

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie CC 13
Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie (einschl.
Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)
Direktorin: Prof. Dr. B. Siegmund

Habilitationsschrift

Die mukosale Barriere bei Zöliakie

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Michael Schumann

Eingereicht: Februar 2020
Dekan: Prof. Dr. A.R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Hampe, Dresden
2. Gutachter: Prof. Dr. Sibylle Koletzko, München

Widmung

*Diese Arbeit ist
meiner wunderbaren kleinen Familie,
Imke, Karlotta, Federica und Marleen, gewidmet,
die für mich immer Inspiration und Ansporn zugleich sein werden
und meinen Eltern,
ohne deren Zutun ich nicht wäre, wo ich bin.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1. Zöliakie	8
1.1.1. Definition	8
1.1.2. Glutene	8
1.1.3. Immunpathologie der Zöliakie	9
1.1.4. Genetik	12
1.1.5. Refraktäre Zöliakie	13
1.2. Mukosale Barriere	14
1.2.1. Die Bausteine der mukosalen Barriere	14
1.2.2. Die Mukusschicht und antimikrobielle Peptide	14
1.2.3. Die parazelluläre epitheliale Barriere	15
1.2.4. Adherens Junction	16
1.2.5. Tight Junction	16
1.2.6. Die transzelluläre epitheliale Barriere	20
1.2.7. Rolle der epithelialen Polarität für die mukosale Barriere	21
2. Fragestellungen	24
3. Vorstellung eigener Arbeiten	25
3.1. Transzelluläre Aufnahme des 33mer-Gliadinpeptids	26
(i) Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue	
(ii) Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease	
3.2. Parazelluläre Barriere bei Zöliakie und Änderungen der Polarität	44
(iii) Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease	
(iv) Defective tight junctions in refractory celiac disease	
3.3. Der Sandwich-Assay – eine Orts-auflösende Methode zur Bestimmung der Permeabilität von Makromolekülen durch eine Mukosa	64
(v) A novel method for imaging sites of paracellular passage of macromolecules in epithelial sheets	
4. Diskussion	75
4.1. Kernbefunde der Arbeit	75
4.2. Im Rahmen dieser Arbeit entstandene methodische Neuerung	75
4.3. Der Zöliakie-assoziierte Barriere defekt	76
4.4. Etablierte und nicht etablierte Ursachen der Zöliakie	78
4.5. Perspektive: Was sind die sich anschließenden Fragestellungen?	80
5. Zusammenfassung und Abstract	82

6. Literaturverzeichnis	84
7. Danksagung	89
8. Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité	91

IEL	Intraepithelialer Lymphozyt
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
JAM-A	Junktionales Adhäsionsmolekül-A (<i>engl. junctional adhesion molecule-A</i>)
kDa	Kilodalton
LKB1	Leber-Kinase-B1 (<i>engl. liver kinase B1</i>)
LLGL	Letales Riesenlarven-Protein (<i>engl. lethal (2) giant larvae</i>)
MAGI	Membran-assoziierte Guanylatkinase (<i>engl. membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein</i>)
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) mit nachgeschalteter Flugzeitanalyse (<i>engl. time of flight, TOF</i>)
MARVEL	MAL und verwandte Proteine für Vesikelbewegung und Membranassoziation (<i>engl. MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link</i>)
mbCD	Methyl- β -cyclodextrin
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl. major histocompatibility complex</i>)
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase (<i>engl. myosin light chain kinase</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>engl. molecular weight</i>)
μm	Mikrometer
NA	Nicht anwendbar
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle (<i>engl. natural killer cell</i>)
NZWS	Nicht-Zöliakie-Weizensensitivität
OA	Okadasäure (<i>engl. ocadaic acid</i>)
p31-49	p31-49-19mer des α 2-Gliadin (Sequenz: LGQQQPFPPQQPYPQPQPF)
p57-68	p57-68-12mer des α 2-Gliadin (Sequenz: QLQPFQPQLPY)
p202-220	p202-220-19mer des α 2-Gliadin (Sequenz: QQYPLGQGSFRPSQQNPQA)
Par	Partitionierungsdefekt-Protein (<i>engl. partitioning defective-protein</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>engl. polymerase chain reaction</i>)
pdz-Domäne	Proteindomäne ähnlich den Proteinen <i>PSD95/SAP90</i> , <i>Discs large</i> oder <i>ZO-1</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat
PP	Peyer'sche Plaques (<i>engl. Peyer's patch</i>)
PP-1/-2A	Proteinphosphatase-1/-2A
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog (<i>engl. phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase</i>)
Rab-GTPase	Kleine GTPase vom Typ Rab (<i>engl. Ras-related in brain</i>)
RCD	Refraktäre Zöliakie (<i>engl. refractory celiac disease</i>)
RP-HPLC	Reverse Phase-Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (<i>engl. reverse phase high pressure liquid chromatography</i>)
SH3	Src-Homologie-3-ähnliche-Domäne
SigA	Sekretorische IgA
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>engl. single nucleotide polymorphism</i>)
STK11	Serin/Threonin-Proteinkinase-11 (<i>engl. serine/threonine kinase-11</i>)
TAMP	TJ-assoziiertes MARVEL-Protein
TER	Transepithelialer Widerstand (<i>engl. transepithelial resistance</i>)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>engl. transforming growth factor-β</i>)

TJ	Schlussleistenkomplex (<i>engl. tight junction</i>)
tTG	Gewebstransglutaminase (<i>engl. tissue transglutaminase</i>)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
ZO	Zonula occludens-Protein (<i>engl. zonula occludens protein</i>)

1. Einleitung

1.1. Zöliakie

1.1.1. Definition

Bei der Zöliakie handelt es sich um eine chronische, immun-vermittelte Dünndarmerkrankung, die bei genetisch Prädisponierten durch die Aufnahme der in Getreiden exprimierten Glutene initiiert wird und die daher durch Einhaltung einer glutenfreien Diät in Remission gebracht werden kann.

1.1.2. Glutene

Der Auslöser der intestinalen Immunreaktion bei Zöliakie sind die Glutene, pflanzliche Speicherproteine, die in verschiedenen Getreidesorten vorkommen. Aufgrund ihrer besonderen Kleber-Eigenschaften (lat. glüten, Leim) verleihen sie dem Getreidemehl die typischen Backeigenschaften. Glutene sind Teil des sog. Mehlkörpers der Getreidekörner und stellen ein Proteingemisch dar, das im Falle des Weizens nach seiner Alkohollöslichkeit in die Alkohol-löslichen Gliadine und die Alkohol-unlöslichen Glutenine unterteilt wird (**Tabelle 1**). Sowohl in der Peptidsequenz der Gliadine als auch der Glutenine finden sich Oligopeptidsequenzen, die T-Zell-vermittelt die Immunreaktion bei Zöliakie auslösen bzw. unterhalten können.[1-4]

Tabelle 1: In Getreiden vorkommende, Enteropathie-auslösende Proteine (nach Schumann, Siegmund, *Gluten-Enteropathie, in Stange (Ed.), Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Schattauer 2015 [5]*)

Proteinklasse	Fraktionen	Triggert Immunreaktion bei...
Glutene	Prolamine (alkohollöslich)	
	Weizen: Gliadine	Zöliakie
	Roggen: Secaline	Zöliakie
	Gerste: Hordeine	Zöliakie
	Hafer: Avenine	-
	Mais: Zeine	-
	Gluteline (alkoholunlöslich)	
	Weizen: Glutenine	Zöliakie
	Roggen: Secalinine	Zöliakie
	Gerste: Hordenine	Zöliakie
	Hafer: Avenine	-
	Mais: Zeanine	-
Amylase-Trypsin-Inhib. (ATI)		Zöliakie & Weizensensitivität (?)

1.1.3. Immunpathologie der Zöliakie

Wird Gluten mit der Nahrung aufgenommen, kommt es bei einem genetisch Prädisponierten zur Zöliakie-typischen Immunreaktion des Mukosa-assoziierten Immunsystems (**Abb. 1**).[5-7]

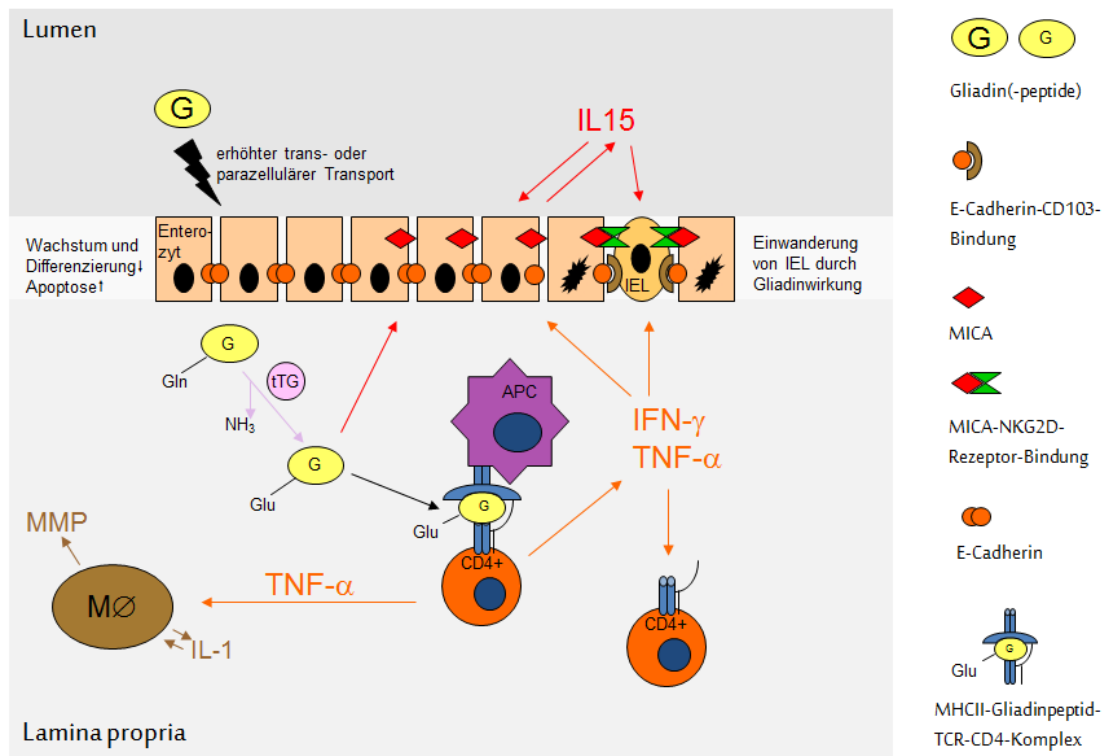


Abb. 1: Immunpathologie bei Zöliakie. (adaptiert aus Schumann et al., *Gastroenterologie up2date* 2014 [6])

APC, Antigen-präsentierende Zelle; IEL, intraepithelialer Lymphozyt; TNF- α , Tumor-Nekrose Faktor- α ; IFN- γ , Interferon- γ ; IL-15, Interleukin-15; IL-1, Interleukin-1; tTg, Gewebstransglutaminase; MMP, Matrixmetalloproteinase; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat.

Es bedarf hierfür allerdings der Passage der immundominanten Oligopeptide vom Lumen des oberen Gastrointestinaltrakts in die Lamina propria der Dünndarmmukosa, um eine Immunreaktion der intestinalen T-Zellen auszulösen. Üblicherweise werden jedoch ingestierte Peptide luminal in einem mehrschrittigen Prozess hydrolysiert: Dabei beginnt die Pepsin-assoziierte Hydrolyse bereits im Magen und setzt sich im oberen Dünndarm als hocheffizienter Carboxy-terminaler bzw. endopeptidaler Verdau durch pankreatische Proteasen und Carboxypeptidasen fort. Finalisiert wird der Peptidverdau durch die im Bürstensaum verankerten Exo- und Endopeptidasen (*engl. brush border enzymes*), woran sich der erleichterte Transport der aus diesem Verdauungsprozess hervorgehenden Aminosäuren, Di- und Tripeptiden über das Epithel in das subepitheliale Kapillarnetz anschließt.[8] Dies stellt sich bei den in Gliadinen wie Gluteninen vorkommenden Prolin- und Glutamin-reichen Peptidsequenzen anders dar. Da der Mensch nicht über die

entsprechenden Prolyl- und Glutamylendopeptidasen verfügt, reichern sich im Dünndarmlumen Oligo- bis Polypeptidsequenzen (z.T. bis ca. 50 Aminosäuren lange Gliadin-Polypeptide) an.[9] Da diese Peptidsequenzen (i) im Dünndarmlumen unverdaut vorliegen und (ii) nachweislich die bei Zöliakiepatienten später noch genauer zu erläuternde T-Zellreaktion auslösen, müssen sie zuvor die epitheliale Barriere der Dünndarmmukosa passieren. Hierfür können verschiedene Mechanismen postuliert werden, die grob in einen parazellulären und einen transzellulären Weg unterteilt werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden beide Wege untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass größere Peptide mittels Transzytose das Epithel passieren, die – wie auch die Arbeitsgruppe von Martine Heyman zeigen konnte – vermutlich durch den Transferrinrezeptor CD71 vermittelt wird.[10, 11]

Im Anschluss an den transepithelialen Transportprozess werden die Peptide subepithelial durch die Gewebstransglutaminase (tTG) deamidiert.[2] Im Rahmen der Calcium-abhängigen Deamidierung werden durch Konvertierung von Glutaminresten in Glutamatreste negative Ladungen in die Gliadinepitope eingefügt (**Abb. 2**). Hieraus resultiert ein Anstieg der Bindungsaffinität dieser Peptide in die Bindungstasche der auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimierten HLA-DQ2- und DQ8-Moleküle um das 10fache. Die Interaktion dieser Gliadinpeptid-präsentierenden APCs mit CD4+ T-Zellen triggert die Immunreaktion des adaptiven Schenkels des Immunsystems.[12] Dabei ist die Spezifität dieser DQ2- bzw. DQ8-restringierten Immunreaktion auch hinsichtlich der Sequenz des T-Zellrezeptors herauszustellen: Nur CD4+ T-Zellen, die einen T-Zellrezeptor tragen, der spezifisch den DQ2/8-Gliadinpeptidkomplex erkennt, werden aktiviert. Auch hier sind deamidierte Gliadinpeptide deutlich potenter in der T-Zellaktivierung als native Peptide, was sich darin ausdrückt, dass – verglichen mit dem deamidierten Gliadinpeptid – eine 100fach höhere Konzentration nativen Peptids notwendig ist, um die gleiche T-Zellantwort zu induzieren.

