

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
(einschl. Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunregulation, intestinale Barrierestörung und mikrobielle
Translokation beim Morbus Whipple

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian Friebel

aus Cottbus

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT IN DEUTSCH	2
ABSTRAKT IN ENGLISCH	4
EINFÜHRUNG	6
METHODIK	9
ERGEBNISSE	11
DISKUSSION	14
LITERATURVERZEICHNIS	18
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	22
AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG	23
DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN	27
LEBENS LAUF	63
PUBLIKATIONS LISTE	65
DANKSAGUNG	67

Abstrakt in Deutsch

Einführung:

Der klassische Morbus Whipple (M. Whipple) ist eine systemische, chronische Infektion verursacht durch das Bakterium *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*). Charakteristische Symptommanifestation ist der Gastrointestinaltrakt mit chronischer Diarrhoe und Zeichen der Malabsorption.

Eine Makrophagenakkumulation in der Lamina propria, welche große Mengen an Periodic acid-Schiff (PAS)-positiven Partikeln enthalten, ist pathognomonisch für den klassischen M. Whipple. Während die mukosale Immunreaktion durch ein tolerogenes Milieu charakterisiert ist, welche verschiedenen immunologischen Defiziten der Patienten sowie anti-inflammatorischer Effekte von *T. whipplei* selbst zugeschrieben werden, ist die Rolle regulatorischer T-Zellen (T_{regs}), die immunologische Grundlage des entzündlichen Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS) sowie die Ursache der systemischen Entzündungsreaktion bisher nicht aufgeklärt. Außerdem galt es zu untersuchen inwieweit die mukosale Infektion beim M. Whipple mit den zu beobachtenden gastrointestinalen Symptomen verbunden ist.

Methoden:

Dünndarmproben wurden mittels Zangenbiopsie im Rahmen der Routineösophagogastroduodenoskopie entnommen. Die Biopsien wurden umgehend für elektrophysiologische Experimente in Ussing-Kammern und Analyse der Zytokinproduktion präpariert, oder nach einer Fixierung und Paraffineinbettung für immunhistochemische und strukturelle Analysen verwandt. Die Detektion der Tight junction-Proteinexpression erfolgte durch Westernblotanalyse. Surrogatmarker einer mikrobiellen Translokation (MT) sowie entzündlichen Reaktion wurden im peripheren Blut gemessen. Die Phänotypisierung und Funktionsanalyse von zirkulierenden Immunzellen geschah mittels Durchflusszytometrie.

Resultate:

Wir konnten eine erhöhte Anzahl von mukosalen T_{regs} und assoziierter Zytokine nachweisen. Zirkulierende T_{regs} wiesen darüber hinaus einen aktivierten Phänotyp auf, der eine T-Zell-Anergie vermitteln kann. Die verminderte gegenregulative Kapazität durch T_{regs} war außerdem mit einer unspezifischen Aktivierung und Expansion von $CD4^+$ T-Zellen beim IRIS assoziiert.

Eine hyperregenerative mukosale Transformation, ging mit einem Verlust des differenzierten Oberflächenepithels und nachfolgend mit einer erhöhten Permeabilität für osmotisch aktive Elektrolyte und Makromoleküle einher. Die duodenale Architektur- und Permeabilitätsstörung zeigte sich unter antibiotischer Therapie rückläufig. Das strukturelle Korrelat für die beobachtete Barrierestörung bildete eine veränderte Expression der transmembranalen Proteine Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3 und Tricellulin. Die biologische Signifikanz der mukosalen Barrierestörung wurde durch den Nachweis erhöhter Serummarker einer MT, welche unter antibiotische Therapie wieder rückläufig waren, unterstrichen.

Schlussfolgerung:

T_{regs} könnten zur chronischen Infektion und systemischen Ausbreitung von *T. whipplei* beitragen und sind außerdem an der T-Zell-Rekonstitution beim IRIS beteiligt.

Die mukosale Immunantwort ist verantwortlich für die Barrierestörung beim klassischen M. Whipple. Der Verlust von Absorptionskapazität sowie ein Leckflux von Ionen und Wasser stellen die Ursache der Diarrhoe dar. Eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle und die nachfolgende vermehrte MT sind ein Mediator der systemischen Entzündungsreaktion. Die mukosale Barriere modulierende Therapien könnten eine symptomatische Strategie bei Patienten mit einem klassischen M. Whipple darstellen.

Abstrakt in Englisch

Introduction:

Classical Whipple's disease (CWD) is a chronic disseminated infection caused by *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*). Most patients suffer from gastrointestinal symptoms such as chronic diarrhea and malabsorption.

CWD is characterized by accumulation of small intestinal mucosal macrophages, which are densely packed with periodic acid–Schiff (PAS)-stained granules corresponding to intracellular bacteria. Although the tolerogenic mucosal immune reaction was attributed to a subtle immune defect of the host and to anti-inflammatory effects of *T. whipplei*, little is known about the role of regulatory T cells (T_{regs}), the immunological processes underlying immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) and the causes of systemic inflammation in CWD. Further, the question how the mucosal infection in CWD is linked to the gastrointestinal symptoms of the patients is unresolved.

Methods:

Duodenal mucosa specimens were obtained by forceps biopsy during routine upper gastroduodenal endoscopy. Biopsies were immediately processed to electrophysiological experiments in Ussing-type chambers or analysis of cytokine production or fixed and embedded in paraffin for immunohistochemical and structural analysis. For detection of tight junction protein expression western blot analysis was performed. Surrogate markers of microbial translocation (MT) and inflammation were measured in peripheral blood samples. Immune cells were characterized and functionally analyzed by flow cytometry.

Results:

The numbers of mucosal T_{regs} and related cytokines was found to be increased. Further, peripheral T_{regs} exhibit a more activated phenotype that facilitates exhaustion of effector $CD4^+$ T cells. A nonspecific activation and expansion $CD4^+$ T cells that are not sufficiently counterbalanced by T_{regs} mediates IRIS in CWD.

Our data indicate a hyperregenerative small intestinal mucosal transformation with loss of differentiated surface epithelium subsequently increasing duodenal permeability to small osmotically active solutes and macromolecules. Duodenal architecture and permeability ameliorated upon antibiotic treatment. Structural correlates for these alterations were concordant

changes of membranous claudin-1, claudin-2, claudin-3, and tricellulin expression. Increased serum markers of MT and their decline following treatment corroborated the biological significance of the mucosal barrier defect.

Conclusion:

T_{regs} might contribute to the chronic infection and systemic spread of *T. whipplei* in CWD and during T cell reconstitution in CWD IRIS they reveal insufficient regulative capacity.

Furthermore, the mucosal immune responses in CWD elicit barrier dysfunction. Diarrhea is caused by loss of absorptive capacity and leak flux of ions and water. Increased permeability to macromolecules and subsequent MT contributes to systemic inflammation. Thus, therapeutic strategies to reconstitute the mucosal barrier and control inflammation could assist symptomatic control of CWD.

Einführung ⁽¹⁻³⁾

Der klassische Morbus Whipple (M. Whipple) ist eine chronische Multisystemerkrankung, verursacht durch das Bakterium *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*). Bei *T. whipplei* handelt es sich um ein stäbchenförmiges Bakterium bei dem ein direkter fäkal-oraler Übertragungsweg angenommen wird.(4) Im Vergleich zu akuten Infektionen beträgt die Prävalenz des klassischen M. Whipple lediglich 1-3:1.000.000, wobei die Mehrzahl (ca. 2/3) der Patienten männlich und bei Erkrankungsbeginn im Mittel 55 Jahre alt sind. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung primär während der Prodromalphase mit unspezifischen Allgemeinsymptomen und Gelenkbeschwerden und später, im Mittel nach 6 bis 8 Jahren, durch eine ausgeprägte Malabsorption und Diarrhoe verbunden mit Gewichtsverlust, Lymphadenopathie und Fieber (Tabelle 1). Insbesondere bei Beteiligung des Zentralnervensystems kann es zu fatalen Verläufen kommen.(5)

Tabelle 1. Klinische Charakteristika beim klassischen M. Whipple (Auswahl)

Organsystem	Symptome
gastrointestinal	chronische Diarrhoe, Steatorrhoe, Bauchschmerzen, Gewichtsverlust, Hepatosplenomegalie, Aszites
muskuloskeletal	Polyarthralgie, Myalgie
kardial	Perimyokarditis
pulmonal	Pleuritis, Pleuraerguss, chronischer Husten
dermal	Hyperpigmentation, Purpura
okulär	Uveitis
zentralnervös	Kognitive Dysfunktion, okulomastikatorische Myorhythmie (OMM), okulo-fazial-skeletale Myorhythmie (OFSM), supranukleäre Ophthalmoplegie, Krampfanfälle
neuromuskulär	Periphere axonale Neuropathie
systemisch	Fieber, Lymphadenopathie, Anämie, Hypotonie

