

Aus dem
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Campus Benjamin Franklin
Kommissarische Direktorin: Prof. Dr. med. Katharina Beyer

Habilitationsschrift

Die epitheliale Barriere des Darms – Mechanismen der Barriestörung und -protektion

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach „Biomedizin“

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Nina A. Hering

Eingereicht: November 2022

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Bleich

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Püschel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	2
1.1 Die epitheliale Darmbarriere – Aufbau und Funktion	2
1.2 Experimentelle Methoden zur Charakterisierung der Barrierefunktion.....	4
1.3 Barrierestörung – Ursachen und Mechanismen	6
1.3.1 Intestinale Erreger als Auslöser einer Barrierestörung	7
1.3.2 Inflammatorisch assoziierte Barrierestörung	8
1.4 Stabilisierung und Protektion der epithelialen Barrierefunktion.....	11
1.4.1 Modulation der intestinalen Barrierefunktion durch Probiotika	11
1.4.2 Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen auf die intestinale Barrierefunktion.....	12
1.5 Zielsetzung und Fragestellung	14
2. Eigene Arbeiten.....	16
2.1 Nachweis und Charakterisierung eines neuen <i>Yersinia enterocolitica</i> - Pathomechanismus am Kolon der Maus.....	16
2.2 Identifikation eines neuen Pathomechanismus von <i>Klebsiella oxytoca</i>	23
2.3 Barrierestabilisierende Regulationsmechanismen des Probiotikums <i>E. coli</i> Nissle.....	40
2.4 Barriereprotektive Wirkmechanismen von Lactoferrin	51
2.5 Barriereprotektion durch die Punicalagin-Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A.....	64
3. Diskussion.....	76
3.1 Modulation und Regulation der Tight Junction als Mechanismus der intestinalen Barrierefunktion	76
3.2 Epithelzellapoptosen als Mechanismus der Barrierefunktion.....	79
3.3 Neue Behandlungsoptionen und alternative therapeutische Strategien.....	81
4. Zusammenfassung	84
5. Literaturverzeichnis	87
Danksagung	97
Erklärung.....	98

Abkürzungsverzeichnis

AAHC	Antibiotika-assoziierte-hämorrhagische Kolitis
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2
FITC	fluoreszein isothiocyanate (Fluoreszein-Derivat)
GvHD	graft-versus-host disease
IL	Interleukin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARVEL	myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
MC	Morbus Crohn
MLCK	myosin-light chain kinase, Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
M-Zellen	Microfold-Zellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC ζ	Proteinkinase C zeta
R ^{epi}	epithelialer Widerstand
R ^{para}	parazellulärer Widerstand
R ^{sub}	subepithelialer Widerstand
R ^{trans}	transzellulärer Widerstand
TER	transepithelialer Widerstand
TJ	Tight Junction
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
UC	Colitis ulcerosa
WT	Wildtyp
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
ZO	Zona occludens

1. Einleitung

1.1 Die epitheliale Darmbarriere – Aufbau und Funktion

Die intestinale Mukosa stellt eine natürliche Barriere zwischen der funktionell äußeren Umwelt und dem Körperinneren dar. Sie besteht aus einer einzigen Schicht polarisierter Epithelzellen, die in direktem Kontakt mit dem Darmlumen stehen, wobei eine die Epithelzellen bedeckende visköse Mukusschicht als initialer physikalischer Schutz vor mechanischen, chemischen, enzymatischen und mikrobiellen Einflüssen fungiert (1). Die Epithelzellen sind durch verschiedene Zell-Zell-Verbindungen miteinander verbunden; am weitesten apikal befindet sich die Tight Junction (TJ, *Zonula occludens*), weiter basolateral sind Adherens Junctions (*Zonula adhaerens*) und schließlich die Desmosomen (*Macula adhaerens*) lokalisiert. Die epitheliale Barriere erfüllt einerseits die Aufgabe, eine kontrollierte Aufnahme von Nährstoffen, Soluten und Wasser aus dem Darmlumen in die Zirkulation zu gewährleisten und andererseits einen unerwünschten Durchtritt von Antigenen, Pathogenen und anderer Noxen in das Körperinnere zu verhindern. Die Aufnahme von Nährstoffen erfolgt transzellulär durch verschiedene Carrier und Kanäle in den Membranen der Epithelzellen. Im Gegensatz hierzu erfolgt der Transport von kleinen Ionen und Wasser sowohl transzellulär als auch parazellulär durch Kanäle der TJ und den interzellulären Spalt, das heißt zwischen benachbarten Zellen hindurch. Der parazelluläre Transport wird durch die Struktur und molekulare Zusammensetzung der TJ begrenzt bzw. ermöglicht und erfolgt in Abhängigkeit von Ionenradius und -ladung (2). In Gefrierbruch-elektronenmikroskopischen Analysen kann die TJ als Netzwerk von kontinuierlichen Strängen identifiziert werden (3). Diese TJ-Stränge setzen sich aus verschiedenen TJ-Proteinen zusammen, welche die Zellen perlschnurartig umgürten. Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, die über ihre extrazellulären Domänen mit entsprechenden TJ-Proteindomänen benachbarter Zellen interagieren (4-6) (Abbildung 1).

Gegenwärtig sind vier TJ-Proteinfamilien bekannt, die Familien der Claudine (7-9), der Junctional Adhesion Molecules (10), der TJ-associated MARVEL proteins (TAMPs) (11) und der Anguline (12). Im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Regulation und Aufrechterhaltung der Barriere- bzw. Kanalfunktion sind die Claudine und TAMPs bisher am besten untersucht. Die größte Familie bilden die Claudine mit 27 bekannten Mitgliedern. Hierbei kann funktionell zwischen abdichtenden und kanalbildenden Claudinen unterschieden werden. Die Expression und Lokalisation barrierebildender Claudine in der TJ, wie zum Beispiel Claudin-1 (13) oder Claudin-5 (14), tragen zu einer Abdichtung der Barriere bei. Kanalbildende Claudine hingegen erhöhen die Durchlässigkeit der TJ für bestimmte Ionen und/oder Wasser. Beispiele hierfür sind Claudin-2 (15, 16) und Claudin-15 (17) (18, 19), die beide selektiv den Durchtritt von

Kationen und Wasser ermöglichen. Die Funktion anderer Claudine ist wiederum von der Zusammensetzung der TJ und der Interaktion mit anderen Claudinen abhängig (20), wie beispielsweise für Claudin-4 oder -8 beschrieben (21).

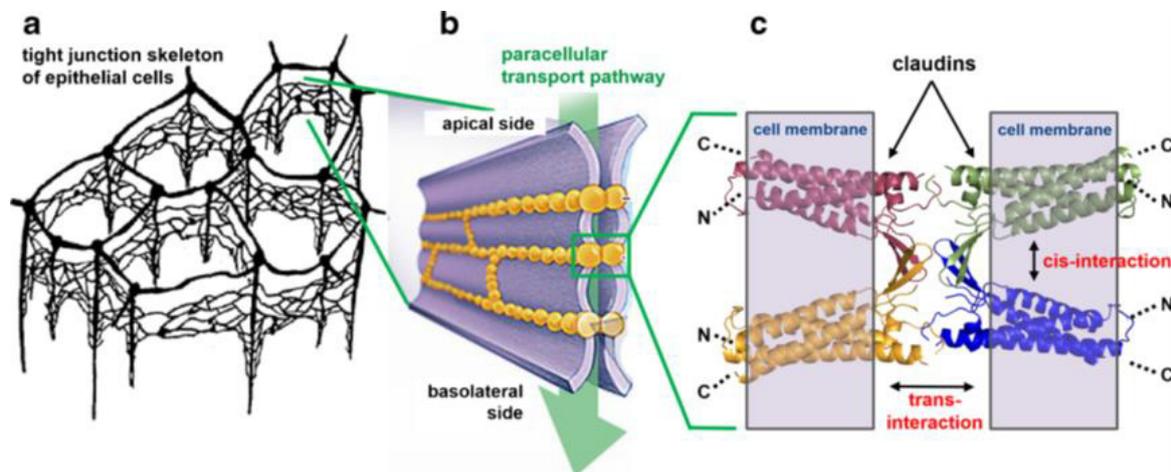


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tight Junction. a) Das TJ-Gerüst umgürtet die Epithelzellen. b) Darstellung des parazellulären Spalts zwischen den lateralen Membranen zweier benachbarter Epithelzellen (violett) mit perlschnurartig aufgereihten TJ-Proteinen (gelb). c) Interaktion von TJ-Proteinen (hier: Claudine) in cis (Proteine in der gleichen Zellmembran) und trans (Proteine in der gegenüberliegenden Zellmembran). (Bildnachweis: (22); Reproduktionsgenehmigungen Journal of cell science (1340352-1), Pflügers Archiv: European journal of physiology (1343666-1))

Zur Familie der TAMPs gehören Tricellulin (Marvel-D2), Marvel-D3 und Occludin. Namensgebend für Tricellulin ist, dass es vorwiegend in trizellulären Tight Junctions, das heißt im Kontaktpunkt von drei Zellen, exprimiert wird (23). In der trizellulären TJ hat Tricellulin eine abdichtende Funktion und reguliert hier insbesondere den Transport von Makromolekülen (24). Die funktionelle Aufgabe von Marvel D3 ist bisher kaum verstanden. Möglicherweise ist es für die Regulation der Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit der Epithelzellen von Relevanz (25).

Auch die Rolle von Occludin ist bisher nicht abschließend geklärt. In Studien an Occludindefizienten Mäusen (26) oder Zellkulturen (27) zeigten sich keine Effekte auf die untersuchten Barriereigenschaften. Etwas jüngere Arbeiten deuten darauf hin, dass bei einer Verminderung der Expression von Occludin dieses durch Tricellulin ersetzt werden kann (20, 28). In seiner Interaktion mit dem intrazellulären Gerüstprotein Zonula Occludens 1 (ZO-1) kommt Occludin eine regulatorische Funktion für die Zellpolarisation zu (29).

Die Zusammensetzung, Aufrechterhaltung und Regulation der TJ wird außer durch ZO-1 durch zahlreiche weitere TJ-assoziierte Proteine unterstützt. Diese interagieren meist intrazellulär über Proteininteraktionsdomänen mit den TJ-Proteinen und fungieren als Gerüstprotein oder

haben regulatorische Funktionen (30). Als Beispiel für Gerüstproteine sind hier die Zonula occludens-Proteine 1 bis 3 (ZO-1 bis -3) hervorzuheben, die entgegen ihrer Namensgebung keine TJ-Proteine sind. Diese intrazellulären Proteine koppeln die TJ-Proteine mit dem Myosin-Aktin-Zytoskelett (31) und verankern diese somit in der Membran (32). Regulatorische Funktionen übernehmen assoziierte Proteinkinasen, wie zum Beispiel Myosin Light Chain Kinase (MLCK), Proteinkinase C zeta (PKC ζ) und MAGI (membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of proteinprotein interaction domains) (2, 33-35).

1.2 Experimentelle Methoden zur Charakterisierung der Barrierefunktion

Die Barrierefunktion kann experimentell durch Messung verschiedener Parameter quantitativ erfasst und charakterisiert werden. Hierfür können verschiedene Modelle unterschiedlicher Komplexität genutzt werden. Als Modell mit hoher Integrationsebene bieten sich humane, endoskopisch entnommene Darmschleimhautbiopsate oder aus Versuchstieren gewonnene Mukosaprobe an. Allerdings stehen solche Proben nicht immer zur Verfügung bzw. muss eine Verwendung und Untersuchung dieser ethisch vertretbar sein. Daher kommt zumeist ein in vitro-Epithelzellmodell auf Transwellfiltern zum Einsatz. Intestinale Zelllinien, wie zum Beispiel T84, HT-269/B6 oder Caco2 werden hierfür auf Transwellfilter ausgesät und bilden innerhalb weniger Tage konfluente Monolayer mit epithelialen Eigenschaften (36).

Der transepitheliale Widerstand (TER) ist ein reziprokes Maß für die elektrische Leitfähigkeit aller Ionen in Lösung und berechnet sich aus dem Quotienten der gemessenen Spannung (U) bei einer induzierten Stromstärke (I) über der epithelialen Barriere: $TER = \frac{U}{I}$. Dieses erfolgt unter Berücksichtigung der Fläche des Epithels bzw. Zelllayers, so dass der TER in Ohm·cm² angegeben wird. Am Zellmodell kann der TER mit Hilfe eines Chopstik-Elektrodenpaars oder in der Ussing-Kammer gemessen werden. Die Ussing-Technik wurde in den 1940er Jahren von dem dänischen Zoologen und Physiologen Hans Ussing entwickelt und ermöglicht die Messung elektrophysiologischer Barriere- und Transportfunktionen am lebenden Epithel (37) bzw. an konfluenten Zellmonolayern (36). Die Grundidee von Ussing bestand darin, dass bei Ausschaltung aller den passiven Transport antreibenden Gradienten (Konzentration, Druck und elektrische Spannung) der zur Nullung der Spannung notwendige Strom ("Kurzschlussstrom") einem aktiven Ionentransport entspricht (37). Auf diese Weise kann passiver Transport (angetrieben von physikalischen Triebkräften) von aktivem Transport (angetrieben durch metabolische Energie in Form von ATP) unterschieden werden.

Der Beitrag epithelialer (R^{epi}) und subepithelialer (R^{sub}) Anteile zum gesamten Widerstand ($TER = R^{epi} + R^{sub}$) eines Epithels kann durch eine als Ein-Wege-Impedanzspektroskopie bezeichnete Technik unterschieden werden. Durch Weiterentwicklung dieser Technik zur Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ist seit einigen Jahren sogar eine Differenzierung von parazel-

lulärem (R^{para}) und transzellulärem (R^{trans}) Widerstand möglich (38). Hierbei wird R^{para} durch die Dichtigkeit der TJ determiniert, während R^{trans} durch die Gesamtheit aller Transportwege für Ionen durch die Epithelzellen hindurch bestimmt wird. Diese beiden Komponenten determinieren den epithelialen Widerstand (R^{epi}), präzise formuliert ergibt sich R^{epi} aus $1/(1/R^{\text{trans}} + 1/R^{\text{para}})$.

Zusätzlich zu Widerstand, Strom und Spannung kann in der Ussing-Kammer auch der passive Durchtritt von Markermolekülen verschiedener Größe pro Zeiteinheit (Flux) gemessen werden. Aus dem Flux und der eingesetzten Konzentration des Markermoleküls lässt sich die Permeabilität für dieses Molekül berechnen. Neben dem TER stellt die Permeabilität für Moleküle unterschiedlicher Größe ein spezifisches Charakteristikum der Barriereintegrität dar. Molekular können einer Barriestörung eine veränderte oder gestörte Expression, Lokalisation und/oder Interaktion von TJ-Proteinen oder das Auftreten apoptotischer Lecks zu Grunde liegen. Werden beispielsweise vermehrt kanalbildende TJ-Proteine wie Claudin-2 oder Claudin-15 in die TJ eingebaut oder kommt es zu einer Abnahme von abdichtenden TJ-Proteinen wie Claudin-1 oder Claudin-3, wird die Barriere für Ionen und Wasser durchlässiger. TJ-Expressionsprofile werden typischerweise auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht.

Neben einer veränderten Zusammensetzung der TJ kann aber auch eine veränderte Lokalisation, das heißt eine Umverteilung von TJ-Proteinen in subapikale oder intrazelluläre Kompartimente der Zellen, eine Barriestörung verursachen. Mittels Immunfluoreszenzfärbung entsprechender TJ-Proteine und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie können solche Prozesse visualisiert werden. Die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie ermöglicht wiederum eine Quantifizierung der TJ-Ultrastruktur durch Vermessung der vertikalen Netzwerkausdehnung, der Strangdichte und -anzahl oder Strangbrüchen. Auch ein vermehrtes Auftreten von Epithelzellapoptosen, Ulzerationen und eine verminderte oder beeinträchtigte Epithelzellrestitution (39, 40) können für eine Barriestörung ursächlich sein.

