

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss von Bakterien auf die Integrität der epithelialen Barriere im
Darm als möglicher Pathomechanismus der spontan bakteriellen
Peritonitis bei Leberzirrhose**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lorenz Baptist Wächter

2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss von Bakterien auf die Integrität der epithelialen Barriere im
Darm als möglicher Pathomechanismus der spontan bakteriellen
Peritonitis bei Leberzirrhose**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lorenz Baptist Wächter

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dipl. phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

2. Berichterstatter:

PD Dr. Nahed El-Najjar

Tag der mündlichen Prüfung:

23.03.2022

*„The good life is a process, not a state of being.
It is a direction, not a destination.”*

Carl R. Rogers

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Spontan bakterielle Peritonitis	11
1.1.1 Epidemiologie	11
1.1.2 Diagnostik und Therapie	12
1.1.3 Pathogenese	13
1.2 Zell-Zell-Kontakte	19
1.2.1 Architektur der Zell-Zell-Kontakte	19
1.2.2 Bakterielle Effekte auf Zell-Zell-Kontakte	21
1.3 Die p53-Familie – Wächter des Genoms und bakterieller Abwehrmechanismus?	23
1.3.1 Aufbau, Funktion und Regulation von p53	23
1.3.2 Regulation von p53 während Infektionen	26
1.4 Fortschritte im Verständnis des Pathomechanismus der SBP	28
1.5 Zielsetzung	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Geräte und Laborbedarf	30
2.1.2 Software	31
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien	32
2.1.4 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	34
2.1.5 Zelllinien	38
2.2 Methoden	38

2.2.1 Zellkultur	38
2.2.2 BCA-Test.....	40
2.2.3 Gelelektrophorese	41
2.2.4 Semi-Dry Blot und Detektion der Proteine.....	41
2.2.5 Immunfluoreszenz	42
2.2.6 Quantitative reverse-Transkriptase-RT-PCR.....	43
2.2.7 Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit.....	44
2.2.8 Durchflusszytometrie	44
2.2.9 Statistische Analyse	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Regulation der p53 Signaltransduktion	46
3.1.1 <i>K. pneumoniae</i> aktiviert die Expression von <i>TP53</i>	46
3.1.2 <i>K. pneumoniae</i> induziert die p53-Proteinproduktion zu einem frühen Zeitpunkt.....	48
3.1.3 Die Stimulation mit <i>K. pneumoniae</i> führt zur Zunahme Apoptose- assoziiertes Proteine.....	49
3.2 Caco-2 – ein adäquates Modell für die Analyse der Regulation von Zell- Zell-Kontakten	53
3.2.1 HCT-116 Zellen – mangelnde Polarisierung und breite Interzellularspalten	53
3.2.2 Caco-2 Zellen – ein adäquates Modell für die Untersuchung der Zell-Zell- Kontakte	53
3.3 Regulation der Zell-Zell-Kontakte von Caco-2 Zellen	56
3.3.1 <i>K. pneumoniae</i> hat keinen eindeutigen Effekt auf die Regulation der Occludin oder E-Cadherin mRNA.....	56
3.3.2 Zell-Zell-Kontakt-Komponenten werden durch <i>K. pneumoniae</i> reguliert ..	57
3.4 Bakterielle Stimulation beeinflusst den Zell-Zyklus.....	61
4 Diskussion	63
4.1 Regulation der p53 Signaltransduktion durch <i>K. pneumoniae</i>	64

4.2 Modifikation von TJ durch <i>K. pneumoniae</i>	68
4.3 Schlussfolgerung.....	73
5 Zusammenfassung.....	75
Literaturverzeichnis	76
Eigenständigkeitserklärung	94
Danksagung	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>AIEC</i>	Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i>
Akt	Proteinkinase B
AMP	antimikrobielle Peptide
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bax	Bcl-2-associated X protein
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
BT	bakterielle Translokation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAIDS	cirrhosis-associated immune dysfunction syndrome
CFU	koloniebildende Einheit
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	dendritische Zelle
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
<i>EHEC</i>	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
<i>EPEC</i>	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
etc.	et cetera
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
GALT	gut associated lymphoid tissue
ggf.	gegebenenfalls
GI	gastrointestinal

h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMOX1	Hämoxygenas-1
HMOX2	Hämoxygenase-2
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IL	Interleukin
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
l	Liter
mA	Milliampere
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEM	Minimum Essential Media
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MLC	Myosin II Leichtkette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
mm ³	Kubikmillimeter
mmol	Millimol
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger-RNA
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
n	Anzahl
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen

PMN	polymorphonukleär
PPP	Pentose Phosphate Pathway
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
SD	Standardabweichung
SIBO	small intestinal bacterial overgrowth
TJ	tight junction
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TNF	Tumornekrosefaktor
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
ZO	Zonula-occludens
Z-Z-K	Zell-Zell-Kontakte
°C	Grad Celsius

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. Diagnostik der SBP.....	13
Abbildung 2. Veränderungen des Darmepithels im Rahmen der Leberzirrhose.	16
Abbildung 3. Modell der bakteriellen Translokation.	18
Abbildung 4. Architektur der Zell-Zell-Kontakte.....	21
Abbildung 5. Proteinstruktur des humanen p53.....	23
Abbildung 6. Übersicht über die Funktionen von p53.	25
Abbildung 7. Bakterielle Regulation von p53.	27
Abbildung 8. Versuchsaufbau zur Analyse der p53-Regulation in HCT-116 Zellen. 46	
Abbildung 9. TP53-Expression in HCT-116 Zellen nach bakterieller Stimulation....	47
Abbildung 10. p53-Proteinspiegel in HCT-116 Zellen in Gegenwart von <i>K. pneumoniae</i>	48
Abbildung 11. Proteom Profiling Assay auf Apoptose-assoziierte Proteine in HCT-116 Zellen nach bakterieller Stimulation mit <i>K. pneumoniae</i>	51
Abbildung 12. Induktion Apoptose-assoziiierter Proteine in HCT-116 Zellen nach <i>K. pneumoniae</i> Stimulation.	52
Abbildung 13. Elektronenmikroskopie von Caco-2 Zellen und HCT-116 Zellen nach 6-tägiger Kultivierung.....	54
Abbildung 13. Elektronenmikroskopie von Caco-2 Zellen und HCT-116 Zellen nach 14-tägiger Kultivierungsdauer.....	54
Abbildung 14. Proteinausstattung und Polarisierung von Caco-2 Zellen im zeitlichen Verlauf.....	55
Abbildung 15. Versuchsaufbau zur Analyse der Regulation von Zell-Zell-Kontakten in Caco-2 Zellen.	56
Abbildung 16. mRNA Spiegel von E-Cadherin und Occludin nach Stimulation von Caco-2 Zellen mit <i>K. pneumoniae</i>	57
Abbildung 17. Regulation von Zell-Zell-Kontakt Proteinen in Caco-2 Zellen während der <i>K. pneumoniae</i> Infektion.....	58
Abbildung 18. Immunhistochemische Darstellung der Regulation von Occludin in Caco-2 Zellen während der <i>K. pneumoniae</i> Infektion.....	59
Abbildung 19. Relatives Occludin-Fluoreszenzsignal von Caco-2 Zellen im Rahmen der bakteriellen Stimulation mit <i>K. pneumoniae</i>	60

Abbildung 21. Gewählte Gates.	61
Abbildung 22. Analyse des Zellzyklus von Caco-2 Zellen nach bakterieller Stimulation mit <i>K. pneumoniae</i>	62
Abbildung 23. Übersicht der regulatorischen Effekte von <i>K. pneumoniae</i> in HCT-116 und Caco-2 Zellen.	73
Tabelle 1. Auflistung der für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper.....	33
Tabelle 2. Auflistung der für die Western Blots verwendeten Antikörper.	33
Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Primer.	34

1 Einleitung

1.1 Spontan bakterielle Peritonitis

Bei der spontan bakteriellen Peritonitis (SBP), einer gefährlichen Komplikation der Leberzirrhose, handelt es sich um eine bakterielle Entzündung der Abdominalhöhle ohne einen intraabdominellen, chirurgisch sanierbaren Fokus (Such und Runyon 1998). Hervorgerufen wird diese Entzündung durch eine bakterielle Translokation (BT). Hierunter versteht man das Abwandern/ die Durchwanderung von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) in die mesenterialen Lymphknoten (MLN) und den Aszites (Llovet et al. 1994).

1.1.1 Epidemiologie

Infektionen stellen bei Patienten¹ mit Leberzirrhose eine häufige Komplikation dar. Etwa 23% bis 34% dieses Patientenkollektivs haben bei Einweisung ins Krankenhaus - oder entwickeln während ihres Aufenthaltes - eine Infektion (Borzio et al. 2001; Singal et al. 2014). Verglichen mit der Infektionsrate hospitalisierter Patienten ohne Leberzirrhose (5% bis 7%) ist dies eine drastische Erhöhung (Tandon und Garcia-Tsao 2008). Führend sind Infektionen des Urogenitaltraktes und die SBP (Singal et al. 2014). Zwischen 2% und 12% der stationär behandelten Patienten mit Leberzirrhose leiden an einer SBP (Evans et al. 2003). Risikofaktoren für die Entwicklung einer SBP sind der Schweregrad der Leberzirrhose, vorangegangene Episoden einer SBP, stattgefundenen gastrointestinale Blutungen sowie ein Proteinspiegel im Aszites unter 1,5 g/dl (Obstein et al. 2007; Ra et al. 2015; Garcia-Tsao 2016). Trotz aller Therapieanstrengungen liegt die Krankenhausmortalität einer SBP bei 10 – 50 %. Die 1-Jahres-Mortalität nach Auftreten der ersten Episode beträgt 31 % bis 93 % (Gerbes et al. 2019; EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis 2018). Als häufigste Erreger lassen sich in 56% - 70% Gram-negative Bakterien, allen voran *Escherichia coli* (*E. coli*), gefolgt von *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) isolieren. Ein kultureller Bakteriennachweis gelingt nur in ca. 40% der Fälle (Fernandez et al. 2012; Cheong et al. 2009). In den vergangenen

¹ Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wird im Folgenden auf eine geschlechtsspezifische Differenzierung verzichtet. Entsprechende Begriffe gelten für alle Geschlechter.

Jahren wurden vermehrt Gram-positive Erreger verzeichnet, am ehesten aufgrund der zur SBP-Prophylaxe eingesetzten Chinolone (Cholongitas et al. 2005).

1.1.2 Diagnostik und Therapie

Klinisch kann sich die SBP mit typischen Zeichen eines Peritonismus, einer systemischen Entzündungsreaktion (Hyperthermie, Tachykardie) oder einer verschlechterten Organfunktion (hepatische Enzephalopathie, Nierenversagen) äußern (Rimola et al. 2000). Darüber hinaus sind asymptomatische Verläufe möglich; daher sollte jeder Patient mit (Leberzirrhose und) neu aufgetretenem Aszites eine diagnostische Aszitespunktion erhalten. (Gerbes et al. 2011; EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis 2018; Biggins et al. 2021). Wegen der hohen Negativrate der Bakterienkulturen ist die Indikation für eine Antibiotikatherapie bereits ab einer Zellzahl im Aszites von >250 polymorphonukleären (PMN) Zellen/mm³ zu stellen. Ebenfalls sollte bei einem Bakteraszites, also dem Nachweis von Bakterien im Aszites, eine Antibiotikatherapie erfolgen (Abb. 1). Lange Zeit waren Cephalosporine der 3. Generation (z. B. Cefotaxim) Mittel der ersten Wahl. Aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen sollte v. a. bei nosokomialen Infektionen, kürzlicher Hospitalisation und schwer kranken Patienten eine Therapie mit Piperacillin/Tazobactam erwogen werden (Biggins et al. 2021). Sollte eine bekannte Kolonisation mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) vorliegen, wird empfohlen Vancomycin zu ergänzen. Im Falle einer bekannten Kolonisation mit Vancomycin-resistenten Enterokokken, sollte Daptomycin zusätzlich gegeben werden. Hatte der Patient in der Vorgeschichte bereits kürzlich Piperacillin/Tazobactam erhalten sollte die Antibiose mit Meropenem erfolgen. In jedem Fall müssen lokale Resistenzlagen berücksichtigt und der Therapieerfolg anhand des klinischen Verlaufs und einer erneuten Aszitespunktion ca. 48 Stunden nach Antibiotikaerstgabe evaluiert werden (Gerbes et al. 2019; EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis 2018). Es gibt erste Hinweise darauf, dass Biomarker wie Lactoferrin oder C3a im Aszites ggf. zur frühen Diagnostik der SBP und zur Evaluation des Therapieansprechens genutzt werden können (Scherer et al. 2019).

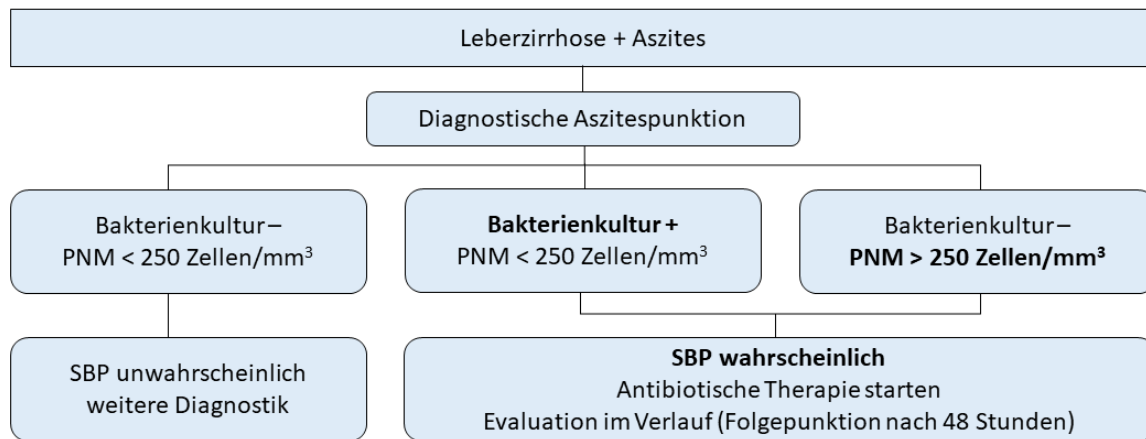


Abbildung 1. Diagnostik der SBP. Bei (Leberzirrhose und) Aszites sollte eine diagnostische Aszitespunktion erwogen werden. Gelingt ein Bakteriennachweis oder sind mehr als 250 PMN Zellen/mm³ vorhanden, ist eine unverzügliche empirische Antibiotikatherapie indiziert.

1.1.3 Pathogenese

Trotz großer Fortschritte der letzten Jahre ist der Pathomechanismus der SBP nicht bis ins letzte Detail geklärt. Gemeinsame Endstrecke stellt die BT dar, die durch folgende Veränderungen begünstigt wird (Lutz et al. 2015) (Abb. 2):

- Störungen der intestinalen Barrierefunktion
- Veränderungen im Mikrobiom
- Beeinträchtigung des Immunsystems

Definiert ist die BT hierbei als Translokation von Bakterien (oder deren Produkte) aus dem GI-Trakt in die MLN (Berg und Garlington 1979).

Begünstigt werden diese Veränderungen durch spezifische Effekte der Leberzirrhose. Dazu gehört eine erhöhte Zytokinfreisetzung, insbesondere von TNF, IFN- γ und IL-6. Malnutrition, wie sie oft bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose auftritt, ist ebenfalls mit einer verstärkten BT assoziiert, möglicherweise aufgrund des metabolischen Stresses der Epithelzellen (Wiest et al. 2014). Des Weiteren werden, bedingt durch die portale Hypertension mit folgender Hypoperfusion der Lamina mucosa, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die wiederum die Apoptose der Darmepithelzellen begünstigen (Tsiaoussis et al. 2015).

Veränderungen der Mikrobiota und des Mikrobioms

Die im Menschen beheimatete Anzahl an Bakterien übersteigt die körpereigene Zellzahl um das 10-fache. Der Großteil der Bakterien ist dabei im GI-Trakt lokalisiert. Das Genom dieser Organismen, das Mikrobiom, enthält ≥ 100 -mal so viel Gene wie das menschliche Genom. Unter anderem ist das Mikrobiom für den Energiehaushalt wichtig (Backhed et al. 2005). Einige Krankheiten, darunter auch die Leberzirrhose, sind mit Veränderungen der Intestinalflora assoziiert (Giannelli et al. 2014).

Eine dieser Veränderungen ist der *small intestinal bacterial overgrowth (SIBO)*, definiert als $\geq 10^6$ CFU/ml oder dem Wachstum von Bakterien aus dem Colon in einem Aspirat des oberen Jejunums (Corazza et al. 1990). Die Prävalenz des *SIBO* unter Patienten mit Leberzirrhose liegt bei ca. 60% und korreliert mit einer erhöhten Endotoxämie sowie BT (Bauer et al. 2002; Bauer et al. 2001; Guarner et al. 1997). Eine verlängerte Transportzeit durch den Dünndarm sowie dessen verminderte Motilität korreliert mit dem *SIBO* und könnte teilweise dafür verantwortlich sein (Chang et al. 1998; Sadik et al. 2009).

Darüber hinaus zeigen Stuhluntersuchungen von Patienten mit Leberzirrhose eine veränderte Zusammensetzung der Mikrobiota im Sinne einer abnehmenden Diversität (Haderer et al. 2021). Unabhängig von der Ursache der Leberzirrhose kommt es zu einer Abnahme von Bakterien des Stammes *Bacteroidetes* und einer Zunahme von *Fuso-* und *Proteobakterien*, denen auch die *Enterobacteriaceae* (inkl. *K. pneumoniae* und *E. coli*) angehören. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme von *Streptococcaceae* in Abhängigkeit des Schweregrades der Leberzirrhose. Der Nachweis von *Streptococcaceae*, welche typischerweise im Dünndarm zu finden sind, kann als Ausdruck einer Umstrukturierung der Dickdarmflora gedeutet werden (Chen et al. 2011).

Störungen des Immunsystems

Da es sich bei der Leberzirrhose um eine Krankheit mit systemischen Auswirkungen handelt, ist es naheliegend, dass auch das Immunsystem betroffen ist. Bei dem *cirrhosis-associated immune dysfunction syndrome (CAIDS)* handelt es sich um eine multifaktorielle systemische Immunsuppression, in deren Folge Bakterien, Endotoxine und Zytokine nicht mehr ausreichend abgebaut werden können (Bonnell et al. 2011).

Zum einen zeigen sich Veränderungen der zellulären Bestandteile des Immunsystems. So leistet das retikuloendotheliale System nur noch beschränkt Phagozytose (Lahnborg et al. 1981; Rimola et al. 1984). Zum anderen ist die Lebensdauer, Migrationsfähigkeit, Phagozytoseaktivität und Chemotaxis durch neutrophile Granulozyten gestört sowie die Funktion der Monozyten eingeschränkt (Fiuza et al. 2000; Kusaba et al. 1998).

Auch die humoralen Bestandteile des Immunsystems sind betroffen, wodurch die bakterizide Wirkung und die Opsonisierung abgeschwächt ist (Bonnel et al. 2011). Deutlich wird dies an der verminderten Immunglobulinkonzentration im Aszites sowie der verminderten Konzentration von Komplementfaktoren in Serum und Aszites (Runyon et al. 1985; Ono et al. 2004).

Störungen der intestinalen Barriere

Der menschliche GI-Trakt beheimatet eine Vielzahl und Vielfalt an Bakterien. So steigt die Besiedelung ab dem Jejunum von 10^5 CFU/ml auf bis zu 10^8 CFU/ml im Zökum an (Marteau et al. 2001). Um größtmögliche Sterilität der gesamten Kompartimente im Körper zu gewährleisten, aber zeitgleich Resorptionsvorgänge zu ermöglichen, ist eine dynamische und zugleich dichte Barriere nötig (Abb. 2). Konkret wird diese gebildet aus:

- Mukusschicht mit aufgelagerten antimikrobiellen Peptiden (AMP) und IgA
- Epithelzellen, untereinander verbunden durch *tight junctions* (TJ)
- *Gut associated lymphoid tissue* (GALT) (Wiest et al. 2014)

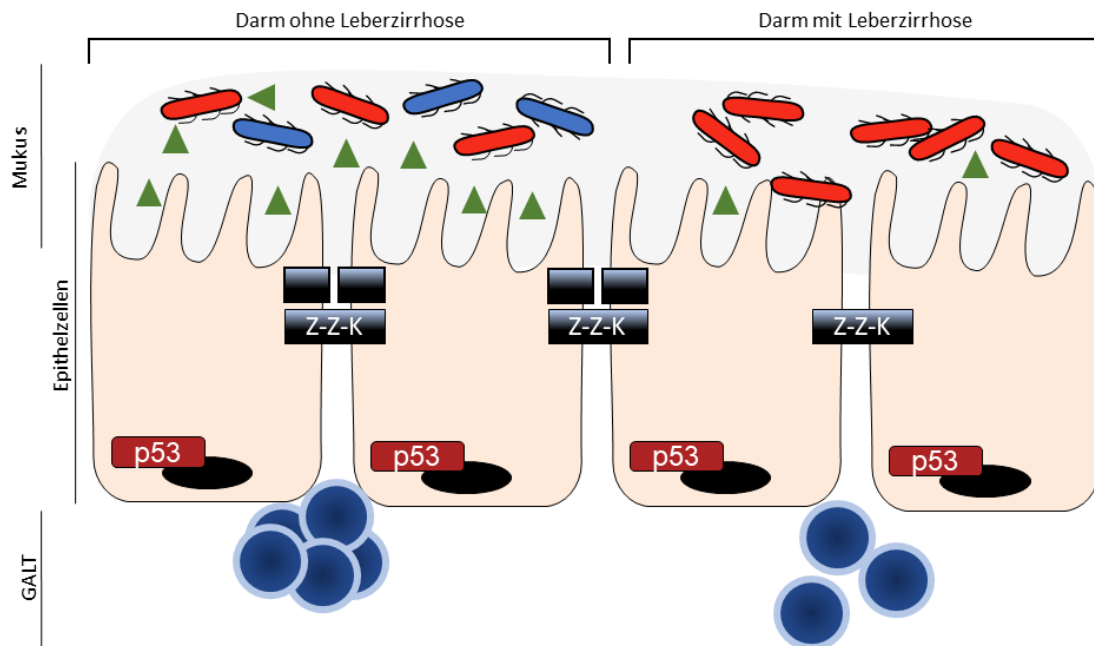


Abbildung 2. Veränderungen des Darmepithels im Rahmen der Leberzirrhose. Epithelzellen des gesunden Darms sind über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, um eine größtmögliche Integrität zu gewährleisten und zeitgleich Resorptionsvorgänge zu ermöglichen. In der apikal gelegenen Mukusschicht befinden sich eine Vielzahl und Vielfalt von Bakterien und antimikrobiellen Peptiden. Basal der Zellen liegt das GALT mit seinen Lymphfollikeln. Im Rahmen der Leberzirrhose kommt es zu einer Reduktion der Mukusschicht, einer Abnahme der Vielfalt der Bakterien und ggf. zu einer Überwucherung mit bestimmten Erregern. Weiterhin kann die Bildung von AMPs beeinträchtigt sowie die Funktion von B-Zellen oder dendritischen Zellen verändert sein. TJ-Proteine wie Claudine oder Occludin können reduziert sein, was zu einer Erhöhung der Permeabilität führen kann. ▲ = antimikrobielle Peptide (AMP), **Z-Z-K** = Zell-Zell-Kontakte.

Die Mukusschicht dient als erste Schicht der intestinalen Barriere und besteht aus einer Vielzahl an Proteinen, wobei das O-glycosylated mucin 2 eines der wichtigsten Bestandteile darstellt. Aufgebaut ist die Mukusschicht aus einer inneren, dicht gepackten und für Bakterien im Normalfall nicht überwindbaren Schicht sowie einer aufgelagerten Schicht welche als Habitat für diverse Bakterien dient (Johansson et al. 2013). Unsere Arbeitsgruppe hat erstmals bei Patienten mit Leberzirrhose eine Reduktion der Mukusschicht in Kolonbiopsien nachgewiesen (Haderer et al. 2021). Panethzellen, als spezialisierte Epithelzellen im GI-Trakt, haben die Aufgabe, Bakterien zu erkennen und ein komplexes Gemisch aus AMPs (Defensine, Lektine) zu synthetisieren, wodurch die Anzahl der Mukusa-assoziierten Bakterien kontrolliert und die – auch bei gesunden stattfindende – BT limitiert wird (Vaishnava et al. 2008). Jedoch ist die Bildung von AMPs aus Panethzellen, insbesondere der α -Defensine bei zirrhotischen Ratten mit BT erniedrigt (Teltschik et al. 2012). Ebenfalls ist die Synthese

von Lektinen, wie den *regenerating islet-derived proteins* (RegIII β und RegIII γ) bei Ratten nach chronischer Alkoholfuhr vermindert. RegIII β und RegIII γ , stammen aus Enterozyten und Paneth-Zellen und können Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien binden (Yan et al. 2011; Cash et al. 2006).

Die Integrität der mechanischen Barriere, gebildet durch den Epithelzellverband, wird beim Gesunden durch Zell-Zell-Kontakte gewährleistet. Im Speziellen handelt es sich um TJ, *adherens junctions* und Desmosomen. Bei Patienten mit Leberzirrhose kann eine erhöhte Permeabilität des Epithels beobachtet werden (Ersoz et al. 1999; Pascual et al. 2003). Vereinfacht damit zeigt sich auf molekularbiologischer Ebene eine Reduktion von Occludin und Claudin 1. Diese ist bei dekompensierter Leberzirrhose stärker ausgeprägt als bei kompensierter (Assimakopoulos et al. 2012). Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe von Darmbiopsien von Patienten mit Leberzirrhose bestätigen die Reduktion des Occludin Spiegels und zeigen darüber hinaus auch eine Reduktion von E-Cadherin (Haderer et al. 2021).

Das GALT, als lokales Abwehrgewebe, dient der Infektionsabwehr durch Antigenaufnahme und -präsentation, Produktion von IgA und ggf. der Initiierung einer Immunantwort. Es besteht aus solitären Lymphfollikeln und den Peyer-Plaques, die sich von der Tunica mucosa bis in die Submucosa erstrecken. Obwohl vergleichsweise wenig über die zirrrosebedingten Veränderungen des GALT bekannt ist, kommt es zu einer Vermehrung von DCs, aktivierten Monozyten und T-Lymphozyten in der Lamina mucosa und einer vermehrten Phagozytose durch DC (Tsiaoussis et al. 2015). Interessanterweise wurde bei Ratten mit CCl₄ induzierter Zirrhose und BT eine verminderte Aktivität der DC (reduzierte Phagozytose und TNF Produktion) festgestellt, wohingegen sie bei Tieren ohne BT aber mit Nachweis von fragmentierter Bakterien-DNA gesteigert war. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf eine gewisse Toleranzentwicklung gegenüber den betreffenden Antigenen aufgrund der anfänglich ständigen Präsentation (Munoz et al. 2012). Auch die Anzahl der CD27⁺ Gedächtnis B-Zellen bei Patienten mit Leberzirrhose ist vermindert und ihre Funktion eingeschränkt (Doi et al. 2012; Saitoh 1999).

Eine Vielzahl an Faktoren und deren komplexe gegenseitige Wechselwirkung sind an der Entstehung der BT und somit der SBP beteiligt (Abb. 3). Wiest et. al. stellen die Hypothese einer dynamisch entstehenden BT auf, die sich abhängig vom Stadium der Leberzirrhose entwickelt: Zunächst komme es möglicherweise zu einer geringen, aber kontinuierlichen Translokation bakterieller Produkte, die eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Moleküle zur Folge hat. Dadurch wird die Immunantwort anfänglich induziert, langfristig kommt es zu einer weiteren Lockerung der TJ und zur Toleranzentwicklung gegenüber der erhöhten BT, welche die weitere Translokation erleichtert (Wiest et al. 2014).

