **a)** ZO-1, **b)** Claudin-5, **c)** Claudin-3, **d)** Claudin-4 und **e)** Claudin-8.

Abschließend wurde eine Analyse der TJ-Ultrastruktur in Gefrierbruchstudien durchgeführt. Wie die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 3.10 exemplarisch zeigt, waren keine Unterschiede zwischen Kontrollen und infizierten Monolayern offensichtlich. Die morphometrische Analyse ergab, dass die Anzahl horizontal orientierter Stränge, Strangdichte und Netzwerktiefe sowie das Auftreten von Strangbrüchen ( $> 20 \text{ nm}$ ) in infizierten Monolayern nicht signifikant verändert war (Tabelle 3.1). Partikelartige Stränge waren nicht auffindbar. Strukturell stark beeinträchtigte oder vollständig aufgelöste Tight Junctions in *leaky regions* sind mittels der Gefrierbruchtechnik vermutlich nicht nachweisbar. Demnach entstammen die in infizierten Monolayern nachgewiesenen Schlussleisten intakten Arealen. Die intakten Areale unterscheiden sich somit nicht von Schlussleisten der Kontrollen.



**Abb. 3.10: Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie.** Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen von Tight Junctions in Kontrollen und infizierten HT-29/B6-Monolayern. Balken = 200 nm; MV (Microvilli)

**Tabelle 3.1: Morphometrische Analyse der TJ-Ultrastruktur.** Mittelwerte  $\pm$  SEM

	Strangzahl	Strangdichte (Stränge/pm)	Netzwerk- dichte (nm)	Strangbrüche > 20 nm (pro $\mu\text{m}$ Stranglänge)	n
<b>Kontrolle</b>	$3,9 \pm 0,2$	$14 \pm 1,6$	$275 \pm 25$	$0,34 \pm 0,2$	8
<b>YeO9</b>	$3,6 \pm 0,3$	$16 \pm 1,5$	$223 \pm 17$	$0,26 \pm 0,1$	13

### 3.1.6 Rolle bekannter *Y. enterocolitica*-Virulenzfaktoren

Viele der typischen *Y. enterocolitica*-Virulenzfaktoren sind bereits gut charakterisiert und in ihrer Funktion und Regulation beschrieben. In dieser Arbeit wurde in einer ersten Annäherung zunächst versucht, ursächliche Virulenzfaktoren durch gezielte Modifikation des Infektionsansatzes zu klassifizieren. In einem weiteren spezifischeren Ansatz konnten anschließend verschiedene, gentechnisch veränderte *Y. enterocolitica*-Stämme bezüglich ihrer Wirkung auf die epitheliale Barriere getestet werden.

#### Rolle temperaturabhängig exprimierter Virulenzfaktoren

Bisher wurden *Y. enterocolitica* bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur von 27 °C angezogen. Die Inkubation auf den epithelialen Monolayern erfolgte dann bei 37 °C. Dieses Temperaturprofil wurde gewählt, da es den natürlichen Gegebenheiten bei einer typischen Infektion des Menschen am nächsten kommt. Der psychrophile Erreger wird aus der Umgebung mit Temperaturen unter 30 °C aufgenommen und erfährt nach Inkorporation 37 °C Körpertemperatur.

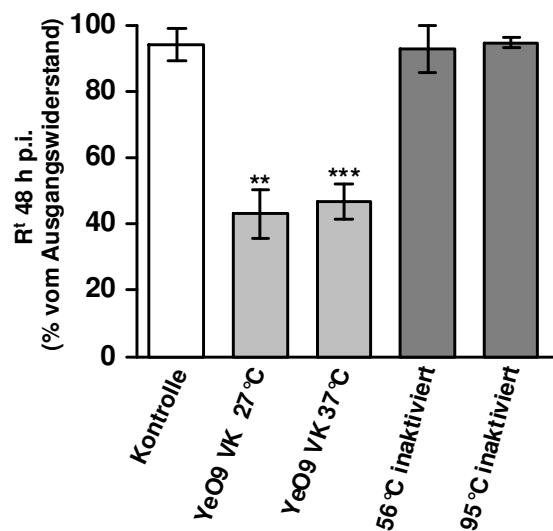
Da die Expression verschiedener *Y. enterocolitica*-Virulenzfaktoren temperaturabhängig erfolgt, wurde die Kultivierungs- bzw. Inkubationstemperatur (27 °C oder 37 °C) in nachste-



henden Experimenten variiert und der Einfluss auf den  $R^t$ -Verlauf im Infektionsansatz untersucht. Somit sollte geprüft werden, inwiefern die bei Temperaturen unter 30 °C typischen Eigenschaften (z.B. Flagellin, Yst-A oder Invasin) oder die bei 37 °C exprimierten Faktoren (z.B. Yops, Ail, YadA) ursächlich für den Barrieredefekt sind.

In einem ersten Versuchsansatz wurden *Y. enterocolitica* parallel bei 37 °C oder 27 °C kultiviert und für die Infektion von HT/29-B6-Monolayer eingesetzt. Wie Abb. 3.11 zu entnehmen ist, war der Widerstandseffekt jedoch unabhängig von der Anzuchttemperatur des Erregers. Beide Kulturen verursachten gleichermaßen einen  $R^t$ -Abfall (Vorkultur bei 37 °C:  $47 \pm 5\%$ ,  $P < 0,001$ ;  $n = 6$  und Vorkultur bei 27 °C:  $43 \pm 7\%$ ,  $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ).

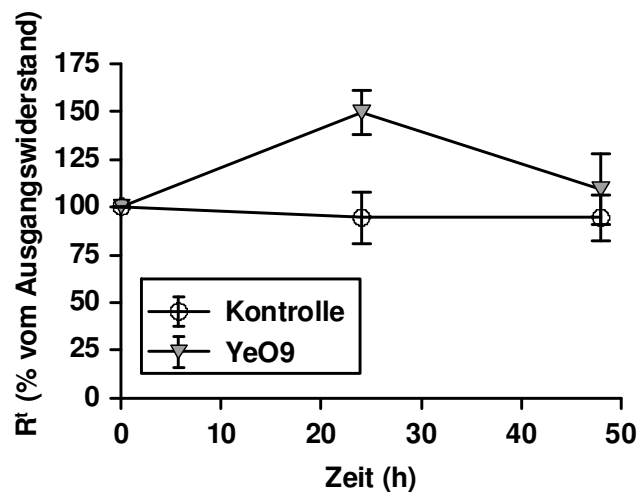
Durch hitzebehandelte (56 °C oder 95 °C) *Y. enterocolitica* konnte die Barriestörung hingegen nicht hervorgerufen werden. 48 h p.i. wurde hier eine Verminderung des Ausgangswiderstandes auf  $93 \pm 7\%$  (56 °C,  $n = 5$ ) bzw.  $95 \pm 1\%$  (95 °C,  $n = 6$ ) gemessen, was dem Kontrollniveau ( $96 \pm 5\%$ ;  $n = 8$ ) entsprach (Abb. 3.11).



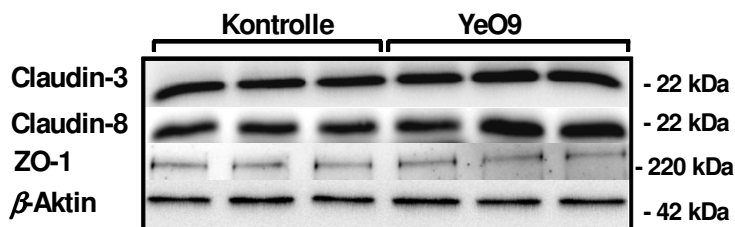
**Abb. 3.11: Einfluss der Kultivierungstemperatur und Hitzeinaktivierung.** Der 48 h p.i. durch vitale *Y. enterocolitica* auf HT-29/B6-Monolayern induzierte  $R^t$ -Abfall war unabhängig von der Temperatur der Vorkultur (VK). Hitzeinaktivierte *Y. enterocolitica* (56 °C oder 95 °C) hatten hingegen keinen Einfluss auf den  $R^t$  (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ).

In einem weiteren Experiment wurde der Infektionsansatz über 48 h bei 27 °C statt bei 37 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte weder ein  $R^t$ -Abfall registriert werden ( $n = 9$ , Abb. 3.12a) noch eine Verminderung der Proteinexpression von Claudin-3 und -8 oder ZO-1 ( $n = 6$ , Abb. 3.12b und c). Die Expressionsanalyse ergab sogar gegenüber der Kontrolle eine Zunahme der Claudin-8 Proteinlevel auf  $134 \pm 9\%$  ( $P < 0,01$ ).

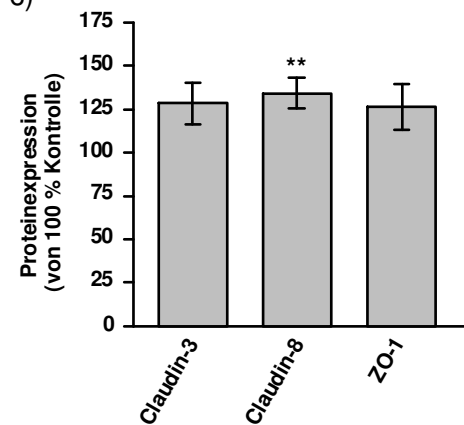
a)



b)

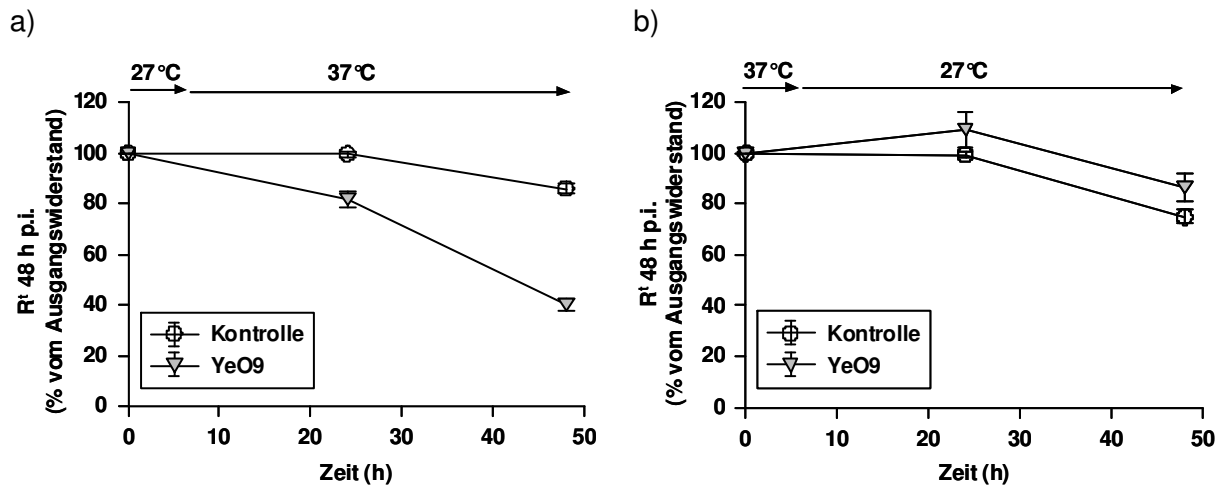


c)



**Abb. 3.12: Inkubation des Infektionsansatzes über 48 h bei 27 °C.** **a)** R<sup>t</sup>-Verlauf nach Infektion mit *Y. enterocolitica* und Inkubation bei 27 °C (n = 9). **b)** Proteinlevel von Claudin-3, Claudin-8 und ZO-1 48 h p.i. nach Inkubation bei 27 °C (n = 6). **c)** Densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse und Normalisierung gegen  $\beta$ -Aktin (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\**P* < 0,01; n = 6).

Zur Aufklärung, ob es sich hierbei um ein erreger- oder ein zellspezifisches Phänomen handelte, wurde nach Abtötung der Bakterien ein Temperaturwechsel durchgeführt. Dafür wurde der Zeitpunkt 4 h p.i. (also 1,5 h nach Antibiose) gewählt, um die Wirkung des 2,5 h p.i. verabreichten Gentamycins zu gewährleisten. Erfolgte die Inkubation des Infektionsansatzes innerhalb der ersten 4 h p.i. bei 27 °C, fand anschließend ein Temperaturwechsel zu 37 °C statt. Wie in Abb. 3.13a veranschaulicht, kam es unter diesen Bedingungen zu einem R<sup>t</sup>-Abfall (n = 2). Betrug die Anfangstemperatur hingegen erst 37 °C und wurde anschließend auf 27 °C abgesenkt, war kein R<sup>t</sup>-Effekt zu verzeichnen (n = 2, Abb. 3.13b). Dieses zeigt, dass die Temperatur für die Virulenz der Bakterien in diesem Modell nicht ausschlaggebend war, eine zellspezifische Reaktion jedoch nur unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C eintrat.

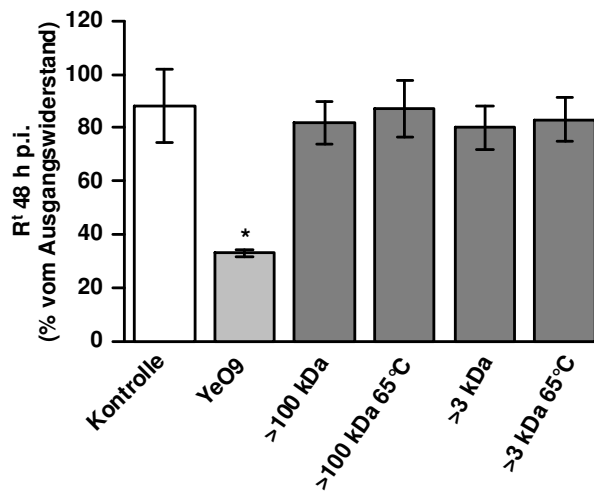


**Abb. 3.13: Einfluss vitaler *Y. enterocolitica* auf den R<sup>t</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.** HT-29/B6-Monolayer wurden infiziert und parallel bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. 2,5 h p.i. wurde Gentamycin zugesetzt. 4 h p.i. erfolgte ein Temperaturwechsel **a)** von 37 °C zu 27 °C oder **b)** von 27 °C zu 37 °C. Gezeigt ist der R<sup>t</sup>-Verlauf in beiden Versuchsansätzen über 48 h (Mittelwerte ± SEM; n = 2).

#### Wirksamkeit von *Y. enterocolitica*-Kulturüberständen

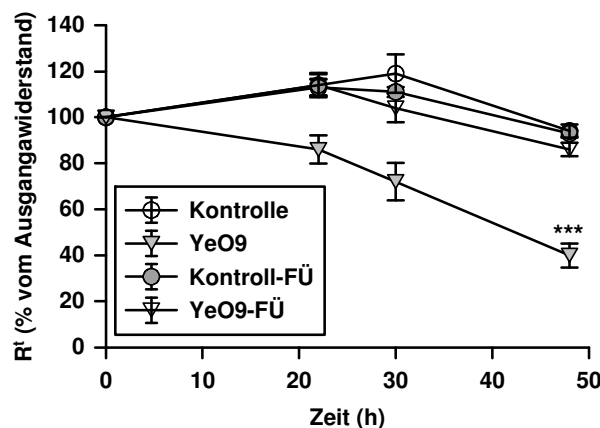
Bakterielle Kulturüberstände enthalten häufig LPS, sezernierte Toxine oder andere Effektorproteine und können somit eine potentiell pathogene Wirkung haben.

In einem ersten Ansatz wurde *Y. enterocolitica*-Kultur ( $OD_{578} = 1$ ) abzentrifugiert, der Kulturüberstand filtriert und dann auf HT-29/B6-Monolayer gegeben. Innerhalb von 48 h hatte dieser jedoch keine Wirkung auf den R<sup>t</sup> ( $79 \pm 5\%$  versus  $79 \pm 4\%$  in Kontrollen; n = 5). Um auszuschließen, dass sezernierte bakterielle Produkte durch das Kulturvolumen zu stark verdünnt vorlagen, wurden die Kulturüberstände in einem weiteren Ansatz aufkonzentriert. Sowohl Präparationen mit einem Molekulargewicht > 100 kDa (300-fach eingeeengt) als auch Präparationen mit kleinerem Molekulargewicht (> 3 kDa, 13-fach eingeeengt) zeigten jedoch keine Wirkung auf die epitheliale Barriere (Abb. 3.14). Selbst ein in einer FRENCH<sup>®</sup>Press erzeugtes Bakterienlysat hatte keinen signifikanten Effekt auf den R<sup>t</sup> ( $81 \pm 3\%$  versus  $90 \pm 4\%$  in Kontrollen; n = 6).



**Abb. 3.14: Wirkung von *Y. enterocolitica*-Kulturüberständen.** Die Behandlung von HT-29/B6-Monolayern mit Präparationen von *Y. enterocolitica*-Kulturüberständen (Molekulargewicht > 100 kDa oder > 3 kDa) hatte im Vergleich zur Infektion mit dem vitalen Erreger (\* $P < 0,05$ ) keinen signifikanten Einfluss auf den  $R^t$  ( $n = 4$ ). Bei 65 °C inaktivierte Präparationen dienten als Negativkontrolle (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Um zu prüfen, ob für die Produktion bzw. Sezernierung bakterieller Viruenzfaktoren die Anwesenheit der Epithelzellen erforderlich war, wurden auf Filtermembranen kultivierte HT-29/B6-Monolayer standardgemäß infiziert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die apikalen Filterüberstände (FÜ; YeO9-FÜ bzw. Kontroll-FÜ) abgenommen, auf neue Monolayer transferiert und die Wirkung auf den  $R^t$  über 48 h verfolgt. Wie Abb. 3.15 zu entnehmen ist, hatten YeO9-FÜ jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den  $R^t$ . Obwohl YeO9-FÜ den  $R^t$  auf  $86 \pm 3\%$  ( $n = 3$ ) vom Ausgangswiderstand verminderte unterschied sich dieses nicht signifikant von Kontrollen ( $94 \pm 3\%$ ;  $n = 5$ ) oder Kontroll-FÜ ( $93 \pm 1\%$ ,  $n = 5$ ). Vitale *Y. enterocolitica* reduzierten den  $R^t$  auf  $40 \pm 5\%$  vom Ausgangswiderstand ( $***P < 0,001$ ;  $n = 5$ ). Somit ist davon auszugehen, dass *Y. enterocolitica* auch nicht in Anwesenheit der Epithelzellen einen barrierelevanten Virulenzfaktor in das Medium sezerniert.

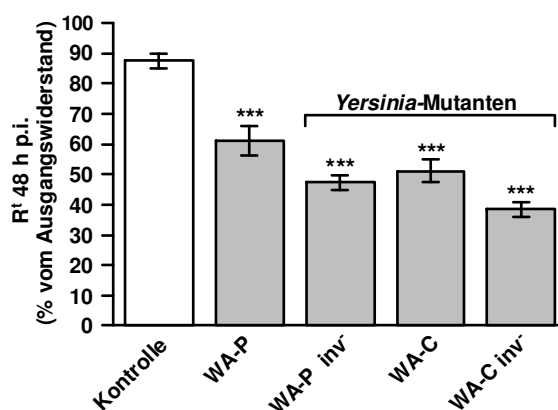


**Abb. 3.15: Effekte von YeO9-FÜ auf den  $R^t$ .**  $R^t$ -Messung an HT-29/B6 nach Inkubation mit Filterüberständen aus 48-stündiger Co-Kultivierung.

### Charakterisierung von *Y. enterocolitica*-Mutanten hinsichtlich ihrer Virulenzeigenschaften an der epithelialen Barriere

Im Folgenden wurde versucht, mit Hilfe verschiedener, gentechnisch veränderter *Y. enterocolitica*-Stämme einen für die Barriestörung verantwortlichen Virulenzfaktor zu identifizieren. Dazu konnten bereits bekannte Virulenzfaktoren bezüglich ihrer Wirkung im HT-29/B6-Modell analysiert werden. Ausgangsstamm dieser Untersuchungen war das klinische Isolat *Y. enterocolitica* WA-314, das dem Serotyp O:8 und der Biogruppe 1B zugeordnet ist (Heesemann *et al.*, 1983). Dieser Stamm trägt das Virulenzplasmid pYVO8 und ist in der Tabelle 2.4 als WA-P bezeichnet. Abgeleitet hiervon ist das, als apathogen eingestufte, plasmidlose Derivat WA-C. Der WA-P  $inv^-$  Stamm trägt pYVO8, weist aber eine Deletion des *inv*-Gens auf, dessen Produkt die Adhäsion und Internalisierung vermittelnde Membranprotein Invasin ist. Abgeleitet aus diesen beiden Derivaten ergibt sich die plasmidlose und *inv*-defiziente Doppelmutante WA-C  $inv^-$ .

HT-29/B6-Monolayer wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, mit WA-P und den verschiedenen Mutantenstämmen (MOI 100) infiziert und der  $R^t$  über 48h gemessen. Der bisher eingesetzte Stamm YeO9 wurde in diesen Experimenten parallel mitgeführt, um eventuelle Serotyp-spezifische Effekte auszuschließen. Der Wildtyp WA-P induzierte innerhalb von 48 h einen  $R^t$ -Abfall, wobei kein signifikanter Unterschied zu den durch YeO9 hervorgerufenen Effekten festzustellen war (WA-P:  $61 \pm 5\%$ ;  $n = 18$  und YeO9:  $54 \pm 5,3\%$ ;  $n = 15$ ). Aber auch die Infektion mit jedem der Mutantenstämmen resultierte 48 h p.i. in einer Verminderung des  $R^t$ . WA-C reduzierte den Ausgangswiderstand auf  $51 \pm 4\%$  ( $P < 0,001$ ;  $n = 18$ ), WA-P  $inv^-$  auf  $41 \pm 3\%$  ( $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ) und WA-C  $inv^-$  auf  $36 \pm 3\%$  ( $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ) (Abb. 3.16).

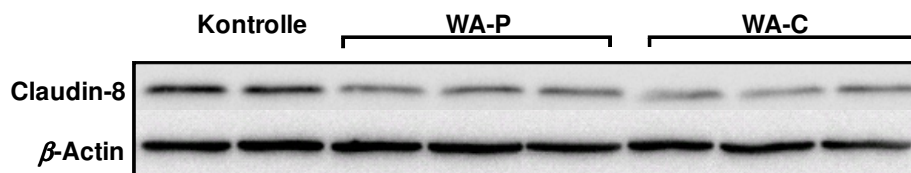


**Abb. 3.16: Widerstandseffekte nach Infektion von HT-29/B6 Monolayern mit *Y. enterocolitica*-Mutanten.** Die auf dem *Y. enterocolitica* O8 Wildtyp WAP basierenden Mutantenstämmen WA-C, WA-P  $inv^-$  und WA-C  $inv^-$  lösten 48 h p.i. gegenüber der Kontrolle einen  $R^t$ -Abfall aus (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ).