Normalerweise werden auftretende Defekte, die kurzzeitig durch den Verlust einzelner apoptotischer Zellen entstehen, schnell durch die Proliferation umliegender Zellen geschlossen. Bei bestimmten Infektionskrankheiten oder intestinalen Entzündungsprozessen wurde jedoch nachgewiesen, dass bei einem vermehrten Auftreten von Apoptosen, dieser Prozess zur Ionenleitfähigkeit und Permeabilität insbesondere größerer Moleküle beiträgt (40-42). Es wird angenommen, dass der Beitrag von Apoptosen zur Barriestörung maßgeblich durch die Restitutionsgeschwindigkeit des geschädigten Epithels determiniert wird (40, 43).

Darüber hinaus können apoptotische Prozesse auch einen Einfluss auf TJ-Proteine haben, wie anhand einer Fragmentierung von Occludin in apoptotischen Epithelzellen gezeigt wurde (44). Das Auftreten von Epithelzellapoptosen kann experimentell durch Spaltung des Apoptoseenzym Caspase-3 im Western Blot nachgewiesen werden oder mittels TUNEL-Färbung

(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling), wobei DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen mit Fluoreszein gekoppelten Nukleotiden markiert und durch Fluorescence-activated cell scanning identifiziert und quantifiziert werden. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die hier beschriebenen und für diese Arbeit relevanten Methoden zur Messung der Barrierefunktion.

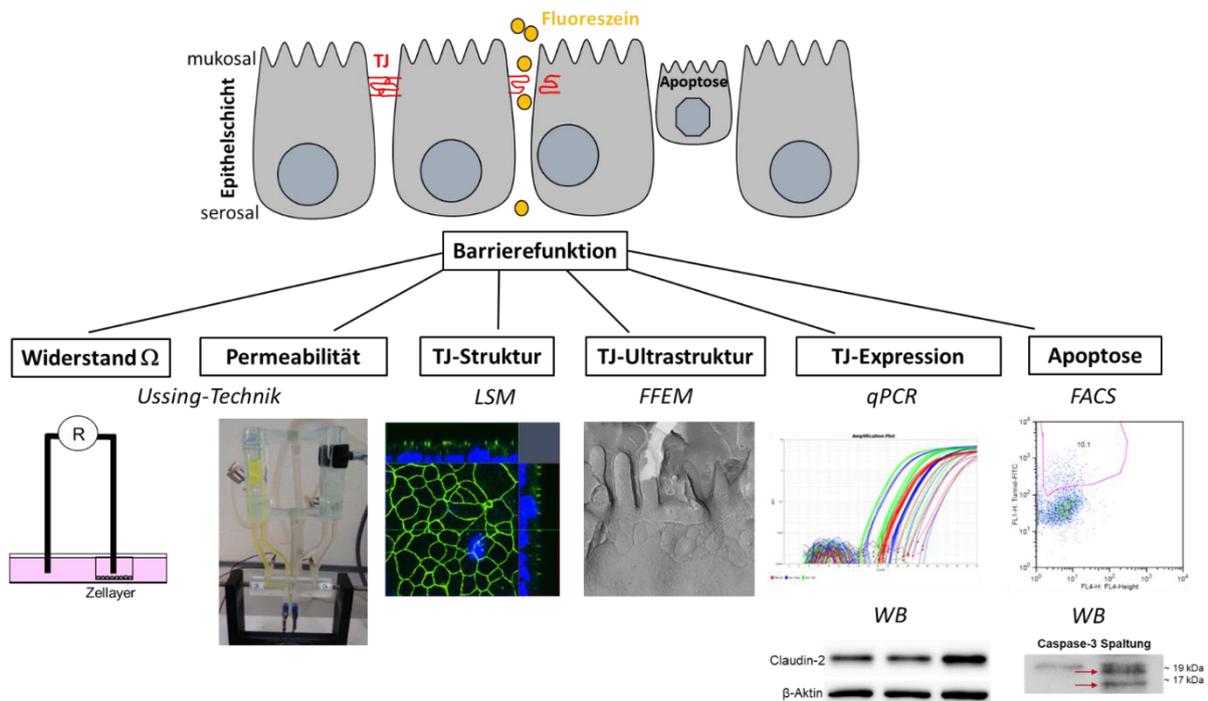


Abbildung 2: Experimentelle Methoden zur Messung und Charakterisierung der Barrierefunktion. Die Dichtigkeit der Epithelschicht wird durch die Zusammensetzung bzw. Durchlässigkeit der Tight Junction (TJ) und/oder durch das Auftreten von Epithelzellapoptosen bestimmt. Die unterschiedlichen Parameter der Barrierefunktion können experimentell gemessen werden. Mit Hilfe eines Chopstick-Elektrodenpaares oder mit Hilfe der Ussing-Technik kann der elektrische Widerstand gemessen bzw. die Permeabilität verschieden großer Markermoleküle (z.B. 332 Da-Fluoreszein) bestimmt werden. Strukturelle Untersuchungen der TJ können mittels Laserscanning-Mikroskopie (LSM) oder Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie (FFEM) erfolgen. Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) erlaubt eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene, während die Proteinexpression im Western Blot (WB) untersucht wird. Apoptosen können nach entsprechender Färbung mittels Fluorescence-activated cell scanning (FACS) oder anhand der Spaltung des Enzyms Caspase-3 im WB nachgewiesen werden.

1.3 Barrierestörung – Ursachen und Mechanismen

Für die physiologische Funktion des Darms ist die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und -integrität von größter Bedeutung. Viele intestinale Erkrankungen sind mit einer Barrierestörung der Darmmukosa assoziiert oder werden sogar durch eine solche bedingt. Normalerweise ist der Übertritt von antigenen Molekülen, Allergenen, Bakterien, Pilzen oder Viren über das gesunde Darmepithel sehr gering. Verschiedene Faktoren können jedoch eine Störung der Barrierefunktion verursachen und eine gesteigerte Permeabilität und verstärkten Übertritt über die Darmbarriere hervorrufen.

1.3.1 Intestinale Erreger als Auslöser einer Barrierestörung

Eine Infektion mit pathogenen Mikroorganismen ruft häufig eine Durchfallerkrankung hervor, wobei drei infektiöse Diarrhö-Mechanismen zu unterscheiden sind. (1) Bei der malabsorptiven Diarrhö liegt eine Verminderung der resorptiven Oberfläche, das heißt eine Beeinträchtigung der Zottenarchitektur und -funktion zugrunde. Diese wird zwar häufiger durch inflammatorische Prozesse oder chirurgische Interventionen bedingt, kann aber auch durch den Endoparasiten *Giardia lamblia* (Lambliasis) (45) oder das Bakterium *Tropheryma whipplei* (Morbus Whipple) (46) verursacht werden. (2) Bei der sekretorischen Diarrhö kommt es zu einer gesteigerten Sekretion von Anionen, vor allem Chlorid und Bikarbonat, denen Kationen und Wasser osmotisch folgen. Dieses äußert sich in heftigen, wässrigen Durchfällen, wobei Volumen- und Elektrolytverlust häufig durch orale oder parenterale Rehydratation bilanziert werden müssen. Ein typischer Erreger einer sekretorischen Diarrhöe ist der Cholera-Erreger *Vibrio cholerae* (47). (3) Die sogenannte Leckfluxdiarrhö basiert auf einer lecken Darmbarriere. Verschiedene enterale Erreger können fokale Läsionen (48) und/ oder TJ-Destruktionen im Epithel induzieren. Der bakterielle Durchfallerreger *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) verursacht im Zellmodell sogenannten *leaky regions*, die durch eine erhöhte Leitfähigkeit und eine Umverteilung von Claudin-3, -4 und -8 aus der TJ in das Zytoplasma charakterisiert sind. Zusätzlich kann eine verminderte Expression von ZO-1 und von Claudin-2, -3, -8 und -10 in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Eine Inhibition der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) bewirkt hier eine Wiederherstellung der durch *Y. enterocolitica* reduzierten Claudin-8 Expressionslevel und eine teilweise Inhibition des TER-Abfalls (49). *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), ein weiterer typischer Durchfallerreger, induziert in der humanen Kolonmukosa Apoptosen, eine verminderte Expression der barrierebildenden Claudine-3, -4, -5 und -8 und eine Umverteilung von Claudin-1, -5 und -8 aus der TJ (50).

Zumeist kommt es zu einer Kombination von verschiedenen Störungen, die sich in einer Mischung aus Diarrhö-Mechanismen widerspiegeln. Die *C. jejuni*-Kolitis ist neben einer lecken Epithelbarriere noch durch eine Malabsorption charakterisiert (50). *Vibrio cholerae* produziert verschiedene Toxine. Während das Cholera-Toxin eine Chloridsekretion durch Aktivierung entsprechender Ionenkanäle stimuliert, verursacht das Zonula Occludens-Toxin eine TJ-Störung (51). Auch bei einer Norovirus-Infektion liegt eine Kombination aus einer sekretorischen Diarrhö und einer Leckfluxdiarrhö zu Grunde, wobei letztere durch eine verminderte Expression von Claudin-4, Claudin-5 und Occludin sowie ein vermehrtes Auftreten von Apoptosen gekennzeichnet ist (52).

Die Antibiotika-assoziierten Diarrhöen stellen eine Sonderform dar, die durch eine Störung der kommensalen Mikrobiota induziert wird. Die humane Darmmukosa ist dicht mit Mikroorganismen besiedelt, die in erster Linie eine protektive Funktion für den Wirtsorganismus haben. Neben der Förderung des Epithelstoffwechsels, der Anregung der Darmperistaltik sowie der

Stimulation zur Ausbildung des darmassoziierten Immunsystems, vermittelt die kommensale Mikrobiota die Aufrechterhaltung einer mikrobiellen Barriere (Kolonialisierungsresistenz). Unter normalen physiologischen Bedingungen besteht ein mikro-ökologisches Gleichgewicht. Wird dieses zum Beispiel durch eine Antibiotikatherapie gestört, kann es durch eine überschießende Vermehrung und/ oder Toxinproduktion zur Entstehung von Krankheiten kommen. Ein typisches Beispiel hierfür ist das Bakterium *Clostridioides difficile*, das 15-20 % aller Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen verursacht (53). Aber auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (54) und dem Reizdarmsyndrom gibt es Hinweise auf eine veränderte Mikrobiota (55).

Die Wirkungsweisen intestinaler Diarrhö-Erreger sind mannigfaltig und speziesspezifisch, was eine individuelle Erforschung der diversen Pathomechanismen erfordert.

1.3.2 Inflammatorisch assoziierte Barrierestörung

Häufig korreliert eine gestörte Darmbarrierefunktion mit einer Immunaktivierung. Der gesteigerte Übertritt von (makro)molekularen Antigenen über die gestörte Darmbarriere triggert eine Immunantwort und es kommt lokal zur Ausschüttung von Zytokinen. Eine große Anzahl verschiedenster Studien an Patientinnen und Patienten, Tiermodellen und Zellkulturen konnte belegen, dass insbesondere proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel der Tumornekrosefaktor α (TNF α) selbst schädigend auf die Architektur und Funktion der Darmbarriere wirken und eine Barrierestörung induzieren bzw. zusätzlich befeuern können, so dass eine Art Teufelskreis besteht (56). Im Folgenden sollen vier Erkrankungen vorgestellt werden, denen trotz unterschiedlicher Genese allen eine intestinale Barrierestörung zugrunde liegt, die mit einer Immunaktivierung assoziiert ist.

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (UC) sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), die multifaktoriell bedingt sind und typischerweise mit einer Darmbarrierestörung und einer schweren Inflammation mit variabler Ausbreitung über die verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes einhergehen. Eine vollständige Heilung ist bisher nicht möglich, da weder die Ursache für die Entstehung dieser Erkrankungen noch die zugrundeliegenden Pathomechanismen vollständig verstanden sind. Der TER der Kolonmukosa ist bei beiden Krankheitsformen reduziert und die Permeabilität für Markermoleküle unterschiedlicher Größe erhöht (57-60). Die Barrierestörung bei MC-Patientinnen und -Patienten ist durch eine verstärkte Expression des Kationen- und Wasserkanals Claudin-2, eine verminderte Expression von Occludin und Claudin-3 sowie durch eine verminderte Expression und Umverteilung von Claudin-5 und -8 gekennzeichnet (59). Bei der UC sind die Claudine 1 und 4 sowie Occludin (40) und Tricellulin (60) im Darmepithel vermindert exprimiert, während das Level von Claudin-2 wie bei MC erhöht ist (40). Analysen der TJ-Ultrastruktur in sigmoidalen Biopsien von Patientinnen und Patienten mit MC als auch UC zeigen zudem eine verringerte Anzahl an TJ-Strängen, eine verminderte Tiefe des TJ-Maschenwerks und beim MC auch eine Zunahme von TJ-

Strangbrüchen, was insgesamt auf eine reduzierte Komplexität der TJ schließen lässt (58, 59). Bei beiden CED-Formen treten vermehrt Apoptosen im Darmepithel auf (59, 61), bei der UC zusätzlich noch Mikroerosionen und Ulzerationen (61).

Die chronische bzw. in rezidivierenden Schüben auftretende Entzündung des Darmepithels wird durch eine gesteigerte Expression und Aktivität von proinflammatorischen Zytokinen getriggert. Primär liegen beiden Krankheitsbildern unterschiedliche T-Zellantworten zu Grunde. Beim MC kommt es hauptsächlich zu einer Th1/Th17-Antwort, bei der vorwiegend Interferon γ (IFN γ), Interleukin (IL)-12 und -23 eine Rolle spielen. Bei der UC herrscht hingegen eine Th2-ähnliche Antwort vor, bei der IL-13 durch Natürliche Killer-T-Zellen produziert wird. Darüber hinaus ist sowohl beim MC als auch bei der UC TNF α eines der vorherrschenden Zytokine, das sekundär als Antwort auf die primäre Th1/Th17 bzw. Th2-ähnliche Antwort ausgeschüttet wird (62, 63). Insbesondere die Wirkung von TNF α , IFN γ und IL-13 auf die epitheliale Barrierefunktion ist mittlerweile gut untersucht. Sowohl in Zellmodellen als auch im Tiermodell konnte bestätigt werden, dass diese proinflammatorischen Zytokine vergleichbare Barriere-defekte induzieren, wie sie bei CED-Patientinnen und -Patienten zu beobachten sind. Elektronenmikroskopische Gefrierbruchanalysen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 zeigen, dass TNF α die Anzahl von TJ-Strängen und die Tiefe des TJ-Maschenwerks deutlich reduziert (58, 64). TNF α stimuliert in diesem Zellmodell die Expression des kanalbildenden Claudin-2 über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (65) und induziert eine Umverteilung des abdichtenden Claudin-1 in subapikale Kompartimente (66). Am Rattenkolon bewirken TNF α und IFN γ in Kombination eine Hochregulation von Claudin-2 und eine Expressionsreduktion von Claudin-1, -5 und -7 (67). Darüber hinaus induziert TNF α Epithelzellapoptosen (68, 69). In einer Studie an humanen Biopsien von MC-Patientinnen und -Patienten konnte bestätigt werden, dass die Verabreichung eines TNF α -Antikörpers eine verminderte Apoptoserate und Wiederherstellung der Barrierefunktion bewirkt (70).

Auch das UC-Effektorzytokin IL-13 verursacht Apoptosen im Epithel (71) und stimuliert die Claudin-2-Expression (40). Zusätzlich beeinträchtigt IL-13 die Restitution des Epithels (40) und reduziert die Expression von Tricellulin, wobei letzteres mit einer erhöhten Makromolekülpermeabilität einhergeht (60).