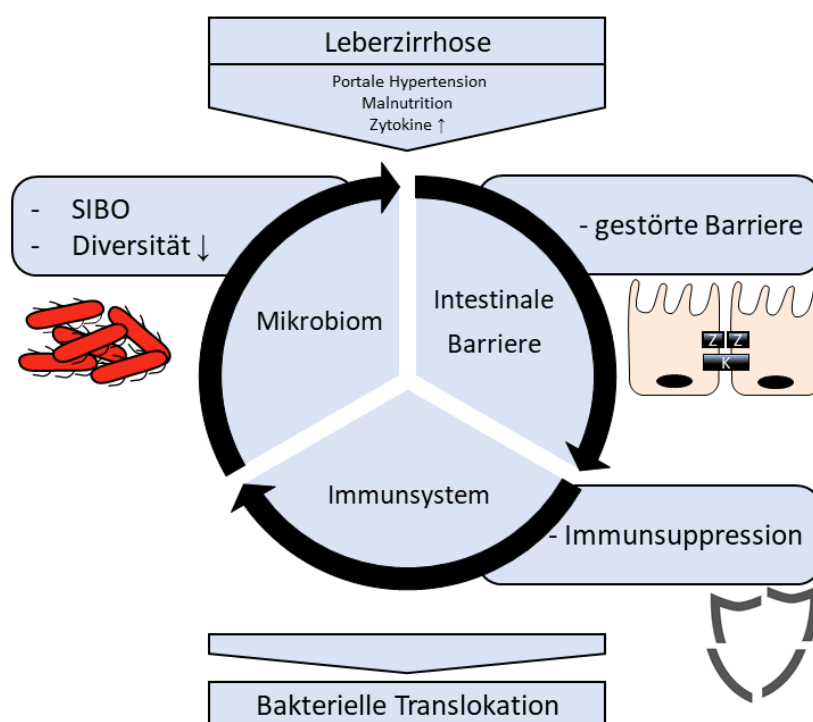


Abbildung 3. Modell der bakteriellen Translokation. Die portale Hypertension und die vermehrte Bildung von Zytokinen (IL-6, IFN- γ , TNF) im Rahmen der Leberzirrhose führen zu vielfältigen Veränderungen im Körper: Es kommt zu einer bakteriellen Überwucherung im Dünndarm mit abnehmender Diversität und einer gestörten epithelialen Barriere. Des Weiteren ist eine systemische Immunsuppression zu beobachten. Diese Veränderungen und deren Wechselwirkung untereinander begünstigen die BT (modifiziert nach Wiest et al. 2014).

1.2 Zell-Zell-Kontakte

Zell-Zell-Kontakte spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere und nehmen somit bei der Entstehung der SBP eine Schlüsselrolle ein. Deshalb sollen sie im nächsten Abschnitt genauer charakterisiert werden.

1.2.1 Architektur der Zell-Zell-Kontakte

Intestinale Epithelzellen sind durch Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden. Zu ihnen gehören:

- TJ
- *adherens junctions*
- Desmosomen

Desmosomen und *adherens junctions* dienen vor allem der mechanischen Verankerung der Epithelzellen und deren Kommunikation, wohingegen TJ eine regulierbare, permeable Barriere zwischen den Epithelzellen bilden und so den parazellulären Transport steuern.

Tight junctions

Die TJ werden aus einem Proteinkomplex gebildet. Dieser besteht aus Transmembranproteinen (Occludin, Claudine, Junktionales Adhäsionsmolekül und Tricellulin), deren intrazelluläre Domäne über Zonula Occludens Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3) an das Aktin-Zytoskelett geknüpft ist (Abb. 4). Eine Regulation der Permeabilität der TJ gelingt durch ihre Verbindung mit intrazellulären Aktin-Myosin-Ringen und wird unter anderem durch die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) vermittelt (Marchiando et al. 2010). Zytokine wie TNF sind in der Lage die Expression der MLCK zu erhöhen (Wang et al. 2005). In der Folge kommt es zur verstärkten Phosphorylierung der regulatorische Myosin II Leichtkette (MLC), die die Aktivität der Myosin ATPase erhöht (Turner et al. 1997; Le Shen et al. 2006). Im Ergebnis steigt die Permeabilität über bislang nur unzureichend geklärte, molekulare Mechanismen (Turner 2009).

Occludin, das 1993 als erstes Transmembranprotein der TJs beschrieben wurde, ist ein ca. 65 kDa großes Protein mit 2 extrazellulären Loops und je einer NH₂- und COOH-terminalen intrazellulären Domäne (Furuse et al. 1993). Wohingegen früher der

Stellenwert von Occludin für die Ausbildung funktionsfähiger TJ und einer kompetenten Barriere in Frage gestellt wurde, zeigen neuere Untersuchungen im Zell- und Tiermodell, dass ein Fehlen von Occludin zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität für Makromoleküle (Inulin, 10-kDa Dextran, 70-kDa Dextran) führt. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER), als Marker für den parazellulären Ionenstrom, bleibt dabei unverändert. Es muss also diskutiert werden, ob es einen Occludin-abhängigen, selektiven, parazellulären Weg für Makromoleküle gibt (Al-Sadi et al. 2011).

Die Familie der Claudine, als weitere Gruppe TJ-assoziierter Transmembranproteine, besteht aus mindestens 24 Proteinen mit einer Größe von 20 - 27 kDa. Strukturell betrachtet sind Claudine aus 2 extrazellulären Loops und einem intrazellulären C- und N-Terminus aufgebaut. In Ihrer Funktion können sie entweder Barrieren oder Poren bilden und lassen sich dadurch in 2 Gruppen einteilen (van Itallie und Anderson 2006). Intestinal bilden Claudin 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 und 14 Barrieren, wohingegen Claudin 2, 7, 12, und 15 Poren bilden. Die Funktion der einzelnen Claudine wird dabei durch die Anzahl und Position geladener Amino-Gruppen am ersten extrazellulären Loop bestimmt. Negativ geladene Gruppen führen dabei zu einer selektiven Permeabilität für Kationen (Suzuki 2013). Den Claudinen kommt eine entscheidende Rolle in der Bildung der TJ – insbesondere der Bildung der Barriere- und Permeabilitätsfunktion – zu. Claudin-1 knock-out Mäuse sterben innerhalb von 24 Stunden an Dehydratation und Elektrolytverlust (Furuse et al. 2002).

Adherens junctions

Die *Adherens junctions* bestehen aus Transmembran- oder Membran-assoziierten Glykoproteinen der Cadherin-Familie, welche aus 6 Hauptgruppen besteht: Typ I Cadherine (u. a. E-Cadherin), Typ II Cadherine, Desmocollin, Desmoglein, Flamingo Cadherine und Proto-Cadherine. Die intrazelluläre Domäne der Cadherine ist mit Plaque-Proteinen wie Catenin an Aktinfilamente des Zytoskeletts gebunden (Abb. 4) (Nollet et al. 2000). Der Prototyp der Cadherine – das Typ I Cadherin E-Cadherin – besteht aus einer intrazellulären, einer Transmembran und einer extrazellulären Domäne, wobei letztere 5 repetitive Domänen beinhaltet (Hulpiau und van Roy 2009). E-Cadherin ist für die zelluläre Signaltransduktion und Adhäsion, die Morphogenese und die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase von zentraler Bedeutung (Bondow et al. 2012; Schneider et al. 2010).

Desmosomen

Desmosomen dienen vor allem der starken mechanischen Verankerung von Zellen, sind allerdings auch bei der Signaltransduktion und somit an Prozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt (Garrod und Chidgey 2008).

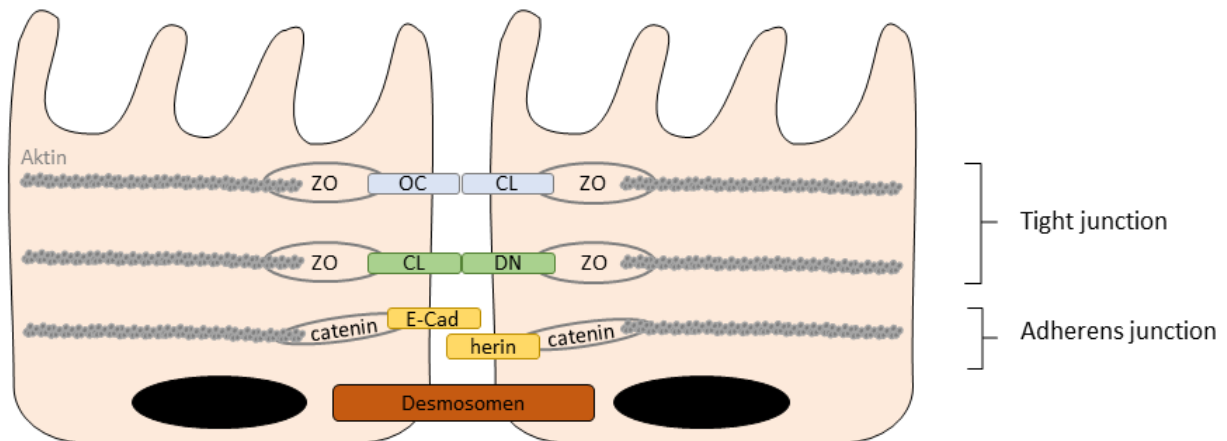


Abbildung 4. Architektur der Zell-Zell-Kontakte. Mehrere Proteinkomplexe verbinden benachbarte Epithelzellen miteinander. Apikal befinden sich TJ, bestehend aus Transmembranproteinen Occludin (OCCL) oder Claudin (CLDN), die über Zonula occludens Proteine (ZO) mit Aktinfilamenten der Zelle verbunden sind. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Versiegelung des Parazellularraumes bei gleichzeitigem Erhalt der gerichteten Permeabilität. Basal der TJ befinden sich die *adherens junctions*, die aus den Transmembranproteinen E-Cadherin (E-Cadherin), die über Catenine mit den Aktinfilamenten verbunden sind, gebildet werden. Sie sind wichtig für die Adhäsion der Zellen, die korrekte Morphogenese sowie der Aufrechterhaltung der intestinalen epithelialen Homöostase. Die **Desmosomen** dienen vor allem der mechanischen Verankerung von Zellen, sind aber auch an der Signaltransduktion beteiligt (modifiziert nach Suzuki 2013).

1.2.2 Bakterielle Effekte auf Zell-Zell-Kontakte

Neben Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Nahrungsmitteln nehmen auch eine Vielzahl von Erregern Einfluss auf TJ. Dabei können die Bakterien ihre Wirkung entweder durch direkte zelluläre Bindung oder Toxinsekretion entfalten. *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* sowie verschiedene *E. coli*-Stämme, darunter Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und adherent-invasive *E. coli* (AIEC) sind in der Lage, TJ zu beeinflussen (Suzuki 2013; Shawki und McCole 2017; Haderer et al. 2021).

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Caco-2-Zellmodell eine Reduktion von Occludin und E-Cadherin nach bakterieller Stimulation mit verschiedenen *E. coli* Stämmen zeigen, wobei der Effekt zeit- und dosisabhängig war. Ein Effekt war jeweils nur bei lebenden

Bakterien zu beobachten. Interessanterweise zeigten 5 von 10 *E. coli* Stämmen, die aus dem Aszites von Patienten mit einer SBP isoliert wurden, eine Reduktion von Occludin und E-Cadherin in unterschiedlichem Ausmaß. Auch der direkte Kontakt der Bakterien zu den Zellen war für die Reduktion von E-Cadherin und Occludin wichtig: Ohne direkten Bakterien-Zell-Kontakt war keine Reduktion von E-Cadherin und eine verminderte Reduktion von Occludin zu beobachten. Während die verminderten Occludin-Level durch eine *E. coli* induzierte proteasomale Degradation vermittelt wurden, ist der Einfluss auf E-Cadherin auf eine bakterielle Protease zurückzuführen (Haderer et al. 2021). Auch ein SBP-verursachender *Proteus mirabilis* zeigte eine Reduktion von Occludin und E-Cadherin über die eben beschriebenen Mechanismen (Haderer et al. 2021).

Nach *EPEC* Infektion zeigte sich im Zellmodell eine verminderte Assoziation von Occludin, ZO-1 und Claudin 1. TJ-Proteine dislozieren zur lateralen Membran und der transepitheliale elektrische Widerstand nimmt mit der Dauer der Infektion ab. Diese Effekte scheinen nach antibiotischer Behandlung reversibel zu sein (Muza-Moons et al. 2004). Hervorgerufen wird der regulatorische Einfluss durch die mittels Typ III-Sekretions-System injizierten Proteine EspF und Map (*mitochondria-associated protein*) und das Membranprotein Intimin. Die komplexe wechselseitige Beeinflussung der Proteine ermöglicht eine Modifikation der TJs (Dean und Kenny 2004).

Auch *EHEC* führt im Zellmodell zu einer Reduktion von ZO-1 und einer Abnahme des transepithelialen elektrischen Widerstandes (Philpott et al. 1998).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass *K. pneumoniae* die Menge von ZO-1, Claudin 1 und Occludin im Mausmodell negativ beeinflusst, wenngleich in anderen Untersuchungen an Zellkulturen keine Regulation von ZO-1 oder Occludin durch *K. pneumoniae* beobachtet werden konnte (Hsu et al. 2015; Lee und Kim 2011).

Neben reduzierenden Effekten scheinen andere Bakterien in der Lage zu sein, Zell-Zell-Kontakte zu stabilisieren. *In vivo* Experimente legen nahe, dass sich ausgewählte Bakterien, wie *Lactobacillus plantarum*, positiv auf die Ausbildung der TJ auswirken können. So zeigten sich in Gegenwart von *L. plantarum* vermehrt ZO-1 und Occludin im menschlichen Duodenalepithel. *In vitro* Versuche identifizierten den Toll-like Rezeptor 2 als Zielmolekül von *L. plantarum*, dessen Stimulation durch Agonisten ebenfalls eine verstärkte Bildung von Occludin hervorruft (Karczewski et al. 2010).

1.3 Die p53-Familie – Wächter des Genoms und bakterieller Abwehrmechanismus?

Menschliche Zellen und ihr Genom unterliegen ständig auch potenziell schädlichen Einflüssen aus der Umwelt und dem Körperinneren. Eine Vielzahl an zellulären Mechanismen steht zur Verfügung, um den Stressoren entgegenzuwirken und das Überleben der Zelle sicherzustellen. p53 – oft als „*Wächter des Genoms*“ bezeichnet und seine strukturellen Homologe, allen voran p63 und p73, nehmen dabei Schlüsselrollen ein (Lane 1992; Yang et al. 1998; Vousden und Lu 2002; Müller et al. 2005; Müller et al. 2006; Seitz et al. 2010; Levine und Oren 2009; Pflaum et al. 2014; Sethi et al. 2015; Kunst et al. 2016; Pitolli et al. 2019; González et al. 2017). Ein Defekt des Tumorsuppressors p53 führt dazu, dass sich Zellen auch nach DNA-Schäden unkontrolliert teilen können - die Tumorgenese wird begünstigt. In ungefähr der Hälfte aller Tumorerkrankungen lassen sich p53-Mutationen nachweisen (Levine und Oren 2009; Müller et al. 1994).

1.3.1 Aufbau, Funktion und Regulation von p53

p53 wird von dem Gen *TP53* kodiert, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 liegt. Mit seiner molekularen Masse von 43,7 kDa umfasst es 19.200 bp mit 11 Exons (Pflaum et al. 2014). p53 liegt in der Zelle als Tetramer aus 4 identisch aufgebauten Untereinheiten vor. Jedes Monomer besteht dabei aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), einer Prolin-reichen Domäne (PRD), einer DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer Oligomerisierungsdomäne (OD) (Abb. 5) (Bourdon et al. 2005). Durch die Verwendung verschiedener Promotoren und durch alternatives Splicing kann eine Vielzahl an Isoformen mit teils unterschiedlicher Aktivität gebildet werden (Kunst et al. 2016; Solomon et al. 2014).



Abbildung 5. Proteinstruktur des humanen p53. p53 liegt in der Zelle als Tetramer aus 4 identisch aufgebauten Monomeren vor. Ein Monomer beinhaltet eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), eine Prolin-reiche Domäne (PRD), eine DNA-bindende Domäne (DBD) und eine Oligomerisierungsdomäne (OD). Die N-terminale TAD dient der Bindung von Transkriptionsfaktoren und MDM2. Es schließt sich die PRD an. Die DNA-bindende Domäne (DBD) ist essentiell für die transkriptionelle Aktivität des Proteins. C-Terminal befindet sich die OD (modifiziert nach Kunst et al. 2016).

In gesunden, nicht gestressten Zellen, wird p53 konstitutiv exprimiert, liegt aber nur in geringer Konzentration vor (Momand et al. 1992; Kussie et al. 1996; Haupt et al. 1997; Rodriguez et al. 2000; Michael und Oren 2003), da es von der E3-Ubiquitin Ligase MDM2 ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird (Maki et al. 1996; Sethi et al. 2015; Donehower et al. 1992; Levine 1997; Friedel und Loewer 2021). Ist die Zelle potenziell schädlichen Einflüssen ausgesetzt, beispielsweise einer Hypoxie, oxidativem Stress oder DNA-Schäden, kommt es durch verschiedene regulatorische Proteine zur Inhibierung von MDM2 und somit zur Akkumulation von p53 (Abb. 6) (Perry 2010). p53 kann wiederum auf ein ganzes Repertoire möglicher Stressantworten zurückgreifen: Das Überleben der Zelle kann mithilfe von DNA-Reparaturmechanismen und der Einleitung eines Zell-Zyklus-Arrestes gesichert oder durch die Einleitung der Apoptose verwehrt werden (Abb. 6) (Vousden und Lu 2002). Eine Vielzahl von Genen, die an Apoptose (u. a. TRAIL-R1, TRAIL-R2, CD95), Zell-Zyklus-Arrest (u. a. p21), DNA-Reparatur (u. a. HMSH2), Zelldifferenzierung oder Zellmetabolismus (u. a. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) beteiligt sind, wurden als Zielgene von p53 identifiziert (Mihara et al. 2003; Tomita et al. 2006; Chipuk et al. 2004; Boutelle und Attardi 2021; Shi et al. 2020; Lahalle et al. 2021; Pflaum et al. 2014; Menendez et al. 2009; Vousden und Prives 2009).

Zusätzlich zur Funktion als Transkriptionsfaktor sind auch transkriptionsunabhängige p53-Mechanismen beschrieben, bei denen das Zytosol und die Mitochondrien involviert sind (Speidel 2010). So interagiert p53 beispielsweise nach zellulärem Stress mit dem pro-apoptischen Protein Bak. In der Folge kommt es zur vermehrten Freisetzung von Cytochrom c. Die p53-Bak Komplexbildung führt darüber hinaus zu einer reduzierten Interaktion von Bak mit dem anti-apoptischen Mcl1 (Leu et al. 2004).

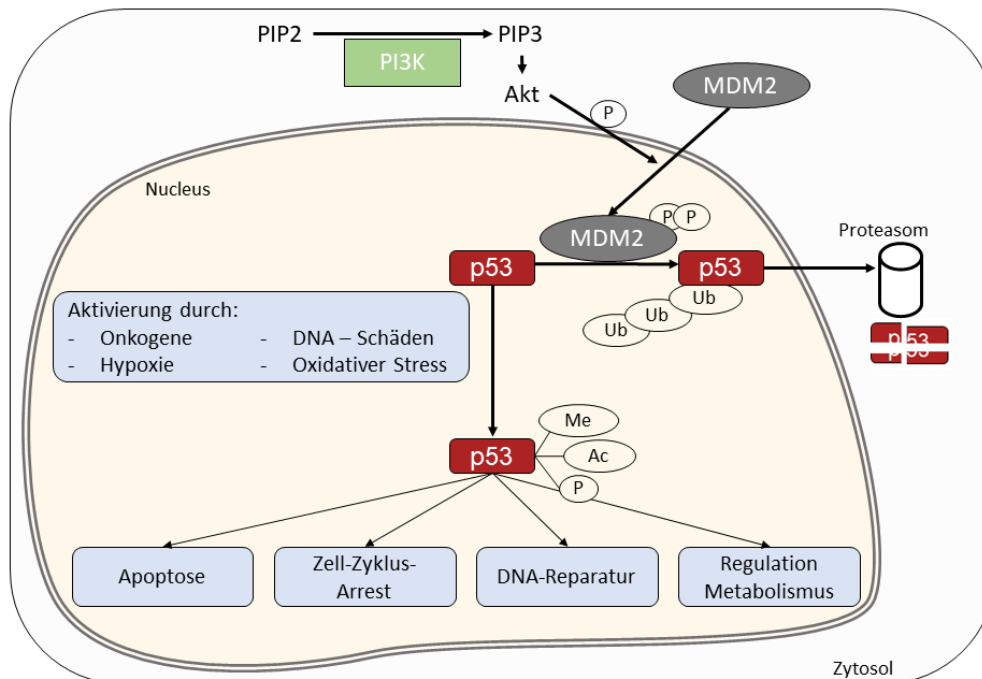


Abbildung 6. Übersicht über die Funktionen von p53. In gesunden Zellen wird das kontinuierlich exprimierte p53 durch MDM2 ubiquitiniert und proteasomal degradiert. Ein Anstieg der intrazellulären p53-Konzentration in Folge einer Stresssituation wird u. a. durch einen verminderten p53 Abbau und die p53-Aktivierung durch Methylierung (Me), Acetylierung (Ac) oder Phosphorylierung (P) erreicht. Auf diese Weise kann p53 über die Regulation seiner Zielgene z. B. DNA-Reparaturmechanismen oder die Apoptose einleiten. Ein hemmender Einfluss auf p53 wird u. a. durch den PI3K/Akt-Signalweg ausgeübt. Nach der PI3K-Aktivierung (z. B. durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) erfolgt u. a. die Bildung von Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3). PIP3 aktiviert die Proteinkinase B (Akt), die wiederum MDM2 phosphoryliert. Phosphoryliertes MDM2 transloziert in den Zellkern und begünstigt den proteasomalen Abbau von p53 (modifiziert nach Siegl und Rudel 2015).

Neben aktivierenden Mechanismen gibt es auch hemmende Einflüsse auf p53. Ein bedeutender Signalweg liegt hier in der PI3K/Akt vermittelten Regulation von p53 (Abb. 6) (Abraham und O'Neill 2014). Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind eine Familie von Enzymen, unterteilt in Klasse I, Klasse II und Klasse III, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, um eingehende Signale zu übermitteln. Nach der PI3K Aktivierung erfolgt die Phosphorylierung bestimmter Phospholipide (Vanhaesebroeck et al. 2010). Im Falle der Klasse I PI3K kommt es zur Bildung von Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3) an der Plasmamembran. In der Folge wird Proteinkinase B (Akt), eine Serin/Threoninkinase, aktiviert. Durch Akt werden konsekutiv eine Vielzahl von Proteinen phosphoryliert, darunter auch MDM2 (Faes und Dormond 2015). Phosphoryliertes MDM2 transloziert in den Zellkern und begünstigt die Ubiquitinierung und damit den proteasomalen Abbau von p53 (Mayo und Donner 2001).

1.3.2 Regulation von p53 während Infektionen

Der Stellenwert von p53 als Tumorsuppressor ist unbestritten. In den letzten Jahren wurde über eine Funktion von p53 während bakteriellen Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* und *Helicobacter pylori* berichtet (Siegl und Rudel 2015).

Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) schädigen die DNA der betroffenen Zelle, führen zu einer PI3K/Akt vermittelten Aktivierung von MDM2 und somit zu einem vermehrten proteasomalen Abbau von p53 (Abb. 7). Als obligat intrazellulärer Erreger ist *C. trachomatis* auf den Stoffwechsel der Zelle angewiesen – unter anderem werden große Mengen an Nukleotiden, wie z. B. NADPH konsumiert, welche vorwiegend über den Pentose-Phosphat-Weg (PPP) gewonnen werden. Mit dem vermehrten Abbau von p53 fällt der hemmende Einfluss von p53 auf den PPP weg, sodass vermehrt Substrate für die Replikation von *C. trachomatis* zu Verfügung stehen (Siegl et al. 2014).

Auch nicht obligat intrazelluläre Erreger wie *Helicobacter pylori*, allen voran Stämme, die den Virulenzfaktor CagA exprimieren, können p53 mittels PI3K/Akt/MDM2 regulieren (Abb. 7). Bemerkenswert ist die im Mausmodell beobachtete biphasische Regulation: Dem frühen Anstieg des p53-Levels nach 4 – 6 Stunden bakterieller Stimulation folgt ein schneller Abfall der p53-Konzentration und ein zweiter Peak nach mehreren Wochen, der ggf. mit der Entwicklung einer Gastritis korreliert. Während der frühe p53-Anstieg möglicherweise durch DNA-Schäden erklärt werden kann, wäre es denkbar, dass eine *H. pylori* vermittelte Reduktion von p53 der Prävention des Zelltodes und der Reduktion einer zellulären Stressantwort dient (Wei et al. 2010).

Infektionen mit *Neisseria gonorrhoeae* resultieren ebenfalls in einer DNA-Schädigung und verminderten p53 Spiegeln bei gleichzeitig erhöhten Proteinspiegeln von p21 und p27. Beides sind *cyclin-dependent kinase* Inhibitoren, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind und beispielsweise bei bestehenden DNA-Schäden ein Voranschreiten in die nächste Zyklusphase verhindern. Durch die bakterielle Stimulation wird die Progression des Zellzyklus verlangsamt. Dies führt zu einer Häufung von Zellen in der G1 Phase (Vielfort et al. 2013).

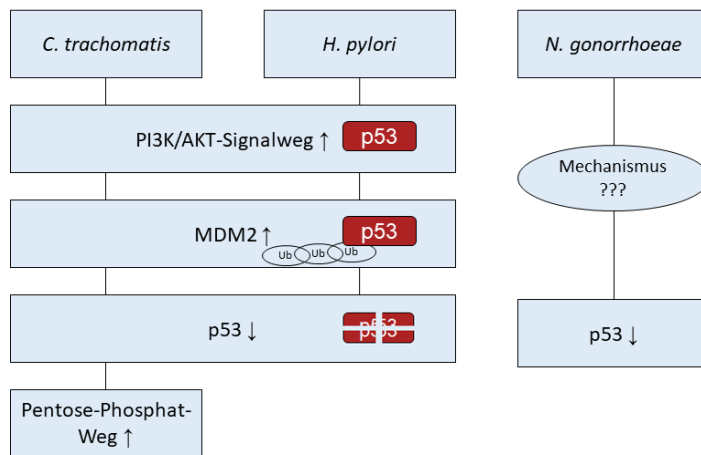


Abbildung 7. Bakterielle Regulation von p53. Sowohl *C. trachomatis* als auch *H. pylori* führen zu einer Reduktion von p53 durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs. Es kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung von MDM2 und somit zur verstärkten Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von p53. *C. trachomatis* profitiert darüber hinaus von der Entthemmung des PPP. *N. gonorrhoeae* interferiert ebenfalls, über einen unbekanntes Mechanismus, mit p53.

Auch SBP relevante Erreger wie *E. coli* können im Rahmen der Infektion zu einer Reduktion von p53 führen. Im Zellmodell zeigte sich nach bakterieller Stimulation mit *E. coli* eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion des p53 Spiegels (Scholtis et al. 2019). Neben den genannten Erregern können noch weitere, unter anderem *K. pneumoniae*, im Rahmen einer Infektion DNA-Schäden verursachen (Cuevas-Ramos et al. 2010; Huang et al. 2013). Auch diese entstandenen Schäden könnten eine Aktivierung von p53 zur Folge haben. Möglicherweise trägt die via p53 eingeleitete Stressantwort dazu bei, infizierte Zellen zu eliminieren oder die intrazelluläre Replikation zu inhibieren. Die Modulation von p53 durch Bakterien scheint deshalb ein bedeutender Schritt, um das bakterielle Überleben zu sichern.

