

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Die Rolle der p53 Familie bei der Entstehung einer
spontan bakteriellen Peritonitis**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Carina Steindl

2025

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Die Rolle der p53 Familie bei der Entstehung einer
spontan bakteriellen Peritonitis**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Carina Steindl

2025

Dekan:

Dipl. Phys. Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

1. Berichterstatterin

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA

2. Berichterstatter:in

Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung:

05.03.2026

„Wer nicht forscht, muss alles glauben“

Saskia Eich (2020)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Aufbau des menschlichen Darms.....	7
1.1.1	Aufbau des Darmepithels und der zweischichtigen Mukusschicht	7
1.1.2	Das Darmmikrobiom	8
1.2	Darm-Leber Achse	9
1.3	Leberfibrose, Leberzirrhose und das Hepatozelluläre Karzinom	10
1.4	Spontan bakterielle Peritonitis	11
1.4.1	Pathogenese der SBP.....	12
1.4.2	Veränderte Zusammensetzung der Darmflora	12
1.4.3	Erleichterte Bakterien-Epithel-Interaktion durch reduzierte Mukusschicht	13
1.4.4	Bakteriell-induzierter Abbau wichtiger Zell-Zell-Kontaktproteine und erhöhte intestinale Permeabilität	13
1.5	Die p53 Familie	15
1.5.1	Aufbau und Funktion der p53 Familienmitglieder	15
1.5.2	Die Rolle der p53 Familie bei Lebererkrankungen	16
1.5.3	Die Rolle der p53 Familie in der Bakterien-Epithelzell-Interaktion.....	17
1.6	Der Zelltod Paraptose	18
1.6.1	Charakteristika der Paraptose.....	18
1.6.2	Die Rolle von p53 in der Paraptose.....	20
1.7	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte und Laborbedarf.....	23
2.1.2	Software	25

2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.4	Antikörper.....	27
2.1.5	qRT-PCR Primer	28
2.1.6	Zelllinien mit variierendem p53 und p73 Status.....	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Zellbiologische Methoden	29
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	31
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.3	Studiendesign und -methoden der Untersuchung von Darmbiopsien von Patient(inn)en mit und ohne Leberzirrhose	33
2.3.1	Studienteilnehmende und Patient(inn)eninformation.....	33
2.3.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Darmbiopsien.....	34
2.3.3	RNA-Isolation, cDNA-Herstellung und qRT-PCR aus Darmbiopsien ..	34
2.3.4	Mukusfärbung der Darmbiopsien mit Alcian Blau sowie Muzikarmin ..	35
2.3.5	Gefrierschnitte aus Darmbiopsien und Immunfluoreszenzfärbung von p53 und p73	35
2.4	Statistische Analysen	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Analyse der Mukusdicke und der Expression der Proteine der p53 Familie in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose.....	37
3.1.1	Die Dicke der Mukusschicht im Kolon ist bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose reduziert.....	37
3.1.2	Die Expression von p53 und p73 ist in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose verringert.....	38
3.1.3	Bereits in frühen Stadien der Leberzirrhose tritt eine Reduktion von p53 und p73 im Darmepithel auf	40
3.1.4	Die Mukusdicke bei Leberzirrhose korreliert mit reduzierten p53- und p73-Proteinspiegeln	40

3.1.5	Die Reduktion der p53 Familie im Darmepithel erfolgt transkriptionsunabhängig	41
3.2	Untersuchung der bakteriell-induzierten Reduktion der p53 Familie im (ko) SBP-Modell	41
3.2.1	Die Bakterien-Epithelzell-Interaktion führt zu dynamischen Veränderungen der p53-Spiegel	42
3.2.2	Die Bakterien-Epithelzell-Interaktion induziert den Abbau von p73.....	42
3.2.3	Dynamische Veränderung der p53-Spiegel nach bakterieller Ko-Kultur auch in Abwesenheit von p73.....	42
3.2.4	p53 Defizienz beschleunigt die bakteriell-induzierte Reduktion von p73.	43
3.3	Bakteriell-induzierter Zelltod: Charakterisierung der Paraptose und Bedeutung der p53 Familie	44
3.3.1	<i>E. coli</i> induzieren einen Caspase-unabhängigen Zelltod in HCT116 Zellen	46
3.3.2	Der bakteriell-induzierte Zelltod ist transkriptionsabhängig und wird durch Actinomycin D inhibiert	48
3.3.3	p53 und p73 Status beeinflussen die bakteriell-induzierte Zelltodkinetik	50
3.3.4	Der bakteriell-induzierte Zelltod geht p53/p73-unabhängig mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials einher	56
3.3.5	Elektronenmikroskopische Analyse der Kinetik und Morphologie der bakteriell-induzierten Paraptose	62
3.3.6	Defizienz von p53 und p73 verzögert den Verlauf der bakteriell-induzierten Paraptose.....	66
3.3.7	Elektronenmikroskopischer Nachweis intrazellulärer Bakterien im <i>in vitro</i> -SBP-Modell	68
4	Diskussion	71

4.1	Bakterielle Einflussnahme auf die p53 Familie im Kontext der spontan bakteriellen Peritonitis	71
4.1.1	Auswirkungen der Reduktion der p53 Familie auf die SBP Entstehung..	71
4.1.2	Intrazelluläre Bakterien und ihre Auswirkungen auf die p53 Familie: Schutzmechanismus oder Überlebensvorteil?	73
4.2	Charakterisierung der durch Bakterien induzierten Paraptose und ihre Bedeutung für die SBP - Eine neue Rolle von p53 und p73.....	75
4.2.1	Die zytoplasmatischen Vakuolen gehen vom dilatierten ER und von dilatierten Mitochondrien aus.....	76
4.2.2	Die regulatorische Rolle von p53 und p73 in der Paraptose	78
4.2.3	Paraptose als möglicher Pathomechanismus in der SBP-Entstehung	79
5	Zusammenfassung	81
6	Abkürzungsverzeichnis.....	84
7	Literaturverzeichnis	86
8	Eigenständigkeitserklärung	99
9	Danksagung	I
10	Lebenslauf.....	III

1 Einleitung

1.1 Aufbau des menschlichen Darms

1.1.1 Aufbau des Darmepithels und der zweischichtigen Mukusschicht

Der menschliche Darm ist aus vier Schichten aufgebaut: der *Serosa*, der *Muscularis*, der *Submucosa* und der nach luminal reichenden *Mucosa*. Die *Mucosa* untergliedert sich in eine glatte Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*), eine bindegewebige Schicht (*Lamina propria*) und eine direkt ans Darmlumen angrenzende Zylinderepithelschicht (*Lamina epithelialis*). Die einschichtige Epithelschicht besteht vorwiegend aus Enterozyten, die als Villi bzw. Krypten formiert sind (Peterson & Artis, 2014). Das Darmepithel muss die besondere Herausforderung bewältigen, eine physikalische Barriere gegenüber Pathogenen darzustellen und gleichzeitig die Resorption von Wasser und Nahrungsbestandteilen zu gewährleisten. Daher kommen neben den Enterozyten weitere Zelltypen in der Darmepithelschicht vor. Paneth-Zellen und M-Zellen sind Teil der intestinalen Immunabwehr. Die kontinuierliche Zellerneuerung geht von pluripotenten Stammzellen am Kryptengrund aus. Becherzellen sezernieren Muzine, aus denen die Mukusschicht aufgebaut ist. Hauptbestandteil dieser Schicht ist das hochglykosylierte Mucin MUC2 (Gallego et al., 2023; Luis & Hansson, 2023; Peterson & Artis, 2014).

Dünn- und Dickdarm unterscheiden sich in ihren Funktionen und folglich auch in ihrem Aufbau. Während im Dünndarm vor allem Verdauung und Aufnahme von Nährstoffen im Vordergrund stehen, ist der Dickdarm vorrangig für Wasser- und Salzresorption zuständig.

Im Dünndarm ist der Mukus einschichtig und dünner aufgebaut, wohingegen der Mukus im Dickdarm zweischichtig und dicker ist (Ermund et al., 2013; Luis & Hansson, 2023). Die Mukusschicht stellt eine physikalische Barriere zwischen Mikroorganismen und Darmepithel dar. Im Dickdarm besteht sie aus zwei Schichten: einer inneren, dicht gepackten Schicht, die für Bakterien undurchdringbar ist (Gallego et al., 2023). Die äußere, luminal gelegene, lockerer aufgebaute Schicht ist von Bakterien besiedelt und wird von diesen zum Teil als Energiequelle genutzt (Johansson et al., 2008; Luis & Hansson, 2023). Der Mukus im Dünndarm ist lockerer strukturiert und für Bakterien potenziell durchdringbar (Ermund et al., 2013). Dennoch haben Bakterien keinen direkten Kontakt zu Epithelzellen. Das liegt einerseits an einer verstärkten

Absonderung antimikrobieller Peptide aus Paneth-Zellen und andererseits an einer ständigen Erneuerung des Mukus (Luis & Hansson, 2023).

Unterhalb der Mukusschicht wird die Darmbarriere durch Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen ergänzt. Diese regulieren insbesondere den parazellulären Stoff- und Wassertransport und dichten die Epithelschicht gegen das Eindringen potenzieller Krankheitserreger ab (Salvo Romero et al., 2015). Vier Hauptgruppen bilden die interzellulären Verbindungen, die von apikal nach basal in *Tight junctions*, *Adherens junctions*, *Gap junctions* und Desmosomen unterteilt werden (Salvo Romero et al., 2015). Durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten können Pathogene wie Bakterien in tiefere Darmschichten eindringen. Dies wird als bakterielle Translokation bezeichnet (García-Tsao, 2001).

1.1.2 Das Darmmikrobiom

Das menschliche Darmmikrobiom besteht aus Billionen von Mikroorganismen, die im Verdauungstrakt ansässig sind. Dazu zählen Bakterien, Viren, Archaeen und Eukaryonten, die den Magen-Darm-Trakt besiedeln. Das Mikrobiom entsteht bereits während der Geburt und seine Zusammensetzung wird durch unterschiedliche Umweltfaktoren beeinflusst. Neben genetischen Dispositionen nehmen Geburtsmodus, Alter und insbesondere Antibiotika sowie Ernährung Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms. Während Magen und Dünndarm geringer besiedelt sind, ist der Großteil des Mikrobioms im Dickdarm verortet (Gomaa, 2020; Kunst et al., 2023).

Das Zusammenleben von Darmmikrobiom und einem gesunden menschlichen Wirt ist symbiotisch. So bietet das Mikrobiom z. B. einen Schutz vor dem Eindringen von Pathogenen oder erleichtert die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen. Eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms wird Dysbiose genannt (Guarner & Malagelada, 2003; Thursby & Juge, 2017). Zahlreiche Erkrankungen werden mit einer Dysbiose in Verbindung gebracht. Hierzu zählen chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), Allergien, Autoimmunerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Übergewicht und Diabetes (Gomaa, 2020). Auch ein Zusammenhang zwischen steatotischen Lebererkrankungen (SLD; bis 2023 noch NAFLD genannt) und einer Dysbiose ist beschrieben (Henao-Mejia et al., 2012).

1.2 Darm-Leber Achse

Darm und Leber stehen auf vielfältige Art und Weise miteinander in Verbindung. Eine direkte anatomische Beziehung besteht über die Pfortader, über die das venöse, nährstoffreiche Blut des Darmtrakts zur Leber fließt. Die Pfortader gewährt bis zu 75 % der Blutversorgung der Leber. Über den Pfortaderkreislauf werden im Darm resorbierte Kohlenhydrate, Fettsäuren und Aminosäuren sowie mikrobielle Stoffwechselprodukte zur Leber transportiert. In den Hepatozyten werden die Nährstoffe verstoffwechselt und/oder gespeichert (Hsu & Schnabl, 2023). Im Pfortaderblut enthaltene mikrobielle Stoffwechselprodukte wirken auf Stoffwechsel- und Abwehrfunktion der Leber ein: Aus dem Mikrobiom stammendes D-Laktat fördert das Abfangen und Eliminieren von Pathogenen durch hepatische Kupffer-Zellen. So zeigte ein Mausmodell mit keimfreien Mäusen eine deutlich herabgesetzte Erregerelimination durch hepatische Kupffer-Zellen bei Infektion mit *Staphylococcus aureus*. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei antibiotischer Mikrobiom-Eradikation nachgewiesen. Durch Gabe von D-Laktat oder die Besiedelung der keimfreien Mäuse mit D-Laktat-produzierenden Bakterien konnte die Erregerabwehr über hepatische Kupffer-Zellen wiederhergestellt werden (McDonald et al., 2020).

Hepatozyten produzieren Gallenflüssigkeit, die in den Dünndarm abgegeben wird. Sie enthält Bicarbonat, Gallensäuren, IgA und antimikrobielle Substanzen und nimmt Einfluss auf das Mikrobiom (Hsu & Schnabl, 2023). Bei Ratten resultierte eine Unterbindung des Gallengangs in einer bakteriellen Überwucherung vor allem mit gram-negativen Aerobiern und einer erhöhten bakteriellen Translokationsrate (Inagaki et al., 2006).

Leber und Darm können auch über den systemischen Blutkreislauf miteinander wechselwirken. Entzündungsmediatoren oder Hormone, die in Leber oder Darm gebildet werden, werden ins Blut abgegeben und beeinflussen sich gegenseitig (Hsu & Schnabl, 2023).

Diese enge wechselseitige Verbindung bewirkt, dass Störungen in einem der beiden Systeme sich jeweils auf das andere auswirken können. So sind alkoholassoziierte Lebererkrankungen und steatotische Lebererkrankungen (SLD; bis 2023 noch NAFLD genannt) mit einer Dysbiose assoziiert (Henao-Mejia et al., 2012; Hsu & Schnabl, 2023; Llopis et al., 2016).

1.3 Leberfibrose, Leberzirrhose und das Hepatozelluläre Karzinom

Erkrankungen der Leber haben eine hohe Sterblichkeitsrate. Leberzirrhose ist mit jährlich 1,2 Millionen Todesfällen eine der häufigsten Todesursachen weltweit (Rang 11). Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) war im Jahr 2020 weltweit die fünfthäufigste Tumorentität und ist ebenso eine der häufigsten Todesursachen (16. Rang) (Asrani et al., 2019; Ferlay et al., 2021; Wilde & Katsounas, 2019). Sowohl in Ländern mit hohem Einkommen als auch in Ländern mit niedrigem Einkommen ist die Prävalenz der Leberzirrhose hoch und kann verschiedene Ursachen haben. Sie wird in der Regel durch eine chronische Entzündung der Leber mit nachfolgenden bindegewebigen Umbaus des Leberparenchyms ausgelöst (Ginès et al., 2021). In westlichen Ländern ist gesundheitsschädlicher Alkoholkonsum, häufig im Rahmen einer Alcohol Use Disorder (AUD), die führende Ursache. Daneben sind Übergewicht, steatotische Lebererkrankungen (SLD), Hepatitis-B oder -C Infektionen, Eisen- oder Kupfer-Speicher-Krankheiten sowie Autoimmunerkrankungen wie z. B. primär sklerosierende Cholangitis (PSC) typische Auslöser einer Leberzirrhose (Ginès et al., 2021). Auf dem Boden einer Leberzirrhose kann ein HCC entstehen. Nach wie vor hat das HCC eine schlechte Prognose und stellt weltweit die dritthäufigste krebbsbedingte Todesursache dar (Ge & Runyon, 2016; Michalski et al., 2023; Sung et al., 2021).

Im klinischen Alltag wird zwischen kompensierter und dekomensierter Leberzirrhose unterschieden. Bei kompensierter Leberzirrhose ist der fibrotische Umbau des Leberparenchyms noch weitgehend symptomlos. In der dekomensierten Situation treten Komplikationen der Leberzirrhose auf (Ginès et al., 2021). Typische Komplikationen sind Ikterus, (Varizen-)Blutungen, hepatische Enzephalopathie, hepato-renales Syndrom sowie Aszites mit oder ohne spontan bakterieller Peritonitis (siehe 1.4).

Zur Abschätzung des Schweregrads und der Prognose einer Leberzirrhose wird der Child-Pugh Score verwendet. Dieser wird anhand von fünf Parametern bestimmt: Serumalbumin, International Normalized Ratio (INR), Bilirubin, Aszitesmenge und Grad der hepatischen Enzephalopathie. Die Einteilung erfolgt nach aufsteigendem Erkrankungsgrad in Child-Pugh A, B oder C. Die 1-Jahres-Überlebensrate ist bei Child-Pugh A noch 100 %, bei Child-Pugh B auf 80 % verringert und bei Child-Pugh C nur 45 % (Bernardi & Caraceni, 2018). Für die Listung zur Lebertransplantation wird der

labReMELD-Na-Score (Model for End Stage Liver Disease) verwendet. In diesen Score fließen die Laborparameter Bilirubin, INR, Serum-Kreatinin sowie Serum-Natrium ein. Unabhängig von der Ätiologie der Leberzirrhose kann anhand des labReMELD-Na-Scores die Überlebenswahrscheinlichkeit der nächsten drei Monate abgeschätzt werden (Bernardi & Caraceni, 2018; Bundesärztekammer, 2025; Ginès et al., 2021; Goudsmit & Putter, 2021; Goudsmit et al., 2021).

1.4 Spontan bakterielle Peritonitis

Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose und wird in der S2k-Leitlinie 2018 der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) als eine bakteriell ausgelöste Entzündung der Peritonealhöhle ohne Vorhandensein eines anderen intraabdominellen Infektionsherdes definiert. Sie wird durch > 250 polymorphonukleäre (PMN-)Zellen pro mm^3 Aszites nachgewiesen. Der mikrobiologische Erregernachweis gelingt nur in 60 % der angelegten Kulturen, sollte aber zur optimalen Therapieplanung ebenfalls erfolgen (Gerbes et al., 2019).

Die SBP ist die häufigste bakterielle Infektion bei Leberzirrhose. Sie tritt bei etwa 17 % - 24 % aller stationär aufgenommenen Patient(inn)en mit Leberzirrhose auf (Fernández et al., 2002; Naim Abu-Freha et al., 2021). Bei etwa 3,5 % der ambulant behandelten, asymptomatischen Patient(inn)en liegt eine SBP vor (Evans et al., 2003; Gerbes et al., 2019). Die Prognose der SBP ist äußerst schlecht. Einen Monat nach Diagnosestellung beträgt die Mortalität bereits 34 % und wächst auf eine 1-Jahres-Mortalität von 66 % an (Schwabl et al., 2015).

Als Risikofaktoren für das Auftreten einer SBP wurden ein Child-Pugh C Status, erhöhte Bilirubinwerte, eine Hyponatriämie $< 125 \text{ mmol/L}$, > 100 PMN-Zellen/ μL Aszites, gastrointestinale Blutungen, niedrige Gesamteiweißmengen im Aszites ($< 1,0 \text{ g/dl}$) und frühere SBP-Infektionen beschrieben (Gerbes et al., 2019; Schwabl et al., 2015).

Eine neu aufgetretene, ambulant erworbene SBP soll entsprechend der S2k-Leitlinie der DGVS (Gerbes et al., 2019) mit Cephalosporinen der Gruppe 3a behandelt werden. Eine nosokomial erworbene SBP oder eine bereits antibiotisch vorththerapierte SBP soll leitliniengerecht mit Piperacillin/Tazobactam oder Carbapenemen therapiert werden. Bei Nachweis einer SBP soll eine empirische Antibiotikagabe unverzüglich

begonnen und im Verlauf antibiogrammgerecht angepasst werden (Gerbes et al., 2019). Zunehmende Resistenzen erschweren die Therapie. Bereits 14,5 % der nachgewiesenen Erreger sind multiresistent (Naim Abu-Freha et al., 2021). Daher werden neue Therapieoptionen dringend benötigt (Marciano et al., 2019; Naim Abu-Freha et al., 2021).

1.4.1 Pathogenese der SBP

Die bakterielle Translokation (BT) bezeichnet das Translozieren von Darmbakterien oder Erregerbestandteilen in die mesenterialen Lymphknoten (MLK). Bei Gesunden ist dieser Vorgang physiologisch und dient der Immunitätsausbildung. Eine BT wird dann als pathologisch bezeichnet, wenn sie in einer ungesunden Menge oder Häufigkeit auftritt (Berg & Garlington, 1979; Wiest et al., 2014). Bei Leberzirrhose tritt eine solche pathologisch erhöhte BT der Darmflora auf, die in der Folge zur Entwicklung einer SBP führen kann. Oral verabreichte, GFP-fluoreszenzmarkierte *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden bei Ratten mit Zirrhose sowohl in den MLK als auch im Aszites zu 40 % häufiger nachgewiesen (Teltschik et al., 2012). Die häufigsten nachgewiesenen Erreger der SBP gehören der natürlichen Darmflora an und sind gram-negative *Enterobacteriaceae* wie *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (Chopyk & Grakoui, 2020).

1.4.2 Veränderte Zusammensetzung der Darmflora

Sowohl die Zusammensetzung (Dysbiose) als auch die Menge (bakterielle Überwucherung) der Darmflora kann pathologisch verändert sein. Beide Veränderungen können bei Leberzirrhose sowohl im Dün- als auch im Dickdarm auftreten. Stuhluntersuchungen zeigten ein reduziertes Vorkommen von *Bacteroidetes* und ein vermehrtes Vorkommen von Proteobakterien und Fusobakterien bei vorbestehender Leberzirrhose. Zudem korreliert der Child-Pugh Score positiv mit dem Vorkommen von *Streptococcaceae* (Chen et al., 2011).

Auch die Darmflora des Dünndarms ist bei Leberzirrhose verändert. *Veillonella*, *Megasphaera*, *Dialister*, *Atopobium* und *Prevotella* sind im Duodenum von Patient(inn)en mit Leberzirrhose überrepräsentiert (Chen et al., 2016). Zusätzlich hat auch die Genese der Leberzirrhose einen Einfluss auf das Mikrobiom. Unterschiede im duodenalen Mikrobiom zeigten sich bei alkoholassoziierter Leberzirrhose verglichen mit viral induzierter Leberzirrhose (Dong et al., 2019). Fortgesetzt

Alkoholkonsum beeinflusst das Mikrobiom verglichen mit abstinent lebenden Patient(inn)en mit Leberzirrhose (Bajaj et al., 2017).

1.4.3 Erleichterte Bakterien-Epithel-Interaktion durch reduzierte Mukusschicht

Im gesunden Darm sorgt eine ausreichend dicke Mukusschicht für eine physikalische Trennung zwischen luminalen Darmbakterien und Darmepithel (vgl. 1.1.1). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Dicke des Mukus in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose signifikant reduziert ist (Haderer et al., 2022). Die physikalische Barriere zwischen Darmepithel und Mikrobiom ist folglich dysfunktional. Hierdurch wird ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Darmepithel ermöglicht, und die epitheliale Darmbarriere kann im nächsten Schritt durch den unmittelbaren bakteriellen Einfluss geschädigt werden.

MUC2 ist der wichtigste Baustein der Mukusschicht. In MUC2-defizienten Mäusen wurde ein direkter Bakterien-Epithel-Kontakt selbst in tiefen Kryptenabschnitten beobachtet. Vereinzelt konnten Bakterien in Darmepithelzellen eindringen und intrazellulär nachgewiesen werden (Johansson et al., 2011). Insgesamt traten bei MUC2-defizienten Versuchstieren Kolitiden, Diarrhoen, Wachstumsstörungen und eine deutlich erhöhte Rate an Kolonadenomen auf (Johansson et al., 2011; Johansson et al., 2008; Velcich et al., 2002).