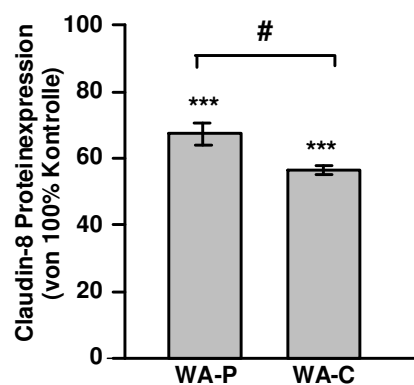
Die beiden Invasin-defizienten Mutanten verursachten sogar einen stärker ausgeprägten  $R^T$ -Abfall als die anderen *Y. enterocolitica*-Stämme ( $P < 0,05$  und  $P < 0,001$ ). Ihre Invasionsdefizienz wurde in einem Gentamycin-Protektionsversuch bestätigt. Während sich die Invasionsrate des Wildtyps auf  $0,03 \pm 0,01\%$  ( $n = 6$ ) belief, konnten WA-P inv<sup>-</sup> und WA-C inv<sup>-</sup> intrazellulär nicht nachgewiesen werden ( $n = 5$ ). Somit ist davon auszugehen, dass die Barrierestörung unabhängig von der Internalisierung des Erregers erfolgt.

Für den Wildtyp WA-P und die WA-C-Mutante wurde des Weiteren 48 h p.i. eine Expressionsanalyse des TJ-Proteins Claudin-8 durchgeführt. Diese ergab eine Verminderung der Claudin-8-Proteinlevel durch beide Stämme ( $n = 5$ ;  $P < 0,001$  versus Kontrolle), wobei der durch WA-C induzierte Effekt stärker ausgeprägt war (WA-P:  $73 \pm 7\%$  versus WA-C:  $56 \pm 1,3$ ;  $P < 0,05$ ,  $n = 5$ ), (Abb. 3.17).

a)



b)

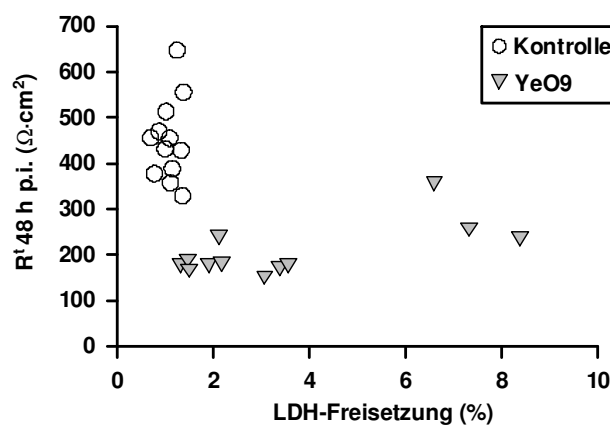


**Abb. 3.17: Claudin-8-Proteinlevel nach Infektion von HT-29/B6 mit WA-P oder WA-C.** **a)** Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot mit **b)** densitometrischer Auswertung und Normalisierung mit  $\beta$ -Aktin (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\*\* $P < 0,001$  versus Kontrolle und # $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

### 3.1.7 Zytotoxizität und Apoptose

Barrieredefekte können ferner auch durch das Auftreten lokaler Zellschäden, wie Apoptosen (Bojarski *et al.*, 2001) oder Nekrosen bedingt sein (Madara & Stafford, 1989). Ob ein Verlust von Epithelzellen zu der durch *Y. enterocolitica* induzierten Barrierestörung beiträgt, wurde durch eine quantitative Erfassung nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen in HT-29/B6-Monolayern 48 h p.i. überprüft.

Der Begriff Nekrose bezeichnet den Tod einer Zelle durch Schädigung der Zellstruktur, z.B. infolge mechanischer Verletzungen, Kontakt mit Toxinen, Hypoxie, Hypothermie oder Infektionen mit Krankheitserregern. Typisch sind hierbei eine Kondensation der Kernsubstanz und das Anschwellen der Zellorganellen, dessen Folge das Platzen der Zelle und eine unkontrollierter Austritt des Zellinhalts in die Umgebung ist. Der Nachweis von Nekrosen in epithelialen HT-29/B6-Monolayern erfolgte in dieser Arbeit über Messung der LDH-Aktivität im apikalen Zellüberstand. Freigesetzte LDH wurde prozentual auf den Gesamtgehalt bezogen. Da die ermittelten Werte offensichtlich nicht normalverteilt waren, wurde der Median ermittelt und zur Signifikanzprüfung der U-Tests nach Wilcoxon, Mann und Whitney herangezogen. Im Überstand unbehandelter Kontrollen wurde 1,1% LDH ( $n = 12$ ) nachgewiesen. Dem gegenüber resultierte die Infektion mit *Y. enterocolitica* in einer Zunahme auf 2,6% ( $P < 0,001$ ;  $n = 12$ ). Wie aus Abb. 3.18 hervorgeht, korrelierte die LDH-Freisetzung jedoch nicht mit dem  $R^t$ -Abfall.



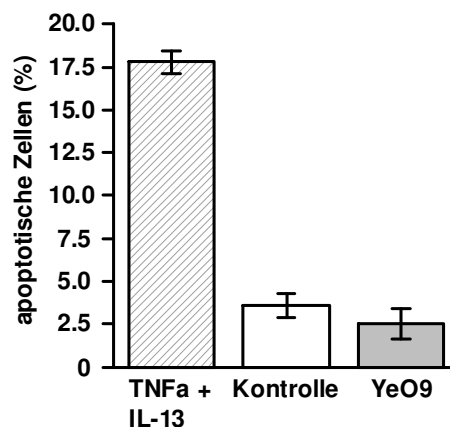
**Abb. 3.18: Einfluss von *Y. enterocolitica* auf die LDH-Freisetzung in HT-29/B6-Monolayern.** In epithelialen HT-29/B6-Monolayern konnten nekrotische Zellschäden durch Messung der LDH-Aktivität im Zellüberstand nachgewiesen werden. Gezeigt ist die LDH-Freisetzung in Korrelation mit den korrespondierenden transepithelialen Widerständen von vier unabhängigen Experimenten.

HT-29/B6-Monolayer, die mit inaktivierten *Y. enterocolitica* inkubiert wurden, zeigten weder einen  $R^t$ -Abfall (Abb. 3.11) noch eine signifikant gesteigerte LDH-Freisetzung. Wie ihr Wildtypstamm WA-P verursachten auch die beiden Mutantenstämme WA-C und WA-C inv<sup>-</sup> eine LDH-Zunahme im Überstand. Als Positivkontrolle wurde Nekrose durch  $INF\gamma$  induziert (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: LDH-Freisetzung von HT-29/B6-Monolayern.** Freigesetztes LDH ist prozentual auf die Gesamtaktivität bezogen. Angegeben ist der Median aus n Messwerten. Signifikanz wurde mit Hilfe des U-Tests gegen die Kontrolle getestet; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Induktor	LDH-Freisetzung (%)	n
Kontrolle	1,1	12
YeO9 inaktiviert	1,5	4
YeO9	2,6***	12
WA-P	2,1**	6
Wa-C	3,7**	6
Wa-Cinv	3,1**	6
IFN $\gamma$	5,1**	5

Im Gegensatz zur Nekrose läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. Die betroffenen Zellen reagieren hierbei auf intrazelluläre Signale, auch wenn sich die Auslöser außerhalb der Zelle befinden. Charakteristisch für apoptotische Zellen ist neben einem Verlust des Zellvolumens, wodurch der Kontakt zu den Nachbarzellen verloren geht, auch eine Zerstücklung des Chromatins. Die Zellmembran bleibt jedoch während des gesamten Prozesses unbeschädigt und die Zelle zerfällt schließlich in membranumschlossene apoptotische Körperchen, die von Nachbar- oder Fresszellen eliminiert werden. Der Einfluss von *Y. enterocolitica* auf die epitheliale Apoptose in HT-29/B6-Monolayern wurde mit Hilfe einer TUNEL-Färbung, die auf einer Fluoreszenzmarkierung von DNA-Strangbrüchen basiert, geprüft. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte mittels FACS-Analyse und ergab keine Zunahme der Apoptose in infizierten Monolayern ( $2,5 \pm 0,9\%$  versus  $3,6 \pm 0,7\%$  in Kontrollen;  $n = 5$ ) (Abb. 3.19). Dieses entsprach den Befunden der Conductance-Scanning Analyse (Abschnitt 3.1.3). Im Vergleich dazu steigerten die bekannten Induktoren TNF $\alpha$  und IL-13 (Heller *et al.*, 2005) die Apoptose auf  $17,8 \pm 0,7\%$  ( $n = 2$ ).



**Abb. 3.19: Quantifizierung von Apoptosen in HT-29/B6-Monolayern.** Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung markiert und im Durchflusszytometer identifiziert und gezählt (FACS-Analyse). Die Anzahl apoptotischer Zellen ist prozentual auf die Gesamtzellzahl bezogen. Als Positivkontrollen diente eine Kombination aus TNF $\alpha$  und IL-13.



### 3.1.8 Identifizierung regulatorischer Prozesse

Abschließend sollte die Aktivierung eukaryotischer Signalkaskaden durch *Y. enterocolitica* im HT-29/B6-Infektionsmodell beleuchtet werden. Ziel war die Identifizierung eines Signalweges dessen Aktivierung die beobachteten TJ-Proteindefekte bedingte. Da der Barrieredefekt nur durch vitale *Y. enterocolitica* ausgelöst werden konnte (Abschnitt 3.1.6) und unabhängig von der Expositionsdauer war (Abschnitt 3.1.1), konnte davon ausgegangen werden, dass eine solche Aktivierung innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums direkt nach der Infektion stattfinden musste.

#### Calcium

In vielen Zellen, die auf extrazelluläre Signale ansprechen, wirkt Calcium als intrazellulärer Botenstoff und ruft in der Zelle eine Reaktion hervor. Normalerweise wird die Calciumkonzentration im Zytosol mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen im endoplasmatischen Reticulum (ER), den Mitochondrien und der Plasmamembran sehr gering gehalten ( $< 10^{-7}$  M). Exogene Reize sorgen dafür, dass Calcium entweder über spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran in die Zelle einströmt oder gespeichertes Calcium aus dem Endoplasmatischen Reticulum oder den Mitochondrien freigesetzt wird. In beiden Fällen steigt die Calciumkonzentration im Zytosol an und es kommt zu einer Zellreaktion.

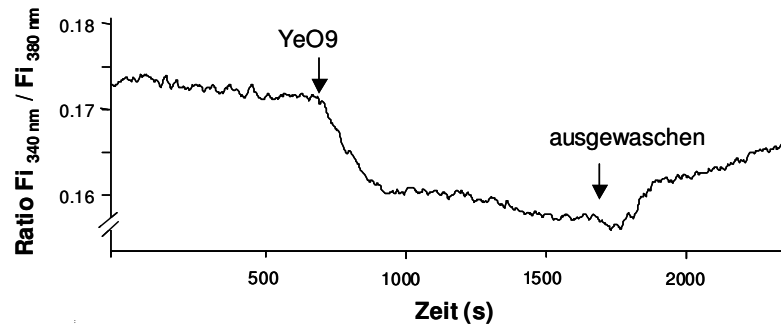
Saha und Kollegen (Saha *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2009) beschreiben eine durch Yst-A stimulierte Calcium-Antwort in intestinalen Rattenzellen. Yst-A bewirkte in diesen Zellen eine Erhöhung der intrazellulären IP<sub>3</sub>-Level, was zu einer über den IP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelten Calciumfreisetzung führte.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Fura-Messungen geprüft, inwiefern eine typischerweise schnelle Calcium-Antwort durch vitale *Y. enterocolitica* in HT-29/B6 stimuliert werden kann. Hierfür wurden auf Deckgläsern kultivierte, konfluente HT-29/B6-Monolayer mit dem Calcium-Indikator Fura-2AM beladen. Die Analyse erfolgte fluoresszenzoptisch, indem die durch Fura-2 beladene Zellen in kurzer Folge abwechselnd UV-Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm ausgesetzt wurden. Das emittierte Licht, dessen Intensität von der Bindung zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängt, wurde für beide Wellenlängen getrennt registriert und für die Auswertung zueinander ins Verhältnis (Ratio  $F_{i340\text{nm}}/F_{i380\text{nm}}$ ) gesetzt.

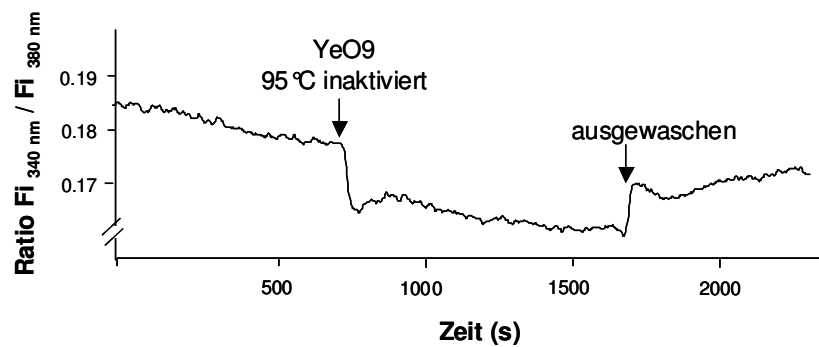
Nach einer 12-minütigen Messung mit reiner Versuchslösung, wurden die Fura-beladenen Zellen mit *Y. enterocolitica*-Kultur bis zu 45 min lang perfundiert. Aufgrund der Trübung der Bakterienkultur ( $\text{OD}_{578} = 2$ ) kam es zeitgleich mit der Einleitung zu einer leichten Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten, die solange anhielt, bis die Bakteriensuspension durch Spülen mit Versuchslösung wieder ausgewaschen wurde (Abb. 3.20a). Gleiches wurde auch bei der Messung mit hitzeinaktivierter *Y. enterocolitica*-Kultur beobachtet (Abb. 3.20b). Auch eine bei RT durchgeführte Messung zeigte keine Calcium-Mobilisierung durch *Y. enterocoli-*

*tica* (nicht gezeigt). Dem entgegen induzierte der als Positivkontrolle eingesetzte IP3-Agonist ATP (Saha *et al.*, 2009) in HT-29/B6 einen sehr schnellen Anstieg der Calcium-Konzentration von den Basalwerten ( $222 \text{ nM} \pm 37$ ,  $n = 9$ ) auf das  $4,2 \pm 0,6$ -Fache ( $n = 3$ ; Abb. 3.20c).

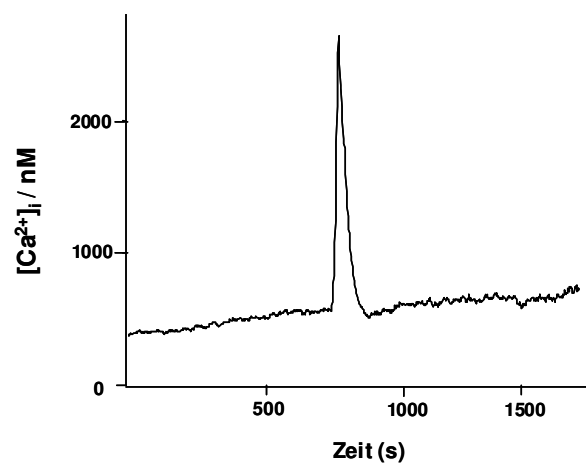
a)



b)

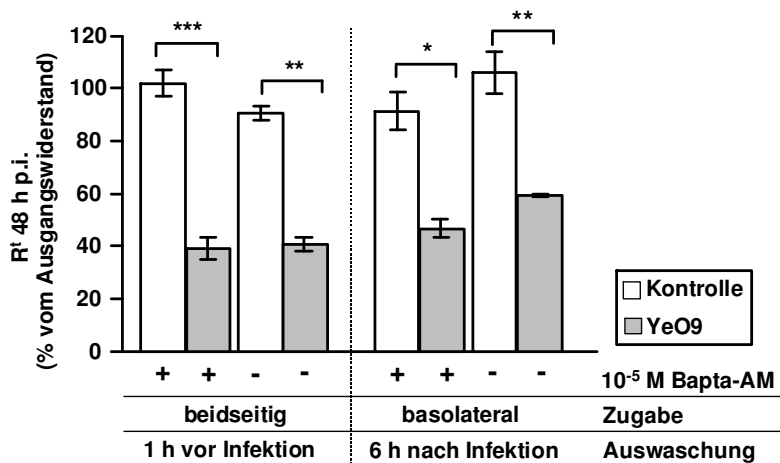


c)



**Abb. 3.20: Calcium-Mobilisierung in HT-29/B6-Zellen nach *Y. enterocolitica*-Exposition.** Gezeigt ist das Fluoreszenzverhältnis vor und nach Perfusion mit **a)** vitalen und **b)** hitzeinaktivierten *Y. enterocolitica* aus einem von je drei unabhängigen Versuchsansätzen. **c)** Induktion einer Calciumfreisetzung in HT-29/B6 durch ATP.

Da die Fura-Messung nur über einen kurzen Zeitraum erfolgte, mussten Langzeiteffekte in einem weiteren Experiment ausgeschlossen werden. Dazu wurden auf Filtermembranen kultivierte HT-29/B6-Monolayer jeweils vor der Infektion für 1 h mit dem Calciumchelator BAPTA-AM inkubiert. In einem ersten Ansatz wurde beidseitig vorinkubiert und der Chelator vor der Infektion ausgewaschen. In einem zweiten Ansatz wurde der Chelator nur basolateral appliziert und erst 6 h p.i. entfernt. Die  $R^t$ -Messung erfolgte über 48 h. Wie in Abb. 3.21 gezeigt, hatte die Komplexierung von intrazellulärem Calcium mit BAPTA-AM keinen Einfluss auf den *Y. enterocolitica* induzierten  $R^t$ -Abfall.



**Abb. 3.21: Einfluss auf den  $R^t$  in infizierten HT-29/B6-Monolayern nach Calcium-Komplexierung mit BAPTA-AM.** Auf Filtermembranen kultivierte HT-29/B6-Monolayer wurden mit BAPTA-AM vorinkubiert. Die Auswaschung des Calciumchelators erfolgte kurz vor bzw. 6 h nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Dargestellt sind die 48 h p.i. erfassten  $R^t$ -Werte in mit BAPTA-AM behandelten und unbehandelten Monolayern (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  und \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ).

### Inhibitorstudien

Im Folgenden wurde die Involvierung verschiedener bekannter Signalkaskaden durch den Einsatz von spezifischen Kinaseinhibitoren eruiert. Dieses erfolgte zunächst im Widerstandsexperiment, wobei der  $R^t$ -Verlauf folgender Versuchsansätze verglichen wurde: (i) unbehandelte Kontrolle, (ii) infiziert, (iii), Kontrolle mit Inhibitor und (iv) infiziert mit Inhibitor. Eine ausführliche Auflistung aller getesteten Inhibitoren sowie die prozentuale Änderung vom Ausgangswiderstand 48 h p.i. zeigt Tabelle 3.3.

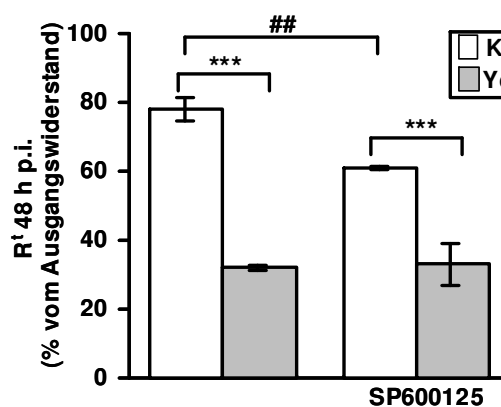
Eine Hemmung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Kinase, der Proteintyrosinkinase, der Proteinkinase C oder auch der *Myosin light chain*-Kinase hatte keinen Einfluss auf den  $R^t$ -Verlauf im Infektionsansatz. Der Einsatz des IP3-Kinaseinhibitors Ly294002 verstärkte den von *Y. enterocolitica* verursachte  $R^t$ -Abfall zusätzlich ( $n = 2$ ;  $P > 0,05$ ). Die MAP-Kinase-Inhibitoren SP600125, SB202190 oder U0126 bewirkten unabhängig von der Infektion über 48 h selbst eine Verminderung des  $R^t$ , wodurch eine mögliche Abschwächung des Erreger-induzierten  $R^t$ -Abfalls maskiert wurde. Diese Vermutung bestätigte sich für die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK)

durch den Einsatz von JNKi1, einem weiteren JNK-spezifischen Inhibitor. JNKi1 zeigte selbst keinen Effekt auf den  $R^t$  und konnte den *Y. enterocolitica*-induzierten  $R^t$ -Abfall um  $9 \pm 2\%$  ( $P < 0,01$ ;  $n = 4$ ) abschwächen. Abb. 3.22 gibt die prozentuale Veränderung vom Ausgangswiderstand 48 h p.i. unter Einfluss von SP600125 bzw. JNKi1 wieder.