1.4 Fortschritte im Verständnis des Pathomechanismus der SBP

Unsere Arbeitsgruppe konnte wesentliche Mechanismen der Entstehung der SBP identifizieren, welche aufgrund ihrer Relevanz an dieser Stelle kurz dargestellt werden sollen.

SBP verursachende Erreger wie *E. coli* und *Proteus mirabilis* wurden aus dem Aszites von Patienten mit Leberzirrhose isoliert. In einem Zellkulturmodell mit Caco-2 Zellen konnte eine zeit- und dosisabhängige Reduktion von Occludin und E-Cadherin gezeigt werden, wobei jeweils eine direkte Interaktion der vitalen Bakterien mit den Epithelzellen notwendig war. Eine Regulation auf mRNA Ebene war nicht zu beobachten. Der durch die Reduktion der Zell-Zell-Kontakte verursachte Verlust der epithelialen Integrität führte zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase (Haderer et al. 2021).

Die Reduktion von Occludin lässt sich auf einen verstärkten proteasomalen Abbau zurückführen, wohingegen die E-Cadherin Reduktion auf eine bis dahin unbekannt, erstmals identifizierte bakterielle Protease zurückzuführen ist (Haderer et al. 2021). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Rahmen der bakteriellen Infektion eine verstärkte, intrazelluläre, proteasomale Degradation induziert wird. Darüber hinaus verfügten die untersuchten *E. coli* Bakterien auch über eine neu beschriebene bakterielle Protease, welche zur Spaltung von E-Cadherin führt und somit die epitheliale Integrität beeinflusst. Beide Mechanismen stellen wichtige therapeutische targets zur Prävention einer bakteriellen Translokation dar.

1.5 Zielsetzung

Die komplexe Pathogenese der SBP ist bis dato nicht vollständig geklärt, die BT jedoch als auslösender Mechanismus identifiziert. Durch eine geschwächte intestinale Barriere, eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms sowie eine systemische Immunsuppression wird die BT begünstigt.

Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass SBP verursachende *E. coli* Stämme in der Lage sind, eine Proteasom vermittelte Occludin Reduktion herbeizuführen und mittels einer neu identifizierten bakteriellen Protease einen E-Cadherin Reduktion zu induzieren (Haderer et al. 2021).

Da *K. pneumoniae* – neben *E. coli* – einen der häufigsten Erreger der SBP darstellt, sollte in dieser Arbeit mit Hilfe eines *in vitro* Modells untersucht werden, welchen Einfluss *K. pneumoniae* auf die TJ (Occludin, Claudin 1, Claudin 4) und *adherens junctions* (E-Cadherin) ausübt. Von Interesse waren hierbei sowohl die Proteinspiegel als auch die Genexpression.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Rolle von p53 während bakterieller Infektionen zu untersuchen. Unsere Hypothese war hier, dass p53 eine „first line defense“ in der bakteriellen Abwehr darstellen könnte. Deshalb wurde untersucht, ob p53 auch während der Infektion mit *K. pneumoniae* einer Regulation unterliegt. Mithilfe der Ergebnisse soll weiteres Wissen zur Rolle von p53 während bakterieller Infektionen gewonnen und ein Beitrag zur Identifizierung des genauen Pathomechanismus der SBP geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Analysewaage Excellence XA 105 Dual Range	Mettler Toledo, Deutschland
BB6220 Inkubator	Heraeus, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Cell Counting Slides für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Costar Stripette 5ml, 10ml, 25ml, 50 ml	Corning, USA
Costar 12 Well TC-Treated Plates	Corning, USA
Costar®24 Well TC-Treated Plates	Corning, USA
Durchflusszytometer BD LSRFORTESSA	BD Biosciences, USA
EMax Plus Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Eppendorf Easypet	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorfgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf AG, Germany
Electrophoresis Power Subbly EV261	Consort bvba, Belgium
Falcon 40 µm und 70 µm Cell Strainer	Corning, USA
Falcon 50 ml Tubes	Corning, USA
Falcon 15 ml Tubes	Corning, USA
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M mit HAL-100 Laser	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Grade Whatman 3MM Chr Blotting Paper	GE Healthcare, USA
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Deutschland
Light Cycler 480 Real-time PCR System Deutschland	Roche Diagnostics GmbH,
Light Cycler 480 384 Well Platte Deutschland	Roche Diagnostics GmbH,
Light Cycler 480 Sealing Foil Deutschland	Roche Diagnostics GmbH,
Millicell-ERS Voltohmmeter	Merck Millipore, USA
Multigel, Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Deutschland

Nanophotometer IMPLLEN	Implen GmbH, Deutschland
Nunc Lab-Tek Chamber Slide 2-Well	Thermo Fisher Scientific, USA
PCF-Insert 12mm, Porengröße 0,4 µm	Merck Millipore, USA
PCR-Tubes 0,5 ml und 0,2 ml	Kisker Biotech, Deutschland
PVDF Transfer Membran	Thermo Fisher Scientific, USA
Reinstwasseraufbereitungsanlage Mili-Q Q-POD	Merck Millipore, USA
Sterilbank Laminair HB2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Deutschland
TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
TE77XP Semi-Dry Transfer Unit	Hoefer Inc., USA
Transwell Insert 3 µm Porengröße	Merck Millipore, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
ZOE Fluorescent Cell Imager	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Zell-Kultur-Flaschen, 75 cm ²	Corning, USA
Zell-Kultur-Flaschen, 125cm ²	Corning, USA
Zellkulturschale TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Deutschland

2.1.2 Software

AxioVision 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Flowlogic Software Version 7.2.1	Miltenyi Biotec, Deutschland
ImageJ	National Institute of Health, USA
Image Lab Software	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft, USA
LightCycler 480 Software, Version 1.5 SP4	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
SoftMax Pro 7	Molecular Devices, USA

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

2.1.3.1 Chemikalien, Zellkulturreagenzien und Fertigkits

Standard-Reagenzien wurden von branchenüblichen Herstellern bezogen. Es folgt eine Auflistung der Nicht-Standard-Reagenzien:

Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, USA
cOmplete ULTRA, Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
DAPI	BioLegend, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Kupfer(II)-sulfat	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälberserum	Bio&Sell, Germany
Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N,N</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, USA
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, USA
Minimum Essential Medium Eagle (M4655)	Sigma-Aldrich, USA
McCoy's 5A (Modified) Medium, GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Bovines Serumalbumin	PanReac AppliChem, Deutschland
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit	R&D Systems, USA
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Niederlande
ReBlot Plus Strong Stripping Solution (10x)	Merck Millipore, USA
RLT-Lysepuffer	Qiagen, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Niederlande
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Niederlande

2.1.3.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Gelöst in
Occludin Alexa Fluor 488 conjugate (OC-3F10)	Invitrogen, USA	2 µg/ml	BSA
Alexa Fluor 488 Mouse IgG1, k Isotype Ctrl Antibody	BioLegend, USA	2 µg/ml	BSA

Tabelle 1. Auflistung der für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper.

Antikörper	Firma	Verdünnung	Gelöst in	Stamm
P53 Antibody [DO-1]	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA	1:1000	5% Magermilch	Mouse
Occludin [NBP1-87402]	Novus Biologicals, USA	1:1000	5% Magermilch	Rabbit
E-Cadherin [24E10]	Cell Signaling Technology, USA	1:1000	5% BSA	Rabbit
Claudin 1 [1C5-D9]	Abnova, Taiwan	1:1000	5% Magermilch	Mouse
Claudin 2 [E1H90]	Cell Signaling Technology, USA	1:1000	5% BSA	Rabbit
Claudin 4 [16195-1-AP]	Proteintech Group Inc., USA	1:1000	5% Magermilch	Rabbit
Villin-1 [R814]	Cell Signaling Technology, USA	1:1000	5% Magermilch	Rabbit
HSP90AB1 [OTI4C10]	OriGene, USA	1:1000	5% BSA	Mouse
betaAktin [A3854-200UL]	Sigma Aldrich, USA	1:10000	5% Magermilch	Mouse
Mouse (A9044-2ML)	Sigma Aldrich, USA	1:3000	Wie primärer AK	Mouse
Rabbit (A0545-1ML)	Sigma Aldrich, USA	1:3000	Wie primärer AK	Rabbit

Tabelle 2. Auflistung der für die Western Blots verwendeten Antikörper.

2.1.3.3 Primer

Die Primer stammten von metabion international AG (Deutschland) und wurden für den Mastermix 1:10 auf 10 µM mit RNase freiem Wasser verdünnt. Sie enthielten folgenden Sequenzen:

Primer	Spezies	Sequenz 5' → 3'
GAPDH forward	Mensch	CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA
GAPDH reverse	Mensch	GCT GGT CCA GGG GTC TTA CT
TAp53 forward	Mensch	AGG CCT TGG AAC TCA AGG
TAp53 reverse	Mensch	TTA TGG CGG GAG GTA GAC TG
OCLDN forward	Mensch	ACA AGC GGT TTT ATC CAG AGT C
OCLDN reverse	Mensch	GTC ATC CAC AGG CGA AGT TAA T
CDH1 forward	Mensch	ATG AGT GTC CCC CGG TAT CT
CDH1 reverse	Mensch	GGT CAG TAT CAG CCG CTT TC

Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Primer.

2.1.4 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

2.1.4.1 Puffer

Puffer für den Semi-Dry-Blot

Anodenpuffer A

Tris (ohne HCl)	18,2 g
Methanol	100 ml
Zugabe von Millipore H ₂ O auf Endvolumen von	500 ml
pH	10,4

Anodenpuffer B

Tris (ohne HCl)	1,5 g
Methanol	100 ml
Zugabe von Millipore H ₂ O auf Endvolumen von	500 ml
pH	10,4

Kathodenpuffer C

Tris (ohne HCl)	1,5 g
Methanol	100 ml
6-Aminohexansäure	2,6 g
Zugabe von Millipore H ₂ O auf Endvolumen von	500 ml
pH	9,4

Western Blot Waschpuffer

Millipore H ₂ O	900 ml
PBS (10x)	100 ml
Tween	0,5 ml

Immunfluoreszenz Waschpuffer

TBS	50 ml
Tween	50 µl

RIPA-Lysepuffer

RIPA-Puffer	10 ml
cOmplete ULTRA, Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor	1 Tablette

2x Lämmli-Puffer

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
10% SDS	2 ml
0,2 M EDTA	0,2 ml
Glycerin	3,1 ml
Bromphenolblau	30 mg
Millipore H ₂ O	2 ml

Working-Reagent für BCA-Test

Bicinchoninsäure	20 ml
Kupfer(II)-sulfat	400 µl

2.1.4.2 Kulturmedien

HCT-116-Kulturmedium

McCoy's 5A (Modified) Medium	500 ml
GlutaMAX supplementiert	
Fetales Kälberserum	50 ml

Caco-2-Kulturmedium

Minimum Essential Medium Eagle (M4655)	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml

Luria Broth (LB) Medium

Natriumchlorid	0,5 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Auffüllen auf 1000 ml mit Millipore H ₂ O (pH 7)	

2.1.4.3 Lösungen

10x PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	28,85 g
Auffüllen auf 1000 ml mit mit Millipore H ₂ O	

ECL-Mix

250 mM Luminol in DMSO	2 ml
aus 100 mg Luminol in 2 ml DMSO	
90 mM p-Coumarin-Säure in DMSO	890 µl
aus 14,76 mg p-Coumarin-Säure in 1 ml DMSO	
1M Tris-HCl pH 8,5	20 ml
Auffüllen auf 200 ml mit Millipore H ₂ O	

Polyacrylamid-Gele

Trenngel (12%) 10 ml	
Millipore H ₂ O	3,3 ml
30% Acrylamid-Mix	4,0 ml
Tris (1,5M, pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% Ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	4 µl

Trenngel (15%) 10 ml

Millipore H ₂ O	2,3 ml
30% Acrylamid-Mix	5,0 ml
Tris (1,5M, pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% Ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	4 µl

Sammelgel (5%) 3 ml

Millipore H ₂ O	2,1 ml
30% Acrylamid-Mix	0,5 ml
Tris (1,5M, pH 8,8)	0,33 ml
10% SDS	30 µl
10% Ammoniumpersulfat	30 µl
TEMED	3 µl

Reverse-Transkriptase-Mix (Gesamtvolumen 6 µl/Reaktion)

Quantiscript Reverse-Transkriptase Puffer	4 µl
Quantiscript Reverse Transkriptase	1 µl
Reverse Transkriptase Primer Mix	1 µl

PCR-Mastermix (Gesamtvolumen 9 µl/Well)

1 µl Primer-Mix
5 µl SYBR-Green (2x)
3 µl RNase-freies H ₂ O

2.1.5 Zelllinien

2.1.5.1 HCT-116 – Kolorektale Adenokarzinomzellen

HCT-116 Zellen (p53 wildtyp) sind humane kolorektale Adenokarzinomzellen. Sie dienen der Untersuchung eines möglichen Einflusses von *K. pneumoniae* auf p53.

2.1.5.2 Caco-2 – Kolorektale Adenokarzinomzellen

Caco-2 Zellen (p53 mutiert), gelten als gut differenziert: Durch die Ausbildung eines polarisierten Monolayers und die Bildung eines Bürstensaums inklusive Enzymausstattung (wie z. B. Laktase, Aminopeptidase N und Dipeptidylpeptidase IV) ähneln sie reifen Enterozyten (Liu und Bodmer 2006, Chantret et al. 1988). Sie dienen der Untersuchung einer möglichen Regulation der Zell-Zell-Kontakte durch *K. pneumoniae*.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 HCT-116

HCT-116 Zellen wurde in McCoy's Medium in oben genannter Zusammensetzung in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 – 4 Tage bei einer Konfluenz von ca. 80% unter sterilen Bedingungen passagiert. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt wurde, erfolgte eine Waschung der Zellen mit 5 ml sterilen PBS (1x). Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA (1x) gewaschen und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proteolyse wurde mit 10 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellen von der Flasche gelöst und in eine neue Zellkulturflasche auf ein Endvolumen von 10 ml 1:7 oder 1:10 verteilt. Sofern die Zellen für Experimente ausgesät wurden, erfolgte die Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA (1x) für 5 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Proteolyse mit 8 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 30 ml bis 50 ml Kulturmedium resuspendiert sowie durch einen Zellsieb mit 70 µm Porengröße gefiltert, um die Zellen zu separieren. Es folgte die automatische Bestimmung der Zellzahl mittels TC20 Automated Cell Counter. Die Zellsuspension wurde entsprechend verdünnt und für das jeweilige Experiment in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.2 Caco-2

Caco-2 Zellen wurden in Minimum Essential Medium nach obiger Zusammensetzung in 125 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Die Teilung der Zellen unter sterilen Bedingungen in Subkulturen erfolgte nach 3 bzw. 4 Tagen bei einer Konfluenz des Zellrasens von ca. 80%.

Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilen PBS (1x) gewaschen. Anschließend inkubierten die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA (1x) für 5 bis 8 Minuten bei 37°C. Die Proteolyse wurde mit 10 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellen von der Flasche gelöst und in eine neue Zellkulturflasche auf ein Endvolumen von 20 ml 1:3 oder 1:5 verteilt.

Sofern die Zellen für Experimente ausgesät wurden, erfolgte die Inkubation mit 4 ml Trypsin-EDTA (1x) für 5 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Proteolyse mit 6 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 30 ml bis 50 ml Kulturmedium resuspendiert sowie durch einen Zellsieb mit 40 µm Porengröße gefiltert, um die Zellen zu separieren. Es folgte die automatische Bestimmung der Zellzahl mittels TC20 Automated Cell Counter. Die Zellsuspension wurde entsprechend verdünnt und für das jeweilige Experiment ausgesät.

2.2.1.3 Aussaat, Koinkubation und Ernte der Zellen

Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Die initiale Konzentration betrug dabei für HCT-116 Zellen 5*10⁶ Zellen/ 10 ml und für Caco-2 Zellen 2,5*10⁶ Zellen/ 10 ml. Die Zellen wurden für einen definierten Zeitraum bei 37°C, 5% CO₂ und angefeuchteter Atmosphäre kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage.

Eine *K. pneumoniae* Suspension wurde am Tag vor der Zellernte angesetzt. Dabei wurden 20 µl der *K. pneumoniae* Glycerin-Kultur in 20 ml LB0 gegeben. Die Suspension schüttelte über Nacht bei 37°C. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Messung der OD₆₀₀ der Suspension bei verschiedenen Verdünnungen und die Kalkulation der Bakterienzahl pro µl mit Hilfe der folgenden, aus vorangegangenen laborinternen Arbeiten bekannten, Formel:

$$\text{CFU}/\mu\text{l} = (137874 * \text{OD}_{600} + 18713) * \text{Verdünnung}$$

Die Zellen wurden dann entsprechend dem Experiment mit einer definierten Multiplizität der Infektion (MOI) an Bakterien infiziert und für einen vorab festgelegten Zeitraum bei 37°C, 5% CO₂ und angefeuchteter Atmosphäre inkubiert. Als Kontrolle dienten die Inkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien der jeweils höchstens MOI welche für 5 Minuten auf 90 °C erhitzt wurden.

Anschließend folgte die Zellernte. Diese begann mit einer dreimaligen Waschung mit PBS (1x), bevor die Zellen mit 800 µl PBS (1x) befeuchtet und mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gelöst wurden. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und dieses 5 Minuten bei 400 x g und 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Experiment weiterverarbeitet:

a) Gewinnung von Proteinlysaten

Hierzu erfolgte im nächsten Schritt die Resuspendierung des Pellets in 350 µl RIPA-Lysepuffer und Inkubation für 1 Stunde auf Eis. Abschließend wurde die Suspension 1 Stunde bei 16 000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei – 20°C gelagert.

b) Gewinnung von Proteinlysaten und RNA

Das Zellpellet wurde zunächst in 900 µl PBS (1x) resuspendiert. Davon wurden 600 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Proben (600 µl und 300 µl) 5 Minuten bei 400 x g und 5°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet, welches aus den 600 µl entstanden ist, wurde in 600 µl RLT-Puffer gelöst und bei – 20 °C gelagert.

Das aus den 300 µl entstandene Pellet wurde in 350 µl RIPA-Lysepuffer gelöst und das Proteinlysat wie oben beschrieben gewonnen.

2.2.2 BCA-Test

Die Proteinlysate tauten zunächst auf Eis auf. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Proben erfolgte mittels BCA-Test. Auf einer 96-Well Platte wurden 10 µl einer Standardlösung mit bekannter Proteinkonzentration in Duplikaten vorgelegt (0 µg/ml, 200 µg/ml und/oder 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml, 2000 µg/ml und/oder 4000 µg/ml). Es folgte eine 1:10 (HCT-116) oder 1:5

(Caco-2) Verdünnung der zu messenden Proben im Well mit RIPA-Lysepuffer in Duplikaten bei einem Gesamtvolumen von 10 μl . Im nächsten Schritt wurden 200 μl des Working-Reagent pro Well pipettiert. Zusätzlich fungierten 2 Wells mit 200 μl Working-Reagent als Blank. Nach kurzem Klopfen der Platte inkubierte diese für 20 Minuten bei 37°C. Es folgte die photometrische Messung der Absorption bei 562 nm. Mittels Software gelang die Ermittlung einer Standardkurve und die Extrapolation der unbekannt Proteinkonzentrationen.

2.2.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben entsprechend mit RIPA-Lysepuffer verdünnt, um eine Gesamtkonzentration von 30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ oder 25 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ zu erhalten. Es erfolgte die Zugabe von 10 μl Lämmli-Puffer (2x + DTT) pro Probe und die Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten.

Die Geltaschen der Polyacrylamid-Gele konnten anschließend mit den Proben befüllt werden. Je nach erwarteter Größe der zu untersuchenden Proteine stand ein Gel mit 12% bzw. 15% Polyacrylamid zur Verfügung.

Die Gelelektrophorese lief pro Gel für 20 Minuten bei 25 mA und für 40 Minuten bei 40 mA.

2.2.4 Semi-Dry Blot und Detektion der Proteine

Der Semi-Dry-Blot wurde nach folgendem Schema aufgebaut:

- 1 Filterpapier (in Anodenpuffer A getränkt)
- 2 Filterpapiere (in Anodenpuffer B getränkt)
- 1 Methanol aktivierte Membran
- Auflegen des Gels auf die aktivierte Membran
- 3 Filterpapiere (in Kathodenpuffer C getränkt)

Der Proteintransfer erfolgte bei 80 mA pro Gel für 50 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran je nach verwendetem Antikörper 1 Stunde mit BSA (5 %) oder Magermilch (5 %) inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu reduzieren. Über Nacht inkubierte der primäre Antikörper bei 4°C gemäß den in Tabelle 1 aufgeführten Verdünnungen. β -Aktin inkubierte mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur. Während allen Inkubationsvorgängen befand sich die Membran auf einem Rütteltisch.

Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:3000 verdünnt und inkubierte 1 Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von einer dreimaligen Waschung und Inkubation der Membran für 45 Sekunden mit 5 ml ECL-Mix und 1,52 µl H₂O₂ pro Membran. Das entstandene Signal wurde mit Hilfe des ChemiDoc XRS+ Systems erfasst und mittels Image Lab bearbeitet.

Wenn weitere Proteine detektiert werden sollten, wurde die Membran mit 10 ml ReBlot Strong (1x) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit BSA oder Magermilch geblockt und erneut wie oben beschrieben mit einem Antikörper behandelt.

Signale, die optisch nicht eindeutig interpretiert werden konnten, wurden densitometrisch ausgewertet.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Caco-2 Zellen für die Immunfluoreszenz wurden in Chamber-Slides mit 2 Kammern ausgesät. Pro Kammer (Fläche = 4,2 cm²) erfolgte die Zugabe von 180.000 Zellen am Tag 0. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage bis zur Ernte am 6. oder 15. Tag.

Am Tag der Ernte erfolgte die Koinkubation der Zellen mit *K. pneumoniae* (MOI 5). Zuerst wurden 2 Kammern trypsiniert, die Zellzahl mittels automatisierter Zählung ermittelt und der Mittelwert gebildet. Dieser diente als Grundlage zur Bestimmung der MOI für die Koinkubation der anderen Kammern. Nach der Infektion konnten die Zellen fixiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen, bevor diese mit 4% Formaldehyd (500 µl/Well) für 15 Minuten lichtgeschützt inkubierten. Es schloss sich eine weitere Waschung mit 500 µl PBS/Well und die Konservierung mit 0,05% Natriumazid (500 µl) an. In diesem Zustand lagerten die Zellen für mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C.

Für die Anfertigung der eigentlichen Immunfluoreszenz wurden von den fixierten Proben die Kammern entfernt und die Zellen mit Immunfluoreszenz-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss mussten die Zellen mittels 2% Saponin (160 µl/Well) für 15 Minuten lichtgeschützt permeabilisiert und zweimal gewaschen werden. Um unspezifische Bindestellen zu reduzieren, folgte die Inkubation mit 160 µl 5% BSA pro Well für 30 Minuten lichtgeschützt mit anschließender Waschung.

Im nächsten Schritt konnten die Antikörper gemäß der in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen hinzugegeben und die Zellen für 1 Stunde lichtgeschützt inkubiert werden. Vor der Zugabe von DAPI (300 nM) inklusive dreiminütiger, lichtgeschützter

Inkubation, folgte eine dreimalige Waschung. Abschließend wurden die Zellen erneut gewaschen, pro Objektträger 2 Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium hinzugegeben und mit einem Deckglas bedeckt.

Die Mikroskopie wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M durchgeführt. Hierzu wurde ein repräsentativer Bereich ausgewählt, ein Bild angefertigt und mit der AxioVison Software unter Zuhilfenahme der *best-fit* Einstellung nachbearbeitet. Zu vergleichende Bilder wurden immer mit der identischen Belichtungsintensität und –dauer angefertigt. Mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ gelang eine semi-quantitative Auswertung der aufgenommenen Bilder, wie von Caster und Kahn beschrieben (Caster und Kahn 2012).

2.2.6 Quantitative reverse-Transkriptase-RT-PCR

2.2.6.1 RNA-Isolation

Die Proben lagerten wie oben beschrieben in RLT-Puffer bei -20°C und wurden auf Eis aufgetaut. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Kit streng nach dem Protokoll des Herstellers. Die anschließende Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm. Mit Hilfe der Absorptionskoeffizienten A260/A280 und A260/A230 wurde die Reinheit der RNA beurteilt.

2.2.6.2 Reverse Transkription

Zur Durchführung der reversen Transkription (nach Protokoll des Herstellers) wurde die isolierte RNA mit RNase freiem Wasser auf 3000 ng/12 µl eingestellt. Durch Zugabe von 2 µl gDNA Whipeout Buffer pro Probe (2 Minuten bei 42°C) gelang ein DNA-Verdau. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 6 µl RT-Mix pro Probe sowie die Inkubation für 15 Minuten bei 42°C und 3 Minuten bei 95°C.

Die synthetisierte cDNA wurde zum Schluss mit 40 µl RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 60 µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.6.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Durchführung der PCR ermöglichte eine Analyse der Genexpression. Grundlage hierfür war die aus der reversen Transkription entstandene cDNA. Für die Durchführung wurde eine Lösung aus 1 µl der cDNA und 9 µl des PCR-Mastermix pro Well hergestellt, welche anschließend in Triplikaten auf eine 384 Well Platte aufgetragen

wurde. Die Platte zentrifugierte lichtgeschützt für 3 Minuten. Die qRT-PCR begann mit der Denaturierung bei 95°C für 8 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen der Amplifikation (1 Sekunde bei 95°C, 15 Sekunden bei 64°C und 20 Sekunden bei 72°C). Das Produkt wurde abschließend auf 4°C gekühlt. Die delta delta-Ct Methode diente zur Bestimmung der relativen Expression (RE). Dazu wurde die Expression der Zielgene zur Referenzgenexpression (GADPH) normalisiert und behandelte Proben in Relation zu unbehandelten gesetzt (Schmittgen und Livak 2008).

$$RE = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{unbehandelt}} (\text{Zielgen-Referenzgen}) - \Delta Ct_{\text{behandelt}} (\text{Zielgen-Referenzgen}))}$$

2.2.7 Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit

Mit Hilfe eines *Proteome Profiler Assays* gelang die zeitgleiche Untersuchung einer möglichen Regulation Apoptose-assoziiierter Proteine. Grundlage dieser Methode stellen die an eine Membran gebundene *Capture-* und *Kontroll-Antikörper* dar. Die Membran wurde über Nacht mit ausgewählten Proben inkubiert und gebundene Proteine konnten am nächsten Tag detektiert und densitometrisch ausgewertet werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Ein möglicher Einfluss der bakteriellen Stimulation auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen sollte mittels einer Durchflusszytometrie untersucht werden. Dazu wurden Caco-2 Zellen ($2,5 \cdot 10^6$ Zellen) in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und für 6 bzw. 15 Tage kultiviert. Es folgte die Koinkubation mit einer MOI 5 von *K. pneumoniae* für 4 Stunden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA (1x) für mehrere Minuten inkubiert und die Proteolyse mit dem vorher abgesaugten Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei 4°C und 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml PBS (1x) resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 400 x g). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 70% gekühltem Ethanol fixiert und in einem Eppendorfgefäß bei -20°C gelagert.

Für die DAPI Färbung zentrifugierte das Pellet zunächst (5 Minuten, 4°C, 400 x g), wurde nach Verwerfen des Überstands mit PBS (1x) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl PS (1x) unter Zugabe von 50 µl RNase (1mg/ml) gelöst. Der RNA-Verdau erfolgte durch Inkubation

für 15 Minuten bei 37°C. Danach zentrifugierte die Zellsuspension erneut für 5 Minuten bei 4°C und 400 x g bevor der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 450 µl PBS (1x) und 50 µl DAPI (30 µM) resuspendiert wurde. Abschließend wurde die Zellsuspension unter Verwendung eines Siebes (40 µm Porengröße) in die Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und lichtgeschützt bis zur Messung aufbewahrt.