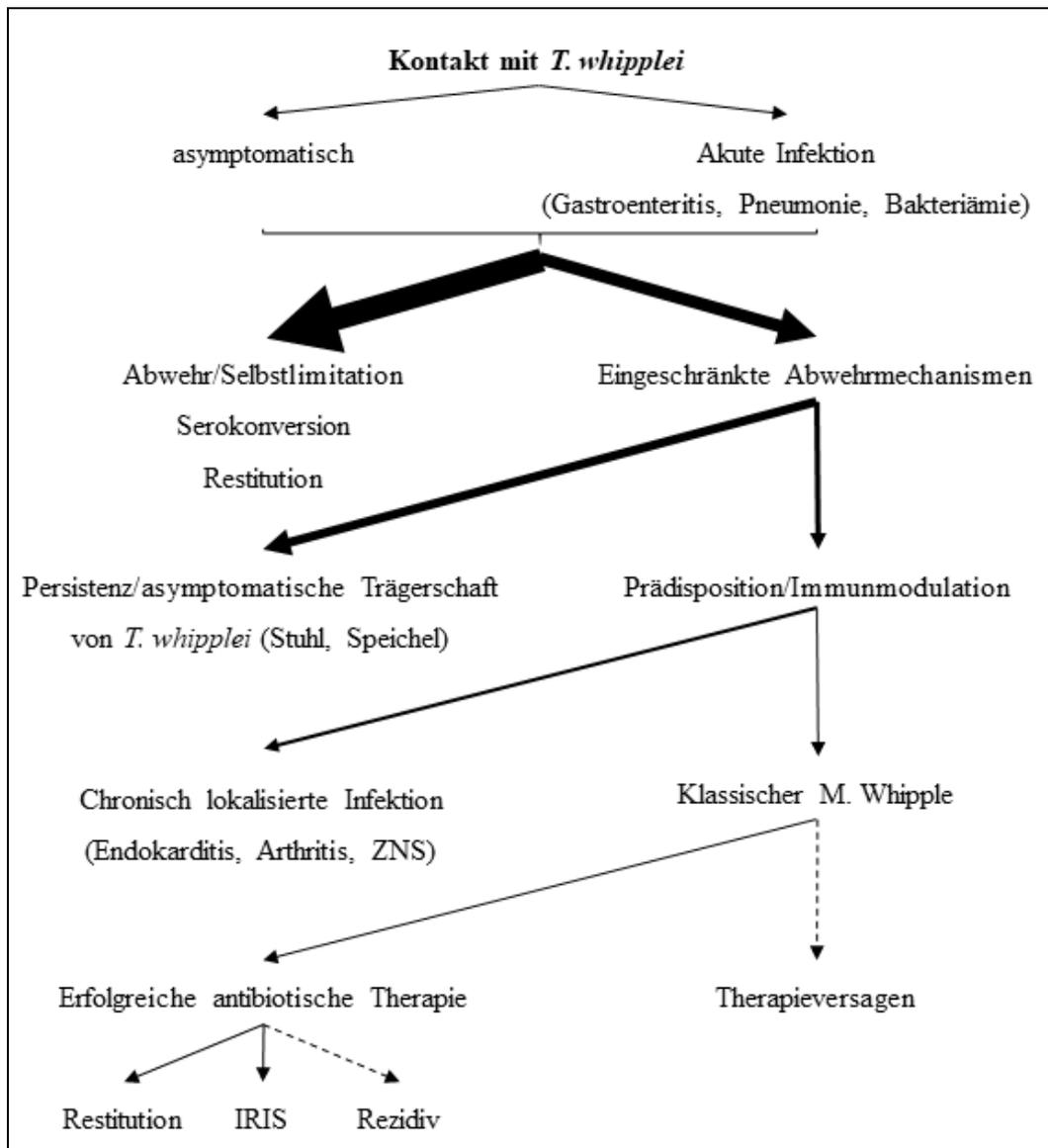
Quellen: (5, 6)

Die Diagnosesicherung erfolgt in der Regel mit Hilfe der Aufarbeitung von Duodenalbiopsien. Eine Makrophagenakkumulation in der Lamina propria (LP), welche großen Mengen an Periodic acid-Schiff (PAS)-positiven Partikeln enthalten, ist dabei pathognomonisch für den klassischen

M. Whipple. Mikroskopisch imponieren distendierte Villi sowie ektatische Lymphgefäße. Außerdem kommen eine *T. whipplei*-spezifische PCR und Immunhistochemie zum Einsatz.(5, 7) Aus dem Kontakt mit *T. whipplei* entwickelt sich bei den meisten Menschen eine asymptomatische Trägerschaft oder eine selbst-limitierende Infektion, die zugleich von einer protektiven humoralen und zellulären Immunität gefolgt wird.(5) Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre haben jedoch bei Patienten die einen klassischen M. Whipple entwickeln eine Reihe immunologischer Veränderungen herausarbeiten können, die für die Manifestation und die systemische Ausbreitung prädisponieren. Die Makrophagenaktivierung und -funktion ist alternativ verändert und deutet auf eine reduzierte Fähigkeit der zellulären Abwehr gegenüber *T. Whipplei* hin.(8) Charakteristisch ist außerdem eine verminderte Th1- und verstärkte Th2-Reaktivität und die Abwesenheit von *T. whipplei*-spezifischen Th1-Reaktionen, forciert durch eine geringere Interleukin (IL)-12 Produktion unreifer dendritischer Zellen (DC).(9-11) Die Folge dieser Veränderungen ist letztlich eine Akkumulation von *T. whipplei* primär in Antigenpräsentierenden Zellen (APC).(5) Dem tolerogenen Immunmilieu steht eine systemische pro-inflammatorische Reaktion gegenüber.(7, 12) Veränderungen der intestinalen epithelialen und Tight junction-assoziierten parazellulären Barriere, wie sie beispielweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorkommen, sind beim M. Whipple bisher nicht beschrieben. Für die antibiotische Therapie wird derzeit eine zweiwöchige intravenöse Induktion mit Ceftriaxon, gefolgt von einer einjährigen Gabe von Cotrimoxazol favorisiert. Alternativ kann auch eine Kombination von Doxycyclin und Hydroxychloroquin sowie eine Erhaltungstherapie mit Doxycyclin verabreicht werden.(5) Im Rahmen der antiinfektiven Therapie kann es bei bis zu 10% der Patienten zur Entwicklung eines inflammatorischen Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS) kommen. Trotz der Eradikation von *T. whipplei* geht dies klinisch meist mit einer erneuten systemischen Entzündungsreaktion einher. Dabei ist die vorherige Therapie mit Immunsuppressiva, meist aufgrund einer fehldiagnostizierten rheumatischen Erkrankung, am stärksten mit dem Auftreten eines IRIS assoziiert.(2, 13, 14) Einer inflammatorischen T-Zell-Rekonstitution scheint hier eine entscheidende Rolle zuzukommen. Zwei Formen des IRIS werden grundsätzlich unterschieden. So kann eine bestehende bereits zuvor therapierte opportunistische Infektion durch die Immunrekonstitution zu einer klinischen Verschlechterung führen oder wenn sie zuvor inapparent war, sich sogar erst demaskieren.(15)

Neben dem klassischen M. Whipple konnten in den letzten Jahren weitere Entitäten die mit *T. whipplei* als Pathogen assoziiert sind, identifiziert werden (Grafik 1). Diese sind oft nicht über eine positive PAS-Reaktion duodенaler Biopsien zu diagnostizieren, sondern nur mit Hilfe der symptomatischen Gewebe.

Grafik 1. Erkrankungsverläufe



Adaptiert nach: (16-25)

Mit dieser Arbeit sollten vier Fragestellungen beantwortet werden. Da beim M. Whipple eine verminderte T-Zellantwort zu beobachten ist, galt es zu untersuchen inwieweit T_{reg} s in die Pathogenese eingebunden sind. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle T-Zellen in der Pathogenese des IRIS beim M. Whipple spielen. Chronische Diarrhoe und Malabsorption zeigen eine Dünndarmdysfunktion an. Da der zugrunde liegende Pathomechanismus bisher nicht bekannt ist, galt es zu untersuchen inwieweit die mukosale Infektion beim M. Whipple mit den zu beobachtenden gastrointestinalen Symptomen verbunden ist und inwieweit eine intestinale Barrierestörung und mikrobielle Translokation (MT) Auslöser einer systemischen Entzündungsreaktion sein könnten.