1.4.4 Bakteriell-induzierter Abbau wichtiger Zell-Zell-Kontaktproteine und erhöhte intestinale Permeabilität

Die epitheliale Barriere wird als sogenannte „second line of defence“ gegenüber bakterieller Translokation angesehen. Wesentlicher Bestandteil dieses Abwehrmechanismus sind dichte Zell-Zell-Verbindungen. Bei Leberzirrhose ist die Integrität der epithelialen Barriere geschwächt. Unsere Vorarbeiten zeigen, dass wichtige Zell-Zell-Kontaktproteine wie E-Cadherin und Occludin in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose vermindert vorhanden sind. Unsere Daten zeigen außerdem, dass Bakterien aktiv am Abbau wichtiger Zell-Zell-Kontaktproteine beteiligt sind. Nach direktem Kontakt mit intestinalen Epithelzellen sind SBP-relevante *E. coli* und *Proteus mirabilis* in der Lage, E-Cadherin und Occludin zu degradieren. E-Cadherin als eines der wichtigsten *Adherens junction* Proteine wird durch eine von *E. coli* exprimierte Protease degradiert. Weiterhin führt ein bakteriell-induzierter

proteasomaler Abbau von Occludin, einem Hauptvertreter der *Tight junction* Proteine, zu einer Schwächung der Darmbarriere (Haderer et al., 2022).

Mit zunehmendem Schweregrad der Leberzirrhose, gemessen am Child-Pugh Score, wurden in einer anderen Studie abnehmende Mengen von Occludin und Claudin-1, einem weiteren Zell-Zell-Kontaktprotein, in Duodenalbiopsien gemessen. Dies führt zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität des Darmepithels für bakterielle Bestandteile (Endotoxine). Die Menge im Blut zirkulierender Endotoxine ist bei Leberzirrhose signifikant erhöht. Insbesondere bei dekompenzierter Leberzirrhose und bei geringen Occludin und Claudin-1 Mengen stieg die Endotoxinkonzentration aufgrund der erhöhten intestinalen Permeabilität an (Assimakopoulos et al., 2012).

Die Entstehung einer SBP, wie in Abbildung 1 dargestellt, fußt somit auf einer stark beeinträchtigten Integrität und damit gesteigerten Durchlässigkeit des Darmepithels.

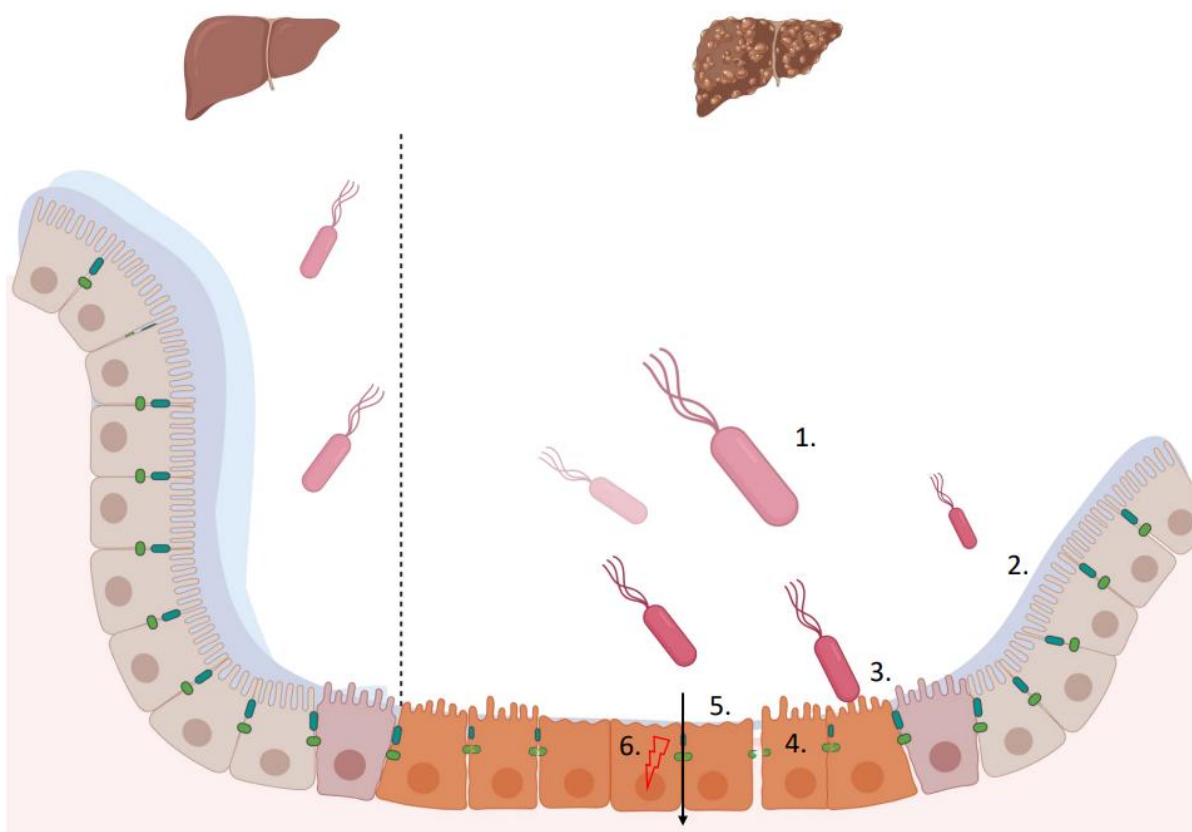


Abbildung 1 - **Pathogenese der SBP.** Patient(inn)en mit Leberzirrhose weisen eine Dysbiose auf (1). Bei Leberzirrhose ist die Dicke des Mukus reduziert (2). Hierdurch wird der direkte Kontakt von Bakterien mit Epithelzellen begünstigt (3). SBP-relevante Bakterien bauen aktiv Zell-Zell-Kontaktproteine ab (4). Dadurch ergibt sich eine gesteigerte intestinale Permeabilität, (5) wodurch mutmaßlich zellulärer Stress ausgelöst wird (6).

1.5 Die p53 Familie

Zellen besitzen verschiedene Mechanismen, um auf potenziell schädliche Einflüsse reagieren zu können. Als „Wächter des Genoms“ nimmt der Tumorsuppressor p53 hierbei eine zentrale Rolle ein. Seine Bedeutung zeigt sich unter anderem dadurch, dass bei über 70 % aller Krebserkrankungen ein Defekt von p53 zugrunde liegt (Kunst et al., 2016). Als Transkriptionsfaktor hat p53 eine Vielzahl an Funktionen. DNA-Reparaturmechanismen, Arrest des Zellzyklus, Einleitung der Seneszenz, Induktion des programmierten Zelltodes, insbesondere der Apoptose, und Stoffwechselregulation sind mit der Funktion von p53 verknüpft (Boutelle & Attardi, 2021; Kunst et al., 2016; Müller et al., 2006). Weiterhin wurde eine Beteiligung von p53 an der bakteriellen Abwehr beschrieben. Die Stabilisierung von p53 durch Nutlin-3 und Etoposid hemmte die Bildung der für den Replikationszyklus essenziellen Einschlusskörperchen und verringert dadurch die intrazelluläre Vermehrung von *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). (Siegl et al., 2014; Siegl & Rudel, 2015).

Neben p53 existieren weitere Strukturhomologe, p73 und p63, die zusammen mit p53 die p53 Familie bilden. Zusätzlich zu ihrer Rolle in der embryonalen Entwicklung, tragen beide p53-Homologe sowohl zur Tumorsuppression als auch zum onkogenen Potential von p53 bei (Cai et al., 2022; Gressner et al., 2005; Kunst et al., 2016; Müller et al., 2006).

1.5.1 Aufbau und Funktion der p53 Familienmitglieder

Die vielfältigen und zum Teil gegensätzlichen Aufgaben der p53 Familie werden von verschiedenen Isoformen erfüllt. Diese werden durch alternatives Splicing und unterschiedliche Promotoren aus einer gemeinsamen Grundstruktur generiert und im Anschluss posttranslational modifiziert. Der in Abbildung 2 skizzierte Grundaufbau setzt sich zusammen aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), die die Bindungsstelle für Regulationsfaktoren ist, einer prolinreichen Erkennungs-Sequenz (PRD), einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer Oligomerisierungsdomäne (OD) (Kunst et al., 2016).



Abbildung 2 – **Grundstruktur und modularer Aufbau des humanen p53-Gens.** Neben einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) besteht es aus einer prolinreichen Erkennungs-Sequenz (PRD), einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer Oligomerisierungsdomäne (OD).

Als sogenannter „Wächter des Genoms“ ist eine der grundlegenden Aufgaben der p53 Familie, im Rahmen der DNA-Damage Response (DDR) auf DNA-Schäden zu reagieren, indem DNA-Reparatursysteme, Zellzyklusarrest oder Zelltod ausgelöst werden (Müller et al., 1998; Vaddavalli & Schumacher, 2022).

Normalerweise wird die Menge von p53 in Zellen niedrig gehalten. Hierzu wird der proteasomale Abbau von p53 durch die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 eingeleitet. Expression und Abbau von p53 bilden einen über MDM2 vermittelten negativen Rückkopplungsmechanismus. Als zelluläre Reaktion auf Stressreize wie z. B. Hypoxie, DNA-Schäden oder oxidativen Stress, wird MDM2 über verschiedene Signalwege gehemmt. In der Folge steigt die zelluläre p53 Menge an. p53 bindet als Transkriptionsfaktor an seine Zielstrukturen in der DNA und löst so die zelluläre Stressantwort aus (Levine, 2020).

1.5.2 Die Rolle der p53 Familie bei Lebererkrankungen

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Aufgrund seines Einflusses auf die Regulation des Metabolismus hat p53 eine wichtige Funktion in der Leber und spielt zudem bei den pathophysiologischen Prozessen der Karzinogenese eine bedeutende Rolle.

Mehr als 70 % aller Tumoren weisen einen p53-Defekt auf. Auch das HCC ist häufig durch eine p53-Mutation gekennzeichnet (Kunst et al., 2016; Tümen et al., 2022). Gut verstanden ist, dass eine Aflatoxin-Exposition zu einer Mutation im p53-Gen an der dritten Base des Codons 249 führt. In der Folge ist das Risiko für die Entstehung eines HCCs stark erhöht. Außerdem wird die Wirkung einer (Chemo)-Therapie durch die p53 Menge beeinflusst. So führen niedrige p53-Spiegel zu einem schlechteren Ansprechen von Lebertumorzellen auf Therapeutika wie z. B. Bleomycin (Müller et al., 1997).

Leberfibrose stellt den Ausgangspunkt für die Entstehung einer Leberzirrhose und/oder eines HCC dar und steht eng mit der p53 Familie in Verbindung. Je nach Stadium der Leberschädigung variiert die Wirkung von p53 auf die Leber. Im

Anfangsstadium hat eine Aktivierung von p53 entzündungshemmende und antifibrotische Effekte. Bei anhaltender und chronischer Leberschädigung tragen sowohl Aktivierung von p53 als auch Seneszenz hepatischer Sternzellen (HSCs) zur Akkumulation von HSCs bei, die maßgeblich am fibrotischen Umbau der Leber beteiligt sind (Yu et al., 2022). In einem Mausmodell für Leberfibrose steigert ein p53 Knock-out (ko) die Fibrose im Lebergewebe, da die Seneszenz der HSCs blockiert wird (Guo et al., 2021).

1.5.3 Die Rolle der p53 Familie in der Bakterien-Epithelzell-Interaktion

Bakterien modulieren Signalwege von Wirtszellen, um ihren Lebenszyklus zu optimieren. Das steht im Gegensatz zur DNA Damage Response (DDR), die normalerweise Zelltod oder Seneszenz auslöst, sobald Schäden erkannt werden. Bei Bakterien der Gattungen *Helicobacter*, *Chlamydia* und *Shigella* wurde eine Einflussnahme auf die DDR über die Reduktion der p53 Familie beobachtet (Chumduri et al., 2016). *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein weit verbreiteter Krankheitserreger, dessen Besiedelung zu chronischen Magenschleimhautentzündungen, Magengeschwüren und schließlich zu Magentumoren führt. *H. pylori* blockiert den Transkriptionsfaktor USF1, der normalerweise p53 stabilisiert, sodass p53 vermehrt proteasomal abgebaut wird (Costa et al., 2020). Darüber hinaus führt der Virulenzfaktor CagA von *H. pylori* zur verstärkten Aktivität der E3-Ubiquitinligase MDM2, die den proteasomalen Abbau von p53 einleitet (Chumduri et al., 2016). Dies beeinträchtigt die Fähigkeit infizierter Zellen zur DNA-Reparatur und damit deren genetische Stabilität.

Eine Infektion mit *C. trachomatis* und *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) führt ebenfalls zum Abbau von p53. Dieser wird ebenso über erhöhte MDM2-Phosphorylierung vermittelt (Chumduri et al., 2016). Zusätzlich exprimiert *S. flexneri* den Virulenzfaktor VirA, dessen Proteaseaktivität zur Spaltung von p53 führt (Bergounioux et al., 2012).

Bakterien nehmen also über unterschiedliche Mechanismen Einfluss auf die p53 Familie. Es wird angenommen, dass die Reduktion von p53 das Überleben des Erregers verbessert, da keine p53-abhängige Apoptose ausgelöst wird, und so z. B. die bakterielle Replikation intrazellulär stattfinden kann (Siegl & Rudel, 2015).

1.6 Der Zelltod Paraptose

Zelltod ist ein wesentlicher Mechanismus, der bei Entstehung, Entwicklung, Wachstum und Homöostase von Organismen eine entscheidende Aufgabe erfüllt. Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat zu einem immer detaillierteren Verständnis der Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltodarten geführt. 2018 hat das internationale Nomenklatur-Komitee für Zelltod (NCCD) eine Klassifikation der Zelltodarten anhand ihrer molekularen Gesichtspunkte etabliert. Sie unterscheidet insbesondere zwischen programmierten und nicht-programmierten Zelltodarten (Galluzzi et al., 2018).

Der wohl bekannteste programmierte Zelltod ist die Apoptose. Sie kommt bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen vor. Dieser Zelltod wird über die Caspasen-Kaskade vermittelt. Morphologisch zeichnet sich Apoptose durch Fragmentierung der DNA, Zellschrumpfung und durch Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran aus. Besonders charakteristisch ist zudem die Zerlegung der Zelle in kleine membranumgebene Bruchstücke, die sogenannten Apoptosekörperchen (Galluzzi et al., 2018). Apoptose findet daher immer ohne die Induktion von Entzündungsprozessen statt.

Nekrose ist eine typische Form des unprogrammierten Zelltods. Sie stellt eine unkontrollierte und unmittelbare Reaktion auf chemische, physikalische oder mechanische Schädigungen sowie auf Entzündungsprozesse oder Hypoxie dar. Eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran lässt die Zelle bis hin zur Zellruptur anschwellen. Der austretende Zellinhalt löst im umliegenden Gewebe eine Entzündungsreaktion aus oder führt direkt zu Gewebeschäden (D'Arcy, 2019; Galluzzi et al., 2018).

Während Apoptose und Nekrose bereits gut erforscht sind, werden unbekanntere Zelltodarten wie Paraptose erst zunehmend verstanden.

1.6.1 Charakteristika der Paraptose

Paraptose ist eine Form des regulierten Zelltods, die neben der Apoptose existiert („para“ = neben). Sie wurde erstmals im Jahr 2000 von Sperandio et al. beschrieben. Die Zelltodform der Paraptose unterscheidet sich grundlegend von der Apoptose. Paraptose wird nicht durch die Caspasen-Kaskade vermittelt und kann daher auch

nicht durch den Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK blockiert werden. Morphologisch fehlen die für Apoptose typischen Apoptosekörperchen sowie DNA-Fragmentierung oder -Kondensation (Kunst et al., 2024; Sperandio et al., 2000).

Insbesondere das Auftreten multipler zytoplasmatischer Vakuolen mit einfacher Membran wird zum Nachweis der Paraptose verwendet (Kessel, 2019; Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020). Bei der Erstbeschreibung der Paraptose wurde die Vakuolisierung des Zytoplasmas sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch beobachtet. Die charakteristischen zytoplasmatischen Vakuolen gehen vom dilatierten endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder dilatierten Mitochondrien aus (Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020), schematisch dargestellt in Abbildung 3. Paraptose benötigt eine intakte Proteinsynthese und kann durch Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D und Translationsinhibitoren wie Cycloheximid blockiert werden. Daher zählt sie zu den regulierten Zelltodarten und grenzt sich so von den nekrotischen Zelltodarten ab (Sperandio et al., 2000).

Paraptose kann durch Aktivierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I-Rezeptors (IGF-IR) und seiner nachgeschalteten Signalwege, die Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) und JNK-Signalwege umfassen, ausgelöst werden (Sperandio et al., 2000; Sperandio et al., 2004). Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER sowie mitochondriale Ca^{2+} -Überladung gehen ebenfalls mit Paraptose einher (Ghosh et al., 2016; Kunst et al., 2024; Yoon et al., 2014). Durch diese Mechanismen entsteht eine osmotische Sogwirkung. Dadurch schwellen ER-Lumen und Mitochondrien an, was zur Vakuolisierung des Zytoplasmas führt (Yan et al., 2020).

Eine Reihe von Naturstoffen wie z. B. Curcumin oder Celastrol sowie photodynamische Therapie und Strahlentherapie können Paraptose auslösen und sind insbesondere für neue Tumorthérapien interessant. Durch die Auslösung von zellulärem Stress wie ER-Stress, oxidativem Stress oder mitochondrialer Dysfunktion werden paraptotische Signalwege aktiviert (Hanson et al., 2023; Kim et al., 2020; Kunst et al., 2024; Yoon et al., 2014).

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass auch Bakterien wie *E. coli* einen paraptotischen Zelltod in Darmepithelzellen auslösen können, wodurch möglicherweise die Entstehung einer SBP begünstigt wird (Neubert Philip, 2020).

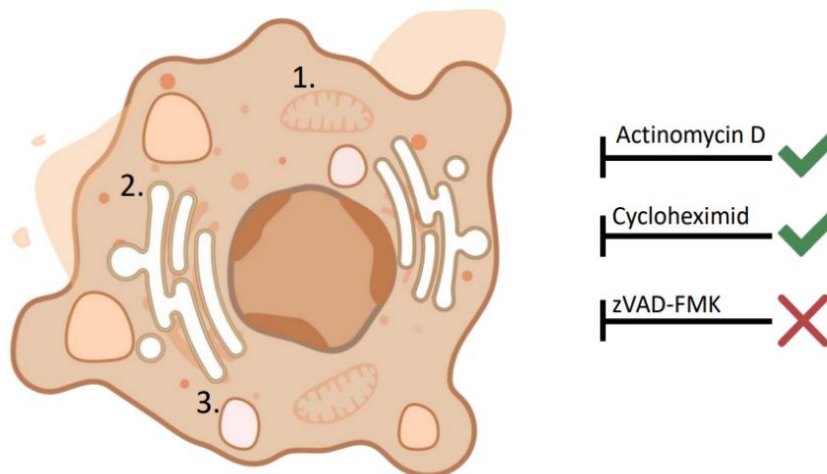


Abbildung 3 – **Kennzeichen der Paraptose.** Charakteristische Merkmale der Paraptose sind dilatierte Mitochondrien (1), ein dilatiertes ER (2), woraus eine zytoplasmatische Vakuolisierung (3) hervorgeht. Apoptosekörperchen, DNA-Fragmentierung oder -Kondensation fehlen. Der paraptotische Zelltod ist durch den Translationsinhibitor Actinomycin D und den Transkriptionsinhibitor Cycloheximid blockierbar. Der Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK blockiert diese Form des Zelltods nicht.

1.6.2 Die Rolle von p53 in der Paraptose

Die p53 Familie spielt eine wesentliche Rolle bei apoptotischen und anderen Caspase-unabhängigen Zelltodarten wie z. B. der Ferroptose, Nekroptose oder Autophagie (Le Jiang et al., 2015; Lane et al., 1994; Pflaum et al., 2014; Ranjan & Iwakuma, 2016). Welche Rolle p53 in der Paraptose hat, ist bislang noch unzureichend verstanden. Ginsenosid Rh2 induziert in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms parallel Apoptose und Paraptose in einer p53-abhängigen Weise (Li et al., 2011). Eine weitere Assoziation zwischen p53 und Paraptose wurde durch Pehar et al. (2010) beschrieben. Die p53-Isoform $\Delta 40p53$ (p44), bei der die N-terminale Region fehlt, führt zur Induktion des IGF-IR. Die erhöhten IGF-IR-Spiegel wiederum lösen dann einen paraptotischen Zelltod aus (Pehar et al., 2010). Dies deutet auf eine Funktion von p53 in der Paraptose hin. Für ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen sind weitere Untersuchungen nötig.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Mit einer 1-Jahres-Mortalität von 66 % ist die SBP eine der schwerwiegendsten Komplikationen der Leberzirrhose (Schwabl et al., 2015). Ein detaillierteres molekulares Verständnis des Integritätsverlustes der Darmbarriere und der daraus resultierenden bakteriellen Translokation ist notwendig, um neue Therapieansätze zu

finden. Verschiedene Bakterien, darunter *H. pylori*, *S. flexneri* und *C. trachomatis* inaktivieren die p53 Familie, um das Überleben ihrer Wirtszelle zu sichern (Chumduri et al., 2016). Vordaten unserer Arbeitsgruppe zeigen außerdem, dass auch SBP-relevante Bakterien wie *E. coli* und *K. pneumoniae* die p53 Familie in Darmepithelzellen reduzieren (Haderer, 2019). Angesichts der bei Leberzirrhose reduzierten Mukusschicht (Haderer et al., 2022) können Bakterien auch im Menschen bei Patienten mit Leberzirrhose direkt auf Darmepithelzellen einwirken. Wir haben daher die Effekte dieser verstärkten Interaktion von Bakterien mit Epithelzellen auf die Proteinspiegel der p53 Familie in einer großen Kohorte von Patient(inn)en mit Leberzirrhose untersucht. Die Auswirkungen eines Verlusts von p53 und/oder p73 auf zelluläre Funktionen wurden anhand von ko Zellmodellen untersucht. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Welche Proteinspiegel der p53 Familie finden sich in der Mukosa von Patient(inn)en mit Leberzirrhose im Vergleich zu gesunden Kontrollen?
- 2) Wie beeinflusst eine Defizienz von p53 und/oder p73 *in vitro* die Widerstandsfähigkeit von Epithelzellen gegenüber Bakterien?

Weiterhin haben Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass der direkte Kontakt von Bakterien und Darmepithelzellen eine Form von Zelltod auslöst, der alle Merkmale der Paraptose aufweist, wodurch die Darmbarriere im Kontext einer SBP zusätzlich geschwächt werden könnte (Neubert Philip, 2020). Die genaue Rolle der p53 Familie bei dieser Form des Zelltods ist noch nicht beschrieben. Wir haben daher p53 und/oder p73 ko Modelle generiert, die im Rahmen dieser Dissertation hinsichtlich der Morphologie und der Kinetik des bakteriell-induzierten Zelltods sowohl durchflusszytometrisch als auch elektronenmikroskopisch charakterisiert wurden, um folgende Fragen zu klären:

- 3) Welche Rolle spielt die p53 Familie bei der bakteriell-induzierten Paraptose?
- 4) Welche Charakteristika der Paraptose weisen Darmepithelzellen nach Bakterienkontakt auf und wie ist deren zeitliche Reihenfolge?

Insgesamt sollten im Rahmen dieser Arbeit die wechselseitigen Einflüsse zwischen der Mukusschicht, der Bakterien-Epithel-Interaktion, der p53 Familie und der Paraptose auf die Entstehung einer SBP untersucht werden (Abbildung 4).