Aus den gewonnenen Daten wurde der Zell-Zyklus mit Hilfe der Flowlogic Software und des Batty-Algorithmus analysiert.

2.2.9 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mittels Microsoft Excel 2013 durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichen (SD) gebildet. Die statistische Signifikanz wurde, bei einem definierten Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$, mit Hilfe des Welch's t-test überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der p53 Signaltransduktion

Um einen möglichen Einfluss von *K. pneumoniae* auf die Regulation der p53-Familie zu untersuchen, wurden HCT-116 Zellen nach dreitägigem Wachstum über einen Zeitraum von 30 Minuten, 1 oder 2 Stunden mit *K. pneumoniae* in verschiedenen MOIs (0/0,1/1/5) inkubiert. Hitzeinaktivierte Bakterien dienten als zusätzliche Kontrolle. Aus den koinkubierten Zellen wurden Lysate für Western Blot und qPCR gewonnen (Abb. 8).

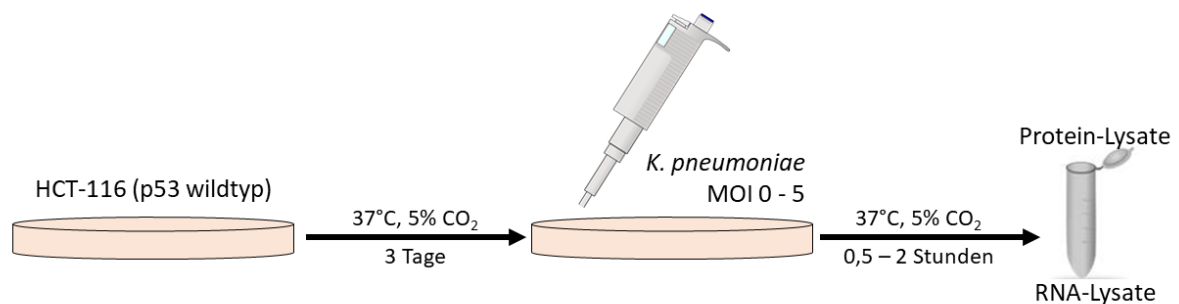


Abbildung 8. Versuchsaufbau zur Analyse der p53-Regulation in HCT-116 Zellen. HCT-116 Zellen (p53 wildtyp) wurden für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und anschließend mit *K. pneumoniae* in unterschiedlicher MOI (0/0,1/1/5) sowie hitzeinaktivierten Bakterien für definierte Zeiten (30 min, 1 h oder 2 h) infiziert. Anschließend wurden Protein- und RNA-Lysate gewonnen.

3.1.1 *K. pneumoniae* aktiviert die Expression von TP53

Nach 30-minütiger Koinkubation der HCT-116 Zellen mit *K. pneumoniae* zeigte sich in Abhängigkeit der MOI eine Regulation der TP53-Expression (Abb. 9). Eine Stimulation mit MOI 0,1 führte zu keinem Effekt, wohingegen eine höhere Bakterienkonzentration von MOI 1 fast zu einer Verdoppelung (MW=1,9, SD=0,6) und von MOI 5 zu einer Verdreifachung (MW=3,4, SD=0,5) der TP53-Expression führte. Die Transkriptmengen nivellierten sich im zeitlichen Verlauf vielmehr. Die HI-Kontrolle wirkte sich nicht auf die TP53 Expression aus.

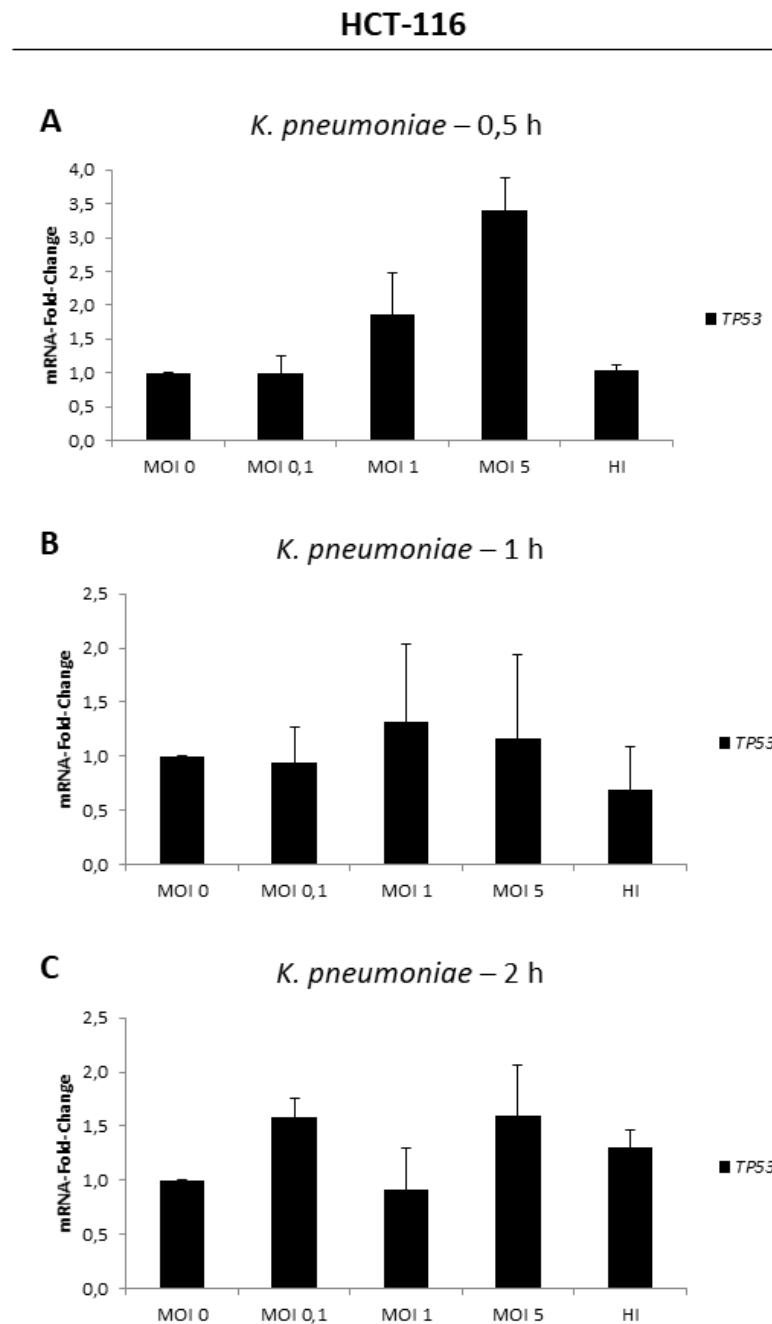


Abbildung 9. *TP53*-Expression in HCT-116 Zellen nach bakterieller Stimulation. Relative *TP53*-mRNA Spiegel nach bakterieller Stimulation mit *K. pneumoniae* in diversen MOIs für 30 min (A), 1 h (B) und 2 h (C). Die Normierung erfolgte relativ zu GAPDH.

(A) Nach 30 min Koinkubation stieg die relative mRNA Menge bei MOI 1 um 90% (MW:1,9, SD:0,6), bei MOI 5 war sie mehr als verdreifacht (MW:3,4, SD:0,5). Diese Effekte waren nach längerer Inkubationsdauer nicht mehr zu beobachten. n=3 für MOI 0/0,1/1, n=2 für MOI 5.

(B)/(C) Nach 1 h und 2 h der Stimulation zeigte sich keine eindeutige *TP53* Regulation. Hitzeinaktivierte Bakterien zeigten weder nach 30 min, noch im zeitlichen Verlauf eine Regulation von *TP53* mit einem maximalen Anstieg nach 2 h bei einer MOI 5 um 30% (MW: 1,3, SD: 0,2). n=4.

3.1.2 *K. pneumoniae* induziert die p53-Proteinproduktion zu einem frühen Zeitpunkt

Mittels Western Blot Analysen wurde im nächsten Schritt eine mögliche Regulation von p53 auf Proteinebene untersucht. Bereits nach 30-minütiger Koinkubation zeigte sich im Western Blot ein verstärktes Signal von p53. Dieser regulatorische Effekt war ab einer MOI von 1 zu beobachten und nahm mit steigender MOI zu – er war bei einer MOI 1 schwächer ausgeprägt als bei einer MOI von 5. Zu späteren Zeitpunkten (1 und 2 Stunden) zeigte sich kein eindeutiger Effekt auf den p53-Proteinspiegel durch die bakterielle Stimulation (Abb. 10 A). Hitzeinaktivierte *K. pneumoniae* hatten hingegen zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die Regulation von p53 (Abb. 10 B).

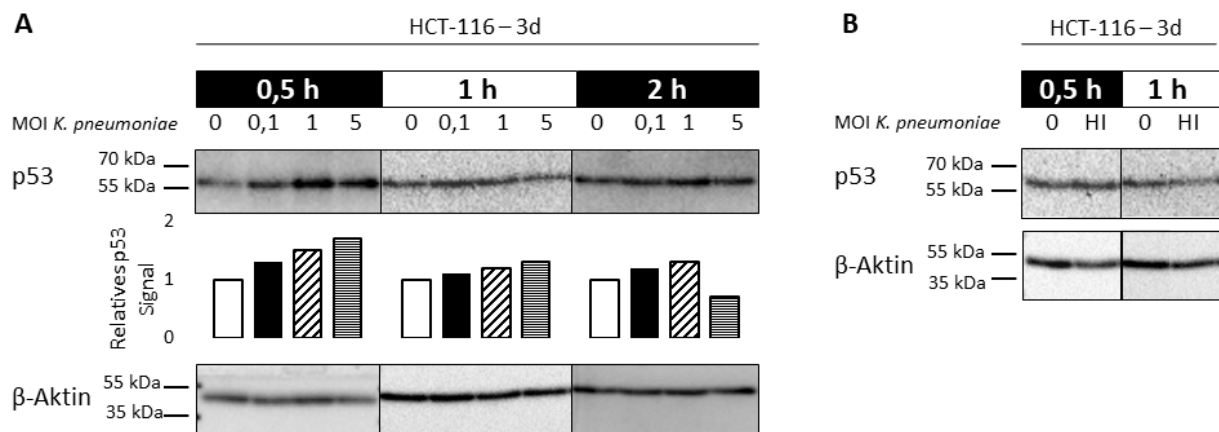


Abbildung 10. p53-Proteinspiegel in HCT-116 Zellen in Gegenwart von *K. pneumoniae*. **(A)** Western Blot von HCT-116 Zellen nach bakterieller Stimulation für 0,5 h - 2 h mit diversen MOIs (0/0,1/1/5) von *K. pneumoniae*. Untersucht wurde die Proteinmenge von p53. Dabei zeigte sich nach 30 min Stimulation durch MOI 1 und MOI 5 eine verstärkte p53-Induktion. Zu späteren Zeitpunkten oder durch eine kleinere MOI von 0,1 war eine p53-Regulation nicht nachzuweisen. Die densitometrische Auswertung des abgebildeten Western Blots ist unter den jeweiligen Banden angegeben. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Daten sind repräsentativ für eines von 3 unabhängigen Experimenten.

(B) Western Blot von HCT-116 Zellen nach 30 min und 1 h unbehandelt (MOI 0) bzw. nach bakterieller Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien. Hitzeinaktivierte Bakterien hatten keinen Einfluss auf die Regulation von p53. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Daten sind repräsentativ für eines von 2 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Die Stimulation mit *K. pneumoniae* führt zur Zunahme Apoptose-assoziierter Proteine

Da die gezeigte frühzeitige Induktion von p53 durch bakterielle Stimulation möglicherweise Apoptose induziert, sollten im nächsten Schritt Apoptose-assozierte Proteine untersucht werden. Da eine Multiplizität der Infektion von 5 als stärkster Stimulus identifiziert wurde, wurden nun Proben mit MOI 5 nach 30 Minuten und 1 Stunde mit Hilfe eines Proteome Profiler Human Apoptosis Array untersucht. Unbehandelte Zellen (MOI 0 für 30 Minuten) dienten dabei als Referenz.

Es ergaben sich Hinweise, dass eine Vielzahl von an der Apoptose beteiligten Proteinen, durch eine Stimulation mit *K. pneumoniae* reguliert werden (Abb. 11).

Als Ausdruck des zellulären Stresses war eine vermehrte Expression der Hämoxygenase-1 (HMOX-1) und Hämoxygenase-2 (HMOX-2) zu beobachten (Waza et al. 2018; Muñoz-Sánchez und Chánez-Cárdenas 2014). Weiterhin bestand eine verstärkte Phosphorylierung des Zellzyklus-Checkpoint Proteins Rad17 sowie von p53 als mögliches Zeichen eines DNA-Schadens (Post et al. 2001; Shieh et al. 1997).

Ebenfalls war eine vermehrte Bildung von p21 zu detektieren. Dieser Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen ist in der Lage, das Voranschreiten des Zellzyklus zu stoppen und darüber hinaus eine Zielstruktur von p53 (Abbas und Dutta 2009).

Weitere, allesamt pro-apoptotisch wirkende Proteine wie Bad (bindet Bcl-2), Bax (löst Mitose Arrest aus bzw. leitet die Apoptose ein), pro-Caspase-3 (Protease), CD95, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Vermittlung der Apoptose) waren nach bakterieller Infektion ebenfalls vermehrt zu detektieren (Abb. 11) (Müller et al. 1997; Müller et al. 1998; Karstedt et al. 2017; Voss und Strasser 2020). Am stärksten war diese Regulation nach 30 Minuten. Nach 1 Stunde Infektion sanken die jeweiligen Proteinspiegel wieder ab, teils unter das Ausgangsniveau.

Die Hämoxygenas-1 und -2 waren nach 30-minütiger Stimulation 5-, bzw. 6-fach erhöht, wobei der Spiegel nach 1-stündiger Stimulation für HMOX-1 nur noch 3-fach und für die HOMX-2 nur noch 3-fach so hoch war im Vergleich mit der Kontrolle. Nach 30-minütiger Koinkubation war ein deutlicher Anstieg von phospho-RAD17 (S635) mit einer 44-fachen Steigerung zu beobachten (Abb. 12). Ein phospho-RAD17 Signal war nach 1-Stündiger Koinkubation nicht zu detektieren.

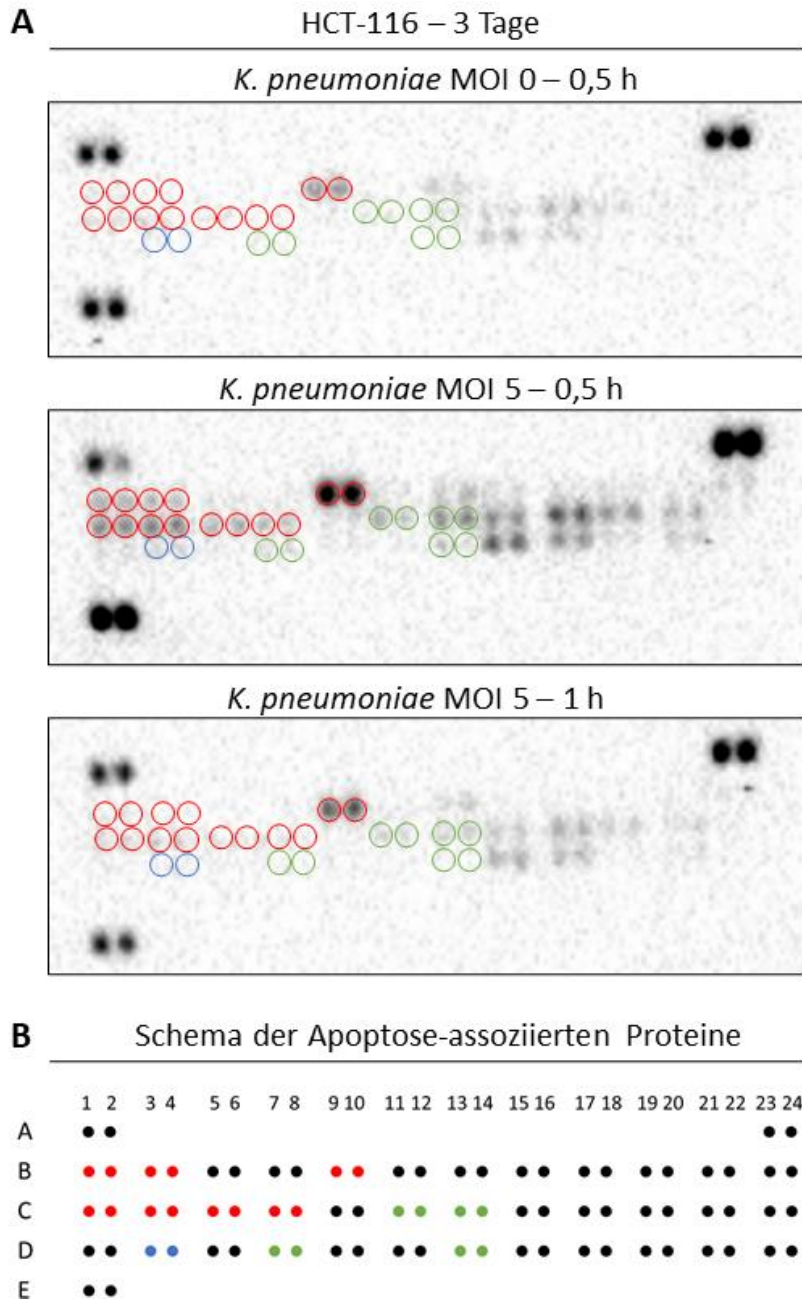
Weiterhin ließ sich ein vermehrtes Signal von phospho-p53 (S15) beobachten. Nach 30 Minuten verdoppelte sich das Signal, um nach 1-stündiger Inkubation unter den Ausgangswert der Kontrolle zu fallen (0,4-fach).

Auch bei p21 war nach einer 30-minütigen Infektion der Zellen ein deutlicher Anstieg (3-fach) zu verzeichnen. Nach einer 1-stündigen Stimulation fiel das p21-Level unter das Ausgangsniveau der Kontrolle (0,3-fach).

Ähnlich verhielt es sich mit den pro-apoptischen Proteinen (Abb. 12). Nach 30-minütiger Stimulation kam es zu einem deutlichen Anstieg von CD95 (14-fach), Bad (7-fach), Bax (6-fach), Pro-Caspase-3 (3,1-fach), TRAIL-R1 (3,6-fach) sowie TRAIL-R2 (4,2-fach). Auch hier war der Anstieg nach 1-stündiger Inkubation deutlich weniger ausgeprägt (CD95 6-fach, Bad 2fach, Pro-Caspase-3 2-fach, TRAIL-R2 1,4-fach), bzw. fiel sogar unter den Ausgangswert der Kontrolle (TRAIL-R1 0,9-fach, Bax 0,2-fach)

Zusammenfassend kommt es zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion zu zellulärem Stress, erkennbar an einem Anstieg der HMOX-1, HMOX-2 sowie von phospho-RAD17 (S635) und phospho-p53 (S15).

Auch p21, welches die Einleitung eines Zellzyklusarrests in Folge von DNA-Schäden vermitteln kann, wird nach 30-Minuten vermehrt gebildet. Insgesamt war eine vermehrte Bildung diverser Proteine, die allesamt pro-apoptisch wirken können und somit eine erhöhte Empfindlichkeit der Zelle gegenüber der Einleitung einer Apoptose zur Folge haben, zu verzeichnen. Hierzu zählten allen voran Bad, Bax, Pro-Caspase-3, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2.



	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10	11/12	13/14	15/16	17/18	19/20	21/22	23/24
A	Reference											Reference
B	Bad	Bax	Bcl-2	Bcl-x	Pro-Caspase-3	Cleaved Caspase-3	Catalase	cIAP-1	cIAP-2	Claspin	Clusterin	cytochrome C
C	TRAIL R1/CR4	TRAIL R2/DR5	FADD	Fas/CD95	HIF-1a	HO-1/HMOX1/HSP32	HO-2/HMOX2	HSP27	HSP60	HSP70	HTRA2/Omi	Livin
D	PON2	p21/CIP1/CDKN1A	p27/Kip1	Phospho-p53(S15)	Phospho-p53(S45)	Phospho-p53(S392)	Phospho-Rad17(S635)	SMAC/Diablo	Survivin	TNF R1/TNFRSF1A	XIAP	PBS
E	Reference											

Abbildung 11. Proteom Profiling Assay auf Apoptose-assoziierte Proteine in HCT-116 Zellen nach *K. pneumoniae* Stimulation. HCT-116 Zellen wurden 30 min und 1 h mit *K. pneumoniae* in einer MOI von 5 koinkubiert. Als Referenz dienten unbehandelten Zellen nach 30 min. Aus den Zelllysaten erfolgte mittels eines Proteom Profiling Assays die Analyse Apoptose-assoziiierter Proteine. (A) Western Blot der Untersuchten Proteine. (B) Beladungsschema des Assays. Rot = Proteine die in Zusammenhang mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Apoptose stehen. Grün = Protein in Zusammenhang mit zellulärem Stress. Blau = Proteine im Zusammenhang mit Zellzyklusarrest

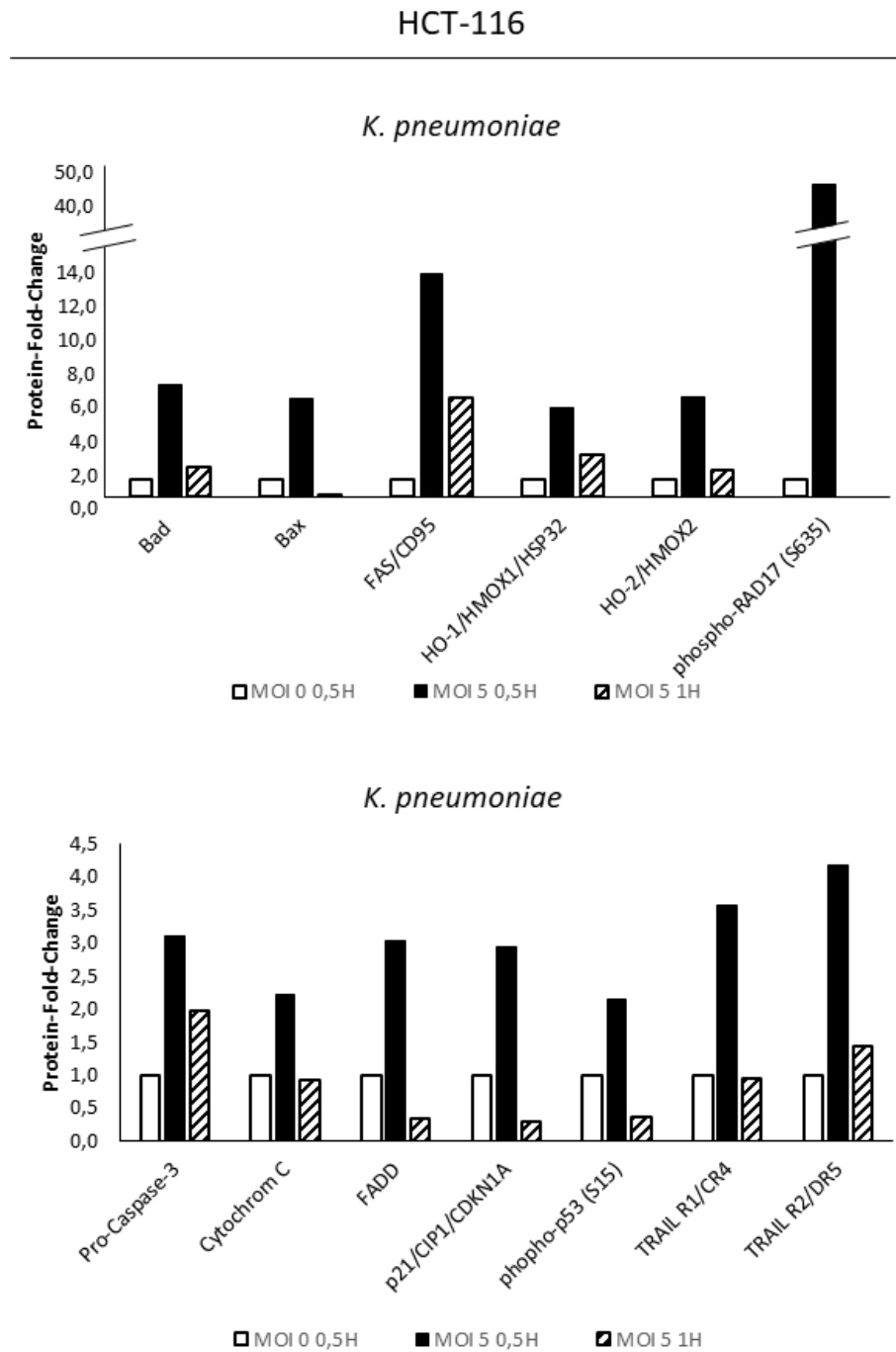


Abbildung 12. Induktion Apoptose-assoziiierter Proteine in HCT-116 Zellen nach *K. pneumoniae* Stimulation. HCT-116 Zellen wurden 30 min und 1 h mit *K. pneumoniae* in einer MOI von 5 kokubiert. Als Referenz dienten die unbehandelten Zellen nach 30 min. Eine deutliche Regulation ($\geq 5x$ der Referenz) zeigte sich bereits nach 30 min bei den Apoptose-assoziierten Proteinen Bad, Bax, CD95, HO-1, HO-2. Der stärkste Anstieg mit einer ca. 44-fachen Steigerung war bei phospho-RAD17 (S635) zu beobachten.

Die Menge an Pro-Caspase-3, FADD, p21, TRAIL R1, TRAIL R2 und phospho-p53 (S15) hatte sich nach 30 min Stimulation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mindestens verdoppelt. Nach 1 h war die Proteinmenge der genannten Proteine wieder gesunken, teils unter das Ausgangsniveau der unbehandelten Kontrollen. n=1.

3.2 Caco-2 – ein adäquates Modell für die Analyse der Regulation von Zell-Zell-Kontakten

Neben dem Effekt von *K. pneumoniae* auf die p53-Familie sollte auch ein potenzieller Effekt auf die Zell-Zell-Kontakte untersucht werden. Dazu musste zunächst ein geeignetes Modell etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg elektronenmikroskopische Aufnahmen von Caco-2 und HCT-116 Zellen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer angefertigt und miteinander verglichen.

3.2.1 HCT-116 Zellen – mangelnde Polarisierung und breite Interzellularspalten

HCT-116 Zellen zeigten ein unstrukturiert wirkendes, mehrschichtiges Wachstum, eine mangelnde Polarisierung mit Ausbildung von nur wenigen Mikrovilli sowie deutlich weniger ausgeprägten TJ. Die Interzellularspalten waren dabei, verglichen mit Caco-2 Zellen, verbreitert. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die HCT-116 Zellen als Modell für Zell-Zell-Kontakte nicht verwendet (Abb. 12 und 13).

3.2.2 Caco-2 Zellen – ein adäquates Modell für die Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte

Wegen ihrer besseren Differenzierung und Polarisierung wurden Caco-2 Zellen als *in vitro* Modell für die Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte gewählt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich gegenüber den HCT-116 Zellen ein Monolayer-ähnliches Wachstum sowie eine deutlichere Polarisierung in basales und apikales Kompartiment (Abb. 12 und 13). Der apikale Zellpol zeigte Mikrovilli, die mit zunehmender Dauer der Inkubation vermehrt aufzufinden waren. Die Anzahl und Ausprägung der Mikrovilli bei Caco-2 Zellen war zu jedem untersuchten Zeitpunkt stärker ausgeprägt als bei HCT-116 Zellen.