Methodik ⁽¹⁻³⁾

Alle Patienten wurden prospektiv vor Initiierung der antibiotischen Therapie eingeschlossen. Für die drei folgenden Studien standen verschiedene Patientenkollektive zur Verfügung (Tabelle 2).

Tabelle 2. Patientencharakteristika (Zusammenfassung)

	M. Whipple	IRIS	Kontrollen
Schinnerling, Moos et al.(1)	93 Patienten 18w, 75m; 57 J.	keine	122 Kontrollen 47w, 75m; 42,1 J.
Moos et al.(2)	57 Patienten 8w, 49m; 57 J.	24 Patienten 5w, 19m; 57 J.	89 Kontrollen* 45w, 44m; 50 J.
Epple, Friebel, Moos et al.(3)	52 Patienten 6w, 46m; 55,9 J.	keine	78 Kontrollen 18w, 60m; 49,1 J.

w, weiblich; m, männlich; J., Altersdurchschnitt in Jahren

*Referenzwerte beziehen sich tlw. auf Vorpublikationen (1, 8)

Die Diagnosesicherung eines M. Whipple erfolgte durch den Nachweis PAS-positiver Makrophagen, eine *T. whipplei*-spezifischen PCR oder Immunhistochemie. Die Zuordnung zur entsprechenden Gruppe (klassischer M. Whipple und IRIS) geschah in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf retrospektiv. Gepaarte Proben von Patienten mit einem M. Whipple wurden im Stadium der Remission gewonnen bzw. dann, wenn sich das IRIS manifestierte. Eine erfolgreiche antibiotische Therapie wurde sowohl bei den Patienten mit einem klassischen M. Whipple als auch bei denen, die im Verlauf ein IRIS entwickelten durch eine negative PCR aus dem entsprechenden Gewebe bestätigt. Alle Kontrollprobanden wiesen keine Symptome einer gastrointestinalen oder systemischen Entzündungsreaktion auf. Die Studien wurden von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt und die Teilnehmer stimmten schriftlich entsprechend der Deklaration von Helsinki zu.

Dünndarmproben wurden mittels Zangenbiopsie im Rahmen der Routineösophagogastroduodenoskopie entnommen. Die Biopsien wurden umgehend für elektrophysiologische Experimente in Ussing-Kammern und Analyse der Zytokinproduktion präpariert, oder nach einer Fixierung und Paraffineinbettung für immunhistochemische und strukturelle Analysen verwandt. Für die Immunhistochemie (zur Bestimmung von: Alkalische Phosphatase, FOXP3, cleaved Caspase-3, Ki-67, Perforin, CD3, CD4, CD8, CD45RA,

CD45RO, CD68) verwandten wir einen alkalischer-Phosphatase-konjugierten Streptavidin-Biotin-Komplex als Detektionssystem mit Fast Red als Substrat. Die Zytokine TNF- α , soluble CD14 (sCD14), IL-4, IL-13, IL-10 und TGF- β wurden aus dem Überstand von duodenalen Biopsien nach Kurzzeitkultur (48h) zytometrisch (Cytometric Bead Array – CBA) gemessen. Die Detektion der Tight junction-Proteinexpression (Tricellulin, Occludin, Claudin 1-5, 7 und 15) erfolgte durch Westernblotanalyse. Die Bestimmung der niedermolekularen intestinalen Permeabilität erfolgte durch die Impedanzspektroskopie durch Messung des epithelialen und subepithelialen Widerstands (R^{epi} und R^{sub}). Die makromolekulare Permeabilität wurde durch parazelluläre Fluxmessungen von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Dextran FD4 (4kDa) sowie Horseradish peroxidase (HRP) gemessen. Um eine mögliche Anionensekretion zu quantifizieren, wurden Kurzschlussstromexperimente in Ussing-Kammern durchgeführt.

Die Zytokine TGF- β , IFN- γ , IL-10 sowie Surrogatmarker einer MT (Lipopolysaccharid – LPS, LPS-bindendes Protein – LBP und sCD14) wurden im peripheren Blut aus Plasma- bzw. Serumproben mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay und CBA gemessen.

Die zirkulierenden bzw. residenten Immunzellen konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie phänotypisiert und quantifiziert werden. T_{reg} wurden aus mittels Ficoll-Paque gewonnenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durch magnetische Zellseparation isoliert und deren Suppressionskapazität wurde durch Kokultur mit Responder-T-Zellen (T_{resp}), anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 bestimmt. Für die Stimulation mit *T. whipplei* wurde der Stamm Twist Marseille (CNCM I-2202) verwandt.(26) Die Th1-Reaktivität (IFN- γ Produktion) wurde im Vollblut nach Hinzugabe von Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB) bestimmt.

Für die Datenanalyse verwendeten wir das Programm Graph-Pad Prism. Bei der statistischen Auswertung kamen der ungepaarte und gepaarte t-Test, für multiples Testen die Bonferroni-Holm-Korrektur sowie der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Als signifikant galten Werte von $p < 0.05$.

Ergebnisse⁽¹⁻³⁾

Die Rolle regulatorischer T-Zellen beim M. Whipple

Bisherige Untersuchungsergebnisse zeigen beim klassischen M. Whipple ein immunmodulatorisches Milieu an. Der Beitrag zur Immunpathogenese von T_{regs} sollte deshalb in dieser Studie untersucht werden. Das Duodenum stellt den primären Ort der intestinalen Manifestation und Infektion dar. Hier konnten wir in Biopsien von unbehandelten M. Whipple Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine vermehrte Anzahl von FOXP3⁺ T_{reg} in der LP nachweisen. Eine erhöhte duodenale Sekretion klassischer regulatorischer Zytokine IL-10 und TGF- β deutet auch eine funktionelle Relevanz an. Obwohl sich der systemische Anteil von T_{reg} in den beobachteten Gruppen nicht unterschied, wiesen T_{reg} von Patienten mit einem bisher nicht antibiotisch therapierten M. Whipple eine vermehrte Expression von CTLA-4 und CD39 auf, welche mit einer gesteigerten regulatorischen Aktivität assoziiert sind. In diesem Zusammenhang konnte auch eine erhöhte Konzentration des regulatorischen Zytokins TGF- β und eine verminderte Plasmakonzentration des pro-inflammatorischen T-Zell assoziierten Zytokins IFN- γ betrachtet werden. Die verstärkte funktionelle regulatorische Kapazität von T_{reg} bei Patienten mit einem M. Whipple wurde mit Hilfe eines in vitro T-Zell-Suppressionsassays bestimmt. Dabei wiesen anti-CD3/anti-CD28 stimulierte T_{resp} , welche zuvor mit T_{reg} von M. Whipple Patienten inkubiert worden waren, im Vergleich zu T_{reg} gesunder Kontrollen, eine verringerte IFN- γ Sekretion und T_{reg} von M. Whipple Patienten somit eine erhöhte Suppressionskapazität auf. T_{reg} von M. Whipple Patienten sind aber offensichtlich nicht in der Lage die *T. whipplei* spezifische T-Zell-Antwort zu beeinflussen. Wir konnten zeigen, dass eine Depletion von T_{reg} keine Auswirkung auf die IFN- γ Sekretion mit *T. whipplei* Lysat stimulierter CD4⁺ Zellen hatte. Eine verminderte *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort bildet eine weitere entscheidende Säule der Immunpathogenese des M. Whipple. Diese könnte durch eine T-Zell-Anergie bedingt sein, welche wiederum in dem bei M. Whipple Patienten beobachteten anti-inflammatorischen Zytokinmilieu und der gesteigerten T_{reg} -Aktivität begründet sein könnte. Deshalb wurden in einem nächsten Schritt T-Zellen von M. Whipple Patienten auf die Expression von Anergie-assoziierten Markern untersucht. Wir konnten dabei eine verminderte GITR- und eine gesteigerte PD-1-Expression auf CD25⁺FOXP3⁻ Effektor-T-Zellen sowie eine erhöhte Expression des Apoptose-vermittelnden Rezeptors Fas (CD95) auf CD45RO⁺ CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen nachweisen. CD4⁺ T-Zellen zeigten sich auch funktionell anerg, da nach

polyklonaler Stimulation mit dem Superantigen SEB die durch IFN- γ vermittelte Th1 Antwort vermindert war.