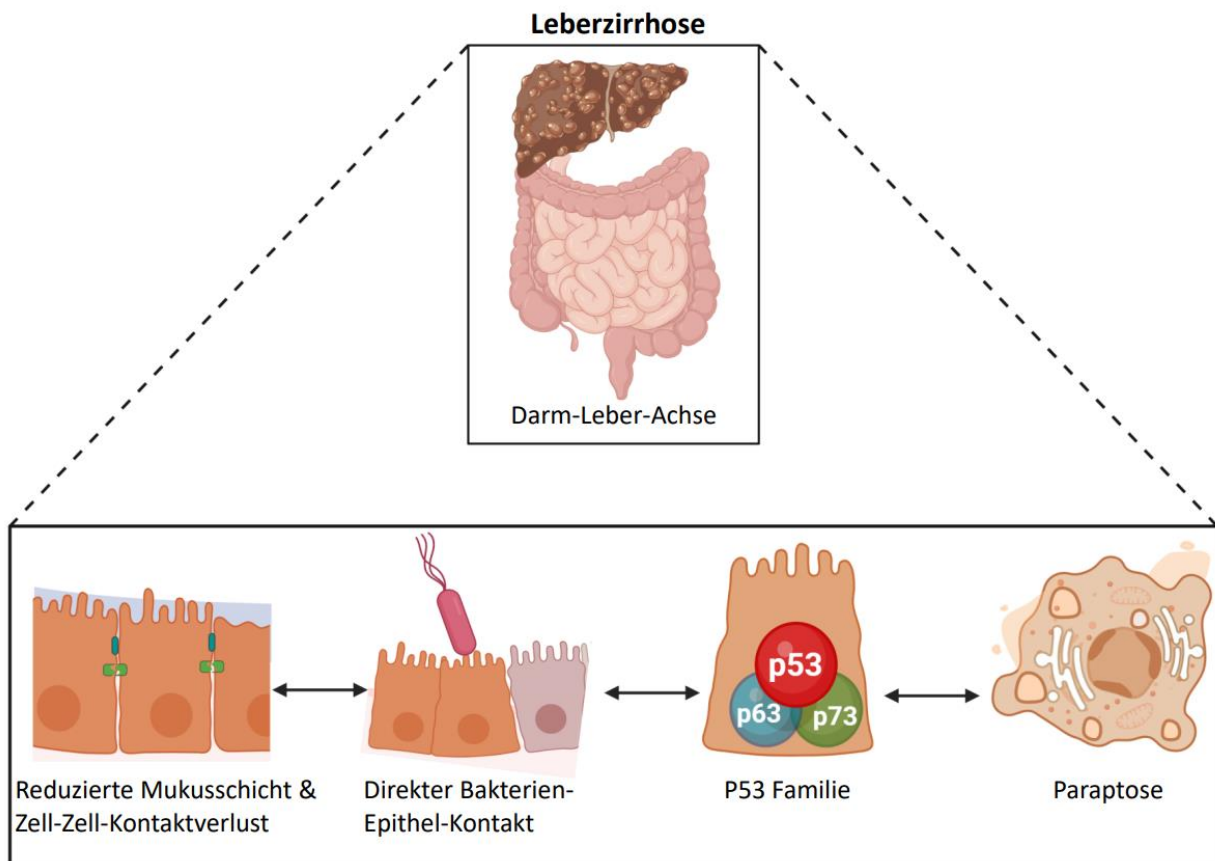


Abbildung 4 - **Zielsetzung der Arbeit.** Untersuchung der wechselseitigen Einflüsse zwischen der Mukusschicht, der Bakterien-Epithel-Interaktion, der Rolle der p53 Familie und der Paraptose in Bezug auf die Entstehung einer SBP.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Analysenwaage Excellence XA 105 Dual Range	Mettler Toledo, Deutschland
CB 210 Inkubator	Binder GmbH, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Costar® Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, USA
Durchflusszytometer BD LSR Fortessa	BD Biosciences, USA
Elektrophorese Netzgerät EV261	Consort bvba, Belgien
Elektroporation Küvetten	peQlab, Deutschland
Emax Plus Mikrotiterplatten Lesegerät	Molecular Devices, USA
Eppendorf Easypet®	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Gefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Deutschland
Falcon® 5 ml Round Bottom Polystyrene Test Tube	Corning, USA
Falcon® 14 ml Polypropylen Round Bottom Tube	Corning, USA
Falcon® Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Corning, USA
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M mit HAL-100 Laser	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Grade Whatman 3MM Chr Fließpapier	GE Healthcare, USA
Halb-Mikro-Küvette 3 ml	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Kanülen 20 G	BD Microlance™, Deutschland
Keyence VHX-7000 Mikroskop	Keyence GmbH, Deutschland
Laborwaage	Satorius Laboratory, Deutschland
Leica CM3050 S Krystat	Leica Biosystems, Deutschland
Leica Laser Scanning TCS SP5 SMD Konfokalmikroskop	Leica Biosystems, Deutschland

Light Cycler® 480 384 well Platte	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cycler® 480 Siegelfolie	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cycler® 480 System	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Milli-Q® IQ 7000 Reinstwassersystem	Merck Millipore, USA
Mini-PROTEAN® TGX Fertiggel 12 %	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Nanophotometer IMPLEN	Implen GmbH, Deutschland
Pipetman	Gilson, USA
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Schüttelgerät Certomat® R	B. Braun Biotech International GmbH, Deutschland
Schüttelgerät MTS2/4 digital	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Deutschland
Spritzen 1 ml	BD Plastipak™, Deutschland
Sterilbank Laminair HB2448	Heraeus, Deutschland
T3 Thermoblock	Biometra GmbH, Deutschland
TC20™ Zählkammer	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
TE77XP Semi-Dry Transfer Unit	Hoefer Inc, USA
Transferpette®	Brand GmbH & Co.KG, Deutschland
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf AG, Deutschland
Ultraschall Homogenisator	Bandelin, Deutschland
Vortexer Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Wasserbad WNE7	Memmert GmbH & Co.KG, Deutschland
Zählkammer für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Zellkulturflaschen T-75 und T-175	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellkulturschale 100x20 mm, Standard	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zentrifuge Micro Star 17	VWR International GmbH, USA
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Deutschland

Tabelle 1 Geräte und Laborbedarf

2.1.2 Software

Axio Vision 4,8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
FACSDiva™	BD Biosciences, USA
FlowJo™ v.10.8.1	BD Biosciences, USA
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
LightCycler® 480 Version 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Microsoft Excel, Power Point, Word 2021	Microsoft, USA
Prism 8	GraphPad Software, USA
SoftMax Pro 7	Molecular Devices, USA

Tabelle 2 Software

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
6-Aminohexansäure	Merck Millipore, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	BioLegend, USA
Actinomycin D	Tocris Bioscience, UK
Alcian Blau	Institut für Pathologie, Universität Regensburg, Deutschland
Annexin V Binding Buffer, 10x concentrate, BD Pharmingen™	BD Biosciences, USA
APC Annexin V	BD Biosciences, USA
BCA Protein Assay Kit Pierce™	Thermo Fisher Scientific™, USA
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	PanReac AppliChem, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
cOmplete™ Mini tablets, Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
DAPI Lösung, BD Pharmingen™	BD Biosciences, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's PBS + MgCl ₂ + CaCl ₂	Sigma-Aldrich, USA

Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&Sell, Deutschland
Fixierlösung nach Karnovsky	Institut für Pathologie, Universität Regensburg, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
McCoy's 5A Medium, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS), 20 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
PageRuler™ Plus Proteinleiter, 10 bis 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA
Panobinostat (LBH589)	Selleck Chemicals, USA
PhosSTOP™ EASYpack	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Polyacrylamid Fertiggel (12 %)	BioRad Laboratories Inc, USA
ProLong™ Gold Eindeckmittel mit DAPI	Thermo Fisher Scientific, USA
p-Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich, USA
QuantiFast®SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Niederlande
QuantiTect Reverse Transkription (RT) Kit	Qiagen, Niederlande
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer	Sigma-Aldrich, USA
ReBlot Plus Strong Stripping Lösung, 10x	Merck Millipore, USA
RLT Lysepuffer	Qiagen, Niederlande
RNaseZap® Ambion™	Thermo Fisher Scientific, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Niederlande
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Tabelle 3 Chemikalien und Reagenzien

Die Auflistung enthält die verwendeten Nicht-Standard-Reagenzien. Standard-Reagenzien wurden von handelsüblichen Herstellern bezogen und sind nicht aufgelistet.

2.1.4 Antikörper

Blockier-Lösung: 5 % Milchpulver oder 5 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBST. Für den Antigen-Nachweis wurden PVDF-Membranen über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper in 5 % Milchpulver-Lösung bzw. 5 % BSA-Lösung in PBST inkubiert. Sekundärantikörper wurden in der jeweils entsprechenden Blockier-Lösung inkubiert. Die im Western Blot verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Antigen	ID	Hersteller	Verdünnung	Ursprung
TP53	sc-126/DO-1	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1/1000 (Milch)	Maus
TP73	ab40658/EP436Y	Abcam	1/1000 (BSA)	Kaninchen
Sek. Kaninchen IgG	A0545	Sigma Aldrich	1/10000	
Sek. Maus IgG	A9044	Sigma Aldrich	1/10000	
β-Actin	A3854	Sigma Aldrich	1/5000 (Milch)	

Tabelle 4 Antikörper für Western Blot

Die für Immunfluoreszenzfärbungen der Gefrierschnitte von Kolonbiopsien verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Antigen	ID	Hersteller	Verdünnung / Konzentration	Ursprung
TP53	sc-126/DO-1	Santa Cruz Biotechnology Inc.	4 µg/ml	Maus
TP73	ab40658/EP436Y	Abcam	11 ng/ml	Kaninchen
Anti-Maus Alexa Fluor 488	AB_2534069	Invitrogen	1:1000	Ziege
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	AB_2534079	Invitrogen	1:1000	Ziege
Isotyp Kontrolle Maus	Ab18415 MG2a-53	Abcam	4 µg/ml	Maus
Isotyp Kontrolle Kaninchen	Ab37415	Abcam	11 µg/ml	Kaninchen

Tabelle 5 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

2.1.5 qRT-PCR Primer

Die für die qRT-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Metabion International AG, Deutschland) bezogen und in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt. Die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die mRNA-Spiegel von *TP73* wurde mit Primern der Firma Quiagen (QT00030240, QT00088935) bestimmt.

Antigen	Spezies	forward 5' – 3'	reverse 5' – 3'
β2MG	Mensch	CCACTGAAAAAGATGAGT ATGCCT	CCAATCCAAATGCGGCAT CTTCA
MUC2	Mensch	CACCTGTGCCCTGGAAG GC	CGGTCACGTGGGGCAGG TTC
TP53	Mensch	AGGCCTTGGAAGTCAAG GAT	TTATGGCGGGAGGTAGA CTG

Tabelle 6 Primer qRT-PCR

2.1.6 Zelllinien mit variierendem p53 und p73 Status

Die kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie HCT116 wächst mehrschichtig und ohne enterozytenähnliche Differenzierung (Chantret et al., 1988). HCT116 Wildtyp (wt) sind Zellen mit funktionellem p53 und p73 (Liu & Bodmer, 2006; Vilgelm et al., 2010). Um bakterielle Effekte auf einzelne p53 Familienmitglieder zu untersuchen und das Fehlen von p53 Familienmitgliedern zu untersuchen, wurden folgende ko Zelllinien verwendet: HCT116 p53 ko, HCT116 p73 ko und HCT116 p53/p73 ko mit einem zweifachen ko (Tabelle 7). Alle HCT116 Zelllinien wurden in Kooperation mit Thermo Fisher Scientific etabliert.

	p53	p73
HCT116 wt	ja	ja
HCT116 p53 ko	nein	ja
HCT116 p73 ko	ja	nein
HCT116 p53/p73 ko	nein	nein

Tabelle 7 Verwendete HCT116 Zelllinien

Die in Abbildung 5 gezeigte Western Blot-Analyse der verwendeten HCT116 Zelllinien bestätigt das Vorhandensein von p53 und p73 in der HCT116 wt Zelllinie sowie das Fehlen der entsprechenden Proteine in den ko Zelllinien.

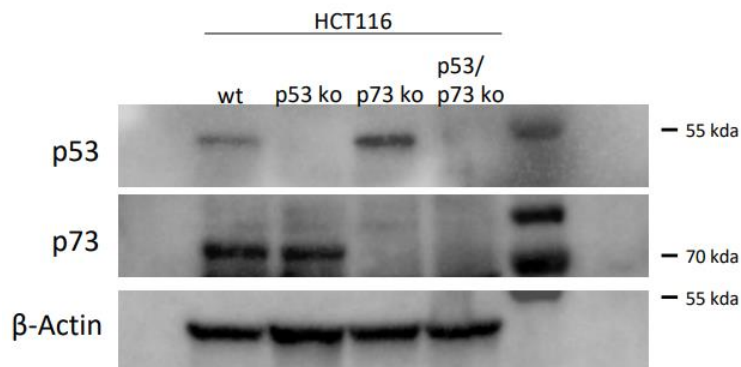


Abbildung 5 - Western Blot Analysen der verwendeten HCT116 Zelllinien.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur der HCT116 Zelllinien

HCT116 Zellkultur Medium: McCoy's 5A (Modified) Medium, 10 % FCS

Alle HCT116 Zelllinien wurden unter identischen Bedingungen kultiviert.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:8 gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1xTrypsin von der Zellkulturflasche gelöst und in McCoy's 5A Medium resuspendiert. Mit Hilfe des TC20™ Automated Cell Counter wurden die Zellen gezählt. Vor der Herstellung von Proteinlysaten und der FACS-Färbung wurden die Zellen jeweils zweimal mit PBS gewaschen und mit 1xTrypsin abgelöst. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 ml PBS (+10 % FCS) resuspendiert und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Annexin binding buffer resuspendiert.

2.2.1.2 SBP *in vitro* Ko-Kultur-Modell

Zur Simulation der bakteriellen Dysbiose, wie sie bei fortschreitender Leberzirrhose auftritt, wurden HCT116 Kolon Zelllinien mit *Escherichia coli* (*E. coli* O6:Hnt; siehe 2.2.2.1) ko-kultiviert. Um die Rolle der einzelnen p53 Familienmitglieder zu untersuchen, wurden vier HCT116 Zelllinien (Tabelle 7) mit unterschiedlichem p53 und p73 Status verwendet. Der Versuchsablauf war bei allen verwendeten Zelllinien identisch.

Es wurden 5×10^6 Zellen in 100x20 mm Zellkulturschalen ausgesät und für sechs Tage kultiviert. Vor der Ko-Kultur mit Bakterien wurde die Zellzahl bestimmt. Entsprechend der Zellzahl wurden die Bakterien mit einer Infektionsmultiplikation (MOI) von 5 zugegeben. Die HCT116 Zellen wurden für bis zu 4h bei 37 °C mit *E. coli* (O6:Hnt) Bakterien koinkubiert. In 30 min-Intervallen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse, die Herstellung von Proteinlysaten sowie die Fixierung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie (siehe 2.2.1.4).

2.2.1.3 Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Zelltods und des mitochondrialen Membranpotentials

Annexin binding buffer (ABB): 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , Hepes 10 mM, pH 7,4

APC Annexin V: 10 ng/5 μl

DAPI Solution: 1 mg/ml

Für die Analyse des Zelltods und des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Zellen, wie in 2.2.2.1 beschrieben, abgelöst, zentrifugiert und in 1 ml ABB resuspendiert.

Zur Analyse des Zelltods wurden 50 μl der Zellsuspension mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (0,1 $\mu\text{g/ml}$, in PBS + MgCl_2 + CaCl_2) und Allophycocyanin (APC)-konjugiertem Annexin V (0,2 ng/ml) für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurden 50 μl der Zellsuspension mit Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) in einer Endkonzentration von 500 nM für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem LSR Fortessa durchgeführt und mit Hilfe der Software FlowLogic ausgewertet.

Zur Bestimmung des spezifisch durch Bakterien oder andere Substanzen induzierten Zelltods muss der spontan eintretende Zelltod berücksichtigt werden. Spontaner Zelltod tritt sowohl in behandelten als auch unbehandelten Zellen durch unterschiedliche Auslöser auf. Mechanischer Stress, Noxen, thermische Zellschäden oder Pathogene können spontanen Zelltod verursachen. Daher wurde der spezifische Zelltod entsprechend folgender Gleichung bestimmt (Kaminski et al., 2007):

$$\text{spezifischer Zelltod (\%)} = \left[\frac{(\% \text{ Zelltod}_{\text{behandelte Zellen}} - \% \text{ Zelltod}_{\text{unbehandelte Zellen}})}{100 \% - \% \text{ Zelltod}_{\text{unbehandelte Zellen}}} \right] \times 100$$

2.2.1.4 Fixierung der Zellen zur elektronenmikroskopischen Analyse

Karnovsky-Fixativ: 2 % Paraformaldehyd; 2,5 % Glutaraldehyd

Der Zelltod der Paraptose zeichnet sich durch seine ultrastrukturelle Morphologie aus. Daher wurde die bakteriell-induzierte Paraptose in Intervallen von 30 Minuten elektronenmikroskopisch untersucht. Wie in 2.2.1.1 beschrieben, wurden die mit *E. coli* (O6:Hnt) kokultivierten HCT116 Zellen vorbereitet und jeweils 100 µl der Zellsuspension in 500 µl Karnovsky Reagenz fixiert. Es wurden sowohl HCT116 Wildtyp Zellen als auch HCT116 p53/p73 ko Zellen untersucht. Am Institut für Pathologie der Universität Regensburg in Kooperation mit Professor Brochhausen, jetzt Mannheim, wurden die Proben weiterverarbeitet und elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Laborstamm *E. coli* (O6:Hnt)

Für alle *in vitro* Versuche wurde der *E. coli* Laborstamm ATCC 25922 (O6:Hnt) verwendet.

2.2.2.2 Herstellen einer *E. coli* Übernachtskultur

Der *E. coli* Stamm wurde bei -80 °C in mit Glycerin versetztem LB-Medium gelagert. Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurde der *E. coli* Stamm 1:1000 in LB-Medium verdünnt und unter ständigem Schütteln für 14-16 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.3 Bestimmung der Bakterienzahl mittels optischer Dichte (OD₆₀₀)

Für die Bestimmung der Bakterienzahl und der Wachstumskurven wurde die OD₆₀₀ einer 1:8 Verdünnung der *E. coli* Kultur in LB-Medium gemessen. Laborinterne Eichgeraden wurden zur Berechnung der Bakterienzahl genutzt. Für Ko-Kultur Versuche wurden die Bakterien mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 5 eingesetzt. LB-Medium allein stellte die entsprechende Kontrollgruppe dar (MOI 0).

2.2.2.4 Wachstumskurve von *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen

Zum Ausschluss bakteriostatischer/bakterizider Effekte von Actinomycin D oder DMSO wurden *E. coli* (O6:Hnt) in 80 µM Actinomycin D oder DMSO kultiviert und mit dem Wachstumsverhalten in reinem McCoy's 5A Medium verglichen. In Zeitintervallen

von 30 Minuten wurde die OD₆₀₀ gemessen und aus den Werten wurden die entsprechenden Wachstumskurven angefertigt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot-Analysen

Phosphataseinhibitor: PhosSTOP™ EASYpack (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland)

Proteaseinhibitor: cOmplete™ Mini tablets (Sigma-Aldrich, USA)

RIPA Lysepuffer: 150 mM NaCl, 1,0 % IGEPAL® CA-630, 0,5 % Natriumdeoxycholsäure, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, USA)

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen geerntet (vgl. Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.1.2). Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl RIPA-Puffer mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren aufgenommen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis und eine 20-minütige Zentrifugation bei 16000 x g (4 °C).

2.2.3.2 BCA-Proteinmengenbestimmung

BCA Protein Assay Kit Pierce™

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proteinlysate erfolgte mittels BCA-Protein-Assay. Die 1:10 verdünnten Proben wurden in Dreifachbestimmung durch Absorption bei 492 nm gemessen. BSA Referenzproben im Wertebereich von 200 – 2000 ng/ml dienten als Standardkontrollen.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2x Laemmli Puffer: 120 mM Tris pH 6,8; 20 % Glycerin; 4 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau; DTT

SDS Laufpuffer: 25 mM Tris Base; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS

Entsprechend der Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit RIPA Lysepuffer auf 9-15 µg Protein pro Probe verdünnt und mit 2x Laemmli Puffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte durch 5-minütige Inkubation bei 95 °C und anschließende 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur (1500 x g). Für die SDS-PAGE wurden 12 %ige gebrauchsfertige Gele verwendet (150 V, 500 mA, 40 min). 10 µl der

PageRuler™ Plus Proteinleiter dienten als Standard zur Analyse des Molekulargewichts der untersuchten Proteine.

2.2.3.4 Western Blot-Analysen

Anodenpuffer A: 300 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer B: 25 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4

Blockierlösung: 5 % Milch bzw. 5 % BSA in PBST

Detektionslösung: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarin-Säure in DMSO, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

Kathodenpuffer C: 25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4

Strippinglösung: 1x Re-Blot Plus Strong

Western Blot Waschpuffer: 1x PBS mit 0,05 % Tween-20 (PBST)

Die aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren auf die zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran transferiert. Das SDS-Gel und die Filterpapiere wurden in den jeweiligen Anoden- bzw. Kathodenpuffern equilibriert. Die Proteine wurden für 50 Minuten bei 80 V auf die Membran übertragen. Die Membranen wurden für 1 h in der Blockierlösung blockiert und über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Die Membranen wurden dreimal für 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Nach 1 h Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper wurden die Membranen erneut dreimal in Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde die zuvor mit 0,03 % H₂O₂ versetzte Detektionslösung verwendet. Für den Nachweis weiterer Proteine auf derselben Membran wurde die PVDF-Membran 20 Minuten bei Raumtemperatur in Strippinglösung inkubiert. Der Proteinnachweis wurde mit dem ChemiDoc XRS+ System durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde Image Lab™ (Bio-Rad) verwendet. Als Ladekontrolle diente β-Actin.

2.3 Studiendesign und -methoden der Untersuchung von Darmbiopsien von Patient(inn)en mit und ohne Leberzirrhose

2.3.1 Studienteilnehmende und Patient(inn)eninformation

In die Studie wurden Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose eingeschlossen, bei denen z. B. aufgrund einer bevorstehenden Lebertransplantation eine Koloskopie

indiziert war. Kontrollpatient(inn)en wiesen keine Leberzirrhose auf und wurden z. B. im Rahmen der Darmkrebsvorsorge koloskopiert. Die Koloskopie erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg. Entsprechend des Ethikvotums 16-101-0382 wurde die schriftliche Einverständniserklärung der Studienteilnehmenden vor der Untersuchung eingeholt. Im Durchschnitt wurden pro Patient(in) vier Biopsien entnommen.

2.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Darmbiopsien

Kolonbiopsien von Kontrollpatient(inn)en und Patient(inn)en mit Leberzirrhose wurden in 350 µl RIPA Lysepuffer gelöst und mit Ultraschall homogenisiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis sowie eine 20-minütige Zentrifugation bei 16000 x g (4 °C) (vgl. 2.2.3.1).

2.3.3 RNA-Isolation, cDNA-Herstellung und qRT-PCR aus Darmbiopsien

Für die RNA-Isolierung wurden die Kolonbiopsien in 600 µl RLT-Puffer (inklusive 3 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen und mit einer 1 ml Spritze zerkleinert. Nach Vorgaben des Herstellers Qiagen wurde die RNA-Extraktion mit dem RNeasy-Mini-Kit durchgeführt. Bei der nachfolgenden photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration diente destilliertes Wasser als Referenz. Die Absorptionskoeffizienten A_{260}/A_{280} wurden verwendet, um die Reinheit des RNA-Produkts zu bewerten.

Für die cDNA-Synthese wurden 2000 ng RNA verwendet. Gemäß den Herstellerangaben (QuantiTec RT Kit, Qiagen) wurde ein enzymatischer DNA-Verdau bei 42 °C für zwei Minuten vorgenommen. Im Anschluss erfolgte die reverse Transkription für 15 Minuten bei 42 °C. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurden die Proben für drei Minuten bei 95 °C inkubiert.