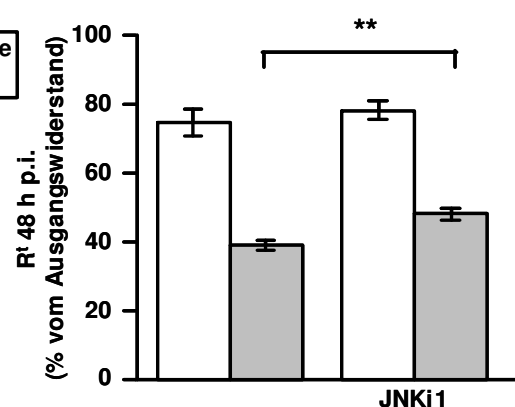
**Tabelle 3.3: Inhibitorstudien.**  $R^t$ -Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Signifikanzen wurden zwischen inhibierten und unbehandelten infizierten Zellen getestet; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

Inhibitor	Ziel	Zugabe	$R^t$ 48 h p.i. (% vom Ausgangswiderstand)				n
			inhibiert		unbehandelt		
			Kontrolle	YeO9	Kontrolle	YeO9	
SP600125	JNK MAP- Kinase	10 $\mu$ M beidseitig	61 $\pm$ 0,7	33 $\pm$ 6	78 $\pm$ 3	32 $\pm$ 0,8	9
JNKi1	JNK MAP-Kinase	2,5 $\mu$ M beidseitig	78 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2**	74 $\pm$ 4	39 $\pm$ 1	4
Bay11-7082	I $\kappa$ B- $\alpha$ -Kinase	10 $\mu$ M beidseitig	71 $\pm$ 3	32 $\pm$ 5	76 $\pm$ 3	36 $\pm$ 4	5
Genistein	Proteintyrosin- sinkinase	50 $\mu$ M beidseitig	93 $\pm$ 3	43 $\pm$ 3	87 $\pm$ 4	37 $\pm$ 1	3
ML-7	<i>Myosin light chain</i> -Kinase	10 $\mu$ M beidseitig	68 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3			
Chelerythrine	Protein- kinase C	10 $\mu$ M beidseitig	80 $\pm$ 5	35 $\pm$ 1			
Ly294002	IP3-Kinase	10 $\mu$ M basolateral	71 $\pm$ 2	26 $\pm$ 0,1*	91 $\pm$ 3	53 $\pm$ 0,8	2
SB202190	p38 MAP-Kinase	10 $\mu$ M beidseitig	61 $\pm$ 1	35 $\pm$ 0,3			
U0126	ERK1/2 MAP- Kinase	10 $\mu$ M beidseitig	23 $\pm$ 1	13 $\pm$ 0,2			

a)



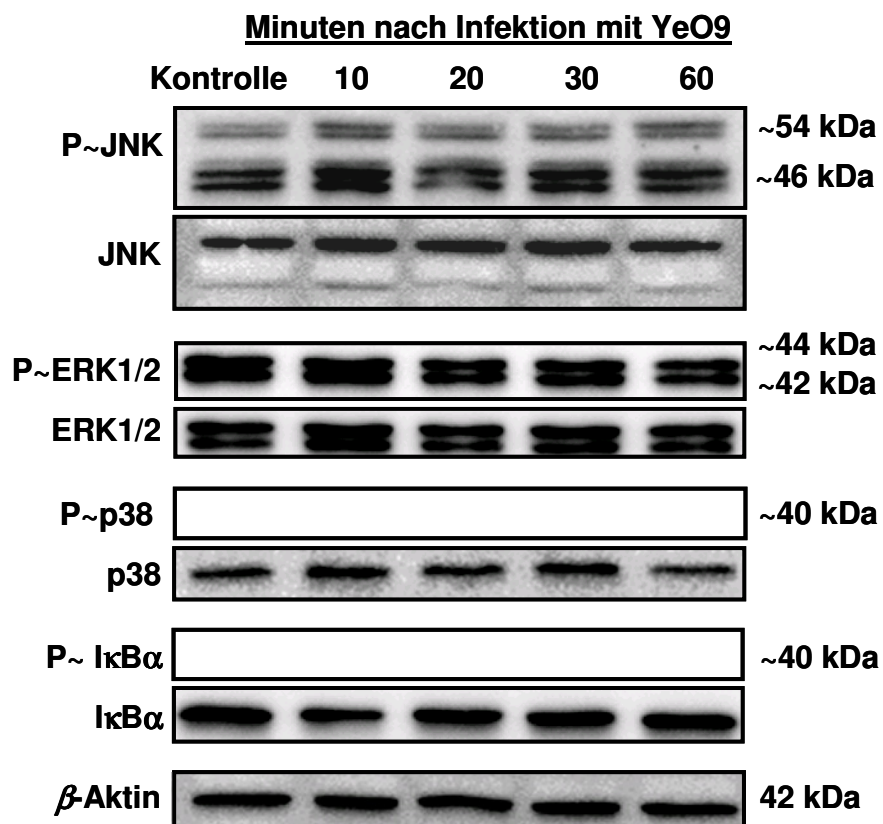
b)



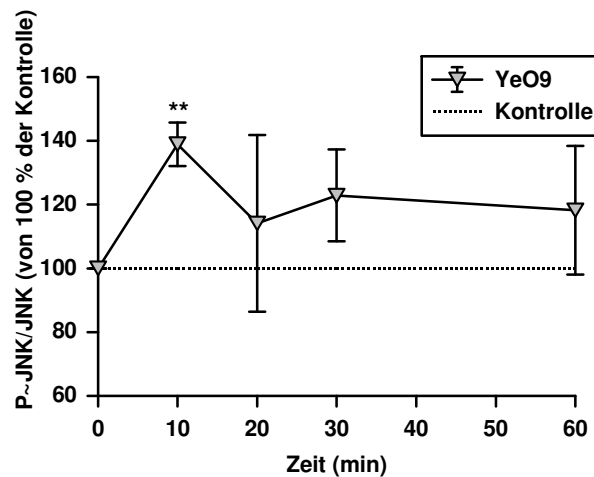
**Abb. 3.22: Abschwächung des *Y. enterocolitica*-induzierten  $R^t$ -Abfalls durch JNK-Inhibition.** HT-29/B6-Monolayer wurden vor der Infektion mit den JNK-Inhibitoren SP600125 oder JNKi1 versetzt. **a)** SP600125 verursachte innerhalb von 48 h einen Abfall des  $R^t$  vom Ausgangswiderstand, wodurch eine Verminderung des *Y. enterocolitica*-induzierten  $R^t$ -Abfalls maskiert wurde (\*\* $P < 0,001$ , ## $P > 0,01$ ;  $n = 9$ ). **b)** Der Einsatz von JNKi1 selbst hatte keine  $R^t$ -Effekt, so dass eine Abschwächung des *Y. enterocolitica*-induzierten Effekts offensichtlich wurde (\*\* $P < 0,01$ ;  $n = 4$ ).

Zusätzlich zu den Widerstandsexperimenten wurden Phosphorylierungs-Analysen durchgeführt, die eine JNK-Aktivierung durch *Y. enterocolitica* bestätigten. Der Phosphorylierungsgrad der MAP-Kinasen sowie der I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase wurde 10, 20, 30 und 60 min nach der Infektion untersucht und mit dem in Kontrollen verglichen. Auf dem in Abb. 3.23a gezeigten Western Blot ist bereits nach 10-minütiger Yersinien-Inkubation eine verstärkte Phosphorylierung der beiden Isoformen JNK1 (46 kDa) und JNK2 (54 kDa) erkennbar. Der Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 oder der I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase wurde durch die Infektion hingegen nicht beeinflusst. Die ERK1/2-Kinase war bereits in Kontrollen deutlich phosphoryliert und wurde durch den Erreger nicht weiter stimuliert. Im Unterschied dazu waren die p38- und die I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase weder in Kontrollen noch in infizierten HT-29/B6-Zellayern aktiviert (Abb. 3.23a). Für eine Quantifizierung der JNK-Phosphorylierung wurden die Signale der unphosphorylierten (JNK) und phosphorylierten JNK-Isoformen (P~JNK) densitometriert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dieses ist in Abb. 3.23b als P~JNK/JNK prozentual dargestellt, wobei die Kontrollwerte zum jeweiligen Zeitpunkt auf 100% festgesetzt wurden. Da die Effekte auf JNK-1 und 2 vergleichbar waren, sind die beiden Isoformen nicht einzeln gezeigt.

a)



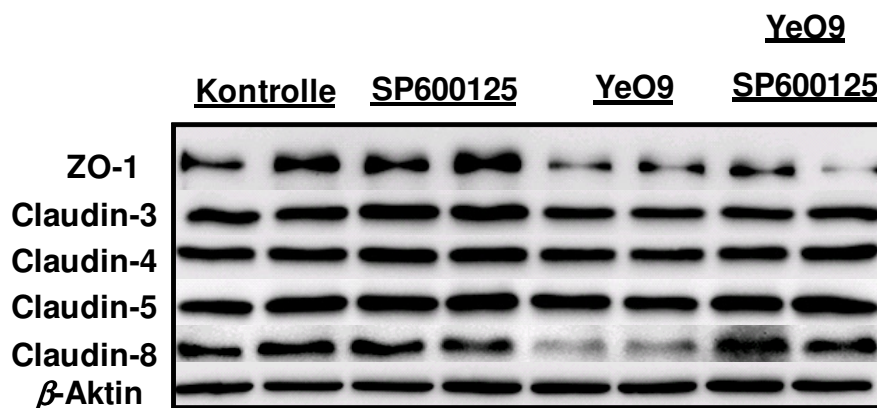
b)



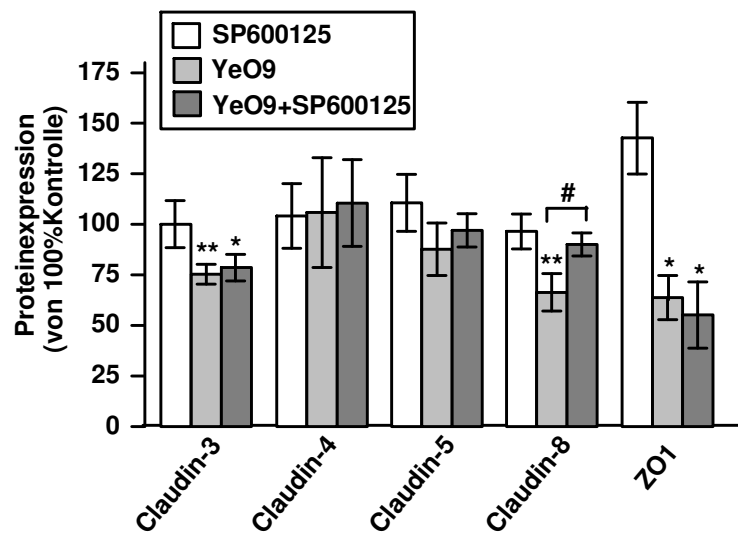
**Abb. 3.23: Analyse der Kinase-Phosphorylierung durch *Y. enterocolitica*.** HT-29/B6-Zelllayer wurden mit *Y. enterocolitica* infiziert und 10, 20, 30 und 60 min. p.i. Proben zur Proteinanalyse präpariert. **a)** Der Phosphorylierungsstatus der Kinasen c-Jun, ERK1/2, p38 und I $\kappa$ B $\alpha$  wurde im Western Blot ermittelt. Dargestellt ist eins von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten. **b)** Die densitometrische Auswertung veranschaulicht den Zeitverlauf der JNK-Phosphorylierung (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0,01$ ;  $n = 5$ ).

Um einen Einfluss der JNK-Inhibition auf die Expression von barrierebildenden TJ-Proteinen zu ermitteln, wurden Western Blot-Analysen für ZO-1, Claudin-3, -4, -5, und -8 durchgeführt. Wie aus Abb. 3.24a hervorgeht, war Claudin-8 das einzige der analysierten TJ-Proteine, das durch die JNK-Hemmung verändert war. Hier führte der Einsatz von SP600125 zu einer Wiederherstellung des Claudin-8-Proteinlevels auf  $90 \pm 6\%$  ( $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ) im Vergleich zu  $66 \pm 10\%$  in nicht inhibierten infizierten Monolayern und  $96 \pm 9\%$  in SP600125-inhibierten Kontrollen (Abb. 3.24a und b). Mit JNKi1 konnten vergleichbare Effekte erzielt werden. In diesem Versuchsansatz wurde die Expression von Claudin-8 durch JNK-Inhibition von  $65 \pm 4\%$  auf  $83 \pm 8\%$  angehoben ( $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ). Mit  $88 \pm 12\%$  unterschieden sich die Proteinlevel in JNKi1 inhibierten Kontrollen nicht signifikant von denen in unbehandelten Kontrollen ( $n = 4$ ) (Abb. 3.24c und d).

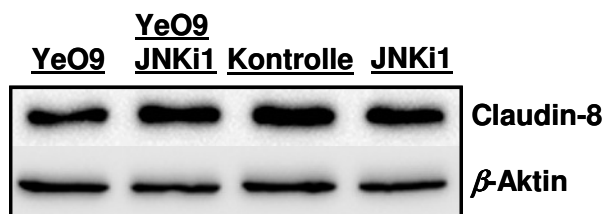
a)



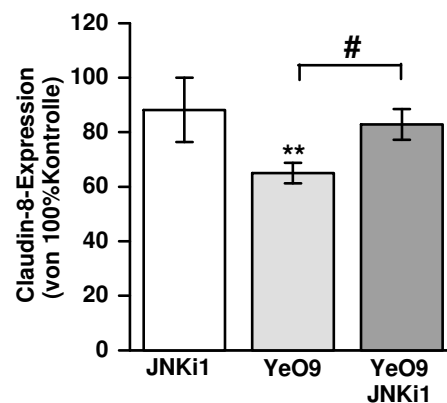
b)



c)



d)



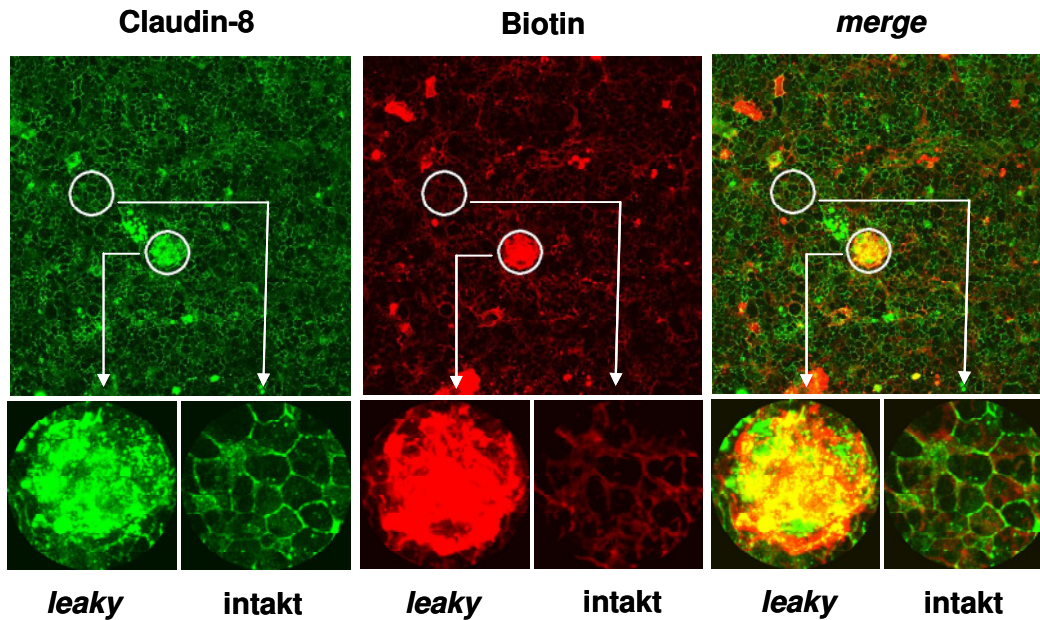
**Abb. 3.24: Wiederherstellung der durch *Y. enterocolitica* reduzierten Claudin-8-Proteinexpression durch JNK-Inhibition.** 48 h p.i. wurde das Expressionsniveau von TJ-Proteinen in JNK-inhibierten und nicht inhibierten HT-29/B6-Monolayer verglichen. **a)** Einfluss von SP600125 auf die Proteinexpression verschiedener TJ-Proteine mit **b)** densitometrischer Analyse ( $n = 5$ ). **c)** Einfluss von JNKi1 auf die Claudin-8-Expression mit **d)** Densitometrie ( $n = 4$ ). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $P < 0,05$  und \*\* $P < 0,01$  versus unbehandelte Kontrolle, # $P < 0,05$  versus Inhibitor).

Zur weiteren Aufklärung wurde die Einflussnahme der JNK auf die Lokalisation von Claudin-8 in der TJ überprüft. Dazu wurde an infizierten, JNKi1-inkubierten Monolayern eine Biotinylierung in Kombination mit einer Claudin-8-Immunfärbung 48 h p.i. durchgeführt. Zum direkten Vergleich dienten parallel infizierte, nicht inhibierte Monolayer. Die konfokale laserscanning-mikroskopische Analyse zeigte jedoch auch nach JNK-Inhibition eine Umverteilung von Claudin-8 innerhalb von *leaky regions* ( $n = 2$ ). Repräsentative Ausschnitte von Immunfluoreszenzaufnahmen eines JNKi-inhibierten und eines unbehandelten infizierten Monolayers zeigt Abb. 3.25. Somit kann festgehalten werden, dass die Hemmung der JNK in einer ca. 10%igen Abschwächung des *Y. enterocolitica*-induzierten  $R^t$ -Abfalls und einer vollständigen

Wiederherstellung der Claudin-8-Expression resultierte, jedoch keinen Einfluss auf den in *leaky regions* beobachteten Umverteilungsprozess hatte.

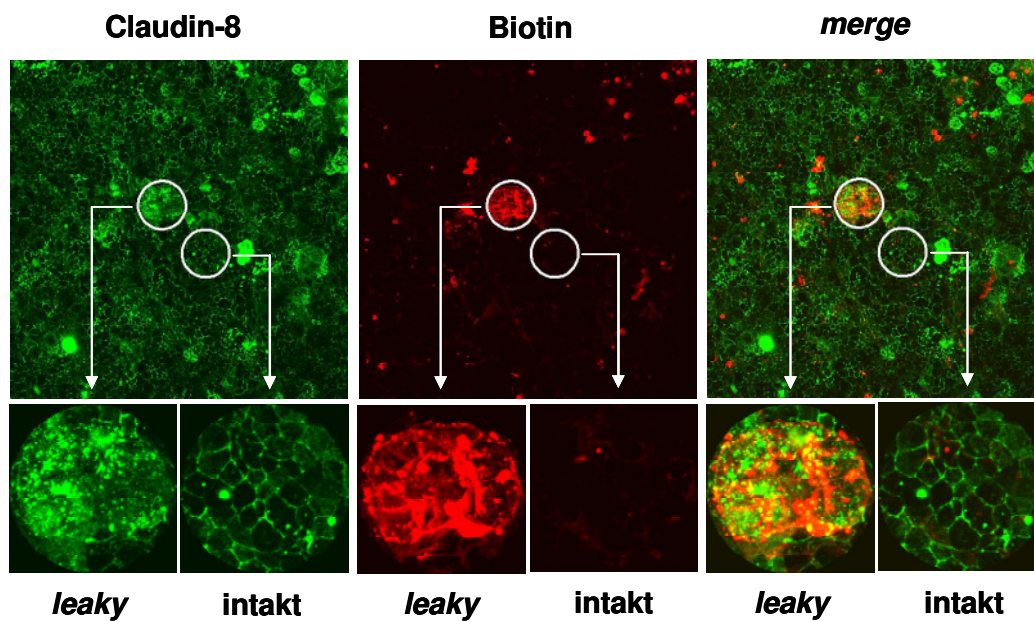
a)

YeO9 + JNKi1



b)

YeO9



**Abb. 3.25: Analyse der Lokalisation von Claudin-8 in *leaky regions* nach JNK-Inhibition.** Dargestellt sind *z-stack*-Projektionen von *Y. enterocolitica*-infizierten HT-29/B6-Monolayern nach Biotinylierung (rot) und Immunfärbung von Claudin-8 (grün). In *leaky regions* weisen sowohl **a)** JNKi1-behandelte als auch **b)** nicht inhibierte Monolayer eine Claudin-8-Umverteilung auf (Übersichtsaufnahmen:  $x = 325 \mu\text{m}$ ,  $y = 325 \mu\text{m}$ ; vergrößerte *leaky regions*/intakte Bereiche:  $r = 20 \mu\text{m}$ ).



## 3.2 Einfluss von *E. coli* Nissle auf die Tight Junction-medierte Barrierefunktion

Verschiedene *in-vitro* und *in-vivo*-Studien haben in den letzten Jahren zu der Erkenntnis geführt, dass die klinische Wirksamkeit des Probiotikums *E. coli* Nissle 1917 unter anderem in einer Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion besteht. Welche Rolle barriererelevanten TJ-Proteinen zukommt, ist allerdings noch weitgehend ungeklärt und wird daher im zweiten Teil dieser Arbeit analysiert. Da bereits aus früheren Arbeiten (Dissertation Jan F. Richter; Institut für Klinische Physiologie) eine positive Wirkung von *E. coli* Nissle auf HT-29/B6-Zelllayer bekannt war, kam dieses Zellkulturmodell auch für die nachstehenden Experimente zum Einsatz. Im Folgenden wird der Einfluss von *E. coli* Nissle sowie die Wirkung des bakteriellen Kulturüberstands auf den transepithelialen Widerstand dokumentiert. Weitergehend erfolgt eine Charakterisierung des Barriereeffekts, wobei insbesondere parazelluläre Veränderungen fokussiert werden. Abschließend werden die Rolle und Funktion des Claudin-14 Proteins näher beleuchtet.

### 3.2.1 Einfluss von *E. coli* Nissle auf den transepithelialen Widerstand

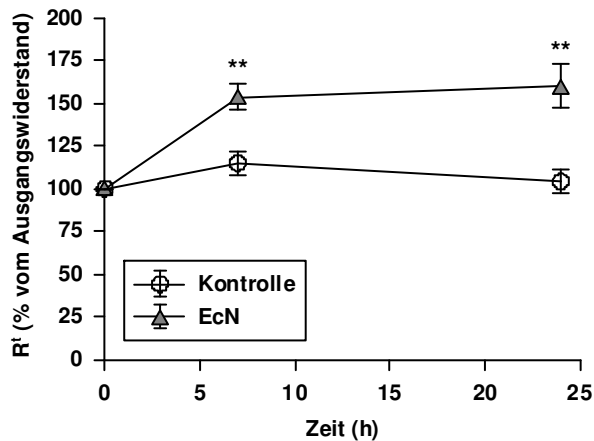
Die Inokulation konfluenter, auf Filtermembranen kultivierter HT-29/B6-Monolayer erfolgte analog zu der unter 3.1.1 beschriebenen Prozedur. EcN wurde apikal appliziert und nach 2,5 h durch Gentamycinbehandlung abgetötet. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. Abb. 3.26a zeigt den  $R^t$ -Verlauf über 24 h nach Inokulation mit  $1 \cdot 10^8$  CFU. Die als Kontrolle eingesetzten, unbehandelten Monolayer wiesen innerhalb dieses Zeitraums kaum Schwankungen vom Ausgangswert auf. Dem gegenüber verursachte das Probiotikum einen deutlichen Anstieg des transepithelialen Widerstands. 7 h p.i. war eine Zunahme auf  $153 \pm 7\%$  ( $P < 0,01$  versus Kontrolle  $115 \pm 7\%$ ;  $n = 3$ ) und 24 h p.i. auf  $160 \pm 13\%$  vom Ausgangswiderstand ( $P < 0,001$  versus Kontrolle  $104 \pm 7\%$ ;  $n = 6$ ) zu beobachten. Eine eindeutige Dosisabhängigkeit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden:  $10^7$  CFU steigerten den initialen Widerstand innerhalb von 24 h p.i. auf  $154 \pm 15\%$  und  $10^6$  CFU auf  $129 \pm 7\%$  ( $n = 3$ ).

In verschiedenen Arbeiten konnte bereits belegt werden, dass EcN aktive Faktoren in das Kulturmedium sezerniert (Wehkamp *et al.*, 2004; Schlee *et al.*, 2007). Die Präparation von EcN-Kulturüberständen sowie ihre Wirksamkeit im HT-29/B6-Modell war bereits in Vorarbeiten am Institut für Klinische Physiologie erprobt worden und hatte gezeigt, dass das Filtrat des EcN-Kulturüberstands einen Widerstandsanstieg induzierte, wobei die Wirksamkeit noch durch eine Aufkonzentrierung intensiviert werden konnte.