Die Immunpathologie des Immunrekonstitutionssyndroms beim M. Whipple

Das IRIS beim M. Whipple, dessen Pathogenese bisher nur unvollständig verstanden ist, stellt eine ernst zu nehmende Komplikation nach Initiierung der antibiotischen Therapie dar. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Gewebeeinfiltration mit Immunzellen neben PAS⁺CD68⁺ Makrophagen von CD4⁺ und zu einem geringeren Anteil auch von CD8⁺ T-Zellen dominiert wurde. Außerdem wiesen Patienten die ein IRIS entwickelten, im Vergleich zu Patienten bei denen diese Komplikation nicht auftrat, initial niedrigere CD4⁺ T-Zell-Zahlen sowie einen Anstieg nach Beginn der Antibiotikatherapie auf. Darüber hinaus korrelierte die Dauer einer vor Etablierung der Diagnose des M. Whipple durchgeführten Immunsuppression negativ mit der Zahl zirkulierender CD4⁺ T-Zellen. Die T-Zellrekonstitution ging auch funktionell mit einem Anstieg der Th1-Antwort einher. Nach SEB-Stimulation konnten wir hier auch eine Zunahme der IFN- γ Produktion aktivierter T-Zellen detektieren. Dieser Effekt ließ sich bei den M. Whipple Patienten ohne IRIS (non-IRIS) nicht nachweisen. Die gesteigerte Th1-Antwort war dabei nicht auf *T. whipplei* selbst zurückzuführen, da *T. whipplei* sowohl bei non-IRIS M. Whipple Patienten als auch bei den klassischen M. Whipple Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verminderte Th1-Antwort generierte. IRIS-Patienten wiesen darüber hinaus eine systemische Expansion von naiven (CD45RA⁺CCR7⁺) CD4⁺ T-Zellen auf. Im Vergleich zu non-IRIS M. Whipple Patienten, entstammte dabei ein größerer Anteil kürzlich aus dem Thymus emigrierter CD31⁺ naiver T-Zellen. Der systemische Anteil der Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA⁻CD4⁺) hingegen war vermindert, wobei jedoch mehr Zellen den entzündungs-assoziierten Chemokinrezeptor CCR6 und den Darm-Homing-Marker $\alpha 4\beta 7$ exprimierten. Das beobachtete Verhältnis von naiven und Gedächtnis-T-Zellen zeigte sich im Gewebe am Ort der IRIS-Manifestation jedoch genau invers. Außerdem konnten wir bei IRIS-Patienten einen geringeren Anteil des Apoptose-vermittelnden Rezeptors Fas (CD95) detektieren. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten, die ein IRIS entwickelten, eine verminderte Anzahl von T_{reg} systemisch als auch im Duodenum auf. Nach Antibiotikagabe nahm das Verhältnis von aktivierten T-Zellen zu T_{reg} bei Patienten, bei denen kein IRIS auftrat ab, wohingegen es bei den IRIS-Patienten zugunsten der aktivierten T-Zellen zunahm.

Intestinale Barrierestörung beim M. Whipple

Intestinale Malabsorption und Diarrhoe sind Charakteristika des M. Whipple. Darüber hinaus ist für die Immunpathogenese ein immunmodulatorisches bzw. regulatorisches Milieu kennzeichnend. Im Gegensatz hierzu ist wiederum eine systemische Immunaktivierung zu verzeichnen. In diesem Kontext galt es die hierfür zugrunde liegenden Pathomechanismen mit dem Fokus auf die intestinale Barriere zu untersuchen. Dabei konnten wir in Biopsien von M. Whipple Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollproben eine duodenale Architekturstörung nachweisen, die mit einer hyperregenerativen mukosalen Transformation und Dedifferenzierung einherging. So zeigte sich eine Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie, welche mit einer vermehrten Enterozytenapoptose sowie einer reduzierten Expression des mukosalen Differenzierungsmarkers alkalischen Phosphatase assoziiert war. Die elektrophysiologischen Messungen und Flux-Experimente wiesen auf eine erhöhte duodenale Permeabilität für osmotisch aktive Elektrolyte und Makromoleküle hin. Während beim R^{sub} keine Unterschiede zu verzeichnen waren, zeigte sich R^{epi} bei unbehandelten M. Whipple Patienten vermindert. Funktionell zeigte sich die erhöhte Permeabilität gegenüber niedrigmolekularen osmotisch wirksamen Teilchen durch eine bei M. Whipple Patienten gesteigerte epitheliale Mannitoldurchlässigkeit. Eine aktive Ionensekretion im Dünndarm ließ sich nicht detektieren. Eine Barrierestörung konnte ebenfalls für Makromoleküle nachgewiesen werden. So zeigte sich die Permeabilität für FD4 und HRP in den Fluxmessungen bei unbehandelten M. Whipple Patienten erhöht. Die biologische Signifikanz der makromolekularen mukosalen Barrierestörung wurde durch den Nachweis erhöhter Serummarker einer MT (LPS, LBP und sCD14) unterstrichen. Die duodenale Architektur- und Permeabilitätsstörung zeigte sich unter antibiotischer Therapie teilweise rückläufig. Das strukturelle Korrelat für die beobachtete mikro- und makromolekulare Barrierestörung bildete eine veränderte Expression der transmembranalen Proteine Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3 und Tricellulin. In dieser Studie identifizierten wir eine erhöhte duodenale Sekretion von TNF- α , IL-4, IL-13 und sCD14 als potentielle Mediatoren der epithelialen Apoptose und veränderten Tight junction-Proteinexpression bei M. Whipple Patienten.

Diskussion ⁽¹⁻³⁾

Einer hohen Seroprävalenz von *T. whipplei*-Antikörpern, als auch der hohen Anzahl selbstlimitierender akuter Infektionen und asymptomatischen Trägerschaft, steht nur eine geringe chronische Manifestationsrate gegenüber.(4, 27) Hieraus wurde geschlussfolgert, dass Patienten, die einen klassischen M. Whipple entwickeln, eine zugrunde liegende Prädisposition haben müssen.(28) Diese Arbeit sollte deshalb in dem Kontext der bisher bekannten Immunpathogenese weitere Erkenntnisse bezüglich der intestinalen Barriere, T_{regs} und dem IRIS erbringen.

Eine asymptomatische oder als Gastroenteritis, Pneumonie oder Bakteriämie symptomatische Erstinfektion nach fäkal-oralen Mensch-zu-Mensch Übertragung wurde bisher postuliert.(5) Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Translokation von *T. whipplei* über das Darmepithel erfolgt und nachfolgend der Erreger von APC in der LP aufgenommen wird (unveröffentlichte Daten: Friebel, Schumann, Moos, Schneider). In einer vorangegangenen Studie wurde bei Patienten mit einem M. Whipple *T. Whipplei* ebenfalls in duodenalen Epithelzellen nachgewiesen.(29) Die Aufnahme und Präsentation von *T. whipplei* durch APC geht in der Regel mit einer protektiven zellulären und humoralen Immunität einher.(28) Bei M. Whipple Patienten konnte jedoch gezeigt werden, dass *T. whipplei* die IL-12 Produktion durch DC und deren Reifung vermindert.(9) Dies wird als ein wichtiger Kernpunkt angesehen, da hierdurch eine IFN- γ assoziierte Th1- und klassische entzündliche Makrophagenpolarisation zugunsten tolerogener DC, alternativ aktivierter antiinflammatorischer Makrophagen und einer Th2-Antwort verändert wird.(5, 8) Eine pro-inflammatorische Reaktion wäre jedoch notwendig für eine suffiziente bakterielle Elimination von *T. whipplei*. In der Folge ließ sich auch eine verminderte Immunglobulinsynthese als weiterer wichtigen Baustein beobachten.(11) Es wird diskutiert, ob hier eine genetische Disposition für die beobachteten immunologischen Veränderungen (s. Tabelle 3) verantwortlich ist. So zeigte sich eine Assoziation zu den Allelen HLA-DRB1*13 und HLA-DQB1*06, die mit einer insuffizienten Antigenpräsentation einhergehen könnten.(30) Außerdem konnte bei M. Whipple Patienten gezeigt werden, dass deren genetisches Zytokinprofil mit einer geringen Produktionsrate von TGF- β 1 und einer erhöhten für IL-4 verbunden war.(31) Allerdings scheinen diese Polymorphismen ähnlich wie die HLA-Allel-Assoziation nicht kausal mit dem Auftreten eines M. Whipple verbunden zu sein, vielmehr sind sie als zusätzliche Verstärker zu sehen. Trotzdem bleibt unklar, warum ein derart weit verbreitetes Bakterium nur mit einer so geringen chronischen Manifestationsrate einhergeht.

Außerdem erscheint ein primärer T-Zell Defekt als wenig wahrscheinlich. So treten bei M. Whipple Patienten nicht vermehrt opportunistische Infektionen auf und immunsupprimierte HIV-Patienten mit einem T-Zell-Defekt sind nicht häufiger von einem M. Whipple betroffen.(10) Deshalb scheint erst die Infektion mit *T. whipplei* in einem bestimmten vulnerablen Patientenkollektiv durch sekundäre immunologische Veränderungen dessen Ausbreitung zu begünstigen.