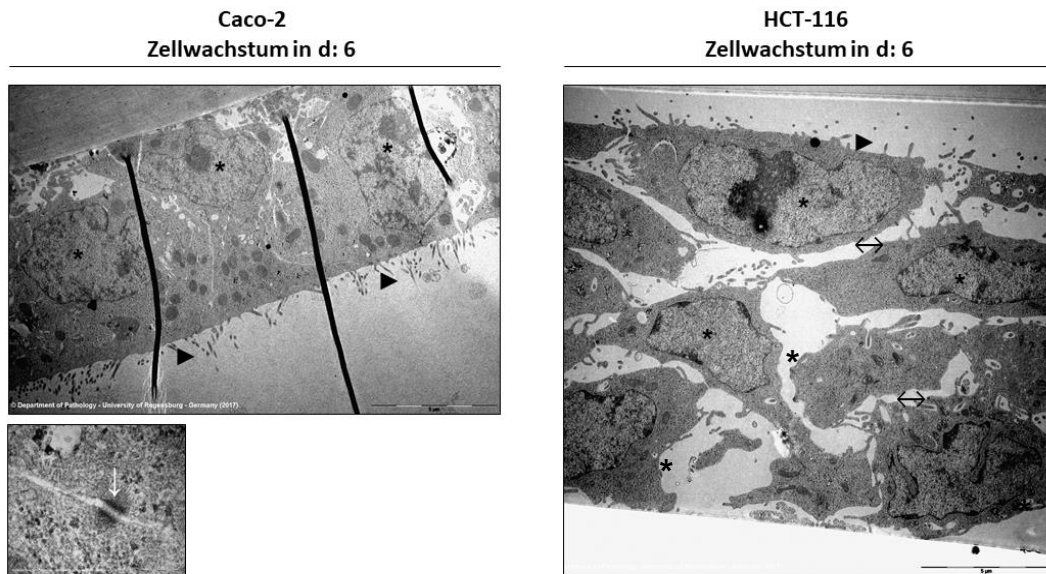


Abbildung 13. Elektronenmikroskopie von Caco-2 Zellen und HCT-116 Zellen nach 6-tägiger Kultivierung. Caco-2 Zellen zeigen ein Wachstum in einem Monolayer mit eher kubisch bis hochprismatischen Zellen. Der Zellverband liegt polarisiert vor und bildet Mikrovilli (▶) aus. Zell-Zell-Kontakte sind deutlich erkennbar (▮). Der Zellverband der HCT-116 Zellen imponiert mehrschichtig mit breiten Interzellularräumen (↔). Die Polarisation zeigt sich abgeschwächt in der ersten Zellreihe, allgemein wirken die gebildeten Mikrovilli verkürzt. * = Zellkern.

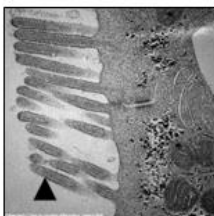
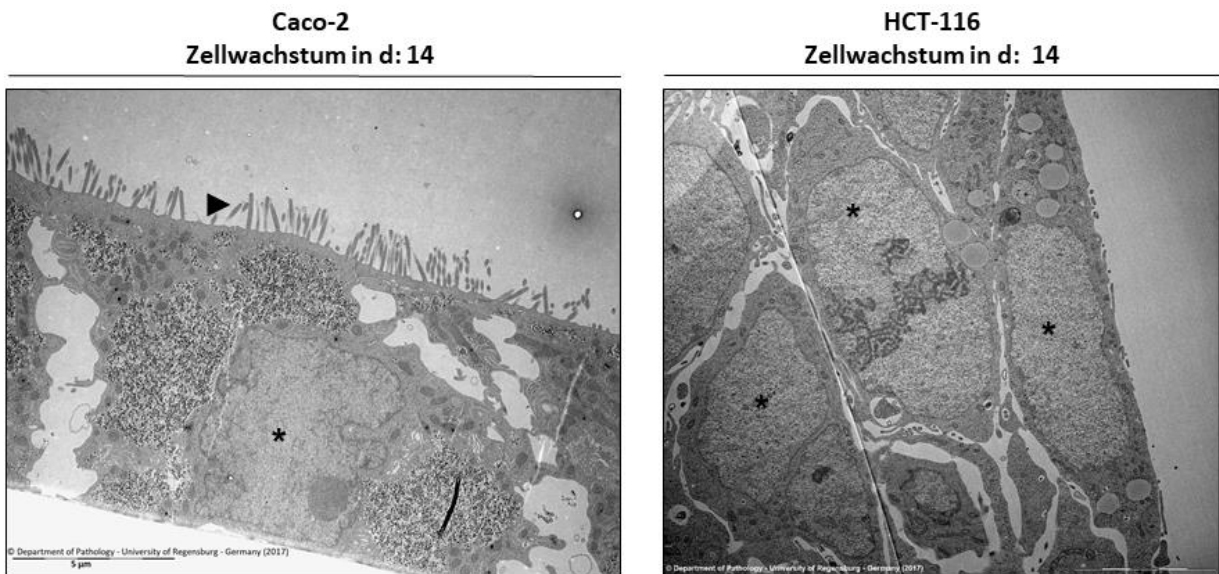


Abbildung 13. Elektronenmikroskopie von Caco-2 Zellen und HCT-116 Zellen nach 14-tägiger Kultivierungsdauer. Die Architektur beider Zelllinien bleibt im Wesentlichen unverändert. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Zellen zeigt sich eine verstärkte Bildung der Mikrovilli (▶) bei den Caco-2 Zellen. Caco-2 Zellen zeigen größere Abstände zwischen den Zellen, im Allgemeinen ist der Interzellularraum schmäler als bei HCT-116 Zellen. * = Zellkern.

Durch Western Blot Analysen sollte ein geeigneter Zeitpunkt für die Durchführung der Koinkubations-Experimente identifiziert werden. Dieser Zeitpunkt sollte sich dadurch definieren, dass Zell-Zell-Kontakt Proteine wie Occludin und Claudine ausreichend vorhanden waren und die Zellen polarisierten. Hierzu wurden Caco-2 Zellen 1, 6, 7, 14 und 21 Tage kultiviert und daraufhin der Proteinspiegel diverser Zell-Zell-Kontakt Proteine (E-Cadherin, Occludin, Claudin 1 und Claudin 2) untersucht (Abb. 14). Als Marker für eine zunehmende Polarisation diente das bürstensaum-assoziierte Protein Villin. Es zeigte sich eine stetige Zunahme aller Zell-Zell-Kontakt Proteine und des Villins. Bereits ab Tag 6 wurden alle untersuchten Proteine gebildet. Zwischen Tag 6 und 7 sowie Tag 14 und 21 zeigten sich nur marginale Unterschiede. Ein deutlich gesteigerter Spiegel von Villin und Claudin 1 zeigte sich im Vergleich von Tag 7 und 14. Somit wurden die Experimente nach 6- und 15-tägigem Wachstum durchgeführt.

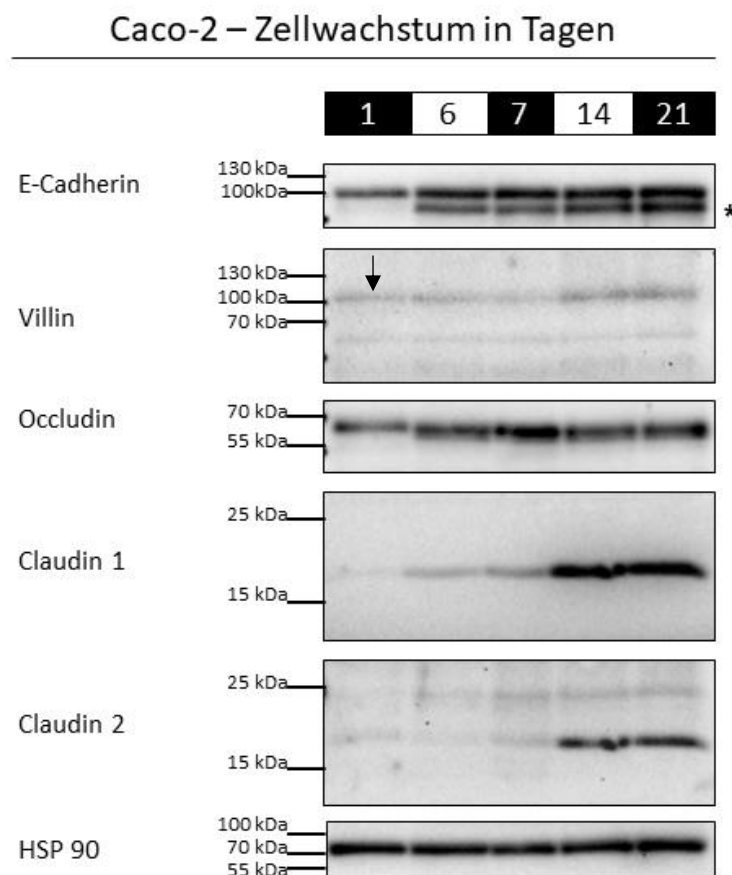


Abbildung 14. Proteinausstattung und Polarisation von Caco-2 Zellen im zeitlichen Verlauf. Alle untersuchten Proteine (E-Cadherin, Villin (↓), Occludin, Claudin 1 und Claudin 2) wurden mit zunehmender Kultivierungsdauer vermehrt gebildet. Dabei waren die Unterschiede zwischen Tag 6 und 7 sowie Tag 14 und 21 gering, zwischen Tag 7 und 14 insbesondere bei Villin, Claudin 1 und Claudin 2 deutlicher. HSP 90 diente als Ladekontrolle. n=1.

*= Unspezifische Bande, wahrscheinlich Spaltprodukt von E-Cadherin

3.3 Regulation der Zell-Zell-Kontakte von Caco-2 Zellen

Um einen möglichen regulatorischen Einfluss von *K. pneumoniae* auf die Zell-Zell-Kontakte von Caco-2 Zellen zu untersuchen, wurden diese für 6 bzw. 15 Tage kultiviert und anschließend für einen Zeitraum von 4 Stunden mit *K. pneumoniae* infiziert. Neben Protein- und RNA-Lysaten wurden auch Proben für eine immunhistochemische Färbung gewonnen (Abb. 15).

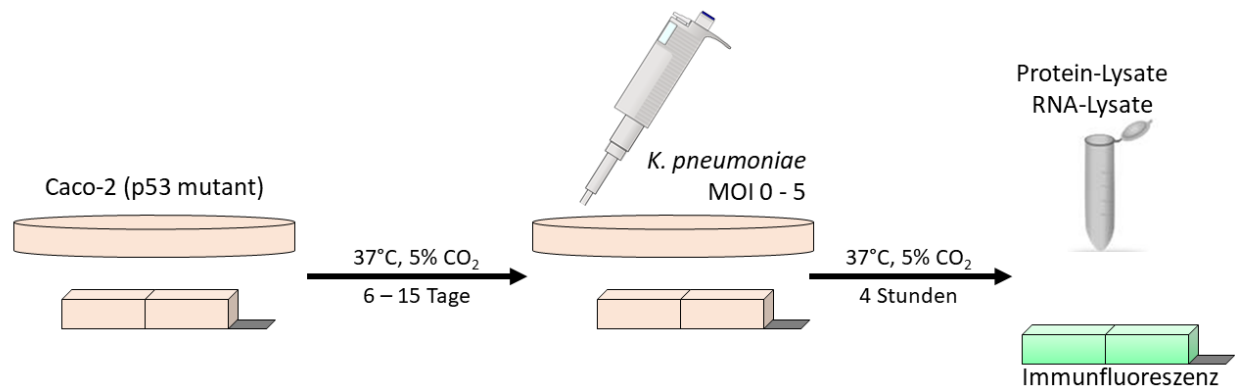


Abbildung 15. Versuchsaufbau zur Analyse der Regulation von Zell-Zell-Kontakten in Caco-2 Zellen. Caco-2 Zellen (p53 mutant) wurden für 6 – 15 Tage (bei 37°C, 5% CO₂) in Zellkulturschalen oder Chamber-Slides kultiviert und mit *K. pneumoniae* in unterschiedlicher MOI (0, 1, 5) sowie hitzeinaktivierten Bakterien für 4 h stimuliert. Im Anschluss wurden Protein- und RNA-Lysate sowie Objektträger mit fixierten Zellen für eine immunhistochemische Färbung gewonnen.

3.3.1 *K. pneumoniae* hat keinen eindeutigen Effekt auf die Regulation der Occludin oder E-Cadherin mRNA

Die 6 Tage kultivierten Zellen zeigten nach bakterieller Stimulation mit *K. pneumoniae* mit MOI 1 und MOI 5 keine klare Regulation der E-Cadherin oder Occludin mRNA. Auch die hitzeinaktivierten Bakterien führten zu keiner Regulation dieser beiden mRNAs (Abb. 16 A).

Die 15 Tage kultivierten Zellen zeigten einen leichten Anstieg der E-Cadherin mRNA nach bakterieller Stimulation mit MOI 1 und MOI 5 und den hitzeinaktivierten Bakterien, wohingegen die Occludin mRNA keiner Regulation unterlag (Abb. 16 B).

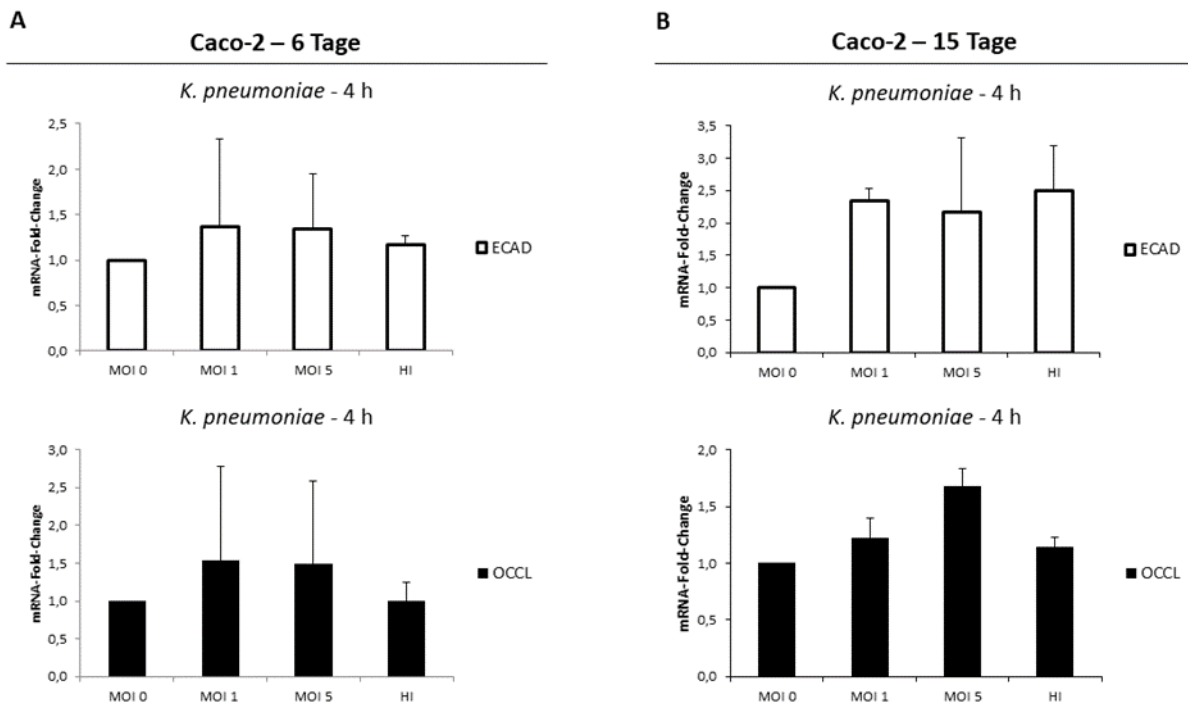


Abbildung 16. mRNA Spiegel von E-Cadherin und Occludin nach Stimulation von Caco-2 Zellen mit *K. pneumoniae*. Relative mRNA Spiegel von E-Cadherin (ECAD, oben) oder Occludin (OCCL, unten) nach 4-stündiger bakterieller Stimulation von Caco-2 Zellen. Hitzeinaktivierte Bakterien dienten als Kontrolle. Die Normierung erfolgte relativ zu GAPDH.

(A) Nach 6-tägiger Kultivierungsdauer war keine eindeutige Regulation von E-Cadherin oder Occludin durch die bakterielle Stimulation zu beobachten. Der stärkste Effekt mit einer Steigerung von ca. 50% war bei MOI 1 zu beobachten (E-Cadherin: MW: 1,4, SD: 1,0; Occludin: MW: 1,5, SD:1,2). n=2.

(B) Nach 15-tägiger Kultivierungsdauer zeichnete sich eine Verdopplung der E-Cadherin mRNA nach Stimulation mit MOI 1 (MW: 2,3, SD: 0,2), MOI 5 (MW: 2,2, SD: 1,2) und hitzeinaktivierten Bakterien (MW: 2,5, SD: 0,7) ab. Ein eindeutiger bakterieller Effekt auf die Regulation der Occludin mRNA war hingegen nicht erkennbar. Der stärkste Effekt trat hier nach Koinkubation mit MOI 5 (MW: 1,7, SD: 0,1) auf. n=2.

3.3.2 Zell-Zell-Kontakt-Komponenten werden durch *K. pneumoniae* reguliert

Nach vierstündiger Koinkubation der 6-tägig kultivierten Zellen zeigten sich im Western Blot reduzierte Occludin, Claudin 1 und Claudin 4 Proteinspiegel (Abb. 17 A). Mit steigender MOI stieg auch die Intensität der Regulation an. Die E-Cadherin Level blieben nach bakterieller Stimulation konstant.

Auch Caco-2 Zellen nach 15-tägigem Wachstum zeigten im Rahmen der Infektion in Abhängigkeit der MOI verminderte Occludin, Claudin 1 und Claudin 4 sowie jederzeit konstante E-Cadherin Proteinlevel. Hitzeinaktivierte Bakterien hatten zu keinem Zeitpunkt einen regulatorischen Einfluss (Abb. 17 B).

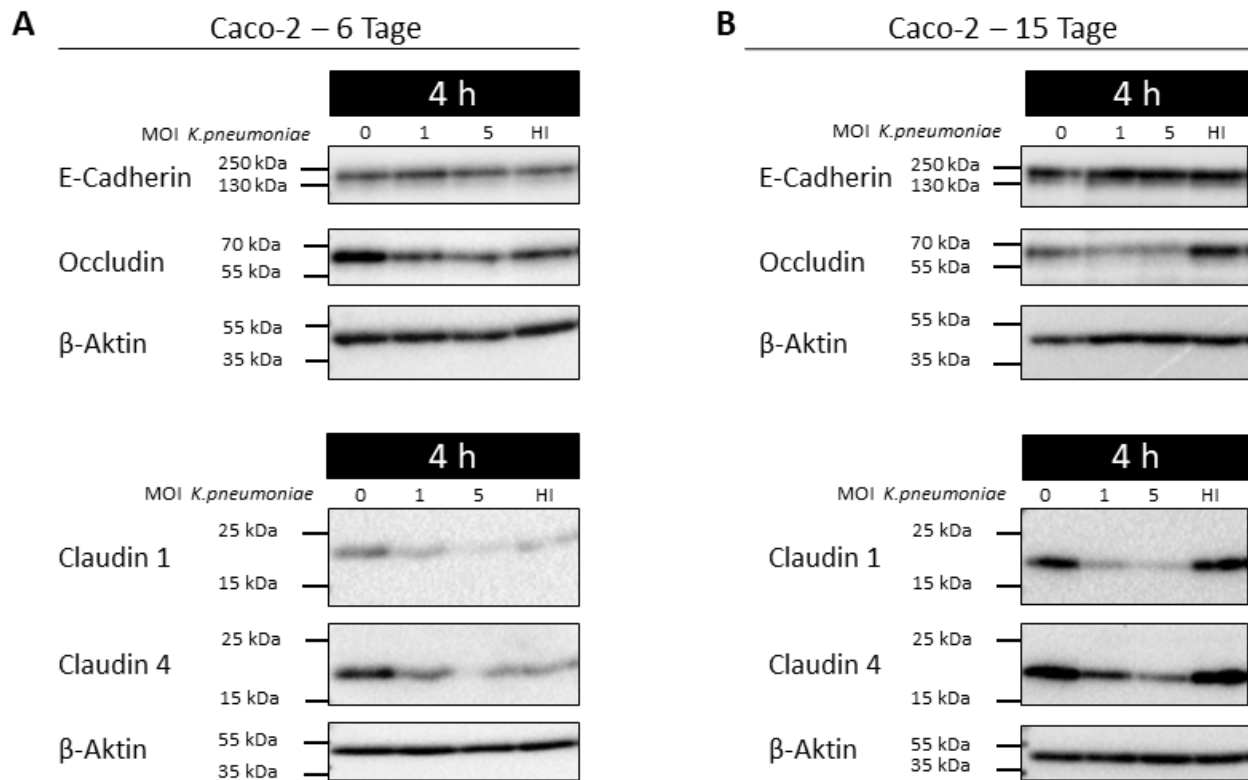


Abbildung 17. Regulation von Zell-Zell-Kontakt Proteinen in Caco-2 Zellen während der *K. pneumoniae* Infektion. Western Blot von Caco-2 Zellen nach 6-tägigem **(A)** oder 15-tägigem **(B)** Wachstum und Stimulation für 4 h mit *K. pneumoniae* in unterschiedlicher MOI (0, 1, 5) und hitzeinaktivierten Bakterien. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

(A) Nach 6-tägiger Kultivierungsdauer der Zellen führte die bakterielle Stimulation in Abhängigkeit der MOI zur Reduktion von Occludin, Claudin 1 und Claudin 4. Hitzeinaktivierte Bakterien zeigten keinen regulatorischen Effekt. Ebenso beeinflusste *K. pneumoniae* den E-Cadherin Proteinspiegel nicht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für eines von 2 unabhängigen Experimenten.

(B) Auch die 4-stündige Koinkubation der 15-tägig kultivierten Caco-2 Zellen führte in Abhängigkeit der MOI zu einer verminderten Menge an Occludin, Claudin 1 und Claudin 4, wohingegen E-Cadherin nicht reguliert wurde. Kein Effekt wurde bei den hitzeinaktivierten Bakterien beobachtet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für eines von 3 unabhängigen Experimenten.

Die im Western Blot gezeigte Regulation von Occludin ließ sich auch immunhistochemisch bestätigen und visualisieren (Abb. 18). Die 6 bzw. 15 Tage kultivierten Zellen wurden hierbei analog zu den Zellen für Protein- und RNA-Lysate über 4 Stunden mit *K. pneumoniae* stimuliert und Occludin anschließend mittels Immunfluoreszenz-Antikörper markiert. Insgesamt bestand nach bakterieller Stimulation ein reduziertes Fluoreszenzsignal sowie ein inhomogeneres Verteilungsmuster. Dies war nach 15-tägiger Kultivierungsdauer ausgeprägter.

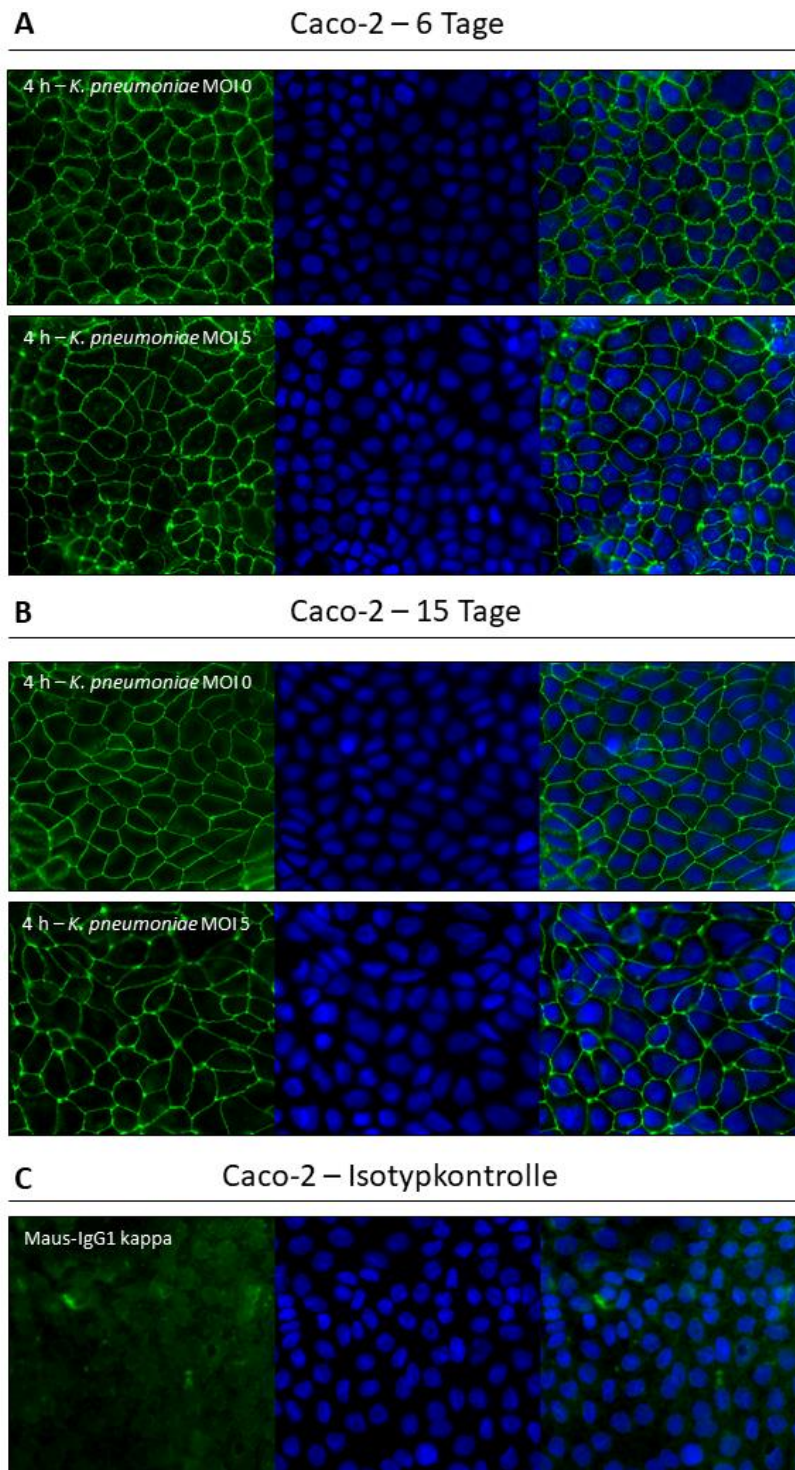


Abbildung 18. Immunhistochemische Darstellung der Regulation von Occludin in Caco-2 Zellen während der *K. pneumoniae* Infektion. Immunfluoreszenzmikroskopie von Caco-2 Zellen nach 6-tägigem **(A)** bzw. 15-tägigem **(B)** Wachstum. **(A) + (B)** Grün= Occludin, Blau= Zellkern. In der Kontrolle zeigt sich ein kräftiges, gleichmäßig verteiltes, ringförmiges Fluoreszenzsignal. Nach 4 h Stimulation mit *K. pneumoniae* ist bei den 6-tägig und 15-tägig kultivierten Zellen eine Reduktion des Signals, bei insgesamt inhomogenem Signal, erkennbar. Die Strukturierung des Occludingerüsts ist beeinträchtigt. Es bestehen schwach fluoreszierende Bereiche neben punktförmigen Akkumulationen. Bei den 15-tägig kultivierten Zellen ist der Effekt ausgeprägter. **(C)** Grün= unspezifisches Fluoreszenzsignal. Isotypkontrolle mit Maus-IgG1-kappa Antikörper, um unspezifische Bindungskapazität darzustellen. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für eines von 3 unabhängigen Experimenten.