IFN γ induziert in Kombination mit TNF α ebenfalls Zelltod in Form von Nekroptose (72). Erhöhte IFN γ -Level allein bedingen eine Internalisierung von TJ-Proteinen via Endozytose (73). In T84-Zellen verursacht IFN γ eine Aktin-Restrukturierung, eine Verminderung des Gerüstproteins ZO-1 (74) und eine Internalisierung von Claudin-1 und -4, Occludin und dem Junctional Adhesion Molecule-A aus der TJ (75). Diese Prozesse werden durch eine Aktivierung der GTPase RhoA getriggert, was wiederum zu einer gesteigerten Expression der Rho-assoziierten Kinase führt, die letztlich die Myosin light chain (MLC) phosphoryliert und somit aktiviert (76).

Bei der Graft versus Host Erkrankung (graft-versus-host disease; GvHD) kommt es nach einer allogenen Transplantation von Knochenmark, Blutstammzellen oder Nabelschnurblut bei 30-60 % der Betroffenen zu einer systemischen Entzündung, die sich hauptsächlich in der Haut, der Leber und dem Darm manifestiert. Letzteres geht mit Übelkeit, Erbrechen, abdominalen Krämpfen und Diarrhöen einher. In der aktiven GvHD findet sich im Darmepithel neben dem histologisch bestätigten Auftreten von Kryptenabzessen (77) und Epithelzellapoptosen (77, 78) ein reduzierter epithelialer Widerstand, eine verstärkte Expression von Claudin-2 und eine Umverteilung von Claudin-5 in die basolaterale Membran (78). Dieses ist höchstwahrscheinlich ebenfalls auf die Aktivität proinflammatorischer Zytokine zurückzuführen (79, 80). Darüber hinaus konnte in der Kolonmukosa von Patientinnen und Patienten mit aktiver GvHD eine gesteigerte Transportaktivität für die makromolekulare Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen werden (78). Dieses stützt wiederum die Hypothese, dass eine gesteigerte Translokation mikrobieller Produkte oder luminaler Antigene die Immunaktivierung triggern und somit einen „Zytokinsturm“ auslösen (81).

Nach Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) kommt es initial zu einer starken Virusreplikation und T-Zellaktivierung in der intestinalen Mukosa. Eine Infiltration von Perforinproduzierenden CD8 Zellen (82) sowie eine lokale Ausschüttung von Zytokinen, wie $TNF\alpha$, IL-4 und IL-2 (83) induzieren eine Barriestörung, die durch ein vermehrtes Auftreten von Epithelzellapoptosen, eine gesteigerte Expression von Claudin-2 und eine verminderte Expression von Claudin-1 gekennzeichnet ist. Der Hypothese folgend, sind insbesondere die Epithelzellapoptosen von zentraler Bedeutung für die HIV-Immupathogenese, da hierüber mutmaßlich eine verstärkte Translokation mikrobieller Antigene erfolgt, was zu einer systemischen Immunaktivierung und Immunzelldepletion führt (84). Dieses ist letztlich ursächlich für die Anfälligkeit für opportunistische Infektionen und bestimmte Tumore. So gibt der Nachweis erhöhter Lipopolysaccharid (LPS)-Level im Serum HIV-positiver Patientinnen und Patienten Anlass zu der Annahme, dass es hier möglicherweise zu einem verstärkten Übertritt von LPS aus dem Darmlumen in die Zirkulation kommt (84). Diese Hypothese wird durch weitere Studien gestützt, die zeigen, dass eine suppressive antivirale Therapie bei HIV-positiven Patientinnen und Patienten zu einer Verminderung der LPS-Level im Serum sowie zu einer Normalisierung der mukosalen Zytokinlevel und Barrierefunktion führt (83).

Der Zusammenhang zwischen einer gestörten Darmbarrierefunktion und einer Immunaktivierung lässt sich auch bei dem klinischen Bild des postoperativen Ileus beobachten. Ein postoperativer Ileus tritt nach ca. 10-30 % aller viszeralchirurgischen Interventionen auf und ist initial durch eine neuronal vermittelte Inhibition der gastrointestinalen Motilität und eine Passagestörung gekennzeichnet (85). Dieses geht mit einer gesteigerten mukosalen Permeabilität für verschieden große Markermoleküle einher (86), auf die eine Entzündungsreaktion folgt, die durch das Einwandern von Leukozyten in die Tunica muscularis gekennzeichnet ist. Auch hier wird

davon ausgegangen, dass ein vermehrter Übertritt von Antigenen über die lecke Darmmukosa zur Immunaktivierung führt (87). So zeigen Untersuchungen in einem Mausmodell des postoperativen Ileus, dass durch eine präoperative Spülung des Darms mit physiologischer Kochsalzlösung, das heißt durch Reduktion des Darminhalts und insbesondere der mikrobiellen Last, eine Permeabilitätszunahme von Fluoreszein, die Expression von TNF α und das Einwandern von Leukozyten in die *Tunica Muskularis* in der frühen Phase der Ileus-Entstehung inhibiert werden kann (88).

Die hier vorgestellten Beispiele zeigen eindrücklich, dass eine entzündlich getriggerte Barriestörung bei vielen verschiedenen Erkrankungen unterschiedlichster Ätiologie vorliegt und den Krankheitsverlauf grundlegend beeinflussen und vorantreiben kann. Prävention und Behandlung stellen nach wie vor große Herausforderungen dar und machen die Dringlichkeit für die Erforschung neuer innovativer Therapieansätze deutlich.

1.4 Stabilisierung und Protektion der epithelialen Barrierefunktion

Die Entschlüsselung und Charakterisierung zu Grunde liegender Pathomechanismen bilden die Basis zur Entwicklung neuer spezifischer therapeutischer Interventionsmöglichkeiten. Die beste Option, eine Barriestörung zu beheben, ist die auslösende Krankheit selbst zu heilen. Da dieses jedoch nicht immer möglich ist, kann zumindest eine Stärkung oder Protektion der epithelialen Barriere zur Linderung beitragen. Diverse Studien der letzten Jahre zeigen, dass dieses zum Beispiel durch bestimmte Probiotika oder Nahrungsinhaltsstoffe gefördert werden kann.

1.4.1 Modulation der intestinalen Barrierefunktion durch Probiotika

Als Probiotikum wird allgemein ein Produkt bezeichnet, das lebende Mikroorganismen enthält und bei entsprechender Verabreichung eine gesundheitsfördernde Wirkung auf den Wirtorganismus ausübt (89). Der Begriff Probiotikum leitet sich aus dem griechischen „pro bios“, übersetzt „für das Leben“ ab. Zu den bekannten Spezies probiotischer Bakterien gehören unter anderem Lactobazillen, Bifidobakterien, Streptokokken und einige *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme (90). Ihre Wirkmechanismen sind vielgestaltig. Durch Produktion bzw. Stimulation antibakterieller oder zytoprotektiver Substanzen können sie immunmodulatorisch wirken, Pathogene direkt bekämpfen oder die Zusammensetzung der TJ modifizieren (91). Probiotika kommen bereits seit vielen Jahren zur Prävention oder Therapie gastrointestinaler Erkrankungen zum Einsatz. Das Bakterium *E. coli* Nissle (EcN) wurde im Jahr 1917 durch den Arzt Alfred Nissle entdeckt und wird heutzutage in Form des Probiotikums Mutaflor® (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Germany und EcN, Cadigroup, Italien) zur Therapie gastrointestinaler Störungen verabreicht. In mehreren klinischen Studien konnte bestätigt werden, dass Mutaflor® den Zustand der Remission bei UC-Patientinnen und Patienten genauso gut erhalten kann, wie die Standardtherapie mit dem Glukokortikoid Mesalazin (92). Glukokortikoide oder Zytokinantago-

nisten kommen häufig zum Einsatz, um die intestinale Entzündungsreaktion bei CED-Erkrankten zu dämpfen. Eine Therapie mit Steroiden bringt auf Dauer jedoch schwere Nebenwirkungen mit sich und der Einsatz von Zytokinantagonisten ist sehr teuer.

Verschiedene Studien haben sich mit der Identifikation und Charakterisierung der Wirkmechanismen von EcN beschäftigt. So konnte gezeigt werden, dass EcN die Invasion von pathogenen Mikroorganismen, wie *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* oder *Y. enterocolitica* in Darmepithelzellen hemmen kann (93). EcN wirkt immunmodulatorisch und stimuliert die Expression des antimikrobiellen Peptids β -Defensin-2 (94), dessen Expression insbesondere bei Betroffenen mit MC reduziert ist (95) und hat einen regulatorischen Einfluss auf bestimmte, für die Entzündungsantwort relevante microRNAs (96, 97). In einer 2014 publizierten Studie wurde EcN zur Erzeugung eines transgenen Probiotikums genutzt, welches das immunmodulatorische Nematodenprotein Cystatin exprimiert und sezerniert. Untersuchungen zeigten, dass dieser transgene EcN-Stamm die Barrierefunktion sowohl im Zellkulturmodell als auch im Kolon von Ferkeln verbessert und die Entzündungsantwort im murinen Kolitis-Modell sowie im Darm von Absatzferkeln inhibieren kann [127]. Einige Arbeiten beschreiben eine indirekte Einflussnahme auf die epitheliale Barrierefunktion über die Regulation von ZO-Gerüstproteinen. In T84-Zellen stimuliert EcN die Expression des Gerüstproteins ZO-2 und des Desmosomen-Proteins Pinin und hemmt eine durch Enteropathogene *E. coli*-induzierte Umverteilung von ZO-2 (98). Im Kolitis-Mausmodell stimuliert EcN hingegen die Expression von ZO-1 (99). Trotz intensiver Forschung sind die barriereprotektiven und stabilisierenden Mechanismen des EcN nicht abschließend verstanden. Insbesondere sind die verantwortlichen bakteriellen Faktoren bisher nicht identifiziert.

1.4.2 Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen auf die intestinale Barrierefunktion

Nahrungsinhaltsstoffe passieren täglich den menschlichen Gastrointestinaltrakt, werden hier weiter enzymatisch gespalten, mikrobiell umgesetzt und über erleichterte Diffusion oder aktive Transportprozesse aus dem Darmlumen aufgenommen. Das heißt, Nahrungsinhaltsstoffe und ihre Metaboliten treten in direkten Kontakt mit den Epithelzellen und haben somit das Potential direkt auf die Barrierefunktion zu wirken.

Milch enthält verschiedene Proteinfractionen, vor allem Molkeproteine und Casein, aber auch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Immunglobuline, die für die frühkindliche Entwicklung des Darms und die Reifung des Immunsystems relevant sind (100). Ihre Wirkung auf die epitheliale Darmbarrierefunktion ist bisher allerdings wenig untersucht. Eine Studie an einem Kolitis-Modell der Maus beschreibt einen inhibierenden Effekt auf die Expression des $\text{INF}\gamma$ -Rezeptors und eine Linderung der intestinalen Entzündung nach oraler Verabreichung eines Molkeproteinkonzentrats (101). Das bovine Molkeproteinkonzentrat WPC1 (whey protein concentrate 1) und das caseinreiche Magermilchpulver NFDM (nonfat dry milk), zwei Präparationen, die

für die Produktion von Säuglings- und Kleinkindernahrung zum Einsatz kommen, zeigen unterschiedliche Effekte auf die epitheliale Barriere im Zellmodell, was auf dem unterschiedlichen Gehalt an Wachstumsfaktor Transforming growth factor β (TGF β) beruht. Im HT-29/B6 Zellmodell stimuliert das an TGF β reiche WPC1 einen Widerstandsanstieg und eine Reduktion der Fluoreszein-Permeabilität, was mit einer Expressionszunahme von Claudin-4 einhergeht und erweist sich darüber hinaus gegenüber einer INF γ -induzierten Barrierestörung als protektiv. Im Gegensatz dazu zeigt NFDM, das geringere Mengen an Molkeproteinen und TGF β enthält, keine Barrierewirksamkeit (102). Verschiedene Wachstumsfaktoren sind bekannt, die Barriereintegrität durch Stimulation von Zellproliferation und Restitutionsprozessen zu stärken (103). TGF β kommt sowohl in humaner Muttermilch als auch in Kuhmilch in hohen Konzentrationen vor und hat neben seinem Einfluss auf die neonatale Entwicklung und Reifung auch einen regulatorischen Einfluss auf Entzündungsprozesse und Reparaturprozesse im Epithel, kann vor Infektionen schützen und das Allergiepotezial reduzieren (104). An T84-Zellen stimuliert TGF β einen Widerstandsanstieg, eine verstärkte Expression von Claudin-1 und kann eine durch enterohämorrhagische *E. coli* induzierte Barrierestörung inhibieren (105).

Andere Studien untersuchen die Wirksamkeit von verschiedenen Pflanzeninhaltsstoffen auf ihre protektiven Eigenschaften an der epithelialen Barriere. Polyphenole bilden eine große Gruppe mit verschiedenen Subgruppen bioaktiver Verbindungen, wie zum Beispiel Flavonoiden, Ligninen und Tanninen, die natürlicherweise in Pflanzen vorkommen. Das Flavonol Quercetin gehört zu den am häufigsten vorkommenden Flavonoiden und findet sich in bestimmten Obst- und Gemüsesorten, wie zum Beispiel Äpfeln oder Zwiebeln (106). Im Zellmodell stimuliert Quercetin einen dosisabhängigen TER-Anstieg, eine Permeabilitätsminderung für Natrium und Chlorid, und eine Expressionssteigerung von Claudin-4 (107). Untersuchungen am nativen Ileum und Kolon der Ratte ex vivo in Ussing-Kammern zeigen zudem, dass Quercetin den durch TNF α und INF γ verursachten TER-Abfall und die Expressionsregulation von Claudin-2 inhibieren kann (66).

Auch eine Reihe anderer Pflanzeninhaltsstoffe, wie 6-Shogaol aus dem Ingwerrhizom (*Zingiber officinale*), das Gummiharz des Myrrhenbaums (*Commiphora molmol*) oder das Alkaloid Berberin, das sich unter anderem in der Berberitze (*Berberis vulgaris*) oder der Orangenwurzel (*Hydrastis canadensis*) findet, zeigen ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung auf die durch TNF α induzierte Barrierestörung. Alle drei Substanzen inhibieren die durch TNF α bedingte Stimulation der Claudin-2-Expression und die Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ im HT-29/B6 Zellmodell (66, 108, 109). Berberin und Shogaol wirken hierbei durch Inhibition der Phosphorylierung der Akt-Kinase und Nuclear factor kappa B (NF κ B)-Signaltransduktion (66, 108), während Myrrhe die Expressionsregulation von Claudin-2 durch Hemmung des Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) Signalweges beeinflusst (109). Diese

Untersuchungen zeigen eine sehr ähnliche protektive Wirkungsweise dieser Pflanzeninhaltsstoffe auf die inflammatorisch induzierte Barrierestörung und die TJ-medierte Barrierefunktion. Möglicherweise lassen sich hier grundlegende Wirkmechanismen ableiten, auf deren Basis eine Entwicklung neuer Interventionsmöglichkeiten oder Therapiekonzepte erfolgen könnte. Die Wirkung vieler Nahrungsinhaltsstoffe auf die epitheliale Barriere ist bisher jedoch noch kaum erforscht und ihr Potential somit nicht erkannt.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Die epitheliale Darmbarriere ist fortwährend verschiedensten Reizen aus dem Darminhalt ausgesetzt. Diese können gegensätzliche Effekte auf die Barrierefunktion des Darmepithels ausüben, das heißt sie können schadhaft wirken und die Barrierefunktion stören oder aber diese stabilisieren bzw. schützen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung molekularer Prozesse, die die Barrierefunktion modulieren und entweder in einer Barrierestörung oder aber in einer Barrierestabilisierung bzw. -protektion resultieren. Im Fokus stehen hierbei einerseits die molekulare Zusammensetzung und Integrität der TJ und andererseits die Induktion und Inhibition von Epithelzellapoptosen. Diese Aspekte werden hier anhand ausgewählter Stimuli im Zell- und Tiermodell untersucht. Im ersten Teil der Arbeit werden Mechanismen der Barrierestörung durch zwei enteropathogene Durchfallerreger erforscht, der zweite Teil beschäftigt sich mit Mechanismen der Barrierestabilisierung und -protektion durch ein ausgewähltes Probiotikum und verschiedene Nahrungsinhaltsstoffe. Ziel der Arbeit ist es, sowohl Patho- als auch Protektionsmechanismen auf molekularer Ebene zu entschlüsseln. Nur ein detailliertes Verständnis solcher Mechanismen ermöglicht eine gezielte Entwicklung von effektiven, innovativen Therapieansätzen und Interventionsmöglichkeiten für die Behandlung intestinaler oder auch systemischer Erkrankungen, die mit einer Barrierestörung assoziiert sind.