Neben der Verschiebung hin zu einem alternativ aktivierten anti-inflammatorischen Makrophagenphänotyp, ist auch eine durch IL-16 und durch einen verminderten oxidativen Burst bedingte verminderte Eliminationskapazität für *T. whipplei* ermittelt worden.(8, 32, 33) An dem Ort der primären Infektion kommt es letztlich über Jahre durch die verminderte pro-inflammatorische Antwort zu einer Akkumulation von *T. whipplei* in APC der LP.(28) In der aktuellen Studie konnten wir zeigen, dass eine vermehrte Infiltration und Aktivität von T_{regs} diese Vorgänge unterstützen könnte. Eine gesteigerte T_{reg} Aktivität führte auch zu einer T-Zell-Anergie und verstärkt somit die fehlende Immunkapazität.(1)

Im Gegensatz hierzu findet sich systemisch ein inflammatorisches Geschehen. Bei Patienten mit einem klassischen M. Whipple lassen sich neben Fieber, eine Leuko- und Thrombozytose beobachten, die BSG und das CRP sind erhöht und die CD4/CD8-Ratio vermindert.(7) Außerdem wurde in einer aktuellen Studie eine gesteigerte unspezifische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen systemisch nachgewiesen. In der LP zeigten sich diese Veränderungen nicht.(12) Diese Beobachtung reiht sich in das bisher beschriebene regulatorische Milieu ein. Neben der massiven Infiltration durch *T. whipplei* wurde die Architektur und Integrität der mukosalen Barriere bisher nicht beschrieben. Im Rahmen der Studie konnten wir zeigen, dass bei unbehandelten M. Whipple Patienten durch Apoptose und Dedifferenzierung sowie Dysregulation der Tight Junction Komplexe eine Barriestörung hervorgerufen wird. Die Barriestörung ist insofern von Bedeutung als das hiermit eine MT einhergeht.(3) Das besondere immunologische Milieu beim M. Whipple begünstigt durch eine verminderte Eliminationskapazität eine systemische Ausbreitung. In diesem Zusammenhang sind auch die erhöht nachweisbaren Surrogatmarker einer MT zu verstehen.(3) Auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der HIV-Enteropathie konnte man eine durch die MT bedingte, verstärkende entzündliche Komponente beobachten.(34) Wir postulieren deshalb, dass eine intestinale Barriestörung beim M. Whipple systemisch eine pro-inflammatorische Antwort vermittelt.

Das IRIS stellt eine häufige Komplikation nach Initiierung der antibiotischen Behandlung des M. Whipple dar.(14) Eine niedrige CD4⁺ T-Zell-Zahl bei Diagnosestellung konnte als Risikofaktor identifiziert werden. Eine verminderte gegenregulatorische Kapazität von T_{regs} scheint mit für die

Effektor-T-Zell-Rekonstitution und für das daraus folgende inflammatorische Geschehen verantwortlich zu sein.(2) Bisher existierende Daten deuteten einen Zusammenhang mit einer vorangegangenen Immunsuppression meist aufgrund einer fehldiagnostizierten rheumatologischen Erkrankung und dem Auftreten eines IRIS beim M. Whipple an.(13) Die Dauer der Immunsuppression korrelierte in unserer Studie mit einer niedrigen CD4⁺ T-Zell-Zahl.(2) Interessanterweise wiesen IRIS Patienten im Vergleich zu jenen mit einem klassischen M. Whipple eine stärkere Barrierestörung auf (unveröffentlichte Daten: Friebel, Moos, Schneider). Da wir zeigen konnten, dass die gesteigerte T-Zell-Reaktivität nicht durch *T. whipplei* selbst ausgelöst wurde, könnte indes eine ausgeprägtere Barrierestörung, welche zu einem verstärkten Priming des Immunsystems führen würde, nach Initiierung der Behandlung, Auslöser der überschießenden inflammatorischen Immunantwort sein.(2) Ein ähnliches Modell wurde bereits beim HIV-assoziierten IRIS postuliert.(35)

Tabelle 3. Übersicht immunologischer Veränderungen beim M. Whipple und IRIS

Allgemein	(7)	CRP↑, BSG↑, Leukozytose, Thrombozytose
GI-Barriere	(3)	TNF- α und IL-13 \rightarrow Barrierestörung \rightarrow MT↑
Genotyp	(30)	HLA-Allele DRB*13 und DQB1*06
T-Zellen	(33)	CD4/CD8 Ratio↓
	(12)	Aktivierung und Zytotoxizität CD8 ⁺ T-Zellen↑; <i>T. whipplei</i> -spezifische Aktivierung CD8 ⁺ T-Zellen↓
	(1, 33, 36)	Th1-Antwort↓; Th2-Antwort↑
	(1)	T _{reg} Infiltration und Funktion↑; T-Zell-Anergie↑
Monozyten/ Makrophagen	(32, 33)	IL-16↑ \rightarrow <i>T. whipplei</i> Phagozytose und Degradation↓ (Hemmung der Phagosom-Lysosom-Fusion); CD11b↓
	(8)	<i>T. whipplei</i> \rightarrow oxidativer Burst↓
	(37, 38)	IFN- β \rightarrow Apoptose↑
	(8, 31, 32, 36, 38, 39)	Alternativ aktivierte Makrophagen↑ (CCL18, IL-4, IL-10, TGF- β)↑ (IL-2, IL-12, IFN- γ)↓
DC	(9)	IL-12↓; Reifung↓; <i>T. whipplei</i> Transport
B-Zellen	(11)	B-Zellen↓; IgA↓, IgG2↓, IgM↓
IRIS	(2)	CD4 ⁺ T-Zellrekonstitution; T _{reg} Regulation↓

↑erhöht; ↓vermindert

Charakteristische Symptommanifestation beim klassischen M. Whipple ist der Gastrointestinaltrakt mit chronischer Diarrhoe und Zeichen der Malabsorption.(7) Obwohl diese Konstellation eine Dünndarmdysfunktion anzeigt, konnte der ursächliche Pathomechanismus bis jetzt noch nicht hinreichend aufgeklärt werden. Daher galt es zu untersuchen inwieweit die mukosale Infektion beim M. Whipple mit den zu beobachtenden gastrointestinalen Symptomen verbunden ist. In der aktuellen Studie konnten wir eine mukosale Architekturstörung nachweisen, die durch eine gesteigerte Apoptoserate und hyperregenerative Dedifferenzierung des Oberflächenepithels charakterisiert war. Eine daraus resultierende verminderte Absorptionskapazität sowie erhöhte Permeabilität mit einem passiven Efflux von Natrium, Chlorid und Wasser scheinen ursächlich für die beobachtete Diarrhoe zu sein. (3) Eine Leckflux-Diarrhoe konnte auch bereits bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der HIV-assoziierten Enteropathie nachgewiesen werden.(40, 41) Wir konnten außerdem zeigen, dass für die beobachteten Veränderungen kein aktiver transepithelialer Ionentransport zugrunde lag, sondern ein passiver parazellulärer. Dazu passend ließ sich eine Dysregulation der Tight junction Proteinkomplexe beobachten.(3, 42-44) Die Herunterregulation von Tricellulin verursachte zusätzlich eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle.(3, 45) Als potentielle Mediatoren identifizierten wir dabei TNF- α und IL-13.(3, 46, 47) Neben der zu beobachtenden chronischen Diarrhoe wurde *T. whipplei* bereits in Verbindungen mit einer akuten Gastroenteritis gebracht (18, 20, 25). Wir konnten zeigen, dass durch die Infektion mit *T. whipplei* eine Enterozytenapoptose und daraus folgend eine akute Barrierestörung verursacht wurde (unveröffentlichte Daten: Friebel, Schumann, Moos, Schneider). Dies unterstreicht die Bedeutung von *T. whipplei* als Pathogen auch über den klassischen M. Whipple hinaus und lässt einen *T. whipplei*-spezifischen Mechanismus vermuten. Trotz der noch uneinheitlichen Datenlage bezüglich eines protektiven Nutzens, sollten bezogen auf die hier beobachteten Veränderungen beim M. Whipple, Barriere-modulierende und -rekonstituierende Therapien zur symptomatischen Kontrollen als auch Immunregulation diskutiert werden.(48, 49)

Zusammenfassend konnten wir also zeigen, dass T_{reg} zu der beschriebenen Immunmodulation beim M. Whipple beitragen und dass IRIS durch eine verminderte gegenregulatorische T_{reg}-Kapazität bedingte CD4⁺ T-Zell-Rekonstitution vermittelt wird. Die mukosale Immunantwort ist für die Barrierestörung beim klassischen M. Whipple verantwortlich. Sie stellt zum einen durch einen Verlust von Absorptionskapazität sowie eine Leckflux von Ionen und Wasser die Ursache der Diarrhoe dar. Zum anderen ist sie durch eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle und die daraus folgende vermehrte MT ein Mediator der systemischen Entzündungsreaktion.