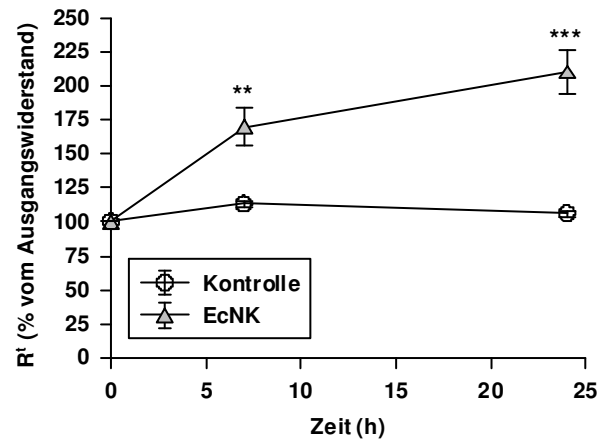
In der vorliegenden Arbeit wurden EcN-Kulturüberstände nach etabliertem Verfahren präpariert und aufkonzentriert (Faktor  $\sim 130$ ). Wie in Abb. 3.26b dargestellt, resultierte die Inkubation mit 10  $\mu$ l dieser, als *E. coli* Nisslekonzentrat (EcNK) bezeichneten Präparation in einem

stark ausgeprägten  $R^I$ -Anstieg auf  $170 \pm 14\%$  nach 7 h (*versus* Kontrolle  $113 \pm 3\%$ ,  $P < 0,01$ ;  $n = 9$ ) und auf  $210 \pm 16\%$  nach 24 h (*versus* Kontrolle  $106 \pm 2\%$ ,  $P < 0,001$ ;  $n = 9$ ).

a)

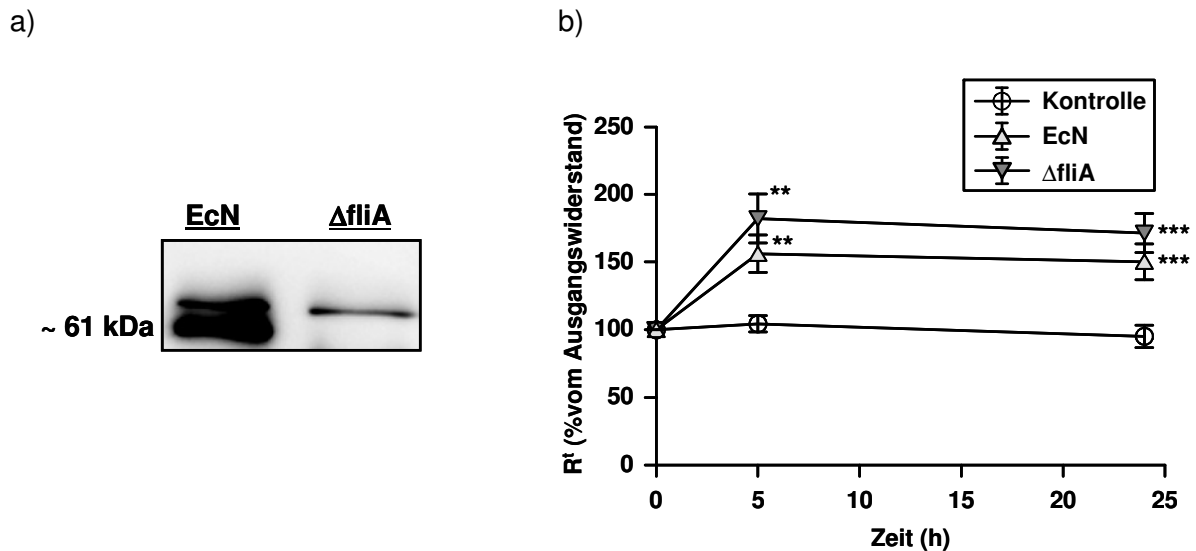


b)



**Abb. 3.26: Effekt von *E. coli* Nissle und *E. coli* Nisslekonzentrat auf den trans-epithelialen Widerstand.** Dargestellt ist die zeitliche  $R^I$ -Änderung **a)** nach Inokulation mit vitalen *E. coli* Nissle ( $10^8$  CFU;  $n = 6$ ) und **b)** nach Applikation von 10  $\mu$ l EcNK (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 9$ ).

Wie von Schlee et al. (Schlee *et al.*, 2007) aufgeklärt, weist das im Kulturüberstand befindliche *E. coli* Nissle-Flagellin in Kolonepithelzellen eine immunmodulatorische Funktion auf. In Hinblick darauf stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, inwiefern dieser bakterielle Faktor auch eine Rolle für den auf HT-29/B6-Monolayern beobachteten Widerstandsanstieg spielt. Um dieses zu beantworten, wurde eine *E. coli* Nissle  $\Delta$ fliA-Mutante im Widerstandsexperiment getestet. In diesem Derivat ist die Transkription der Flagellengene auf Grund des fehlenden Sigmafaktors FliA unterbunden. Das Fehlen des ~61 kDa großen Flagellinproteins konnte für diesen Stamm im Western Blot bestätigt werden (Abb. 3.27a). Im Widerstandsexperiment bewirkte die Mutante jedoch einen deutlichen Anstieg vom Ausgangswiderstand auf  $150 \pm 13\%$  5 h p.i. und  $172 \pm 15\%$  24 h p.i. ( $P < 0,001$  *versus* Kontrolle;  $n = 6$ ). Da dieser Effekt mit dem des Wildtyps vergleichbar war ( $156 \pm 14\%$  5 h p.i. und  $150 \pm 13\%$  24 h p.i.;  $n = 6$ ), ist Flagellin als ursächlicher Induktor des Barriereeffekts auszuschließen (Abb. 3.27b).



**Abb. 3.27: Rolle von *E. coli* Nissle-Flagellin.** a) Western Blot zur Überprüfung der Flagellinsynthese (~61kDa) in Wildtyp und *fliA*-defizienter *E. coli* Nissle-Mutante ( $\Delta fliA$ ) b) Konfluente HT-29/B6-Monolayer wurden mit dem EcN-Wildtyp oder der  $\Delta fliA$ -Mutante infiziert und die Änderung des  $R^t$  über 24 h verfolgt (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ).

### 3.2.2 Charakterisierung des parazellulären Barriereeffekts

Alle in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente wurden nach 24-stündiger Inkubation mit EcNK durchgeführt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Monolayer.

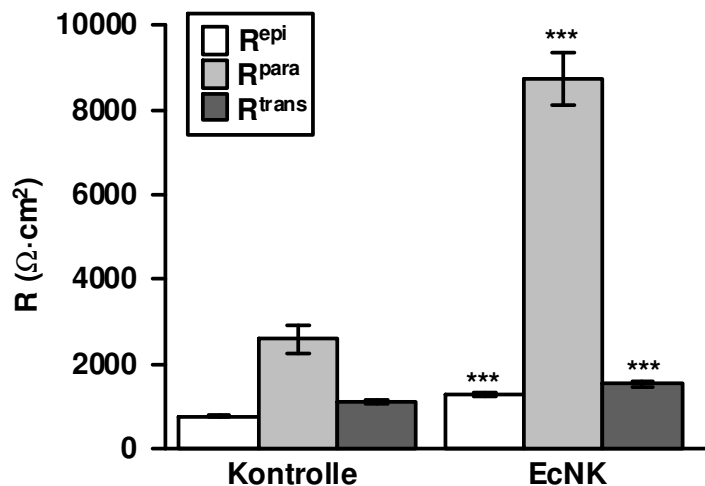
Zur näheren Charakterisierung wurden die epithelialen Monolayer nach Vorinkubation in Ussing-Kammern eingespannt. Neben der Erfassung elektrophysiologischer Parametern wie Kurzschlussstrom und transepithelalem Widerstand wurden unidirektionale Fluxmessung vom apikalen zum basolateralen Kompartiment mit Mannitol durchgeführt. Während sich die in Kontrollen und EcNK-behandelten Monolayern erfassten Kurzschlussströme nicht unterschieden, zeigte sich dass die EcNK-vermittelte Zunahme des  $R^t$  mit einer Verminderung der Mannitol-Permeabilität einherging ( $P < 0,001$ ;  $n = 9$ ). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

**Tabelle 3.4: Messung von Mannitol-Fluxen und Kurzschlussströmen nach EcNK-Vorinkubation.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 9$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

	$I_{sc}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$R^t$ ( $\Omega \cdot cm^2$ )	$H^3$ -Mannitol Permeabilität ( $10^6$ cm/s)
<b>Kontrolle</b>	$2,3 \pm 0,3$	$281 \pm 31$	$1,55 \pm 0,02$
<b>EcNK</b>	$2,6 \pm 0,3$	$361 \pm 86^{**}$	$0,89 \pm 0,08^{***}$

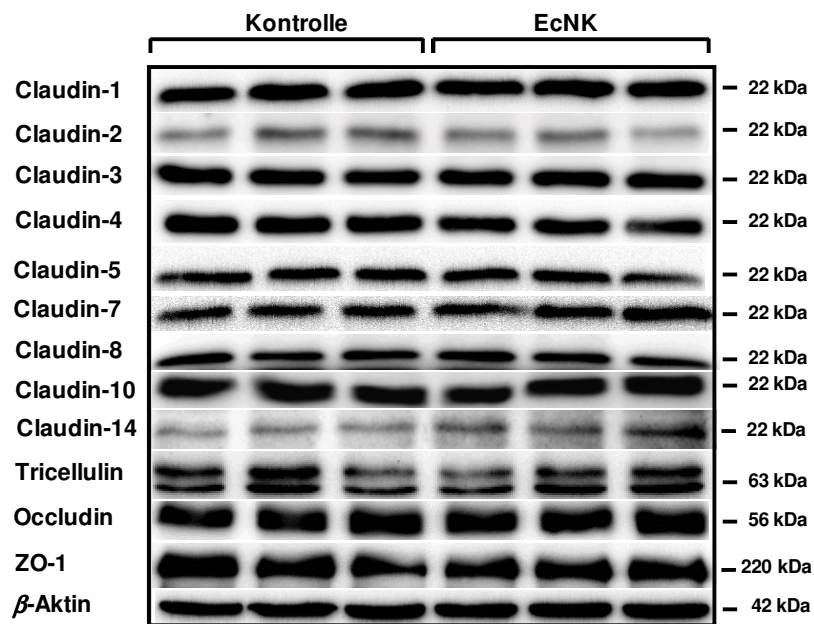
Darüber hinaus konnte über Zwei-Wege-Impedanzmessungen gezeigt werden (Abb. 3.28), dass der durch EcNK vermittelte Widerstandseffekt überwiegend auf einer Abdichtung der parazellulären Barriere beruht.  $R^{\text{para}}$  betrug in EcNK-inkubierten Monolayern  $8727 \pm 621 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und war somit 3,4-mal höher als in Kontrollen mit  $2590 \pm 340 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ( $P < 0,001$ ;  $n = 4$ ). Aber auch für  $R^{\text{epi}}$  und  $R^{\text{trans}}$  war eine leichte Zunahme unter EcNK-Einfluss festzustellen.  $R^{\text{epi}}$  belief sich auf  $1295 \pm 52 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (versus Kontrolle  $764 \pm 34 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $P < 0,001$ ;  $n = 4$ ) und  $R^{\text{trans}}$  auf  $1525 \pm 69 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (versus Kontrolle  $1108 \pm 25 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $P < 0,001$ ;  $n = 4$ ).



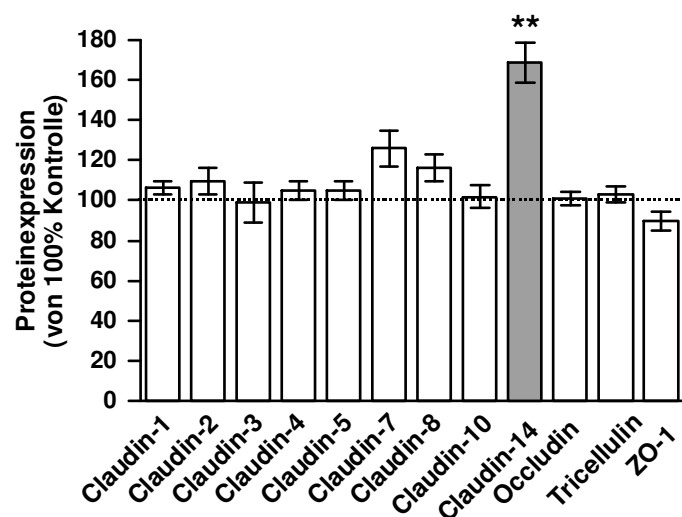
**Abb. 3.28: Bestimmung von  $R^{\text{epi}}$ ,  $R^{\text{trans}}$  und  $R^{\text{para}}$  auf HT-29/B6-Monolayern unter Einfluss von EcNK.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie. Alle drei Widerstandskomponenten wurden durch EcNK beeinflusst, wobei die Zunahme von  $R^{\text{para}}$  besonders stark ausgeprägt war (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\*\* $P < 0,001$  versus Kontrolle;  $n = 4$ ).

An diese Befunde anknüpfend wurden das Expressionsniveau verschiedener Claudine sowie von ZO-1, Occludin und Tricellulin nach EcNK-Inkubation analysiert. In Abb. 3.29a sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse veranschaulicht. Eine Änderung der Proteinlevel konnte ausschließlich für Claudin-14 verzeichnet werden. Aus der densitometrischen Auswertung ergab sich eine Steigerung auf  $169 \pm 10\%$  ( $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ) (Abb. 3.29b). Alle anderen TJ-Proteine zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Kontrollniveau. Eine Zunahme der ZO-1-Expression konnte im HT-29/B6-Modell nicht nachgewiesen werden.

a)

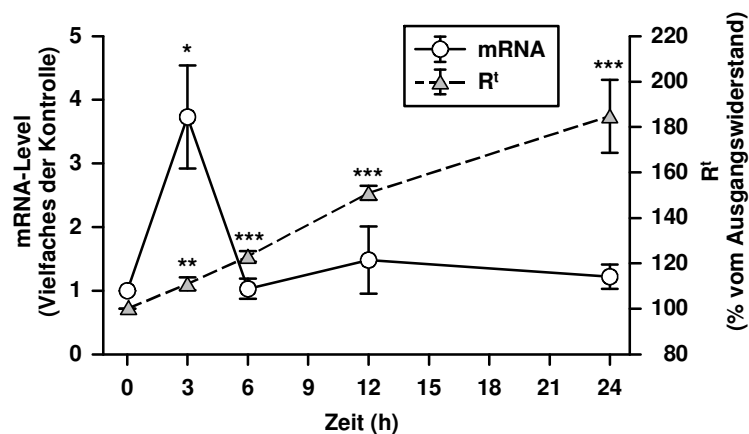


b)



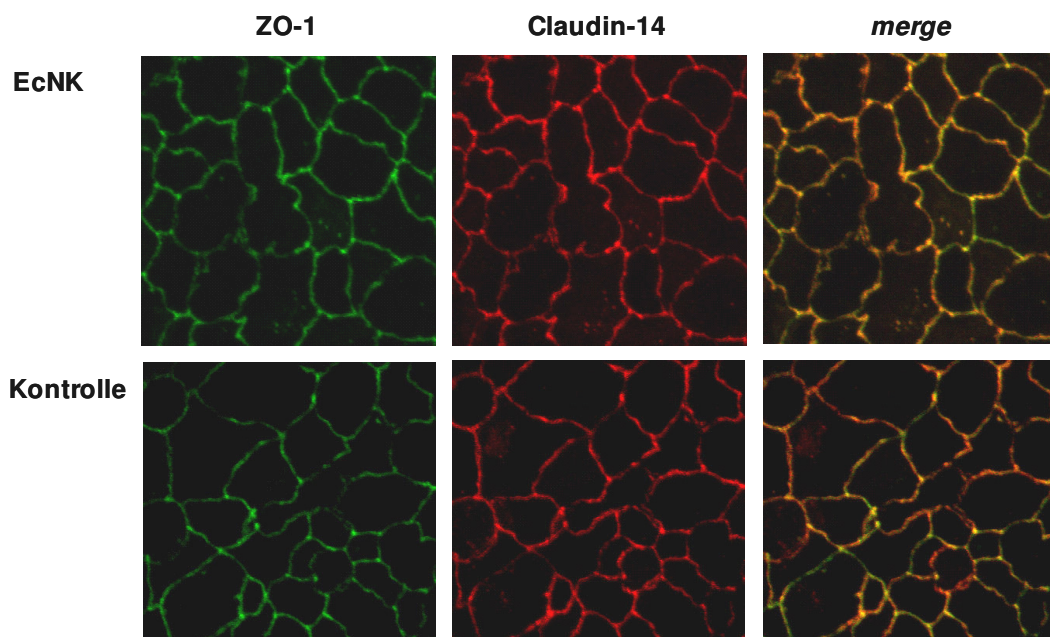
**Abb. 3.29: Einfluss von EcNK auf das Expressionsmuster von TJ-Proteinen.** Konfluente HT-29/B6-Monolayer wurden für 24 h mit EcNK inkubiert und anschließend das Proteinlevel verschiedener Claudine sowie von Occludin, Tricellulin und ZO-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. **a)** Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. **b)** Densitometrische Auswertung der Expressionsanalysen und Normalisierung gegen  $\beta$ -Aktin (Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0,01$ ;  $n = 6$ ).

Eine Real-time RT-PCR-Analyse der Claudin-14 mRNA-Level zu verschiedenen Zeitpunkten ergab bereits nach dreistündiger Inkubation mit EcNK eine Zunahme der Expression auf das  $3,7 \pm 0,8$ -fache der Kontrolle ( $P < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Wie dem in Abb. 3.30 dargestellten Zeitverlauf zu entnehmen ist, entsprachen die Claudin-14 mRNA-Level nach 6 h wieder dem Kontrollniveau ( $1 \pm 0,2$ -fach;  $n = 8$ ) und stiegen im weiteren Verlauf auch nicht erneut signifikant an ( $1,5 \pm 0,5$ -fach nach 12 h und  $1,2 \pm 0,2$ -fach nach 24 h).



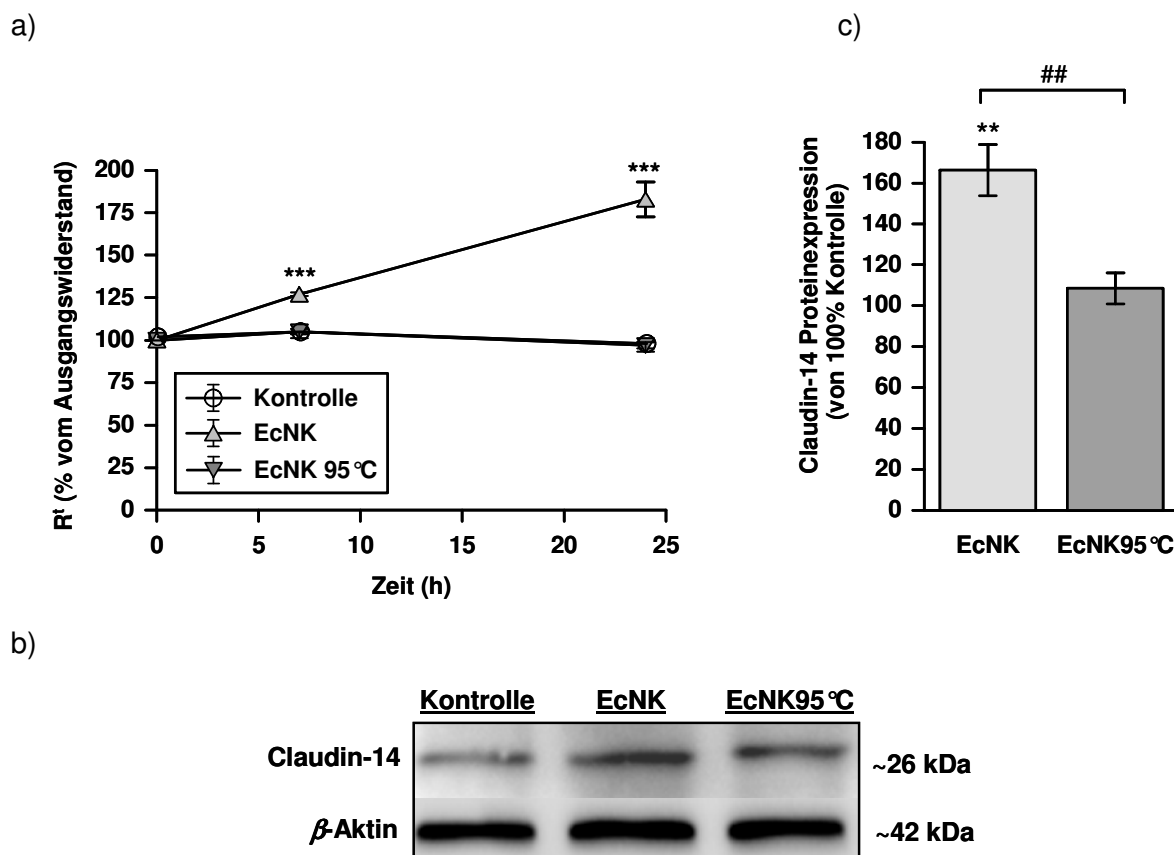
**Abb. 3.30: Zeitlicher Verlauf von Claudin-14 mRNA-Expression und R<sup>t</sup>-Anstieg.** Das Expressionsniveau der Claudin-14 mRNA wurde in HT-29/B6-Monolayern 3, 6, 12 und 24 h nach Stimulation mit EcNK untersucht. Zur Normalisierung der über Real-time RT-PCR ermittelten Werte wurde das *Housekeeping*-Gen GAP-DH eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (\* $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ,) in Korrelation mit den zugehörigen R<sup>t</sup>-Werten (Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 8$ ).

Eine für Claudin-14 und ZO-1 durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung ließ keine auffälligen Unterschiede zur Kontrolle erkennen. Die TJ-Netzwerkfärbung mit EcNK-behandelter Monolayer schien weder evident verstärkt noch waren vermehrt intrazelluläre Signale nachzuweisen (Abb. 3.31). Die Visualisierung mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie konnte somit nicht zur weiteren Quantifizierung beitragen.



**Abb. 3.31: Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-14 und ZO-1 unter EcNK-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle.** Gezeigt sind z-stack-Maximumprojektionen der x-y-Ebene ( $x = 35 \mu\text{m}$ ,  $y = 35 \mu\text{m}$ ): ZO-1 in grün und Claudin-14 in rot.