Die synthetisierte cDNA wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) amplifiziert. Die Reaktionsansätze wurden entsprechend Tabelle 8 pipettiert und in technischen Replikaten gemessen. Die Thermocycling-Bedingungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Proben wurden mithilfe der Delta-Delta-Ct-Methode analysiert. Zur Normalisierung wurde β 2MG als internes Referenzgen verwendet.

Komponenten	Volumen
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 µl
Primer (forward + reverse) (vgl. Tabelle 6)	1 µl
cDNA	1 µl
RNase freies Wasser	ad 10 µl

Tabelle 8 Reaktionsansatz qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Inkubationszeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	8 min	
Amplifikation	95 °C	1 s	40 Zyklen
	64 °C	15 s	
	72 °C	20 s	
Cooling	40 °C		

Tabelle 9 qRT-PCR Programm

2.3.4 Mukusfärbung der Darmbiopsien mit Alcian Blau sowie Muzikarmin

Standardmäßig wurden Kolonbiopsien von Patient(inn)en im Rahmen der Biobank des UKR im Institut für Pathologie bei vorliegender Zustimmung asserviert. Diese Proben wurden durch das Institut für Pathologie freundlicherweise geschnitten und gefärbt. Hier wurde die Mukusschicht einmal mit Alcian Blau und einmal mit Muzikarmin gefärbt. Die Mukusdicke wurde mit der Software CaseViewer 2.4 bestimmt.

2.3.5 Gefrierschnitte aus Darmbiopsien und Immunfluoreszenzfärbung von p53 und p73

Für die Immunfluoreszenzfärbung von p53 und p73 wurden Kolonbiopsien in Tissue-Tek eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Am Kryotom wurden 8 µm dünne Schnitte der Kolonbiopsien angefertigt. Im Anschluss wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von p53 und p73 vorgenommen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Die Gefrierschnitte wurden für 5 Minuten in 4 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie dreimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 0,1 % TritonX-100 permeabilisiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurden die Schnitte

für 30 Minuten mit 1 % BSA blockiert. Danach erfolgte eine Übernacht-Inkubation mit dem Primärantikörper. Nach erneutem dreifachem Waschen wurde der gekoppelte Sekundärantikörper für 1 Stunde inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit ProLong™ Gold Eindeckmittel mit DAPI abgedeckt und über Nacht ausgehärtet. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Axiovert 200M (Zeiss) unter Verwendung der Software Image J für die Bilddarstellung.

2.4 Statistische Analysen

Für die Analyse wurde Prism 8 (GraphPad) verwendet. Metrische Daten sind als Diagramme mit Mittelwerten und Standardabweichungen von mindestens drei biologischen Replikaten dargestellt. Zur statistischen Analyse wurden der Mann-Whitney Rank Sum Test, ANOVA oder Spearman R angewendet. Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Mukusdicke und der Expression der Proteine der p53 Familie in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose

Unsere Vorarbeiten zeigen, dass die Mukusschicht des Dickdarms bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose reduziert ist. Dies erleichtert einen direkten Kontakt von Bakterien und Darmepithel. Zudem degradieren Bakterien wichtige Zell-Zell-Kontaktproteine und fördern so die bakterielle Translokation bei der SBP. Unsere Hypothese ist, dass diese Bakterien-Epithel-Interaktion zellulären Stress und entsprechende Stressantworten auslöst. Daher wurden Stressmediatoren im Kontext bakteriell-induzierter Effekte in Epithelzellen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die p53 Tumorsuppressorfamilie als eine der wichtigsten Komponenten der zellulären Stressantwort betrachtet. Anknüpfend an die Dissertation von Marika Haderer wurden Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit vorbestehender Leberzirrhose im Hinblick auf die Dicke der Mukusschicht und die p53 Familie untersucht und mit Kontrollpatient(inn)en verglichen (Haderer, 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde die Patient(inn)enstichprobe nunmehr deutlich vergrößert.

3.1.1 Die Dicke der Mukusschicht im Kolon ist bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose reduziert

Die Aufrechterhaltung einer wirksamen Trennung zwischen dem Mikrobiom im Darmlumen und dem Darmepithel ist eine wichtige Aufgabe der Mukusschicht. Einen wesentlichen Aspekt dieser physikalischen Barriere stellt die ausreichende Dicke des Mukus dar. Spezialisierte Becherzellen produzieren Muzine, aus denen die Schleimschicht hauptsächlich besteht. Damit wird eine direkte Interaktion zwischen intestinalen Bakterien und den Darmepithelzellen verhindert (Peterson & Artis, 2014). In unseren Vorarbeiten zeigten wir bereits, dass Patient(inn)en mit Leberzirrhose verringerte Mukusschichtdicken aufweisen (Haderer et al., 2022). Auch in dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob sich dieser Befund in einem erweiterten Probenkollektiv bestätigt. Zusätzlich zur bisher durchgeführten Alcian Blau Färbung (Haderer et al. 2022), die insbesondere saure Muzine anfärbt (Jass, 1996), wurde die Mukusschicht in Kolonbiopsien auch mit Muzikarmin gefärbt.

Kolonbiopsien von jeweils fünf Patient(inn)en mit Leberzirrhose und fünf Kontrollpatient(inn)en wurden durch das Institut für Pathologie der Universität

Regensburg gefärbt. Im Anschluss wurde die Mukusdicke an multiplen Messpunkten mit der Software CaseViewer 2.4 bestimmt.

Wie in Abbildung 6AB dargestellt, war die Mukusdicke bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose in Übereinstimmung mit der Literatur auch in unserer Stichprobe signifikant reduziert. Bei Anwendung der Alcian Blau Färbung wurde eine mittlere Mukusdicke von 60,3 μm bei Kontrollpatient(inn)en gemessen. Im Gegensatz dazu betrug die durchschnittliche Mukusdicke der Biopsien bei Leberzirrhose nur 25,7 μm , was eine signifikante Reduktion darstellt ($p = 0,0079$) (Abbildung 6A). Übereinstimmend ergab die Mukusfärbung mit Muzikarmin eine durchschnittliche Dicke des Mukus von 61,0 μm bei Kontrollpatient(inn)en und 27,2 μm bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose. Somit war auch in dieser Färbung die Mukusdicke signifikant reduziert ($p = 0,0159$) (Abbildung 6B).

Demzufolge bestätigten beide Mukus-Färbungen, dass die Dicke der Mukusschicht im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose signifikant reduziert ist.

3.1.2 Die Expression von p53 und p73 ist in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose verringert

Durch die verringerte Dicke der Mukusschicht im Darm bei Leberzirrhose wird der direkte Bakterien-Epithel-Kontakt erleichtert (Haderer et al., 2022). Unsere Hypothese ist, dass dieser direkte Kontakt zu Stressantworten in den Epithelzellen führt. Daher untersuchten wir die Regulation der p53 Familie als einem der wichtigsten zellulären Stressmediatoren. Hierfür wurden die Expression der p53- und p73-Proteine in Kolonbiopsien von 50 Patient(inn)en mit Leberzirrhose und 70 Kontrollpatient(inn)en mittels Western Blot analysiert. Sowohl die Menge von p53 ($p = 0,0346$) als auch von p73 ($p = 0,0001$) war in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose signifikant reduziert (Abbildung 6CE).

Als weitere Methode zur visuellen Beurteilung der p53- und p73-Expression in den Kolonbiopsien wurden Gefrierschnitte angefertigt und eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Übereinstimmend mit den Western Blots weisen die exemplarisch dargestellten Proben reduzierte Mengen an p53 und p73 auf (Abbildung 6F).

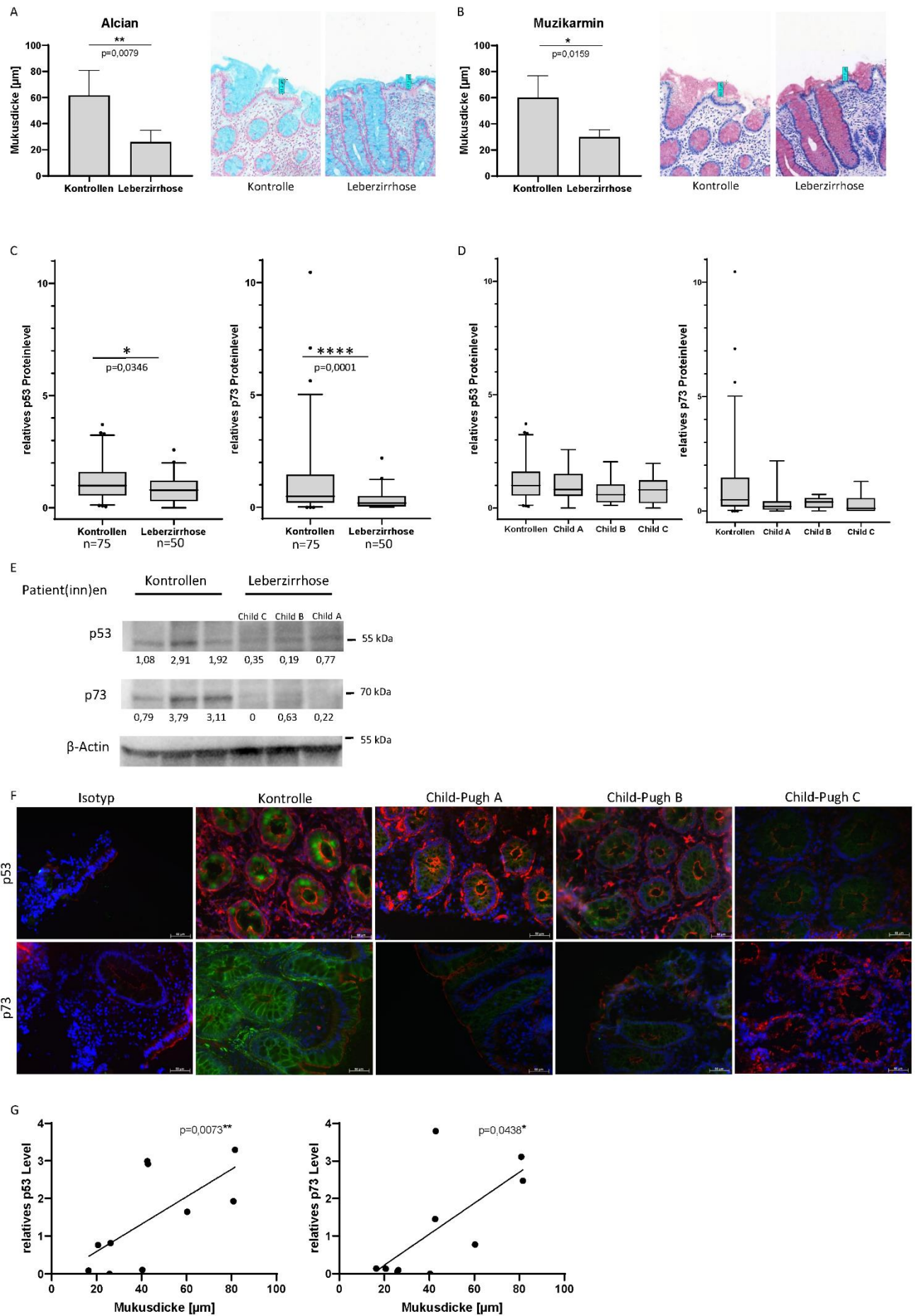


Abbildung 6 - Darmbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose weisen reduzierte p53- und p73-Spiegel auf. Die Mukusschicht ist bei vorbestehender Leberzirrhose sowohl in der (A) Alcian Blau Färbung ($p = 0,0079$) als auch in der (B) Muzikarmin Färbung ($p = 0,0159$) signifikant reduziert. Alcian Blau und Muzikarmin Färbung des Mukus von je 5 Patient(inn)en mit Leberzirrhose und 5 Kontrollpatient(inn)en. (C) Western Blot-Analysen von Kolonbiopsien von 50 Patient(inn)en mit Leberzirrhose wurden mit 70 Kontrollpatient(inn)en verglichen und sind sowohl für p53 ($p = 0,0346$) als auch p73 ($p = 0,0001$) im Mann-Whitney-Test signifikant reduziert (D) Die Aufschlüsselung nach Child-Pugh Klassifikation (18x Child-Pugh A; 16x Child-Pugh B; 16x Child-Pugh C) zeigt, dass bereits in frühen Stadien der Leberzirrhose (Child-Pugh A und B) reduzierte p53- und p73-Spiegel vorliegen. (E) Exemplarischer Western Blot. (F) Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von p53 und p73 in Darmbiopsien, die ebenfalls verringerte p53- und p73-Spiegel bei vorbestehender Leberzirrhose zeigt. (G) Verringerte p53- und p73-Spiegel korrelieren mit einer reduzierten Mukusschicht. Der Spearman-Rho-Wert zwischen der Mukusdicke und der p53 Menge beträgt 0,8061 und ist damit signifikant ($p = 0,0072$). Der Spearman-Rho-Wert zwischen der Mukusdicke und der p73 Menge beträgt 0,6606 und ist ebenso signifikant ($p = 0,0438$).

3.1.3 Bereits in frühen Stadien der Leberzirrhose tritt eine Reduktion von p53 und p73 im Darmepithel auf

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der p53 Familie vom Schweregrad der Leberzirrhose abhängt, wurden die relativen Proteinspiegel von p53 bzw. p73 in Abhängigkeit vom Child-Pugh Score analysiert. In der Gruppe von 50 Patient(inn)en mit Leberzirrhose wurden 18 Fälle mit Child-Pugh A, 16 Fälle mit Child-Pugh B und 16 Fälle mit Child-Pugh C eingeschlossen. Die nach Child-Pugh Score differenzierte Auswertung zeigte, dass die p53 Familie bereits in frühen Stadien (Child-Pugh A und Child-Pugh B) reduziert ist. Eine lineare Abnahme entsprechend des Child-Pugh Stadiums wurde hingegen nicht festgestellt (Abbildung 6D).

3.1.4 Die Mukusdicke bei Leberzirrhose korreliert mit reduzierten p53- und p73-Proteinspiegeln

Eine dünnere Mukusschicht erleichtert die Interaktion von Bakterien mit dem Darmepithel. Basierend darauf ist unsere Hypothese, dass die Reduktion der p53 Familie im Darm bei Leberzirrhose durch die so gesteigerte Interaktion mit Bakterien induziert wird. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Dicke der mit Alcian Blau gefärbten Mukusschicht der Kolonbiopsien mit den im Western Blot bestimmten Mengen von p53 und p73 korreliert. Hierfür wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient angewendet. Wie in Abbildung 6G dargestellt, betrug der Spearman-Rho-Wert zwischen der Mukusdicke und der Menge an p53 0,8061 und war damit signifikant ($p = 0,0072$). Der Spearman-Rho-Wert zwischen der Mukusdicke und der Menge an p73 betrug 0,6606 und war ebenfalls signifikant ($p = 0,0438$).

Somit konnten wir zeigen, dass die Reduktion von p53 und p73 in Kolonbiopsien umso ausgeprägter ist, je dünner die Mukusschicht ist. Dies unterstreicht unsere Hypothese,

dass die Reduktion der Proteinmengen der p53 Familie durch bakterielle Interaktion mit dem Darmepithel bedingt ist.

3.1.5 Die Reduktion der p53 Familie im Darmepithel erfolgt transkriptionsunabhängig

Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose weisen eine dünnere Mukusschicht sowie signifikant reduzierte Proteinmengen von p53 und p73 auf. Um zu untersuchen, ob dies auf einer verringerten Transkription basiert, wurden qRT-PCR Analysen der Kolonbiopsien angefertigt. Weder die RNA-Menge von *TP53* ($p = 0,2111$) noch die von *TP73* ($p = 0,7229$) war in den Kolonbiopsien der 20 bzw. 15 untersuchten Patient(inn)en mit Leberzirrhose verglichen mit 60 bzw. 63 Kontrollpatient(inn)en signifikant reduziert (Abbildung 7).

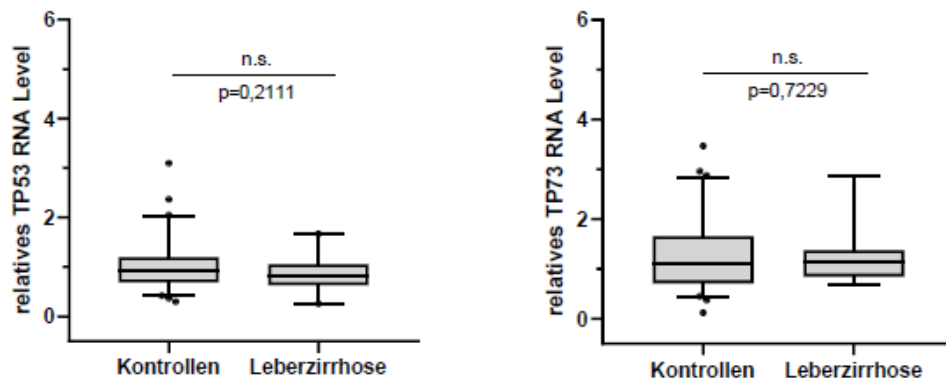


Abbildung 7 - Darmbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose weisen keine signifikant reduzierten RNA-Mengen für *TP53* und *TP73* auf. In der qRT-PCR Analyse der Kolonbiopsien von 20 Patient(inn)en mit Leberzirrhose und 62 Kontrollpatient(inn)en zeigte sich keine signifikante Reduktion der *TP53*-Transkription ($p = 0,2111$ im Mann-Whitney-Test). Ebenso war die *TP73*-Transkription in den Kolonbiopsien von 15 Patient(inn)en mit Leberzirrhose verglichen mit 63 Kontrollpatient(inn)en nicht signifikant reduziert ($p = 0,7229$ im Mann-Whitney-Test).

3.2 Untersuchung der bakteriell-induzierten Reduktion der p53 Familie im (ko) SBP-Modell

Im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose ist die Mukusschicht dünner und eine direkte Bakterien-Epithel-Interaktion dadurch erleichtert. Zudem sind die Mengen an p53 und p73 im Darmepithel bei Leberzirrhose reduziert. Unsere Hypothese ist, dass die Reduktion der p53 Familienmitglieder durch bakterielle Einflüsse induziert wird. Daher haben wir im nächsten Schritt in einem von uns entwickelten *in vitro*-Modell (Haderer, 2019) die Interaktion von Bakterien mit Epithelzellen untersucht und die Kinetik der Regulation von p53 Familienmitgliedern bestimmt.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir ein bereits etabliertes *in vitro*-Modell aus HCT116 Zellen, einer kolorektalen Adenokarzinomzelllinie (Haderer, 2019). Die HCT116 Darmepithelzellen wurden für sechs Tage kultiviert. Da *E. coli* der am häufigsten nachgewiesene Erreger einer SBP ist (Chopyk & Grakoui, 2020), wurden die Zellen mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) über vier Stunden ko-kultiviert. Somit wurde die direkte Bakterien-Epithel-Interaktion simuliert und die Menge von p53 sowie p73 mittels Western Blot in 30 Minuten-Intervallen bestimmt. Zusätzlich wurden zwei weitere HCT116 Zelllinien mit einem ko von p53 (HCT116 p53 ko) bzw. einem ko von p73 (HCT116 p73 ko) verwendet. Damit untersuchten wir die Konsequenzen herabgesetzter Spiegel von p53 oder p73 im Darm von Patientinnen und Patienten mit Leberzirrhose.

3.2.1 Die Bakterien-Epithelzell-Interaktion führt zu dynamischen Veränderungen der p53-Spiegel

Eine anhaltende Bakterien-Epithel-Interaktion führt zu Veränderungen der p53 und p73 Mengen in HCT116 Wildtyp Darmepithelzellen. In der Kinetik zeigte sich zu Beginn der Ko-Kultur eine Zunahme der p53 Menge, die nach 90 Minuten um 47 % gesteigert war. Im Verlauf erfolgt eine Degradation von p53, wodurch nach 240 Minuten lediglich 10 % der ursprünglichen p53 Menge vorhanden waren (Abbildung 8).

3.2.2 Die Bakterien-Epithelzell-Interaktion induziert den Abbau von p73

Im Unterschied zu p53 blieb eine Induktion von p73 nach bakterieller Ko-Kultur aus. Nach 120 Minuten war eine kontinuierliche Reduktion der p73 Mengen zu beobachten und nach 150 Minuten waren diese bereits um 50 % reduziert. Diese Abnahme setzte sich fort, sodass nach 210 Minuten nur noch 7 % der ursprünglichen Proteinmenge vorhanden war. Nach 240 Minuten Ko-Kultur war p73 nicht mehr nachweisbar (Abbildung 8).

3.2.3 Dynamische Veränderung der p53-Spiegel nach bakterieller Ko-Kultur auch in Abwesenheit von p73

Im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose wurden signifikant reduzierte Spiegel von p53 und p73 festgestellt (Abbildung 6). Daraus ergab sich die Frage, welche Auswirkungen eine Reduktion der einzelnen p53 Familienmitglieder auf die Regulation der jeweils anderen hat. Um diese *in vivo* Situation nachzustellen, wurden für die Ko-

Kultur-Experimente zwei ko HCT116-Modelle verwendet (HCT116 p53 ko; HCT116 p73 ko).

Die Auswirkungen des Verlusts von p73 auf die Kinetik von p53 bei bakterieller Ko-Kultur wurden mit Hilfe der HCT116 p73 ko Zelllinie untersucht. Analog zu HCT116 Wildtyp Zellen führte der direkte Kontakt mit Bakterien nach 90 Minuten zunächst zu einer Steigerung von p53 um bis zu 66 %. Eine Reduktion der p53 Menge auf 50 % des Ausgangsniveaus war erst nach 240 Minuten nachweisbar (Abbildung 8). In Abwesenheit von p73 induzierte der Kontakt mit Bakterien somit ebenfalls eine transiente Induktion von p53. Die anschließende Reduktion des Proteins fand im Vergleich zum Wildtyp jedoch zeitlich verzögert und deutlich weniger ausgeprägt statt.

3.2.4 p53 Defizienz beschleunigt die bakteriell-induzierte Reduktion von p73

Analog dazu wurde eine HCT116 p53 ko Zelllinie eingesetzt, um die Auswirkungen der p53 Defizienz auf die p73 Proteinmengen nach bakterieller Ko-Kultur zu untersuchen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der HCT116 Wildtyp Zellen hatte die bakterielle Ko-Kultur auch in Abwesenheit von p53 keine induktiven Effekte auf die p73-Spiegel (Abbildung 8). Ebenfalls übereinstimmend mit den Wildtyp Zellen erfolgte nach 120 Minuten eine Reduktion von p73. Bereits nach 210 Minuten war p73 nicht mehr nachweisbar (Abbildung 8). HCT116 p53 ko Zellen zeigten bei bakterieller Ko-Kultur einen leicht beschleunigten p73-Abbau verglichen mit HCT116 Wildtyp Zellen.

Zusammenfassend wurde im *in vitro*-Modell beobachtet, dass der direkte Kontakt mit *E. coli* die p53 und p73 Mengen von Darmepithelzellen beeinflusst. Nach anhaltendem Kontakt mit den Bakterien wurden beide Proteine herunterreguliert. Bei p53 ging der Reduktion eine transiente Induktion voraus. Der Verlust von p73 führte zu einer Stabilisierung der p53-Proteinmenge nach direktem Bakterien-Epithel-Kontakt.