Zu den Themenkomplexen, Mechanismen der Barrierestörung bzw. Barrierestabilisierung und -protektion werden in dieser Arbeit die folgenden Fragestellungen untersucht:

Pathomechanismen enteraler Durchfallerreger an der epithelialen Barriere (Arbeit 1 und 2)

- 1.1 Verursacht *Y. enterocolitica* auch im Kolon eine Barrierestörung und durch welche molekularen Mechanismen ist diese charakterisiert? (Arbeit 1)
- 1.2 Beruht die durch den Erreger der Antibiotika-assoziierten hämorrhagischen Kolitis *Klebsiella oxytoca* induzierte Barrierestörung einzig auf der Zytotoxin-vermittelten Induktion von Epithelzellapoptosen oder gibt es eine zusätzliche Störung der Tight Junction-medierten Barrierefunktion? (Arbeit 2)

Stabilisierende und protektive Wirkung eines probiotischen Bakteriums und Nahrungsinhaltsstoffen auf die epitheliale Barriere

2.1 Welcher bakterielle Faktor des probiotischen *E. coli Nissle* ist für die Barrierestabilisierung verantwortlich und über welche Signaltransduktionsmechanismen wird dieses vermittelt? (Arbeit 3)

2.2 Welchen Einfluss hat das in der humanen Muttermilch enthaltene Protein Lactoferrin auf die Barrierefunktion? Kann seine Wirkungsweise an der epithelialen Darmbarriere seinen Zusatz in Säuglingsnahrung rechtfertigen? (Arbeit 4)

2.3 Auf welchen molekularen Wirkmechanismen beruht die mutmaßlich gesundheitsfördernde Wirkung des Polyphenols Punicallagin und seiner Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A am Darmepithel? (Arbeit 5)

Für die Untersuchungen kamen vorrangig Zellmodelle verschiedener intestinaler Zelllinien (T84, HT-29/B6, Caco2) zum Einsatz. Hierfür wurden die auf Filterinserts kultivierten epithelialen Zellmonolayer mit den genannten enteropathogenen Bakterien infiziert bzw. mit den gewählten Nahrungsinhaltsstoffen und Metaboliten inkubiert. Ein Entzündungsmodell wurde durch Stimulation der Zelllayer mit dem proinflammatorischen Zytokin $TNF\alpha$ generiert. Der Einsatz von Tiermodellen ermöglichte eine Untersuchung der Barrierestörung auf höherer Komplexitätsebene. Die Barrierefunktion der epithelialen Zelllayer bzw. die murinen oder porzinen intestinalen Mukosaprobe wurden zur eingehenden Charakterisierung elektrophysiologischen, molekularbiologischen, protein-biochemischen und konfokal-mikroskopischen Untersuchungen unterzogen.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Nachweis und Charakterisierung eines neuen *Yersinia enterocolitica*-Pathomechanismus am Kolon der Maus

Das enteropathogene Bakterium *Y. enterocolitica* ist ein typischer Durchfallerreger, der beim Menschen akute Enteritis, Enterokolitis, mesenteriale Lymphadenitis oder Ileitis (Yersiniose) hervorrufen kann. In Abhängigkeit von Alter und Immunstatus kann es auch zu postinfektiösen Erkrankungen, wie zum Beispiel einer reaktiven Arthritis kommen. Während die Pathogenität dieses Erregers im Ileum bereits sehr gut untersucht ist (110, 111), wurden mögliche Pathomechanismen im Kolon bisher nicht erforscht.

In einer vorangegangenen Studie am Epithelmodell der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 konnte bereits gezeigt werden, dass die durch *Y. enterocolitica* induzierte Barrierestörung durch lokale TJ-Defekte und das Auftreten von Nekrosen charakterisiert ist (49). Um diese in vitro beobachteten Effekte auf die TJ-medierte Barriere in vivo zu bestätigen, wurden Mäuse mit dem Erreger oral infiziert und die physiologischen und molekularen Effekte am murinen Kolonepithel untersucht.

Symptomatisch ging die Infektion der Mäuse mit der Ausscheidung wässriger Fäzes und einem Gewichtsverlust einher. Eine Invasion des Erregers in das Darmepithel konnte sowohl im Ileum als auch im Kolon spezifisch mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung mikroskopisch nachgewiesen werden. Vermessungen von epithelialen Ileum- und Kolonproben in Ussingkammern ergaben eine Verminderung des TER und eine Zunahme der Fluoreszein (332 Da)-Permeabilität. Weitere Untersuchungen mittels Western Blot und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie zeigten, dass dieses im Kolon mit einer verminderten Expression von Claudin-8, Occludin und Tricellulin und einer fokalen Umverteilung von Claudin-5 und Occludin korrelierte. Im Ileum wurde eine verminderte Expression von Occludin nachgewiesen. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig in vivo bestätigt werden, dass *Y. enterocolitica* auch das Kolonepithel invadiert und hier eine Barrierestörung verursacht. Die hier im Mausmodell beobachteten Pathomechanismen ergänzen die Befunde aus den vorangegangenen Zellkulturstudien (49) und stützen die Einordnung des Diarrhömechanismus als Leckflux. Ein verstärkter Übertritt von Antigenen über die gestörte Darmbarriere könnte zudem ursächlich für das postinfektiöse Auftreten von Arthritiden sein.

Hering N.A., Fromm A., Kikhney J., Lee I.F., Moter A., Schulzke J.D. & Bücker R. *Yersinia enterocolitica* Affects Intestinal Barrier Function in the Colon. *The Journal of Infectious Diseases* 2016;213(7):1157-62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv571>

JID (6 Seiten)

2.2 Identifikation eines neuen Pathomechanismus von *Klebsiella oxytoca*

Nach einer oralen Antibiotikatherapie mit Penicillin kann es als seltene Nebenwirkung zu einer segmentalen Kolitis mit blutiger Diarrhö und starken abdominellen Schmerzen kommen, die durch *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) Bakterien verursacht wird, die normalerweise Teil der gesunden Darmflora sind (112). Diese sogenannte Antibiotika-assoziierte-hämorrhagische Kolitis (AAHC) stellt eine Differentialdiagnose zur Antibiotika-assoziierten *Clostridioides difficile*-Kolitis dar. Bisher wurde die Symptomatik auf die von *K. oxytoca* sezernierten Toxine Tilivalline und Tilimycin zurückgeführt, die als starke Apoptoseinduktoren am Darmepithel wirken (113, 114).

Um weitere mögliche Effekte von *K. oxytoca* auf die epitheliale Darmbarriere zu untersuchen, wurden bakterielle Kulturüberstände des Toxin-produzierenden *K. oxytoca*-Stamms AHC6 und einer isogenen Tilivalline/Tilimycin-defizienten Mutante (Mut-89) im T84-Zellmodell untersucht. Die Kulturüberstände beider Stämme verursachten einen Abfall des TER, eine Zunahme der Permeabilität für Fluoreszein (332 Da) und FITC-Dextran-4kDa sowie eine Expressionsminderung und Umverteilung der abdichtenden TJ-Proteine Claudin-5 und -8 in den T84-Zelllayern. Weitere konfokalmikroskopische Analysen von Kolonproben aus mit AHC6 und Mut-89 infizierten Mäusen zeigten ebenfalls eine Umverteilung dieser beiden Claudine in den Kolonkrypten. Somit konnte bestätigt werden, dass diese Barrieredefekte unabhängig von Tilivalline/Tilimycin induziert wurden. Einzig eine Expressionsregulation von Claudin-1 wurde nachweislich durch die Toxine bedingt und konnte durch den Einsatz eines Apoptoseinhibitors geblockt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie ein neuer Pathomechanismus der AAHC identifiziert und nachgewiesen, dass der Erreger *K. oxytoca* über zwei verschiedene Mechanismen eine Barriestörung am intestinalen Epithel verursacht. Zusätzlich zu den durch die Toxine Tilivalline/Tilimycin stimulierten epithelialen Apoptosen, wird die Barriere durch eine gestörte Expression und Lokalisation von Claudin-5 und -8 geschwächt, was unabhängig von Tilivalline/Tilimycin erfolgt.

Hering N.A., Fromm A., Bücken R., Gorkiewicz G., Zechner E., Högenauer C., Fromm M., Schulzke J.D. & Troeger H. Tilivalline- and Tilimycin-Independent Effects of *Klebsiella oxytoca* on Tight Junction-Mediated Intestinal Barrier Impairment. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225595>

2.3 Barrierestabilisierende Regulationsmechanismen des Probiotikums *E. coli* Nissle

Bisherige Studien zeigen, dass *E. coli* Nissle (EcN), das als wirksamer Bestandteil der Präparation Mutaflor® therapeutisch verabreicht wird, immunmodulatorische Fähigkeiten aufweist und die Expression von ZO-Proteinen regulieren kann. Bisher war aber nicht bekannt, ob EcN auch durch Modulation der TJ die Barrierefunktion direkt beeinflussen und modulieren kann, welche Signalwege involviert sind und welcher bakterielle Faktor hierfür verantwortlich ist.

Um diese Fragen zu klären, wurden epitheliale Zellschichten der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 mit einer Präparation des EcN-Kulturüberstandes inkubiert. Dieses bedingte eine Zunahme des TER und eine parallele Abnahme der Permeabilität für Mannitol (182 Da). Zwei-Wege-Impedanzmessungen am HT-29/B6-Modell sowie an Mukosaproben aus Schweinen, die mit EcN gefüttert wurden, zeigten eine Zunahme des parazellulären Widerstandes, das heißt eine Abdichtung der durch die TJ determinierten parazellulären Route. Durch Einsatz einer Deletionsmutante konnte das TIR domain containing protein C (TcpC), das von EcN in den Kulturüberstand sezerniert wird, als ursächlich identifiziert werden. Dieses stimulierte über eine Aktivierung der PKC ζ und der extrazellulär regulierten Kinase 1/2 (ERK1/2) eine verstärkte Expression von Claudin-14. Die abdichtende Funktion dieses Claudins wurde durch Einsatz einer spezifischen small interfering RNA und die Messung von Dilutionspotentialen für Natrium- und Chloridionen experimentell bestätigt.

In dieser Studie konnte erstmalig ein direkter Einfluss von EcN auf ein TJ-Protein gezeigt werden, durch den es die Barrierefunktion stärkt. Der identifizierte molekulare Wirkmechanismus beruht hierbei auf einer durch das bakterielle TcpC-Protein stimulierten Expression von Claudin-14 über Aktivierung der Kinasen PKC ζ und ERK1/2.

Hering N.A.*, Richter J.F., Fromm A., Wieser A., Hartmann S., Günzel D., Bücken R., Fromm M., Schulzke J.D. & Troeger H. TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC ζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunology* 2014;7(2):369-78. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.55>

* geteilte Erstautorenschaft

2.4 Barriereprotektive Wirkmechanismen von Lactoferrin

Lactoferrin ist ein Glykoprotein, das natürlicherweise in der Muttermilch vorkommt (115) und zur frühkindlichen Entwicklung und Gesundheit beiträgt. Ihm werden unter anderem antiinflammatorische, antimikrobielle und antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben (116). Pädiatrische Studien konnten zeigen, dass Lactoferrin Frühgeborene vor einer nekrotisierenden Enterokolitis schützt und das Wachstum pathogener Mikroorganismen einschränkt (117, 118).

Gegenstand dieser Studie war es, einen direkten protektiven Einfluss von Lactoferrin auf eine inflammatorisch oder infektiös bedingte Barrierestörung am Zellmodell zu untersuchen.

In einem HT-29/B6-Entzündungsmodell wurde eine Barrierestörung durch das proinflammatorische Zytokin TNF α induziert. Eine Vorbehandlung der Zellschicht mit bovinem Lactoferrin konnte das durch TNF α stimulierte Auftreten von Apoptosen und eine TJ-Strangreduktion verhindern. Dieses spiegelte sich funktionell in einer anteiligen Inhibierung des TER-Abfalls und Permeabilitätszunahme von FITC-Dextran-4kDa wider. Hierbei zeigte sich, dass Lactoferrin ebenso effektiv wirkte, wie der pharmakologische Apoptoseinhibitor Q-VD-Oph.

Auch im Infektionsmodell erwies sich Lactoferrin als protektiv und konnte den durch *Y. enterocolitica* induzierten TER-Abfall sowohl in HT-29/B6- als auch in T84-Zellschichten partiell hemmen. Western Blot Analysen zeigten, dass Lactoferrin die Phosphorylierung der JNK durch *Y. enterocolitica* vollständig blockierte und eine Expressionsminderung von Claudin-8 somit verhinderte.

Zusammenfassend konnten in beiden Zellmodellen barriereprotektive Wirkmechanismen von Lactoferrin identifiziert und die Relevanz dieses Milchproteins für die gesunde frühkindliche Entwicklung somit bekräftigt werden.

Hering N.A., Luettig J., Krug S.M., Wiegand S., Gross G., van Tol E.A., Schulzke J.D. & Rosenthal R. Lactoferrin protects against intestinal inflammation and bacteria-induced barrier dysfunction in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2017;1405(1):177-188.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13405>

2.5 Barriereprotektion durch die Punicalagin-Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A

Das Ellagitannin Punicalagin ist ein Polyphenol und kommt vor allem in Granatäpfeln (*Punica granatum*) vor. Extrakte und Teile dieser Frucht finden aufgrund ihrer antiinflammatorischen (119, 120) und antidiarrhöischen Wirkung (121) schon lange in der traditionellen bzw. alternativen Medizin Anwendung. Wissenschaftliche Studien, die die molekularen Wirkmechanismen der Inhaltsstoffe charakterisieren und belegen, gibt es bisher jedoch kaum.

Dem wurde in dieser Arbeit nachgegangen und die protektiven und stabilisierenden Eigenschaften von Punicalagin und seinen bioaktiven Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A an der epithelialen Barriere untersucht. Hierfür wurde das Caco2-Zellmodell, das Dünndarmepitheliegenschaften aufweist und das Entzündungsmodell der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 genutzt.

Punicalagin selbst zeigte sich in beiden Zellmodellen kaum barrierewirksam. Ellagsäure induzierte hingegen einen dosisabhängigen TER-Anstieg und eine Abnahme der Fluoreszein (332 Da)-Permeabilität in Caco-2 Zelllayern. Dieses ging mit einer über die Aktivierung der Myosin-Light Chain Kinase 2 vermittelten Expressionsverminderung von Claudin-4, -7 und -15 einher. Urolithin A wiederum konnte die durch TNF α -induzierte Barriestörung im HT-29/B6 Entzündungsmodell durch Hemmung der Expressionsregulation von Claudin-1 und -2 und der Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ entgegenwirken.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Punicalagin-Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A in Abhängigkeit des Zellmodells auf unterschiedliche Weise auf die intestinale Barrierefunktion wirken. Ellagsäure wirkt vorrangig präventiv, in dem es die Barriere per se durch TJ-Modifikation in Dünndarmzellen stärkt. Urolithin A ist wiederum gegenüber einem inflammatorisch-induzierten Barriedefekt im Kolonzellmodell effektiv.