Aktiviert T-Zellen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ), veranlassen spezifische Plasmazellen zur Sekretion von anti-Gliadin- und anti-Transglutaminase-IgA und aktivieren Matrix-Metalloproteinasen, die das Stroma der duodenalen Mukosa umbauen.[13] Es wird ferner vermutet, dass die Gewebstransglutaminase pH-abhängig neben der o.g. Deamidierung auch Gliadinbruchstücke durch eine Transamidierungsreaktion an die extrazelluläre Matrix binden kann, diese dabei immobilisiert und die mukosale Immunreaktion auf diese Weise verstärken kann.

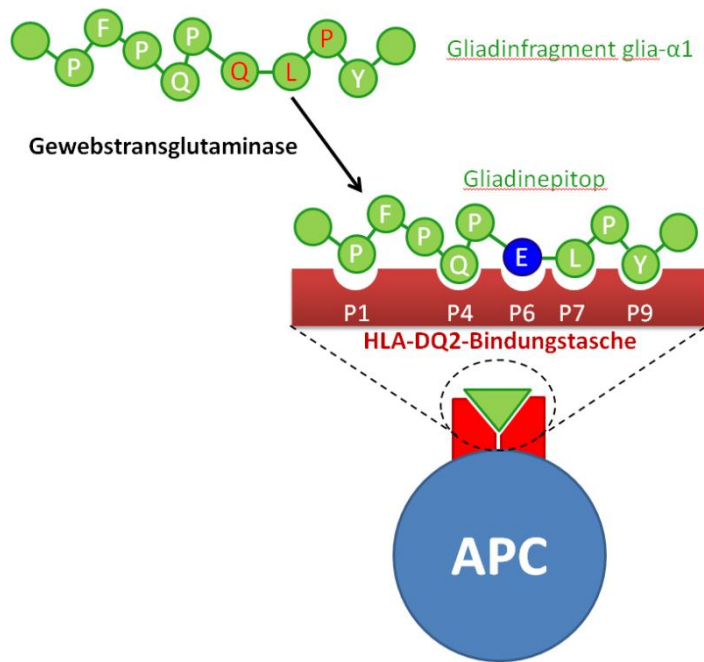


Abb. 2: Optimierung der Bindungsaffinität der Gliadinpeptide in die Tasche des HLA-DQ2/DQ8-Moleküls.

Durch enzymatische Deamidierung der Gliadinpeptide (Aktivität der Gewebstransglutaminase) entstehen nach Konversion der Glutamin- in Glutamatreste zusätzliche negative Ladungen, die die Bindung in die Bindungstasche des HLA-DQ2-Moleküls verbessern. Hier ist am Beispiel des Peptidfragments gli- α 1 die Bindung des Peptids an HLA-DQ2 dargestellt. Dieses Prinzip gilt genauso für weitere Peptidfragmente aus den α -, β - und ω -Gliadinen und ähnlich auch für die Bindung in die HLA-DQ8-Bindungstasche. Weiterhin ist das Tripeptid, das dem Erkennungsmotif der Gewebstransglutaminase in der nativen Gliadinpeptidsequenz (Q-X-P) entspricht, rot markiert. Die Aminosäuren der Gliadinpeptidsequenz sind im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. APC, Antigen-präsentierende Zelle, P1...P9, Bindungspositionen im DQ2-Komplex (nach Schumann et al., *Pathophysiologie der Zöliakie, Der Gastroenterologe* 2015 [7]).

Parallel wird auch das angeborene Immunsystem aktiviert. In Anwesenheit bestimmter Gliadinsequenzen, z.B. des α -Gliadinpeptids p31-49, produzieren Epithelzellen und Lamina-propria-Lymphozyten vermehrt Interleukin-15 (IL-15). Dies hat die Expression epithelialer Stressproteine wie MIC-A und HLA-E zur Folge,[14, 15] die von Natürlichen Killer-(NK)-Rezeptor-tragenden intraepithelialen Lymphozyten (IEL) erkannt und daraufhin lysiert werden.

Im Rahmen dieser Immunreaktion verändert sich die Architektur der Dünndarmmukosa hin zu einer Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie, die das strukturelle Korrelat des bei Zöliakie entstehenden Malabsorptionssyndroms darstellt. Ferner weist die Zöliakiemukosa einen epithelialen Barrieredefekt auf. Dieser bewirkt eine sog. Leckfluxdiarrhoe (d.h. eine Diarrhoe, die auf einer gesteigerten Passage von Soluten aufgrund einer TJ-Störung beruht). Zudem ist er die Basis für eine fortgesetzte Glutenexposition der Lamina propria-Zellen (**Abb. 3**).[16-18]

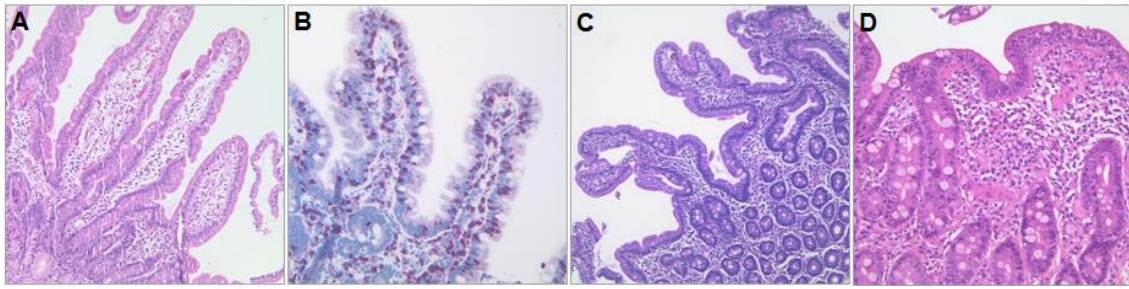


Abb. 3: Klassifikation der Veränderungen der Duodenalmukosaarchitektur nach Marsh & Oberhuber

A: Marsh 0, lange Zotten, kurze Krypten. B: Marsh I, >25 intraepitheliale Lymphozyten (IEL) pro 100 Enterozyten, dargestellt mittels Färbung der IELs (CD3-Immunhistologie). C: Marsh II, Kryptenhyperplasie ohne Zottenatrophie. D: Marsh IIIb, Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie (aus Schumann, Siegmund, *Gluten-Enteropathie, in Stange (Ed.), Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Schattauer 2015 [5]*; Bilder sind ursprünglich angefertigt und zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jöhrens, Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin).

1.1.4. Genetik

Zwillingsstudien konnten aufzeigen, dass die Ätiologie der Zöliakie zu einem großen Anteil genetisch erklärbar ist.[19] Dabei besteht ein komplex-genetischer Vererbungsgang, in dessen Rahmen bis zu 100 Gene mit erheblich unterschiedlichen Einzelbeiträgen beteiligt sind. Der bei weitem wichtigste Beitrag wird durch Gene geleistet, die für die bereits o.g. MHC II-Proteine HLA-DQ2 und DQ8 kodieren. Dies wird auch dadurch reflektiert, dass bei Fehlen von HLA-DQ2 und HLA-DQ8, das Vorliegen einer Zöliakie nahezu ausgeschlossen ist. Die für HLA-DQ2 kodierenden Gene (DQA0501 und DQB0201) liegen bei 90-95% der Zöliakie-Patienten vor, die für HLA-DQ8 kodierenden Gene bei ca. 5%. Da die Prävalenz dieser Gene in der Gesamtpopulation allerdings hoch ist, ist der positiv prädiktive Wert dieser genetischen Marker sehr niedrig, was ihren Wert in der klinischen Diagnostik auf die Funktion eines Markers zum Ausschluss einer Zöliakie reduziert. Für HLA-DQ2 wurde ferner ein Gendosisseffekt nachgewiesen, d.h. bei Vorliegen einer DQ2-Homozygotie ist die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Zöliakie sowie im Weiteren für die Entwicklung einer Refraktären Zöliakie (RCD, siehe unten) im Vergleich zum Vorliegen einer für DQ2 heterozygoten Situation erhöht.[20]

Non-HLA-Gene wurden fast ausschließlich mittels sog. *Whole Genome Association Studies* identifiziert, in deren Rahmen an großen Zöliakiekollektiven mehrere 100,000, über das humane Genom verteilte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) untersucht wurden. Die dabei identifizierten, mit Zöliakie assoziierten Gene beeinflussen vornehmlich die Funktion von T- und B-Zellen (z.B. IL-2/IL-21), z.T. aber auch die Aktivität des angeborenen Immunsystems.[21, 22]

1.1.5. Refraktäre Zöliakie

Von einer Refraktären Zöliakie (RCD) spricht man, wenn nach einem Jahr strikter glutenfreier Diät (GFD) weiterhin ein Malabsorptionssyndrom auf dem Boden einer Marsh III-Enteropathie vorliegt.[23] Glutenverunreinigungen in der Diät sowie eine Reihe von Differentialdiagnosen wie ein Morbus Crohn des Dünndarms, eine Lambliasis, Morbus Whipple, ein variables Immundefektsyndrom (CVID), HIV/AIDS-assoziierte Enteropathie, Eosinophile Enteritis, eine autoimmune Enteropathie und eine intestinale Tuberkulose sollten alternativ erwogen werden. Es werden zwei Subtypen der RCD unterschieden: Typ I, eine vermutlich in ihrer Ätiologie heterogene Autoimmunerkrankung, die zumeist auf Immunsuppressiva wie Budesonid, 6-Thioguanin oder TNF α -Antikörper anspricht und Typ II, eine Enteropathie mit klonal proliferierenden IEL, die mit jejunalen Ulzerationen assoziiert ist und oftmals in ein Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom (EATL, **Abb. 4**) übergeht. Diagnostische Modalitäten zur RCD-Subtypisierung umfassen die molekularpathologische Analyse, in deren Rahmen mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR)-basierten GeneScan-Analyse die Klonalität von T-Zellen in der duodenalen Mukosa untersucht wird, wie auch Immunfärbungen, sei es als Immunhistochemie (CD8-Färbung) oder als Durchflusszytometrie intestinaler Lymphozyten. Bei RCD Typ II findet sich eine aberrante intestinale Lymphozytenpopulation bzw. ein klonales Profil im T-Zellrezeptor-Genescan. Bei vielen Patienten lässt sich initial eine Stabilisierung der Erkrankung durch Budesonid erreichen. Oftmals muss bei fortschreitender Erkrankung eine Chemotherapie mit Cladribine und in einigen Fällen sogar eine Stammzelltransplantation durchgeführt werden, um die Entwicklung hin zu einem EATL aufzuhalten.[24, 25]



Abb. 4: Ballonenteroskopischer Nachweis eines Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphoms (EATL) im Dünndarm. *Bild ist ursprünglich angefertigt und zur Verfügung gestellt von PD Dr. Bojarski, Klinik für Gastroenterologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin*

1.2. Mukosale Barriere

Neben der Assimilation von Nährstoffen ist der Aufbau einer funktionalen Barriere gegenüber luminalen Mikroorganismen essentiell. Dabei muss diese Barriere gleichzeitig einen regulierten Kontakt mit luminalen Antigenen, u.a. solchen der Mikrobiota, garantieren. Diese Regulation umfasst (i) die Dosierung des durchtretenden Antigens wie auch (ii) die Prozessierung des antigenen Materials.[26]

1.2.1. Die Bausteine der mukosalen Barriere

Strukturell sehr verschiedene Komponenten garantieren die Integrität der mukosalen Barriere. Dazu gehören (i) die Mukusschicht sowie die epitheliale Barriere, bei der Mechanismen (ii) der parazellulären wie (iii) der transzellulären Dichtigkeit zur Barrierefunktion beitragen. Auf Polaritäts-assoziierte Mechanismen der Organisation der epithelialen Barriere wird gesondert eingegangen.

1.2.2. Die Mukusschicht und antimikrobielle Peptide

Der **Mukus** besteht neben Wasser aus Ionen, wobei Chlorid-, Bicarbonat- und Natriumionen dominieren. Bicarbonat antagonisiert dabei nicht nur einen sauren pH, sondern schützt die Mukosa auch dadurch, dass es die Sekretion und Entfaltung der Muzine induziert. Bicarbonat wird dabei durch CFTR-abhängige (*CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator*) wie auch CFTR-unabhängige Kanäle sezerniert, Prozesse, die auch bei Darmentzündungen reguliert werden (**Abb. 5**).[27, 28]

Die Protein-Hauptkomponente des Mukus sind Muzine, große Proteine (*Muc2*: ~5200 Aminosäuren), die stark glykosyliert sind, durch Becherzellen sezerniert werden und essentiell für die Mukusgenese sind, da bei *Muc2*-Knockout-Mäusen eine Mukusschicht fehlt.[29, 30] Die Muzinsekretion, ihre luminal Entfaltung und ihr Verdau durch die Metalloprotease Meprin- β sind dabei auch determinierend für den qualitativen Unterschied des Mukus in Dünn- und Dickdarm: Während der nur gering mit Bakterien besiedelte Dünndarm, der auch die Nährstoffresorption gewährleisten muss, durch eine einschichtige, leicht penetrierbare Mukusschicht bedeckt ist, verfügt das Kolon, in dem sich eine ca. eine Million-fach größere Zahl an Mikrobiota finden, über eine zweischichtige Mukusschicht, von der im gesunden Kolon die innere Schicht nicht durch Bakterien penetriert werden kann (**Abb. 5**).[31, 32] Dabei spielt die Ausbildung dichter Muzinnetze durch *Muc2*-Polymerisation eine zentrale Rolle, ein Prozess der ebenfalls abhängig von der CFTR-Aktivität ist.[28]