Literaturverzeichnis

1. Schinnerling K, Moos V, Geelhaar A, Allers K, Loddenkemper C, Friebel J, Conrad K, Kühl AA, Erben U. Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease. *The Journal of Immunology*. 2011;187(8):4061-7.
2. Moos V, Feurle GE, Schinnerling K, Geelhaar A, Friebel J, Allers K, Moter A, Kikhney J, Loddenkemper C, Kühl AA, Erben U, Fenollar F, Raoult D, Schneider T. Immunopathology of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Whipple's Disease. *The Journal of Immunology*. 2013;190(5):2354-61.
3. Epple HJ, Friebel J, Moos V, Troeger H, Krug SM, Allers K, Schinnerling K, Fromm A, Siegmund B, Fromm M, Schulzke JD, Schneider T. Architectural and functional alterations of the small intestinal mucosa in classical Whipple's disease. *Mucosal Immunology*. 2017;10:1542.
4. Keita AK, Raoult D, Fenollar F. *Tropheryma whippelii* as a commensal bacterium. *Future Microbiology*. 2013;8(1):57-71.
5. Marth T, Moos V, Müller C, Biagi F, Schneider T. *Tropheryma whippelii* infection and Whipple's disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(3):e13-e22.
6. El-Abassi R, Soliman MY, Williams F, England JD. Whipple's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;377:197-206.
7. Günther U, Moos V, Offenmüller G, Oelkers G, Heise W, Moter A, Loddenkemper C, Schneider T. Gastrointestinal Diagnosis of Classical Whipple Disease: Clinical, Endoscopic, and Histopathologic Features in 191 Patients. *Medicine*. 2015;94(15):e714.
8. Moos V, Schmidt C, Geelhaar A, Kunkel D, Allers K, Schinnerling K, Loddenkemper C, Fenollar F, Moter A, Raoult D, Ignatius R, Schneider T. Impaired Immune Functions of Monocytes and Macrophages in Whipple's Disease. *Gastroenterology*. 2010;138(1):210-20.
9. Schinnerling K, Geelhaar-Karsch A, Allers K, Friebel J, Conrad K, Loddenkemper C, Kühl AA, Erben U, Ignatius R, Moos V, Schneider T. Role of Dendritic Cells in the Pathogenesis of Whipple's Disease. *Infection and Immunity*. 2015;83(2):482-91.
10. Moos V, Schneider T. The role of T cells in the pathogenesis of classical Whipple's disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012;10(3):253-5.
11. Geelhaar A, Moos V, Schinnerling K, Allers K, Loddenkemper C, Fenollar F, LaScola B, Raoult D, Schneider T. Specific and Nonspecific B-Cell Function in the Small Intestines of Patients with Whipple's Disease. *Infection and Immunity*. 2010;78(11):4589-92.
12. Trotta L, Weigt K, Schinnerling K, Geelhaar-Karsch A, Oelkers G, Biagi F, Corazza GR, Allers K, Schneider T, Erben U, Moos V. Peripheral T-Cell Reactivity to Heat Shock Protein 70 and Its Cofactor GrpE from *Tropheryma whippelii* Is Reduced in Patients with Classical Whipple's Disease. *Infection and Immunity*. 2017;85(8):e00363-17.
13. Biagi F, Trotta L, Di Stefano M, Balduzzi D, Marchese A, Vattiato C, Bianchi PI, Fenollar F, Corazza GR. Previous immunosuppressive therapy is a risk factor for immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease. *Digestive and Liver Disease*. 2012;44(10):880-2.

14. Feurle GE, Moos V, Schinnerling K, Geelhaar A, Allers K, Biagi F, Bläker H, Moter A, Loddenkemper C, Jansen A, Schneider T. The immune reconstitution inflammatory syndrome in whipple disease: A cohort study. *Annals of Internal Medicine*. 2010;153(11):710-7.
15. Lagier J-C, Raoult D. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with bacterial infections. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2014;13(3):341-50.
16. Lagier JC, Papazian L, Fenollar F, Edouard S, Melenotte C, Laroumagne S, Michel G, Martin C, Gainnier M, Lions C, Carrieri P, Stein A, Brouqui P, Raoult D. *Tropheryma whipplei* DNA in bronchoalveolar lavage samples: a case control study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(10):875-9.
17. Fenollar F, Lagier J-C, Raoult D. *Tropheryma whipplei* and Whipple's disease. *Journal of Infection*. 2014;69(2):103-12.
18. Gautret P, Lagier J-C, Benkouiten S, Fenollar F, Raoult D, Brouqui P. Does *Tropheryma whipplei* contribute to travelers' diarrhea?: A PCR analysis of paired stool samples in French travelers to Senegal. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2014;12(3):264-7.
19. Bousbia S, Papazian L, Auffray J-P, Fenollar F, Martin C, Li W, Chiche L, La Scola B, Raoult D. *Tropheryma whipplei* in Patients with Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(2):258-63.
20. Raoult D, Fenollar F, Rolain J-M, Minodier P, Bosdure E, Li W, Garnier JM, Richet H. *Tropheryma whipplei* in Children with Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(5):776-82.
21. Fenollar F, Mediannikov O, Socolovschi C, Bassene H, Diatta G, Richet H, Tall A, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. *Tropheryma whipplei* Bacteremia during Fever in Rural West Africa. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;51(5):515-21.
22. Greub G. A New Piece Added to the Whipple Puzzle: *Tropheryma whipplei* Primary Infection with Bacteremia and Cough. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;51(5):522-4.
23. Fenollar F, Célard M, Lagier J-C, Lepidi H, Fournier P-E, Raoult D. *Tropheryma whipplei* Endocarditis. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(11):1721-30.
24. García-Álvarez L, Pérez-Matute P, Blanco JR, Ibarra V, Oteo JA. High prevalence of asymptomatic carriers of *Tropheryma whipplei* in different populations from the North of Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016;34(6):340-5.
25. Gautret P, Benkouiten S, Parola P, Brouqui P, Memish Z, Raoult D. Occurrence of *Tropheryma whipplei* during diarrhea in Hajj pilgrims: A PCR analysis of paired rectal swabs. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2014;12(5):481-4.
26. Raoult D, Birg ML, Scola BL, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, Roux V, Piette JC, Vandenesch F, Vital-Durand D, Marrie TJ. Cultivation of the Bacillus of Whipple's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(9):620-5.
27. Keita AK, Bassene H, Tall A, Sokhna C, Ratmanov P, Trape J-F, Raoult D, Fenollar F. *Tropheryma whipplei*: A Common Bacterium in Rural Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(12):e1403.
28. Schneider T, Moos V, Loddenkemper C, Marth T, Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease: new aspects of pathogenesis and treatment. *The Lancet Infectious Diseases*. 2008;8(3):179-90.