Hering N.A., Luettig J., Jebautzke B., Schulzke J.D. & Rosenthal R. The Punicalagin Metabolites Ellagic Acid and Urolithin A Exert Different Strengthening and Anti-Inflammatory Effects on Tight Junction-Mediated Intestinal Barrier Function In Vitro. *Frontiers in Pharmacology* 2021;12:610164. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.610164>

3. Diskussion

Die Barrierefunktion des Darmepithels spielt eine entscheidende Rolle für die Gesundheit des Gastrointestinaltrakts, das heißt ihr kommt eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung und Verhinderung von Krankheiten zu. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung und Charakterisierung von Mechanismen der Barriestörung und -protektion. Dafür wurden einerseits Pathomechanismen der infektiös bedingten Barriestörung durch zwei unterschiedliche Durchfallerreger charakterisiert und andererseits die stabilisierenden und protektiven Wirkmechanismen eines Probiotikums sowie ausgewählter Nahrungsinhaltsstoffe auf die epitheliale Barriere untersucht. Im direkten Vergleich lässt sich erkennen, dass Barriestörung und Barriereprotektion prinzipiell die gleichen molekularen Zielstrukturen und Mechanismen zu Grunde liegen. Einerseits stellt die TJ eine wesentliche Zielstruktur dar, über die der Verlust von Ionen und Wasser reguliert wird. Andererseits ist das Ausmaß an Epithelzellapoptosen, die als Eintrittspforte für immunmodulatorische Moleküle diskutiert werden, entscheidend. Das heißt, TJ-Modulation und Apoptoseregulation sind von zentraler Bedeutung für die Barriereintegrität und stellen somit potenzielle Ziele für therapeutische Interventionen dar.

3.1 Modulation und Regulation der Tight Junction als Mechanismus der intestinalen Barrierefunktion

In dieser Arbeit wurden die Pathomechanismen von zwei bakteriellen Durchfallerregern unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Während *Y. enterocolitica* hauptsächlich durch die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder Wasser in den Darm gelangt, kolonisiert das Bakterium *K. oxytoca* die gesunde Darmmukosa und wird erst bei einer Störung des mikrobiellen Ökosystems zum Pathogen. Beide Erreger verursachen eine Störung der TJ-Integrität, was die epitheliale Barrierefunktion schwächt und letztlich in einer Leckflux-bedingten Diarrhö resultiert. Erstmals konnte eine Invasion von *Y. enterocolitica* in das Kolonepithel gezeigt und eine Barriestörung in diesem Darmabschnitt nachgewiesen werden. Bisherige Untersuchungen beschäftigten sich vor allem mit der Induktion von Lymphknotenabzessen (122), der Invasion in M-Zellen und einer Translokation in die Peyerischen Plaques (110) im Ileum. Dieses steht aber vielmehr mit einer systemischen Ausbreitung von *Y. enterocolitica* in andere Organe in Zusammenhang, als mit einer tatsächlichen Barriestörung. Die vorliegende Arbeit konnte somit maßgeblich zum Verständnis der *Y. enterocolitica*-Diarröh zugrundeliegenden Pathomechanismen beitragen. Neben einem Widerstandsabfall und einer Zunahme der Fluoreszein-Permeabilität konnten eine verminderte Expression von Claudin-8, Occludin und Tricellulin und eine fokale Umverteilung von Claudin-5 und Occludin in der murinen Kolonmukosa nachgewiesen werden (123). Diese Beobachtungen stimmen prinzipiell mit den Befunden einer vorangegangenen Zellkulturstudie überein (49).

Die durch *K. oxytoca* hervorgerufene AAHC wurde bisher auf die durch die bakteriellen Zytotoxine Tilivalline und Tilimycin induzierten Epithelzellapoptosen zurückgeführt (113, 114, 124). Die hier durchgeführten Untersuchungen im Zell- und Mausmodell konnten jedoch einen weiteren Pathomechanismus an der epithelialen Barriere identifizieren, der in einer Zytotoxin-unabhängigen Expressionsminderung und Umverteilung der abdichtenden Claudine-5 und -8 besteht. Der durch *K. oxytoca* induzierten Barriestörung, die letztlich in der AAHC resultiert, liegen somit zwei verschiedene Pathomechanismen zu Grunde. Einerseits werden durch die Zytotoxine Apoptosen im Epithelzellverband induziert (113, 114, 124) und andererseits führen die Expressionsminderung und Umverteilung abdichtender Claudine in subapikale Kompartimente zu einer Schwächung der Barriere und einer erhöhten Durchlässigkeit für Ionen und Wasser (42).

Insbesondere Claudin-8 scheint eine relevante Zielstruktur bakterieller Erreger zu sein. So wurde eine Regulation dieses Claudins nicht nur in den vorliegenden Arbeiten durch *Y. enterocolitica* und *K. oxytoca* beobachtet (42, 49, 123), sondern auch durch *Arcobacter butzleri* (125) und *C. jejuni*, zwei Durchfallerreger aus der Familie der *Campylobacteraceae* (50). Weitere Veröffentlichungen zeigen, dass Claudin-8 ein Ziel bakterieller Toxine ist. So kann das *Clostridium perfringens* Enterotoxin an Claudin-8 binden (126), während die von *C. jejuni* sezernierte Serinprotease HtrA Claudin-8 spaltet (127). Eine Identifikation der Virulenzfaktoren, die für die durch *Y. enterocolitica* bzw. *K. oxytoca* induzierten TJ-Defekte verantwortlich sind, steht noch aus.

Die Untersuchung der barriereprotektiven Mechanismen des Milchproteins Lactoferrin zeigen, dass die durch *Y. enterocolitica* im HT-29/B6 Infektionsmodell stimulierte Aktivierung der JNK und die damit verbundene Expressionsminderung des abdichtenden Claudin-8 (128) durch das Milchprotein Lactoferrin verhindert werden kann (128). *Y. enterocolitica* und Lactoferrin modulieren offensichtlich die Aktivität der JNK in entgegengesetzter Richtung. Dieses Beispiel zeigt eindrücklich die Modulation von TJ-Proteinen durch verschiedene Effektoren und ihren gegensätzlichen Einfluss auf die Barrierefunktion. Andere Studien beschreiben eine Hemmung der durch *C. jejuni* hervorgerufenen Barriestörung durch die Polyphenole Resveratrol oder Curcumin (129, 130). Resveratrol verhindert im Zellmodell die durch *C. jejuni* induzierte Umverteilung von Claudin-5 und Occludin sowie eine Expressionsregulation von Claudin-1 und -2 (130).

Den enteralen Durchfallerregern stehen probiotische Bakterien, wie der hier untersuchte Stamm EcN gegenüber, der bereits seit vielen Jahren im Fokus der Forschung steht. Obwohl EcN in Form der Präparation Mutaflor® therapeutisch zum Einsatz kommt, waren bisher weder die bakteriellen Faktoren noch die Wirkmechanismen des EcN an der epithelialen Barriere im Detail bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnten nun sowohl ein bakterieller Faktor als auch ein zu Grunde liegender Regulationsmechanismus in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6

identifiziert werden, über den EcN die Barrierefunktion stabilisiert. Das von EcN in den Kulturüberstand sezernierte Protein TpcC stimuliert hier durch Aktivierung der PKC- ζ und der ERK 1/2 die Expression des abdichtenden Claudin-14, was in einem TER-Anstieg und einer verringerten parazellulären Permeabilität für Mannitol resultiert [126]. Das TpcC-Protein konnte in dieser Arbeit als neuer wirksamer bakterieller Faktor identifiziert werden (131). Bisher war einzig das Flagellenprotein FliA als immunmodulatorisch aktiver Faktor des EcN bekannt (94). Die durch EcN stimulierte Zunahme des TER über die Aktivierung von ERK1/2 sowie die TpcC-induzierte Expression von Claudin-14 konnte inzwischen auch in anderen intestinalen Zelllinien durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (132, 133). Möglicherweise gibt es noch einen weiteren TpcC-unabhängigen Regulationsmechanismus der Claudin-14-Expression durch extrazelluläre EcN-Vesikel, was allerdings bisher ausschließlich auf mRNA und nicht auf Proteinexpressionsebene gezeigt werden konnte (133). Diese Vesikel können auch einer durch EPEC induzierten Claudin-14 Expressionsminderung in T84-Zellen entgegenwirken (133). Die protektiven Mechanismen des EcN sind offensichtlich divers und bestehen neben seiner antagonistischen Wirkung auf Pathogene und seinen immunmodulatorischen Fähigkeiten (93, 94, 96, 134) in einer die Barrierefunktion direkt stabilisierenden- und protektiven Expressionsregulation von Claudin-14 und ZO-Proteinen (98, 99, 131). Letztendlich ist anzunehmen, dass die multiplen Wirkmechanismen des EcN von verschiedenen äußeren Gegebenheiten und Faktoren abhängen und durch die Interaktion mit den humanen Epithel- und Immunzellen, der Mikrobiota, verschiedenen Pathogenen sowie Stoffwechselprodukten und Nahrungsinhaltstoffen getriggert werden (135).

Nahrungsinhaltsstoffe werden während des Verdauungsprozesses aus der Nahrung freigesetzt und passieren in verschiedenen Verdauungsstufen den Gastrointestinaltrakt. So wird beispielsweise aus dem in Granatäpfeln (*Punica granatum*) enthaltenen Polyphenol Punicalagin im Magen durch saure Hydrolyse Ellagsäure gebildet, die dann wiederum im Darm durch bakterielle Spaltung zu Urolithin A und B umgesetzt wird (Abbildung 3). Das Gesundheitspotential des Granatapfelextrakts, das insbesondere Punicalagin und Ellagsäure enthält, wird gegenwärtig stark beworben und ist als Nahrungsergänzungsmittel in Form von Kapseln oder Saft erhältlich. Wissenschaftlich belegt ist seine Wirkung jedoch noch nicht abschließend. Verschiedene Studien weisen unter anderem auf antioxidative, antikanzerogene oder antiinflammatorische Effekte hin (121). Auch eine antidiarrhoische Wirkung ist beschrieben (119, 120), aber die zugrundeliegenden Wirkmechanismen waren bisher kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte für Punicalagin selbst keine Barrierewirksamkeit im Zellmodell beobachtet werden (136). Ausschließlich seine Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A zeigen Effekte in zwei unterschiedliche Barriere-Modellen. Während Ellagsäure die Barriere durch Modifikation der TJ per se stabilisiert, indem es insbesondere durch Expressionsminderung von Claudin-15 und Claudin-7 den Ionenfluss reduziert, wirkt Urolithin A durch Hemmung der

Expressionsregulation von Claudin-1 und -2 und der Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ protektiv gegenüber einer durch $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Barrierestörung (136). Die Stimulation der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 mit $\text{TNF}\alpha$ hat sich als Entzündungsmodell in der Barriereforschung bewährt (66, 108, 109, 136). $\text{TNF}\alpha$ verursacht in diesem Modell eine Zunahme von Claudin-1 und des kanalbildenden Claudin-2. Trotz verstärkter Expression kann Claudin-1 nicht funktional abdichtend agieren, da es nicht in der TJ lokalisiert ist. Offensichtlich kann dieser proinflammatorische Pathomechanismus durch verschiedene Nahrungsinhaltsstoffe gehemmt werden. Neben Urlothin A (136) können wie eingangs beschrieben auch Berberin (66), Shogaol (108) und Myrrhe (109), die durch $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Expressionsregulation und Lokalisation von Claudin-1 und -2 in HT-29/B6 hemmen. Inwiefern dieser Wirkmechanismus auch im Tiermodell oder Menschen nachgewiesen werden kann, bleibt in nachfolgenden Studien zu untersuchen.

3.2 Epithelzellapoptosen als Mechanismus der Barrierefunktion

Neben der Modulation und Regulation der TJ spielt auch das Auftreten von Epithelzellapoptosen eine entscheidende Rolle für die Barriereintegrität. Prinzipiell werden apoptotische Löcher im Epithel als Eintrittspforte für Erreger oder antigene (Makro)-Moleküle wie zum Beispiel LPS diskutiert (84), die wiederum eine Immunaktivierung triggern können, was schließlich in dem eingangs beschriebenen Teufelskreis mündet. Das heißt, eine Immunaktivierung führt zu einer verstärkten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die wiederum die Barrierefunktion schwächen. Eine Translokation von Bakterien selbst oder ihrer LPS aus dem Darmlumen in die Zirkulation kann unter Umständen eine lebensbedrohliche Sepsis auslösen (137). α -Hämolyysin produzierende *E. coli* induzieren zum Beispiel fokale Löcher (*focal leaks*) im Darmepithel, über die sie die Barriere überwinden (48) (138). Zytokine können die Translokation von Bakterien verstärken (139, 140).

Zur Charakterisierung der Barrierepermeabilität kommen verschieden große Markermoleküle zum Einsatz. Kleinere Moleküle, wie ^3H -Mannitol (182 Da) oder Fluoreszein (332 Da) können auf Grund ihrer kleinen Radien je nach Dichtigkeit noch die bizelluläre TJ passieren. Größere Moleküle wie das hier eingesetzte FITC-Dextran-4kDa oder auch Makromoleküle (> 10 kDa) können die Barriere nur über die tricelluläre TJ, Endozytoseprozesse oder apoptotische Lecks bzw. größere Läsionen im Epithel überwinden (24, 77, 78).

In Folge einer Infektion mit *Y. enterocolitica* kommt es in Abhängigkeit vom Immunstatus und Alter häufiger zu postinfektiösen Erkrankungen, einschließlich reaktiver Arthritis, Entzündung des subkutanen Fettgewebes (Erythema nodosum) oder Uveitis (141). Dies kann mit einer Translokation bakterieller Antigene in die Zirkulation und Immunaktivierung in Zusammenhang gebracht werden. So können in der Synovialflüssigkeit von Patientinnen und Patienten mit

reaktiver Arthritis *Yersinia*-Antigene (LPS) nachgewiesen werden (142). In dem in dieser Arbeit untersuchten *Yersinia*-Mausmodell, zeigt sich eine tendenzielle Zunahme der FITC-Dextran-4kDa-Permeabilität an der Kolonmukosa (123), was mit einer Translokation von Antigenen in Einklang gebracht werden kann. Dieses könnte hier auf eine verminderte Expression von Tricellulin zurückgeführt werden. Eine verstärkte Apoptoseinduktion wurde im Kolonepithel der Maus ausgeschlossen. Im Zellmodell verursacht *Y. enterocolitica* allerdings Nekrosen (49). Auch wenn sich der Prozess der Nekrose von dem der Apoptose unterscheidet, ist anzunehmen, dass hier ähnlich wie bei den Apoptosen kurzzeitig Löcher im Epithel entstehen, über die eine Antigentranslokation möglich ist (143). Dieses wurde im Mausmodell bis her jedoch nicht näher untersucht.