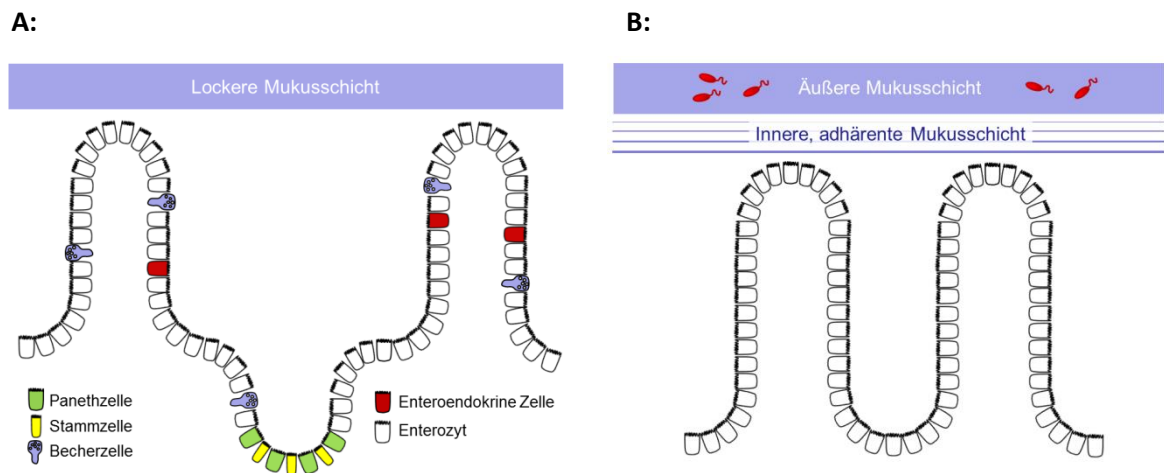


Abb. 5: Aufbau der Mukusschichten im Dünndarm (A) und im Kolon (B). (nach Schumann und Kühnel, *Pathophysiological role of TNF in IBD: TNF and its impact on barrier function, Frontiers in Gastroenterology 2015*).[26]

Unter **antimikrobiellen Peptiden (AMPs)** fasst man hochkonservierte, kurze (ca. 30 Aminosäuren) Polypeptide wie Defensine und Cathelicidin LL-37 zusammen. Aufgrund ihrer kationischen Eigenschaften einerseits und des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren andererseits bilden sie amphipathische Tertiärstrukturen aus.[33] Sie werden epithelial synthetisiert und dann nach luminal sezerniert und sind antimikrobiell gegen ein ganzes Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie Pilzen und Viren aktiv.[34] **Defensine** interagieren mit Lipid II der bakteriellen Zellwand und hemmen dadurch deren Synthese.[35] In Abhängigkeit des intramolekularem Disulfidbindungsmuster werden α - und β -Defensine unterschieden, wobei α -Defensine von Panethzellen und β -Defensine primär von Enterozyten exprimiert werden. Ferner gibt es konstitutiv exprimierte humane β -Defensine (HBD-1) und solche, die nur durch proinflammatorische Zytokine oder direkt durch Mikroorganismen induziert werden (HBD-2 und HBD-3).[36, 37]

1.2.3. Die parazelluläre epitheliale Barriere

Die intakte Epithelzellschicht stellt eine wirksame Barriere gegenüber luminalen Pathogenen dar. Die schwächsten Anteile dieser Zellschicht sind natürlich die Interzellularräume, die – so sie nicht versiegelt sind – eine parazelluläre Passage für pathogenes Material darstellen können. Physiologischerweise ist daher der Parazellularraum durch den apikalen junctionalen Komplex verschlossen, der sich aus der apikalen *Tight Junction (TJ)* und der direkt basal sich anschließenden *Adherens Junction (AJ)* zusammensetzt. Dabei stellen AJs und Desmosomen die mechanische Verbindung benachbarter Zellen sicher, derweil die TJs zum einen die Versiegelung der

Epithelschicht hin zum intestinalen Lumen garantieren, gleichzeitig aber auch eine selektive parazelluläre Passage ermöglichen (**Abb. 6A**).[38]

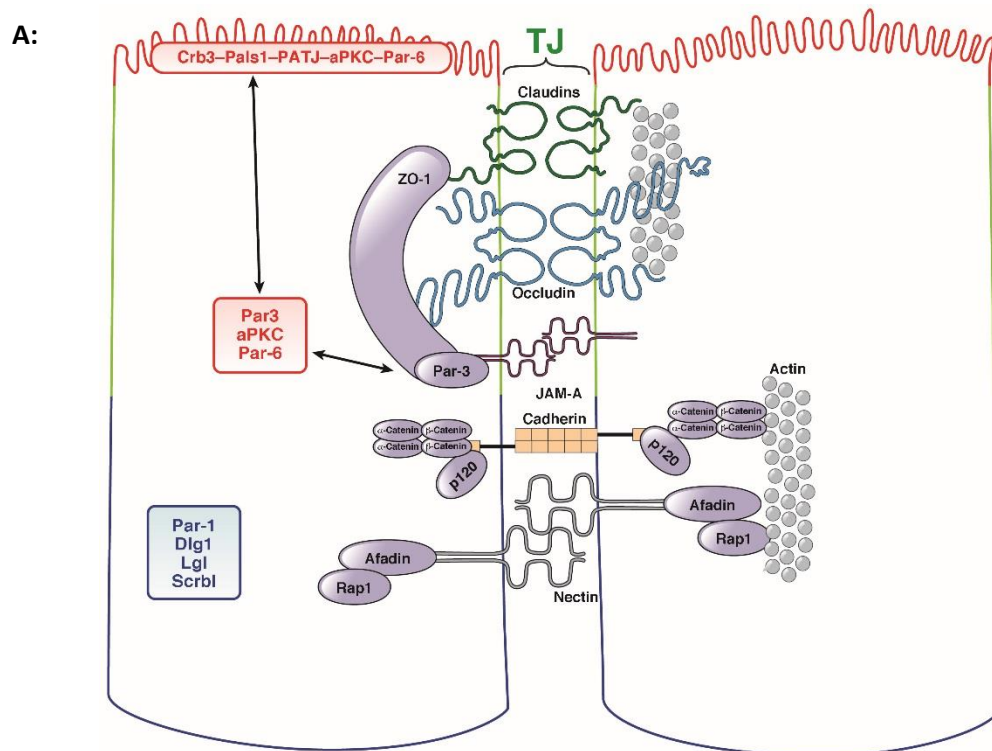
1.2.4. Adherens Junction

AJs bestehen aus zwei funktionalen Bausteinen: (i) Dem zentral-adhäsiven (*engl. core-adhesive*) Cadherin/Catenin-Komplex und (ii) der Interaktion zwischen Nectin und Afadin.[39]

Bei **Cadherinen** handelt es sich um Typ I-Transmembranproteine, die über ihren extrazellulären N-Terminus eine Ca^{++} -abhängige, homotypische Interaktion zwischen zwei identischen Molekülen in benachbarten Zellen ausbilden (daher auch Interaktion „in trans“). Der intrazelluläre C-Terminus ist durch seine Bindung an β -Catenin vor der Proteolyse geschützt. Ferner ist er über die Wirkung von α -Cateninen und EPLIN (*engl. epithelial protein lost in neoplasm*) an das Aktomyosinnetzwerk assoziiert.[40, 41] p120-Catenin ist hierbei ein weiteres Protein, das diesen Komplex stabilisiert, indem es seine Endozytose verhindert. **Nectine** sind Calcium-abhängige Transmembranproteine der IgG-Superfamilie, die über drei extrazelluläre Immunoglobulin-ähnliche Domänen verfügen, mit denen sie heterophile Interaktionen in trans eingehen können. Die intrazelluläre Domäne interagiert mit dem Scaffolder AF6/Afadin, welcher wiederum mit dem Aktinzytoskelett und der kleinen GTPase Rap1 interagiert.[42]

1.2.5. Tight Junction

Eine anschauliche Beschreibung der Lokalisation und Funktion der TJ ist das Jared Diamond's Bierdosen-Modell der Epithelien (*engl. beer can model of epithelia*), bei dem Epithelzellen wie die Bierdosen eines Sixpacks durch ein Plastikband miteinander verbunden sind. Der Raum zwischen den Dosen korrespondiert zum lateralen Interzellularraum und das Plastikband zur TJ. Diese sind als Fassbänder konstruiert, die die apikalsten Anteile der lateralen Membran jeder Zelle umschließen (**Abb. 6a**).[43] Durch die Separation des luminalen vom basolateralen Kompartiment garantieren die TJs die sog. *gate function*, welche die Regulation des parazellulären Transports beschreibt und bereits in den 1960er-70er Jahren durch transmissionselektronenmikroskopische Experimente mit dem 139 Da-Molekül Lanthan veranschaulicht wurde (**Abb. 6b**: Lanthan wird auf Höhe der TJ gestoppt).[44]



B:

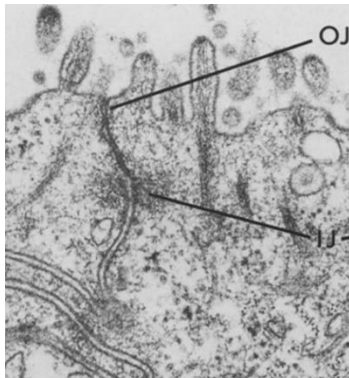


Abb. 6: Der apikale junctionale Komplex. (A) Lokalisationen der beteiligten junctionalen Proteine in der Epithelzelle. Graphik aus Schumann et al., *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jan 14;3(2):150.[26] **(B)** Die TJ in der Transmissionselektronenmikroskopie: Lanthan (molekulare Größe: 139 Da) wird auf Höhe der sog. "kissing points" durch die TJ gestoppt; Lu, lumen. Graphik aus Friend & Gilula, *J Cell Biol* 1972.[45] (Reproduktion der Abb. Ist für Dissertationszwecke durch *J Cell Biol* ausdrücklich gestattet.)

Zudem erfüllen die TJs die *fence function*, indem sie die laterale Diffusion von Membranproteinen und -lipiden hin zum apikalen bzw. zum basolateralen Kompartiment restringieren.[46, 47] Gefrierbruchelektronenmikroskopische Experimente zeigten, dass TJs ein Netzwerk aus Einzelsträngen bilden, das je nach Gewebe, aber auch im Rahmen verschiedener entzündlicher Erkrankungen der intestinalen Mukosa eine unterschiedliche Komplexität annehmen kann.[48] Auf molekularer Ebene sind TJs aus integralen Membranproteinen und assoziierten intrazellulären Proteinen aufgebaut. Die integralen TJ-Proteinen umfassen Ein-Transmembranproteine wie JAM-A und CAR (*engl. coxsackievirus and adenovirus receptor*) sowie Transmembranproteine, die vier Transmembrandomänen aufweisen, im Besonderen die Proteine der Claudinfamilie und sog. TAMPs (TJ-assoziierte MARVEL-Proteine, wie Occludin und Tricellulin) (**Tabelle 2**).[46]

Tabelle 2: TJ-Proteine. Die Funktion der jeweiligen Proteine ist kodiert: B, Barriere-formend; C⁺, Claudin mit Kationenporenfunktion; A⁻, Claudin mit Anionenporenfunktion; WH, Wundheilung; AP, TJ-assoziiertes Protein; TAMPs, *TJ-associated MARVEL proteins*; IGLD, Immunglobulin-ähnliche Domäne; PDZB, *pdz-binding domain*; MARVEL, *MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*; PDZ, *PSD95-discs large tumor suppressor-zonula occludens-1*; CC, *coiled coil*; IA, *Interaktionen mit...*; NA, nicht anwendbar (Tabelle wurde modifiziert nach Schumann und Kühnel, *Pathophysiological role of TNF in IBD: TNF and its impact on barrier function, Frontiers in Gastrointestinal Research 2015 [26]*); [§], Funktionelle Domänen wurden mit der UniProt-Datenbank abgeglichen (<http://www.uniprot.org>).

Abk.	Name	TM-Domänen	Funktionelle Domänen [§]	Funktion
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule-A	1	IGLD & PDZB	B
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus-Rezeptor	1	IGLD & PDZB	B
Claudins	<i>24 Mitglieder</i>			
	Claudin-1	4	IA ZO1/2/PATJ	B
	Claudin-2	4	IA ZO1/2	C ⁺
	Claudin-4	4	IA ZO1/2	B
	Claudin-5	4	IA ZO1/2	B
	Claudin-8	4	IA ZO1/2	B
	Claudin-15	4	-	C ⁺
	Claudin-17	4	-	A ⁻
TAMPs	Occludin	4	MARVEL	WH
	Tricellulin	4	MARVEL	B
	MarvelD3	4	MARVEL	B
ZO-1/-2/-3	Zonula occludens-Protein-1/2/3	NA	3x PDZ	AP
MAGI-1/-2/-3	Membran-assoziierte Guanylatkinase-1/-2/-3	NA	6x PDZ	AP
MUPP-1	<i>Multiple PDZ domain protein</i>	NA	13x PDZ	AP
Cingulin	Cingulin	NA	CC	AP

Proteine der **Claudinfamilie** regulieren die TJ-Ionenselektivität und umfassen daher nicht nur Proteine, die eine Barrierefunktion gegenüber Soluten verursachen (z.B. Claudin-1, -4, -5 oder -8), sondern auch andere, die eine Porenfunktion ausüben. Das aktuelle Modell sieht vor, dass diese parazelluläre Route einer Hochkapazitätspore entspricht, die für Ionen größen- und ladungsabhängig funktioniert (Na⁺, K⁺: Claudin-2, -15; Cl⁻: Claudin-17), aber auch für Wassermoleküle permeabel sein kann (Claudin-2).[49, 50]

Das TAMP-Protein **Occludin**, das als erstes der TJ-Proteine entdeckt wurde, ist ein integrales TJ-Protein, das offenkundig in den meisten TJ-typischen Funktionen (i.B. *fence function* und *gate function*) entbehrlich ist.[51]-[52, 53] Andererseits scheint es eine Rolle bei der dynamischen Reorganisation der TJs zu spielen, u.a. bei der Koordination der Wundheilung, bei der Extrusion apoptotischer Enterozyten aus dem Epithelverband, der Interaktion von Epithelzellen mit IELs und dem Zytokin-induzierten Umbau der TJs.[53-56]

Der Name eines weiteren TAMPs, **Tricellulin**, bezieht sich auf seine bevorzugte Lokalisation in trizellulären Verknüpfungspunkten. Tricellulin scheint dabei eher die makromolekulare Permeabilität als die ionale Permeabilität der TJ zu bestimmen. Im o.g. Modell wäre die Tricellulin-assoziierte Permeabilität eher einer Niedrigkapazitätspore zuzuordnen, die eine Permeabilität für Makromoleküle aufweist und damit evtl. auch verantwortlich für die Passage kleinerer Antigene in die Lamina propria sein könnte, andererseits aber nicht Ionen-spezifisch funktioniert.[57, 58]

Integrale TJ-Proteine interagieren mit TJ-Scaffolds bzw. -Adapterproteinen, die u.a. die Funktion in der TJ-Assemblierung haben, die Position der per Polymerisation sich zu TJ-Strängen ausbildenden integralen TJ-Proteine entlang der lateralen Membran festzulegen. In dieses Bild passt z.B. die Tatsache, dass Epithelzellen keine TJs mehr ausbilden, wenn die ZO-Proteine ausgeschaltet sind.[59] Strukturelle Grundlage der Interaktionen zwischen integralen und assoziierten TJ-Proteine ist eine Bindung zwischen einer C-terminalen Sequenz im Claudinmolekül und einer PDZ-Domäne, die ein Proteinmotif der meisten nicht-integralen TJ-assoziierten Proteine darstellt (**Tabelle 2**).[46] Dabei legen die ZO-Adapterproteine auch die Position der TJ relativ zur AJ fest, da die SH3- (SH3, Src-Homologie-3) sowie auch die GUK- (GUK, Guanylatkinase-ähnliche)-Domäne der ZO-1-Proteine mit den AJ-assoziierten Proteinen α -Catenin und Afadin interagieren.[59]

Eine weitere vermutlich sehr wichtige, bislang aber nur in präliminären Ansätzen beforschte Funktion der TJ geht von ihrer Lokalisation in Lipidmikrodomänen, sog. Flößen (engl. *rafts*) aus. Entsprechend kann man im Experiment durch Cholesterolentzug eine rasche Reduktion der TJ-bedingten Barrierefunktion nachvollziehen.[60, 61] Die Lokalisation in *rafts* impliziert funktionell u.a. die Regulation der TJ durch eine *raft*-abhängige oder auch Caveolin-abhängige Endozytose.