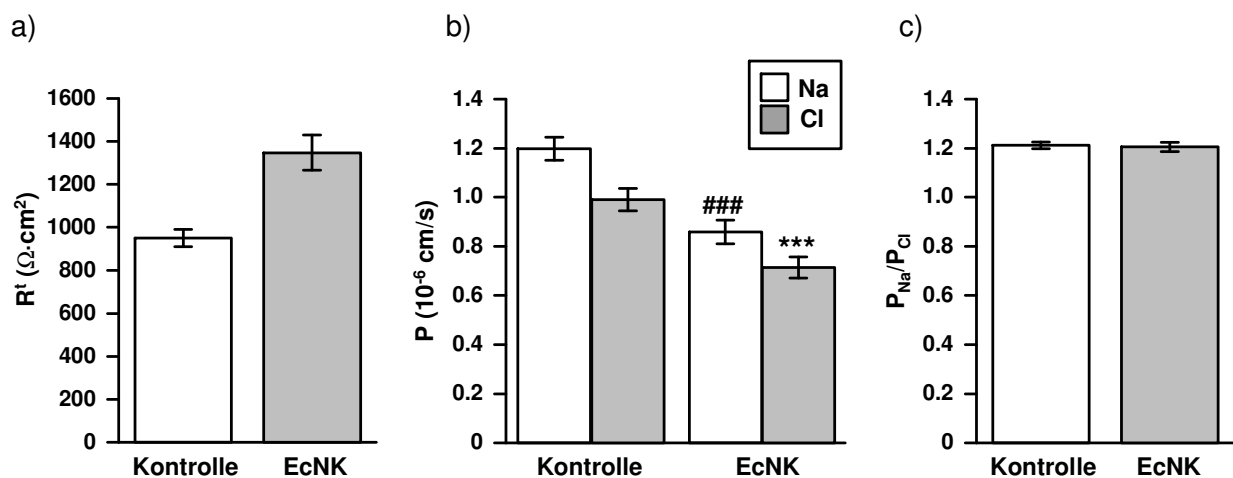
Um zu eruieren, ob die beobachtete Barrierestärkung tatsächlich durch das Claudin-14 Protein verursacht wurde, musste eine Korrelation des EcNK-vermittelten Widerstandsanstiegs mit dem Claudin-14 Proteinlevel in HT-29/B6-Monolayern überprüft werden. Durch Hitzebehandlung des EcNK bei 95 °C konnte die Barrierewirkung vollständig aufgehoben werden. Es erfolgte weder ein Widerstandsanstieg noch eine signifikante Zunahme der Claudin-14 Proteinlevel. Wie Abb. 3.32a illustriert, stieg der Widerstand nach einer Hitzebehandlung des EcNK nicht mehr an und blieb gegenüber aktivem EcNK ( $183 \pm 10\%$  nach 24 h,  $P < 0,001$ ;  $n = 6$ ) während der 24-stündigen Inkubation auf Kontrollniveau ( $97 \pm 2\%$  nach 24 h Inkubation mit EcNK 95 °C *versus*  $96 \pm 3\%$  in Kontrollen;  $n = 6$ ). Im Anschluss an das Widerstandsexperiment durchgeführte Western Blot-Analysen ergaben eine Steigerung des Claudin-14 Proteinlevels auf  $166 \pm 13\%$  durch aktives EcNK ( $P < 0,01$ ;  $n = 7$ ). Hitzeinaktiviertes EcNK bewirkte hingegen keine signifikante Zunahme ( $108 \pm 8\%$ , des Kontrollniveaus  $n = 7$ ) (Abb. 3.32b und c).



**Abb. 3.32: Korrelation von EcNK-induziertem  $R^t$ -Effekt und Claudin-14-Proteinexpression.** HT-29/B6-Monolayer wurden mit 10  $\mu$ l aktivem oder hitzeinaktiviertem EcNK (EcNK 95 °C) über 24 h inkubiert. **a)** Widerstandsverlauf ( $***P < 0,001$ ;  $n = 6$ ) und **b)** anschließende Western Blot-Analyse der Claudin-14 Proteinlevel mit **c)** densitometrischer Auswertung und Normalisierung gegen  $\beta$ -Aktin (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $**P < 0,01$ , *versus* Kontrolle;  $##P < 0,01$  *versus* inaktiviert;  $n = 7$ ).

Da an einem Nierenzellkulturmodell durchgeführte Claudin-14-Überexpressionsstudien auf eine selektive Abdichtung gegenüber Natriumionen hindeuteten (Ben-Yosef *et al.*, 2003), wurden NaCl-Dilutionspotential-Messungen an EcNK-vorinkubierten HT-29/B6-Monolayern durchgeführt. Um in Ussing-Kammern die reine Permeabilität von Natrium- bzw. Chloridionen über den Zelllayer messen zu können, musste die Aktivität elektrogener Kanäle vermieden und das Experiment folglich bei 14 °C statt bei 37 °C erfolgen.

Neben den erwarteten Unterschieden im Widerstandsniveau (Abb. 3.33a) offenbarte sich auch eine Verminderung der Natriumpermeabilität von  $1,2 \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$  cm/s in Kontrollen auf  $0,9 \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$  cm/s unter EcNK-Einfluss ( $P < 0,001$ ;  $n = 9$ ). Aber auch die Chloridpermeabilität wurde durch EcNK eingeschränkt. In Kontrollen wurde eine Durchtrittsgeschwindigkeit von  $1,0 \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$  cm/s und auf EcNK-behandelten Zellen von  $0,7 \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$  cm/s ermittelt ( $P < 0,001$ ;  $n = 9$ ) (Abb. 3.33b). Wurden die Permeabilitäten der beiden Ionen jeweils ins Verhältnis zueinander gesetzt ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ), ergab sich jedoch keine Abweichung gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.33c). Das heißt EcNK bewirkte an der epithelialen HT-29/B6-Barriere keine selektive Verminderung der Natriumpermeabilität, sondern dichtete diese gleichermaßen gegen Chlorid- und Natriumionen ab.



**Abb. 3.33: Beeinflussung der NaCl-Permeabilität durch EcNK.** HT-29/B6-Monolayer wurden mit EcNK für 24 h inkubiert und anschließend in Ussing-Kammern eingespannt. Dargestellt sind **a)** der transepitheliale Widerstand, **b)** die aus Dilutionspotentialmessungen ermittelten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid sowie **c)** das Permeationsverhältnis ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ) in Kontrollen und EcNK-stimulierten Monolayern (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $P_{\text{Na}}$ :  $***P < 0,001$ ;  $P_{\text{Cl}}$ :  $###P < 0,001$  versus Kontrolle;  $n = 9$ ).

### 3.2.3 Funktion von Claudin-14

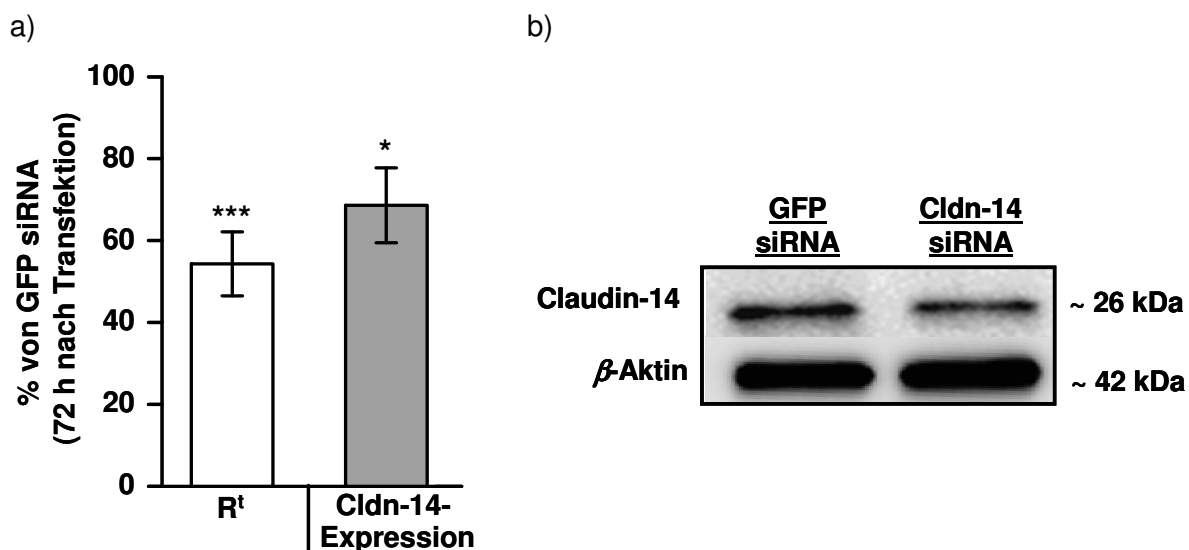
Bisher liegen in der Literatur wenige Erkenntnisse zur Funktion von Claudin-14 vor. Um die mutmaßlich abdichtende Funktion dieses TJ-Proteins zu bestätigen, wurde die Claudin-14-



Expression in HT-29/B6 Zellen mittels siRNA reduziert und resultierende Konsequenzen für die Barriere aufgezeigt.

HT-29/B6-Zellen wurden transient mit einer für Claudin-14 spezifischen siRNA (Cldn-14 siRNA) transfiziert und direkt nach der Nukleofektion auf Filtermembranen ausgesät. Als Kontrolle wurde eine für GFP (*green fluorescent protein*) spezifische siRNA (GFP siRNA) eingesetzt. Im Verlauf der folgenden sechs Tage erfolgten regelmäßige Widerstandsmessungen. Bereits 48 h nach Nukleofektion wiesen die Kontrollen gegenüber Cldn-14 siRNA transfizierten Zellen einen doppelt so hohen Widerstand auf, wobei die Differenz prozentual ermittelt wurde in dem die Kontrollwiderstände auf 100% gesetzt wurden. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt (insgesamt sechs) betrug der  $R^t$  in Cldn-14 siRNA transfizierten Zellayern nur durchschnittlich  $51 \pm 2\%$  der Kontrollmonolayer ( $P < 0,001$ ; mindestens  $n = 5$ ).

Die 72 h nach siRNA-Transfektion ermittelten Unterschiede im Widerstandsniveau ( $54 \pm 8\%$  der Kontrolle,  $P < 0,001$ ;  $n = 8$ ) sowie die zur Überprüfung der Transfektionseffizienz durchgeführten Western Blot-Analysen sind in Abb. 3.34 dargestellt. Die Proteinexpression von Claudin-14 entsprach zu diesem Zeitpunkt  $69 \pm 9\%$  der Kontrolle ( $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ). Demnach korrelierte eine ca. 30%ige Verminderung der Claudin-14-Expression mit einem um knapp 50% geringeren  $R^t$ .



**Abb. 3.34: Widerstandsmessung und Proteinnachweis 72 h nach Transfektion von HT-29/B6 mit Cldn-14 siRNA.** a) Widerstandsniveau und Claudin-14 Proteinexpression 72 h nach Transfektion von Cldn-14 siRNA (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 8$  bzw. 4). b) Repräsentativer Western Blot aus vier vergleichbaren Experimenten.

## 4 Diskussion

Der epithelialen Barriere des Darmes kommt bei der Abgrenzung des Darmlumens vom Körperinneren eine Schlüsselfunktion zu. Dabei ist insbesondere die epitheliale TJ für die Abdichtung des lateralen interzellulären Spalts und die spezifische Regulation der Barrierefunktion im Hinblick auf physiologische Anforderungen bzw. Stimuli von Bedeutung. Die Barriereintegrität kann auf verschiedenen Wegen durch Bakterien und/oder ihre Faktoren bzw. Stoffwechselprodukte beeinflusst werden. Speziell auf dem Gebiet der Barriestörung durch pathogene Bakterien konnten in den vergangenen Jahren zunehmend neue Erkenntnisse gewonnen und die Mechanismen verschiedenster Durchfallerreger identifiziert werden (Guttman & Finlay, 2009). Hier sind unter anderem die Induktion von Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion, die Aktivierung inflammatorischer Kaskaden (Berkes *et al.*, 2003), die Induktion lokaler Zellschäden (Troeger *et al.*, 2007) oder aber auch eine Destruktion der Struktur und Funktion von Tight Junctions zu nennen (Fasano *et al.*, 1991; Sonoda *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2007; Bucker *et al.*, 2009). Dem entgegen kann die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der TJ wiederum auch durch die Einwirkung probiotischer Bakterien dahingehend modifiziert werden, dass eine Stärkung der epithelialen Barriere resultiert (Ewaschuk *et al.*, 2008; Mennigen & Bruewer, 2009). Somit ist die epitheliale TJ molekulare Zielstruktur pathogener und probiotischer Mikroorganismen.

### 4.1 Pathomechanismen der *Y. enterocolitica*-Infektion

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* verursacht typischerweise eine Diarrhö, wobei insbesondere Kinder unter schweren Enterokolitiden leiden können (Marriott *et al.*, 1985). Zudem ist das Auftreten von reaktiven Gelenkentzündungen als eine häufige Folge von *Y. enterocolitica*-induzierten Durchfallerkrankungen bekannt (Lahesmaa-Rantala *et al.*, 1991).

Somit liegt es nahe, dass die von Gogarten und Kollegen in einem Mausmodell durch *Y. enterocolitica* beobachtete Barriestörung (Gogarten *et al.*, 1994) tatsächlich als Pathomechanismus der Durchfallerkrankung fungiert und darüber hinaus auch ursächlich ist für weitere mit der *Y. enterocolitica*-Infektion assoziierte Krankheitsbilder, wie zum Beispiel für die reaktive Arthritis. Während die für *Y. enterocolitica* spezifischen Virulenzeigenschaften und Strategien zur Invasion des Darmepithels und zur Immunabwehr in den letzten Jahren entschlüsselt werden konnten, blieben der Diarrhö und Barriestörung auslösende Mechanismus sowie die damit einhergehenden morphologischen Veränderungen des Epithels bisher ungeklärt. Dieses wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit anhand des HT-29/B6-Infektionsmodells detailliert untersucht.

#### 4.1.1 Elektrophysiologische Charakteristika der Barrierestörung

Im HT-29/B6-Zellkulturmodell, das sich bereits in früheren Studien für die Analyse erregereinduzierter Barrieredefekte bewährt hat (Epple *et al.*, 2004; Troeger *et al.*, 2007; Bucker *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2009), war die durch *Y. enterocolitica* ausgelöste Barrierestörung durch einen Abfall des transepithelialen Widerstands und eine parallele Zunahme der Molekülpermeabilität charakterisiert. Fluxmessungen offenbarten einen verstärkten Durchtritt von Mannitol und Fluoreszein mit kleinen hydrodynamischen Radien von 3,6 Å und 4,5 Å. Für das 4 kDa große FITC-Dextranmolekül, für das ein hydrodynamischer Radius von ca. 13 Å geschätzt wird, zeigte sich zwar eine Tendenz in der Permeabilitätszunahme, jedoch keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle. Dieses mag zum einen darin begründet sein, dass die gemessenen Molekülfluxe hier nahe der Nachweisgrenze lagen. Andererseits ist auf Grund dieser Befunde nicht von einem vermehrten Auftreten größerer Löcher im infizierten Zelloberflächen auszugehen, so dass der Durchtritt der kleineren Mannitol- bzw. Fluoreszeinmoleküle vermutlich parazellulär über eine durchlässigere TJ im infizierten Monolayer erfolgte. Gestützt wird diese Hypothese von den Befunden der Zwei-Wege-Impedanzmessung, die eine deutliche Abnahme des parazellulären, aber keine Veränderungen des transzellulären Widerstands nach *Y. enterocolitica*-Infektion ergab.

#### 4.1.2 Störung der TJ-Integrität in *leaky regions*

Einen zentralen Aspekt dieser Arbeit stellt die Auffindung fokaler, ungleichmäßig verteilter Barrieredefekte in infizierten Monolayern dar. Diese von intakten Arealen umgebenen, als *leaky regions* bezeichneten Bereiche sind funktionell durch eine gesteigerte Leitfähigkeit bzw. Permeabilität charakterisiert, was mit Hilfe von Conductance-Scanning-Analysen und Biotinylierungen identifiziert werden konnte. Strukturell geht dieser regionale Verlust der Barriereintegrität mit einer veränderten Zusammensetzung der TJ einher. Konfokalmikroskopische Betrachtungen offenbarten innerhalb von *leaky regions* eine Umverteilung verschiedener TJ-Proteine aus der TJ in subapikale intrazelluläre Kompartimente. Als Konsequenz einer solchen Distribution muss von einem Verlust der Barrierefunktion des betroffenen Proteins ausgegangen werden. Darüber hinaus zeigte sich in Western Blot-Studien, dass mehrere TJ-Proteine zusätzlich auch in ihrem Expressionslevel verändert waren.

In den letzten Jahren ist es zunehmend gelungen die Barrierefunktion verschiedener Claudine zu entschlüsseln. Einige der 24 bekannten Claudine dichten die Barriere ab und bewirken eine Zunahme des transepithelialen Widerstands. Zu den bekannten im Dünndarm und im Kolon vorkommenden barrierebildenden Claudinen gehören Claudin-1,- 3,- 4, -5 und -8 (Markov *et al.*, 2010).

Im HT-29/B6-Infektionsmodell waren Claudin-3, -4 und -8 in ihrer Expression vermindert und/oder aus der TJ umverteilt. *Y. enterocolitica* bewirkte eine leichte Verminderung der

Claudin-3-Proteinlevel, wobei 6 h p.i. keine Regulation auf mRNA-Ebene nachzuweisen war. Claudin-4 war in seiner Expression unverändert, aber wie auch Claudin-3 innerhalb von *leaky regions* aus der TJ in subapikale Kompartimente umverteilt. Eine parazelluläre Abdichtung durch Claudin-3 konnte erst kürzlich in einem Nierenzellkulturmodell bestätigt werden (Milatz *et al.*, 2010). Die abdichtende Barrierefunktion von Claudin-4, die in einer Verminderung der Kationenpermeabilität besteht, ist hingegen schon länger bekannt (Van Itallie *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu diesen beiden war Claudin-8, ein weiterer bereits eingehend untersuchter Barrierebildner (Yu *et al.*, 2003; Amasheh *et al.*, 2009), zusätzlich zum beobachteten Umverteilungsprozess sowohl in seiner mRNA- und Proteinexpression stark reduziert. Konfokalmikroskopische Analysen der *leaky regions* zeigten ein äußerst diffuses Claudin-8-Signal. Möglicherweise unterlag das lokal in subapikale Kompartimente delokalisierte Protein bereits dem lysosomalen Abbau (Yu & Turner, 2008) und konnte somit nicht mehr als intaktes Protein im Western Blot nachgewiesen werden. Die Verringerung der Proteinlevel resultierte allerdings selbst nicht aus einem verstärkten Abbau, sondern war durch eine reduzierte Expression bedingt. Das heißt, degradiertes Protein konnte nicht ausreichend ersetzt werden. Dieses wird sowohl von den Befunden der Proteinstabilitätsanalyse gestützt, als auch durch die Verringerung der Claudin-8 mRNA-Level, die auf eine Genregulation hindeuten.

Andere Claudine, wie zum Beispiel Claudin-2 (Amasheh *et al.*, 2002) und -10b (Gunzel *et al.*, 2009) bilden kationenselektive Poren, die einen Widerstandsabfall veranlassen. Allerdings ist Claudin-2 unter physiologischen Bedingungen im Darm kaum nachweisbar und wird insbesondere unter inflammatorischen Gegebenheiten oder während der Restitution hochreguliert (Mankertz & Schulzke, 2007; Zeissig *et al.*, 2007). Auch in der HT-29/B6-Zelllinie ist dieses Protein im Grundstatus eher schwach exprimiert und konfokalmikroskopisch nur in einzelnen Zellen nachweisbar. Die Rolle von Claudin-10 ist weniger gut definiert, da es bisher nur in der Niere untersucht wurde. Derzeit wird angenommen, dass seine Funktion von der spezifischen Zusammensetzung der übrigen Claudine in der TJ im Darm abhängt. Das heißt der funktionale Einfluss eines einzelnen TJ-Proteins wird unter anderem auch durch die gegenwärtige Proteinzusammensetzung der TJ bestimmt. Dieses ist für einige Claudine, wie zum Beispiel Claudin-11 und -15 bekannt (Colegio *et al.*, 2002; Van Itallie *et al.*, 2003), die in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung mit anderen Claudinen im TJ-Polymer den transepithelialen Widerstand erhöhen oder vermindern können. Claudin-11 und -15 kommen allerdings im Dünndarm und Kolon nicht vor.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass insbesondere die für Claudin-3, -4 und -8 beobachteten Veränderungen für den Verlust der Barriereintegrität im *Y. enterocolitica*-Infektionsmodell ursächlich sind.

Überdies war die Proteinexpression von ZO-1 in infizierten Monolayern reduziert. Auch wenn ZO-1 selbst keinen direkten Einfluss auf den transepithelialen Widerstand hat, ist es wahr-

scheinlich, dass die Reduktion des ZO-1-Ankers in einer Aussortierung barriererelevanter Claudine aus TJ-Strängen resultiert (Bucker *et al.*, 2009).

Diese Befunde stehen im Einklang mit anderen Arbeiten, in denen bereits ein Einfluss auf die epitheliale TJ durch verschiedene Erreger gezeigt und in Zusammenhang mit einer Barriere-störung gebracht werden konnte (Fasano *et al.*, 1991; Sonoda *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2007; Bucker *et al.*, 2009).

Die abschließend durchgeführten Gefrierbruchanalysen zeigten, dass eine Auflösung der TJ-Ultrastruktur von *leaky regions* mit dieser Technik nicht möglich war. Die Zellkontakte waren hier offenbar so stark verändert, dass keine TJ-Strukturen im Gefrierbruch nachweisbar waren. Zudem nahmen die intakten Areale eine wesentlich größere Fläche des Monolayers ein, als die pro cm<sup>2</sup> abgeschätzten 300 *leaky regions*. Daher ist davon auszugehen, dass die mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie identifizierten Stränge infizierter Zellschichten intakte Regionen repräsentieren. Die Analyse morphometrischer Parameter ergab keine Abweichungen von den Kontrollen. Somit ist dieser Befund in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Conductance-Scanning-Analyse zu sehen, die für intakte Regionen keine Unterschiede in der Ionenleitfähigkeit zwischen Kontrollen und *Y. enterocolitica*-infizierten Monolayern zeigte.

#### 4.1.3 Nekrose- und Apoptoseinduktion

Eine weitere Komponente des Barrieredefekts stellte das Auftreten epithelialer Nekrosen dar. Es ist allgemein bekannt, dass der Verlust von Enterozyten zur Durchlässigkeit intestinaler Epithelien beiträgt. So wurde insbesondere für epitheliale Apoptosen gezeigt, dass diese zur Permeabilität des Epithels beitragen können (Gitter *et al.*, 2000; Bojarski *et al.*, 2001; Epple *et al.*, 2009). Die Zytotoxizität von *Y. enterocolitica* wurde bereits in verschiedenen Zelltypen erforscht. Das Virulenzplasmid kodierte Protein YopP ist verantwortlich für eine Apoptoseinduktion in Makrophagen (Mills *et al.*, 1997) und verursacht ferner Caspase-abhängig Apoptose und Caspase-unabhängig nekrotischen Zelltod in dendritischen Zellen (Erfurth *et al.*, 2004; Grobner *et al.*, 2006). In Hep2-Zellen wird Apoptose durch Invasin ausgelöst (Superti *et al.*, 2005).