Die beiden *K. oxytoca* Toxine Tilimycin und Tilivalline sind starke Apoptoseinduktoren (113, 114) und stimulieren die Permeabilität von FITC-Dextran-4kDa im Zellmodell signifikant (42). Postinfektiöse Syndrome einer *K. oxytoca*-Infektion sind bisher nicht bekannt bzw. untersucht. Ein Zusammenhang mit der Entstehung von CED durch *K. oxytoca* konnte allerdings ausgeschlossen werden (144). In dem hier untersuchten T84-Zellmodell zeigt die pharmakologische Hemmung der Apoptose eine partielle Inhibition des durch Tilimycin- und Tilivalline induzierten TER-Abfalls. Auch die Toxin-Deletionsmutante verursacht einen signifikant geringeren TER-Abfall als der Wildtyp (42). Diese Befunde veranschaulichen die Barriererelevanz von Epithelzellapoptosen deutlich. Darüber hinaus stehen die durch *K. oxytoca*-Toxine verursachten Epithelzellapoptosen in einem direkten Zusammenhang mit einer Expressionsminderung von Claudin-1 (42). Auch in anderen Arbeiten konnte ein direkter Einfluss von Epithelzellapoptosen auf TJ-Proteine beobachtet werden. So ist beispielsweise eine Spaltung von Occludin und der Gerüstproteine ZO-1 und -2 nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin beschrieben (44). Eine aktuelle Arbeit zeigt, dass Occludin selbst einen regulativen Einfluss auf die Expression des Apoptoseenzym Caspase-3 hat und dieser Mechanismus bei einem entzündungsbedingten Verlust von Occludin einen protektiven Einfluss auf die Barriere hat (145). Das proinflammatorische Zytokin $TNF\alpha$ ist ebenfalls ein bekannter Apoptoseinduktor und kann die Permeabilität von FITC-Dextran-4kDa steigern (128). In der HT-29/B6-Zelllinie zeigt das Zytokin neben seiner proapoptotischen Wirkung auch Effekte auf die Expression und Lokalisation von Claudin-1 und -2. Interessanterweise sind hier beide Pathomechanismen offensichtlich vollkommen unabhängig voneinander. Das in dieser Arbeit untersuchte Milchprotein Lactoferrin kann die durch $TNF\alpha$ bedingte Apoptose vollständig inhibieren, nicht aber die Expressionsregulation von Claudin-1 und -2 (128). Das Punicalagin-Metabolit Urolithin A hingegen hemmt die durch $TNF\alpha$ hervorgerufene Expressionsregulation und Umverteilung von Claudin-1 und -2, aber nicht die Apoptose (136).

Lactoferrin hat sich in der hier untersuchten Studie als potenter Apoptoseinhibitor erwiesen.

Es hemmt die durch TNF α im Zellmodell induzierte Spaltung des Apoptoseenzym Caspase-3 und verhindert zusätzlich Effekte auf die TJ-Morphometrie. Lactoferrin wirkt hier gleichermaßen potent, wie der pharmakologische Apoptoseinhibitor Q-VD-Oph. Dieses spiegelt sich in einem geringeren TER-Abfall und verminderter Permeabilität für Fluoreszein und FITC-Dextran-4kDa wider. Eine antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkung von Lactoferrin am Darmepithel wird auch in anderen Studien beschrieben, die eine durch bakterielle LPS induzierten Barrierestörung im Mausmodell bzw. in der porzinen Dündarmzelllinie IPEC untersuchten (146, 147). Im DSS-Kolitismodel der Maus wirkt Lactoferrin ebenfalls antiinflammatorisch und reduziert die Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (148). Bisher ist Lactoferrin primär auf Grund seiner immunmodulatorischen Fähigkeiten in der Diskussion als Behandlungsoption bei CED [145]. Inwiefern Lactoferrin auch im menschlichen Darm die (Makro)molekültranslokation reduzieren und dieser Hypothese folgend zu einer verminderten Immunaktivierung beitragen kann, bleibt noch zu untersuchen. Aus den bisherigen Erkenntnissen kann geschlussfolgert werden, dass Lactoferrin eine besondere Rolle für die neonatale Barrierefunktion spielt, da der Gastrointestinaltrakt bei Neugeborenen unreif ist und sich Mikrobiom und Immunsystem noch entwickeln müssen. Eine intakte Barrierefunktion ist hier von besonderer Wichtigkeit, um die Translokation von Antigenen, Allergenen oder bakteriellen Toxinen zu verhindern und einer Entstehung von zum Beispiel Nahrungsmittelallergien oder schlimmstenfalls einer nekrotisierenden Enterokolitis vorzubeugen (128). Eine enterale oder orale Supplementierung von Lactoferrin in Kombination mit dem Probiotikum *Lactobacillus GG* kann das Risiko einer nekrotisierenden Enterokolitis oder Sepsis bei Frühgeborenen senken (149, 150). Als natürlicher Inhaltsstoff von Kolostrum und Muttermilch scheint Lactoferrin somit unverzichtbar und sein Zusatz in Säuglingsnahrung gerechtfertigt zu sein.

3.3 Neue Behandlungsoptionen und alternative therapeutische Strategien

Die beste Option eine Erkrankung zu heilen ist ihre Ursache zu beheben. Leider ist dieses nicht immer möglich, wie zum Beispiel bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, deren Ätiologie bis heute nicht vollständig verstanden ist. Die gegenwärtigen Therapieansätze und Behandlungsoptionen zielen hier vor allem auf die Eindämmung der Entzündungsreaktion ab, sind jedoch nicht immer erfolgreich und bringen häufig unerwünschte Nebenwirkungen mit sich. In manchen Fällen ist eine Operation zwingend notwendig, in der einzelne Abschnitte des Darms entfernt werden müssen. Der Leidensdruck der Betroffenen ist sehr hoch und die Notwendigkeit für neue bzw. alternative Therapieansätze somit gegeben.

Ziel ist es bei Erkrankungen, die mit einer inflammatorisch assoziierten Barrierestörung einhergehen, wie CED, HIV oder GvHD, durch Stärkung oder Protektion der intestinalen Barrierefunktion, die Immunaktivierung einzudämmen und darüber eine Linderung akuter Symptome zu erreichen. Bei einer bakteriell verursachten Barrierestörung kann durch Stärkung der Bar

rierefunktion der Wasser- und Elektrolytverlust (Diarrhö) eingedämmt und das Risiko für die Entstehung postinfektiöser Erkrankungen, wie zum Beispiel eines Reizdarmsyndroms, gesenkt werden (151). Insbesondere für kleine Kinder scheint der Aspekt der Eindämmung von Wasser- und Elektrolytverlust evident, da diese wesentlich schneller dehydrieren als Erwachsene. Eine im Jahr 2017 publizierte Studie zeigt hingegen, dass eine durch das Bakterium *Citrobacter rodentium* stimulierte Expressionszunahme von Claudin-2 im Mausmodell wesentlich für den Diarrhöprozess und eine damit einhergehende Auswaschung des Erregers ist. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen Claudin-2-defiziente Mäuse hier einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf, mit höheren Zytokinleveln, einer größeren Gewebeschädigung, einer verstärkten mukosalen Kolonialisierung durch den Erreger und einer längeren Ausscheidungsphase. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Diarrhö ggf. als Protektionsmechanismus fungiert, der der Auswaschung des Erregers dient und vor einem verlängerten Krankheitsverlauf schützt (152). Inwiefern dieses auch auf die durch *Y. enterocolitica* oder *K. oxytoca* induzierte Diarrhö zutrifft, ist bisher nicht untersucht.

Im Hinblick auf eine therapeutische Intervention sollte in jedem Fall abgewogen werden und zwischen einer inflammatorisch und einer bakteriell induzierten Barrierestörung unterschieden werden. Bakteriell hervorgerufene Diarrhöen sind häufig innerhalb weniger Tage selbstlimitierend, während bei den CED Durchfälle in immer wiederkehrenden Schüben auftreten und oft auch blutig sind, was auf Gewebeschädigungen hindeutet. Darüber hinaus haben insbesondere UC-Patientinnen und Patienten ein erhöhtes Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken (153), wobei das Risiko mit zunehmender Dauer der Erkrankung und mit dem Ausmaß der Inflammation steigt (154, 155). Die Erforschung alternativer Therapiekonzepte sollte somit immer krankheitsspezifisch erfolgen und erfordert zudem eine Erprobung und sichere Evaluation in verschiedenen Modellen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Barrierestörung und -protektion prinzipiell auf den gleichen Grundmechanismen basieren, nämlich TJ-Modulation und Apoptoseregulation. Die Unterschiede liegen jedoch im Detail und variieren mit den verschiedenen Stimuli. Während die Apoptoseregulation unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann, ist die TJ-Modulation sehr vielgestaltig und verschiedene Stimuli haben diverse Effekte auf unterschiedliche TJ-Proteine. Während das Zytokin TNF α insbesondere die Expression und Lokalisation von Claudin-1 und -2 beeinflusst, sind in den bakteriellen Infektionsmodellen mit *Y. enterocolitica* und *K. oxytoca* Claudin-8 und/ oder -5 betroffen. Das heißt, jede Barrierestörung hat ihre eigenen Charakteristika. Gleichermaßen verhält es sich mit den barriestabilisierenden Mechanismen. Während EcN die Expression des abdichtenden Claudin-14 stimuliert, stabilisiert Ellagsäure die Barriere durch verminderte Expression von kanalbildenden TJ-Proteinen, wie Claudin-7 und -15. Dieses hat auch Konsequenzen für die Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen von einem Modell auf ein anderes. Insbesondere Zellkulturmodelle stellen sehr isolierte Systeme dar, mit

denen zwar Fragestellungen auf molekularer Ebene präzise untersucht werden können, denen aber die Komplexität des Gesamtorganismus fehlt. Tiermodelle eignen sich hier besser, um eine Fragestellung auf dem Hintergrunde der Komplexität des Gesamtorganismus zu untersuchen und den Einfluss des Immunsystems, der Mikrobiota, des Nervensystems usw. zu berücksichtigen. Aber auch hier darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um Modelle handelt. Beispielsweise stellt die mit Dextran-Natriumsulfat induzierte Kolitis ein etabliertes murines CED-Modell dar. Tatsächlich unterscheiden sich die Mechanismen der Barrierestörung in diesem Modell aber von denen in CED-Patientinnen und -Patienten (156).

Auch die Speziesdiversität sollte bei der Modellwahl berücksichtigt werden. Möglicherweise eignen sich bestimmte Nagetiermodelle nicht für die Untersuchung eines bestimmten Nahrungsinhaltsstoffs, wenn dieser nicht zum spezifischen Nahrungsspektrum dieser Tierart gehört. Speziesbedingte Unterschiede sind nicht auszuschließen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Erforschung von Nahrungsinhaltsstoffen ist die Bioverfügbarkeit. Untersuchungen zeigen, dass beim Erwachsenen mehr als 60 % eines verabreichten bovinen Lactoferrins die Magenpassage überstehen (157). Die Magenpassage allein sagt aber noch wenig über die tatsächliche Aufnahme von Lactoferrin aus, was hauptsächlich im Darm durch Bindung an Lactoferrin-Rezeptoren auf Enterozyten erfolgt (158). Während bei Kindern humanes Lactoferrin in signifikanten Mengen im Stuhl nachgewiesen werden kann (159), steigt die Fähigkeit dieses Protein zu verdauen bzw. aufzunehmen mit zunehmendem Alter (157). Auch Ellagsäure und Urolithin A zeigen sich wirksam in Kolitismodellen der Maus oder Ratte (160-163). Während Urolithin A im Entzündungsmodell der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 protektiv ist, wirkt Ellagsäure vor allem in der Caco-2 Zelllinie, die zwar ursprünglich eine Kolonkarzinomzelllinie ist, aber nachweislich Dünndarमेigenschaften aufweist (164). Diese unterschiedlichen Befunde und Wirkungsweisen sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Entstehungsorte von Ellagsäure und Urolithin A im Verdauungstrakt zurückzuführen (Abbildung 3). Neben dem Prozess der Verstoffwechslung und dem Wirkungsort von Nahrungsinhaltsstoffen sind auch eine adäquate Konzentration und eine lokale Bioverfügbarkeit relevant. In den hier untersuchten Zellmodellen wurden alle zu untersuchenden Substanzen (Lactoferrin, Ellagsäure, Urolithin A) stets von apikal und basolateral verabreicht, um osmotische Effekte zu vermeiden. Einzelne, nicht veröffentlichte Versuche zeigen jedoch, dass ihre Wirkung insbesondere von einer basolateralen Applikation abhängig ist. Somit bleibt zu vermuten, dass auch im menschlichen Körper zuerst eine Aufnahme dieser Nahrungsinhaltsstoffe bzw. Metaboliten in die Zirkulation erfolgt und diese dann von basolateral mit den Epithelzellen interagieren. Auch eine direkte Translokation über Defekte (z.B. Apoptosen) in der Darmbarriere ist denkbar, zum Beispiel im Falle von Lactoferrin.

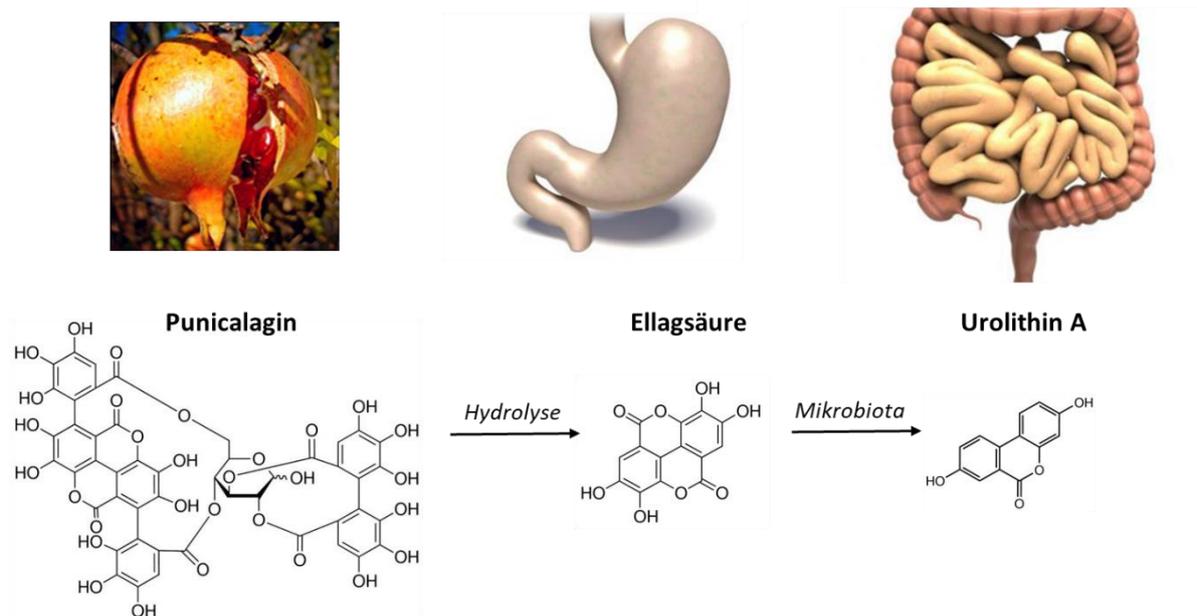


Abbildung 3: Chemische Strukturen, Entstehung und Wirkungsorte der Punicalagin-Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A. Das vor allem in Granatäpfeln enthaltene Punicalagin zerfällt im Magen durch saure Hydrolyse zu Ellagsäure. Diese gelangt in den Dünndarm und wird im Dickdarm durch die intestinale Mikrobiota unter anderem zu Urolithin A verstoffwechselt. (Bildnachweise: Grantapfel (161), Organe: www.medicalgraphics.de/kostenlose-bilder/search.html; Stand 08.09.2022)

Die Aspekte der Modellwahl und Bioverfügbarkeit sollten bei der Untersuchung und Erprobung neuer Therapieoptionen unbedingt berücksichtigt werden. Grundlagenforschung an Zell- und Tiermodellen ist unumgänglich notwendig, um neue Therapieoptionen zu erforschen und ausschlaggebend für ihre Entwicklung. Ihre Effektivität und sichere Anwendung bleiben aber zuletzt in gut kontrollierten klinischen Studien zu bestätigen.