Die bereits visuell sichtbare Occludin Regulation bestätigte sich in der semiquantitativen Auswertung. Das relative Fluoreszenz-Signal sank nach bakterieller Infektion bei den 6-tägig kultivierten Caco-2 Zellen signifikant um ca. 30% (Abb. 19 A) und bei den 15-tägig kultivierten Caco-2 Zellen um ca. 40% (Abb. 19 B), verglichen mit dem Signal der unbehandelten Zellen.

Insgesamt zeigte sich eine Reduktion des Occludin Spiegels auf Proteinebene ohne Hinweis auf eine mRNA-Regulation. Eine Reduktion von E-Cadherin konnte nicht beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung mit der beobachteten Reduktion von Occludin durch SPB verursachende Bakterien wie *Proteus mirabilis* oder *E. coli*, wobei hier auch eine Reduktion von E-Cadherin zu verzeichnen war (Haderer et al. 2021).

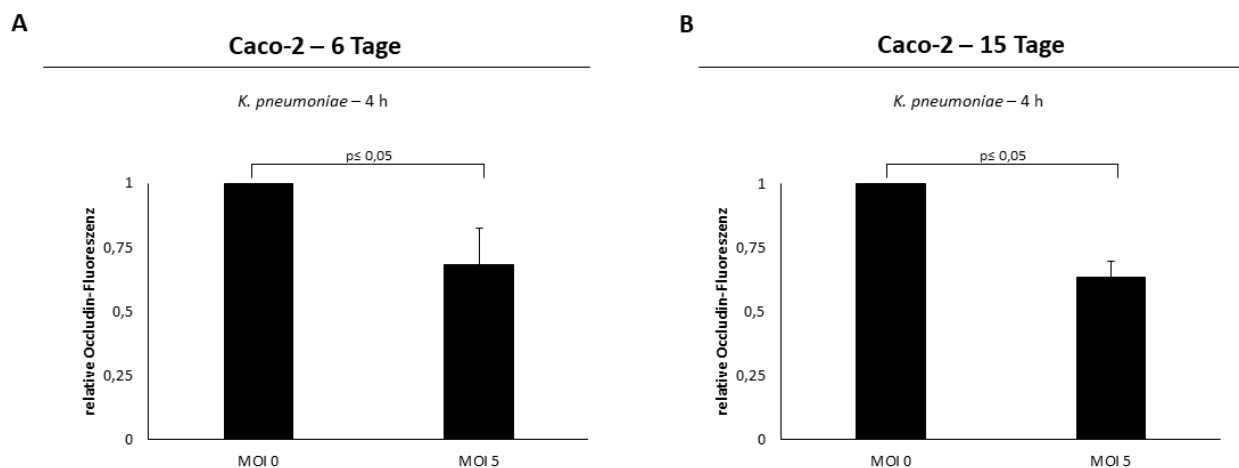


Abbildung 19. Relatives Occludin-Fluoreszenzsignal von Caco-2 Zellen im Rahmen der bakteriellen Stimulation mit *K. pneumoniae*. Darstellung der *corrected total cell fluorescence* von Occludin in Caco-2 Zellen nach 4-stündiger bakterieller Stimulation mit *K. pneumoniae* (MOI 5) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Stimuliert wurden 6- (**A**) und 15-tägig (**B**) kultivierte Zellen. Bei beiden Versuchszeitpunkten wurde eine statistisch signifikante Reduktion des Fluoreszenzsignals von Occludin beobachtet. Diese betrug bei den 6-tägig kultivierten Zellen ca. 30% (MW: 0,7, SD: 0,1, $p=0,033$) und bei den 15-tägig kultivierten Zellen ca. 40% (MW: 0,6, SD: 0,1, $p=0,014$). $n \geq 3$.

3.4 Bakterielle Stimulation beeinflusst den Zell-Zyklus

Abschließend sollte untersucht werden, ob die bakterielle Stimulation zu einer Beeinflussung des Zellzyklus führt. Hierzu wurden 6- und 15-tägig kultivierte Caco-2 Zellen mit einer MOI 5 von *K. pneumoniae* stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Referenz. Mittels Durchflusszytometrie wurde dazu der Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen bestimmt. Die Gates wurden dabei wie in Abb. 21 exemplarisch zu sehen gewählt. Sowohl bei den 6-, als auch bei den 15-tägig kultivierten Zellen zeigte sich eine Beeinflussung des Zell-Zyklus nach bakterieller Stimulation (Abb. 22). So fiel der Anteil apoptotischer Zellen bei den 6-tägig kultivierten Zellen von 13,0% nach Infektion auf 7,7% ab. Ähnliches zeigte sich bei den 15-tägig kultivierten Zellen (MOI 0: 27,4%, MOI 5: 9,7%). Weiterhin kam es zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1 Phase. Der Anteil von 6-tägig kultivierten Caco-2 Zellen in der G0/G1 Phase stieg nach Koinkubation von 24,7% auf 32,9%, der von 15-tägig kultivierten Caco-2 Zellen in der G0/G1 Phase von 27,2% auf 38,1%. Somit kann im Rahmen der bakteriellen Stimulation ein veränderter Zellzyklus, im Sinne einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1 Phase, beobachtet werden, sodass ein Voranschreiten im Zellzyklus verhindert wird. Ein ähnliches Muster war nach bakterieller Stimulation mit *E. coli* zu beobachten: es war eine Akkumulation von Zellen in der G0/G1 Phase zu verzeichnen (Haderer et al. 2021).

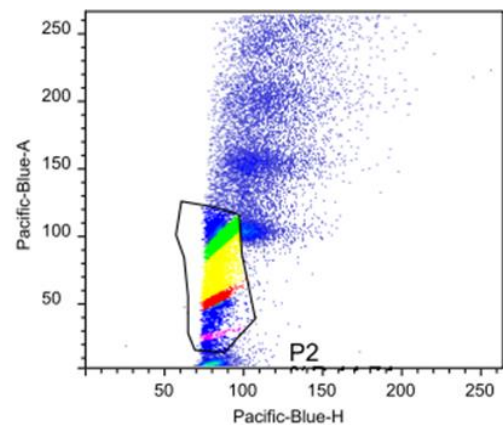


Abbildung 21. Gewählte Gates. P2 enthält alle zu analysierenden Caco-2 Zellen. Blau und Violett = Apoptose, Rot = G0/G1, Gelb = S-Phase, Grün = G2/M.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *K. pneumoniae* in der frühen Phase der Infektion eine transiente, zelluläre Stressantwort im Sinne einer p53 Akkumulation verursacht, wobei insgesamt eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber der Apoptose zu verzeichnen ist. In späteren Phasen der Infektion ist diese Stressantwort nicht mehr nachweisbar, möglicherweise aufgrund einer bakteriellen Gegenregulation. Weiterhin war eine Reduktion der tight junction Proteinen (Occludin, Claudin 1 und Claudin 4) sowie eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1 Phase zu beobachten, was insgesamt zu einer Destabilisierung der epithelialen Integrität führt.

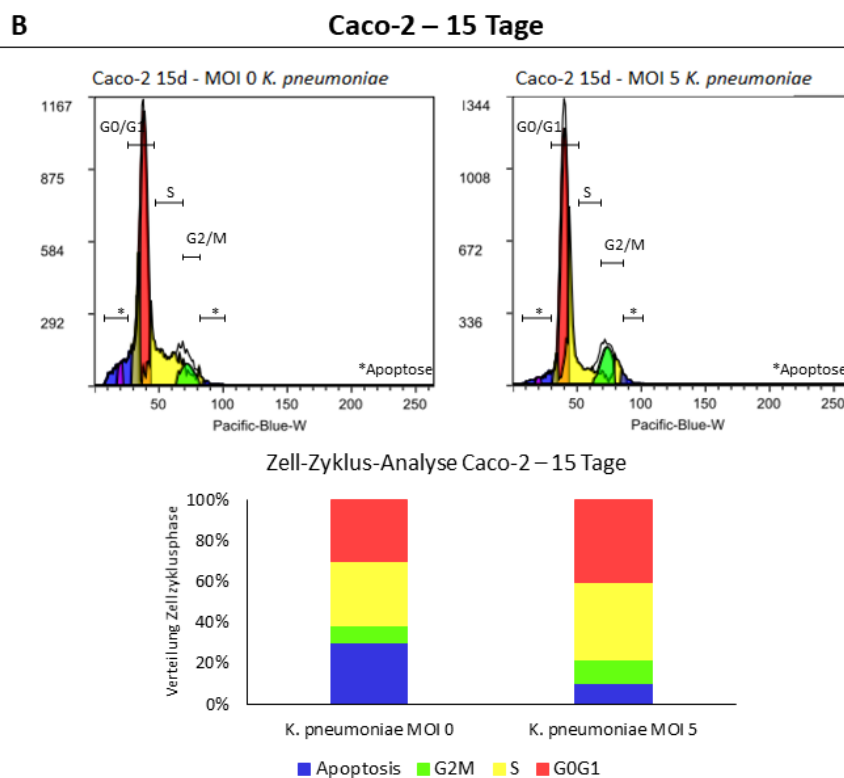
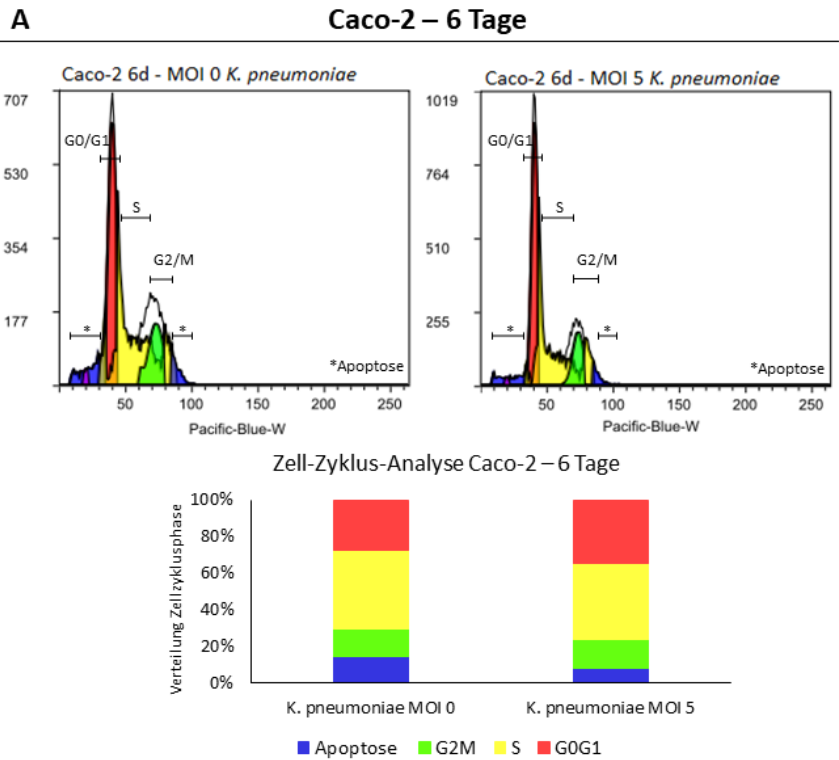


Abbildung 22. Analyse des Zellzyklus von Caco-2 Zellen nach bakterieller Stimulation mit *K. pneumoniae*.

Darstellung der Zellzyklusanalyse von 6-tägig (A) und 15-tägig (B) kultivierten Caco-2 Zellen vor und nach bakterieller Stimulation. Blau/Violett= Apoptose, Rot= G0/G1, Gelb= S-Phase, Grün= G2/M. (A) Die bakterielle Stimulation 6-tägig kultivierter Caco-2 Zellen führte zu einer Verschiebung des Zellzyklus. Nach Stimulation befanden sich im Verhältnis mehr Zellen in der G0/G1-Phase (MOI 0: 24,7% → MOI 5: 32,9%), die Apoptoserate war verringert (MOI 0: 13,0% → MOI 5: 7,0%). n=1

(B) Auch bei den 15-tägig kultivierten Caco-2 Zellen zeigte sich nach Koinkubation eine Reduktion der Apoptose (MOI 0: 27,4% → MOI 5: 9,7%) sowie eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1 Phase (MOI 0: 27,2% → MOI 5: 38,1%). n=1.

4 Diskussion

Die SBP, als eine häufige und gefährliche Komplikation der Leberzirrhose, wird hervorgerufen durch die BT. Eine geschwächte intestinale Barriere, eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms sowie eine systemische Immunsuppression zählen zu den begünstigenden Faktoren für die BT. Trotz großer Bemühungen ist der komplexe Pathomechanismus bis dato nicht vollständig geklärt. Im Detail ist von großem Interesse, in welcher Form SBP relevante Bakterien, wie z. B. *K. pneumoniae*, Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte nehmen. Weiterhin rückte die Regulation von p53 im Rahmen bakterieller Infektionen in der Vergangenheit zunehmend in den Fokus, sodass sich die Frage stellt, welche Rolle p53 bei der Entstehung der SBP hat.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass eine bakterielle Stimulation von HCT-116 Zellen mit *K. pneumoniae* zu einem frühen Zeitpunkt (nach 30 Minuten) zu einem Anstieg der *TP53* Expression führte. In Korrelation dazu stieg das p53-Proteinlevel nach 30-minütiger Infektion an. Die Intensität des Anstiegs verstärkte sich mit steigender MOI. Zu späteren Zeitpunkten war keine Regulation von p53 mehr zu beobachten. Neben der p53-Regulation unterlagen auch andere, Apoptose-assoziierte Proteine (u. a. phospho-RAD17 (S635), CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Bad, Bax) einer Regulation.

Zur Analyse der Zell-Zell-Kontakte wurden Caco-2 Zellen verwendet. Diese stellten sich durch ihr Monolayer-ähnliches Wachstum, ihre gute Differenzierung und ihre ausgeprägte Polarisierung in basales und – mit Mikrovilli besetztes – apikales Kompartiment als adäquates Modell dar.

Die Analyse der Genexpression von Occludin und E-Cadherin von stimulierten Caco-2 Zellen ergab keinen Hinweis auf eine eindeutige Regulation. Bei Caco-2 Zellen führte die bakterielle Infektion mit *K. pneumoniae* jedoch zu einer Reduktion des Occludin, Claudin 1 und Claudin 4 Proteinspiegels nach 4 Stunden, wobei auch hier die Regulation mit steigender MOI zunahm. E-Cadherin unterlag keiner Regulation. Die bakterielle Stimulation führte nicht zu einer vermehrten Apoptose, jedoch zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1 Phase.

Hitzeinaktivierte Bakterien zeigten weder bei HCT-116 noch bei Caco-2 Zellen einen Effekt auf die Genexpression oder die Proteinspiegel.

4.1 Regulation der p53 Signaltransduktion durch *K. pneumoniae*

Die Infektion von HCT-116 Zellen mit *K. pneumoniae* induziert die *TP53*-Expression. Auf mRNA-Ebene wurde eine Tendenz zu einer erhöhten Expression des *TP53*-Genes nach 30-minütiger Inkubation beobachtet. In Korrelation dazu steht das verstärkte p53-Signal im Western Blot. Üblicherweise erfolgt die Akkumulation von p53 durch Inhibition der proteasomalen Degradation (Chao 2015; Maki et al. 1996; Rodriguez et al. 2000). Denkbar wäre, dass beide Mechanismen an der Regulation beteiligt sind.

Die Induktion von p53 war nur zu frühen Zeitpunkten (30 Minuten) und bei einer MOI von 1 und 5 zu beobachten, nach 1- oder 2- stündiger Inkubation sowie Inkubation mit einer MOI von 0,1 zeigten sich unveränderte Proteinspiegel im Vergleich zur Kontrolle. Neben den Effekten auf p53 unterlagen auch viele weitere Apoptose-assoziierte Proteine einer Regulation. Auch hier war der Stimulus nach 30 Minuten am größten. Unsere Ergebnisse stehen hier im Einklang mit Arbeiten, die zeigen, dass das Bakterium *H. pylori* im Zell- und Mausmodell ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf p53 zeigt (Wei et al. 2010). Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion mit *H. pylori* war ein deutlicher p53 Anstieg zu beobachten. Nach 24 Stunden bis zu 2 Wochen nach Infektion zeigte sich dann ein normaler bis erniedrigter p53 Spiegel. Nach 12-wöchiger Infektion war ein erneuter p53 Anstieg zu verzeichnen, welcher durch die Entwicklung einer Gastritis erklärt wurde. Vermittelt war die p53 Reduktion durch eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges (Wei et al. 2010). Insgesamt stehen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten. Eine frühe zelluläre Stressantwort wird durch das Bakterium induziert.

Die Stärke der p53 Reduktion von *K. pneumoniae* war zeit- und konzentrationsabhängig – erst ab einer MOI von 1 bzw. MOI von 5 kam es zu einem Anstieg des p53-Proteinlevels. Möglicherweise ist die initiale Induktion von p53 eine Stressantwort der Zelle, die nachfolgend aktiv durch *K. pneumoniae* (gegen-) reguliert wird. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Infektion zeigten sich der Ausgangskonzentration entsprechende p53-Level. Interessanterweise hatten hitzeinaktivierte Bakterien keinen Einfluss auf den p53-Spiegel. Wie auch bei der Regulation durch *H. pylori* bedarf es bei der Regulation von p53 durch *K. pneumoniae* vitaler Bakterien (Wei et al. 2010).

Es bleibt zu klären, durch welchen Mechanismus *K. pneumoniae* in der Lage ist, einer frühen zellulären Stressantwort im Sinne der p53-Akkumulation entgegenzuwirken und sich dieser zu entziehen. Ein denkbarer Weg wäre die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, welcher schon für andere Bakterien (*C. trachomatis*, *H. pylori*) beschrieben wurde (Wei et al. 2010; Siegl et al. 2014). Auch *K. pneumoniae* ist in der Lage diesen Signalweg zu aktivieren und nutzen, um durch Epithelzellen zu translozieren (Hsu et al. 2015). Neben dem Mechanismus gilt es auch den Grund für die p53-Aktivierung zu eruieren: Führt die Infektion mit *K. pneumoniae*, wie auch Infektionen mit anderen Erregern, zu DNA-Schäden oder oxidativem Stress (Siegl und Rudel 2015)? Untersuchungen anderer Autoren legen nahe, dass Stämme von *K. pneumoniae* intrazellulär eindringen und dabei DNA-Schäden verursachen (Hsu et al. 2015; Huang et al. 2013). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf mögliche DNA-Schädigungen durch die bakterielle Infektion. So ergab das Proteom Profiling auf Apoptose-assoziierte Proteine, dass die phosphorylierte (S635) Form des Zellzyklus-Checkpoint Proteins Rad17 nach 30-minütiger Stimulation mit *K. pneumoniae* um mehr als das 40-fache anstieg. Rad17 wird durch folgende Trigger an S635 phosphoryliert:

- Zellzyklus-abhängig während der S- und G₂/M-Phase (Post et al. 2001)
- als Reaktion auf DNA-Schäden (Post et al. 2001)

Da infizierte und nicht infizierte Zellen zum gleichen Zeitpunkt, in gleicher Konzentration und unter gleichen Bedingungen ausgesät und kultiviert wurden, ist es unwahrscheinlich, dass sie sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden. Somit scheint eine Phosphorylierung als Folge eines möglichen DNA-Schadens durch die bakterielle Infektion wahrscheinlicher. Auch phospho-p53 (S15) imponierte durch einen Anstieg nach bakterieller Stimulation. Phosphorylierung von p53 an Serin 15 ist unter anderem nach DNA-Schäden zu beobachten und führt zu einer Reduktion des inhibitorischen Einflusses von MDM2 und somit zur Aktivierung von p53 (Shieh et al. 1997). Beides, phospho-p53 (S15) und phospho-Rad17 (S635), sind daher ein erstes Indiz für eine mögliche Schädigung der DNA, hervorgerufen durch die Infektion mit *K. pneumoniae*.

Ebenfalls als mögliches Zeichen des zellulären Stresses kann die vermehrte Expression der Hämoxygenase-1 (HMOX1) gewertet werden. In der Vergangenheit

wurden eine Vielzahl von Stimuli (bspw. Hypoxie, oxidativer Stress und Lipopolysacharride) identifiziert, die zur HMOX1 Induktion führten. (Waza et al. 2018) Die Hämoxygenase-2 (HMOX2) galt lange als konstitutiv exprimiert und wenig reguliert. In der Vergangenheit mehrten sich jedoch die Hinweise, dass auch HMOX2 einer Regulation unterliegt und protektive Effekte nach einer zellulären Schädigung entfalten kann (Muñoz-Sánchez und Cháñez-Cárdenas 2014).

Weiterhin zeigte sich der cyclin dependet kinase-Inhibitor p21 – als Zielstruktur von p53 – verstärkt detektierbar, wobei p21 zur Einleitung eines Zellzyklusarrests in der G1 Phase in Folge von DNA-Schäden führt (Abbas und Dutta 2009).

Insgesamt war eine vermehrte Bildung pro-apoptotischer Proteine, Bad, Bax, Pro-Caspase-3, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2 zu beobachten (Voss und Strasser 2020; Karstedt et al. 2017). Besonders hervorzuheben ist hier das CD95 System, welches eine bedeutende Rolle im Rahmen der Regulation der Apoptose einnimmt (Strand et al. 1996). Unsere Arbeitsgruppe hat hier die p53 abhängige Induktion des CD95 Rezeptors erstmals beschrieben. Ebenso wurde eine Regulation des CD95 Rezeptors durch p63 - einem Protein aus der p53 Familie - beobachtet (Gressner et al. 2005). Entsprechende p53 Bindestellen konnten auf dem CD95 Gen identifiziert werden. In der Folge kam es zu einer erhöhten Sensitivität für einen CD95 vermittelten Zelltod (Müller et al. 1997; Müller et al. 1998).

In neueren Untersuchungen konnte durch eine Inhibition des CD95 Liganden im Mausmodell ein apoptotischer Reperfusionsschaden reduziert werden, sodass das CD95 System als mögliches Therapieziel weiter untersucht werden sollte (Al-Saeedi et al. 2018).

Hervorzuheben ist, dass sich ein deutlicher Anstieg der Proteine nach 30-minütiger Koinkubation der HCT-116 mit *K. pneumoniae* zeigte. Nach 1 Stunde waren die Effekte deutlich rückläufig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Infektion mit *K. pneumoniae* zu DNA-Schäden führt, die wiederum einen starken p53 Aktivator darstellen. Nicht nur die Menge an p53, sondern auch seine Aktivität, erkennbar an der Phosphorylierung (S15), steigen. Die vermehrte Bildung Pro-apoptotischer Proteine zu einem frühen

Zeitpunkt erhöht zunächst die Wahrscheinlichkeit für einen apoptotischen Zelltod. Auch weitere Zielstrukturen von p53, insbesondere p21 und CD95, unterliegen zunächst einer Induktion.

Durch einen ungeklärten Mechanismus, möglicherweise unter Einbezug des PI3K/Akt-Signalweges, ist das Bakterium in der Lage, die Akkumulation von p53 zu unterbinden und sich somit der zellulären Stressantwort, die ggf. in der Einleitung der Apoptose endet, zu entziehen. Auch die Level der weiteren Pro-apoptotischen Proteine zeigten sich wieder vermindert. Somit verschafft sich der Erreger einen Überlebensvorteil während der Infektion.

Wie hier verdeutlicht werden konnte, kam es *in vitro* erst ab einer bestimmten Bakterienkonzentration zum Auftreten dieses regulatorischen Effekts. Möglicherweise bedarf es auch *in vivo* bei Patienten mit Leberzirrhose einer Anreicherung bestimmter Bakterien, damit diese als Erreger der SBP in Erscheinung treten können. So imponieren Patienten mit Leberzirrhose mit einer veränderten Zusammensetzung des Mikrobioms: Es kommt zur Zunahme von *Proteobacteria*, zu denen auch *E. coli* und *K. pneumoniae* gehören (Chen et al. 2011).

In künftigen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob der verwendete Stamm von *K. pneumoniae* in der Lage ist, nach intrazellulär zu translozieren und DNA-Schäden zu verursachen, z. B. über den Nachweis von phosphorylierten Histonen H2AX, die mit dem Auftreten von Doppelstrangbrüchen korrelieren (Sharma et al. 2012).

Der Signalweg, der die frühe Akkumulation von p53 hervorruft, muss charakterisiert werden. Hierzu sollte die MDM2-p53 Interaktion weiter untersucht werden.

Auch die Regulation der weiteren Pro-apoptotischen Proteine muss durch spezifische Analysen bestätigt werden.

Von großem Interesse ist, wie *K. pneumoniae* der anfänglichen p53-Akkumulation entgegenwirkt. Ein denkbarer und für andere Bakterien beschriebener Weg ist die p53 Degradierung über den PI3K/Akt-Signalweg, der letzten Endes über Aktivierung von MDM2 zum vermehrten proteasomalen Abbau von p53 führt. Hierdurch würde sich *K. pneumoniae* der im Rahmen der Infektion verursachten, zellulären Stressantwort entziehen. Auch für Infektionen mit *K. pneumoniae* wurde bereits die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs beschrieben, ein möglicher Einfluss auf p53 aber nicht untersucht (Hsu et al. 2015). Der Aktivitätszustand von MDM2 nach bakterieller Stimulation könnte beispielsweise durch Nachweis von phosphoryliertem MDM2 (Ser166) beurteilt werden (Meek und Knippschild 2003; Wei et al. 2010).

4.2 Modifikation von TJ durch *K. pneumoniae*

K. pneumoniae war in der Lage TJ Proteine (Claudin 1, Claudin 4 und Occludin) der 6- bzw. 15-tägig kultivierten Caco-2 Zellen zu regulieren. Der späte Zeitpunkt nach 15 Tagen wurde zusätzlich gewählt, da Caco-2 Zellen ab dem 15. bis 21. Tag unter Ausbildung eines stabilen transepithelialen elektrischen Widerstandes und einschichtigem Wachstums in der Literatur als vollständig differenziert beschrieben wurden (Briske-Anderson et al. 1997; Natoli et al. 2012). Neuere Arbeiten zeigten bereits am 6. Tag eine optimale Polarisierung, Differenzierung sowie Struktur der Zell-Zell-Kontakte (Haderer et al. 2021). Übereinstimmend zeigten auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine voranschreitende Differenzierung.

So waren bei Caco-2 Zellen die TJ-assoziierten Proteine ab 6-tägigem Zellwachstum ausreichend vorhanden, nach 14-tägiger Kultivierung zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Villin, was für eine stärkere Polarisierung spricht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Caco-2 Zellen offenbarten eine bessere Polarisierung, eine höhere Anzahl an Mikrovilli sowie dichtere Zellverbände mit Ausbildung eines Monolayers, wohingegen HCT-116 Zellverbände mehrschichtig und mit breiteren Interzellularräumen wuchsen.

Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein, die Caco-2 Zellen als den reifen Enterozyten ähnlichen Zellen beschrieben (Hidalgo et al. 1989; Sun et al. 2002). Allgemein stellen Caco-2 Zellen ein etabliertes Modell zur Untersuchung der intestinalen Permeabilität und Resorptionsvorgänge dar (Chantret et al. 1988; Srinivasan et al. 2015). Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit Caco-2 Zellen für die Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte favorisiert.

Nach bakterieller Stimulation zeigte sich bei Caco-2 Zellen eine Regulation von TJ Proteinen. Dabei war der Effekt der *K. pneumoniae* Stimulation auf Claudin 1, Claudin 4 und Occludin konzentrationsabhängig – mit steigender MOI sank das Proteinsignal zunehmend. Das *adherens junction* Protein E-Cadherin unterlag keiner Regulation. Der reduzierende Einfluss von *K. pneumoniae* auf Occludin ließ sich in den Immunfluoreszenzaufnahmen visualisieren und erreichte bei der semiquantitativen Auswertung statistische Signifikanz.