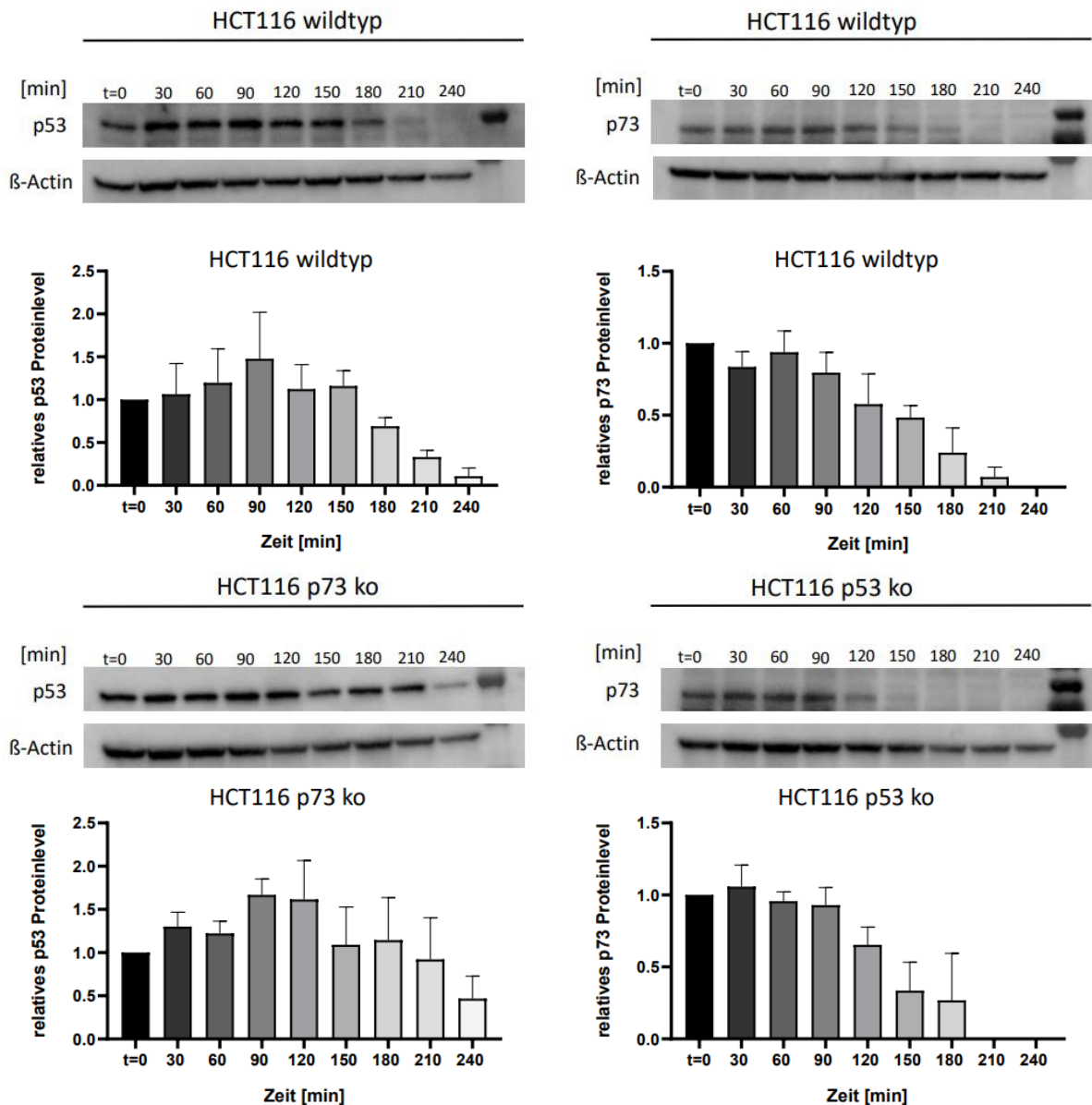


Abbildung 8 – **Regulation der p53- und p73-Spiegel nach bakterieller Ko-Kultur.** HCT116 Zellen wurden jeweils über vier Stunden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden mittels Western Blot die Proteinmengen von p53 und p73 bestimmt. Quantitative Auswertung sowie exemplarische Darstellung der Western Blots. HCT116 Wildtyp Zellen zeigten eine initiale Induktion von p53 und eine anschließende Reduktion von p53. In HCT116 Wildtyp Zellen wurde p73 ohne vorangegangene Induktion reduziert. HCT116 p73 ko Zellen zeigten ebenfalls eine initiale Induktion von p53 und eine spätere und geringer ausgeprägte nachfolgende Reduktion. Die Reduktion von p73 bei HCT116 p53 ko Zellen verlief ähnlich wie bei HCT116 Wildtyp Zellen. $n \geq 3$.

3.3 Bakteriell-induzierter Zelltod: Charakterisierung der Paraptose und Bedeutung der p53 Familie

Im *in vitro*-Modell zeigte sich ein Abbau von p53 und p73 während der bakteriellen Ko-Kultur. Beide Proteine spielen eine entscheidende Rolle als Regulatoren des Zellzyklus, der Seneszenzinduktion und der Initiierung programmierter Zelltodformen wie der Apoptose (vgl. 1.5) (Boutelle & Attardi, 2021).

Gleichzeitig wissen wir, dass *E. coli* einen nicht-apoptotischen Zelltod in Darmepithelzellen auslösen kann (Neubert Philip, 2020). Eine stabile Darmbarriere benötigt vitale Zellen. Eine gestörte Darmbarriere, wie sie bei einer SBP vorliegt, führt zu einer pathologischen bakteriellen Translokation.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde Apoptose als zugrundeliegender Mechanismus des bakteriell-induzierten Zelltods weitgehend ausgeschlossen. Vielmehr zeigen die Daten einen paraptotischen Zelltod (Neubert Philip, 2020). Paraptose zeichnet sich insbesondere durch eine ausgeprägte zytoplasmatische Vakuolisierung aus, die von dilatierten Mitochondrien und/oder dem endoplasmatischen Retikulum ausgeht. Paraptose ist nicht durch Caspase-Inhibitoren blockierbar. Stattdessen inhibieren Transkriptions- oder Translationsinhibitoren wie Actinomycin D oder Cycloheximid den paraptotischen Zelltod (Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020).

Bisher sind die Mechanismen der Paraptose nur unzureichend untersucht und der molekulare Ablauf nicht ausreichend verstanden (Kunst et al., 2024; Yan et al., 2020). Der zeitliche morphologische Ablauf der Paraptose ist ebenfalls noch weitestgehend unbekannt. Ein Zusammenhang zwischen der Paraptose und der p53 Tumorsuppressorfamilie, die in anderen Formen des programmierten und regulierten Zelltods wie z. B. der Apoptose eine bedeutende Rolle spielt, wurde bisher nicht gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst die Kinetik der bakteriell-induzierten Paraptose in intestinalen Epithelzellen charakterisiert. Hierzu wurden HCT116 Zellen bis zu 4 Stunden mit *E. coli* ko-inkubiert. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durchflusszytometrisch nach Annexin-DAPI Färbung. Über eine TMRE-Färbung wurde das mitochondriale Membranpotential mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es gibt Hinweise auf eine mögliche Rolle der p53 Familie bei der Paraptose (vgl. 3.3.6). Um diese Rolle zu analysieren, wurden vier verschiedene HCT116 Zelllinien eingesetzt, die sich im p53 bzw. p73 Status unterscheiden (HCT116 Wildtyp; HCT116 p53 ko; HCT116 p73 ko; HCT116 p53/p73 ko). Zur Untersuchung des morphologischen, ultrastrukturellen Ablaufs der Paraptose wurden zudem HCT116 Wildtyp Zellen und HCT116 p53/p73 ko Zellen in der Elektronenmikroskopie betrachtet.

3.3.1 *E. coli* induzieren einen Caspase-unabhängigen Zelltod in HCT116 Zellen

In unseren Vorarbeiten war nach bakterieller Ko-Kultur von HCT116 Wildtyp Zellen mit *E. coli* keine apoptose-typische Spaltung der Proteine Caspase 3 und PARP nachweisbar. Weiterhin konnte der bakteriell-induzierte Zelltod nicht durch den Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK blockiert werden (Neubert Philip, 2020). Im Vergleich zu den Vorarbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit ein modifizierter Versuchsaufbau mit längerer Kultivierungsdauer der Zellen verwendet. Zudem wurden für die Erstellung einer Kinetik die Zelltodraten in 30 Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 4 Stunden bestimmt. Um sicherzustellen, dass der Zelltod auch in diesem modifizierten Versuchsaufbau nicht apoptotisch ist, wurde der Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK eingesetzt. In Vorversuchen zeigte sich, dass der Zelltod insbesondere nach 150 bis 180 Minuten bakterieller Ko-Kultur einsetzt, weshalb diese Untersuchungszeitpunkte auch für die Analyse der Zelltodraten in unserem Modell gewählt wurden. Übereinstimmend mit unseren Vorarbeiten führte die bakterielle Ko-Kultur zur Induktion von Zelltod in HCT116 Zellen, sichtbar an der Abnahme der vitalen Zellpopulation im Quadranten Q4 (Abbildung 9A). Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK führte zu einer vergleichbaren Abnahme der vitalen Zellpopulation im Quadranten Q4. Somit ist der bakteriell-induzierte Zelltod in unserem Ko-Kultur Caspase-unabhängig. Es wurde keine Reduktion des spezifischen Zelltods nachgewiesen (Abbildung 9). Apoptose als zugrunde liegender Zelltodmechanismus kann damit nicht nachgewiesen werden.

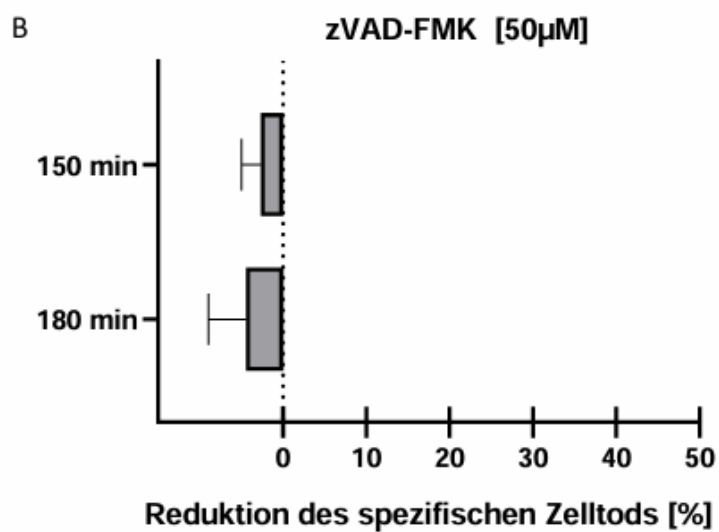
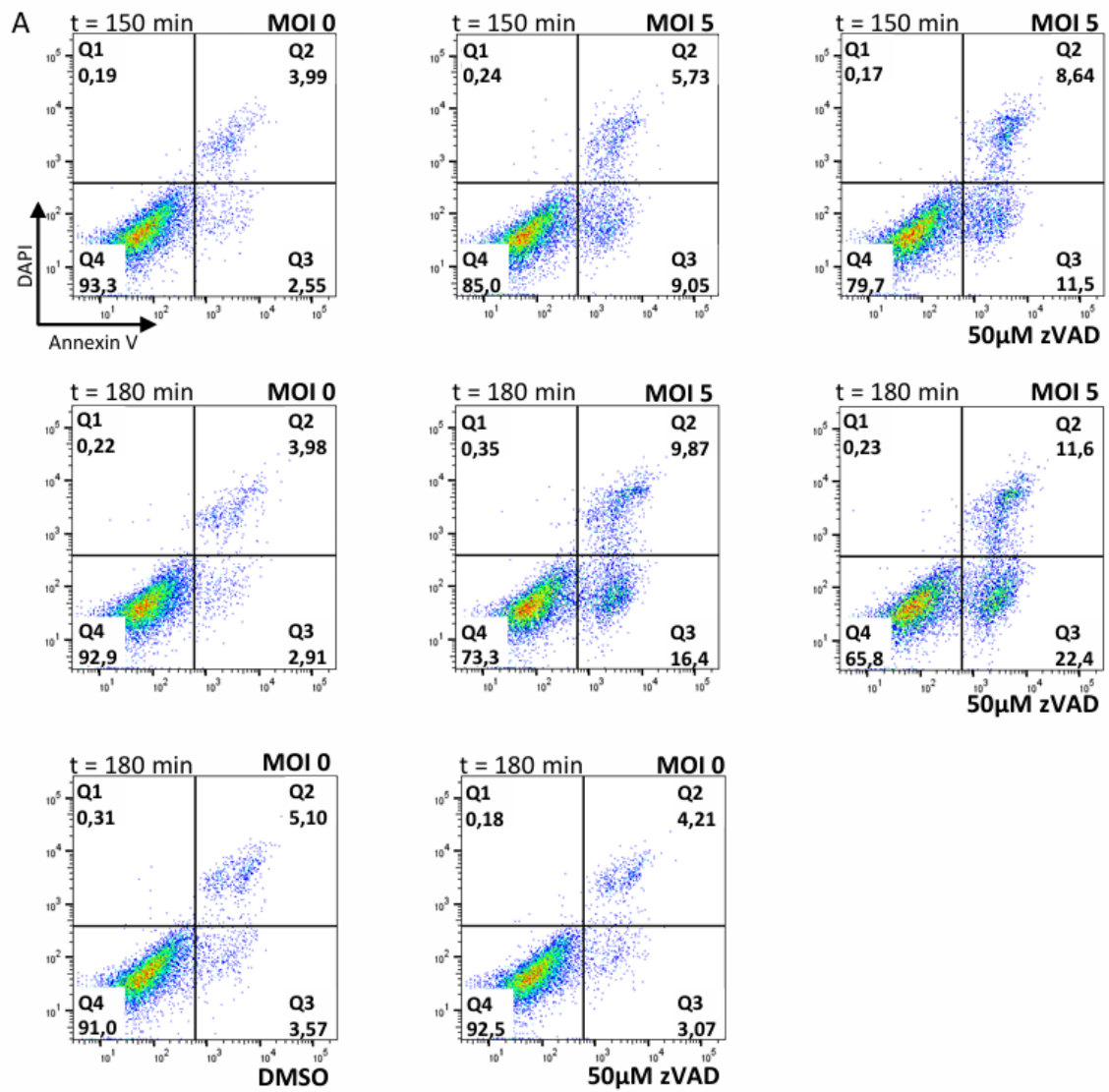


Abbildung 9 – **Die Inhibition von Caspasen hat keinen Einfluss auf den bakteriell-induzierten Zelltod in HCT116 Zellen.** HCT116 Zellen wurden bis zu 180 min mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) ko-kultiviert. Zur Blockierung der Caspase-Aktivität wurden die Zellen 20 Minuten vor Zugabe der Bakterien mit dem Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK (50 μ M) versetzt. DMSO diente als Kontrolle. (A) Die Messung des Zelltods erfolgte nach 150 bzw. 180 min mittels Durchflusszytometrie nach Annexin-DAPI Färbung. Annexin-DAPI ungefärbte Zellen im Q4 Quadranten wurden als lebend gewertet. Mit Annexin und/oder DAPI gefärbte Zellen in den Quadranten Q1 - 3 zeigen den Zelltod an. (B) Die Inhibition der Caspasen mittels zVAD-FMK in n = 3 unabhängigen Experimenten führte im Vergleich zur Ko-Kultivierung von HCT116 und *E. coli* ohne Pancaspaseinhibitor zu keiner Reduktion des spezifischen Zelltods.

3.3.2 Der bakteriell-induzierte Zelltod ist transkriptionsabhängig und wird durch Actinomycin D inhibiert

Paraptose benötigt eine intakte Transkription und Translation (Sperandio et al., 2000). Um den paraptotischen Zelltod in unserem *in vitro*-Modell weiter zu charakterisieren, wurde die bakteriell-induzierte Zelltodrate in Gegenwart des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D bestimmt. Hierzu wurden HCT116 Wildtyp Zellen 20 Minuten mit Actinomycin D (80 μ M) vorbehandelt, gewaschen und anschließend mit *E. coli* (O6:Hnt) ko-kultiviert. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des spezifischen Zelltods (Abbildung 10A) bei gehemmter Transkription. Der durch Bakterien verursachte Zelltod zeigte sich in der Abnahme der vitalen Zellen im Quadranten Q4 und in der Zunahme der mit Annexin und/oder DAPI gefärbten Zellen in den Quadranten Q1, Q2 und Q3. Diese Shifts blieben bei einer vorherigen Transkriptionsblockade mit Actinomycin D aus, sodass in Gegenwart von Actinomycin D nach 180 min bakterieller Ko-Kultur die spezifischen Zelltodraten um 30 % reduziert waren (Abbildung 10B)

Wachstumskurven von *E. coli* (O6:Hnt) mit DMSO und Actinomycin D im Vergleich zu reinem LB-Medium zeigten keine Veränderung des Bakterienwachstums (Abbildung 11). Dieses Ergebnis belegt, dass die Zelltodblockade nicht auf einer durch Actinomycin D herabgesetzten Viabilität der Bakterien beruht. Der bakteriell-induzierte Zelltod ist damit abhängig von einer intakten Transkription.

Mit der Transkriptionsabhängigkeit weist der in unserem *in vitro*-Modell stattfindende Zelltod somit ein weiteres Charakteristikum der Paraptose auf. Daher wird Paraptose als zugrundeliegender Zelltod in unserem Modell der Bakterien-Epithel-Interaktion angenommen.

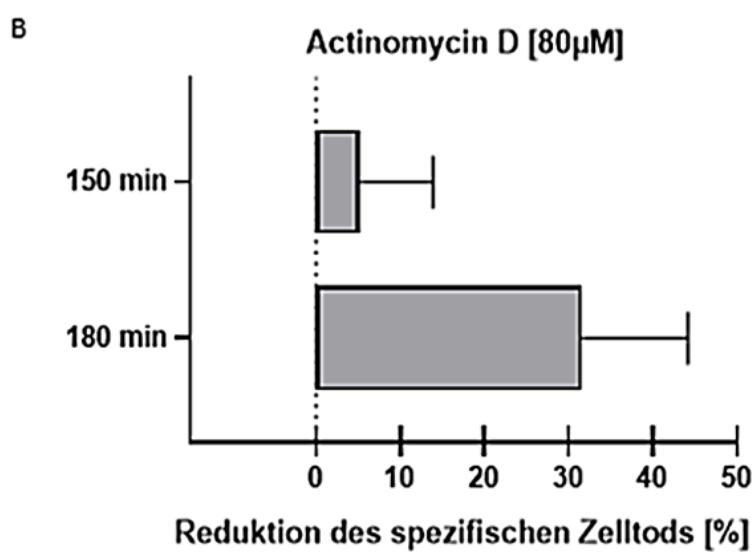
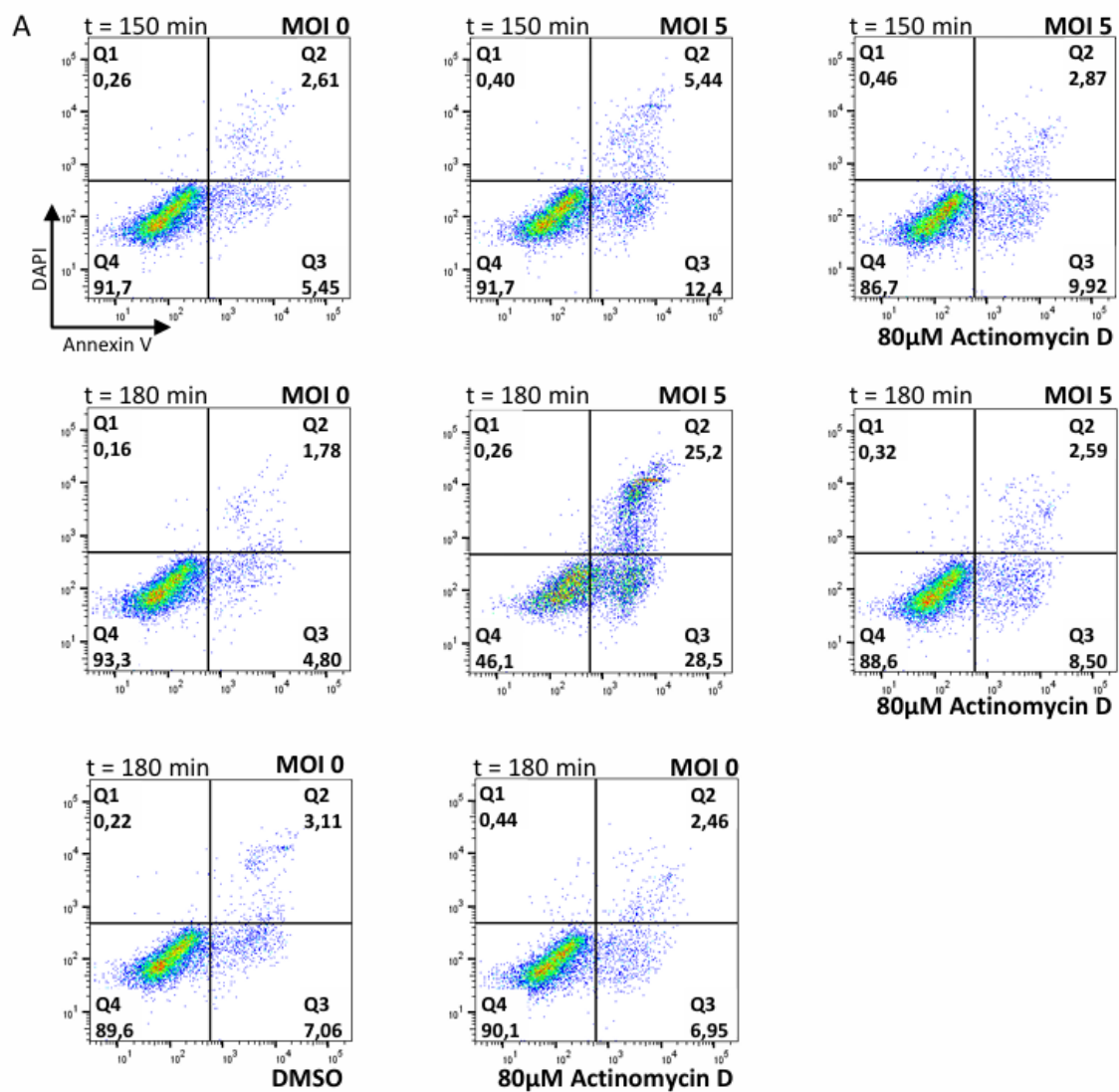


Abbildung 10 – **Der bakteriell-induzierte Zelltod ist transkriptionsabhängig und kann durch Actinomycin D blockiert werden.** HCT116 Zellen wurden bis zu 180 min mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) ko-kultiviert. Zur Transkriptionsinhibition erfolgte eine 20-minütige Vorbehandlung der Zellen mit Actinomycin D (80 µM) vor Zugabe der Bakterien. DMSO diente als Kontrolle. (A) Die Messung des Zelltods erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach Annexin-DAPI Färbung. Annexin-DAPI ungefärbte Zellen im Q4 Quadranten wurden als lebend gewertet. Mit Annexin und/oder DAPI gefärbte Zellen in den Quadranten Q1 - 3 zeigen den Zelltod an. (B) Die Transkriptionsblockade durch Actinomycin D führte zu einer deutlichen Abnahme des bakteriell-induzierten Zelltods in $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten im Vergleich zur Ko-Kultivierung von HCT116 und *E. coli* ohne Transkriptionsinhibitor.