Generell gibt es drei Mechanismen, die die Regulation der TJ-verursachten Barrierefunktion bestimmen: (i) Transkriptionelle Regulation, (ii) Phosphorylierung und (iii) Endozytose von TJ-Komponenten. Die transkriptionelle Regulation ist z.B. zentral für die Regulation der Claudin-2-Expression beschrieben, welches physiologischerweise im Kolon nur an der Kryptenbasis exprimiert wird. Die Analyse der Promoterregion sowie auch funktionelle Studien zeigten, dass die Expression durch verschiedene Transkriptionsfaktoren bestimmt wird, u.a. CDX2, HNF-1 α , GATA-4 aber auch durch Aktivierung des Wnt-Signalweges über LEF-1/ β -Catenin.[62, 63] Ähnlich wird auch die Claudin-4-Expression durch den Transkriptionsfaktor Grhl2 bestimmt, der differentiell auch in Enterozyten exprimiert wird.[64]

Bei der Untersuchung des apikalen Na⁺/Glukose-Kotransports wurde die Bedeutung der Myosin-Leichtketten-Kinase (engl. *myosin light chain kinase*, MLCK) als zentraler Regulator der TJ-Permeabilität beschrieben. Dies geschieht vermutlich auf dem Wege einer Phosphorylierungs-

abhängigen, reversiblen Kontraktion des apikalen Aktomyosinrings.[65] So erhöht nach Exposition der Zellen mit verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Stimuli die Phosphorylierung von MLC die TJ-Permeabilität.[66, 67] Die dritte Modalität der TJ-Regulation, die Endozytose von integralen TJ-Proteinen, kann ebenfalls sekundär zur Aktivierung des MLCK-Weges geschehen. In diesem Zusammenhang wurde die Beteiligung der Caveolin-, Clathrin- und Mikropinozytose-abhängigen Endozytosewege aufgezeigt.[66, 68, 69]

1.2.6. Die transzelluläre epitheliale Barriere

Das aktuelle Verständnis der epithelialen Barriere sieht vor, dass größere Makromoleküle (ab ca. 4-10 kDa) ein gesundes Darmepithel nicht über parazelluläre, sondern nahezu ausschließlich über transzelluläre Mechanismen passieren können. Dies bildet sich auch in einer nicht-linearen Korrelation zwischen der Permeation von Makromolekülen und der (vorrangig parazellulären) Ionenpermeabilität ab. Dabei vermindert sich die Korrelation mit zunehmender Größe des Makromoleküls deutlich, was als Hinweis für das Vorhandensein zweier verschiedener Passagewege für Ionen und Makromoleküle gewertet wird.[70] Der transzelluläre Passageweg (Transzytose) beinhaltet die apikale Endozytose, das intrazelluläre Trafficking (bzw. auch die Prozessierung) der Vesikelladung (engl. *cargo*) und schlussendlich die basolaterale Abgabe/Sekretion.[71] Die endozytotische Aufnahme der Vesikelladung benutzt abhängig von Zelltyp und den Transzytose-induzierenden Stimuli verschiedene Mechanismen (**Abb. 7**). Bei Zöliakie transportieren duodenale Enterozyten per Transzytose und unter Bildung eines Komplexes aus sekretorischen IgA (SIgA) und Gliadinmolekülen, die spezifisch an den apikal exprimierten CD71-Rezeptor binden, die Gliadinfragmente von luminal nach subepithelial.[10, 11]

Andererseits sind M-Zellen, die im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) der Peyer'schen Plaques (PPs) vorkommen, spezifisch auf die Transzytose größerer Partikel, auch Bakterien, ausgerichtet.[72, 73] Da das FAE weniger Mukus sezerniert, haben luminal Antigenen einen besseren Zugang zu den transzytotisch aktiven Zellen des FAE. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die M-Zellen, die in der Lage sind unterschiedliche Bakterien (gezeigt u.a. für Yersinien, Salmonellen und Listerien) via apikaler Endozytose aufzunehmen, im humanen terminalen Ileum nur wenige Zentimeter oral des Kolons vorkommen, was ja das Kompartiment mit der höchsten bakteriellen Besiedlung ist. Weitere Zellen, die in der Lage sind, luminales Antigen aufzunehmen, sind die direkt subepithelial lokalisierten CX3CR1+ dendritischen Zellen (DCs) der sog. villösen Mukosa und Lysozym-positiven DCs des FAE, die luminales Antigen durch ihre Periskop-artigen, langen Dendriten einsammeln, die para- oder transzellulär durch M-Zellporen in das Darmlumen hineinreichen.[74, 75] Darüber hinaus wurde kürzlich die sog. Becherzell-assoziierte

Antigenpassage (engl. *goblet cell-associated antigen passage, GAP*) als seine neue Route der transzellulären Antigenaufnahme beschrieben, die verantwortlich für die Aufnahme großer Antigenmengen über Becherzellen sein könnte.[76]

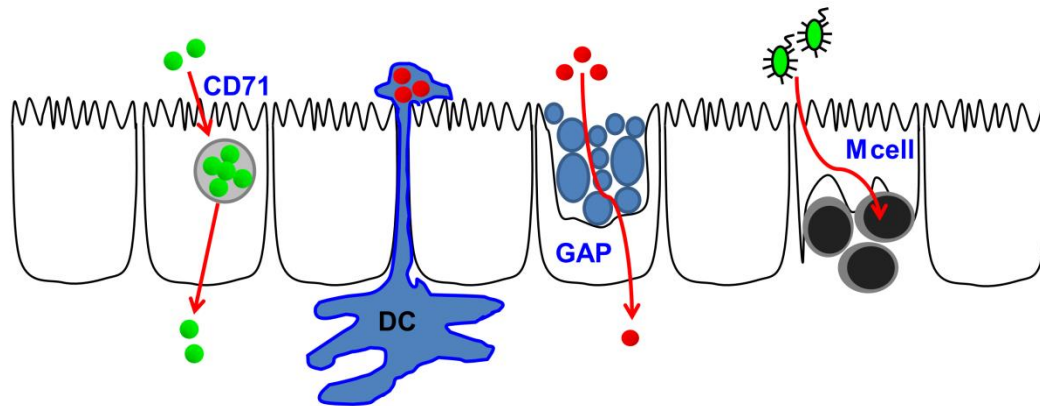


Abb. 7: Übersicht über verschiedene Mechanismen der transzytotischen Antigenpassage. (Abb. rekonstruiert nach Schumann und Kühnel, *Pathophysiological role of TNF in IBD: TNF and its impact on barrier function, Frontiers in Gastroenterology 2015*)

CD71, CD71-abhängige Gliadin-Transzytose; DC, dendritische Zelle; GAP, *goblet cell-associated antigen passage*.

1.2.7. Rolle der epithelialen Polarität für die mukosale Barriere

Ein komplexer TJ-Defekt bei Zöliakie legt nahe, dass eine vorgeschaltete „Master-Regulation“ diese Veränderungen steuern könnte. In dieser Hinsicht war die Identifikation des Par-3-Proteins als ein bei Zöliakie-Betroffenen genetisch veränderter Regulator, der den apikalen Junktionskomplex im Rahmen der Ausbildung der Epithelpolarität assembliert von besonderer Bedeutung.[77] *Partitioning-defective* Proteine (Par-Proteine) sind über eukaryote Spezies sehr gut konserviert und wurden im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt, bei dem sie die ersten asymmetrischen Zellteilungen der Zygote regulieren.[78, 79] Ähnlich der Par-Proteine sind die meisten Zellpolarität-regulierenden Proteine polar exprimiert (**Tabelle 3**). So ist Par-1, eine Serin/Threoninkinase, zusammen mit *Lethal giant larvae* (LLGL) und Scribble in der Zelle basolateral exprimiert. Par-6, Cdc42, die atypische Proteinkinase C (aPKC), Crumbs und Pals1 sind an der apikalen Membran lokalisiert und Par-3 am junctionalen Komplex (**Abb. 8**).[80] Das System wird eng durch „aktive Exklusion“ reguliert, d.h. dass die frei zwischen Membrandomänen diffundierenden Par-Proteine durch Phosphorylierung und durch direkte Protein-Protein-Interaktionen die polare Verteilung der Membranlipide und -proteine verursachen.⁸³ Das PDZ-Domänen-‘Scaffolding’-Protein Par-3 assoziiert mit aPKC- λ und - ζ sowie Par-6 und bildet dabei den

apikalen Polaritätskomplex aus, der die Ausbildung des apikalen junctionalen Komplexes orchestriert (**Abb. 8**).[81, 82]

Tabelle 3: Proteine der Polaritätskomplexe in eukaryoten Epithelzellen (modifiziert aus Assemat et al., 2008 und Suzuki et al., 2006 [83, 84]). Par, Partitionierungsdefekt-Protein; aPKC, atypische Proteinkinase; PALS, Protein-assoziiert-mit-Lin-Sieben; PATJ, Protein-assoziiert-mit-TJ; Scrib, Scribble; Dlg, Discs large; LLGL, Letales Riesenlarven-Protein; STK11, Serin/Threonin-Kinase-11; LKB1, Leber-Kinase-B1.

Komplex	Beteiligte Proteine	Proteinfunktionen (Domänen)	Zelluläre Lokalis.
Par3/aPKC/Par6	Partitioning-defective-3 Atypical PKC- λ , - ζ Partitioning-defective-6	PDZ-Dom.-Protein / Scaffolder Proteinkinase PDZ-domain Protein / Scaffolder	} TJ
Crumbs/PALS/PATJ	Crumbs-3 Protein assoc. with Lin Seven Protein assoc. with TJ	FERM-, PDZ-Domäne PDZ-, GUK Domäne, SH3-Motif PDZ-Dom.-Protein / Scaffolder	} Apikale Membr.
Scrib/Dlg/LLGL	Scribble Discs large Lethal (2) giant larvae	16 leucine-rich repeats (LRR), PDZ-Domänen GUK-, PDZ-Domänen, SH3-Motif WD-Repeats	} Basolat. Membr.
Par-1	Partitioning-defective-1	Ser/Thr-Proteinkinase	Laterale Membran
STK11 (LKB1, Par-4)	Ser/Thr-protein kinase STK11 (Liver kinase B1, Partitioning-defective-4)	Ser/Thr-Proteinkinase	Nukleus → Zytosol
Par-5	Partitioning-defective-5	14-3-3-Protein	

Im Rahmen dieses Prozesses werden bestimmte Serinreste des Par-3-Proteins durch aPKC bzw. Par-1 phosphoryliert (Ser-144, Ser-827 und Ser-885) und verursachen dabei die Bindung von Par-3 an die junctionale Membran bzw. dessen Exklusion von der Membran.[85] In Zusammenschau der genannten genetischen Assoziation des Par-3-Proteins mit Zöliakie und der o.g. Befunde lag es daher nahe, diesen Zusammenhang mit zellbiologischen und physiologischen Techniken zu untersuchen.

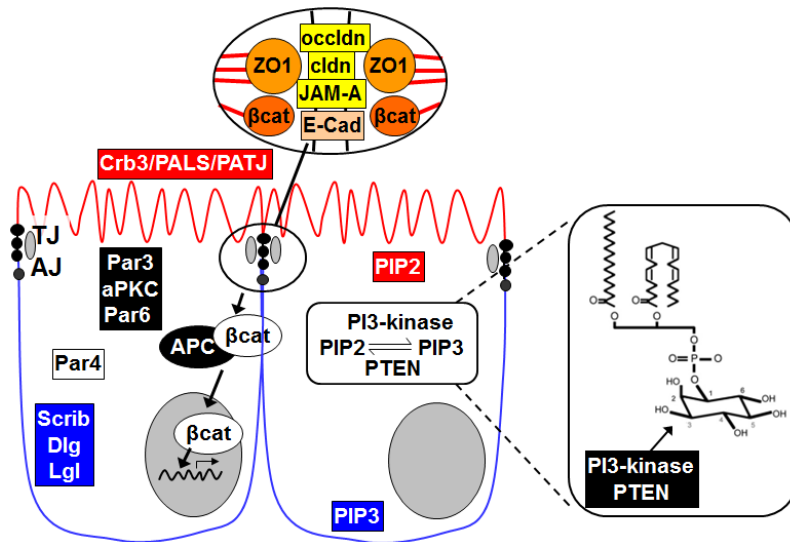


Abb. 8: Proteinkomplexe und Phosphatidylinositol-phosphate, die an Polaritäts-assoziierten Prozessen beteiligt sind.