In epithelialen HT-29/B6-Zellschichten löst *Y. enterocolitica* keine Apoptose aus. Weder in der Conductance-Scanning-Analyse noch in der TUNEL-Färbung konnte ein vermehrtes Auftreten apoptotischer Zellen 48 h p.i. nachgewiesen werden. In diesem Barrieremodell bewirkte *Y. enterocolitica* ein nekrotisches Absterben von Zellen, was durch eine erhöhte LDH-Konzentration im Zellüberstand nachgewiesen wurde. Dieses konnte nur unter dem Einfluss vitaler Bakterien beobachtet werden. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die Zytotoxizität unabhängig von Yop-Proteinen oder Invasin vermittelt wird, da die Mutantenstämme WA-C, WA-P inv<sup>-</sup> oder WA-C inv<sup>-</sup> ebenfalls Nekrosen induzierten.

Obwohl der nekrotische Zellverlust mutmaßlich zum Barrieredefekt beiträgt, konnte keine Korrelation von LDH-Freisetzung und Widerstandsabfall 48 h nach Infektion nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass nekrotische Löcher zeitnah durch die umgebenden Nachbarzellen wieder geschlossen werden. Darüber hinaus könnte das lokale Auftreten von Nekrosen auch als Induktor der beobachteten TJ-Defekte fungieren. Ein solches Phänomen ist für eine durch Apoptoseinduktion induzierte proteolytische Spaltung von TJ-Proteinen bekannt (Bojarski *et al.*, 2004).

#### 4.1.4 Interaktionsmechanismen und Regulation

Interessanterweise wurde die Barrierefunktion des HT-29/B6-Monolayers nur durch vitale *Y. enterocolitica* beeinträchtigt, nicht aber durch Kulturüberstände. Andere Erreger, wie zum Beispiel *V. cholerae* (Fasano *et al.*, 1991) oder *C. perfringens* (Sonoda *et al.*, 1999) sezernieren Toxine, die eine Barriestörung hervorrufen. Ein weiteres Beispiel für die Barriemodulation durch sezernierte Faktoren, sind ein von *E. coli* O4 freigesetztes Hämolyisin (Troeger *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit präparierten *Y. enterocolitica* Kulturüberstände oder Lysate konnten keine Barriestörung im HT-29/B6-Modell hervorrufen, so dass sezernierte Toxine oder LPS hier wohl nicht ursächlich sind.

Nach wie vor wird die Rolle des *Yersinia heat stable* Enterotoxins (Yst-A), das vornehmlich bei Temperaturen unter 30 °C produziert wird, kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu der von Saha und Kollegen (Saha *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2009) publizierten Calcium-Mobilisierung durch Yst-A, konnte in dieser Arbeit durch *Y. enterocolitica*-Kultur keine calciumabhängige Antwort in HT-29/B6-Zellen angeregt werden. Des Weiteren spricht die Tatsache, dass auch bei 37 °C kultivierte *Y. enterocolitica* einen Widerstandsabfall auslösen konnten, gegen einen Beitrag des Enterotoxins. Insofern kommen auch andere temperaturabhängig exprimierte Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel Ail als Auslöser der Barriestörung nicht in Betracht. Auch die Motilität, das heißt die Flagellierung des Bakteriums spielt demnach keine Rolle. Nach 48-stündiger Inkubation des Infektionsansatzes bei 27 °C trat kein Barriere-defekt auf, dieses beruhte jedoch auf einem zellspezifischen Phänomen. Vermutlich konnte unter diesen unphysiologischen Bedingungen keine Zellantwort erfolgen.

Ferner zeigte sich durch den Einsatz der *Y. enterocolitica*-Mutantenstämme WA-C, WA-P inv<sup>-</sup>, WA-C inv<sup>-</sup>, dass die Barriestörung unabhängig von der Expression des Virulenzplasmids pYV und der Invasin-medierten Internalisierung des Erregers vermittelt wurde. Dieses unterscheidet sich von dem für den nah verwandten Erreger *Yersinia pseudotuberculosis* beschriebenen Mechanismus. Für diesen konnte eine Interaktion des plasmidkodierten Effektorproteins YopE mit F-Actin gezeigt werden, in dessen Folge eine Umorganisation der Actin-Filamente auftrat, die wiederum in einer Störung der TJ-Struktur und -Funktion resultierte (Tafazoli *et al.*, 2000). *Y. enterocolitica* ist allerdings wesentlich öfter mit dem Auftreten

von Diarrhöen assoziiert als die verwandte Spezies *Y. pseudotuberculosis*. Daher liegt es nahe, dass beide Arten sich in ihren Virulenzeigenschaften und ihrer Wirkung auf die epitheliale Barriere unterscheiden. Wie sich im Gentamycin-Protektionsassay bestätigte ist Invasin für die Internalisierung von *Y. enterocolitica* in HT-29/B6-Zellen obligatorisch. Da die Invasindefiziente Mutante intrazellulär nicht nachweisbar war, ist eine Aufnahme über alternative Wege, wie zum Beispiel über endozytotische Prozesse ausgeschlossen. Intrazelluläre Bakterien oder auch der Invasionsvorgang selbst sind allerdings für die Induktion der Barrierestörung nicht relevant.

Die Art der Interaktion zwischen Bakterium und epitheliale Zellschicht bleibt somit spekulativ. Da die Vitalität des Erregers essentiell für die Induktion der Barrierestörung war, muss eine aktive Interaktion vermutet werden. Denkbar wäre ein rezeptorvermittelter Kontakt, wie er zum Beispiel vom *Clostridium perfringens* Enterotoxin, dem Claudin-3 und -4 als Rezeptoren dienen, bekannt ist (Sonoda *et al.*, 1999). Insbesondere das inkonsistente Auftreten der *leaky regions* deutet auf eine lokale Einwirkung der Bakterien hin. Dieses könnte durch eine spezifische Rezeptorexposition einzelner spezialisierter Zellen innerhalb des epithelialen Verbands oder durch eine ungleichmäßige Verteilung der vermeintlich protektiven Mukusschicht auf der apikalen Zelloberfläche bestimmt werden.

Die Aktivierung eukaryotischer Signalkaskaden durch *Y. enterocolitica* wurde bisher nur unter dem Aspekt der Induktion proinflammatorischer Wirtszellantworten oder der Umgehung wirtsspezifischer Abwehrmechanismen studiert. Zum Beispiel aktiviert *Yersinia*-Invasin die MAP-Kinase p38 und JNK in Epithelzellen, worüber zusammen mit MEK1, eine transkriptionelle Aktivierung des Interleukin-8-Gens erfolgt (Grassl *et al.*, 2003). YopP induziert wiederum Zelltod durch die Inhibition von MAP-Kinasen in dendritischen Zellen, nicht aber in Makrophagen (Adkins *et al.*, 2008). In der vorliegenden Studie resultierte eine durch *Y. enterocolitica* vermittelte Aktivierung der JNK in einer Verminderung der Claudin-8-Expression. Dieses war unabhängig von Yops oder Invasin. Die plasmidlose Mutante WA-C bewirkte ebenfalls eine Reduktion von Claudin-8. Invasin-defiziente Mutanten verursachten sogar einen stärker ausgeprägten Widerstandsabfall im HT-29/B6-Modell als der Wildtyp.

Insbesondere ermöglichte die Identifikation der JNK, als eine regulatorische Komponente der *Y. enterocolitica*-induzierten Barrierestörung, eine Quantifizierung der Rolle von Claudin-8 im Rahmen des Multieffekts. Die durch Hemmung der JNK bewirkte Wiederherstellung der Claudin-8-Expressionslevel ging mit einer knapp 10%igen Abschwächung des durch *Y. enterocolitica* verursachten Widerstandsabfalls einher, wobei der in *leaky regions* beobachtete Claudin-8-Umverteilungsprozess nicht aufgehoben wurde. Letzteres könnte eine Erklärung für den eher mäßigen R<sup>1</sup>-Effekt der JNK-Inhibition sein. Somit stellt die Verminderung der Proteinexpression neben der Distribution von Claudinen nur einen Teilaspekt des Barrieredefekts dar. Wie es genau zu der Delokalisierung von TJ-Proteinen kommt und über welche

Signalkaskaden *Y. enterocolitica* die Expression von ZO-1 bzw. weiterer Claudine beeinflusst, bleibt offen. Die Modulation der TJ-Proteinexpression über verschiedene Signalkaskaden wurde jüngst in unterschiedlichen Zelllinien und unter diversen Bedingungen dokumentiert (Carrozzino *et al.*, 2009; Mankertz *et al.*, 2009; Naydenov *et al.*, 2009). Eine Inhibition der in dieser Arbeit untersuchten Signalkaskaden, ausgenommenen von JNK und IP3, hatte keinen Einfluss auf die Effekte der *Y. enterocolitica*-Infektion. Es ist nicht auszuschließen, dass die Inhibition einer Signalkaskade durch die Aktivität einer anderen kompensiert werden kann. Eine Kombination mehrere Inhibitoren erwies sich jedoch als problematisch, da die meisten der getesteten Inhibitoren unter den serumreduzierten Bedingungen über den relativ langen Zeitraum von zwei Tagen selbst eine Verminderung des transepithelialen Widerstand verursachten. Eine Verstärkung des *Y. enterocolitica*-induzierten Widerstandsabfalls wurde durch Inhibition der IP3-Kinase beobachtet. Inwiefern die Expression von TJ-Proteinen durch eine erregervermittelte Hemmung spezifischer Signalkaskaden in HT-29/B6 reguliert wird, konnte mit dem hier gewählten inhibitorischen Versuchsansatz allerdings nicht eruiert werden.

#### 4.1.5 *Y. enterocolitica*-spezifische Mechanismen der Barrierestörung

Die von Gogarten *et al.* bereits 1994 durchgeführte Studie an Mäusen ergab erste Hinweise auf einen zugrunde liegenden Leckflux-Mechanismus der *Y. enterocolitica*-Diarrhö (Gogarten *et al.*, 1994). Diese These wird von den Befunden der in der vorliegenden Arbeit am HT-29/B6-Zellkulturmodell durchgeführten Untersuchungen gestützt. Andere bekannte Diarrhö-Mechanismen, wie zum Beispiel Malabsorption oder aktive Ionensekretion konnten weder im Mausexperiment (Gogarten *et al.*, 1994) noch im HT-29/B6-Modell nachgewiesen werden. Dieses könnte ein Grund dafür sein, dass *Y. enterocolitica* in der Klinik nicht ganz so oft als primärer Induktor von Diarrhöen, sondern eher als ursächlich für extraintestinale Manifestationen erkannt wird.

In den letzten Jahren hat in der Wissenschaft eine neue Betrachtungsweise von Infektionen und entzündlichen Prozessen Einzug erhalten, die selbstlimitierende Darmerkrankungen als *trigger* für Komplikationen, wie zum Beispiel chronische entzündliche Darmerkrankungen anerkennt (Sartor, 2008). Für *Y. enterocolitica* selbst wurde dieses bereits in einer 2005 veröffentlichten Studie untersucht (Saebo *et al.*, 2005). Auch im Zusammenhang mit dem sogenannten Reizdarmsyndrom wird der Durchtritt bakterielle Antigene über die intestinale Barriere zunehmend diskutiert (Maes *et al.*, 2007; Maes *et al.*, 2008; Terjung & Spengler, 2009). Da die genaue Entstehung noch nicht hinreichend verstanden ist, sind diese gravierenden Darmerkrankungen bisher nur schwer kausal therapierbar. Effektive therapeutische Interventionen bzw. Präventionsmaßnahmen (z.B. die Verabreichung von Immunsuppressiva nach einer Infektion oder antibiotische Langzeittherapien) sind nur durch ein detailliertes Ver-



ständnis der zugrundeliegenden Prozesse erreichbar. In diesem Zusammenhang kann die Aufklärung der molekularen Vorgänge und Mechanismen der *Yersinia*-vermittelten Barriere-störung potentiell zur Entschlüsselung pathologischer Barriere-defekte beitragen und den derzeitigen Wissensstand auf diesem Gebiet vorantreiben.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen relevante Mechanismen der durch *Y. enterocolitica* induzierten Barriestörung auf. Der Erreger nutzt zwei verschiedene Pathomechanismen, die jedoch unabhängig von typischen *Y. enterocolitica* Virulenzfaktoren wie Invasin, Enterotoxin oder Yops vermittelt werden. Einerseits induziert *Y. enterocolitica* *leaky regions*, die durch eine lokale Störung der TJ-Integrität gekennzeichnet sind und andererseits Nekrosen, die ebenfalls zum Barriere-defekt beitragen können. Als Konsequenz kann im Gesamtorganismus eine Leckflux-Diarrhö auftreten und die Translokation luminaler Antigene begünstigt werden.

## 4.2 Stärkung der TJ-medierten Barriere durch *E. coli* Nissle

Der *E. coli* Nissle Stamm 1917 (EcN) wird seit über 90 Jahren als probiotischer Mikroorganismus unter dem Namen Mutaflor<sup>®</sup> therapeutisch eingesetzt. Seine Wirksamkeit wurde in zahlreichen klinischen Studien mehrfach bestätigt (Rembacken *et al.*, 1999; Kruis *et al.*, 2004). Durch eine intensive Beforschung des Probiotikums selbst konnten bereits verschiedene Wirkmechanismen und die ihnen zugrunde liegenden molekularen Ursachen aufgezeigt werden. So ist neben einer antagonistischen Wirkung auf enteropathogene Erreger (Altenhoefer *et al.*, 2004) und immunmodulatorischen Fähigkeiten (Wehkamp *et al.*, 2004; Schlee *et al.*, 2007) auch eine Stärkung des epithelialen Zellverbands durch EcN beschrieben. Allerdings konnte dieses bislang nur auf eine in verschiedenen Modellen beobachtete Regulation von Zonula Occludens-Proteinen zurückgeführt werden (Cichon *et al.*, 2004; Ukena *et al.*, 2007; Zyrek *et al.*, 2007). Ein direkter Einfluss von EcN auf barriere-relevante TJ-Komponenten, wie Claudine oder Tricellulin war bisher nicht erforscht und wurde daher im zweiten Teil dieser Arbeit näher beleuchtet.

### 4.2.1 Wirkung von *E. coli* Nissle und aktivem Kulturüberstand auf den transepithelialen Widerstand im HT-29/B6-Zellkulturmodell

Für die Analyse einer durch EcN induzierten TJ-medierten Stärkung der epithelialen Barrierefunktion wurde das HT-29/B6-Zellkulturmodell eingesetzt. Im Vergleich zu anderen Arbeiten handelte es sich hierbei um ein unstimuliertes Modell, in dem vorab keine pathologischen Zustände induziert wurden.

Die Behandlung dichter, intakter Monolayer mit vitalem EcN oder aktivem aus Kulturüberständen präparierten *E. coli* Nisslekonzentrat (EcNK) resultierte in einem Widerstands-

stieg. Das Ausmaß dieses Effekts war allerdings unabhängig von den in dieser Arbeit getesteten Infektionsdosen. Bereits durch Einsatz der kleinsten Infektionsmenge von  $1 \cdot 10^6$  Bakterien konnte die maximale Wirkung erreicht werden, so dass eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit vermutlich erst beim Einsatz noch kleinerer Bakterienzahlen augenscheinlich geworden wäre.

Interessanterweise wurde der beobachtete Barriereeffekt durch ein von EcN in den Kulturüberstand sezerniertes Signalmolekül vermittelt. Lösliche oder strukturgebundene Signalmoleküle stellen eine typische Kommunikations- und/oder Interaktionsform von Darmbakterien im Gastrointestinaltrakt dar. So hat das *E. coli* Nissle-Flagellinmolekül einen Induktionseffekt auf die Synthese von humanem  $\beta$ -Defensin-2 in Darmepithelzellen (Wehkamp *et al.*, 2004; Schlee *et al.*, 2007). Für den im HT-29/B6-Modell beobachteten Widerstandsanstieg ist der Flagellenbaustein jedoch nicht relevant, wie durch Einsatz der  $\Delta$ fliA-Mutante bestätigt werden konnte. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bereits bekannt, dass die Barrierewirksamkeit des EcNK von einem Protein vermittelt wird. Durch Proteinase K-Behandlung des EcNK konnte der Effekt auf den transepithelialen Widerstand weitgehend aufgehoben werden (nicht publizierte Daten von Dr. Jan F. Richter, Institut für Klinische Physiologie). Dieser Befund spricht gegen eine Involvierung von Polysaccharidkapsel oder LPS. Möglicherweise kommt den eingangs angesprochenen Fimbrien oder den Mikrozininen hier eine funktionelle Bedeutung zu.

Auch der durch EcN vermittelte Anti-Invasionseffekt wird durch diffusible, bisher nicht näher identifizierte Signalmoleküle vermittelt. Diese wirken direkt auf die Darmepithelzellen ein und verbessern deren Funktion als Infektionsbarriere gegen enteroinvasive Keime deutlich (Oelschlaeger *et al.*, 2001; Altenhoefer *et al.*, 2004). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zur barrierestärkenden Wirkung des EcN.

Durch welche EcN-eigenen Signalsubstanzen die epitheliale Barrierefunktion tatsächlich verbessert wird, bleibt jedoch zunächst noch ungeklärt und ist Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeit.

#### 4.2.2 Einfluss von EcNK auf TJ-Proteine

Aus der weiteren Charakterisierung des Barriereeffekts ergaben sich zwei Aspekte, die auf eine Involvierung der TJ hindeuteten. Zum einen wurde eine Abdichtung gegenüber Mannitol nachgewiesen, das auf Grund seiner Größe das Darmepithel typischerweise parazellulär passiert (Watson *et al.*, 2001). Zum anderen konnte in Zwei-Wege-Impedanzmessungen eine ausgeprägte Zunahme des parazellulären Widerstands registriert werden. Transzelluläre Effekte waren vergleichsweise weniger stark ausgeprägt. Eine mögliche Beeinflussung von aktiven Kanälen oder Transportern in der Membran durch EcN ist vermutlich eher ge-

ring, zumal die Messung von Kurzschlussströmen keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle offenbarte.

Anhand verschiedener, vorwiegend pathologischer Modelle konnte in den letzten Jahren bereits mehrfach ein regulatorischer Einfluss von EcN auf Ankerproteine wie ZO-1 oder -2 beobachtet werden (Cichon *et al.*, 2004; Ukena *et al.*, 2007; Zyrek *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit am HT-29/B6-Monolayer durchgeführten Western Blot-Analysen ließen hingegen keine verstärkte Expression von ZO-1 nach Stimulation mit EcN (nicht gezeigt) oder EcNK erkennen. Dieses kann art- und/oder modellspezifisch begründet sein. So ist durchaus denkbar, dass EcN unter pathologischen oder keimfreien Bedingungen im Darm anders wirkt als im unstimulierten HT-29/B6-Zellkulturmodell.

Darüber hinaus scheint die häufig mit einer Hochregulation von Zonula-Occludens-Proteinen assoziierte Barriereabdichtung eher fraglich. Eine tatsächlich barrierebildende Funktion der ZO-Proteine-1 und -2 ist bisher nicht erwiesen. Die Deletion von ZO-1 in einer epithelialen Mauszelllinie hatte keine Auswirkung auf die Ausbildung eines intakten, polarisierten Monolayers. Einzig die Rekrutierung von TJ-Proteinen und der Einbau in die TJ waren in diesen Klonen verlangsamt (Umeda *et al.*, 2004). Somit kann eine verstärkte Expression von ZO-Proteinen zwar zu einer Stabilisierung der TJ und einer Verbesserung der Zellmorphologie in einem geschädigten Epithel beitragen, jedoch eher keine Zunahme des transepithelialen Widerstands über einer epithelialen Barriere bewirken. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass EcN bzw. EcNK die Expression von ZO-1 im intakten HT-29/B6-Zellmodell nicht beeinflusste und der Widerstandsanstieg vielmehr mit der Regulation eines barrierelevanten Proteins wie Claudin-14 verknüpft war.

In der vorliegenden Studie konnte eine deutliche Zunahme der Claudin-14-Proteinlevel um knapp 70% nach 24-stündiger Inkubation mit EcNK verzeichnet werden. Die unter EcNK nach dreistündiger Inkubation gesteigerten mRNA-Level lassen auf eine Regulation der Genexpression schließen. Die für Claudin-14 in Kombination mit dem TJ-Marker ZO-1 durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen erlaubte zwar keine quantitative Beurteilung der Proteinsignale, bestätigten jedoch eine eindeutige Lokalisierung von Claudin-14 in der TJ. Da durch hitzeinaktiviertes EcNK weder ein Widerstandseffekt noch eine Zunahme des Claudin-14-Proteinniveaus induziert werden konnte, ist hier von einer Korrelation auszugehen.

Inwiefern Claudin-14 auch im Mausmodell eine Rolle spielt ist ungewiss, da dieses TJ-Protein im murinen Darm nicht nachgewiesen wurde (Fujita *et al.*, 2006). Eventuell beeinflusst EcN hier die Expression anderer barrierebildender Claudine, wie zum Beispiel Claudin-1, -4, -5 oder -8.

#### 4.2.3 Claudin-14-vermittelte Abdichtung der parazellulären Barriere

Die tatsächliche Funktion von Claudin-14 im Darm ist bisher noch weitestgehend unbekannt. Erstmals wurde dieses Claudin 2001 in Zusammenhang mit Taubheit beschrieben. So ist eine Deletion von Claudin-14 im Innenohr mit Gehörlosigkeit beim Menschen assoziiert (Wilcox *et al.*, 2001; Wattenhofer *et al.*, 2005). Hinweise für eine funktionelle Barriererelevanz ergaben sich durch Expression von Claudin-14 in einer lecken caninen Nierenkarzinomzelllinie (MDCK II), was in einer ca. sechsfachen Steigerung des transepithelialen Widerstands resultierte (Ben-Yosef *et al.*, 2003). Auf eine abdichtende Funktion von Claudin-14 deuten auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten siRNA-Transfektionsstudien hin. Eine verminderte Expression von Claudin-14 ging im HT-29/B6-Modell mit einem deutlich geringeren Widerstandsniveau einher. Die als Kontrolle mit einer unspezifischen siRNA transfizierten Zellen bildeten vergleichsweise erheblich höhere Widerstände aus.

Im Gegensatz zu dieser Übereinstimmung konnte die für Claudin-14 im caninen Nierenzellmodell publizierte selektive Abdichtung gegenüber Kationen im humanen Darmzellmodell nicht beobachtet werden (Ben-Yosef *et al.*, 2003). Eine Stimulation der Claudin-14 Expression in HT-29/B6 durch EcNK hatte eine Abdichtung gegenüber Natrium- und Chloridionen in gleichem Ausmaß zur Folge. Vermutlich beruht diese funktionelle Abweichung auf zellmodellspezifischen Unterschieden. Im Gegensatz zu HT-29/B6 ist eine ausgeprägte Expression von Claudin-2, das als selektiver Kanal für Kationen fungiert (Amasheh *et al.*, 2002), für die lecke MDCK II-Zelllinie typisch.