4. Zusammenfassung

Das Epithel der Darmmukosa wird durch eine einzelne Schicht von Enterozyten gebildet, die apikal durch die TJ miteinander verbunden sind. Diverse Studien zeigen, dass eine Störung der TJ-Integrität sowie ein vermehrtes Auftreten von Epithelzellapoptosen zu einer Barriere-störung führen, die durch einen verminderten transepithelialen Widerstand und eine erhöhte Molekülpermeabilität gekennzeichnet ist. Dieses lässt sich bei verschiedensten intestinalen und systemischen Erkrankungen, die mit einer intestinalen Barriere-störung einhergehen, beobachten. Aus der Barriere-dysfunktion resultieren ein verstärkter Verlust von Ionen und Wasser (Diarrhö) und eine gesteigerte Translokation von Allergenen, Antigenen und anderen Noxen, die wiederum eine Immunaktivierung und Entzündungsreaktion triggern können. Insbesondere die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$ oder IL-13,

hat eine Verstärkung des Barrieredefekts zur Folge, da diese ebenfalls modulatorisch auf die TJ wirken und Epithelzellapoptosen induzieren können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entschlüsselung und Charakterisierung von Pathomechanismen der Barriestörung einerseits und mit protektiven Mechanismen, die die Barrierefunktion schützen und stärken können andererseits. Die Identifizierung und molekulare Erforschung solcher Mechanismen bildet die Basis, auf der potenziell die Entwicklung neuer, effektiver therapeutischer oder präventiver Interventionen zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Barriestörung verknüpft sind, erfolgen kann.

Im ersten Teil werden Pathomechanismen der bakteriell induzierten Barriestörung analysiert. Untersuchungen in einem murinen Infektionsmodell charakterisieren erstmalig einen Pathomechanismus des Durchfallerregers *Y. enterocolitica* im Kolon. Das Bakterium verursacht hier eine Barriestörung, die auf einer Expressionsminderung der TJ-Proteine Claudin-8, Occludin und Tricellulin und einer fokalen Umverteilung von Claudin-5 und Occludin aus der TJ basiert (123). Auch für *K. oxytoca*, den Erreger der AAHC, kann im Zell- und Mausmodell eine verminderte Expression und Umverteilung von Claudin-5 und -8 sowie eine Apoptose-abhängige Expressionsminderung von Claudin-1 nachgewiesen werden. Dieser neu identifizierte Pathomechanismus trägt, zusammen mit der bereits bekannten Induktion von Epithelzellapoptosen (113, 114), zur Barriestörung und Diarrhöentstehung der AAHC bei (42). Dem gegenüber steht im zweiten Teil die Analyse protektiver Mechanismen an der epithelialen Barriere durch das Probiotikum EcN, dem Milchprotein Lactoferrin und den Punicallagin-Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A. Die Untersuchungen identifizieren das von EcN in den Kulturüberstand sezernierte Protein TcpC, das über die Aktivierung der Signalkinasen PKC ζ und ERK1/2 eine Expressionszunahme des abdichtenden Claudin-14 stimuliert und somit die Barriere stärkt (131). Lactoferrin zeigt sich einerseits wirksam gegenüber der durch *Y. enterocolitica* hervorgerufenen Barriestörung, wobei es die durch den Erreger stimulierte Phosphorylierung der JNK hemmt und somit die Expressionsminderung des abdichtenden Claudin-8 verhindert. Andererseits hemmt Lactoferrin durch das proinflammatorische Zytokin TNF α induzierte Epithelzellapoptosen (128). Urolithin A inhibiert hingegen die durch TNF α stimulierte Expressionsregulation und Umverteilung der Claudine 1 und 2, wohingegen Ellagsäure die Barrierefunktion per se über eine MLCK-abhängige Expressionsregulation von Claudin-4, -7 und -15 stabilisiert (136). Abbildung 4 gibt eine Übersicht, über die in dieser Arbeit diskutierten Patho- und Wirkmechanismen.

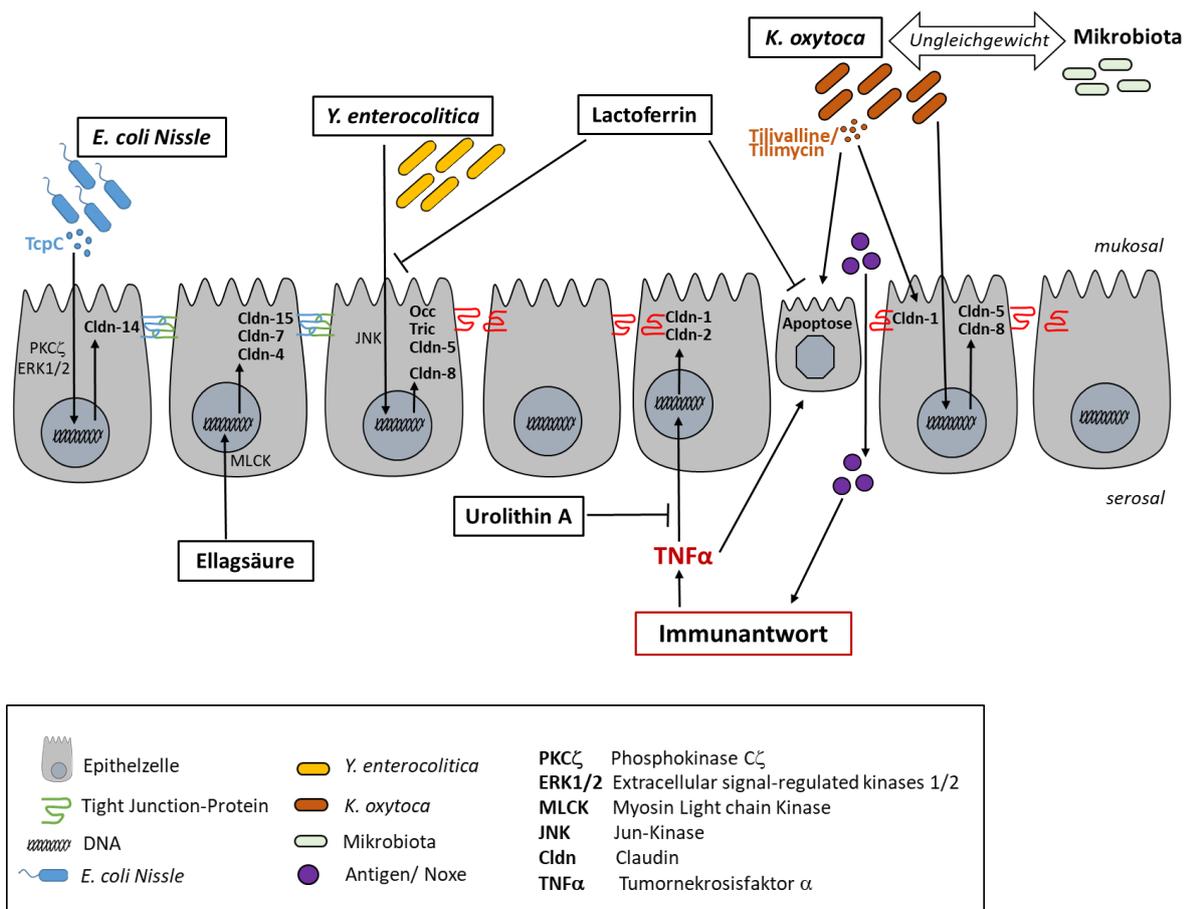


Abbildung 4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Stimuli und ihrer Patho- und Wirkmechanismen an der epithelialen Barriere. Das von dem probiotischen Bakterium *E. coli Nissle* sezernierte TcpC-Protein aktiviert die Kinasen PKC ζ und ERK1/2 und stimuliert darüber eine Expressionszunahme von Claudin-14, das zu einer Abdichtung der Barriere führt. Der Durchfallerreger *Y. enterocolitica* induziert eine Umverteilung von Claudin-5 und Occludin und vermindert die Expression von Claudin-8, Occludin und Tricellulin, wobei die Expressionsregulation von Claudin-8 über eine Aktivierung der JNK erfolgt. Die Aktivierung der JNK durch *Y. enterocolitica* kann durch das Milchprotein Lactoferrin gehemmt und somit die Expressionsminderung von Claudin-8 verhindert werden. Darüber hinaus inhibiert Lactoferrin Epithelzellapoptosen, die durch das Zytokin TNF α verursacht werden und den ungehinderten Übertritt von Antigenen und Noxen erlauben. Bei einem Ungleichgewicht der Mikrobiota kann es zu einem überschießenden Wachstum von *K. oxytoca*-Bakterien kommen, deren Zytotoxine Tilivalline und Tilimycin ebenfalls Epithelzellapoptosen stimulieren (113, 114). Dieses steht in direktem Zusammenhang mit einer verminderten Expression von Claudin-1. Zudem verursacht der Erreger eine Zytotoxin-unabhängige Expressionsminderung und Umverteilung von Claudin-5 und -8. Ellagsäure und Urolithin A sind Metaboliten des Polyphenols Punicalagin. Urolithin A hemmt die durch TNF α induzierte Expressionsregulation und Umverteilung von Claudin-1 und -2. Ellagsäure dichtet die Barriere durch Expressionsregulation von Claudin-4, -7 und -15 ab, was über eine Aktivierung der MLCK erfolgt.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die epitheliale TJ sowie die Regulation von Epithelzellapoptosen zentrale Angriffspunkte sowohl für Barrierestörung als auch für Barrierestabilisierung und/ oder -protektion darstellen. Das Ausmaß und die Spezifität der Expressionsregulation und Lokalisation distinkter TJ-Proteine bzw. das Ausmaß der Apoptoseregulation ist, in Abhängigkeit des jeweiligen Stimulus, verschieden und wird darüber hinaus durch dessen Bioverfügbarkeit und/oder den Wirkungsort mitbestimmt.

5. Literaturverzeichnis

1. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut*. 2020;69(12):2232-43.
2. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525-69.
3. Staehelin LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*. 1973;13(3):763-86.
4. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999;147(4):891-903.
5. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):631-45.
6. Piontek J, Krug SM, Protze J, Krause G, Fromm M. Molecular architecture and assembly of the tight junction backbone. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862(7):183279.
7. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1998;143(2):391-401.
8. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):285-93.
9. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*. 2011;585(4):606-12.
10. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 1998;142(1):117-27.
11. Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, et al. Tight junction-associated MARVEL proteins *marveld3*, *tricellulin*, and *occludin* have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*. 2010;21(7):1200-13.
12. Higashi T, Tokuda S, Kitajiri S, Masuda S, Nakamura H, Oda Y, et al. Analysis of the 'angulin' proteins *LSR*, *ILDR1* and *ILDR2*--*tricellulin* recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 4):966-77.
13. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 2002;156(6):1099-111.
14. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res*. 2005;321(1):89-96.

15. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4969-76.
16. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 11):1913-21.
17. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283(1):C142-7.
18. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(6):F1078-84.
19. Rosenthal R, Gunzel D, Piontek J, Krug SM, Ayala-Torres C, Hempel C, et al. Claudin-15 forms a water channel through the tight junction with distinct function compared to claudin-2. *Acta Physiol (Oxf).* 2020;228(1):e13334.
20. Gunzel D, Fromm M. Claudins and Other Tight Junction Proteins. *Compr Physiol.* 2012;2(3):1819-52.
21. Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(42):18010-5.
22. Fromm M, Piontek J, Rosenthal R, Gunzel D, Krug SM. Tight junctions of the proximal tubule and their channel proteins. *Pflugers Arch.* 2017;469(7-8):877-87.
23. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 2005;171(6):939-45.
24. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell.* 2009;20(16):3713-24.
25. Steed E, Elbediwy A, Vacca B, Dupasquier S, Hemkemeyer SA, Suddason T, et al. MarvelD3 couples tight junctions to the MEKK1-JNK pathway to regulate cell behavior and survival. *J Cell Biol.* 2014;204(5):821-38.
26. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1669(1):34-42.
27. Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, et al. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(6):C1231-41.
28. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:166-76.
29. Odenwald MA, Choi W, Buckley A, Shashikanth N, Joseph NE, Wang Y, et al. ZO-1 interactions with F-actin and occludin direct epithelial polarization and single lumen specification in 3D culture. *J Cell Sci.* 2017;130(1):243-59.
30. Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:402593.
31. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):660-9.
32. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:113-20.
33. Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):729-56.

34. Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, et al. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 10):2095-106.
35. Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda).* 2010;25(1):16-26.
36. Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol.* 1991;261(4 Pt 1):C574-82.
37. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 1951;23(2-3):110-27.
38. Krug SM, Fromm M, Gunzel D. Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J.* 2009;97(8):2202-11.
39. Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, Mankertz J, Fromm M, Wagner S, et al. Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:270-4.
40. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005;129(2):550-64.
41. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J.* 2000;14(12):1749-53.
42. Hering NA, Fromm A, Bucker R, Gorkiewicz G, Zechner E, Hogenauer C, et al. Tilivaline- and Tilimycin-Independent Effects of *Klebsiella oxytoca* on Tight Junction-Mediated Intestinal Barrier Impairment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22).
43. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Edelblum KL, Duckworth CA, Guan Y, et al. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology.* 2011;140(4):1208-18 e1-2.
44. Bojarski C, Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Mankertz J, Schulzke JD, et al. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 10):2097-107.
45. Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology.* 1992;103(2):506-13.
46. Ratnaike RN. Whipple's disease. *Postgrad Med J.* 2000;76(902):760-6.
47. Sharp GW, Hynie S. Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. *Nature.* 1971;229(5282):266-9.
48. Troeger H, Richter JF, Beutin L, Gunzel D, Dobrindt U, Epple HJ, et al. *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. *Cell Microbiol.* 2007;9(10):2530-40.
49. Hering NA, Richter JF, Krug SM, Gunzel D, Fromm A, Bohn E, et al. *Yersinia enterocolitica* induces epithelial barrier dysfunction through regional tight junction changes in colonic HT-29/B6 cell monolayers. *Lab Invest.* 2011;91(2):310-24.
50. Bucker R, Krug SM, Moos V, Bojarski C, Schweiger MR, Kerick M, et al. *Campylobacter jejuni* impairs sodium transport and epithelial barrier function via cytokine release in human colon. *Mucosal Immunol.* 2018;11(2):575-7.
51. Fasano A, Baudry B, Pumplun DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(12):5242-6.
52. Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, Zeitz M, et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut.* 2009;58(8):1070-7.

53. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;346(5):334-9.
54. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol.* 2018;11(1):1-10.
55. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard HC, Rosenberg J. Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis. *Gut Microbes.* 2016;7(5):365-83.
56. Hering NA, Fromm M, Schulzke JD. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol.* 2012;590(5):1035-44.
57. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology.* 1999;117(1):65-72.
58. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1999;116(2):301-9.
59. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 2007;56(1):61-72.
60. Krug SM, Bojarski C, Fromm A, Lee IM, Dames P, Richter JF, et al. Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor alpha2, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunol.* 2018;11(2):345-56.
61. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology.* 2001;121(6):1320-8.
62. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol.* 1996;16(3):144-50.
63. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1756-67.
64. Rodriguez P, Heyman M, Candalh C, Blaton MA, Bouchaud C. Tumour necrosis factor-alpha induces morphological and functional alterations of intestinal HT29 cl.19A cell monolayers. *Cytokine.* 1995;7(5):441-8.
65. Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, et al. TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 2009;336(1):67-77.
66. Amasheh M, Fromm A, Krug SM, Amasheh S, Andres S, Zeitz M, et al. TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signaling. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 23):4145-55.
67. Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S, Fromm A, Soderholm JD, Zeitz M, et al. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(10):1226-35.
68. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 1):137-46.
69. Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, et al. Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol.* 2001;535(Pt 2):541-52.