ZO1, Zonula occludens-Protein-1 ; JAM-A, junctional adhesion molecule-A; βcat, β-catenin; APC, adenomatous polyposis coli gene product; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PTEN, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase. Abk. der Polaritätskomplexe: siehe Tabelle 3.

2. Fragestellungen

Wie eingangs dargestellt sind mit dem Erkrankungs-auslösenden Proteingemisch Gluten und der bedeutungsvollen genetischen Komponente zwei wichtige Faktoren in der Genese der Zöliakie identifiziert. Diese alleine können jedoch weder eine Voraussage, welches Individuum einst an Zöliakie erkranken wird, leisten, noch sind sie geeignet, zu erklären, wieso bei einem Großteil der Zöliakie-Betroffenen die Erkrankung erst im fortgeschrittenen Erwachsenenalter auftritt. Das veranschaulicht, dass weitere eigenständige Faktoren existieren müssen, die einen Einfluss auf die Pathogenese der Zöliakie nehmen.

Eine Veränderung der epithelialen Barriere ist aus zwei Gründen hierfür ein geeigneter Kandidat: (i) Es existieren funktionelle Studien an nicht Zöliakie-betroffenen Verwandten von Zöliakie-Betroffenen, die – verglichen mit nicht-verwandten Gesunden – statistisch signifikant erhöhte Darm-Permeabilitäten von Makromolekülen zeigen.[86] (ii) Im Nachgang der ersten Genom-weiten Assoziationsstudien wurden mehrere noch wenig charakterisierte Gene der epithelialen Barriere zugeordnet, so dass es hiermit erstmals auch genetische Hinweise für einen primären Barrieredefekt gibt.[87]

Daher stellten wir folgende Fragen, die durch die im Nachgang aufgeführten Studien untersucht wurden:

- (i) Wie kann ein Barrieredefekt mittels hochauflösender Verfahren innerhalb eines Epithelverbands lokal visualisiert werden?
- (ii) Ist die transzelluläre Barriere bei Zöliakie verändert?
- (iii) Ist die parazelluläre Barriere bei Zöliakie verändert?
- (iv) Gibt es identifizierbare Masterregulatoren für solche Prozesse?

3. Vorstellung eigener Arbeiten

Die im folgenden aufgeführten Arbeiten befassen sich im weiteren Sinne mit unterschiedlichen Barriereleistungen der intestinalen Schleimhaut (=Mukosa) bei Zöliakie. Im Einzelnen sind dies (analog zur Darstellung in Abb. 7) die parazelluläre und die transzelluläre Barriere sowie deren Regulation durch darüber geschaltete Signalwege.

So ist das Thema der ersten zwei Publikationen die Darstellung und Quantifizierung der transepithelialen Passage insbesondere eines immundominanten α 2-Gliadin-33mer-Fragments aber auch anderer α 2-Gliadin-Fragmente. Dies geschieht durch einen transzytotischen Weg. In den folgenden beiden Publikationen wird die parazelluläre Passage der Gliadinpeptide bei Zöliakie und refraktärer Zöliakie untersucht und eine komplexe Veränderung der TJ bei Zöliakie dargestellt, die die Durchlässigkeit für Fluoreszenz-markierte Gliadinfragmente erhöht. Dies ist mit einer Veränderung des Polaritätsproteins Par-3 und der Proteinphosphatase-1 assoziiert, die damit mögliche Regulatoren dieses Prozesses sind. Anlass der fünften hier aufgeführten und eher methodischen Arbeit war die von uns wahrgenommene Problematik, einen makromolekularen Barrieredefekt örtlich aufzulösen. Dazu wurde die in der letzten Arbeit dargestellte „Sandwich-Technik“ entwickelt. Diese ermöglicht die Mikroskopie von zellulären Defekten in einer Mukosa oder Einzelzellschicht.

3.1. Transzelluläre Aufnahme des 33mer-Gliadinpeptids

Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*; Vol 57(6): 747-754.

Ziel: Darstellung des epithelialen Passagewegs des immundominanten α 2-Gliadin-33mer-Fragments durch das intestinale Epithel.

Methodik und Ergebnisse: Wir konnten zeigen, dass das 33mer-Gliadinpeptid durch einen transzytotischen Prozess die epitheliale Barriere passiert. Hierfür wurde das 33mer biosynthetisiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In einem *ex-vivo*-Experiment wurde Dünndarm-Mukosa von Zöliakiekranken bzw. von Kontrollen in Ussing-Kammern eingespannt. Cy3-markiertes 33mer (4 kDa) wurde dem mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammern zugegeben. Das serosale Kompartiment wurde dann mittels *Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatography* (RP-HPLC) untersucht, um hierin (d.h. nach transmukosaler Passage) die Gliadinfragmente bzw. deren Metabolite identifizieren zu können. Anhand der RP-HPLC-Profile konnten sowohl unverdautes als auch fragmentiertes 33mer im serosalen Kompartiment dargestellt und quantifiziert werden. Verglichen mit einer Kontroll-Mukosa war die 33mer-Passage durch die Zöliakie-Mukosa signifikant erhöht. Das eingespannte Dünndarmgewebe wurde zusätzlich fixiert, immungefärbt und mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (cLSM) untersucht. Dabei gelang der Nachweis des 33mers intraepithelial in endozytotischen Vesikeln. Um den Mechanismus der endozytotischen Aufnahme näher zu untersuchen, wurden intestinale Epithelzellen (Rab-GFP-exprimierende Caco2-Zellen, die auf Transwell-Filtersystemen ausgesät wurden) apikal mit dem 33mer exponiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das 33mer in ein Rab5-positives, früh-endosomales Kompartiment aufgenommen wird. Dies war nach Inkubation der Zellen mit dem pro-inflammatorischen, bei Zöliakie verstärkt exprimierten Zytokin IFN- γ einen Anstieg der 33mer-Translokation nachweisen.

Schlussfolgerung: Im Rahmen einer Zöliakie passieren unverdauliche, 33 Aminosäuren lange Gliadinfragmente verstärkt das Epithel mittels Transzytose, die das Rab5-positive Vesikelkompartiment mit einschließt. Dabei werden diese Fragmente z.T. prozessiert.

Ménard S, Lebreton C, **Schumann M**, Matysiak-Budnik T, Dugave C, Bouhnik Y, Malamut G, Cellier C, Allez M, Crenn P, Schulzke JD, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2012). Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol*; Vol 180(2): 608-615.

Ziel: Vergleich der Passage verschiedener Gliadinpeptidfragmente über das intestinale Epithel.

Methodik und Ergebnisse: Es wurde die Permeabilität des intestinalen Epithels bei Zöliakie für verschiedene α 2-Gliadinpeptidfragmente und für Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) verglichen. Die Peptidfragmente wurden mittels einer RP-HPLC detektiert, die sowohl ein sensitives als auch Peptidfragment-diskriminierendes Verfahren darstellt. Die Gliadinpeptide 33mer und p31-49 passierten zu einem deutlich höheren Anteil undegradiert das Epithel als das bei Transzytose-Experimenten üblicherweise verwendete HRP, d.h. dass die Gliadinpeptide die Degradationsmechanismen der Zelle, wie den lysosomale Abbau, umgehen können. Ferner konnte durch Korrelation mit dem parazellulären Marker Mannitol gezeigt werden, dass die Gliadinpeptid-Permeabilitäten sich besser mit einem transzellulären denn mit einem parazellulären Modellansatz erklären lassen.

Schlussfolgerung: Die Gliadinpeptide 33mer und p31-49 passieren das intestinale Epithel im Vergleich zu anderen Polypeptiden bevorzugt undegradiert, was ihre Aktivität in der Lamina propria der intestinalen Mukosa ermöglicht.

Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*; Vol 57(6): 747-754.

<http://dx.doi.org/10.1136/gut.2007.136366>

Ménard S, Lebreton C, **Schumann M**, Matysiak-Budnik T, Dugave C, Bouhnik Y, Malamut G, Cellier C, Allez M, Crenn P, Schulzke JD, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2012). Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol*; Vol 180(2): 608-615.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.019>

3.2. Parazelluläre Barriere bei Zöliakie und Änderungen der Polarität

Schumann M, Günzel D, Buergel N, Richter JF, Troeger H, May C, Fromm A, Sorgenfrei D, Daum S, Bojarski C, Heyman M, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2012). Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut*; Vol 61(2): 220-228.

Ziel: Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung des parazellulären Barrieredefekts bei Zöliakie sowie die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen.

Methodik und Ergebnisse: Mittels Einwege-Impedanzmessung konnten wir den Barrieredefekt nachweisen und quantifizieren. Die in der Ussing-Kammer durchgeführte Gewebsbiotinylierung erbrachte den Nachweis parazellulärer Defekte in der Zöliakie-Dünndarmmukosa. Die Expressionsanalyse von TJ-Proteinen zeigte einen komplexen Barrieredefekt mit Hochregulation porenbildender TJ-Moleküle (vermehrt Claudin-2 und Claudin-15) sowie verminderte Expression abdichtender Claudine (Claudin-3, -5 und -7). Als zugrundeliegende Masterregulatoren der parazellulären Permeabilität bei Zöliakie kommen das Polaritätskomplex-Protein Par-3 und die Proteinphosphatase-1 (PP-1) in Betracht. Diese Polaritäts-determinierenden Proteine waren bei Zöliakie entlang der lateralen Membran der Epithelzellen fehllokalisiert (Par-3) bzw. fehl-exprimiert (PP-1). Sowohl der bereits in *Drosophila* vorbeschriebene dyspolare Par3-Epithelzellphänotyp als auch die durch Experimente mit spezifischen Inhibitoren analysierbare Funktion der PP-1 gingen in unserem intestinalen Epithelzellmodell mit einer Fehlassemblierung der TJ einher, die den bei Zöliakie identifizierten TJ-Veränderungen entsprach.

Schlussfolgerung: Es wurde erstmals ein Zellpolaritätsdefekt mit der bei Zöliakie bestehenden parazellulären Barrierestörung assoziiert.

Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch ML, Lebenheim L, May C, Krauss M, Hummel M, Daum S, Fromm M, Schulzke JD. Defective tight junctions in refractory celiac disease (2012). *Ann N Y Acad Sci*; Vol 1258: 43-51.

Ziel: Ziel war die Untersuchung des molekularen Aufbaus der TJ bei refraktärer Zöliakie (RCD).

Methodik und Ergebnisse: Mittels *Western Blot* und cLSM wurde die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen untersucht. Das bei Gluten-responsiver Zöliakie normal exprimierte Claudin-4 fand sich bei RCD herabreguliert, wobei zwei Mechanismen synergistisch funktionierten: Reduktion des Expressionslevels und Endozytose des Claudins. Darüberhinausgehende Expressionsveränderungen

von TJ-Proteinen betrafen das abdichtende Claudin-5 (herabreguliert) und das Poren-formende Claudin-2 (hochreguliert).

Schlussfolgerung: Proteinexpression und -lokalisierung von TJ-Proteinen bei RCD sind relativ zur unkomplizierten Zöliakie differenziert zu betrachten.

Schumann M, Günzel D, Buergele N, Richter JF, Troeger H, May C, Fromm A, Sorgenfrei D, Daum S, Bojarski C, Heyman M, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2012). Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut*; Vol 61(2): 220-228.

<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300123>

Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch ML, Lebenheim L, May C, Krauss M, Hummel M, Daum S, Fromm M, Schulzke JD. Defective tight junctions in refractory celiac disease (2012). *Ann N Y Acad Sci; Vol 1258: 43-51.*

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06565.x>

3.3. Der Sandwich-Assay – eine Orts-auflösende Methode zur Bestimmung der Permeabilität von Makromolekülen durch eine Mukosa

Richter JF, Schmauder R, Krug SM, Gebert A, **Schumann M**. A novel method for imaging sites of paracellular passage of macromolecules in epithelial sheets (2016). *J Control Release; Vol 229: 70-79*.

Ziel: Etablierung einer neuen Methode, mit der der epitheliale Makromoleküldurchtritt örtlich aufgelöst werden kann.

Methodik und Ergebnisse: In dieser Arbeit wird eine einfach durchführbare Methode eingeführt, mit der sowohl in der Zellkultur als auch an der Darmmukosa der Durchtritt von Makromolekülen visualisiert und damit ortsaufgelöst werden kann. Dazu können alle Makromoleküle verwendet werden, die sowohl Biotin-, als auch Fluoreszenzfarbstoff-koppelbar sind. Das einfache experimentelle Vorgehen sieht vor, dass die basolaterale Membran des zu untersuchenden Epithels vorab mit einer Avidin-haltigen Lösung inkubiert wird. Dies hat zur Folge, dass das als „Makromolekül-Fänger“ funktionierende Avidin an die basolaterale Epithelmembran bindet. Dann wird das o.g. gekoppelte Makromolekül in das apikale Kompartiment gegeben, was verursacht, dass es an parazellulären Defektstellen (und nur dort!) zu einem Durchtritt dieses Makromoleküls kommt. Dieses wird durch die sofortige Bindung an das basolaterale Avidin am Ort des Durchtritts fixiert. Die auf diese Weise immobilisierten Fluoreszenz-gekoppelten Makromoleküle können dann mittels cLSM im örtlichen Kontext des konventionell immungefärbten Gewebes nachgewiesen werden. Die Arbeit weist die hohe Reproduzierbarkeit der neuen Methodik in verschiedenen Epithelzellkultursystemen (Caco-2, HAT-29/B6, T84, MDCK) und auch in der Rattendarm-Mukosa (unter Verwendung der Ussing-Kammer-Technik) nach.

Schlussfolgerung: Mittels der sog. Sandwich-Technik ist eine örtliche Auflösung des epithelialen Makromoleküldurchtritts möglich.