#### 4.2.4 TJ-Modulation als EcN-spezifischer Wirkmechanismus

Nach bisherigen Erkenntnissen übt EcN mehrere Effekte auf die epitheliale Darmbarriere aus. So besteht seine probiotische Wirkung unter anderem in einer Stärkung des Zusammenhalts des epithelialen Zellverbands. Diesbezüglich konnte in der vorliegenden Studie an Hand des HT-29/B6-Zellkulturmodells ein weiterer Wirkmechanismus des EcN aufgezeigt werden. Die durch EcN-spezifische Signalmoleküle induzierte Hochregulation von Claudin-14 und die damit verbundene parazelluläre Abdichtung bestätigen die mutmaßliche Einflussnahme des Probiotikums auf die TJ-vermittelte Barrierefunktion. Da durch Abdichtung der epithelialen Barriere sowohl Elektrolyt- und Wasserverlust eingedämmt als auch die Durchlässigkeit für antigenes Material aus dem Lumen des Gastrointestinaltraktes reduziert werden, kommt diesem Befund funktionelle Relevanz zu und erklärt eventuell einen Teil der klinisch beobachteten Wirkung bei Colitis ulcerosa. Inwiefern EcN die Claudin-Expression auch in pathologischen Modellen modulieren kann und welche Rolle Claudin-14 hierbei spielt, muss in weiteren Studien überprüft werden. Je besser die Wirkmechanismen des EcN charakterisiert und verstanden sind, desto sicherer und gezielter kann dieses Probiotikum zukünftig therapeutisch eingesetzt werden.

## 5 Zusammenfassung

*Yersinia enterocolitica* ist ein häufiger Durchfallerreger. Um die der Diarrhö und Barrierestörung zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären, wurden die erregerspezifischen Pathomechanismen in einem humanen Kolonkarzinom-Zellkulturmodell detailliert analysiert. Die Infektion der als epithelialer Monolayer wachsenden humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 führte zu einer ausgeprägten Reduktion des transepithelialen Widerstands ( $R^t$ , TER) und einer Zunahme der Permeabilität für Mannitol (182 Da) und Fluorescein (332 Da). Der als Kurzschlussstrom gemessene aktive Ionenstrom war unverändert. Die Veränderungen erfolgten zeit- und dosisabhängig und konnte nur durch den lebenden Erreger selbst, nicht aber durch bakterielle Kulturüberstände induziert werden. Typische *Yersinia*-Virulenzfaktoren, wie Invasin oder die Expression des *Yersinia*-Virulenzplasmids pYV waren nicht ursächlich.

*Y. enterocolitica* induzierte in HT-29/B6-Zellen Nekrosen, was durch eine gesteigerte LDH-Freisetzung nachgewiesen wurde. Apoptosen traten nicht vermehrt auf. Mit Hilfe der Conductance-Scanning-Technik konnten in infizierten Monolayern lokale Leitfähigkeitsänderungen detektiert sowie durch Biotinylierung und anschließende Laserscanning-Mikroskopie visualisiert werden. Innerhalb dieser als *leaky regions* definierten Bereiche waren die barrierebildenden Claudine 3, 4 und 8 aus der Tight Junction in das Zytoplasma umverteilt. Zusätzlich zeigten Western Blot-Analysen eine verminderte Expression von Claudin-2, -3, -8, -10 und ZO-1. Darüber hinaus konnte eine Regulation der Claudin-8-Expression über die terminale c-Jun-Kinase nachgewiesen werden. Die Inhibition der Kinase bewirkte eine Abschwächung des durch *Y. enterocolitica* verursachten  $R^t$ -Abfalls sowie eine vollständige Wiederherstellung der Proteinexpression von Claudin-8. Somit wird die von *Y. enterocolitica* induzierte Barrierestörung durch lokale Tight Junction-Defekte und Nekroseinduktion hervorgerufen. Im Gesamtorganismus würden diese Mechanismen einerseits zu einem gesteigerten Übertritt von Antigenen aus dem Lumen in die Blutbahn führen und andererseits einen vermehrten Übertritt von Soluten und Wasser vom Blut ins Lumen verursachen, der zu einer Leckflux-Diarrhö führen kann.

Der *Escherichia coli*-Stamm Nissle 1917 (EcN) kommt seit Jahren als Probiotikum bei der Behandlung von Diarrhöen und inflammatorischen Darmerkrankungen zum Einsatz. Um seine die Barriere stärkenden Mechanismen aufzuklären, wurde in dieser Arbeit der Einfluss des hochwirksamen EcN-Kulturüberstands auf die Tight Junction-medierte Barrierefunktion *in vitro* am HT-29/B6-Zellkulturmodell untersucht. Aus EcN-Kulturen präparierte Überstände (EcNK) verursachten eine Verdopplung des  $R^t$  und eine Verminderung der Permeabilitäten für Mannitol und NaCl und somit eine Abdichtung der epithelialen Barriere. Das bekanntermaßen immunstimulatorisch wirkende EcN-Flagellin war hierfür nicht verantwortlich. Mes-

sungen mittels Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie offenbarten insbesondere eine Zunahme des parazellulären Widerstands. Die für verschiedene Tight Junction-Proteine (Occludin, Tricellulin und Claudine sowie das TJ-assoziierte Protein ZO-1) durchgeführten Expressionsanalysen zeigten ausschließlich eine Zunahme der Protein- und mRNA-Level von Claudin-14 durch EcNK. Mittels Hitzeinaktivierung des EcNK konnten die Effekte auf  $R^t$  und Claudin-14-Expression aufgehoben werden. Die barriererelevante Funktion des bisher kaum charakterisierten Claudin-14-Proteins bestätigte sich abschließend im siRNA-Transfektionsansatz. Somit ist die im HT-29/B6-Modell durch EcNK induzierte Barriereprotektion auf eine Hochregulation von Claudin-14 zurückzuführen.

## 6 Summary

*Yersinia enterocolitica* is a common cause of acute gastroenteritis. In order to clarify the mechanisms leading to diarrhea and barrier dysfunction the pathomechanisms of this infection were studied in detail. Exposure of human colonic HT-29/B6 cells to *Y. enterocolitica* resulted in a decrease in transepithelial resistance ( $R^t$ , TER) with a parallel increase in mannitol (182 Da) and fluorescein (332 Da) permeability. Active ion transport measured as short circuit current was unchanged. The *Y. enterocolitica* induced changes were time-dependent, required the presence of living bacteria, could not be triggered by bacterial supernatants, and were not due to *Yersinia* invasin or expression from the virulence plasmid pYV.

Concomitantly, *Y. enterocolitica* induced necrosis as indicated by an increase in LDH-release, while epithelial apoptosis was not upregulated. Local changes in conductivity were detected by conductance scanning, indicating *leaky regions* within the epithelium which were visualized by biotinylation and confocal laser scanning microscopy. In these regions, sealing claudin-3, -4 and -8 were redistributed off the tight junction into the cytoplasm. In addition, the expression of claudin-2, -3, -8, -10 and ZO-1 was diminished as quantified by immunoblotting. Moreover, claudin-8 protein expression was found to be regulated via the c-Jun N-terminal kinase, the inhibition of which partially prevented the *Y. enterocolitica* induced decrease in  $R^t$  and restored claudin-8 protein level. In conclusion, barrier dysfunction in *Y. enterocolitica* infection is due to circumscribed epithelial tight junction protein changes and necrotic cell loss. As a consequence leak flux diarrhea and antigen-uptake may be triggered in human infection.

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is a probiotic bacterium used for the treatment of inflammatory bowel disorders. To study its barrier strengthening mechanisms the *in vitro* effect of highly active EcN supernatant (EcNK) on tight junction mediated barrier function was assessed here using the HT-29/B6 cell culture model. EcNK dissected from bacterial culture, improved barrier function measured by a two-fold increase in  $R^t$  and a reduction of permeability for mannitol and NaCl. This was not due to flagellin. Measurements by two-path-impedance spectroscopy revealed a strong effect on paracellular resistance. When changes of tight junction proteins as claudins, occludin, tricellulin as well as the scaffold protein ZO-1 were examined, claudin-14 was the only one found to be affected by EcNK. Claudin-14 was elevated on protein- and mRNA-level. Heat treatment of active EcNK abolished the increase in  $R^t$  and the upregulation of claudin-14 protein level. By silencing claudin-14 in a siRNA-transfection assay, the sealing function of this so far less well characterized tight junction protein was confirmed. In conclusion, EcNK improves barrier function in HT-29/B6 by upregulating claudin-14.

## 7 Literatur

- Abrahamse, S. L. and Rechkemmer, G.** (2001). "Identification of an organic anion transport system in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A." *Pflugers Arch* **441**(4): 529-537.
- Adkins, I., Koberle, M., Grobner, S., Autenrieth, S. E., Bohn, E., Borgmann, S. and Autenrieth, I. B.** (2008). "Y. enterocolitica inhibits antigen degradation in dendritic cells." *Microbes Infect* **10**(7): 798-806.
- Aepfelbacher, M., Trasak, C. and Ruckdeschel, K.** (2007). "Effector functions of pathogenic Yersinia species." *Thromb Haemost* **98**(3): 521-529.
- Aleksic, S. and Bockemuhl, J.** (1990). "[Microbiology and epidemiology of Yersinia infections]." *Immun Infekt* **18**(6): 178-185.
- Alrutz, M. A. and Isberg, R. R.** (1998). "Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13658-13663.
- Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J. and Oelschlaeger, T. A.** (2004). "The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens." *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**(3): 223-229.
- Amasheh, M., Schlichter, S., Amasheh, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2008). "Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells." *J Nutr* **138**(6): 1067-1073.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2002). "Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells." *J Cell Sci* **115**(Pt 24): 4969-4976.
- Amasheh, S., Milatz, S., Krug, S. M., Bergs, M., Amasheh, M., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2009). "Na<sup>+</sup> absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation." *Biochem Biophys Res Commun* **378**(1): 45-50.
- Amasheh, S., Schmidt, T., Mahn, M., Florian, P., Mankertz, J., Tavalali, S., Gitter, A. H., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2005). "Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells." *Cell Tissue Res* **321**(1): 89-96.
- Angelow, S., Schneeberger, E. E. and Yu, A. S.** (2007). "Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2." *J Membr Biol* **215**(2-3): 147-159.
- Autenrieth, I. B. and Firsching, R.** (1996). "Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study." *J Med Microbiol* **44**(4): 285-294.
- Autenrieth, I. B., Kempf, V., Sprinz, T., Preger, S. and Schnell, A.** (1996). "Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against Yersinia enterocolitica involve integrins and cytokines." *Infect Immun* **64**(4): 1357-1368.
- Ben-Yosef, T., Belyantseva, I. A., Saunders, T. L., Hughes, E. D., Kawamoto, K., Van Itallie, C. M., Beyer, L. A., Halsey, K., Gardner, D. J., Wilcox, E. R., Rasmussen, J., Anderson, J. M., Dolan, D. F., Forge, A., Raphael, Y., Camper, S. A. and Friedman, T. B.**



(2003). "Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration." *Hum Mol Genet* **12**(16): 2049-2061.

**Bentzel, C. J., Hainau, B., Ho, S., Hui, S. W., Edelman, A., Anagnostopoulos, T. and Benedetti, E. L.** (1980). "Cytoplasmic regulation of tight-junction permeability: effect of plant cytokinins." *Am J Physiol* **239**(3): C75-89.

**Berkes, J., Viswanathan, V. K., Savkovic, S. D. and Hecht, G.** (2003). "Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation." *Gut* **52**(3): 439-451.

**Bliska, J. B. and Falkow, S.** (1992). "Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3561-3565.

**Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K. and Hacker, J.** (2000). "Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and evolution of virulence." *Adv Exp Med Biol* **485**: 25-32.

**Bojarski, C., Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Mankertz, J., Schmitz, H., Wagner, S., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2001). "Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis." *J Physiol* **535**(Pt 2): 541-552.

**Bojarski, C., Weiske, J., Schoneberg, T., Schroder, W., Mankertz, J., Schulzke, J. D., Florian, P., Fromm, M., Tauber, R. and Huber, O.** (2004). "The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells." *J Cell Sci* **117**(Pt 10): 2097-2107.

**Bottone, E. J.** (1997). "*Yersinia enterocolitica*: the charisma continues." *Clin Microbiol Rev* **10**(2): 257-276.

**Broekaert, I. J. and Walker, W. A.** (2006). "Probiotics and chronic disease." *J Clin Gastroenterol* **40**(3): 270-274.

**Bucker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2009). "Arcobacter butzleri Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells." *J Infect Dis*.

**Cambronne, E. D., Cheng, L. W. and Schneewind, O.** (2000). "LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia* yop virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism." *Mol Microbiol* **37**(2): 263-273.

**Carrozzino, F., Pugnale, P., Feraille, E. and Montesano, R.** (2009). "Inhibition of basal p38 or JNK activity enhances epithelial barrier function through differential modulation of claudin expression." *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3): C775-787.

**Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.

**Cichon, C., Enders, E., Sonnenborn, U. and Schmidt, M. A.** (2004). "DNA-microarray-based comparison of cellular responses in polarized T84 epithelial cells triggered by probiotics: *E. coli* Nissle and *Lactobacillus acidophilus* PZ1041." *Gastroenterology* **126**(4): A579.

**Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M.** (2003). "Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture." *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(6): C1346-1354.

- Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C. and Anderson, J. M.** (2002). "Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1): C142-147.
- Cover, T. L. and Aber, R. C.** (1989). "Yersinia enterocolitica." *N Engl J Med* **321**(1): 16-24.
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B. and Rampal, P.** (2000). "Saccharomyces boulardii preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic Escherichia coli-infected T84 cells." *Infect Immun* **68**(10): 5998-6004.
- D'Souza, T., Agarwal, R. and Morin, P. J.** (2005). "Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells." *J Biol Chem* **280**(28): 26233-26240.
- de Koning, J., Heesemann, J., Hoogkamp-Korstanje, J. A., Festen, J. J., Houtman, P. M. and van Oijen, P. L.** (1989). "Yersinia in intestinal biopsy specimens from patients with seronegative spondyloarthritis: correlation with specific serum IgA antibodies." *J Infect Dis* **159**(1): 109-112.
- Di Virgilio, F., Steinberg, T. H. and Silverstein, S. C.** (1989). "Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> with fura-2." *Methods Cell Biol* **31**: 453-462.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D.** (2004). "Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?" *J Cell Sci* **117**(Pt 1): 19-29.
- El Tahir, Y. and Skurnik, M.** (2001). "YadA, the multifaceted Yersinia adhesin." *Int J Med Microbiol* **291**(3): 209-218.
- Epple, H. J., Mankertz, J., Ignatius, R., Liesenfeld, O., Fromm, M., Zeitz, M., Chakraborty, T. and Schulzke, J. D.** (2004). "Aeromonas hydrophila beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6)." *Infect Immun* **72**(8): 4848-4858.
- Epple, H. J., Schneider, T., Troeger, H., Kunkel, D., Allers, K., Moos, V., Amasheh, M., Lodenkemper, C., Fromm, M., Zeitz, M. and Schulzke, J. D.** (2009). "Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients." *Gut* **58**(2): 220-227.
- Erfurth, S. E., Grobner, S., Kramer, U., Gunst, D. S., Soldanova, I., Schaller, M., Autenrieth, I. B. and Borgmann, S.** (2004). "Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells." *Infect Immun* **72**(12): 7045-7054.
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van Langen, M. and Madsen, K. L.** (2008). "Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**(5): G1025-1034.
- Fanning, A. S. and Anderson, J. M.** (2009). "Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions." *Ann N Y Acad Sci* **1165**: 113-120.
- Fasano, A., Baudry, B., Pumphlin, D. W., Wasserman, S. S., Tall, B. D., Ketley, J. M. and Kaper, J. B.** (1991). "Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5242-5246.

- Fihn, B. M., Sjoqvist, A. and Jodal, M.** (2000). "Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport." *Gastroenterology* **119**(4): 1029-1036.
- Fiocchi, C.** (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." *Gastroenterology* **115**(1): 182-205.
- Fromm, M., Schulzke, J. D. and Hegel, U.** (1985). "Epithelial and subepithelial contributions to transmural electrical resistance of intact rat jejunum, in vitro." *Pflugers Arch* **405**(4): 400-402.
- Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T. and Sawada, N.** (2004). "Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions." *Exp Cell Res* **295**(1): 36-47.
- Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., Kojima, T., Yamashita, T. and Sawada, N.** (2006). "Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine." *J Histochem Cytochem* **54**(8): 933-944.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S.** (2001). "Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells." *J Cell Biol* **153**(2): 263-272.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S.** (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." *J Cell Biol* **156**(6): 1099-1111.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S.** (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 2): 1777-1788.
- Furuse, M., Sasaki, H. and Tsukita, S.** (1999). "Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands." *J Cell Biol* **147**(4): 891-903.
- Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2000). "Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis." *Faseb J* **14**(12): 1749-1753.
- Gitter, A. H., Bertog, M., Schulzke, J. and Fromm, M.** (1997). "Measurement of paracellular epithelial conductivity by conductance scanning." *Pflugers Arch* **434**(6): 830-840.
- Gogarten, W., Kockerling, A., Fromm, M., Riecken, E. O. and Schulzke, J. D.** (1994). "Effect of acute *Yersinia enterocolitica* infection on intestinal barrier function in the mouse." *Scand J Gastroenterol* **29**(9): 814-819.
- Granfors, K., Merilahti-Palo, R., Luukkainen, R., Mottonen, T., Lahesmaa, R., Probst, P., Marker-Hermann, E. and Toivanen, P.** (1998). "Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis." *Arthritis Rheum* **41**(5): 855-862.
- Grassl, G. A., Bohn, E., Muller, Y., Buhler, O. T. and Autenrieth, I. B.** (2003). "Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion." *Int J Med Microbiol* **293**(1): 41-54.

- Grassl, G. A., Kracht, M., Wiedemann, A., Hoffmann, E., Aepfelbacher, M., von Eichel-Streiber, C., Bohn, E. and Autenrieth, I. B.** (2003). "Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades." *Cell Microbiol* **5**(12): 957-971.
- Grobner, S., Autenrieth, S. E., Soldanova, I., Gunst, D. S., Schaller, M., Bohn, E., Muller, S., Leverkus, M., Wesselborg, S., Autenrieth, I. B. and Borgmann, S.** (2006). "Yersinia YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features." *Apoptosis* **11**(11): 1959-1968.
- Grozdanov, L., Zahringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y. A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E. T. and Dobrindt, U.** (2002). "A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917." *J Bacteriol* **184**(21): 5912-5925.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.** (1985). "A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**(6): 3440-3450.
- Gumbiner, B.** (1987). "Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions." *Am J Physiol* **253**(6 Pt 1): C749-758.
- Gunzel, D., Stuiver, M., Kausalya, P. J., Haisch, L., Krug, S. M., Rosenthal, R., Meij, I. C., Hunziker, W., Fromm, M. and Muller, D.** (2009). "Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function." *J Cell Sci* **122**(Pt 10): 1507-1517.
- Guttman, J. A. and Finlay, B. B.** (2009). "Tight junctions as targets of infectious agents." *Biochim Biophys Acta* **1788**(4): 832-841.
- Hafez, M., Hayes, K., Goldrick, M., Grecis, R. K. and Roberts, I. S.** (2010). "The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in stimulating expression of Toll-like receptor 5, CD14, MyD88, and TRIF together with the induction of interleukin-8 expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in epithelial cells." *Infect Immun* **78**(5): 2153-2162.
- Hafez, M., Hayes, K., Goldrick, M., Warhurst, G., Grecis, R. and Roberts, I. S.** (2009). "The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in mediating interactions with intestinal epithelial cells and chemokine induction." *Infect Immun* **77**(7): 2995-3003.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S.** (2002). "Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule." *J Biol Chem* **277**(1): 455-461.
- Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R. and Bjorkman, P. J.** (1999). "Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein." *Science* **286**(5438): 291-295.
- Hanski, C., Grutzkau, A., Naumann, M. and Riecken, E. O.** (1990). "[Interaction of Enterobacteriaceae with M-cells: a joint step in invasion of the intestinal mucosa]." *Z Gastroenterol Verh* **25**: 62-66.
- Hanski, C., Kutschka, U., Schmoranzer, H. P., Naumann, M., Stallmach, A., Hahn, H., Menge, H. and Riecken, E. O.** (1989). "Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis." *Infect Immun* **57**(3): 673-678.

- Hartsock, A. and Nelson, W. J.** (2008). "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 660-669.
- Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H. J. and Laufs, R.** (1983). "Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis." *J Infect Dis* **147**(1): 107-115.
- Heesemann, J. and Laufs, R.** (1983). "Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid." *J Bacteriol* **155**(2): 761-767.
- Heiskala, M., Peterson, P. A. and Yang, Y.** (2001). "The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport." *Traffic* **2**(2): 93-98.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Burgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. and Schulzke, J. D.** (2005). "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution." *Gastroenterology* **129**(2): 550-564.
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B. M., Bolbot, Y. K., Maydannik, V. G., Elze, M., Wolff, C. and Schulze, J.** (2007). "The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers." *Eur J Pediatr* **166**(4): 311-318.
- Hermiston, M. L. and Gordon, J. I.** (1995). "In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death." *J Cell Biol* **129**(2): 489-506.
- Hou, J., Gomes, A. S., Paul, D. L. and Goodenough, D. A.** (2006). "Study of claudin function by RNA interference." *J Biol Chem* **281**(47): 36117-36123.
- Hyafil, F., Babinet, C. and Jacob, F.** (1981). "Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium." *Cell* **26**(3 Pt 1): 447-454.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S.** (2005). "Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells." *J Cell Biol* **171**(6): 939-945.
- Inoue, T., Okamoto, K., Moriyama, T., Takahashi, T., Shimizu, K. and Miyama, A.** (1983). "Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells." *Microbiol Immunol* **27**(2): 159-166.
- Isberg, R. R.** (1990). "Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells." *Mol Biol Med* **7**(1): 73-82.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S.** (1999). "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." *J Cell Biol* **147**(6): 1351-1363.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J. and Ohno, S.** (1998). "An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3." *J Cell Biol* **143**(1): 95-106.
- Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. and Hansson, G. C.** (2008). "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 15064-15069.