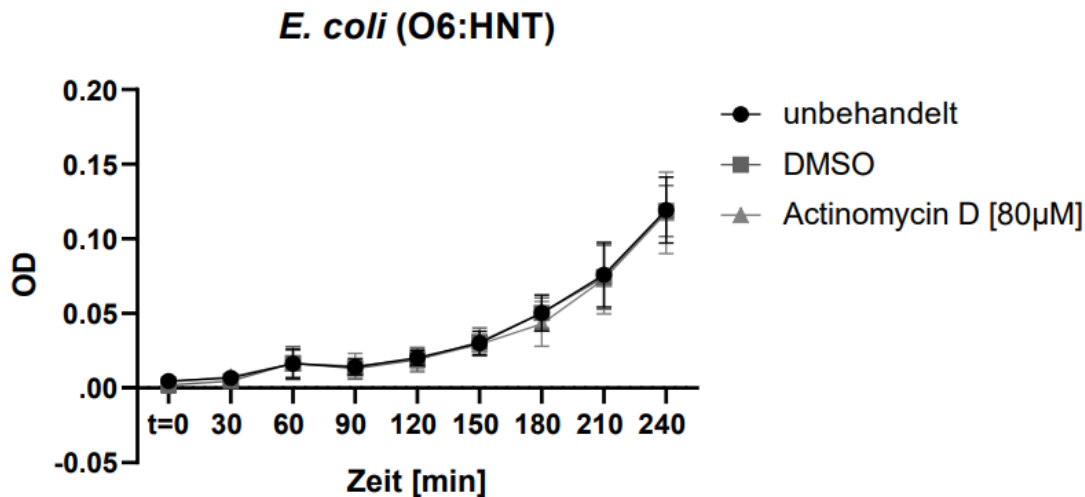


Abbildung 11 – **Der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* (O6:Hnt).** *E. coli* (O6:Hnt) wurden in LB-Medium in Gegenwart von DMSO bzw. Actinomycin D für 4 Stunden inkubiert. In 30 Minuten-Intervallen wurde die OD₆₀₀ der Kulturen bestimmt. Die Wachstumskurven waren in Gegenwart von DMSO bzw. Actinomycin D unverändert im Vergleich zu unbehandelten Kulturen in $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.3.3 p53 und p73 Status beeinflussen die bakteriell-induzierte Zelltodkinetik

SBP-relevante *E. coli* (O6:Hnt) induzieren einen paraptotischen Zelltod in HCT116 Wildtyp Darmepithelzellen. Darüber hinaus zeigen unsere Daten, dass im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose die Spiegel an p53 und p73 reduziert sind. Im *in-vitro* Ko-Kulturmodell führte der direkte Kontakt mit *E. coli* (O6:Hnt) zu einer Reduktion der p53- und p73-Spiegel in Epithelzellen.

Um den zeitlichen Verlauf der bakteriell-induzierten Paraptose genauer zu untersuchen, wurden die Zelltodraten nach bakterieller Ko-Kultur in 30 min-Intervallen durchflusszytometrisch nach Annexin-DAPI Färbung bestimmt. Um in diesem Zusammenhang auch den Aspekt der reduzierten Mengen an Proteinen der p53 Familie abzubilden, wurden neben der HCT116 Wildtyp auch HCT116 Zelllinien mit p53/p73 ko, p53 ko oder p73 ko eingesetzt. Mit dieser Differenzierung wollten wir die

individuelle Rolle der einzelnen Mitglieder der p53 Familie bei der bakteriell-induzierten Paraptose evaluieren.

3.3.3.1 Kinetik der Zelltodinduktion in HCT116 Wildtyp durch *E. coli* (O6:Hnt)

Nach 90 Minuten Ko-Kultur mit *E. coli* (O6:Hnt) zeigte sich bei HCT116 Wildtyp Zellen eine Zunahme der spezifischen Zelltodrate in der Abnahme vitaler Zellen im Quadranten Q4 und in der Zunahme der mit Annexin und/oder DAPI gefärbten Zellen in den Quadranten Q1, Q2 und Q3. Dieser Anstieg setzte sich fort und erreichte nach 180 Minuten ein Plateau (Abbildung 12 und Abbildung 16A).

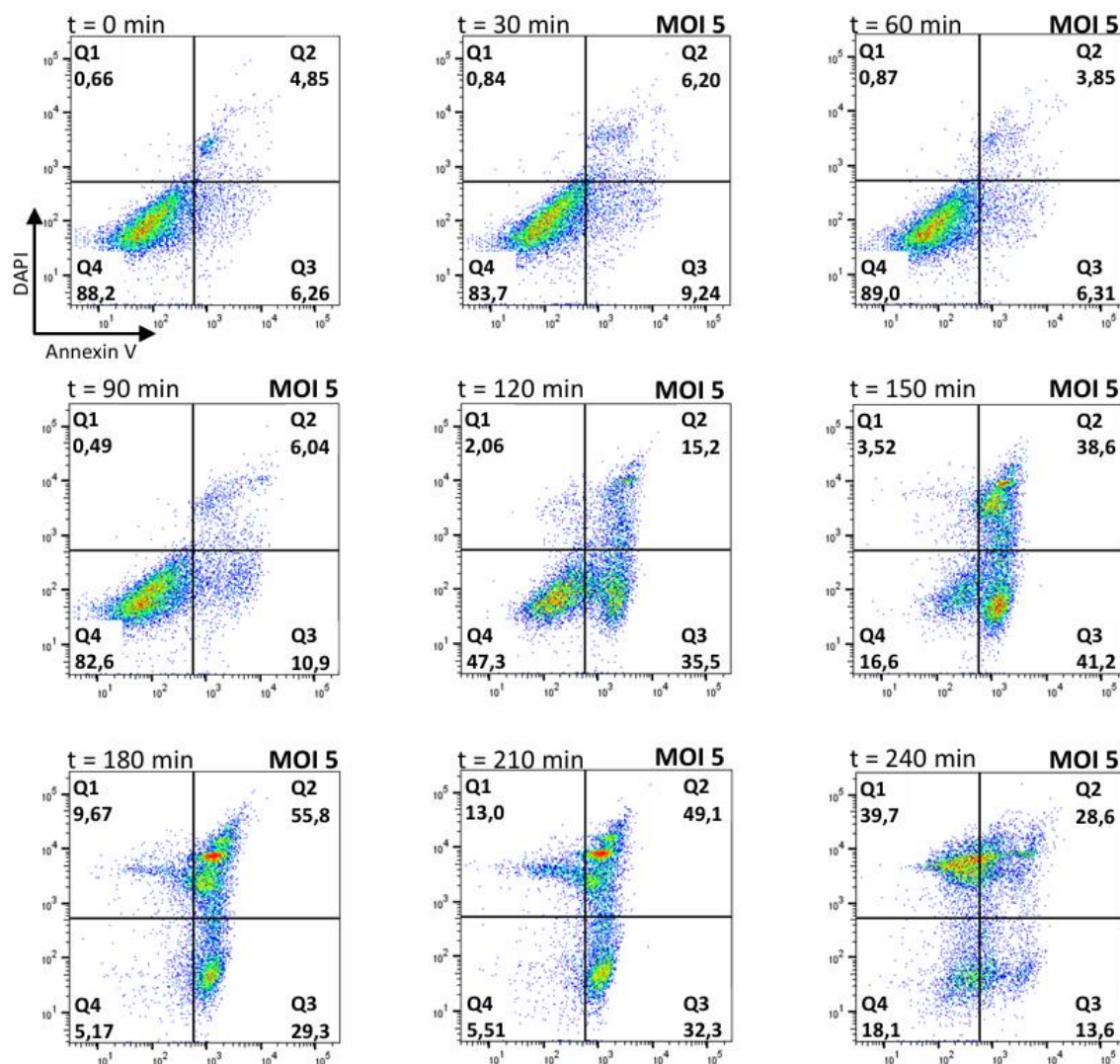


Abbildung 12 - **Kinetik der Zelltodinduktion durch *E. coli* in HCT116 Wildtyp Zellen.** HCT116 Wildtyp Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-DAPI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Annexin-DAPI Färbung zeigte eine Induktion von Zelltod durch *E. coli*, im Sinne von Annexin und/oder DAPI positiver Zellen entsprechend der Quadranten Q1 - 3. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

3.3.3.2 Früheres Eintreten des Zelltods durch bakterielle Ko-Kultur in HCT116 p53 ko

In Abwesenheit von p53 war der bakteriell-induzierte Zelltod beschleunigt. Ab 120 Minuten bakterieller Ko-Kultur waren die Zelltodraten im Vergleich zu HCT116 Wildtyp Zellen erhöht. Bereits ab 150 Minuten war der Zelltod bei HCT116 p53 ko deutlich ausgeprägt (Abbildung 13). Die Bestimmung der spezifischen Zelltodraten ergab ab dem Zeitpunkt 90 Minuten eine Steigerung des spezifischen Zelltodes, die stärker ausgeprägt war als bei HCT116 Wildtyp Zellen (Abbildung 16C).

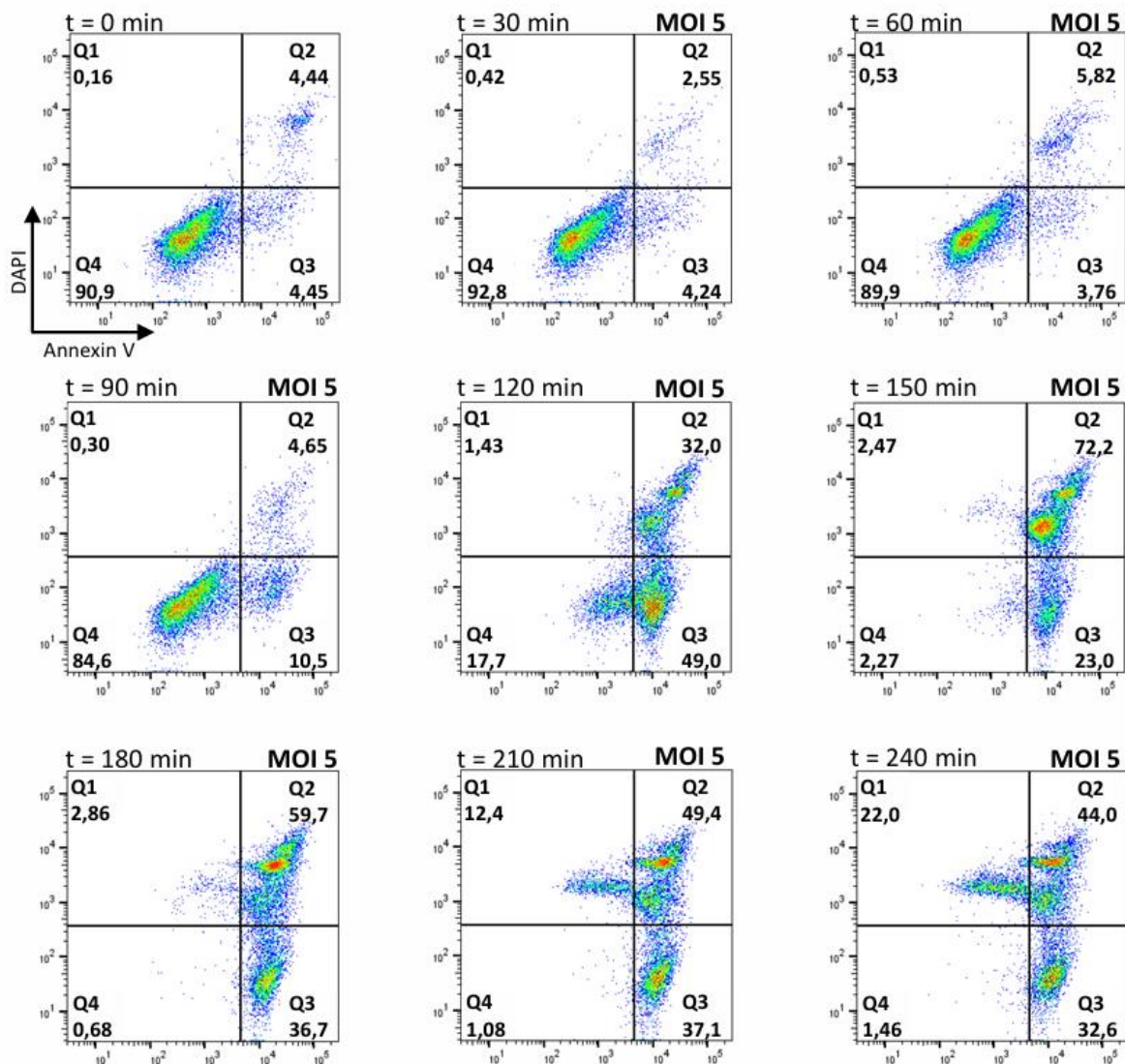


Abbildung 13 - **Kinetik der Zelltodinduktion durch *E. coli* in HCT116 p53 ko Zellen.** HCT116 p53 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-DAPI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Annexin-DAPI Färbung zeigte eine Induktion von Zelltod durch *E. coli*, im Sinne von Annexin und/oder DAPI positiver Zellen entsprechend der Quadranten Q1 - 3. Im Vergleich zu HCT116 Wildtyp Zellen trat der bakteriell-induzierte Zelltod etwas früher (ab 90 Minuten) ein. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

3.3.3.3 Späteres Eintreten des Zelltods durch bakterielle Ko-Kultur in HCT116 p73 ko

Das Fehlen von p73 führte hingegen verglichen mit HCT116 Wildtyp zu einer verzögerten Zelltodinduktion durch Bakterien. Der bakterielle Zelltod, entsprechend der im Quadranten Q1 - 3 gefärbten Zellen, setzte in HCT116 p73 ko Zellen erst ab 150 Minuten ein, erreichte aber bereits nach 180 Minuten das Niveau der Wildtyp-Zellen (Abbildung 14 und Abbildung 16D).

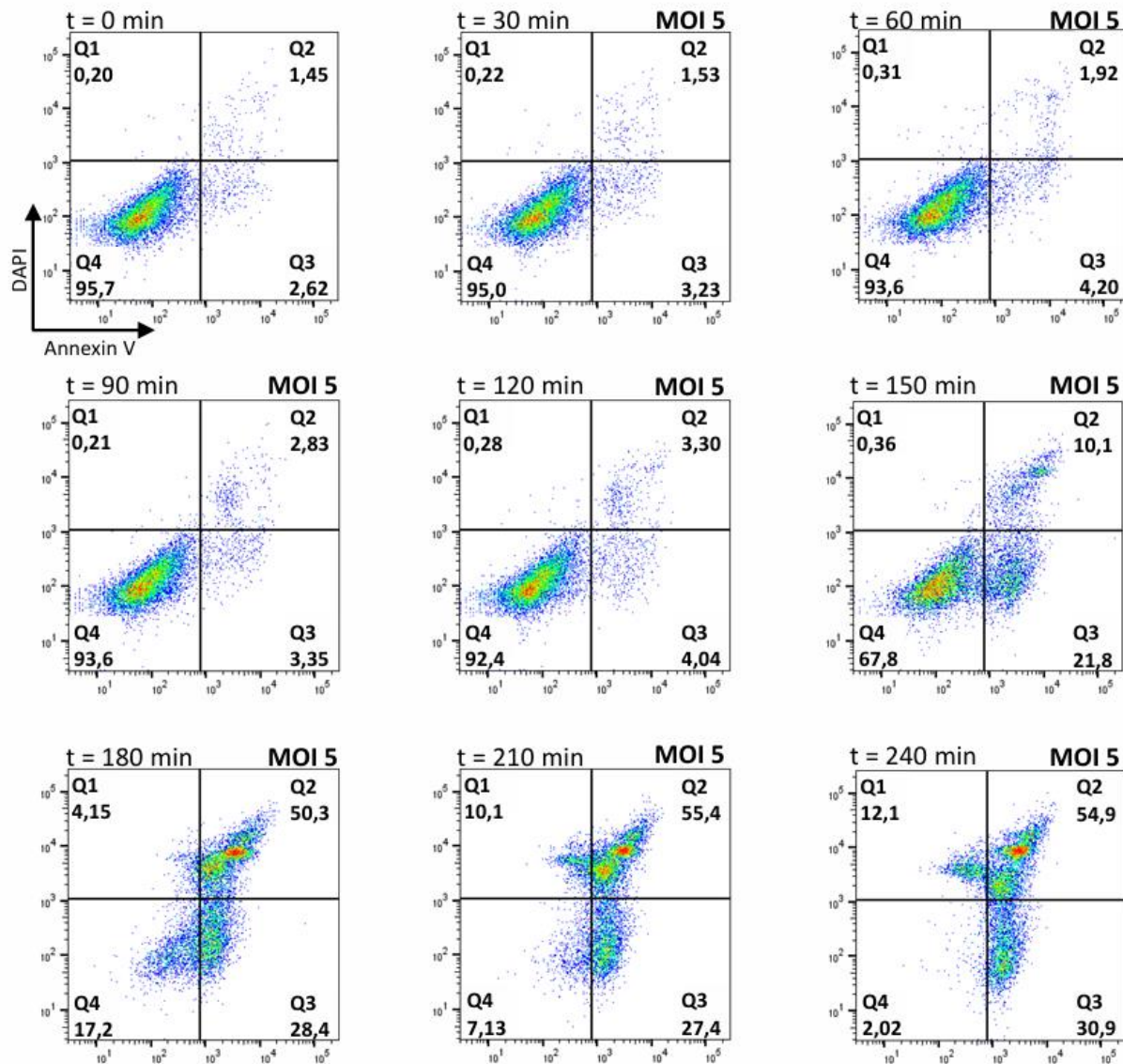


Abbildung 14 - **Kinetik der Zelltodinduktion durch *E. coli* in HCT116 p73 ko Zellen.** HCT116 p73 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-DAPI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Annexin-DAPI Färbung zeigte eine Induktion von Zelltod durch *E. coli*, im Sinne von Annexin und/oder DAPI positiver Zellen entsprechend der Quadranten Q1 - 3. Im Vergleich zu HCT116 Wildtyp Zellen trat der bakteriell-induzierte Zelltod zeitlich verzögert (ab 150 Minuten) ein. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

3.3.3.4 Späteres Eintreten des Zelltods durch bakterielle Stimulation in HCT116 p53/p73 ko

Der doppelte ko von p53 und p73 führte ebenfalls zu einer veränderten Zelltodkinetik nach bakterieller Ko-Kultur. HCT116 p53/p73 ko Zellen blieben im Vergleich zu HCT Wildtyp Zellen während der bakteriellen Ko-Kultur länger vital. Der Zelltod, entsprechend den im Quadranten Q1 - 3 gefärbten Zellen, war nach 150 - 180 Minuten deutlich induziert und setzte sich danach kontinuierlich fort (Abbildung 15 und Abbildung 16B).

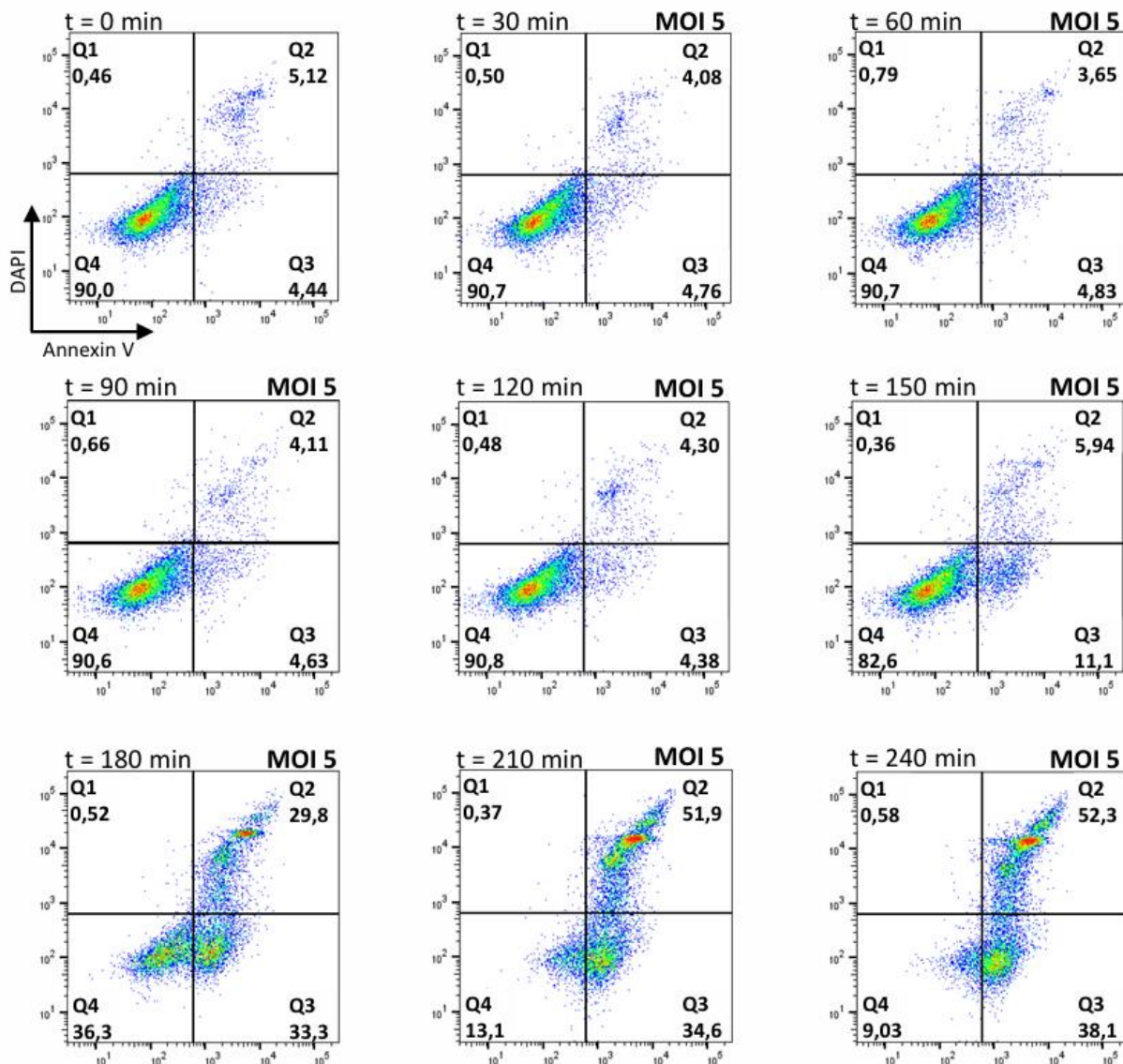


Abbildung 15 - Kinetik der Zelltodinduktion durch *E. coli* in HCT116 p53/p73 ko Zellen. HCT116 p53/p73 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-DAPI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Annexin-DAPI Färbung zeigte eine Induktion von Zelltod durch *E. coli*, im Sinne von Annexin und/oder DAPI positiver Zellen entsprechend der Quadranten Q1 - 3. Im Vergleich zu HCT116 Wildtyp Zellen trat der bakteriell-induzierte Zelltod zeitlich

verzögert (ab 150 Minuten) ein. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

Bakterielle Ko-Kultur von HCT116 Darmepithelzellen mit *E. coli* (O6:HNT) löste unabhängig vom p53 Status nach 4h Inkubationszeit Zelltod aus. Der p53 Status hatte Auswirkungen auf die Kinetik des Zelltods (Abbildung 16). Bei alleinigem Fehlen von p53 wurde die Zelltodinduktion beschleunigt, im Vergleich zu HCT116 Wildtyp mit intaktem p53 und p73. Das alleinige Fehlen von p73 führte zu einem verzögerten Zelltod. Bei gleichzeitigem Fehlen von p53 und p73 trat der Zelltod am langsamsten ein.