Richter JF, Schmauder R, Krug SM, Gebert A, **Schumann M**. A novel method for imaging sites of paracellular passage of macromolecules in epithelial sheets (2016). *J Control Release; Vol 229: 70-79*.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.018>

4. Diskussion

4.1. Kernbefunde der Arbeit

Entlang der eingangs formulierten Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Kernbefunde erhoben: (i) Es wurde die Sandwich-Methode entwickelt, die es erlaubt, einen im Epithelverband befindlichen Barrieredefekt örtlich aufzulösen. Durch diese Technik kann einer erhöht gemessenen Permeabilität eines Makromoleküls in einem globalen Permeabilitätsassay (z.B. Flux-Messung) eine Zellstruktur zugewiesen werden und dadurch der erste Schritt in der Ursachenzuweisung dieser Störung der Barriere vollzogen werden. (ii) Experimente an Epithelzellverbänden wie auch *ex vivo* an der Mukosa von Zöliakie-Betroffenen wiesen einen transzellulären Passageweg von Gliadinfragmenten nach. Dabei werden diese Polypeptide durch apikale Endozytose der intestinalen Epithelzelle, gefolgt von einem transzellulären Transport und basaler Sekretion durch die Darmmukosa aufgenommen. Eine parazelluläre Passage der Gliadin-Makromoleküle findet offenkundig nicht statt. (iii) Dennoch ist auch ein parazellulärer Barrieredefekt für kleinere Makromoleküle in der Zöliakie-Darmmukosa nachweisbar. Dieser ist für die sog. Leak-Flux-Diarrhoe des Zöliakie-Betroffenen verantwortlich und wird durch einen komplexen Umbau der TJ verursacht, was sich in der veränderten Expression von abdichtenden und Poren-bildenden Claudinen sowie auch Epithelpolaritäts-assoziierten Proteinen wie Par-3 äußert. In Funktionsuntersuchungen des intestinalen Epithelverbands können diese in der Mukosa des Zöliakie-Betroffenen nachgewiesenen Epitheldefekte und Expressionsveränderungen durch Exposition mit Zytokinen provoziert werden.

Im Folgenden werden diese Befunde vor dem Hintergrund der Literatur diskutiert.

4.2. Im Rahmen dieser Arbeit entstandene methodische Neuerung

Im Laufe der wissenschaftlichen Arbeiten an dem Thema des mit einer Entzündung assoziierten Barrieredefekts wurde eine Unzulänglichkeit der etablierten Methoden, einen Barrieredefekt zu charakterisieren, deutlich: Sowohl transepitheliale Messungen des elektrischen Widerstands (wozu auch die Impedanzanalyse gezählt werden kann) als auch Flux-Messungen (z.B. mit H₃-Mannitol oder fluoreszierendem Dextran als Makromoleküle) sind zwar in der Lage, einen Barrieredefekt vergleichend (d.h. gegen eine Kontrollgruppe) zu quantifizieren. Sie lokalisieren aber nicht den Defekt zellulär. D.h. es lassen sich nur sehr bedingt Rückschlüsse aufgrund der Größe oder Art des Barriere-translozierenden Agens ziehen, ein Beispiel hierfür ist die Annahme, dass Albumin oder Meerrettichperoxidase eher transzellulär die epitheliale Barriere passieren. Dagegen nimmt man an, dass kleine Solute wie Ionen oder Mannitol eher parazellulär translozieren. Aufgrund dieser nur unbefriedigenden örtlichen Auflösbarkeit der Permeabilitätsprozesse wurde über die Zeit die sog.

Sandwich-Technik, die auf der hoch-affinen Bindung von Biotin zu Avidin basiert und die ferner eine nicht vorbeschriebene Bindung des Avidins an die basolaterale Membran der intestinalen Epithelzellen nutzt, entwickelt. Mit dieser gelang es, den Ort eines parazellulären Makromolekül-Durchtritts mikroskopisch zu identifizieren.[88] Diese Technik ist daher komplementär zu den klassischen „globalen“ Messverfahren wie TER- und Flux-Messung anwendbar. Dabei wurden charakteristische Muster der epithelialen Makromolekültranslokation beschrieben, etwa bei apoptotischen Defekten, bei TJ-Defekten oder nach Exposition der Epithelzellen mit verschiedenen Zytokinen. Ein weiterer Pluspunkt der neuen Technik ist die einfache Anwendbarkeit: Die notwendigen Chemikalien sind alle im Handel rasch und günstig erhältlich und das Experiment selbst in einer Experimentierzeit von nur wenigen Stunden durchführbar. Die Auswertung mittels konfokaler Mikroskopie bedient sich einer zwar sehr speziellen, doch inzwischen weit verbreiteten Technik. Es ist daher prognostizierbar, dass zukünftig die Methode ihren Platz als erster experimenteller Schritt in der mechanistischen Aufklärung eines veränderten Makromolekül-Flux finden wird. Ist dank des Sandwich-Experiments dann klar, durch welche Struktur der Epithelschicht die Makromolekültranslokation sich ändert, kann ein Molekül-zielgenaues Folgeexperiment (z.B. einer Knock-down oder Knock-out-Strategie folgend) den Mechanismus molekular klären. Im Kontext der Zöliakie-Forschung wird es mit dem hoch-sensitiven Sandwich-Assay möglich sein, die parazelluläre Translokation von Gliadinfragmenten bezogen auf die durch Zöliakie-veränderte Struktur (d.h. sowohl TJ-Defekte als auch Einzelzellapoptosen) zu untersuchen, um die Frage zu klären, ob einzelne Gliadinfragmente nicht doch parazellulär translozieren. Dieses Kenntnis wird notwendig sein, um auf die Barriere zielende Therapiestrategien zu konzipieren.

4.3. Der Zöliakie-assoziierte Barrieredefekt

Die in dieser Schrift aufgeführten Arbeiten zeigen auf, wie komplex der epitheliale Barrieredefekt bei Zöliakie sich darstellt: Zum einen werden bei Zöliakie-Patienten mehr immunrelevante Gliadinpeptide über das Epithel transportiert.[11] Dies wurde für verschiedene Epitope des α -Gliadins untersucht und geschieht als Transzytose, die das als Transferrinrezeptor bekannte, speziell beim Zöliakie-Betroffenen in der apikalen Membran exprimierte Protein CD71 als Rezeptor nutzt. Nach apikaler, Rezeptor-assoziiierter Aufnahme eines Gliadin-sIgA-Komplexes und konsekutivem intrazellulären Vesikeltransport wird das Gliadinfragment basolateral in die Lamina propria abgegeben. Die hierfür notwendigen Arbeiten stellten den Transport des α -Gliadin-33mers als spezifisch sIgA- und CD71-abhängig dar und bewiesen die funktionelle Bindung von Gliadin an CD71.[10, 89, 90] Es wurde ferner die Funktion von Proteinen, die mit dem apikalen Endosom assoziiert sind, beschrieben,[11] und die entsprechenden Gliadinfragmente

elektronenmikroskopisch in Vesikeln der intestinalen Epithelzelle nachgewiesen.[91] Klar wurde auch, dass die verschiedenen, epithelial transportierten Gliadinpeptide in unterschiedlichem Ausmaß intrazellulär verdaut werden.[10, 11, 90, 92] So wird das p31-49-Peptid, im Vergleich zum 33mer und anderen Gliadinpeptiden, weit weniger verdaut, was mit elektronenmikroskopischen Ergebnissen übereinstimmt, die zeigen, dass dieses Peptid das lysosomale Epithelzellkompartiment umgeht.[91, 92] In der Arbeit von Menard et al. konnten wir zudem zeigen, dass zwar erwartungsgemäß die mukosal-nach-serosal gerichtete, epitheliale Translokation des klassischen parazellulären Markers Mannitol mit der elektrischen Leitfähigkeit (d.h. dem Kehrwert des elektrischen Widerstands) korreliert, nicht aber die Permeabilität der Gliadinpeptide, was suggeriert, dass diese das Epithel nicht parazellulär passieren.[92]

Neben der transzytotischen Gliadinpeptidaufnahme als Spezifikum der Zöliakie-Betroffenen zeigen die in dieser Arbeit zusammengefassten Beiträge auch, dass es spezifische Veränderungen der parazellulären Barriere des Darmepithels bei Zöliakie gibt: So ist bei Zöliakie-Betroffenen ein funktioneller Barrieredefekt mit dem vermindert gemessenen Epithel-spezifischen, elektrischen Widerstand R^e messbar.[93] Dieser funktionelle Defekt ist interessanterweise nur partiell unter einer GFD regeneriert, was ebenfalls mit einem primären Barrieredefekt bei Zöliakie vereinbar ist.[94] Ein Prototyp-Experiment des später als neue Technik publizierten Sandwich-Assays (siehe Diskussion Methode unten) visualisierte ferner einen parazellulären Barrieredefekt für kleinere Makromoleküle (ca. 250 Da), der im global funktionierenden H3-Mannitol-Flux-Experiment sein Korrelat fand. Eine molekulare Erklärung für diese funktionellen Epitheldefekte fand sich im vergleichenden Proteinaufbau der TJ bei Zöliakie-Betroffenen und gesunden Kontrollen: abdichtende Claudine-3, -5- und -7 sowie Occludin waren herabreguliert. Poren-bildende Claudine (Cldn-2 und -15) waren heraufreguliert.[93] Als Regulator dieser komplexen TJ-Strukturveränderung fand sich das Polaritätsprotein Par-3, das sowohl in einer humangenetischen Kandidatengenstudie als auch bei zellbiologischen Experimenten und solchen mit Patientengewebe als auch in funktionellen Zellkulturexperimenten fehlreguliert war.[77, 93]

Gibt es auch einen Defekt der in der Einleitung beschriebenen Mukus-assoziierten Barriere bei Zöliakie? Hierzu gibt es nur wenig publizierte Daten. So wurde die bei Zöliakie vermindert gemessene Lysozym-Konzentration im Kryptenlumen auf eine Panethzell-Dysfunktion zurückgeführt.[95, 96] Auf eine veränderte Panethzell-Aktivität wurde auch in einer Studie geschlossen, die eine Expressionsreduktion der antimikrobiell wirksamen α -Defensine HD-5 und HD-6 bei Patienten mit refraktärer Zöliakie fand.[97] Zusammengefasst lässt sich also auch

hinsichtlich der Mukusbarriere ein Defekt bei Zöliakie mutmaßen. Allerdings ist die Forschung in diesem Bereich noch in den Anfängen.

4.4. Etablierte und nicht etablierte Ursachen der Zöliakie

Zwillingsstudien zeigen eindeutig die genetische Komponente der Zöliakie auf. So erkrankt ein eineiiger Zwilling eines Zöliakie-Betroffenen in 80% der Fälle auch an Zöliakie. Nachfolgend sind eine Serie von genetischen Kandidatengenstudien und in der Ära, die sich dem *Human Genome*-Projekt anschloss, mehrere Genom-weite Assoziationsstudien publiziert worden, die die der Zöliakie zugrundeliegende, polygenetische Situation beschreiben.[98-101] Dabei legten die ersten Studien ihren Schwerpunkt auf die HLA-Region und führten zur Identifizierung der Gene, die den quantitativ bedeutsamsten Anteil an der Zöliakie-Genese haben: HLA-DQ2 und DQ8.[98, 102] Die neueren genetischen Forschungsarbeiten fokussierten dahingegen auf Nicht-HLA-Gene. Sie trugen nicht nur dazu bei, dass vorbekannte Signalwege des Immunsystems der Zöliakie-Immunpathogenese zugeordnet werden konnten. Vielmehr ergänzten sie auch das molekulare Verständnis um die beteiligten Signalwege des menschlichen Immunsystems. So wurden Gene, die die T-Zellaktivierung und T-Zellrekrutierung vermitteln (IL-2/IL-21, der Transkriptionsfaktor IRF4 und ITGA4) und solche, die die Antigenpräsentation determinieren (CD80, TNFSF4, CIITA) identifiziert. Ferner fanden sich mit ICOSLG und RGS1 Genvarianten, die die B-Zell-Funktion und damit die Produktion spezifischer IgA's (z.B. anti-Gliadin-IgA und anti-Transglutaminase-IgA), vermitteln.[22, 99-101]

Dennoch sind die bekannten genetischen Faktoren nicht ausreichend, die Pathogenese der Zöliakie zu erklären. Ferner ist es bemerkenswert, dass trotz dieser starken genetischen Komponente der Erkrankungsbeginn äußerst variabel ist und die Erkrankung häufig erst in der 4. bis 6. Lebensdekade symptomatisch wird. Dies lässt vermuten, dass jenseits der Gluteneinnahme exogene Faktoren existieren, die den Ausbruch der Erkrankung determinieren.[94] Nachdem durch zwei unabhängige, prospektive Studien bewiesen wurde, dass die Wahrscheinlichkeit, eine Zöliakie auszulösen, von dem Zeitpunkt und der Dynamik der Einführung des Glutens in die Beikost des Kindes unabhängig ist [103, 104], verbleibt die zentrale Hypothese, dass die Initiierung einer Zöliakie durch einen vorangegangenen gastrointestinalen Infekt verursacht werden kann.[105-107] Dieser könnte die epitheliale Barriere so verändern, dass unter Glutenexposition im weiteren Verlauf die mit der Zöliakie assoziierten Genvarianten in die Gluten-abhängige Immunreaktion eingreifen, so dass die resultierende Immunreaktion die typischen Architekturveränderungen der Dünndarmmukosa hervorruft, die dann zur Ausbildung eines Malabsorptionssyndroms führen.[94] Vollkommen offen

bleiben dabei die Fragen, ob (i) der Trigger ein klinisch-manifester gastrointestinaler Infekt sein muss oder ob nicht auch bestimmte mikrobielle Kolonisationen der Dünndarmmukosa, d.h. asymptomatische Veränderungen der Mikrobiota des Darms hierfür genügen könnten und (ii) ob das mikrobielle Agens viraler (z.B. Adenoviren), bakterieller (z.B. Campylobacter) oder protozoaler (z.B. Lamblien) Art sein kann.[105-107] Diesen hypothetischen Überlegungen, die Erregern eine Bedeutung bei der Initiierung einer aktiven Zöliakie geben, ist die Mutmaßung gemein, dass – da ein initialer Wirtsseitiger Kontakt eines solchen Antigens derjenige mit der epithelialen Barriere des Darms sein wird – sich genetisch kodierte Epithelzell-Veränderungen oder durch den Erreger induzierte Barriere-defekte in einer veränderten Zöliakie-Penetranz niederschlagen können. Daher sind die bereits publizierten Arbeiten zur Barriere inklusive derer, die in dieser Schrift niedergelegt sind, nicht nur unter dem Aspekt eines sekundär zur Zöliakie-Immunreaktion entstandenen Barriere-defekts zu sehen, sondern auch im Kontext der Auslösung der Zöliakie. Im Zusammenhang eines primären Barriere-defekts bei Zöliakie ist einerseits die Arbeit von van Elburg zu nennen, der einen Barriere-defekt bei nicht an Zöliakie erkrankten, erstgradigen Verwandten von Zöliakie-Patienten nachwies und auch die humangenetische Arbeit von Kumar, der mehrere Zöliakie-assoziierte Gene identifizierte, die zuvor keiner Funktion zugewiesen waren, mittels Computer-basierten Algorithmen jedoch als Barriere-relevant erkannt werden konnten.[86, 87]