- Kampik, D., Schulte, R. and Autenrieth, I. B.** (2000). "Yersinia enterocolitica invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in Yersinia infections." *Infect Immun* **68**(5): 2484-2492.
- Kapatral, V. and Minnich, S. A.** (1995). "Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three Yersinia enterocolitica flagellin genes." *Mol Microbiol* **17**(1): 49-56.
- Kinder, S. A., Badger, J. L., Bryant, G. O., Pepe, J. C. and Miller, V. L.** (1993). "Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from Yersinia enterocolitica serotype O8 and construction of a transformable R-M+ mutant." *Gene* **136**(1-2): 271-275.
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y. and Tsukita, S.** (2002). "Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments." *J Am Soc Nephrol* **13**(4): 875-886.
- Kockerling, A., Sorgenfrei, D. and Fromm, M.** (1993). "Electrogenic Na<sup>+</sup> absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study." *Am J Physiol* **264**(5 Pt 1): C1285-1293.
- Kohler, H., Sakaguchi, T., Hurley, B. P., Kase, B. A., Reinecker, H. C. and McCormick, B. A.** (2007). "Salmonella enterica serovar Typhimurium regulates intercellular junction proteins and facilitates transepithelial neutrophil and bacterial passage." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(1): G178-187.
- Koornhof, H. J., Smego, R. A., Jr. and Nicol, M.** (1999). "Yersiniosis. II: The pathogenesis of Yersinia infections." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**(2): 87-112.
- Kraehenbuhl, J. P. and Neutra, M. R.** (2000). "Epithelial M cells: differentiation and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 301-332.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J. and Blasig, I. E.** (2008). "Structure and function of claudins." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 631-645.
- Kreusel, K. M., Fromm, M., Schulzke, J. D. and Hegel, U.** (1991). "Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)." *Am J Physiol* **261**(4 Pt 1): C574-582.
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Gunzel, D., Westphal, J. K., Huber, O., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2009). "Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability." *Mol Biol Cell* **20**(16): 3713-3724.
- Krug, S. M., Fromm, M. and Gunzel, D.** (2009). "Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance." *Biophys. J.* **97**(8).
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C. and Schulze, J.** (2004). "Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine." *Gut* **53**(11): 1617-1623.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G. and Stolte, M.** (1997). "Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis." *Aliment Pharmacol Ther* **11**(5): 853-858.

- Lahesmaa-Rantala, R., Magnusson, K. E., Granfors, K., Leino, R., Sundqvist, T. and Toivanen, A.** (1991). "Intestinal permeability in patients with yersinia triggered reactive arthritis." *Ann Rheum Dis* **50**(2): 91-94.
- Li, H., Sheppard, D. N. and Hug, M. J.** (2004). "Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber." *J Cyst Fibros* **3 Suppl 2**: 123-126.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Madara, J. L. and Stafford, J.** (1989). "Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers." *J Clin Invest* **83**(2): 724-727.
- Maes, M., Coucke, F. and Leunis, J. C.** (2007). "Normalization of the increased translocation of endotoxin from gram negative enterobacteria (leaky gut) is accompanied by a remission of chronic fatigue syndrome." *Neuro Endocrinol Lett* **28**(6): 739-744.
- Maes, M., Kubera, M. and Leunis, J. C.** (2008). "The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression." *Neuro Endocrinol Lett* **29**(1): 117-124.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A. and De Vuyst, L.** (2006). "Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds." *Res Microbiol* **157**(3): 241-247.
- Malchow, H. A.** (1997). "Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?" *J Clin Gastroenterol* **25**(4): 653-658.
- Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S. M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2009). "TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling." *Cell Tissue Res*.
- Mankertz, J. and Schulzke, J. D.** (2007). "Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(4): 379-383.
- Mankertz, J., Waller, J. S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Florian, P., Schoneberg, T., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2002). "Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage." *Biochem Biophys Res Commun* **298**(5): 657-666.
- Markov, A. G., Veshnyakova, A., Fromm, M., Amasheh, M. and Amasheh, S.** (2010). "Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine." *J Comp Physiol B* **180**(4): 591-598.
- Marriott, D. J., Taylor, S. and Dorman, D. C.** (1985). "Yersinia enterocolitica infection in children." *Med J Aust* **143**(11): 489-492.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. and Dejana, E.** (1998). "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." *J Cell Biol* **142**(1): 117-127.

- Martinez-Palomo, A., Meza, I., Beaty, G. and Cereijido, M.** (1980). "Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium." *J Cell Biol* **87**(3 Pt 1): 736-745.
- Martins, F. S., Dalmasso, G., Arantes, R. M., Doye, A., Lemichez, E., Lagadec, P., Imbert, V., Peyron, J. F., Rampal, P., Nicoli, J. R. and Czerucka, D.** (2010). "Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection." *PLoS One* **5**(1): e8925.
- Matsumoto, H. and Young, G. M.** (2009). "Translocated effectors of *Yersinia*." *Curr Opin Microbiol* **12**(1): 94-100.
- McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., Lynch, R. D. and Schneeberger, E. E.** (1996). "Occludin is a functional component of the tight junction." *J Cell Sci* **109** ( Pt 9): 2287-2298.
- Mennigen, R. and Bruewer, M.** (2009). "Effect of probiotics on intestinal barrier function." *Ann N Y Acad Sci* **1165**: 183-189.
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N. and Bruewer, M.** (2009). "Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(5): G1140-1149.
- Mikulskis, A. V., Delor, I., Thi, V. H. and Cornelis, G. R.** (1994). "Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors." *Mol Microbiol* **14**(5): 905-915.
- Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Gunzel, D., Muller, D., Schulzke, J. D., Amasheh, S. and Fromm, M.** (2010). "Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes." *Biochim Biophys Acta*.
- Miller, V. L. and Falkow, S.** (1988). "Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells." *Infect Immun* **56**(5): 1242-1248.
- Miller, V. L., Farmer, J. J., 3rd, Hill, W. E. and Falkow, S.** (1989). "The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease." *Infect Immun* **57**(1): 121-131.
- Mills, S. D., Boland, A., Sory, M. P., van der Smissen, P., Kerbouch, C., Finlay, B. B. and Cornelis, G. R.** (1997). "*Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12638-12643.
- Morita, K., Itoh, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Furuse, M., Yoneda, K., Imamura, S., Fujimoto, K. and Tsukita, S.** (1998). "Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin." *J Invest Dermatol* **110**(6): 862-866.
- Moroni, O., Kheadr, E., Boutin, Y., Lacroix, C. and Fliss, I.** (2006). "Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin." *Appl Environ Microbiol* **72**(11): 6894-6901.
- Najdenski, H., Golkocheva, E., Vesselinova, A., Bengoechea, J. A. and Skurnik, M.** (2003). "Proper expression of the O-antigen of lipopolysaccharide is essential for the



virulence of *Yersinia enterocolitica* O:8 in experimental oral infection of rabbits." *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**(2): 97-106.

**Naydenov, N. G., Hopkins, A. M. and Ivanov, A. I.** (2009). "c-Jun N-terminal kinase mediates disassembly of apical junctions in model intestinal epithelia." *Cell Cycle* **8**(13): 2110-2121.

**Nissle, A.** (1918). "Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien." *Med Klin (Munich)* **2**: 29-33.

**Oelschlaeger, T. A., Altenhoefer, A. and Hacker, J.** (2001). "Inhibition of *Salmonella typhimurium* invasion into intestinal cells by the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917." *Gastroenterology* **120**: A326.

**Parassol, N., Freitas, M., Thoreux, K., Dalmasso, G., Bourdet-Sicard, R. and Rampal, P.** (2005). "Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells." *Res Microbiol* **156**(2): 256-262.

**Pepe, J. C. and Miller, V. L.** (1993). "The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection." *Infect Agents Dis* **2**(4): 236-241.

**Pepe, J. C., Wachtel, M. R., Wagar, E. and Miller, V. L.** (1995). "Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection." *Infect Immun* **63**(12): 4837-4848.

**Pierson, D. E. and Falkow, S.** (1993). "The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing." *Infect Immun* **61**(5): 1846-1852.

**Plassmann, D. and Schulte-Witte, H.** (2007). "[Treatment of irritable bowel syndrome with *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN): a retrospective survey]." *Med Klin (Munich)* **102**(11): 888-892.

**Podolsky, D. K.** (2002). "Inflammatory bowel disease." *N Engl J Med* **347**(6): 417-429.

**Rao, M. C., Guandalini, S., Laird, W. J. and Field, M.** (1979). "Effects of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum." *Infect Immun* **26**(3): 875-878.

**Ratnam, S., Mercer, E., Picco, B., Parsons, S. and Butler, R.** (1982). "A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1." *J Infect Dis* **145**(2): 242-247.

**Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M. and Axon, A. T.** (1999). "Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial." *Lancet* **354**(9179): 635-639.

**Revell, P. A. and Miller, V. L.** (2000). "A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* inv gene and for virulence." *Mol Microbiol* **35**(3): 677-685.

**Richter, J. F., Gitter, A. H., Gunzel, D., Weiss, S., Mohamed, W., Chakraborty, T., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2009). "Listeriolysin O affects barrier function and induces chloride secretion in HT-29/B6 colon epithelial cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.

**Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S. and Mengheri, E.** (2006). "Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2

cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88." *Br J Nutr* **95**(6): 1177-1184.

**Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J. D., Amasheh, S., Gunzel, D. and Fromm, M.** (2010). "Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel." *J Cell Sci* **123**(Pt 11): 1913-1921.

**Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S. and Heesemann, J.** (1996). "Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils." *Infect Immun* **64**(3): 724-733.

**Saebo, A., Vik, E., Lange, O. J. and Matuszkiewicz, L.** (2005). "Inflammatory bowel disease associated with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection." *Eur J Intern Med* **16**(3): 176-182.

**Saha, S., Chowdhury, P., Mazumdar, A., Pal, A., Das, P. and Chakrabarti, M. K.** (2009). "Role of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin (Y-STa) on differential regulation of nuclear and cytosolic calcium signaling in rat intestinal epithelial cells." *Cell Biol Toxicol* **25**(3): 297-308.

**Saha, S., Gupta, D. D. and Chakrabarti, M. K.** (2005). "Involvement of phospholipase C in *Yersinia enterocolitica* heat stable enterotoxin (Y-STa) mediated rise in intracellular calcium level in rat intestinal epithelial cells." *Toxicon* **45**(3): 361-367.

**Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S.** (2000). "Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4131-4142.

**Sandle, G. I., Higgs, N., Crowe, P., Marsh, M. N., Venkatesan, S. and Peters, T. J.** (1990). "Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon." *Gastroenterology* **99**(1): 97-105.

**Sartor, R. B.** (2008). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* **134**(2): 577-594.

**Schiemann, D. A.** (1981). "An enterotoxin-negative strain of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is capable of producing diarrhea in mice." *Infect Immun* **32**(2): 571-574.

**Schifferdecker, E. and Fromter, E.** (1978). "The AC impedance of *Necturus* gallbladder epithelium." *Pflugers Arch* **377**(2): 125-133.

**Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F. and Fellermann, K.** (2007). "Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin." *Infect Immun* **75**(5): 2399-2407.

**Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A. J. and Rietschel, E. T.** (1995). "Molecular mechanisms of endotoxin activity." *Arch Microbiol* **164**(6): 383-389.

**Schulte, R. and Autenrieth, I. B.** (1998). "*Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation." *Infect Immun* **66**(3): 1216-1224.

**Schulte, R., Wattiau, P., Hartland, E. L., Robins-Browne, R. M. and Cornelis, G. R.** (1996). "Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*." *Infect Immun* **64**(6): 2106-2113.

- Schulzke, J. D., Gitter, A. H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S. and Fromm, M.** (2005). "Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice." *Biochim Biophys Acta* **1669**(1): 34-42.
- Schutz, E.** (1989). "[The treatment of intestinal diseases with Mutaflor. A multicenter retrospective study]." *Fortschr Med* **107**(28): 599-602.
- Sheff, D. R., Kroschewski, R. and Mellman, I.** (2002). "Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes." *Mol Biol Cell* **13**(1): 262-275.
- Skurnik, M. and Bengoechea, J. A.** (2003). "The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic Yersiniae." *Carbohydr Res* **338**(23): 2521-2529.
- Skurnik, M. and Zhang, L.** (1996). "Molecular genetics and biochemistry of Yersinia lipopolysaccharide." *APMIS* **104**(12): 849-872.
- Smego, R. A., Frean, J. and Koornhof, H. J.** (1999). "Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague Yersinia infections." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**(1): 1-15.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.** (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y. and 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.
- Stahelin, L. A.** (1973). "Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions." *J Cell Sci* **13**(3): 763-786.
- Stainier, I., Iriarte, M. and Cornelis, G. R.** (1997). "YscM1 and YscM2, two Yersinia enterocolitica proteins causing downregulation of yop transcription." *Mol Microbiol* **26**(4): 833-843.
- Superti, F., Pietrantonio, A., Di Biase, A. M., Longhi, C., Valenti, P. and Tinari, A.** (2005). "Inv-mediated apoptosis of epithelial cells infected with enteropathogenic Yersinia: a protective effect of lactoferrin." *Res Microbiol* **156**(5-6): 728-737.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T. and Ohno, S.** (2001). "Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures." *J Cell Biol* **152**(6): 1183-1196.
- Tafazoli, F., Holmstrom, A., Forsberg, A. and Magnusson, K. E.** (2000). "Apically exposed, tight junction-associated beta1-integrins allow binding and YopE-mediated perturbation of epithelial barriers by wild-type Yersinia bacteria." *Infect Immun* **68**(9): 5335-5343.
- Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y. and Tsukita, S.** (2010). "Loss of Claudin-15, but not Claudin-2, Causes Na(+) Deficiency and Glucose Malabsorption in Mouse Small Intestine." *Gastroenterology*.

- Tennant, S. M., Skinner, N. A., Joe, A. and Robins-Browne, R. M.** (2003). "Yersinia enterocolitica biotype 1A: not as harmless as you think." *Adv Exp Med Biol* **529**: 125-128.
- Terjung, B. and Spengler, U.** (2009). "Atypical p-ANCA in PSC and AIH: a hint toward a "leaky gut"?" *Clin Rev Allergy Immunol* **36**(1): 40-51.
- Troeger, H., Richter, J. F., Beutin, L., Gunzel, D., Dobrindt, U., Epple, H. J., Gitter, A. H., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2007). "Escherichia coli alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation." *Cell Microbiol* **9**(10): 2530-2540.
- Tromm, A., Niewerth, U., Khoury, M., Baestlein, E., Wilhelms, G., Schulze, J. and Stolte, M.** (2004). "The probiotic E. coli strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: first results of an open-label trial." *Z Gastroenterol* **42**(5): 365-369.
- Trulzsch, K., Oellerich, M. F. and Heesemann, J.** (2007). "Invasion and dissemination of Yersinia enterocolitica in the mouse infection model." *Adv Exp Med Biol* **603**: 279-285.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M.** (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(4): 285-293.
- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F. and Westendorf, A. M.** (2007). "Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity." *PLoS One* **2**(12): e1308.
- Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S.** (1995). "Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin." *Annu Rev Immunol* **13**: 437-457.
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S.** (2004). "Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1." *J Biol Chem* **279**(43): 44785-44794.
- Ussing, H. H. and Zerahn, K.** (1951). "Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin." *Acta Physiol Scand* **23**(2-3): 110-127.
- Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M.** (2001). "Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability." *J Clin Invest* **107**(10): 1319-1327.
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S. and Anderson, J. M.** (2003). "Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins." *Am J Physiol Renal Physiol* **285**(6): F1078-1084.
- Van Itallie, C. M., Gambling, T. M., Carson, J. L. and Anderson, J. M.** (2005). "Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization." *J Cell Sci* **118**(Pt 7): 1427-1436.
- Van Itallie, C. M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J. L., Coccaro, M. R., Proctor, W., Colegio, O. R. and Anderson, J. M.** (2008). "The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2." *J Cell Sci* **121**(Pt 3): 298-305.
- Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J. and Anderson, J. M.** (2006). "Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities." *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(6): F1288-1299.

- Viboud, G. I. and Bliska, J. B.** (2005). "Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis." *Annu Rev Microbiol* **59**: 69-89.
- Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L. and Warhurst, G.** (2005). "Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores." *J Cell Sci* **118**(Pt 22): 5221-5230.
- Watson, C. J., Rowland, M. and Warhurst, G.** (2001). "Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(2): C388-397.
- Wattenhofer, M., Reymond, A., Falciola, V., Charollais, A., Caille, D., Borel, C., Lyle, R., Estivill, X., Petersen, M. B., Meda, P. and Antonarakis, S. E.** (2005). "Different mechanisms preclude mutant CLDN14 proteins from forming tight junctions in vitro." *Hum Mutat* **25**(6): 543-549.
- Wauters, G., Kondolo, K. and Janssens, M.** (1987). "Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*." *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**: 14-21.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schroder, J. M. and Stange, E. F.** (2004). "NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium." *Infect Immun* **72**(10): 5750-5758.
- Wilcox, E. R., Burton, Q. L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N. A., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J. and Friedman, T. B.** (2001). "Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29." *Cell* **104**(1): 165-172.
- Wohleben, H.** (2005). "Der Einfluss von AGEs und der Wachstumsfaktoren IGF-1 und bFGF auf die freie intrazelluläre Calcium-Konzentration in retinalen Pigmentepithelzellen " *Aus „Institut für klinische Physiologie“ Freie Universität Berlin*: 90.
- Wu, Z., Nybom, P., Sundqvist, T. and Magnusson, K. E.** (1998). "Endogenous nitric oxide in MDCK-I cells modulates the *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease (HA/P)-mediated cytotoxicity." *Microb Pathog* **24**(5): 321-326.
- Yamamoto, M., Ramirez, S. H., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R. L., Kaibuchi, K., Persidsky, Y. and Ikezu, T.** (2008). "Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells." *Am J Pathol* **172**(2): 521-533.
- Yan, F. and Polk, D. B.** (2006). "Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**(6): 717-721.
- Yan, F. and Polk, D. B.** (2010). "Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases." *Curr Opin Gastroenterol* **26**(2): 95-101.
- Young, G. M., Badger, J. L. and Miller, V. L.** (2000). "Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*." *Infect Immun* **68**(7): 4323-4326.
- Yu, A. S., Enck, A. H., Lencer, W. I. and Schneeberger, E. E.** (2003). "Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation." *J Biol Chem* **278**(19): 17350-17359.

**Yu, D. and Turner, J. R.** (2008). "Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 709-716.

**Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2007). "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* **56**(1): 61-72.

**Zhang, Y. C., Zhang, L. W., Tuo, Y. F., Guo, C. F., Yi, H. X., Li, J. Y., Han, X. and Du, M.** (2010). "Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement." *Res Microbiol.*

**Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U. and Schmidt, M. A.** (2007). "Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair." *Cell Microbiol* **9**(3): 804-816.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFU	<i>colony forming units</i>
Cldn	Claudin
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FKS	fötales Kälberserum
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (1 g = 9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G <sub>leak</sub>	Leak-Leitwert (μS)
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom (μA·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid

MALT	Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MW	Mittelwert
mv	Mikrovilli
Nal <sup>R</sup>	Nalidixinsäure-Resistenz
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa-B</i>
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBST	<i>phosphate buffered saline with Tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/Discs-large/ZO1
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>post infectionem</i>
IP3	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Memorial Park Institute (-medium)
R <sup>t</sup>	transepithelialer Widerstand ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
Tbl	Tablette
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
TJ	Tight Junction
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
ÜN	Übernachtkultur
VK	Vorkultur
WT	Wildtyp
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
YeO9	<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp O9
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
ZO	Zonula Occludens

International übliche physikalische und biochemische Abkürzungen sind nicht extra aufgeführt.



## 9 Anhang

### Publikationen

#### Originalarbeiten

- Hering NA, Schulzke JD (2009). Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases* 27(4): 450-454 (Review)
- 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. (angenommen zur Publikation bei *Laboratory Investigation*)
- Hering NA\*, Andres S\*, Fromm A, Van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J, Fromm M, Schulzke JD. Smad4-dependent and Smad4-independent claudin-4 expression regulation by TGF- $\beta$ , a barrier-protective mechanism of whey protein fractions in enteral nutrition. (eingereicht bei *Journal of Nutrition*)

#### Tagungsbeiträge

##### Vorträge:

- 63. Jahrestagung der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten), Berlin, 1. - 4.10 2008.

Hering NA, Troeger H, Schulzke JD. Pathomechanismen der Yersinien-Enteritis im Zellmodell

- 23<sup>th</sup> Meeting European Intestinal Transport Group (EITG), Salerno, 7. - 10. 4. 2010

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 barrier dysfunction in HT-29/B6 cells by causing discrete "leaky regions" exhibiting tight junction alterations.

##### Posterpräsentation:

- 2. Gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM, Göttingen, 25. - 28.9.2005

Otto NA, Becker D, Bumann D, Meyer TF, Dersch P, Hunke S. CpxP is critical for *Salmonella* virulence.

##### Teilnahme:

- International Conference on „Molecular Structure and Function of the Tight Junction“, Berlin, 25. - 27. 4. 2008.

## Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt **Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke** (Klinik für Allgemeinmedizin, Charité, Campus Benjamin Franklin) für die Vergabe des Themas, die Förderung in seinem Teilprojekt der DFG-Forschergruppe 721 und vor allem für die intensive Betreuung meiner Arbeit in allen Stadien ihrer Entstehung.

**Prof. Dr. Michael Krauß** (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) danke ich herzlich für seine freundliche Bereitschaft, die Arbeit zu begutachten.

**Prof. Dr. Michael Fromm** (Institut für Klinische Physiologie, Charité, Campus Benjamin Franklin) danke ich für seine jederzeitige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung bei der Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit sowie für die Durchsicht der Promotionsarbeit.

Bei **Dr. Erwin Bohn** (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Tübingen) möchte ich mich für die gewinnbringende Kooperation und Bereitstellung der *Y. enterocolitica*-Mutantenstämme bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik für Allgemeinmedizin CBF, des Instituts für Klinische Physiologie sowie der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie CBF für die hervorragende Zusammenarbeit und das stets angenehme Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Anja Fromm** für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die zahlreichen Ideen und nicht zuletzt für die nette Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich **Dr. Hanno Tröger** für die Einführung in die Thematik, die konstruktiven Diskussionen und Anregungen und schließlich für die Durchsicht von Teilen dieser Arbeit.

**Dr. Jan F. Richter** danke ich insbesondere für seine Ideen und die Zusammenarbeit bei der Auffindung von *leaky regions* sowie für die Einführung in die konfokale Mikroskopie.

Bei **Dr. Susanne Krug** möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung der Zwei-Wege-Impedanzmessungen und der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie bedanken.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Conductance-Scanning-Analysen und für die Durchsicht von Teilen dieser Arbeit danke ich **PD Dr. Dorothee Günzel**.

**PD Dr. Rita Rosenthal** danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Fura-Messungen.

Für die nette Schreibtischnachbarschaft und die stets hilfreiche Beratung, insbesondere bei der Auswertung von Realtime-PCR-Daten, und für die Durchsicht von Teilen dieser Arbeit bin ich **Dr. Theresa Bergann** sehr dankbar.

**Ing. grad. Detlef Sorgenfrei** danke ich für seine Hilfe bei technischen Schwierigkeiten.

Zu guter Letzt möchte ich **meinem Mann Christian, meiner Familie** sowie **allen Freunden**, die mich während dieser Zeit begleitet haben, für ihre Unterstützung und ihr Verständnis ganz herzlich danken.