Eine Regulation von TJ wurde schon für eine Vielzahl an Bakterien nachgewiesen (Suzuki 2013; Haderer et al. 2021; Lee und Kim 2011). Jedoch beschrieben andere Autoren für *K. pneumoniae* (Stämme: A21, Ca0438, Ca5721) keinen Modifikation von Occludin oder ZO-1 im *in vitro* Modell mit Caco-2 Zellen (Hsu et al. 2015). Im Gegensatz dazu war im Mausmodell der Trinitrobenzosulfonsäure-induzierten Colitis nach oraler Applikation von *K. pneumoniae* eine Reduktion von Occludin, Claudin 1 und ZO-1 zu beobachten, bei zeitgleich erhöhten Spiegeln von Interleukin-6, COX-2 und TNF. Die Reduktion von Occludin und Claudin 1 war, wenn auch weniger ausgeprägt, auch bei den Kontrollen ohne Colitis zu beobachten, denen nur *K. pneumoniae* appliziert wurde (Lee und Kim 2011). Übereinstimmend damit kam es in einem Dysbiose Mausmodell (induziert durch kontinuierliche Gabe von Ampicillin in therapeutischen Dosen) zu einer Anreicherung von *Klebsiella* und *Enterococcus*, einem Anstieg von Entzündungsmediatoren (IFN- γ u. a.) und einer Reduktion von Occludin und ZO-1 (Shi et al. 2018). Möglicherweise ist der Effekt abhängig vom verwendeten *K. pneumoniae* Stamm. In den oben zitierten Versuchen wurde der genaue *K. pneumoniae* Stamm teils nicht angegeben. Hsu et al. verwendeten Stämme, die aus Patienten mit pyogenem Leberabszess (*K. pneumoniae* Ca0438 und Ca5721) oder Bakteriämie (*K. pneumoniae* A21) isoliert wurden (Hsu et al. 2015). Zu beachten ist, dass von *K. pneumoniae* mindestens 75 verschiedene Serotypen und eine Vielzahl von Virulenzfaktoren wie Kapselpolysaccharide, Lipopolysaccharide, Fimbriien und Membranproteine beschrieben sind, sodass sich große Unterschiede in der Pathogenität ergeben (Li et al. 2014). Im Gegensatz zur Arbeit von Hsu et al. wurde die hier gezeigte Occludin-Regulation neben der Immunfluoreszenz auch mittels Western Blot bestätigt und die Claudin-Familie ebenfalls in der Untersuchung berücksichtigt (Hsu et al. 2015).

Unklar bleibt der Mechanismus, welcher zur Reduktion der Occludin, Claudin 1 und Claudin 4 führt. Da *K. pneumoniae* keinen eindeutigen Effekt auf die Regulation der Occludin oder E-Cadherin mRNA zeigte, ist eine Einflussnahme auf Genexpressionsebene unwahrscheinlich.

Wahrscheinlicher ist eine Regulation auf Proteinebene, z. B. im Sinne eines proteasomalen Abbaus oder eine Reduktion durch bakterielle Proteasen (Nava et al. 2014).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte unsere Arbeitsgruppe bereits für verschiedene *E. coli* Stämme (insbesondere für solche, die von Patienten mit SBP isoliert wurden) eine Reduktion von Occludin über eine verstärkte proteasomale Degradation zeigen. Nach bakterieller Stimulation der Caco-2 Zellen kam es zur vermehrten Ubiquitinierung von Occludin. Durch Inhibierung des Proteasoms konnte der Occludin Abbau um bis zu 80 % reduziert werden (Haderer et al. 2021). Ein Einfluss auf E-Cadherin durch *K. pneumoniae* konnte nicht beobachtet werden. Bei anderen, SBP relevanten *E. coli* Stämmen war, neben einer proteasomal vermittelten Occludin Reduktion, auch eine Reduktion von E-Cadherin zu beobachten. Diese war durch eine bakterielle Protease vermittelt (Haderer et al. 2021). Die fehlende Reduktion von E-Cadherin durch *K. pneumoniae* ist möglicherweise zurückzuführen auf eine fehlende bakterielle Protease des hier verwendeten *K. pneumoniae* Stammes.

Ein weiterer beschriebener Mechanismus, z. B. bei Infektionen mit *EPEC*, ist die Umverteilung der TJ-Proteine mit einem Verlust ihrer apikalen Lokalisation (Muza-Moons et al. 2004). Auch die Umverteilung von Occludin von seiner TJ-assoziierten, transmembranösen Lokalisation in den Intrazellulärraum, als Folge einer *EPEC*-induzierten Dephosphorylierung, wurde beschrieben. Die Gesamtmenge an Occludin schien durch die Infektion unbeeinflusst (Simonovic et al. 2000). Die Reduktion der Proteinspiegel, wie auch das konstante Verteilungsmuster vor und nach Infektion in der Immunfluoreszenz, spricht in dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell gegen eine reine Umverteilung der Proteine nach Infektion mit *K. pneumoniae*. Denkbar wäre allerdings auch eine Kombination von Relokalisation und Reduktion der Proteine, wie bereits für das *S. aureus* alpha-Toxin beschrieben. Nach basolateraler Toxin-Stimulation sanken die Proteinspiegel von ZO-1, ZO-2, Occludin und E-Cadherin, bedingt durch einen erhöhten Ca^{2+} Einstrom von extrazellulär, ab und die Lokalisation von β -Catenin verschob sich in Richtung Zytoplasma (Kwak et al. 2012).

Für *K. pneumoniae*, als fakultativ pathogener Kommensale im Darm, scheint eine Wirkentfaltung von luminal naheliegend. Bestimmte Stämme von *H. pylori* sind ebenfalls nur von apikal in der Lage, Claudin 4 und Claudin 5 zu supprimieren, die Umverteilung von Occludin ins Zytosol zu begünstigen und die Permeabilität zu erhöhen. Erreicht wurde dies über die Aktivierung der MLCK, die in einer vermehrten

Phosphorylierung von MLC endet. Hierfür ist der direkte, apikale Zellkontakt vitaler Bakterien nötig – hitzeinaktivierte Bakterien oder der bakterieller Überstand mit den bakteriellen Produkten zeigten keinen Effekt (Fedwick et al. 2005). Die MLCK-Aktivierung wurde auch bei Infektionen anderer Pathogene, die zu Störungen der TJs führen, beobachtet (Barreau und Hugot 2014).

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, dass nur *K. pneumoniae* als vitales Bakterium – nicht hitzeinaktiviert - TJ-Proteine regulieren kann und stehen damit in Übereinstimmung zur beobachteten regulatorischen Effekten anderer SBP-Erreger (Haderer et al. 2021).

In weiteren Experimenten sollte analysiert werden, ob ein direkter Bakterien-Zell-Kontakt notwendig ist und welchen Einfluss bakterielle Produkte nehmen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine vermehrte proteasomale Degradation stattfindet. Eine möglicherweise bakteriell vermittelte Aktivierung der MLCK kann ggf. mit Analyse der phosphorylierten MLC durch Western Blots bzw. durch MLCK-Inhibitorversuche beurteilt werden (Fedwick et al. 2005).

Die Frage ob, und auf welchem Wege *K. pneumoniae* im Zellmodell translozieren kann, sollte ebenfalls in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden. Verschiedene Bakterien können entweder transzellulär oder parazellulär über ein Epithel translozieren. Die Fähigkeit der transzellulären Translokation bestimmter *K. pneumoniae* Stämme wurde bereits charakterisiert (Hsu et al. 2015). In weiteren Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, ob der hier verwendete Stamm in der Lage ist die epitheliale Barriere zu überwinden. Wenn dies der Fall sein sollte, muss in einem nächsten Schritt geklärt werden, ob die Translokation para- oder transzellulär erfolgt.

Um einen möglichen Einfluss durch die bakterielle Infektion oder die Reduktion der TJ-Proteine auf den Zellzyklus zu analysieren, folgte eine durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus. Sowohl die 6- als auch die 15-tägig kultivierten Zellen zeigten nach 4-stündiger bakterieller Infektion eine verringerte Apoptoserate. Weiterhin war eine Akkumulation von Zellen in der G0/G1 Phase zu beobachten. Somit ist nicht davon auszugehen, dass die bakterielle Infektion und der Verlust der TJ-Proteine zu

einer vermehrten Apoptose führen. Vielmehr werden Zellen am Voranschreiten im Zellzyklus gehindert.

Auch bei Infektionen mit anderen Pathogenen ist eine Beeinflussung des Zellzyklus zu beobachten. Im Rahmen der bakteriellen Stimulation von Caco-2 Zellen mit *E. coli* war ebenfalls eine Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase zu beobachten (Haderer et al. 2021). Im Rahmen von Infektionen mit *N. gonorrhoeae* kommt es, durch eine vermehrte Expression der cyclin-dependent kinase Inhibitoren p21 und p27 zu einem verlangsamten Progress des Zellzyklus, insbesondere während der G2- Phase (Vielfort et al. 2013). Unklar bleibt der zu Grunde liegende Mechanismus. Denkbar wäre die Aktivierung von Check-Point-Kinasen in Folge von durch die Infektion mit *K. pneumoniae* hervorgerufenen DNA Schäden (Bertoli et al. 2013).

4.3 Schlussfolgerung

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse einen konzentrationsabhängigen, regulatorischen Einfluss vitaler *K. pneumoniae* auf verschiedene zelluläre Strukturen nahe (Abb. 23). Dazu zählen:

- Proteine der TJ (Occludin, Claudin 1 und Claudin 4)
- zelluläre Stressantwort via p53
- Zellzyklus

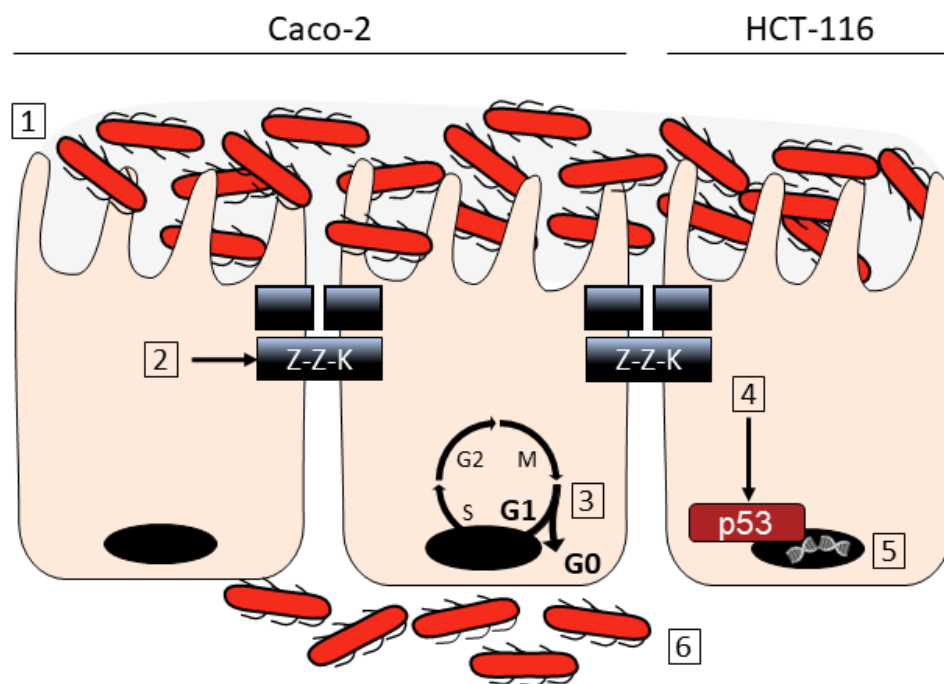


Abbildung 23. Übersicht der regulatorischen Effekte von *K. pneumoniae* in HCT-116 und Caco-2 Zellen. Grundvoraussetzung ist das Überschreiten einer bestimmten Konzentration vitaler Bakterien (1). *K. pneumoniae* nimmt in Caco-2 Zellen, möglicherweise über einen vermehrten proteasomalen Abbau, Einfluss auf die TJ-Proteine Occludin, Claudin 1 und Claudin 4 (2) und führt zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1 Phase (3). In HCT-116 Zellen beeinflusst *K. pneumoniae* die p53 vermittelte zelluläre Stressantwort (4) und verursacht im Rahmen der Infektion möglicherweise DNA-Schäden (5). Die Kombination dieser Effekte führt zu einer Destabilisierung der Integrität des intestinalen Epithelverbands, was die Translokation von Bakterien begünstigen könnte (6).

Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse ergibt sich folgende Hypothese: Kommt es zum Überschreiten einer bestimmten Bakterienkonzentration (MOI 1 und MOI 5), infiziert *K. pneumoniae* intestinale Epithelzellen über einen bisher unbekanntem Mechanismus und entfaltet seinen regulatorischen Einfluss. Erste Indizien legen nahe, dass es im Rahmen der Infektion zu DNA-Schädigungen kommt. Eine zelluläre Stressantwort via

p53 mit vermehrter Expression von p53 Zielgenen wie p21 und CD95, kann durch *K. pneumoniae* induziert werden. Weiterhin kommt es, möglicherweise durch eine bakterieninduzierte proteasomale Degradation, zur Reduktion der Zell-Zell-Kontakte sowie zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase. Die Kombination dieser Effekte destabilisiert die Integrität des intestinalen Epithelverbands und begünstigt die bakterielle Translokation.

Von besonderem wissenschaftlichen und klinischen Interesse ist, dass *K. pneumoniae* während der Infektion mit p53 interferiert. Damit kommt p53 - dem klassischen Tumorsuppressorgen - eine neue und klinisch bedeutsame Rolle in der bakteriellen Abwehr zu.

Im Rahmen der Entstehung der SBP könnten Veränderungen im Mikrobiom, beispielsweise durch Anreicherung von *K. pneumoniae* und einer Reduktion der Mukusdichte eine Schlüsselrolle einnehmen. Durch die hier dargestellte Einflussnahme auf die epitheliale Integrität, allen voran der zellulären Stressantwort und der Regulation von TJ-Proteinen, begünstigen sie somit über verschiedene Mechanismen, die die Aktivierung und spätere Inhibition von p53 einschließt, die BT.

Die vorliegende Arbeit identifiziert eine neue Funktion von p53 in der bakteriellen Abwehr und beschreibt mit Proteinen der TJ, der Regulation von p53 und konsekutiv des Zellzyklus neue therapeutische Targets einer bakteriellen Translokation und der spontan bakteriellen Peritonitis.

5 Zusammenfassung

Die spontan bakterielle Peritonitis ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose. Ihr genauer Pathomechanismus ist bis dato nicht geklärt, gemeinsame Endstrecke ist die bakterielle Translokation, die Durchwanderung von Bakterien aus dem Darmlumen in die mesenterialen Lymphknoten oder in den Aszites bei Patienten mit Leberzirrhose. Wir sprechen dann von einer spontan bakteriellen Peritonitis.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von *K. pneumoniae*, einem häufigen Erreger der SBP, auf intestinale Epithelzellen – deren Integrität und p53 Status.

Die Untersuchungen stützten sich auf 2 Zellkulturmodelle: HCT-116 (p53 wildtyp) für die Untersuchung der p53-Familie und Caco-2 Zellen (p53 mutant) für Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion. Die Zellen wurden über 3 bis 15 Tage kultiviert und anschließend mit unterschiedlicher MOI von *K. pneumoniae* für 30 Minuten bis 4 Stunden infiziert. Hitzeinaktivierte Bakterien dienten als Kontrolle. Es wurden Proben für Western Blot und qPCR (Occludin, Claudin 1, Claudin 4, p53), Immunfluoreszenz (Occludin) und Zellzyklusanalysen gewonnen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *K. pneumoniae* nach 30-minütiger Stimulation von HCT-116 Zellen zu einer transienten Akkumulation von p53 führt. In Übereinstimmung dazu waren weitere Apoptose-assoziierte Proteine (u. a. phospho-RAD17 (S635)) zu Beginn der Infektion erhöht. Die *TP53* Genexpression war nach 30 Minuten ebenfalls gesteigert. Darüber hinaus kam es während der Infektion von Caco-2 Zellen mit *K. pneumoniae* zu einer Reduktion von Claudin 1, Claudin 4 und Occludin. Die Zellzyklusanalyse ergab, dass die Infektion bzw. der Verlust der TJ-Proteine nicht zu einer vermehrten Apoptoserate führte, Zellen allerdings in der G0/G1 Pause akkumulierten.

Es lässt sich schlussfolgern, dass *K. pneumoniae* durch die Regulation von p53, der Reduktion von TJ-Proteinen und der Einflussnahme auf den Zellzyklus in der Lage ist, die epitheliale Integrität zu beeinflussen und somit die BT möglicherweise begünstigt. Dies dient der Vermehrung und der konsekutiven Durchwanderung der Bakterien. Diese Arbeit identifiziert erstmals p53 als einen wichtigen Regulator der epithelialen Integrität und als einen first line defense Mechanismus bei einer bakteriellen Infektion. Das Gleichgewicht von Bakterien und p53 entscheidet über die bakterielle Vermehrung und Translokation gegenüber der Integrität der Epithelzelle.

Literaturverzeichnis

Abbas, Tarek; Dutta, Anindya (2009): p21 in cancer. Intricate networks and multiple activities. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (6), S. 400–414. DOI: 10.1038/nrc2657.

Abraham, Aswin G.; O'Neill, Eric (2014): PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. In: *Biochemical Society transactions* 42 (4), S. 798–803. DOI: 10.1042/BST20140070.

Al-Sadi, Rana; Khatib, Khaldun; Guo, Shuhong; Ye, Dongmei; Youssef, Moustafa; Ma, Thomas (2011): Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300 (6), G1054-64. DOI: 10.1152/ajpgi.00055.2011.

Al-Saeedi, Mohammed; Steinebrunner, Niels; Kudsi, Hassan; Halama, Niels; Mogler, Carolin; Büchler, Markus W. et al. (2018): Neutralization of CD95 ligand protects the liver against ischemia-reperfusion injury and prevents acute liver failure. In: *Cell death & disease* 9 (2), S. 132. DOI: 10.1038/s41419-017-0150-0.

Assimakopoulos, Stelios F.; Tsamandas, Athanassios C.; Tsiaoussis, Georgios I.; Karatza, Elli; Triantos, Christos; Vagianos, Constantine E. et al. (2012): Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. In: *European journal of clinical investigation* 42 (4), S. 439–446. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2011.02609.x.

Backhed, Fredrik; Ley, Ruth E.; Sonnenburg, Justin L.; Peterson, Daniel A.; Gordon, Jeffrey I. (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5717), S. 1915–1920. DOI: 10.1126/science.1104816.

Barreau, F.; Hugot, J. P. (2014): Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. In: *Current opinion in microbiology* 17, S. 91–98. DOI: 10.1016/j.mib.2013.12.003.

Bauer, T. M.; Steinbruckner, B.; Brinkmann, F. E.; Ditzen, A. K.; Schwacha, H.; Aponte, J. J. et al. (2001): Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. In: *The American journal of gastroenterology* 96 (10), S. 2962–2967. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2001.04668.x.

- Bauer, Tilman M.; Schwacha, Henning; Steinbruckner, Bernhard; Brinkmann, Folke E.; Ditzen, Anette K.; Aponte, John J. et al. (2002): Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia. In: *The American journal of gastroenterology* 97 (9), S. 2364–2370. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05791.x.
- Berg, R. D.; Garlington, A. W. (1979): Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. In: *Infection and immunity* 23 (2), S. 403–411.
- Bertoli, Cosetta; Skotheim, Jan M.; Bruin, Robertus A. M. de (2013): Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (8), S. 518–528. DOI: 10.1038/nrm3629.
- Biggins, Scott W.; Angeli, Paulo; Garcia-Tsao, Guadalupe; Ginès, Pere; Ling, Simon C.; Nadim, Mitra K. et al. (2021): Diagnosis, Evaluation, and Management of Ascites, Spontaneous Bacterial Peritonitis and Hepatorenal Syndrome. 2021 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 74 (2), S. 1014–1048. DOI: 10.1002/hep.31884.
- Bondow, Benjamin J.; Faber, Mary L.; Wojta, Kevin J.; Walker, Emily M.; Battle, Michele A. (2012): E-cadherin is required for intestinal morphogenesis in the mouse. In: *Developmental biology* 371 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.06.005.
- Bonnel, Alexander R.; Bunchorntavakul, Chalermrat; Reddy, K. Rajender (2011): Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 9 (9), S. 727–738. DOI: 10.1016/j.cgh.2011.02.031.
- Borzio, M.; Salerno, F.; Piantoni, L.; Cazzaniga, M.; Angeli, P.; Bissoli, F. et al. (2001): Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. In: *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 33 (1), S. 41–48.
- Bourdon, Jean-Christophe; Fernandes, Kenneth; Murray-Zmijewski, Fiona; Liu, Geng; Diot, Alexandra; Xirodimas, Dimitris P. et al. (2005): p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. In: *Genes & development* 19 (18), S. 2122–2137. DOI: 10.1101/gad.1339905.

- Boutelle, Anthony M.; Attardi, Laura D. (2021): p53 and Tumor Suppression. It Takes a Network. In: *Trends in cell biology* 31 (4), S. 298–310. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.12.011;
- Briske-Anderson, M. J.; Finley, J. W.; Newman, S. M. (1997): The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 214 (3), S. 248–257.
- Cash, Heather L.; Whitham, Cecilia V.; Behrendt, Cassie L.; Hooper, Lora V. (2006): Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790), S. 1126–1130. DOI: 10.1126/science.1127119.
- Caster, Amanda H.; Kahn, Richard A. (2012): Computational method for calculating fluorescence intensities within three-dimensional structures in cells. In: *Cellular logistics* 2 (4), S. 176–188. DOI: 10.4161/cl.23150.
- Chang, C. S.; Chen, G. H.; Lien, H. C.; Yeh, H. Z. (1998): Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 28 (5), S. 1187–1190. DOI: 10.1002/hep.510280504.
- Chantret, I.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brattain, M. G.; Zweibaum, A. (1988): Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. In: *Cancer research* 48 (7), S. 1936–1942.
- Chao, Chuck C-K (2015): Mechanisms of p53 degradation. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 438, S. 139–147. DOI: 10.1016/j.cca.2014.08.015.
- Chen, Yanfei; Yang, Fengling; Lu, Haifeng; Wang, Baohong; Chen, Yunbo; Lei, Dajiang et al. (2011): Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54 (2), S. 562–572. DOI: 10.1002/hep.24423.
- Cheong, Hae Suk; Kang, Cheol-In; Lee, Jeong A.; Moon, Soo Youn; Joung, Mi Kyong; Chung, Doo Ryeon et al. (2009): Clinical significance and outcome of nosocomial acquisition of spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver

cirrhosis. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 (9), S. 1230–1236. DOI: 10.1086/597585.

Chipuk, Jerry E.; Kuwana, Tomomi; Bouchier-Hayes, Lisa; Droin, Nathalie M.; Newmeyer, Donald D.; Schuler, Martin; Green, Douglas R. (2004): Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5660), S. 1010–1014. DOI: 10.1126/science.1092734.

Cholongitas, Evangelos; Papatheodoridis, George V.; Lahanas, Alexandros; Xanthaki, Anna; Kontou-Kastellanou, Chrysoula; Archimandritis, Athanasios J. (2005): Increasing frequency of Gram-positive bacteria in spontaneous bacterial peritonitis. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 25 (1), S. 57–61. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2004.0985.x.

Corazza, G. R.; Menozzi, M. G.; Strocchi, A.; Rasciti, L.; Vaira, D.; Lecchini, R. et al. (1990): The diagnosis of small bowel bacterial overgrowth. Reliability of jejunal culture and inadequacy of breath hydrogen testing. In: *Gastroenterology* 98 (2), S. 302–309.

Cuevas-Ramos, Gabriel; Petit, Claude R.; Marcq, Ingrid; Boury, Michèle; Oswald, Eric; Nougayrède, Jean-Philippe (2010): Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25), S. 11537–11542. DOI: 10.1073/pnas.1001261107.

Dean, Paul; Kenny, Brendan (2004): Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic Escherichia coli is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. In: *Molecular microbiology* 54 (3), S. 665–675. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04308.x.

Doi, Hiroyoshi; Iyer, Tara K.; Carpenter, Erica; Li, Hong; Chang, Kyong-Mi; Vonderheide, Robert H.; Kaplan, David E. (2012): Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (3), S. 709–719. DOI: 10.1002/hep.24689.

Donehower, L. A.; Harvey, M.; Slagle, B. L.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A.; Butel, J. S.; Bradley, A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but

susceptible to spontaneous tumours. In: *Nature* 356 (6366), S. 215–221. DOI: 10.1038/356215a0.

EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis (2018). In: *Journal of hepatology* 69 (2), S. 406–460.

Ersoz, G.; Aydin, A.; Erdem, S.; Yuksel, D.; Akarca, U.; Kumanlioglu, K. (1999): Intestinal permeability in liver cirrhosis. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 11 (4), S. 409–412.

Evans, Luke T.; Kim, W. Ray; Poterucha, John J.; Kamath, Patrick S. (2003): Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37 (4), S. 897–901. DOI: 10.1053/jhep.2003.50119.

Faes, Seraina; Dormond, Olivier (2015): PI3K and AKT. Unfaithful Partners in Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 16 (9), S. 21138–21152. DOI: 10.3390/ijms160921138.

Fedwick, Jason P.; Lapointe, Tamia K.; Meddings, Jonathan B.; Sherman, Philip M.; Buret, Andre G. (2005): Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. In: *Infection and immunity* 73 (12), S. 7844–7852. DOI: 10.1128/IAI.73.12.7844-7852.2005.

Fernandez, Javier; Acevedo, Juan; Castro, Miriam; Garcia, Orlando; Lope, Carlos Rodriguez de; Roca, Daria et al. (2012): Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (5), S. 1551–1561. DOI: 10.1002/hep.25532.

Fiuza, C.; Salcedo, M.; Clemente, G.; Tellado, J. M. (2000): In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. In: *The Journal of infectious diseases* 182 (2), S. 526–533. DOI: 10.1086/315742.

Friedel, Laura; Loewer, Alexander (2021): The guardian's choice. How p53 enables context-specific decision-making in individual cells. In: *The FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15767.

Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. (1993): Occludin. A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. In: *The Journal of cell biology* 123 (6 Pt 2), S. 1777–1788.

Furuse, Mikio; Hata, Masaki; Furuse, Kyoko; Yoshida, Yoko; Haratake, Akinori; Sugitani, Yoshinobu et al. (2002): Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier. A lesson from claudin-1-deficient mice. In: *The Journal of cell biology* 156 (6), S. 1099–1111. DOI: 10.1083/jcb.200110122.

Garcia-Tsao, Guadalupe (2016): Current Management of the Complications of Cirrhosis and Portal Hypertension. Variceal Hemorrhage, Ascites, and Spontaneous Bacterial Peritonitis. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 34 (4), S. 382–386. DOI: 10.1159/000444551.

Garrod, David; Chidgey, Martyn (2008): Desmosome structure, composition and function. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 572–587. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.014.

Gerbes, A. L.; Gulberg, V.; Sauerbruch, T.; Wiest, R.; Appenrodt, B.; Bahr, M. J. et al. (2011): German S 3-guideline "ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome". In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 49 (6), S. 749–779. DOI: 10.1055/s-0031-1273405.

Gerbes, Alexander L.; Labenz, Joachim; Appenrodt, Beate; Dollinger, Matthias; Gundling, Felix; Gülberg, Veit et al. (2019): Aktualisierte S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) „Komplikationen der Leberzirrhose“. In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 57 (5), e168. DOI: 10.1055/a-0928-2800.

Giannelli, Valerio; Di Gregorio, Vincenza; Iebba, Valerio; Giusto, Michela; Schippa, Serena; Merli, Manuela; Thalheimer, Ulrich (2014): Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. In: *World journal of gastroenterology* 20 (45), S. 16795–16810. DOI: 10.3748/wjg.v20.i45.16795.