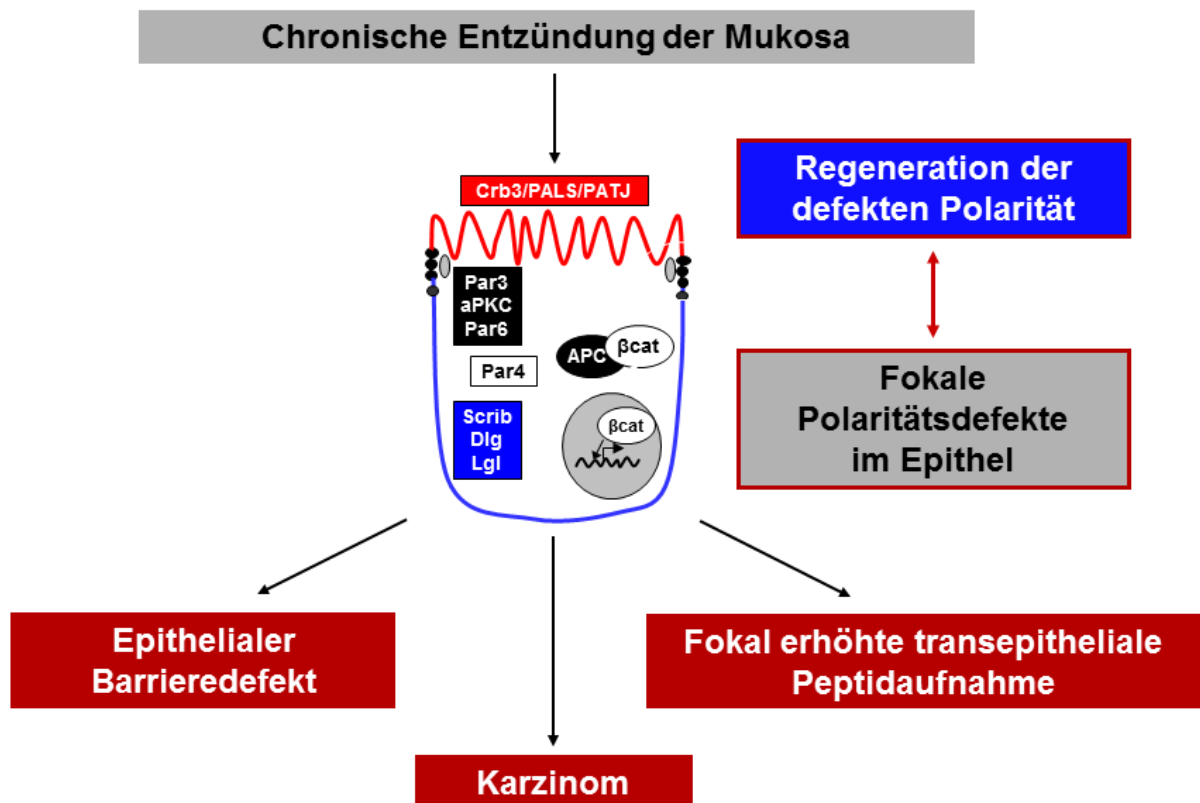


Abb. 9: Modell der Epithelveränderungen bei chronischer Entzündung. Die chronische und damit nachhaltig funktionierende Exposition der Epithelzelle mit Entzündungsmediatoren (z.B. proinflammatorischen Zytokinen)

verursacht Veränderungen der Expression, intrazellulären Lokalisation und Aktivität der Polaritätskomplex-Proteine. Dies hat Auswirkungen auf Epithelfunktionen die *prima vista* unverwandt zu sein scheinen, nämlich parazelluläre Barriere, transzelluläre Proteinaufnahme und epitheliales Malignitätspotential was sich in Prozessen wie der erhöhten Invasivität der Epithelzelle ausdrückt. Die rechtzeitige Regeneration der defekten Epithelpolarität hätte – diesem Modell zufolge – ein multifunktionales therapeutisches Potential.

β cat, β -catenin; APC, adenomatous polyposis coli gene product; Par, Partitionierungsdefekt-Protein; aPKC, atypische Proteinkinase; crb3, Crumbs-3; PALS, Protein-assoziiert-mit-Lin-Sieben; PATJ, Protein-assoziiert-mit-TJ; Scrib, Scribble; Dlg, Discs large; LLGL, Letales Riesenlarven-Protein.

4.5. Perspektive: Was sind die sich anschließenden Fragestellungen?

Die sich an die oben diskutierten Forschungsergebnisse anschließenden Fragestellungen sind vielschichtig. Mögliche Antworten fügen sich zu einem Modell der Epithelveränderungen bei chronischer Entzündung, nach dem die chronische Exposition der Epithelzellen mit Entzündungsmediatoren zu einer Veränderung der Expression, intrazellulären Lokalisation und Aktivität von Polaritätskomplex-Proteinen führt (**Abb. 9**). Da diese Proteinkomplexe eine zentrale Schaltstelle in verschiedenen Zellprozessen einnehmen, hat dies Änderungen der Barrierefunktion, der apikalen Endozytose/Transzytose zur Folge und kann auch die Wahrscheinlichkeit einer Entwicklung hin zu Dysplasien bzw. einer Karzinomzelle erhöhen. Die sich im Anschluss an die oben diskutierten Forschungsergebnisse ergebenden Fragestellungen bzw. die Implikationen die das genannte Modell mit sich bringt, sollen hier schlaglichtartig diskutiert werden:

(i) Welche Funktion haben Polaritätsprozesse generell bei entzündlichen Prozessen? Es ergibt sich im Speziellen die Frage, ob auch andere chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa) sowie auch die wirtsseitige Situation einzelner Darminfektionen (z.B. Salmonellose, Morbus Whipple, Yersiniose) eine Veränderung der epithelialen Polarität (Dypolarität) zur Folge hat. Hinweise für Polaritätsveränderungen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen existieren bereits.[108-110] **(ii)** Welche Polaritätsproteine/-komplexe sind bei chronisch-entzündlichen Prozessen involviert? Untersucht wurde bislang hauptsächlich das mit der aPKC und Par-6 zu einem Komplex assoziierte Par-3. Eigene präliminäre Ergebnisse legen auch eine Funktion des basolateralen Dlg1 bzw. des apikalen Crumbs-3- (Crb3-) Polaritätsorganisations nahe. **(iii)** Wenn die epitheliale Polarität im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen dauerhaft verändert ist: Trägt dies zur bekannten erhöhten Karzinomrate bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bei (Stichwort Colitis-assoziiertes Karzinom bzw. Karzinom bei Zöliakie)? Wären dann Zöliakie- oder CED-Patienten mit einer Alteration (z.B. Mutation/SNP) in einem Polaritäts-definierenden Gen eine Risikopopulation für solche Erkrankungen? **(iv)** Tragen die epithelialen

Dyspolaritäten auch zur veränderten Transzytose von Gliadinpeptiden bei? Gassama-Diagne et al. konnten zeigen, dass die gerichtete Transzytose von Dextranen bei Polaritäts-veränderten MDCK-Zellen umgekehrt wurde (von basolateral → apikal nach apikal → basolateral).[111] Überträgt man gedanklich solche Ergebnisse auf die Situation der Zöliakie würde dies die Dyspolarität weiter in das Zentrum des Forschungsinteresses verschieben, da sie dann auch „Target“ einer Zöliakie-Trigger-verhindernden Therapie sein könnte. **(v)** Können Mikrobiota-Veränderungen (viraler oder bakterieller Art) diese Polaritätsveränderungen triggern und plötzliche Konzentrationsschübe an Gliadinpeptiden im subepithelialen Kompartiment sekundär zu einem Dyspolaritäts-bedingt erhöhten mukosal→submukosalen Transports verursachen? Dies wäre ein Ansatz, die nicht-genetische und nicht direkt Gliadin-abhängige Komponente der Zöliakie-Pathogenese zu erklären.

5. Zusammenfassung und Abstract

Die Zöliakie ist eine genetisch vermittelte Immunreaktion auf Glutene, d.h. Protein-Inhaltsstoffe bestimmter Getreide, und führt über eine chronische Entzündung der Dünndarmmukosa zu einem Malabsorptionssyndrom. Bei genetisch prädisponierten Individuen verursachen dabei die im Proteingemisch der Glutene enthaltene Gliadine eine T-Zell-abhängige Immunreaktion, die schlussendlich zu den bekannten histologischen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut, i.S. einer Zottenatrophie und einer Kryptenhyperplasie führt. Die vorliegende Arbeit befasst sich (i) mit der epithelialen Barriere bei Zöliakie und stellt ferner (ii) den „Sandwich-Assay“, eine Ergänzung des methodischen Repertoires zur Ausmessung der Epithelbarriere vor.

Anhand der publizierten Arbeiten wird aufgezeigt, dass die Epithelbarriere bei Zöliakie sowohl transzellulär, d.h. durch Veränderung transzytotischer Makromolekültransporte, als auch parazellulär, d.h. durch eine komplexe Dysregulation insbesondere der *Tight Junctions* (TJs) verändert ist.

Dazu wurde mittels verschiedener funktioneller Experimentieransätze sowohl der transzelluläre wie auch der parazelluläre Barrieredefekt in der humanen Zöliakie-Dünndarmmukosa *ex vivo* quantifiziert. Für Ersteres wurden endoskopisch gewonnene Mukosaproben in ein miniaturisiertes Ussing-Kammersystem eingesetzt und dort vermessen. Zum einen wurde die eingespannte Dünndarmschleimhaut verschiedenen Fluoreszenz-markierten Gliadinpeptiden von luminal ausgesetzt und die Translokation dieser Peptide dann mittels einer *Reverse Phase-High Pressure Liquid-Chromatographie* (RP-HPLC) quantifiziert bzw. mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die intestinale Gliadinpeptid-Transzytose in der Mukosa von Zöliakie-Betroffenen deutlich erhöht ist. Komplementierende Experimente an intestinalen Epithelzellen, die Rab-GTPase-GFP-Fusionsproteine exprimierten, demonstrierten sowohl Aufnahme der Gliadinpeptide durch apikale Endosomen als auch nachfolgende Degradation der Peptide. Diese Ergebnisse waren gut mit den parallel publizierten Daten der Gruppe um Martine Heyman in Einklang zu bringen, die mit CD71 einen intestinal exprimierten, apikalen Rezeptor für bestimmte Gliadinpeptide identifizierte.

Auch zur Darstellung der parazellulären epithelialen Barriere wurde endoskopisch gewonnene Dünndarmmukosa von Zöliakie-Betroffenen in Ussing-Kammern eingespannt, dann jedoch mittels der Ein-Wege-Impedanzanalyse und der Mannitol-Flux-Bestimmung vermessen. Beide Messungen zeigten übereinstimmend einen parazellulären Barrieredefekt des Dünndarmepithels an. Die weiteren Untersuchungen ergaben eine komplexe Ursache dieses Epitheldefekts: Zum einen war die Zahl epithelialer Einzelzellapoptosen signifikant erhöht. Zum anderen ergab sich auch eine gravierende Veränderung der Proteinzusammensetzung der TJs mit Expressionsminderung mehrerer abdichtender Claudine und Expressionsanstieg zweier Poren-bildender Claudine (Cldn2 und Cldn15). Als Ursache dieser komplexen molekularen Veränderung der TJ wurde ein Polaritätsdefekt identifiziert. Das kürzlich zuvor von Wapenaar et al. in einer humangenetischen Zöliakie-Assoziationsstudie

identifizierte Par-3 ist ein Bestandteil eines Proteinkomplexes, der im Rahmen der Ausbildung der epithelialen Polarität die dafür wichtige Assemblierung der TJ orchestriert. Dieses Protein wies in *ex vivo*-Studien an Dünndarmschleimhäuten von Zöliakie-Betroffenen eine deutlich veränderte Morphologie auf, die in Zellkulturstudien auch funktionell mit durch Inflammation verursachten TJ-Defekten assoziierbar war. Somit ergab sich das Bild einer durch proinflammatorische Zytokine verursachten Veränderung der epithelialen Polarität, die nachfolgend den Aufbau der TJ so verändert, dass daraus eine erhöhte parazelluläre Permeabilität resultiert.

Zusammenfassend ließ sich daher ein komplexes Bild der Barriereveränderungen bei Zöliakie zeichnen, die sowohl transzellulär (i.S. vermehrte Gliadinpeptid-Transzytose) als auch parazellulär (i.S. TJ-Defekte und epitheliale Apoptosen) funktioniert. Ob nicht gar beide Aspekte ursächlich auf eine veränderte Polarität des intestinalen Epithels bei Zöliakie zurückzuführen sind, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Nicht zuletzt die Experimente an der chronisch entzündeten Darmmukosa provozierten die Weiterentwicklung der vornehmlich global aufzulösenden Barriere-Messansätze hin zur Entwicklung einer neuen Barriere-analyisierenden Methode, dem sog. „Sandwich-Assay“, der in der Lage ist, parazelluläre makromolekulare Durchtritte zu visualisieren, d.h. eine Funktionsänderung eines Barriere-verursachenden Mukosa- oder Epithelabschnitts örtlich aufzulösen.