70. Zeissig S, Bojarski C, Buergel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, et al. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut*. 2004;53(9):1295-302.
71. Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol*. 2008;1 Suppl 1:S58-61.
72. Woznicki JA, Saini N, Flood P, Rajaram S, Lee CM, Stamou P, et al. TNF-alpha synergises with IFN-gamma to induce caspase-8-JAK1/2-STAT1-dependent death of intestinal epithelial cells. *Cell Death Dis*. 2021;12(10):864.
73. Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J*. 2005;19(8):923-33.
74. Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol*. 1999;276(5):G1279-88.
75. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Pro-inflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*. 2003;171(11):6164-72.
76. Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, et al. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):5040-52.
77. Gallucci BB, Sale GE, McDonald GB, Epstein R, Shulman HM, Thomas ED. The fine structure of human rectal epithelium in acute graft-versus-host disease. *Am J Surg Pathol*. 1982;6(4):293-305.
78. Troeger H, Hering NA, Bojarski C, Fromm A, Barmeyer C, Uharek L, et al. Epithelial barrier dysfunction as permissive pathomechanism in human intestinal graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(8):1083-6.
79. Brown GR, Lindberg G, Meddings J, Silva M, Beutler B, Thiele D. Tumor necrosis factor inhibitor ameliorates murine intestinal graft-versus-host disease. *Gastroenterology*. 1999;116(3):593-601.
80. Jordan WJ, Brookes PA, Szydlo RM, Goldman JM, Lechler RI, Ritter MA. IL-13 production by donor T cells is prognostic of acute graft-versus-host disease following unrelated donor stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103(2):717-24.
81. Heidt PJ, Vossen JM. Experimental and clinical gnotobiotics: influence of the microflora on graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Med*. 1992;23(3-4):161-73.
82. Epple HJ, Allers K, Troger H, Kuhl A, Erben U, Fromm M, et al. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1289-300.
83. Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood*. 2006;108(9):3072-8.
84. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol*. 2006;7(3):235-9.
85. Venara A, Neunlist M, Slim K, Barbieux J, Colas PA, Hamy A, et al. Postoperative ileus: Pathophysiology, incidence, and prevention. *J Visc Surg*. 2016;153(6):439-46.
86. Snoek SA, Dhawan S, van Bree SH, Cailotto C, van Diest SA, Duarte JM, et al. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24(2):172-84, e91.

87. Schwarz NT, Beer-Stolz D, Simmons RL, Bauer AJ. Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Ann Surg.* 2002;235(1):31-40.
88. Hartmann L, Arndt M, Hahn EM, Mueller MH, Kreis ME, Hering NA. Effect of bowel preparation on intestinal permeability and inflammatory response during postoperative ileus in mice. *Surgery.* 2021;170(5):1442-7.
89. Pineiro M, Stanton C. Probiotic bacteria: legislative framework-- requirements to evidence basis. *J Nutr.* 2007;137(3 Suppl 2):850S-3S.
90. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635-8.
91. Rook G, Backhed F, Levin BR, McFall-Ngai MJ, McLean AR. Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet.* 2017;390(10093):521-30.
92. Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, Lopetuso LR, Pizzoferrato M, Petito V, et al. Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. *World J Gastroenterol.* 2016;22(24):5505-11.
93. Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;40(3):223-9.
94. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, et al. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun.* 2004;72(10):5750-8.
95. Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(6):627-34.
96. Algieri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, Rodriguez-Sojo MJ, Rodriguez-Cabezas ME, Olivares M, et al. Intestinal anti-inflammatory effects of probiotics in DNBS-colitis via modulation of gut microbiota and microRNAs. *Eur J Nutr.* 2021;60(5):2537-51.
97. Bian Z, Li L, Cui J, Zhang H, Liu Y, Zhang CY, et al. Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis. *J Pathol.* 2011;225(4):544-53.
98. Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol.* 2007;9(3):804-16.
99. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2007;2(12):e1308.
100. Cross ML, Gill HS. Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(4):345-50.
101. Jayatilake S, Arai K, Kumada N, Ishida Y, Tanaka I, Iwatsuki S, et al. The Effect of Oral Intake of Low-Temperature-Processed Whey Protein Concentrate on Colitis and Gene Expression Profiles in Mice. *Foods.* 2014;3(2):351-68.
102. Hering NA, Andres S, Fromm A, van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J, et al. Transforming growth factor-beta, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J Nutr.* 2011;141(5):783-9.
103. Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5(1):44-60.

104. Brenmoehl J, Ohde D, Wirthgen E, Hoeflich A. Cytokines in milk and the role of TGF-beta. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(1):47-56.
105. Howe KL, Reardon C, Wang A, Nazli A, McKay DM. Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am J Pathol.* 2005;167(6):1587-97.
106. Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, Bakhiya N, Schafer B, Hirsch-Ernst KI, et al. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(1).
107. Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, et al. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr.* 2008;138(6):1067-73.
108. Luettig J, Rosenthal R, Lee IM, Krug SM, Schulzke JD. The ginger component 6-shogaol prevents TNF-alpha-induced barrier loss via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB signaling. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(12):2576-86.
109. Rosenthal R, Luettig J, Hering NA, Krug SM, Albrecht U, Fromm M, et al. Myrrh exerts barrier-stabilising and -protective effects in HT-29/B6 and Caco-2 intestinal epithelial cells. *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(5):623-34.
110. Grassl GA, Bohn E, Muller Y, Buhler OT, Autenrieth IB. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol.* 2003;293(1):41-54.
111. Trulzsch K, Oellerich MF, Heesemann J. Invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model. *Adv Exp Med Biol.* 2007;603:279-85.
112. Hogenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G, et al. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *N Engl J Med.* 2006;355(23):2418-26.
113. Schneditz G, Rentner J, Roier S, Pletz J, Herzog KA, Bucker R, et al. Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(36):13181-6.
114. Unterhauser K, Poltl L, Schneditz G, Kienesberger S, Glabonjat RA, Kitsera M, et al. *Klebsiella oxytoca* enterotoxins tilimycin and tilivalline have distinct host DNA-damaging and microtubule-stabilizing activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(9):3774-83.
115. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:93-110.
116. Jakaitis BM, Denning PW. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol.* 2014;41(2):423-35.
117. Manzoni P, Meyer M, Stolfi I, Rinaldi M, Cattani S, Pagni L, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates: a randomized clinical trial. *Early Hum Dev.* 2014;90 Suppl 1:S60-5.
118. Trend S, Strunk T, Hibbert J, Kok CH, Zhang G, Doherty DA, et al. Antimicrobial protein and Peptide concentrations and activity in human breast milk consumed by preterm infants at risk of late-onset neonatal sepsis. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117038.
119. Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Das J, Saha BP, et al. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *J Ethnopharmacol.* 1999;68(1-3):205-8.
120. Zhao SS, Ma DX, Zhu Y, Zhao JH, Zhang Y, Chen JQ, et al. Antidiarrheal effect of bioactivity-guided fractions and bioactive components of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Neurogastroenterol Motil.* 2018;30(7):e13364.

121. Saeed M, Naveed M, BiBi J, Kamboh AA, Arain MA, Shah QA, et al. The Promising Pharmacological Effects and Therapeutic/Medicinal Applications of *Punica Granatum* L. (Pomegranate) as a Functional Food in Humans and Animals. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2018;12(1):24-38.
122. Autenrieth IB, Firsching R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol.* 1996;44(4):285-94.
123. Hering NA, Fromm A, Kikhney J, Lee IF, Moter A, Schulzke JD, et al. *Yersinia enterocolitica* Affects Intestinal Barrier Function in the Colon. *J Infect Dis.* 2016;213(7):1157-62.
124. Tse H, Gu Q, Sze KH, Chu IK, Kao RY, Lee KC, et al. A tricyclic pyrrolobenzodiazepine produced by *Klebsiella oxytoca* is associated with cytotoxicity in antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *J Biol Chem.* 2017;292(47):19503-20.
125. Bucker R, Troeger H, Kleer J, Fromm M, Schulzke JD. *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis.* 2009;200(5):756-64.
126. Shrestha A, McClane BA. Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *mBio.* 2013;4(1).
127. Sharafutdinov I, Esmaeili DS, Harrer A, Tegtmeyer N, Sticht H, Backert S. *Campylobacter jejuni* Serine Protease HtrA Cleaves the Tight Junction Component Claudin-8. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:590186.
128. Hering NA, Luettig J, Krug SM, Wiegand S, Gross G, van Tol EA, et al. Lactoferrin protects against intestinal inflammation and bacteria-induced barrier dysfunction in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1405(1):177-88.
129. Lobo de Sa FD, Butkevych E, Natramilarasu PK, Fromm A, Mousavi S, Moos V, et al. Curcumin Mitigates Immune-Induced Epithelial Barrier Dysfunction by *Campylobacter jejuni*. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
130. Lobo de Sa FD, Heimesaat MM, Bereswill S, Natramilarasu PK, Schulzke JD, Bucker R. Resveratrol Prevents *Campylobacter jejuni*-Induced Leaky gut by Restoring Occludin and Claudin-5 in the Paracellular Leak Pathway. *Front Pharmacol.* 2021;12:640572.
131. Hering NA, Richter JF, Fromm A, Wieser A, Hartmann S, Gunzel D, et al. TpcC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC ζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunol.* 2014;7(2):369-78.
132. Alvarez CS, Badia J, Bosch M, Gimenez R, Baldoma L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front Microbiol.* 2016;7:1981.
133. Alvarez CS, Gimenez R, Canas MA, Vera R, Diaz-Garrido N, Badia J, et al. Extracellular vesicles and soluble factors secreted by *Escherichia coli* Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic *E. coli*-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):166.
134. Pradhan S, Weiss AA. Probiotic Properties of *Escherichia coli* Nissle in Human Intestinal Organoids. *mBio.* 2020;11(4).
135. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(10):605-16.
136. Hering NA, Luettig J, Jebautzke B, Schulzke JD, Rosenthal R. The Punicalagin Metabolites Ellagic Acid and Urolithin A Exert Different Strengthening and Anti-Inflammatory Effects on Tight Junction-Mediated Intestinal Barrier Function In Vitro. *Front Pharmacol.* 2021;12:610164.

137. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut*. 1998;42(1):29-35.
138. Bucker R, Schulz E, Gunzel D, Bojarski C, Lee IF, John LJ, et al. alpha-Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut*. 2014;63(12):1893-901.
139. Clark E, Hoare C, Tanianis-Hughes J, Carlson GL, Warhurst G. Interferon gamma induces translocation of commensal *Escherichia coli* across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1258-67.
140. Clark EC, Patel SD, Chadwick PR, Warhurst G, Curry A, Carlson GL. Glutamine deprivation facilitates tumour necrosis factor induced bacterial translocation in Caco-2 cells by depletion of enterocyte fuel substrate. *Gut*. 2003;52(2):224-30.
141. Rosner BM, Werber D, Hohle M, Stark K. Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009-2010. *BMC Infect Dis*. 2013;13:236.
142. Granfors K, Jalkanen S, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, Isomaki O, Pekkola-Heino K, et al. *Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N Engl J Med*. 1989;320(4):216-21.
143. Subramanian S, Geng H, Tan XD. Cell death of intestinal epithelial cells in intestinal diseases. *Sheng Li Xue Bao*. 2020;72(3):308-24.
144. Zollner-Schwetz I, Herzog KA, Feierl G, Leitner E, Schneditz G, Sprenger H, et al. The Toxin-Producing Pathobiont *Klebsiella oxytoca* Is Not Associated with Flares of Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci*. 2015;60(11):3393-8.
145. Kuo WT, Shen L, Zuo L, Shashikanth N, Ong M, Wu L, et al. Inflammation-induced Occludin Downregulation Limits Epithelial Apoptosis by Suppressing Caspase-3 Expression. *Gastroenterology*. 2019;157(5):1323-37.
146. Hu P, Zhao F, Wang J, Zhu W. Lactoferrin attenuates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses and barrier impairment through the modulation of NF-kappaB/MAPK/Nrf2 pathways in IPEC-J2 cells. *Food Funct*. 2020;11(10):8516-26.
147. Zong X, Hu W, Song D, Li Z, Du H, Lu Z, et al. Porcine lactoferrin-derived peptide LFP-20 protects intestinal barrier by maintaining tight junction complex and modulating inflammatory response. *Biochem Pharmacol*. 2016;104:74-82.
148. Wang S, Zhou J, Xiao D, Shu G, Gu L. Bovine Lactoferrin Protects Dextran Sulfate Sodium Salt Mice Against Inflammation and Impairment of Colonic Epithelial Barrier by Regulating Gut Microbial Structure and Metabolites. *Front Nutr*. 2021;8:660598.
149. Al-Alaiyan S, Abdulaziz N, Alkohani A, Almairi SO, Al Hazzani F, Binmanee A, et al. Effects of Probiotics and Lactoferrin on Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Cureus*. 2021;13(9):e18256.
150. Pammi M, Suresh G. Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;6:CD007137.
151. Carco C, Young W, Geary RB, Talley NJ, McNabb WC, Roy NC. Increasing Evidence That Irritable Bowel Syndrome and Functional Gastrointestinal Disorders Have a Microbial Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:468.
152. Tsai PY, Zhang B, He WQ, Zha JM, Odenwald MA, Singh G, et al. IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance. *Cell Host Microbe*. 2017;21(6):671-81 e4.
153. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):229-44.

154. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-35.
155. Loftus EV, Jr. Epidemiology and risk factors for colorectal dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35(3):517-31.
156. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1075-83.
157. Troost FJ, Steijns J, Saris WH, Brummer RJ. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults. *J Nutr*. 2001;131(8):2101-4.
158. Suzuki YA, Lonnerdal B. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(1):75-80.
159. Davidson LA, Lonnerdal B. Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta Paediatr Scand*. 1987;76(5):733-40.
160. Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Yanez-Gascon MJ, Selma MV, Azorin-Ortuno M, Toti S, et al. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem*. 2010;21(8):717-25.
161. Marin M, Maria Giner R, Rios JL, Recio MC. Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. *J Ethnopharmacol*. 2013;150(3):925-34.
162. Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cardeno A, Aparicio-Soto M, Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, et al. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res*. 2012;66(3):235-42.
163. Singh R, Chandrashekhara S, Bodduluri SR, Baby BV, Hegde B, Kotla NG, et al. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat Commun*. 2019;10.
164. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96(3):736-49.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Martin Kreis und Prof. Katharina Beyer für die Möglichkeit bedanken, meine Forschungsprojekte, die maßgeblich zur Fertigstellung der Habilitation beigetragen haben, parallel zu den Aufgaben im Chirurgischen Forschungslabor weiterführen zu können. Gleichzeitig war die parallele Einbindung in vielfältige chirurgische Forschungsthemen und -projekte für mich außerordentlich bereichernd. Auf diese Weise konnte ich mir neue Forschungsbereiche, Methoden und Denkweisen erschließen, die zu weiteren Publikationen im Bereich der Tumorbilogie und dem Postoperativen Ileus geführt haben.

Ich bedanke mich bei allen klinischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, die mich in ihre Forschungsprojekte involviert haben. Hierbei möchte ich insbesondere Dr. Ioannis Pozios und PD Dr. Hendrik Seeliger für die Einführung in die Tumorforschung und die ergiebige und inspirierende Zusammenarbeit danken.

Für die freundliche Aufnahme, die hervorragende Teamarbeit und die tatkräftige Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Marco Arndt, Sonja Sitali und Miriam Zibell sowie bei den ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors Elisabeth Hahn, Janine Arndt, Beatrice Geyer und Ole Gemeinhardt bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt Prof. Jörg-Dieter Schulzke und Prof. Michael Fromm aus der Klinischen Physiologie / Ernährungsmedizin für die Einführung in die Barriereforschung, den Anstoß zu vielen wissenschaftlichen Projekten, die langjährige Unterstützung und Förderung sowie aktuell für die Durchsicht der Habilitationsschrift. Die Zusammenarbeit und spätere Kooperation haben meinen Forschungsschwerpunkt geprägt und waren auf meinem Weg zur Habilitation maßgeblich.

Ich möchte allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinische Physiologie / Ernährungsmedizin und allen Kooperationspartnerinnen und -partnern, die mich in meiner Forschung begleitet und unterstützt haben, für die kollegiale und produktive Zusammenarbeit herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei PD Dr. Rita Rosenthal für die großartige Zusammenarbeit und die regen Diskussionen. Für die technische Unterstützung und die methodische Expertise möchte ich mich bei Anja Fromm, Britta Jebautzke und In-Fah Lee bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, insbesondere für ihre fortwährende Unterstützung und ihren Rückhalt auf meinem beruflichen Weg.

Erklärung

§ 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.

8.9.2022

.....

Datum

.....

Unterschrift