González, Raúl; La Rosa, Ángel J. de; Rufini, Alessandro; Rodríguez-Hernández, María A.; Navarro-Villarán, Elena; Marchal, Trinidad et al. (2017): Role of p63 and p73 isoforms on the cell death in patients with hepatocellular carcinoma submitted to orthotopic liver transplantation. In: *PloS one* 12 (3), e0174326. DOI: 10.1371/journal.pone.0174326.

Gressner, Olav; Schilling, Tobias; Lorenz, Katja; Schulze Schleithoff, Elisa; Koch, Andreas; Schulze-Bergkamen, Henning et al. (2005): TAp63alpha induces apoptosis

by activating signaling via death receptors and mitochondria. In: *The EMBO Journal* 24 (13), S. 2458–2471. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600708.

Guarner, C.; Runyon, B. A.; Young, S.; Heck, M.; Sheikh, M. Y. (1997): Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. In: *Journal of hepatology* 26 (6), S. 1372–1378.

Haderer, Marika; Neubert, Philip; Rinner, Eva; Scholtis, Annika; Broncy, Lucile; Gschwendtner, Heidi et al. (2021): Novel pathomechanism for spontaneous bacterial peritonitis. Disruption of cell junctions by cellular and bacterial proteases. In: *Gut*. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-321663.

Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. In: *Nature* 387 (6630), S. 296–299. DOI: 10.1038/387296a0.

Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. (1989): Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. In: *Gastroenterology* 96 (3), S. 736–749.

Hsu, Chun-Ru; Pan, Yi-Jiun; Liu, Ju-Yun; Chen, Chun-Tang; Lin, Tzu-Lung; Wang, Jin-Town (2015): *Klebsiella pneumoniae* translocates across the intestinal epithelium via Rho GTPase- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent cell invasion. In: *Infection and immunity* 83 (2), S. 769–779. DOI: 10.1128/IAI.02345-14.

Huang, Huang; Weaver, Andrew; Wu, Erxi; Li, Yi; Gao, Hongwei; Fan, Weimin; Wu, Min (2013): Lipid-based signaling modulates DNA repair response and survival against *Klebsiella pneumoniae* infection in host cells and in mice. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49 (5), S. 798–807. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0069OC.

Hulpiau, Paco; van Roy, Frans (2009): Molecular evolution of the cadherin superfamily. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (2), S. 349–369. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.09.027.

Johansson, Malin E. V.; Sjövall, Henrik; Hansson, Gunnar C. (2013): The gastrointestinal mucus system in health and disease. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 10 (6), S. 352–361. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.35.

Karczewski, Jurgen; Troost, Freddy J.; Konings, Irene; Dekker, Jan; Kleerebezem, Michiel; Brummer, Robert-Jan M.; Wells, Jerry M. (2010): Regulation of human

epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298 (6), G851-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00327.2009.

Karstedt, Silvia von; Montinaro, Antonella; Walczak, Henning (2017): Exploring the TRAILS less travelled. TRAIL in cancer biology and therapy. In: *Nature reviews. Cancer* 17 (6), S. 352–366. DOI: 10.1038/nrc.2017.28.

Kunst, Claudia; Haderer, Marika; Heckel, Sebastian; Schlosser, Sophie; Müller, Martina (2016): The p53 family in hepatocellular carcinoma. In: *Transl. Cancer Res.* 5 (6), S. 632–638. DOI: 10.21037/tcr.2016.11.79.

Kusaba, N.; Kumashiro, R.; Ogata, H.; Sata, M.; Tanikawa, K. (1998): In vitro study of neutrophil apoptosis in liver cirrhosis. In: *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 37 (1), S. 11–17.

Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. (1996): Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5289), S. 948–953. DOI: 10.1126/science.274.5289.948.

Kwak, Young-Keun; Vikström, Elena; Magnusson, Karl-Eric; Vécsey-Semjén, Beatrix; Colque-Navarro, Patricia; Möllby, Roland (2012): The *Staphylococcus aureus* alpha-toxin perturbs the barrier function in Caco-2 epithelial cell monolayers by altering junctional integrity. In: *Infection and immunity* 80 (5), S. 1670–1680. DOI: 10.1128/IAI.00001-12.

Lahalle, Airelle; Lacroix, Matthieu; Blasio, Carlo de; Cissé, Madi Y.; Linares, Laetitia K.; Le Cam, Laurent (2021): The p53 Pathway and Metabolism. The Tree That Hides the Forest. In: *Cancers* 13 (1). DOI: 10.3390/cancers13010133.

Lahnborg, G.; Friman, L.; Berghem, L. (1981): Reticuloendothelial function in patients with alcoholic liver cirrhosis. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 16 (4), S. 481–489.

Lane, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. In: *Nature* 358 (6381), S. 15–16. DOI: 10.1038/358015a0.

Le Shen; Black, Eric D.; Witkowski, Edwina D.; Lencer, Wayne I.; Guerriero, Vince; Schneeberger, Eveline E.; Turner, Jerrold R. (2006): Myosin light chain

phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 10), S. 2095–2106. DOI: 10.1242/jcs.02915.

Lee, In-Ah; Kim, Dong-Hyun (2011): *Klebsiella pneumoniae* increases the risk of inflammation and colitis in a murine model of intestinal bowel disease. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 46 (6), S. 684–693. DOI: 10.3109/00365521.2011.560678.

Leu, J. I-Ju; Dumont, Patrick; Hafey, Michael; Murphy, Maureen E.; George, Donna L. (2004): Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. In: *Nature cell biology* 6 (5), S. 443–450. DOI: 10.1038/ncb1123.

Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. In: *Cell* 88 (3), S. 323–331. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81871-1.

Levine, Arnold J.; Oren, Moshe (2009): The first 30 years of p53. Growing ever more complex. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (10), S. 749–758. DOI: 10.1038/nrc2723.

Li, Bei; Zhao, Yuling; Liu, Changting; Chen, Zhenhong; Zhou, Dongsheng (2014): Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. In: *Future microbiology* 9 (9), S. 1071–1081. DOI: 10.2217/fmb.14.48.

Liu, Ying; Bodmer, Walter F. (2006): Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (4), S. 976–981. DOI: 10.1073/pnas.0510146103.

Llovet, J. M.; Bartoli, R.; Planas, R.; Cabre, E.; Jimenez, M.; Urban, A. et al. (1994): Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. In: *Gut* 35 (11), S. 1648–1652.

Lutz, Philipp; Nischalke, Hans Dieter; Strassburg, Christian P.; Spengler, Ulrich (2015): Spontaneous bacterial peritonitis: The clinical challenge of a leaky gut and a cirrhotic liver. In: *World journal of hepatology* 7 (3), S. 304–314. DOI: 10.4254/wjh.v7.i3.304.

Maki, C. G.; Huijbrechtse, J. M.; Howley, P. M. (1996): In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). In: *Cancer research* 56 (11), S. 2649–2654.

- Marchiando, Amanda M.; Graham, W. Vallen; Turner, Jerrold R. (2010): Epithelial barriers in homeostasis and disease. In: *Annual review of pathology* 5, S. 119–144. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092135.
- Marteau, P.; Pochart, P.; Dore, J.; Bera-Maillet, C.; Bernalier, A.; Corthier, G. (2001): Comparative Study of Bacterial Groups within the Human Cecal and Fecal Microbiota. In: *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10), S. 4939–4942. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4939-4942.2001.
- Mayo, L. D.; Donner, D. B. (2001): A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20), S. 11598–11603. DOI: 10.1073/pnas.181181198.
- Meek, David W.; Knippschild, Uwe (2003): Posttranslational modification of MDM2. In: *Molecular cancer research : MCR* 1 (14), S. 1017–1026.
- Menendez, Daniel; Inga, Alberto; Resnick, Michael A. (2009): The expanding universe of p53 targets. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (10), S. 724–737. DOI: 10.1038/nrc2730.
- Michael, Dan; Oren, Moshe (2003): The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. In: *Seminars in Cancer Biology* 13 (1), S. 49–58. DOI: 10.1016/s1044-579x(02)00099-8.
- Mihara, Motohiro; Erster, Susan; Zaika, Alexander; Petrenko, Oleksi; Chittenden, Thomas; Pancoska, Petr; Moll, Ute M. (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. In: *Molecular cell* 11 (3), S. 577–590. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9.
- Momand, Jamil; Zambetti, Gerard P.; Olson, David C.; George, Donna; Levine, Arnold J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. In: *Cell* 69 (7), S. 1237–1245. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90644-r.
- Muller, Martina; Schleithoff, Elisa Schulze; Stremmel, Wolfgang; Melino, Gerry; Krammer, Peter H.; Schilling, Tobias (2006): One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. In: *Drug resistance updates : reviews and commentaries in*

antimicrobial and anticancer chemotherapy 9 (6), S. 288–306. DOI: 10.1016/j.drug.2007.01.001.

Müller, M.; Schilling, T.; Sayan, A. E.; Kairat, A.; Lorenz, K.; Schulze-Bergkamen, H. et al. (2005): TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. In: *Cell death and differentiation* 12 (12), S. 1564–1577. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401774.

Müller, M.; Strand, S.; Hug, H.; Heinemann, E. M.; Walczak, H.; Hofmann, W. J. et al. (1997): Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. In: *The Journal of clinical investigation* 99 (3), S. 403–413. DOI: 10.1172/JCI119174.

Müller, M.; Volkmann, M.; Zentgraf, H.; Galle, P. R. (1994): Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. In: *The New England journal of medicine* 330 (12), S. 865.

Müller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M. et al. (1998): p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (11), S. 2033–2045. DOI: 10.1084/jem.188.11.2033.

Munoz, Leticia; Jose Borrero, Maria; Ubeda, Maria; Lario, Margaret; Diaz, David; Frances, Ruben et al. (2012): Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (5), S. 1861–1869. DOI: 10.1002/hep.25854.

Muñoz-Sánchez, Jorge; Cháñez-Cárdenas, María Elena (2014): A review on hemeoxygenase-2. Focus on cellular protection and oxygen response. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, S. 604981. DOI: 10.1155/2014/604981.

Muza-Moons, Michelle M.; Schneeberger, Eveline E.; Hecht, Gail A. (2004): Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. In: *Cellular microbiology* 6 (8), S. 783–793. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2004.00404.x.

Natoli, Manuela; Leoni, Bruno D.; D'Agnano, Igea; Zucco, Flavia; Felsani, Armando (2012): Good Caco-2 cell culture practices. In: *Toxicology in vitro : an international*

journal published in association with *BIBRA* 26 (8), S. 1243–1246. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.03.009.

Nava, Porfirio; Kamekura, Ryuta; Nusrat, Asma (2014): Cleavage of transmembrane junction proteins and their role in regulating epithelial homeostasis. In: *Tissue Barriers* 1 (2), e24783. DOI: 10.4161/tisb.24783.

Nollet, F.; Kools, P.; van Roy, F. (2000): Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. In: *Journal of molecular biology* 299 (3), S. 551–572. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3777.

Obstein, Keith L.; Campbell, Mical S.; Reddy, K. Rajender; Yang, Yu-Xiao (2007): Association between model for end-stage liver disease and spontaneous bacterial peritonitis. In: *The American journal of gastroenterology* 102 (12), S. 2732–2736. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01485.x.

Ono, Yasuo; Watanabe, Takeshi; Matsumoto, Kaoru; Ito, Tadashi; Kunii, Otohiko; Goldstein, Elliot (2004): Opsonophagocytic dysfunction in patients with liver cirrhosis and low responses to tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in patients' blood. In: *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 10 (4), S. 200–207. DOI: 10.1007/s10156-004-0321-7.

Pascual, Sonia; Such, Jose; Esteban, Angel; Zapater, Pedro; Casellas, Juan A.; Aparicio, Jose R. et al. (2003): Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. In: *Hepato-gastroenterology* 50 (53), S. 1482–1486.

Perry, Mary Ellen (2010): The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (1), a000968. DOI: 10.1101/cshperspect.a000968.

Pflaum, Johanna; Schlosser, Sophie; Muller, Martina (2014): p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. In: *Frontiers in oncology* 4, S. 285. DOI: 10.3389/fonc.2014.00285.

Philpott, D. J.; McKay, D. M.; Mak, W.; Perdue, M. H.; Sherman, P. M. (1998): Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. In: *Infection and immunity* 66 (4), S. 1680–1687.

- Pitolli, Consuelo; Wang, Ying; Candi, Eleonora; Shi, Yufang; Melino, Gerry; Amelio, Ivano (2019): p53-Mediated Tumor Suppression. DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. In: *Cancers* 11 (12). DOI: 10.3390/cancers11121983.
- Post, S.; Weng, Y. C.; Cimprich, K.; Chen, L. B.; Xu, Y.; Lee, E. Y. (2001): Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G(1)/S checkpoint activation in response to DNA damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23), S. 13102–13107. DOI: 10.1073/pnas.231364598.
- Ra, Greta; Tsien, Cynthia; Renner, Eberhard L.; Wong, Florence Suet-Hing (2015): The Negative Prognostic Impact of a First Ever Episode of Spontaneous Bacterial Peritonitis in Cirrhosis and Ascites. In: *Journal of clinical gastroenterology* 49 (10), S. 858–865. DOI: 10.1097/MCG.0000000000000311.
- Rimola, A.; Soto, R.; Bory, F.; Arroyo, V.; Piera, C.; Rodes, J. (1984): Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 4 (1), S. 53–58.
- Rimola, Antoni; García-Tsao, Guadalupe; Navasa, Miquel; Piddock, Laura J.V.; Planas, Ramon; Bernard, Brigitte; Inadomi, John M. (2000): Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis. A consensus document. In: *Journal of hepatology* 32 (1), S. 142–153. DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80201-9.
- Rodriguez, M. S.; Desterro, J. M.; Lain, S.; Lane, D. P.; Hay, R. T. (2000): Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. In: *Molecular and cellular biology* 20 (22), S. 8458–8467. DOI: 10.1128/MCB.20.22.8458-8467.2000.
- Runyon, B. A.; Morrissey, R. L.; Hoefs, J. C.; Wyle, F. A. (1985): Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 5 (4), S. 634–637.
- Runyon, Bruce A. (2013): Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guideline management of adult patients with ascites due to cirrhosis 2012. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (4), S. 1651–1653. DOI: 10.1002/hep.26359.

- Sadik, R.; Abrahamsson, H.; Björnsson, E.; Gunnarsdottir, A.; Stotzer, P.-O. (2009): Etiology of portal hypertension may influence gastrointestinal transit. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38 (10), S. 1039–1044. DOI: 10.1080/00365520310004939.
- Saitoh, Osamu (1999): Increased prevalence of intestinal inflammation in patients with liver cirrhosis. In: *WJG* 5 (5), S. 391. DOI: 10.3748/wjg.v5.i5.391.
- Scherm, S.; Haderer, M.; Aschenbrenner, E.; Pollinger, K.; Schlosser, S.; Kunst, C.; Müller-Schilling, M. (2019): Entzündungsparameter im Aszites bei Leberzirrhosepatienten – neue potentielle Biomarker zur Diagnose der spontan bakteriellen Peritonitis? In: *Z Gastroenterol*, 57 (06), e171.
- Schmittgen, Thomas D.; Livak, Kenneth J. (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. In: *Nature protocols* 3 (6), S. 1101–1108.
- Schneider, Marlon R.; Dahlhoff, Maik; Horst, David; Hirschi, Benjamin; Trülzsch, Konrad; Müller-Höcker, Josef et al. (2010): A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. In: *PloS one* 5 (12), e14325. DOI: 10.1371/journal.pone.0014325.
- Scholtis, A.; Haderer, M.; Aschenbrenner, E.; Gschwendtner, H.; Kunst, C.; Gülow, K.; Müller-Schilling, M. (2019): Induktion von Zelltod und Reduktion von p53-Proteinen in intestinalen Epithelzellen durch *E. coli* – ein Pathogenesemechanismus der spontan bakteriellen Peritonitis. In: *Viszeralmedizin 2019*. Wiesbaden, 2/10/2019 - 5/10/2019: Georg Thieme Verlag KG (Zeitschrift für Gastroenterologie).
- Seitz, Sarah J.; Schleithoff, Elisa Schulze; Koch, Andreas; Schuster, André; Teufel, Andreas; Staib, Frank et al. (2010): Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. In: *International journal of cancer* 126 (9), S. 2049–2066. DOI: 10.1002/ijc.24861.
- Sethi, Isha; Romano, Rose-Anne; Gluck, Christian; Smalley, Kirsten; Vojtesek, Borivoj; Buck, Michael J.; Sinha, Satrajit (2015): A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. In: *BMC genomics* 16, S. 584. DOI: 10.1186/s12864-015-1793-9.

- Sharma, Arishya; Singh, Kamini; Almasan, Alexandru (2012): Histone H2AX phosphorylation. A marker for DNA damage. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 920, S. 613–626. DOI: 10.1007/978-1-61779-998-3_40.
- Shawki, Ali; McCole, Declan F. (2017): Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive Escherichia coli. In: *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 3 (1), S. 41–50. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2016.10.004.
- Shi, Ying; Kellingray, Lee; Zhai, Qixiao; Le Gall, Gwenaelle; Narbad, Arjan; Zhao, Jianxin et al. (2018): Structural and Functional Alterations in the Microbial Community and Immunological Consequences in a Mouse Model of Antibiotic-Induced Dysbiosis. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 1948. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01948.
- Shi, Yong; Norberg, Erik; Vakifahmetoglu-Norberg, Helin (2020): Mutant p53 as a Regulator and Target of Autophagy. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 607149. DOI: 10.3389/fonc.2020.607149.
- Shieh, Sheau-Yann; Ikeda, Masako; Taya, Yoichi; Prives, Carol (1997): DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. In: *Cell* 91 (3), S. 325–334. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80416-X.
- Siegl, Christine; Prusty, Bhupesh K.; Karunakaran, Karthika; Wischhusen, Jorg; Rudel, Thomas (2014): Tumor suppressor p53 alters host cell metabolism to limit Chlamydia trachomatis infection. In: *Cell reports* 9 (3), S. 918–929. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.10.004.
- Siegl, Christine; Rudel, Thomas (2015): Modulation of p53 during bacterial infections. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (12), S. 741–748. DOI: 10.1038/nrmicro3537.
- Simonovic, I.; Rosenberg, J.; Koutsouris, A.; Hecht, G. (2000): Enteropathogenic Escherichia coli dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. In: *Cellular microbiology* 2 (4), S. 305–315.
- Singal, A. K.; Salameh, H.; Kamath, P. S. (2014): Prevalence and in-hospital mortality trends of infections among patients with cirrhosis: a nationwide study of hospitalised patients in the United States. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 40 (1), S. 105–112. DOI: 10.1111/apt.12797.

- Solomon, H.; Sharon, M.; Rotter, V. (2014): Modulation of alternative splicing contributes to cancer development. Focusing on p53 isoforms, p53 β and p53 γ . In: *Cell death and differentiation* 21 (9), S. 1347–1349. DOI: 10.1038/cdd.2014.99.
- Speidel, Daniel (2010): Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. In: *Trends in cell biology* 20 (1), S. 14–24. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.10.002.
- Srinivasan, Balaji; Kolli, Aditya Reddy; Esch, Mandy Brigitte; Abaci, Hasan Erbil; Shuler, Michael L.; Hickman, James J. (2015): TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In: *Journal of laboratory automation* 20 (2), S. 107–126. DOI: 10.1177/2211068214561025.
- Strand, S.; Hofmann, W. J.; Hug, H.; Müller, M.; Otto, G.; Strand, D. et al. (1996): Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-- a mechanism of immune evasion? In: *Nature medicine* 2 (12), S. 1361–1366. DOI: 10.1038/nm1296-1361.
- Such, J.; Runyon, B. A. (1998): Spontaneous bacterial peritonitis. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 27 (4), 669-74; quiz 675-6.
- Sun, Duxin; Lennernas, Hans; Welage, Lynda S.; Barnett, Jeffery L.; Landowski, Christopher P.; Foster, David et al. (2002): Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. In: *Pharmaceutical research* 19 (10), S. 1400–1416.
- Suzuki, Takuya (2013): Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (4), S. 631–659. DOI: 10.1007/s00018-012-1070-x.
- Tandon, Puneeta; Garcia-Tsao, Guadalupe (2008): Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. In: *Seminars in liver disease* 28 (1), S. 26–42. DOI: 10.1055/s-2008-1040319.
- Teltschik, Zora; Wiest, Reiner; Beisner, Julia; Nuding, Sabine; Hofmann, Claudia; Schoelmerich, Juergen et al. (2012): Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (4), S. 1154–1163. DOI: 10.1002/hep.24789.

Tomita, York; Marchenko, Natasha; Erster, Susan; Nemajerova, Alice; Dehner, Alexander; Klein, Christian et al. (2006): WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization.

In: *The Journal of biological chemistry* 281 (13), S. 8600–8606. DOI:

10.1074/jbc.M507611200.

Tsiaoussis, Georgios I.; Assimakopoulos, Stelios F.; Tsamandas, Athanassios C.; Triantos, Christos K.; Thomopoulos, Konstantinos C. (2015): Intestinal barrier dysfunction in cirrhosis: Current concepts in pathophysiology and clinical implications.

In: *World journal of hepatology* 7 (17), S. 2058–2068. DOI:

10.4254/wjh.v7.i17.2058.

Turner, J. R.; Rill, B. K.; Carlson, S. L.; Carnes, D.; Kerner, R.; Mrsny, R. J.; Madara, J. L. (1997): Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. In: *The American journal of physiology* 273 (4 Pt 1), C1378-85.

Turner, Jerrold R. (2009): Intestinal mucosal barrier function in health and disease.

In: *Nature reviews. Immunology* 9 (11), S. 799–809. DOI: 10.1038/nri2653.

Vaishnava, Shipra; Behrendt, Cassie L.; Ismail, Anisa S.; Eckmann, Lars; Hooper, Lora V. (2008): Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52), S. 20858–20863.

DOI: 10.1073/pnas.0808723105.

van Itallie, Christina M.; Anderson, James M. (2006): Claudins and epithelial paracellular transport. In: *Annual review of physiology* 68, S. 403–429. DOI:

10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404.

Vanhaesebroeck, Bart; Guillermet-Guibert, Julie; Graupera, Mariona; Bilanges, Benoit (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (5), S. 329–341. DOI: 10.1038/nrm2882.

Vielfort, Katarina; Söderholm, Niklas; Weyler, Linda; Vare, Daniel; Löfmark, Sonja;

Aro, Helena (2013): Neisseria gonorrhoeae infection causes DNA damage and

affects the expression of p21, p27 and p53 in non-tumor epithelial cells. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 1), S. 339–347. DOI: 10.1242/jcs.117721.

- Voss, Anne K.; Strasser, Andreas (2020): The essentials of developmental apoptosis. In: *F1000Research* 9. DOI: 10.12688/f1000research.21571.1.
- Vousden, Karen H.; Lu, Xin (2002): Live or let die: the cell's response to p53. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (8), S. 594–604. DOI: 10.1038/nrc864.
- Vousden, Karen H.; Prives, Carol (2009): Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. In: *Cell* 137 (3), S. 413–431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.
- Wang, Fengjun; Graham, W. Vallen; Wang, Yingmin; Witkowski, Edwina D.; Schwarz, Brad T.; Turner, Jerrold R. (2005): Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. In: *The American journal of pathology* 166 (2), S. 409–419. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62264-X.
- Waza, Ajaz Ahmad; Hamid, Zeenat; Ali, Sajad; Bhat, Shabir Ahmad; Bhat, Musadiq Ahmad (2018): A review on heme oxygenase-1 induction. Is it a necessary evil. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 67 (7), S. 579–588. DOI: 10.1007/s00011-018-1151-x.
- Wei, Jinxiong; Nagy, Toni A.; Vilgelm, Anna; Zaika, Elena; Ogden, Seth R.; Romero-Gallo, Judith et al. (2010): Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. In: *Gastroenterology* 139 (4), S. 1333–1343. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.06.018.
- Wiest, Reiner; Lawson, Melissa; Geuking, Markus (2014): Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. In: *Journal of hepatology* 60 (1), S. 197–209. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.07.044.
- Yan, Arthur W.; Fouts, Derrick E.; Brandl, Johannes; Starkel, Peter; Torralba, Manolito; Schott, Eckart et al. (2011): Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (1), S. 96–105. DOI: 10.1002/hep.24018.
- Yang, A.; Kaghad, M.; Wang, Y.; Gillett, E.; Fleming, M. D.; Dötsch, V. et al. (1998): p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. In: *Molecular cell* 2 (3), S. 305–316. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80275-0.

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Lorenz Wächter, geboren am 24.05.1993 in Eschenbach i. d. OPf, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Neutraubling, 27.03.2022

Lorenz Wächter

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank insbesondere Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling, die mich außerordentlich freundlich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Vom ersten Gespräch, über die regelmäßigen Treffen während meiner Zeit im Labor bis hin zur Erstellung dieser Doktorarbeit erfuhr ich jederzeit konstruktive Unterstützung. Vielen Dank für diese Förderung und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit auf einem so wunderbar faszinierenden Feld der Medizin durchführen zu können. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle die regelmäßige Ermutigung und Ermöglichung der Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen durch Frau Prof. Dr. Müller-Schilling. Dies war ein hervorragender Weg die wissenschaftlichen Ergebnisse mit einem breitem Fachpublikum zu teilen, wodurch sich oft hilfreiche Gespräche ergaben. Von der Vorbereitung auf diese Kongresse profitierten nicht zuletzt auch meine rhetorischen Fähigkeiten.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Sophie Schlosser, die mich insbesondere zu Beginn in die Welt der wissenschaftlichen Literatur und des wissenschaftlichen Schreibens einführte und für Fragen jederzeit ein offenes Ohr hatte.

Herzlichen Dank auch an PD Dr. Claudia Kunst und PD Dr. Karsten Gülow, die voller Herzblut für jede Art von Frage im Labor zur Verfügung standen und sich bereitwillig alle Entwürfe für Abstracts zu Gemüte führten. Ihr äußerst hilfreiches Feedback trug maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit bei.

Große Dankbarkeit empfinde ich gegenüber dem gesamten Laborteam. Vom Tag der ersten Hospitation an habe ich mich ausgesprochen herzlich aufgenommen gefühlt – und sogleich gemerkt, dass es sehr viel zu lernen gibt. Danke Lisa, Kirstin, Heidi, Manu und Andrea für eure Einführung in die Welt der Pipetten, Zellkulturen und Verdünnungsrechnungen.

Liebe Marika, dir gilt mein ganz besonderer Dank! Vielen Dank für die wundervolle Einarbeitung, Anleitung, Motivation und deine ab und an notwendigen ermutigenden Worte. Danke auch an Sophia, die zeitgleich mit mir ihre Laborzeit begann. Ich danke euch beiden für die großartige und unterhaltsame Laborzeit. Die kaum erinnerlichen

Zeiten der Ernüchterung konnten wir gut mit unserem Humor ausgleichen. Es hat mir große Freude bereitet mit euch zu arbeiten.

Ein weiterer Dank für die Anfertigung und Überlassung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen gilt Frau Dr. Marika Haderer und Herrn Dr. Christoph Brochhausen-Delius (Institut für Pathologie, Universität Regensburg).

Für die Möglichkeit der Präsentation meiner Forschungsergebnisse und die Verleihung des Preises für das beste Poster möchte ich stellvertretend Herrn Prof. Dr. Ansgar Lohse (Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber) danken.

Mein weiterer Dank für die Gewährung von Reisetipendien, welche die Kongressteilnahme ermöglichten, gilt stellvertretend Frau Prof. Dr. Petra-Maria Schumm-Draeger und Herrn Prof. Dr. Cornel Sieber (Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin).

Abschließend ist es mir ein besonderes Anliegen, meiner Familie und meiner Frau für die liebevolle Unterstützung, die aufbauenden Worte, das große Verständnis, aber auch für die geteilte Freude zu danken!