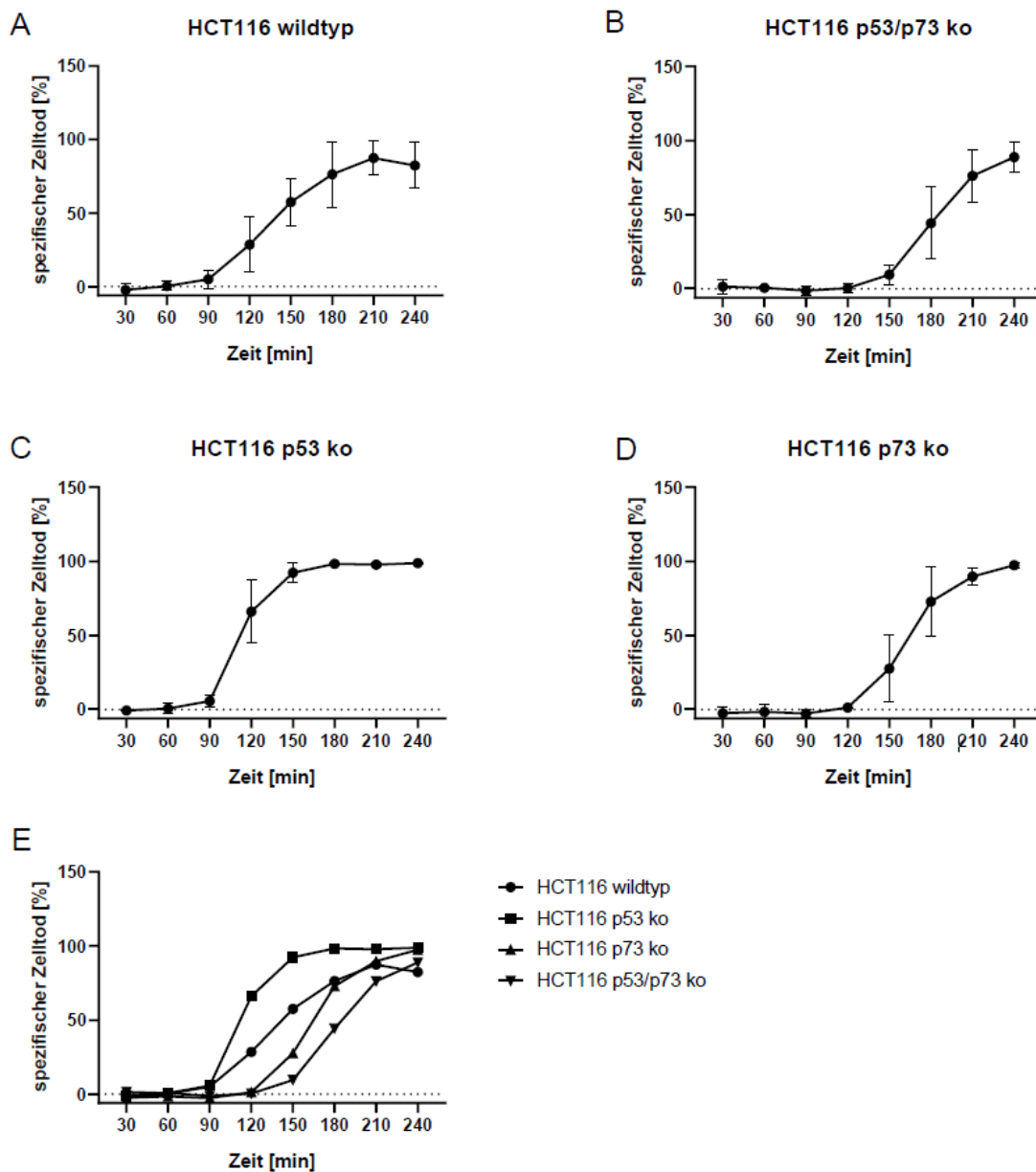


Abbildung 16 – Einfluss von p53 und p73 auf die Kinetik der bakteriell-induzierten Paraptose. HCT116 Zellen mit unterschiedlichem p53 bzw. p73 Status (Wildtyp, p53 ko, p73 ko, p53/p73 ko) wurden bis zu 240 min mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) ko-kultiviert. In 30 min-Intervallen wurde der spezifische Zelltod mittels Annexin/DAPI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. $n \geq 3$

3.3.4 Der bakteriell-induzierte Zelltod geht p53/p73-unabhängig mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials einher

Das charakteristische Merkmal der Paraptose ist die ausgeprägte Bildung von Vakuolen im Zytoplasma, die ihren Ursprung im dilatierten endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder in den dilatierten Mitochondrien haben (Kunst et al., 2024; Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020). Celastrol, ein Anti-Tumor Naturstoff, induziert Paraptose durch die Akkumulation von Calcium in den Mitochondrien, was zum Zelltod führt (Yoon et al., 2014). Intakte Mitochondrien halten das mitochondriale Membranpotential aufrecht. Ein Funktionsverlust der Mitochondrien resultiert in einem Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials. Unsere Hypothese ist, dass eine Dilatation der Mitochondrien bei der Paraptose zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Die mitochondriale Membran weist normalerweise eine negative Nettoladung von ungefähr -180 mV auf. Diese kann durch den positiv geladenen Farbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) angefärbt werden (Crowley et al., 2016). Um zu verstehen, wie sich die durch die Bakterien ausgelöste Stressantwort in unserem Modell auf die Funktion von Mitochondrien auswirkt, wurde mit Hilfe der TMRE-Methode das mitochondriale Membranpotential nach bakterieller Ko-Kultur in 30 Minuten-Intervallen bestimmt. Da unsere Daten zeigen, dass der p53/p73 Status die Kinetik der Paraptose beeinflusst (Abbildung 16), wurden auch für die Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotentials HCT116 Zellen mit unterschiedlichem p53/p73 Status verwendet (Wildtyp, p53 ko, p73 ko und p53/p73 ko). Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde mit FCCP, einem Entkoppler der Atmungskette, ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials induziert. Im Verlauf der bakteriellen Ko-Kultur zeigten alle verwendeten Zelllinien eine zeitabhängige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, die letztlich zu einem vollständigen Kollaps führte.

Bei HCT116 Wildtyp Zellen führte die bakterielle Ko-Kultur ab 150 Minuten zu einer beginnenden Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, sichtbar als Linksshift in Abbildung 17. Der Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials setzte sich fort, bis er schließlich nach 210 Minuten voll ausgeprägt war und das Niveau der Positivkontrolle der mit FCCP behandelten Zellen erreichte. Der Beginn des Zelltods

in der Annexin-DAPI Färbung (Abbildung 12) wurde bereits früher, bei 90 Minuten, beobachtet und war nach 180 Minuten fast vollständig ausgeprägt.

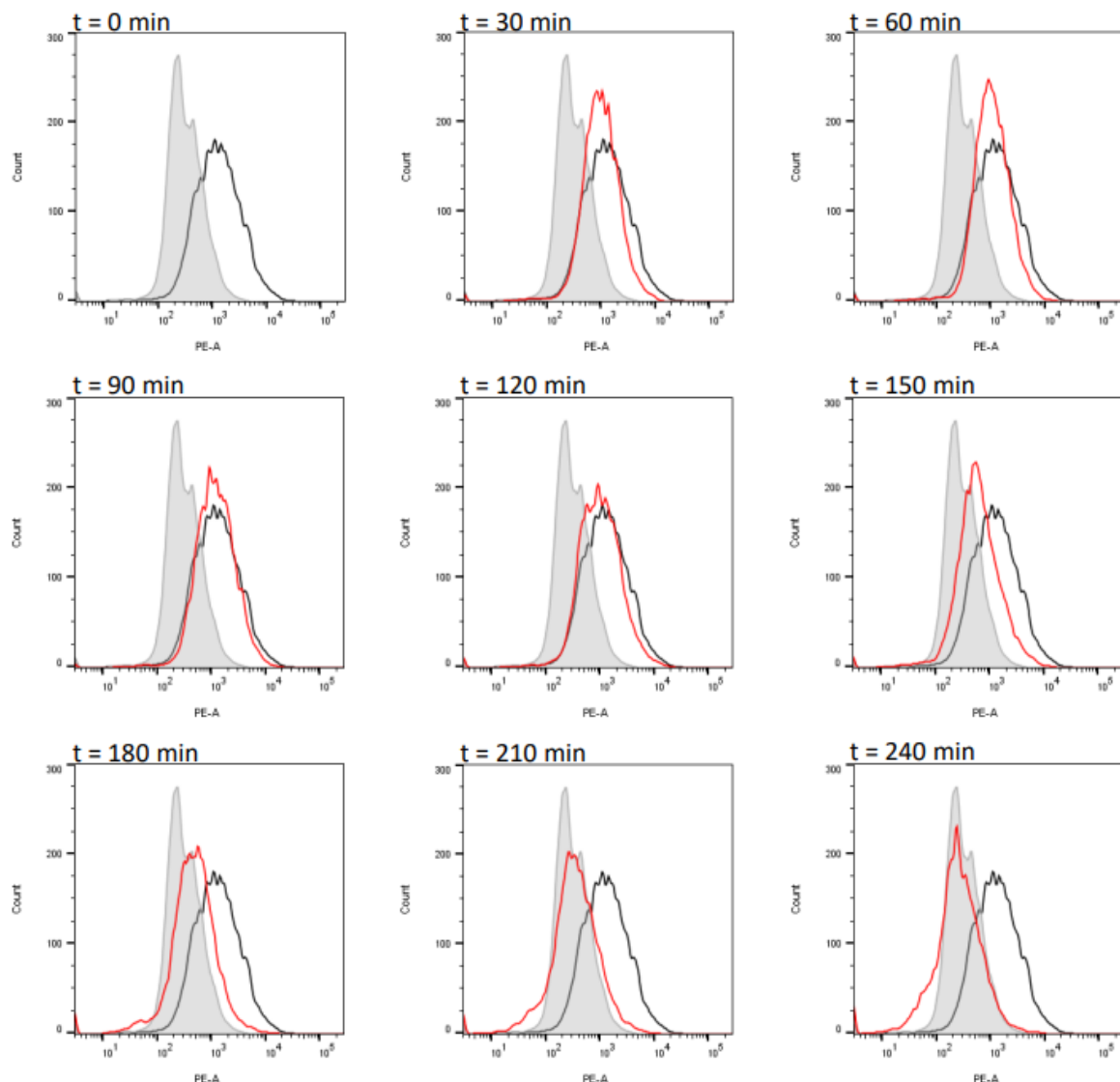


Abbildung 17 – Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach bakterieller Ko-Kultur in HCT116 Wildtyp Zellen. HCT116 Wildtyp Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das mitochondriale Membranpotential unbehandelter Zellen (schwarze Kurve) stellt den Normalzustand dar. Der Atmungsketten-Entkoppler FCCP führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Mit FCCP behandelte Zellen (grau schattierte Kurve) dienen als Referenz für ein zusammengebrochenes mitochondriales Membranpotential. Im Verlauf des durch *E. coli* induzierten Zelltods kommt es zu einer Abnahme bis hin zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (rote Kurve). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von insgesamt $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, führte der einfache p53 ko zu einem schnelleren Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials verglichen mit HCT116 Wildtyp. Bereits nach 30 Minuten bakterieller Ko-Kultur war eine beginnende Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials durch einen Linksshift erkennbar, während diese bei HCT116 Wildtyp erst nach 150 Minuten auftrat. Die Abnahme setzte sich fort, bis

das mitochondriale Membranpotential nach 150 Minuten bakterieller Ko-Kultur vollständig zusammenbrach und das Niveau der FCCP Positivkontrolle erreichte. Der Beginn des Zelltods in der Annexin-DAPI Färbung (Abbildung 13 und Abbildung 16) wurde erst nach 120 Minuten beobachtet und war nach 150 Minuten fast vollständig ausgeprägt.

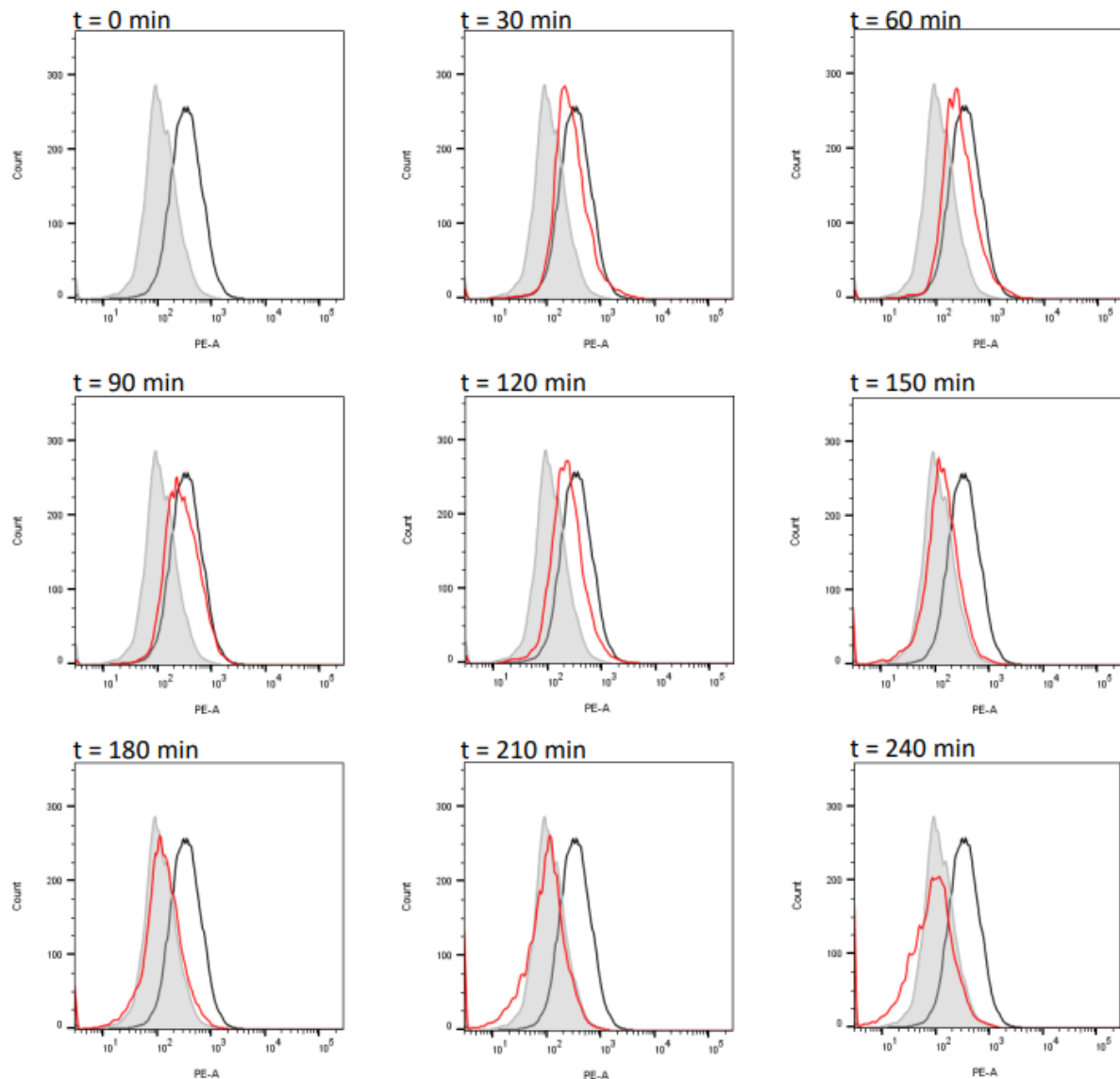


Abbildung 18 - **Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach bakterieller Ko-Kultur in HCT116 p53 ko Zellen.** HCT116 p53 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das mitochondriale Membranpotential unbehandelter Zellen (schwarze Kurve) stellt den Normalzustand dar. Der Atmungsketten-Entkoppler FCCP führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Mit FCCP behandelte Zellen (grau schattierte Kurve) dienen als Referenz für ein zusammengebrochenes mitochondriales Membranpotential. Im Verlauf des durch *E. coli* induzierten Zelltods kommt es zu einer Abnahme bis hin zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (rote Kurve). Bereits nach 30 Minuten bakterieller Ko-Kultur begann die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und war nach 150 Minuten voll ausgeprägt. Verglichen mit HCT116 Wildtyp Zellen, bei denen eine erste Abnahme des

mitochondrialen Membranpotentials erst nach 150 Minuten eintrat, fand dieser Prozess somit beschleunigt statt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von insgesamt $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

Dagegen führte der einfache p73 ko zu einem zeitlich verzögerten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, verglichen mit HCT116 Wildtyp (Abbildung 19). Zu Beginn der bakteriellen Ko-Kultur war eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials sichtbar, die nach 150 Minuten wieder auf den Ausgangswert zurückkehrte. Bei keiner anderen Zelllinie wurde eine Hyperpolarisation beobachtet. Ab 180 Minuten war ein Linksshift entsprechend einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials erkenntlich. Nach 210 Minuten brach das mitochondriale Membranpotential vollständig zusammen und erreichte das Niveau der FCCP Positivkontrolle, wie es bei HCT116 Wildtyp beobachtet wurde. Der Beginn des Zelltods in der Annexin-DAPI Färbung (Abbildung 14 und Abbildung 16) wurde bereits früher, bei 150 Minuten, beobachtet und war nach 210 Minuten fast vollständig ausgeprägt.

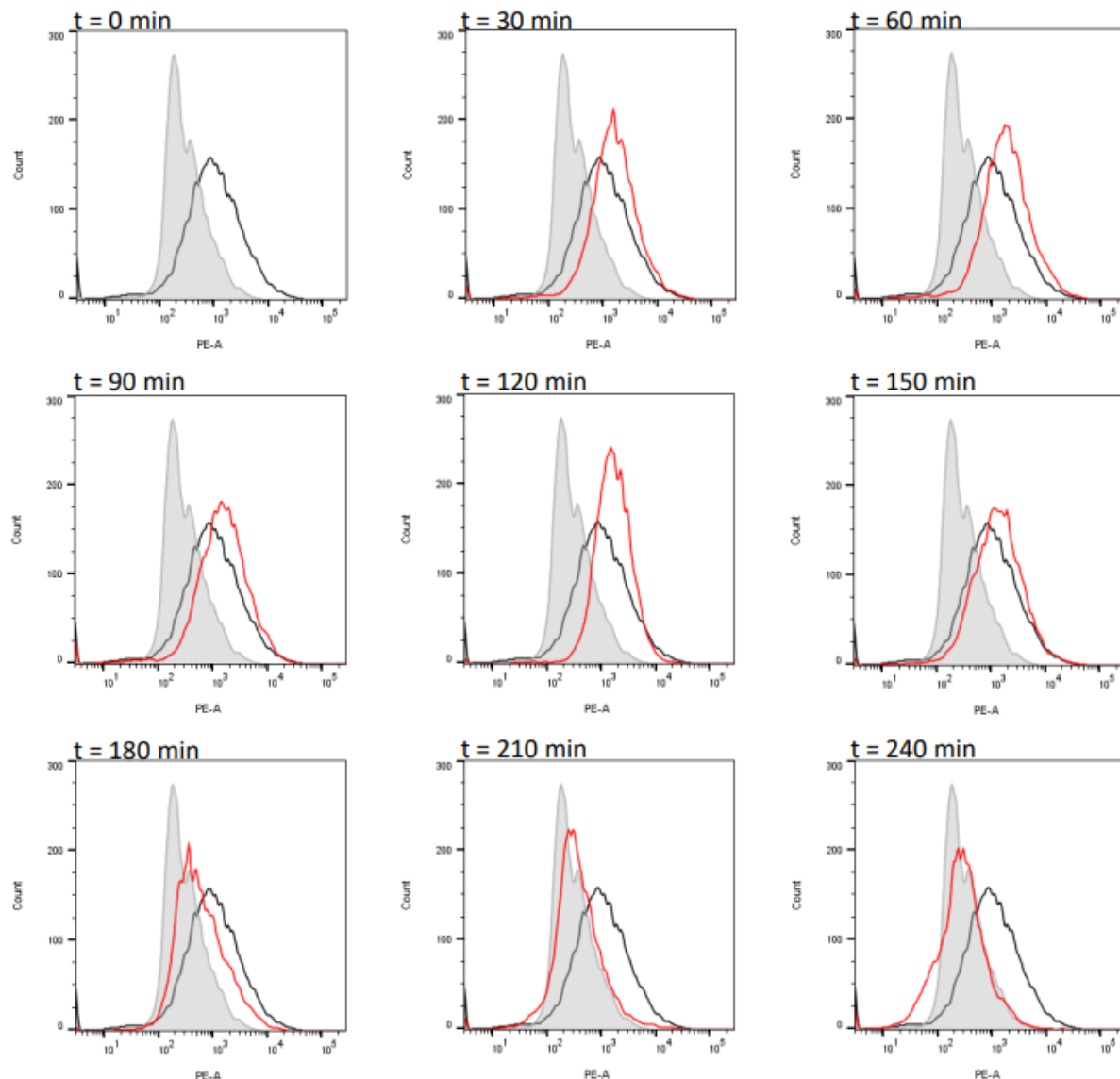


Abbildung 19 - **Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach bakterieller Ko-Kultur in HCT116 p73 ko Zellen.** HCT116 p73 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das mitochondriale Membranpotential unbehandelter Zellen (schwarze Kurve) stellt den Normalzustand dar. Der Atmungsketten-Entkoppler FCCP führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Mit FCCP behandelte Zellen (grau schattierte Kurve) dienen als Referenz für ein zusammengebrochenes mitochondriales Membranpotential. Im Verlauf des durch *E. coli* induzierten Zelltods kommt es zu einer Abnahme bis hin zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (rote Kurve). Die bakterielle Ko-Kultur führte zunächst zu einer Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, das nach 150 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte. Bei HCT116 Wildtyp trat keine Hyperpolarisation auf. Nach 180 Minuten nahm das mitochondriale Membranpotential ab und brach analog zu HCT116 Wildtyp nach 210 Minuten vollständig zusammen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von insgesamt $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zum spezifischen Zelltod (3.3.3) wurde nach bakterieller Ko-Kultur von HCT116 p53/p73 ko Zellen ein zeitlich verzögerter Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials verglichen mit HCT116 Wildtyp Zellen beobachtet. Erst ab 210 Minuten wurde eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials anhand des Linksshifts in Abbildung 20 detektiert. Anders als bei

HCT116 Wildtyp lag das mitochondriale Membranpotential auch nach 240 Minuten noch nicht auf dem Niveau der FCCP Positivkontrolle. Der Beginn des Zelltods in der Annexin-DAPI Färbung (Abbildung 15 und Abbildung 16) wurde bereits früher, bei 180 Minuten, beobachtet und war nach 240 Minuten vollständig ausgeprägt.