Lassen sich aus den Erkenntnissen zur Mukosabarriere bei Zöliakie auch klinische Schlussfolgerungen ziehen? Dies wird die Zukunft zeigen. Mit dem Wirkstoff Larazotidazetat wurde kürzlich ein erstes Barriere-wirksames Therapeutikum für diejenigen Zöliakie-Betroffenen eingeführt, die durch eine glutenfreie Diät nur unzureichend behandelt sind. Ob sich diese Therapie durchsetzt oder gar durch ähnliche Wirkstoffe auf eine noch breitere Indikation ausbauen lässt, bleibt abzuwarten. Ferner steht im Raum, dass der Zeitpunkt, zu dem eine Zöliakie klinisch ausbricht, maßgeblich durch Defekte der Epithelbarriere bestimmt wird, so dass sich hier ggf. eine primärprophylaktische Strategie entwickeln ließe, die man auf Kinder mit einer genetisch zu determinierenden Zöliakie-spezifischen Risikokonstellation anwenden könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, et al. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 2002;123:803-9.
2. Molberg O, McAdam S, Lundin KE, et al. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol* 2001;31:1317-23.
3. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.
4. Vader W, Kooy Y, Van Veelen P, et al. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 2002;122:1729-37.
5. Schumann M, Siegmund B. Gluten-Enteropathie. In: Stange EF, ed. *Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Schattauer*, 2015:295-308.
6. Schumann M, Kamel S, Jöhrens K, et al. Zöliakie – Eine Übersicht zur Leitlinie der DGVS. *Gastroenterologie up2date* 2014;10:235-245.
7. Schumann M, Daum S, Siegmund B. Pathophysiologie der Zöliakie. *Der Gastroenterologe* 2015;6.
8. Erickson RH, Kim YS. Digestion and absorption of dietary protein. *Annu Rev Med* 1990;41:133-9.
9. Hausch F, Shan L, Santiago NA, et al. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G996-G1003.
10. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* 2008;205:143-54.
11. Schumann M, Richter JF, Wedell I, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the {alpha}2-gliadin-33mer in celiac sprue. *Gut* 2008.
12. Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, et al. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest* 2006;116:2226-36.
13. Daum S, Bauer U, Foss HD, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.
14. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;21:367-77.
15. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;21:357-66.
16. Fasano A, Baudry B, Pumphin DW, et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5242-6.
17. Levine MM, Kaper JB, Herrington D, et al. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. *Infect Immun* 1988;56:161-7.
18. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992;102:330-54.
19. Nistico L, Fagnani C, Coto I, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 2006;55:803-8.
20. Vader W, Stepniak D, Kooy Y, et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12390-5.
21. Kumar V, Wijmenga C, Withoff S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* 2012;34:567-80.

22. Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 2012;36:907-19.
23. Malamut G, Meresse B, Cellier C, et al. Refractory celiac disease: from bench to bedside. *Semin Immunopathol* 2012;34:601-13.
24. Daum S, Ipczynski R, Schumann M, et al. High rates of complications and substantial mortality in both types of refractory sprue. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:66-70.
25. Nijeboer P, van Wanrooij RL, Tack GJ, et al. Update on the diagnosis and management of refractory coeliac disease. *Gastroenterol Res Pract* 2013;2013:518483.
26. Schumann M, Kühnel A. Pathophysiological role of TNF in IBD: TNF and its impact on barrier function. In: Rogler G, Herfarth H, Hibi T, Nielsen OH, eds. *Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Inflammatory Bowel Disease*. Volume 34: Karger, 2015:35-48.
27. Schumann M, Winter S, Wichner K, et al. CCR7 deficiency causes diarrhea associated with altered ion transport in colonocytes in the absence of overt colitis. *Mucosal Immunol* 2012;5:377-87.
28. Seidler UE. Gastrointestinal HCO₃⁻ transport and epithelial protection in the gut: new techniques, transport pathways and regulatory pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:900-8.
29. Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15064-9.
30. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006;131:117-29.
31. Johansson ME, Sjovall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:352-61.
32. Schutte A, Ermund A, Becker-Pauly C, et al. Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:12396-401.
33. Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J* 2011;278:3942-51.
34. Kai-Larsen Y, Agerberth B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Front Biosci* 2008;13:3760-7.
35. Sass V, Schneider T, Wilmes M, et al. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect Immun* 2010;78:2793-800.
36. Jaeger SU, Schroeder BO, Meyer-Hoffert U, et al. Cell-mediated reduction of human beta-defensin 1: a major role for mucosal thioredoxin. *Mucosal Immunol* 2013;6:1179-90.
37. Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, et al. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 2011;469:419-23.
38. Quiros M, Nusrat A. RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the Epithelial Apical Junctional Complex. *Semin Cell Dev Biol* 2014;36C:194-203.
39. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:562-71.
40. Abe K, Takeichi M. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13-9.
41. Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, et al. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 2000;100:209-19.
42. Ogita H, Rikitake Y, Miyoshi J, et al. Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010;86:621-9.
43. Diamond JM. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 1977;20:10-8.
44. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.

45. Friend DS, Gilula NB. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* 1972;53:758-76.
46. Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2012;2:1819-52.
47. van Meer G, Simons K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J* 1986;5:1455-64.
48. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, et al. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res* 1998;43:435-41.
49. Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, et al. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:2765-78.
50. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 2010;123:1913-21.
51. Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-88.
52. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-42.
53. Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, et al. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C1231-41.
54. Du D, Xu F, Yu L, et al. The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Dev Cell* 2010;18:52-63.
55. Edelblum KL, Shen L, Weber CR, et al. Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7097-102.
56. Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, et al. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci* 2010;123:2844-52.
57. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009;20:3713-24.
58. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, et al. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 2011;73:283-309.
59. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 2006;126:741-54.
60. Lambert D, O'Neill CA, Padfield PJ. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem J* 2005;387:553-60.
61. Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, et al. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 10):1771-81.
62. Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 2005;203:15-26.
63. Mankertz J, Hillenbrand B, Tavalali S, et al. Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:1001-7.
64. Werth M, Walentin K, Aue A, et al. The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development* 2010;137:3835-45.
65. Turner JR, Rill BK, Carlson SL, et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:C1378-85.
66. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 2010;5:119-44.
67. Yuhan R, Koutsouris A, Savkovic SD, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1997;113:1873-82.

68. Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, et al. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J* 2005;19:923-33.
69. Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, et al. Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J Cell Physiol* 2011;226:2448-56.
70. Madara JL, Dharmasathaphorn K. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J Cell Biol* 1985;101:2124-33.
71. Heyman M, Desjeux JF. Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:304-11.
72. Keita AV, Gullberg E, Ericson AC, et al. Characterization of antigen and bacterial transport in the follicle-associated epithelium of human ileum. *Lab Invest* 2006;86:504-16.
73. Keita AV, Salim SY, Jiang T, et al. Increased uptake of non-pathogenic *E. coli* via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease. *J Pathol* 2008;215:135-44.
74. Lelouard H, Henri S, De Bovis B, et al. Pathogenic bacteria and dead cells are internalized by a unique subset of Peyer's patch dendritic cells that express lysozyme. *Gastroenterology* 2010;138:173-84 e1-3.
75. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-7.
76. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 2012;483:345-9.
77. Wapenaar MC, Monsuur AJ, van Bodegraven AA, et al. Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut* 2008;57:463-7.
78. Goldstein B, Macara IG. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* 2007;13:609-22.
79. Kempfues KJ, Priess JR, Morton DG, et al. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 1988;52:311-20.
80. McCaffrey LM, Macara IG. Signaling pathways in cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.
81. Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, et al. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 2000;275:27979-88.
82. Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, et al. 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* 2001;152:1183-96.
83. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, et al. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:614-30.
84. Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* 2006;119:979-87.
85. Hurd TW, Fan S, Liu CJ, et al. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia. *Curr Biol* 2003;13:2082-90.
86. van Elburg RM, Uil JJ, Mulder CJ, et al. Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with coeliac disease. *Gut* 1993;34:354-7.
87. Kumar V, Gutierrez-Achury J, Kanduri K, et al. Systematic annotation of celiac disease loci refines pathological pathways and suggests a genetic explanation for increased interferon-gamma levels. *Hum Mol Genet* 2015;24:397-409.
88. Richter JF, Schmauder R, Krug SM, et al. A novel method for imaging sites of paracellular passage of macromolecules in epithelial sheets. *J Control Release* 2016;229:70-9.
89. Lebreton C, Menard S, Abed J, et al. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* 2012;143:698-707 e1-4.
90. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;125:696-707.

91. Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, et al. Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut* 2010;59:300-10.
92. Menard S, Lebreton C, Schumann M, et al. Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol* 2012;180:608-15.
93. Schumann M, Gunzel D, Buergel N, et al. Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut* 2012;61:220-8.
94. Schumann M, Siegmund B, Schulzke JD, et al. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;3:150-162.
95. Rubio CA. Lysozyme-rich mucus metaplasia in duodenal crypts supersedes Paneth cells in celiac disease. *Virchows Arch* 2011;459:339-46.
96. Scott H, Brandtzaeg P. Enumeration of Paneth cells in coeliac disease: comparison of conventional light microscopy and immunofluorescence staining for lysozyme. *Gut* 1981;22:812-6.
97. Di Sabatino A, Miceli E, Dhaliwal W, et al. Distribution, proliferation, and function of Paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. *Am J Clin Pathol* 2008;130:34-42.
98. Sollid LM, Markussen G, Ek J, et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989;169:345-50.
99. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 2007;39:827-9.
100. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet* 2011;43:1193-201.
101. Dubois PC, Trynka G, Franke L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 2010;42:295-302.
102. Lundin KE, Scott H, Fausa O, et al. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol* 1994;41:285-91.
103. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med* 2014;371:1295-303.
104. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med* 2014;371:1304-15.
105. Kagnoff MF, Paterson YJ, Kumar PJ, et al. Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. *Gut* 1987;28:995-1001.
106. Marild K, Kahrs CR, Tapia G, et al. Infections and risk of celiac disease in childhood: a prospective nationwide cohort study. *Am J Gastroenterol* 2015;110:1475-84.
107. Riddle MS, Murray JA, Cash BD, et al. Pathogen-specific risk of celiac disease following bacterial causes of foodborne illness: a retrospective cohort study. *Dig Dis Sci* 2013;58:3242-5.
108. Juuti-Uusitalo K, Klunder LJ, Sjollem KA, et al. Differential effects of TNF (TNFSF2) and IFN-gamma on intestinal epithelial cell morphogenesis and barrier function in three-dimensional culture. *PLoS One* 2011;6:e22967.
109. Wald FA, Forteza R, Diwadkar-Watkins R, et al. Aberrant expression of the polarity complex atypical PKC and non-muscle myosin IIA in active and inactive inflammatory bowel disease. *Virchows Arch* 2011;459:331-8.
110. Liu J, Li J, Ren Y, et al. DLG5 in cell polarity maintenance and cancer development. *Int J Biol Sci* 2014;10:543-9.
111. Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, et al. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:963-70.

7. Danksagung

Dank gilt sehr vielen Leuten, die allesamt relevant zum Gelingen meiner Forschungsbemühungen beigetragen haben. Besonders bedeutungsvoll waren und sind:

Dr. Robert T. Jensen, damals Chief des Digestive Diseases Branch des NIDDK an den National Institutes of Health in Bethesda, MD, USA. Er hat mir – zusammen mit seinem großartigen Research Staff Scientist **Samuel Mantey** – die Grundzüge der Behandlung und Transfektion von Zellen in Kultur, der dazugehörigen Molekular- und Zellbiologie und auch etwas molekulare Pharmakologie gelehrt. Außerdem eine Reihe der griffigsten „dirty words“ der amerikanischen Sprache. Es ist schön zu sehen, dass beiden Robert Jensen und Sam Mantey am Fortkommen seiner Ehemaligen viel gelegen war und ist.

Jörg Schulzke, der mich sofort in seine wissenschaftliche Laborgruppe am Benjamin Franklin aufnahm und in vielen Gesprächen mir seine Sichtweise auf das intestinale Epithel vermittelte. Ferner danke ich ihm für die jederzeit abrufbare Unterstützung, sei es in der Klinik, in der Forschung beim Antragschreiben oder auch privat.

Ähnliches gilt für **Michael Fromm**, dessen Bürotür immer für jeden Labormitarbeiter offensteht. Wie und wem man welches Projekt angeht und was man wo publiziert sind Fragen, die hier exzellent geklärt werden können.

Martin Zeitz, der mich in seine Klinik aufnahm und nicht nur ein exzellenter klinischer Lehrmeister sondern auch ein Mensch war, der uns Jungen u.a. vorlebte, mit welcher Sorgfalt Wissenschaft optimalerweise zu planen ist.

Britta Siegmund, die nicht erst kürzlich für mich an Bedeutung gewonnen hat, sondern mir auch einige der ersten Schritte auf Station beibrachte. Im Weiteren natürlich besonders für die konzeptionelle und auch für die tatkräftige Unterstützung meiner Karriere in Klinik und Forschung.

Anja Fromm für das immer wieder unter-die-Arme-greifen. Außerdem ist sie ziemlich sicher diejenige im Labor, die mir die meisten Labormethoden beibrachte, die ich aus der USA-Zeit noch nicht kannte. Und das waren ja auch nicht wenige....

Claudia Heldt für Verschiedenes. Für das anstandslose und sorgfältige, aber auch auffällig eigenständige Arbeiten im Labor. Dafür, dass sie Experimente korrekt durchführt, obwohl sie wieder mal nur die Hälfte der notwendigen Informationen von mir erhielt. Und für ihr aufgeschlossenes und stets unglaublich zuvorkommendes, freundliches Wesen.

Meine Doktoranden oder diejenigen, die ich mitbetreuen durfte, i.B. **Sarah Kamel**, **Julian Friebe**, **Alice Itzinger** und **Paul Tangermann** für Ihren Einsatz, für viele, wahrlich hilfreiche Beiträge und für die durchweg gute Stimmung, die von ihnen ausgeht.

Jan Richter für sehr Vieles, auch Manches, was nicht in diese Zeilen gehört. Aber mindestens für die Möglichkeit, jeden noch so abstrusen Gedanken ungefiltert bei ihm testen zu dürfen.

Diejenigen natürlich, die nicht direkt an der Arbeit beteiligt waren, dennoch einen riesigen Teil meines Lebens ausgemacht haben und ausmachen und ohne die ein solches Leben nicht stattfinden könnte: **Imke und die Kinder**. Und **meine Eltern und mein Bruder Stefan**.

8. Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

18.2.2020

(Datum)

(Dr. Michael Schumann)