29. Audoly G, Fenollar F, Lagier J-C, Lepidi H, Raoult D. Deglycosylation of *Tropheryma whippelii* biofilm and discrepancies between diagnostic results during Whipple's disease progression. *Scientific Reports*. 2016;6:23883.
30. Martinetti M, Biagi F, Badulli C, Feurle GE, Müller C, Moos V, Schneider T, Marth T, Marchese A, Trotta L, Sachetto S, Pasi A, De Silvestri A, Salvaneschi L, Corazza GR. The HLA Alleles DRB1*13 and DQB1*06 Are Associated to Whipple's Disease. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2289-94.
31. Biagi F, Badulli C, Feurle GE, Müller C, Moos V, Schneider T, Marth T, Mytilineos J, Garlaschelli F, Marchese A, Trotta L, Bianchi PI, Di Stefano M, Cremaschi AL, De Silvestri A, Salvaneschi L, Martinetti M, Corazza GR. Cytokine genetic profile in Whipple's disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31(11):3145-50.
32. Ghigo E, Barry AO, Pretat L, Al Moussawi K, Desnues B, Capo C, Kornfeld H, Mege JL. IL-16 Promotes *T. whippelii* Replication by Inhibiting Phagosome Conversion and Modulating Macrophage Activation. *PLOS ONE*. 2010;5(10):e13561.
33. Marth T, Roux M, von Herbay A, Meuer SC, Feurle GE. Persistent Reduction of Complement Receptor 3 α -Chain Expressing Mononuclear Blood Cells and Transient Inhibitory Serum Factors in Whipple's Disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994;72(2):217-26.
34. Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2017;4(1):33-46.
35. Barber DL, Andrade BB, Sereti I, Sher A. Immune reconstitution inflammatory syndrome: the trouble with immunity when you had none. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(2):150-6.
36. Marth T, Kleen N, Stallmach A, Ring S, Aziz S, Schmidt C, Strober W, Zeitz M, Schneider T. Dysregulated peripheral and mucosal Th1/Th2 response in Whipple's disease. *Gastroenterology*. 2002;123(5):1468-77.
37. Gorvel L, Al Moussawi K, Ghigo E, Capo C, Mege JL, Desnues B. *Tropheryma whippelii*, the Whipple's disease bacillus, induces macrophage apoptosis through the extrinsic pathway. *Cell Death & Disease*. 2010;1(4):e34.
38. Al Moussawi K, Ghigo E, Kalinke U, Alexopoulou L, Mege J-L, Desnues B. Type I Interferon Induction Is Detrimental during Infection with the Whipple's Disease Bacterium, *Tropheryma whippelii*. *PLOS Pathogens*. 2010;6(1):e1000722.
39. Geelhaar-Karsch A, Schinnerling K, Conrad K, Friebel J, Allers K, Schneider T, Moos V. Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens. *Inflammation Research*. 2013;62(9):865-9.
40. Barmeyer C, Fromm M, Schulzke J-D. Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2017;469(1):15-26.
41. Eppele H-J, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, Amasheh M, Loddenkemper C, Fromm M, Zeitz M, Schulzke JD. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut*. 2009;58(2):220-7.

42. Günzel D. Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2017;469(1):35-44.
43. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*. 2013;93(2):525-69.
44. Rita R, Dorothee G, Dian T, Carolina C, Jörg-Dieter S, Michael F. Water channels and barriers formed by claudins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;1397(1):100-9.
45. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;36:166-76.
46. John LJ, Fromm M, Schulzke J-D. Epithelial Barriers in Intestinal Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15(5):1255-70.
47. Krug SM, Bojarski C, Fromm A, Lee IM, Dames P, Richter JF, Turner JR, Fromm M, Schulzke JD. Tricellulin is regulated via interleukin 13 receptor $\alpha 2$, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal immunology*. 2017:10.1038/mi.2017.52.
48. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2017;14(1):9-21.
49. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 2014;14:189.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julian Friebel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunregulation, intestinale Barrierestörung und mikrobielle Translokation beim Morbus Whipple“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung

Julian Friebel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schinnerling K., Moos V., Geelhaar A., Allers K., Loddenkemper C., **Friebel J.**, Conrad K., Kühl AA., Erben U., Schneider T. Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease. The Journal of Immunology, October 15, 2011, 187 (8) 4061-4067, doi: 10.4049/jimmunol.1101349.

Beitrag im Einzelnen:

Studienkonzipierung und -design:

Das Konzept und Design der Studie wurde durch die Autoren gemeinsam erarbeitet.

Datenerhebung:

Aufgabe war die die klinische Charakterisierung der Patienten und Kontrollen. Biopsien, histologische Färbungen und Mikroskopie (Abbildung 1) wurden durch mich erarbeitet. Die duodenalen systemischen Zytokine (Abbildung 3) wurden mittels CBA bestimmt. Außerdem war ich an den durchflusszytometrischen Methoden beteiligt (Abbildung 2, 4, 5).

Datenanalyse und Dateninterpretation:

An der Aufarbeitung und Analyse der erhobenen Daten war ich beteiligt. Der Schwerpunkt der eigenständigen Arbeit lag in der Histologie und Messung der Zytokinproduktion. Dies beinhaltete auch die Dateninterpretation.

Verfassen des Manuskriptes und Revision:

An der Erstellung des Manuskriptes, dem Prozess der Weiterverarbeitung, Verfeinerung und finalen Revision, beteiligte ich mich neben den anderen Autoren.

Publikation 2:

Moos V., Feurle GE., Schinnerling K., Geelhaar A., **Friebel J.**, Allers K., Moter A., Kikhney J., Loddenkemper C., Kühl AA., Erben U., Fenollar F., Raoult D., Schneider T. Immunopathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease. The Journal of Immunology, 2013 Mar 1;190(5):2354-61, doi: 10.4049/jimmunol.1202171.

Beitrag im Einzelnen:

Studienkonzipierung und -design:

Das Konzept und Design der Studie wurde durch die Autoren gemeinsam erarbeitet.

Datenerhebung:

Aufgabe war die die klinische Charakterisierung der Patienten und Kontrollen anhand der Krankengeschichte und erhobener Befunde. Biopsien und histologische Färbungen und Mikroskopie (Abbildung 1, 2a, 5) wurden durch mich erarbeitet. IL-10 wurde mittels CBA gemessen (Abbildung 4a). Außerdem war ich an den durchflusszytometrischen Methoden beteiligt (Abbildung 2b-c, 3, 4, 5a).

Datenanalyse und Dateninterpretation:

An der Aufarbeitung und Analyse der erhobenen Daten war ich ebenfalls beteiligt. Der Schwerpunkt der selbstständigen Arbeit lag in der Histologie und Bestimmung der Zytokinproduktion. Dies beinhaltete auch die Dateninterpretation.

Verfassen des Manuskriptes und Revision:

An der Erstellung des Manuskriptes, dem Prozess der Weiterverarbeitung, Verfeinerung und finalen Revision beteiligte ich mich neben den anderen Autoren.

Publikation 3:

H-J Epple*, **J Friebel***, V Moos*, H Troeger, SM Krug, K Allers, K Schinnerling, A Fromm, B Siegmund, M Fromm, JD Schulzke*, T Schneider*. Architectural and functional alterations of the small intestinal mucosa in classical Whipple's disease. Mucosal Immunology, 2017 Nov;10(6):1542-1552. doi: 10.1038/mi.2017.6. Epub 2017 Feb 8.

*These authors contributed equally to this work.

Beitrag im Einzelnen:

Studienkonzipierung und -design:

Die Erarbeitung der Fragestellung sowie die Erstellung des Konzepts und Designs für diese Studie wurde durch mich, Dr. Verena Moos und PD Dr. Hans-Jörg Epple unter der Verantwortung von Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke durchgeführt.

Datenerhebung:

Die Datenerhebung erfolgte am Standort Charité Campus Benjamin Franklin in Zusammenarbeit der Klinik für Gastroenterologie und dem Institut für Klinische Physiologie. Aufgabe von mir war es selbstständig alle der in der Datenbank vorhandenen Patienten mit einem M. Whipple sowie Kontrollprobanden zu charakterisieren. Hierbei war es notwendig, dass ich die gesamte Krankengeschichte und Befunde aller potentiellen Patienten und Kontrollen evaluierte und für das Studienkonzept geeignete Patienten und Kontrollen eigenständig auswählte. Geeignete Biopsien, Biopsieüberstände und Blutproben musste ich dann identifizieren, den Bestand feststellen und bereitstellen. Die histologische Aufarbeitung der Proben wurde durch mich eigenständig durchgeführt (Abbildung 1 und 5a-b). Zu den einzelnen Schritten gehörte dabei die Auswahl geeigneter Antikörper und Reagenzien, die Vortestung dieser, die Anwendung an den ausgewählten Schnitten, die qualitative und quantitative mikroskopische Auswertung sowie die Generierung der für die Publikation erforderlichen Bilder. Dazu gehörte auch der Abgleich mit Negativ- und Positivkontrollen. Für morphometrische Analysen (Abbildung 1b) musste ich zuerst verschiedene Bildbearbeitungsprogramme evaluieren und dann einen Auswertalgorithmus erstellen. Die Plasmamarker einer mikrobiellen Translokation wählte ich nach entsprechender Recherche aus. Die ELISA-Versuche einschließlich der erforderlichen Vortestungen wurden von mir eigenständig erarbeitet (Abbildung 3b). Die Zytokine in den

Biopsieüberständen wurden mittels CBA bzw. ELISA durch mich gemessen (Abbildung 5c-f). Die Durchführung der Westernblotversuche (4a-b), wurde an den von mir identifizierten Proben durch mich mit der Hilfe von Anja Fromm vorgenommen. Die elektrophysiologischen Analysen (Abbildung 2, 3a und Text) geschahen initial durch Anja Fromm und PD Dr. Hans-Jörg Epple und wurden im Rahmen der aktuellen Zusammenstellung in Zusammenarbeit mit mir ausgewertet.

Datenanalyse und Dateninterpretation:

Die Analyse der elektrophysiologischen Messungen und Westernblotuntersuchungen geschah durch mich zusammen mit dem Institut für Klinische Physiologie. Die primäre Datenanalyse der histologischen und serologischen Parameter sowie der Zytokinantwort wurde von mir eigenständig durchgeführt. Dies beinhaltete die quantitative Datengenerierung als auch deren Zusammenstellung und statistische Auswertung. Die abschließende Dateninterpretation erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Dr. Verena Moos und PD Dr. Hans-Jörg Epple unter der Verantwortung von Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke.

Verfassen des Manuskriptes und Revision:

Das Manuskript und die Abbildungen wurden von mir selbstständig angefertigt. Die finalen Abbildungen wurden zusammen mit Dr. Verena Moos und PD Dr. Hans-Jörg Epple erarbeitet. Die weitere Korrektur erfolgte durch die Gesamtheit der Koautoren. An der finalen Revision des Manuskripts waren neben mir Dr. Verena Moos und PD Dr. Hans-Jörg Epple unter der Verantwortung von Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider, und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

Schinnerling K., Moos V., Geelhaar A., Allers K., Loddenkemper C., **Friebel J.**, Conrad K., Kühl AA., Erben U., Schneider T. Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease. The Journal of Immunology, October 15, 2011, 187 (8) 4061-4067, doi: 10.4049/jimmunol.1101349.

IF: 6.78

Publikation 2:

Moos V., Feurle GE., Schinnerling K., Geelhaar A., **Friebel J.**, Allers K., Moter A., Kikhney J., Loddenkemper C., Kühl AA., Erben U., Fenollar F., Raoult D., Schneider T. Immunopathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease. The Journal of Immunology, 2013 Mar 1;190(5):2354-61, doi: 10.4049/jimmunol.1202171.

IF: 6.17

Publikation 3:

H-J Epple*, **J Friebel***, V Moos*, H Troeger, SM Krug, K Allers, K Schinnerling, A Fromm, B Siegmund, M Fromm, JD Schulzke*, T Schneider*. Architectural and functional alterations of the small intestinal mucosa in classical Whipple's disease. Mucosal Immunology, 2017 Nov;10(6):1542-1552. doi: 10.1038/mi.2017.6. Epub 2017 Feb 8.

*These authors contributed equally to this work.

IF: 7.36

Schinnerling K, Moos V, Geelhaar A, Allers K, Loddenkemper C, Friebel J, Conrad K, Kühl AA, Erben U. **Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease.** The Journal of Immunology. 2011;187(8):4061-7.

DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101349>

Moos V, Feurle GE, Schinnerling K, Geelhaar A, Friebe J, Allers K, Moter A, Kikhney J, Loddenkemper C, Kühl AA, Erben U, Fenollar F, Raoult D, Schneider T. **Immunopathology of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Whipple's Disease.** The Journal of Immunology. 2013;190(5):2354-61.

DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202171>

Epple HJ, Friebel J, Moos V, Troeger H, Krug SM, Allers K, Schinnerling K, Fromm A, Siegmund B, Fromm M, Schulzke JD, Schneider T. **Architectural and functional alterations of the small intestinal mucosa in classical Whipple's disease.** Mucosal Immunology. 2017;10:1542.

DOI: <https://doi.org/10.1038/mi.2017.6>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Originalarbeiten in Zeitschriften mit peer review-Verfahren als Erstautor

1. Epple HJ.*, Friebel J.*, Moos V.*, Troeger H., Krug SM., Allers K., Schinnerling K., Fromm A., Siegmund B., Fromm M., Schulzke JD.*, Schneider T.*
Architectural and functional alterations of the small intestinal mucosa in classical Whipple's disease, *Mucosal Immunology*, 2017 Nov;10(6):1542-1552. doi: 10.1038/mi.2017.6. Epub 2017 Feb 8 **IF: 7.36**

*These authors contributed equally to this work.

2. Originalarbeiten in Zeitschriften mit peer review-Verfahren als Koautor

1. Schinnerling K., Moos V., Geelhaar A., Allers K., Loddenkemper C., **Friebel J.**, Conrad K., Kühl AA., Erben U., Schneider T.
Regulatory T Cells in Patients with Whipple's Disease. *The Journal of Immunology*, October 15, 2011, 187 (8) 4061-4067, doi: 10.4049/jimmunol.1101349 **IF: 6.78**
2. Moos V., Feurle GE., Schinnerling K., Geelhaar A., **Friebel J.**, Allers K., Moter A., Kikhney J., Loddenkemper C., Kühl AA., Erben U., Fenollar F., Raoult D., Schneider T.
Immunopathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease, *The Journal of Immunology*, 2013 Mar 1;190(5):2354-61, doi: 10.4049/jimmunol.1202171 **IF: 6.17**
3. Geelhaar-Karsch A., Schinnerling K., Conrad K., **Friebel J.**, Allers K., Schneider T., Moos V.
Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens, *Inflammation Research*, 2013 Sep;62(9):865-9, doi: 10.1007/s00011-013-0642-z **IF: 2.81**
4. Schinnerling K., Geelhaar-Karsch A., Allers K., **Friebel J.**, Conrad K., Loddenkemper C., Kühl AA., Erben U., Ignatius R., Moos V., Schneider T.
Role of Dendritic Cells in the Pathogenesis of Whipple's Disease, *Infection and Immunity*, 2015 Feb;83(2):482-91. doi: 10.1128/IAI.02463-14 **IF: 3.94**
5. Witkowski M., Steffens D., Hassanein A., Witkowski M., Kränkel N., Doerner A., **Friebel J.**, Landmesser U., Rauch U.

Dabigatran-related platelet thrombin response during triple anti-thrombotic therapy: A matter of time? *Thromb Res.* 2017 Jan;149:62-63. doi: 10.1016/j.thromres.2016.11.013. Epub 2016 Nov 14. **IF: ausstehend**

6. Witkowski M., Tabaraie T., Steffens D., **Friebel J.**, Dörner A., Skurk C., Witkowski M., Stratmann B., Tschoepe D., Landmesser U., Rauch U. MicroRNA-19a contributes to the epigenetic regulation of tissue factor in diabetes, *Cardiovasc Diabetol.* 2018 Feb 24;17(1):34. doi: 10.1186/s12933-018-0678-z. **IF: ausstehend**

3. Editorials/Comments/Briefe an den Herausgeber/die Herausgeberin

1. **Friebel J.**, Witkowski M., Rauch U. Treating the unstable atherosclerotic plaque by targeting activated factor X -- anticoagulation and beyond, *Circulation Journal*, 2015;79(11):2329-31, doi: 10.1253/circj.CJ-15-1017 **IF: 4.12**
2. Witkowski M., Steffens D., Hassanein A., Witkowski M., Kränkel N., Doerner A., **Friebel J.**, Landmesser U., Rauch U. Dabigatran-related platelet thrombin response during triple anti-thrombotic therapy: A matter of time? *Thrombosis Research*, 2017 Jan;149:62-63, doi: 10.1016/j.thromres.2016.11.013 **IF: 2.65**

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider und Dr. Verena Moos für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und vor allem für ihre immer freundliche und konstruktive Unterstützung bedanken, die wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen und mein Interesse und Faszination an der Immunologie und Infektiologie geweckt haben. Diese Unterstützung setzt sich auch noch über die Dissertation hinaus bei der Planung und Durchführung neuer Projekte fort.

Zum Gelingen der Arbeit haben natürlich alle aktiven und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Schneider beigetragen. Für die ausdauernde und geduldige Unterstützung (auch über die „letzten“ Experimente hinaus) sowie die herzliche Atmosphäre, möchte ich mich im besonderen Maße bei Kristina Allers, Diana Bösel, Kristina Conrad, Anika Geelhaar-Karsch, Nadine Gehrman, Laura Neumann, Katina Schinnerling, Martina Seipel und Kathleen Weigt bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie, welche auch eine über die Dissertation hinausgehende wissenschaftliche Tätigkeit ermöglicht und mein Methodenspektrum erweitert haben. Bedanken möchte ich mich hierbei bei Anja Fromm, Hans-Jörg Eppele, Dorothee Günzel, Claudia Heldt, Britta Jebautzke, Jörg-Dieter Schulzke und Michael Schumann.

Darüber hinaus bin ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg IMMUCO des DFG geförderten SFB 633 und der damit verbundenen Möglichkeit des regen wissenschaftlichen Austausches und der finanziellen Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Freundin bedanken, ohne deren Unterstützung und uneingeschränktes Verständnis die Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.