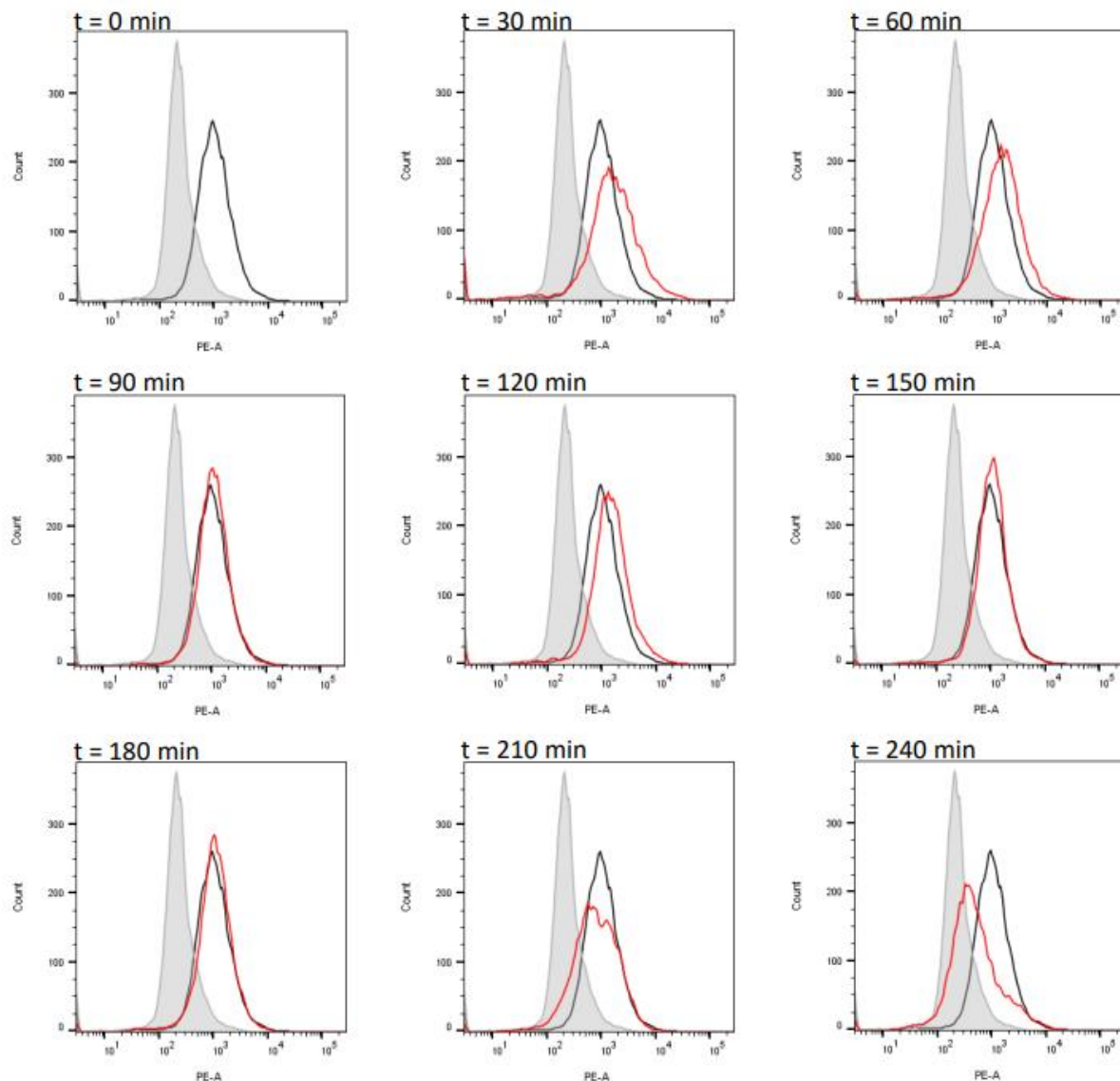


Abbildung 20 - Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach bakterieller Ko-Kultur in HCT116 p53/p73 ko Zellen. HCT116 p53/p73 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen geerntet, mit TMRE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das mitochondriale Membranpotential unbehandelter Zellen (schwarze Kurve) stellt den Normalzustand dar. Der Atmungsketten-Entkoppler FCCP führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Mit FCCP behandelte Zellen (grau schattierte Kurve) dienen als Referenz für ein zusammengebrochenes mitochondriales Membranpotential. Im Verlauf des durch *E. coli* induzierten Zelltods kommt es zu einer Abnahme bis hin zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (rote Kurve). Im Gegensatz zu HCT116 Wildtyp setzte die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials erst nach 210 Minuten ein und war auch nach 240 Minuten nicht auf dem Niveau der FCCP Positivkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen von insgesamt $n \geq 3$ durchgeführten Experimenten.

Bakteriell-induzierte Paraptose geht mit einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in der TMRE-Färbung einher. Wir vermuten, dass dieser

Funktionsverlust der Mitochondrien durch eine ausgeprägte Dilatation der Mitochondrien ausgelöst wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir den Zelltod mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

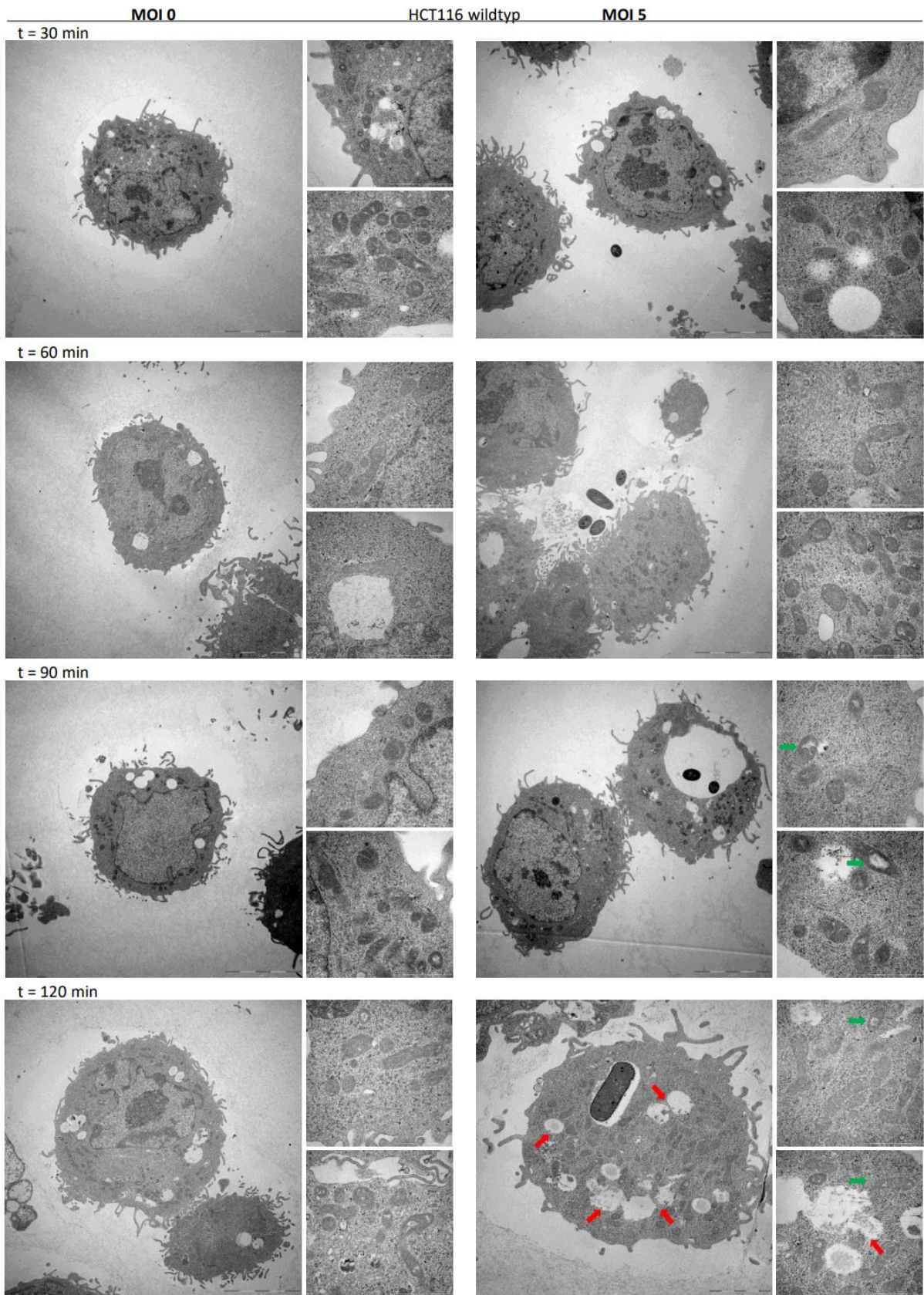
3.3.5 Elektronenmikroskopische Analyse der Kinetik und Morphologie der bakteriell-induzierten Paraptose

Bisher existiert kein gezielter Test oder Assay, um Paraptose als Zelltod zu identifizieren. Bislang wird daher insbesondere das Auftreten multipler zytoplasmatischer Vakuolen mit einfacher Membran in der Elektronenmikroskopie zum Nachweis der Paraptose verwendet (Kessel, 2019; Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020). Die charakteristischen zytoplasmatischen Vakuolen gehen vom dilatierten endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder dilatierten Mitochondrien aus (Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020). Der morphologische Ablauf der Paraptose wurde bisher noch nicht systematisch untersucht. Wir haben daher die zeitlichen morphologischen Veränderungen während der bakteriell-induzierten Paraptose betrachtet. Hierzu wurden HCT116 Darmepithelzellen mit *E. coli* (O6:Hnt) ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen in Karnofsky-Reagenz fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Da der p53/p73 Status sowohl Einfluss auf die Kinetik der Paraptose als auch auf das mitochondriale Membranpotential hat (vgl. 3.3.3 & 3.3.4), wurden auch die p53/p73-defizienten HCT116 Zellen in die elektronenmikroskopischen Analysen mit einbezogen, um mögliche Auswirkungen der p53/p73 Defizienz auf die ultrastrukturelle Morphologie zu detektieren. Die Elektronenmikroskopie wurde freundlicherweise am Institut für Pathologie der Universität Regensburg durchgeführt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der HCT116 Wildtyp Zellen zeigten zu Beginn der bakteriellen Ko-Kultur keine morphologischen Veränderungen und wiesen intakte Zellorganellen auf. Sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Zellen fanden sich physiologisch normwertig einzelne intrazelluläre Vakuolen. Morphologisch waren Zellkern, ER und Mitochondrien zunächst unverändert. Entlang und in direktem Kontakt mit der intakten Zellmembran mit ihren multiplen Zellausläufern waren *E. coli* sichtbar, die erstmals nach 90 Minuten Ko-Kultur auch intrazellulär nachgewiesen wurden (Abbildung 23).

Elektronenmikroskopisch zeigten sich in Gegenwart von Bakterien erstmals ab 120 Minuten eindeutige morphologische Veränderungen. Nach 90 - 120 Minuten bakterieller Ko-Kultur setzte eine beginnende Dilatation der Mitochondriencristae ein, die sich im zeitlichen Verlauf verstärkte (Abbildung 21). Ab 150 Minuten wurde zusätzlich ein dilatiertes ER sichtbar und die Zellausläufer nahmen ab. Die Dilatationen der Mitochondrien und des ER führten zur Bildung von Vakuolen im Zytoplasma. Nach 180 Minuten war die bakteriell-induzierte Paraptose morphologisch bereits vollständig ausgeprägt. Die Mitochondriencristae sowie das ER erschienen stark dilatiert, die überwiegend abgerundeten Zellen wiesen aufgehellte Zellkerne und Löcher in der Zellmembran auf (Abbildung 21).

HCT116 Wildtyp Zellen zeigen somit nach bakterieller Ko-Kultur typische Merkmale der Paraptose in der Elektronenmikroskopie. Insbesondere die zytoplasmatische Vakuolisierung sowie die Dilatation des ER und der Mitochondrien sind charakteristisch. Gleichzeitig fehlen apoptotische Merkmale wie die sogenannten apoptotic bodies, DNA-Fragmentierung oder -Kondensation, was ebenfalls zu den Kennzeichen des paraptotischen Zelltod gehört (Sperandio et al., 2000).



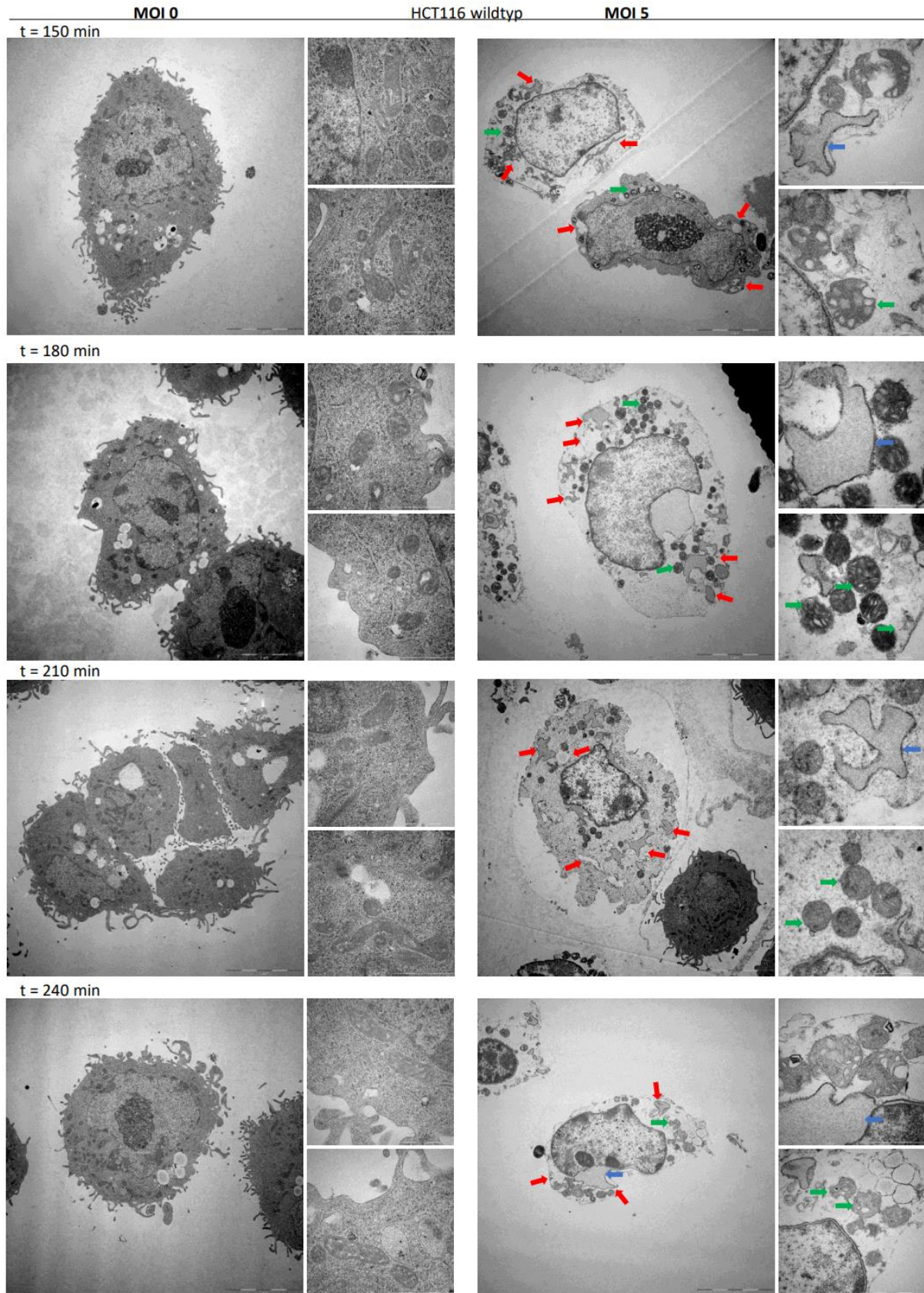


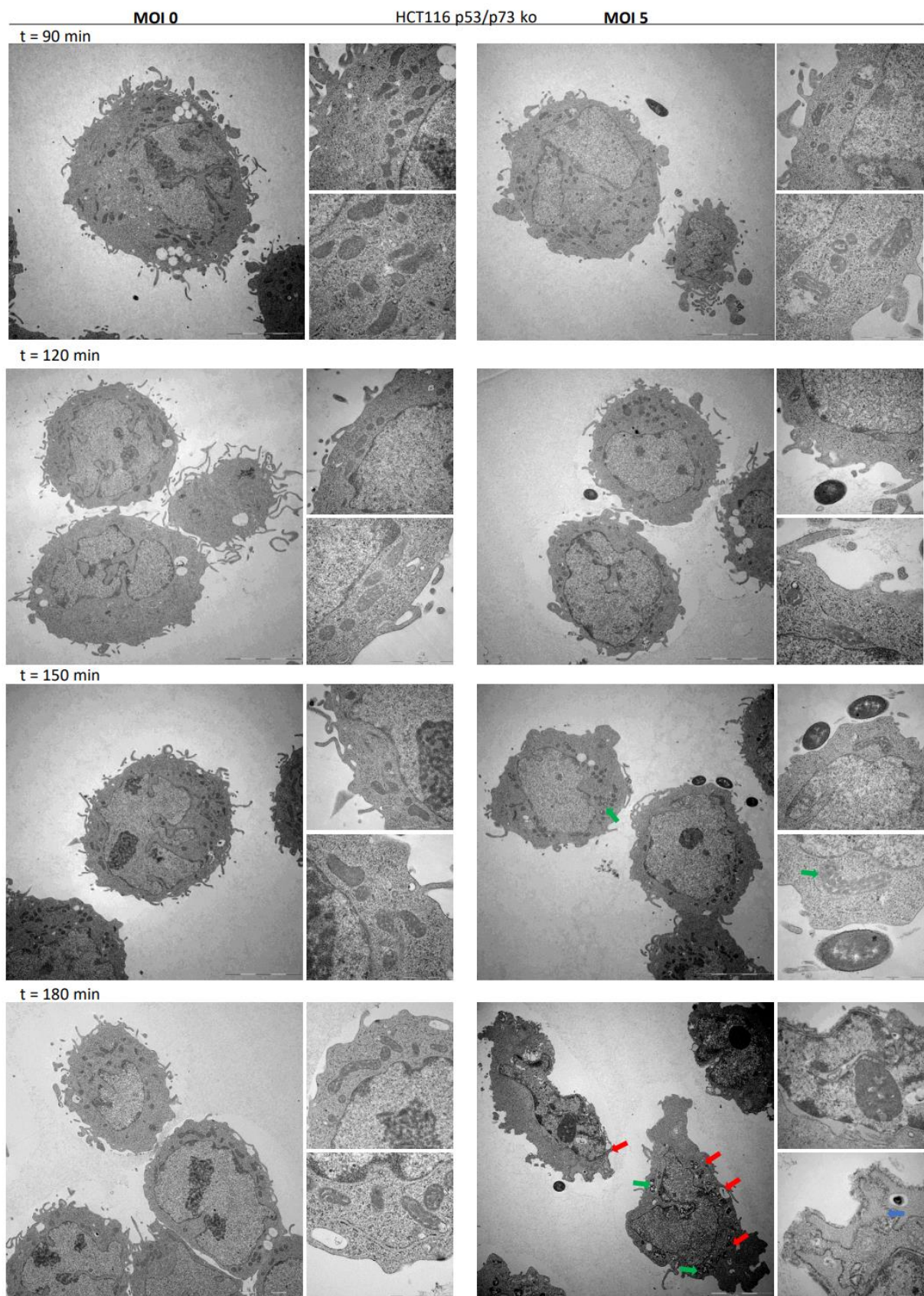
Abbildung 21 – **Morphologische Charakteristika der bakteriell-induzierten Paraptose in HCT116 Wildtyp Zellen.** HCT116 Wildtyp Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Ab 120 Minuten nach bakterieller Ko-Kultur wiesen die Zellen zunehmend typische Merkmale der Paraptose auf. Dilatierte

Mitochondriencristae (grüne Pfeile) traten ab 90 - 120 Minuten zunehmend auf. Die Dilatation des ER (blaue Pfeile) war ab 150 Minuten vermehrt sichtbar. Typische Vakuolenbildung (rote Pfeile) ausgehend von dilatierten Mitochondrien und ER war ab 120 Minuten detektierbar. Zu späteren Zeitpunkten (150 - 240 Minuten) erschienen die Zellkerne aufgeheilt und die Zellen waren überwiegend abgerundet. E. coli waren nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär nachweisbar (90 und 120 Minuten). Dargestellt sind jeweils eine Übersichtsaufnahme als großes Bild und zwei zugehörige Detailaufnahmen als kleinere Bilder rechts daneben.

3.3.6 Defizienz von p53 und p73 verzögert den Verlauf der bakteriell-induzierten Paraptose

Wir haben gesehen, dass der p53/p73 Status die Zelltodkinetik von HCT116 Zellen beeinflusst. Die p53/p73 Defizienz führte zu einem verlangsamten Zelltod in der Durchflusszytometrie (vgl. 3.3.3) und zu einem späteren Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (vgl. 3.3.3.4). Im nächsten Schritt wollten wir klären, ob die Defizienz von Proteinen der p53 Familie auch zu morphologischen Unterschieden bei der Paraptose führt. Daher wurden HCT116 p53/p73 ko Zellen mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) ko-kultiviert und mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Dafür wurden jeweils definierte Zeitpunkte (90, 120, 150, 180, 240 Minuten) gewählt, zu denen Paraptose bereits durchflusszytometrisch detektiert wurde (Abbildung 22).

Erst ab 150 Minuten bakterieller Ko-Kultur war ein beginnender paraptotischer Zelltod elektronenmikroskopisch nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt waren erste dilatierte Mitochondriencristae und eine beginnende Aufweitung des endoplasmatischen Retikulums zu sehen. Diese Effekte waren ab 180 Minuten verstärkt vorhanden. Nach 240 Minuten Ko-Kultur mit *E. coli* war die Paraptose morphologisch voll ausgeprägt (Abbildung 22). Das ER und die mitochondrialen Cristae waren stark dilatiert, wodurch das Zytoplasma vakuolisiert erschien. Zudem waren die Zellkerne aufgeheilt und Löcher in der Cytoplasmamembran erkennbar. Auch in Abwesenheit von p53 und p73 wiesen die Zellen keine apoptotischen Merkmale wie z. B. Apoptosekörperchen, DNA-Fragmentierung oder –Kondensation auf (Abbildung 22). Auf morphologischer Ebene gleicht die *E. coli*-induzierte Paraptose in HCT116 Wildtyp Zellen der in HCT116 p53/p73 ko Zellen. Damit liegt nahe, dass p53 und p73 nicht essentiell für die Induktion oder den generellen Ablauf der Paraptose sind. Dennoch wurde elektronenmikroskopisch eine zeitlich verzögerte Zelltodinduktion in HCT116 p53/p73 ko Zellen gegenüber HCT116 Wildtyp Zellen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die p53 Familie eine Rolle bei der Feinregulation der Paraptose spielt.



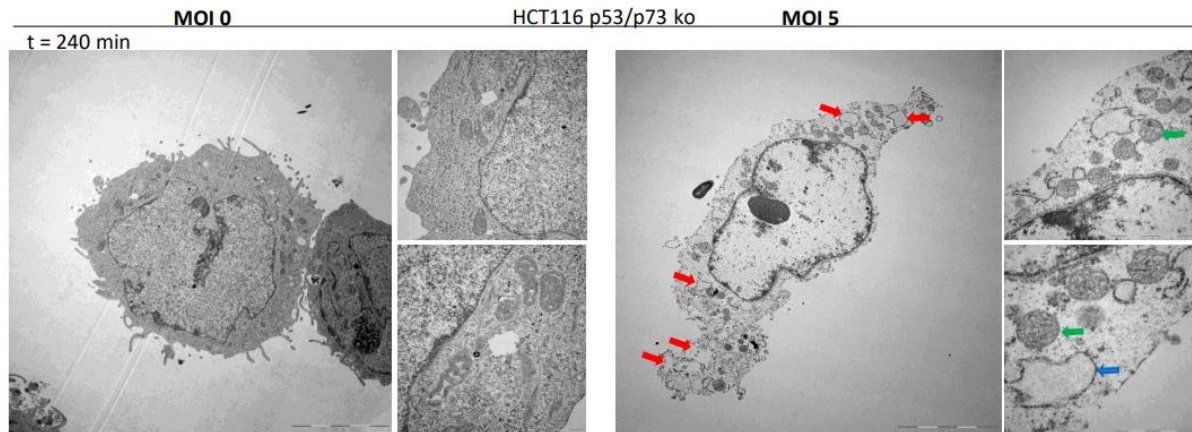


Abbildung 22 – **Zeitlich verzögerte morphologische Veränderungen bei bakteriell-induzierter Paraptose in HCT116 p53/p73 ko Zellen.** HCT116 p53/p73 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Verglichen mit HCT116 Wildtyp wiesen die Zellen erst nach längerer bakterieller Ko-Kultur typische Merkmale der Paraptose auf. Dilatierte Mitochondriencristae (grüne Pfeile) traten ab 150 Minuten zunehmend auf. Die Dilatation des endoplasmatischen Retikulums (blaue Pfeile) war ab 150 - 180 Minuten zunehmend sichtbar. Typische Vakuolenbildung (rote Pfeile) ausgehend von dilatierten Mitochondrien und ER war ab 180 Minuten detektierbar. Zu späteren Zeitpunkten (240 Minuten) erschienen die Zellkerne aufgehellt. Dargestellt sind jeweils eine Übersichtsaufnahme als großes Bild und zwei zugehörige Detailaufnahmen als kleinere Bilder rechts daneben.

3.3.7 Elektronenmikroskopischer Nachweis intrazellulärer Bakterien im *in vitro*-SBP-Modell

Über welchen Mechanismus Bakterien wie *E. coli* (O6:Hnt) Paraptose in HCT116 Darmepithelzellen auslösen, ist ungeklärt. Wir wissen, dass ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Darmepithelzellen notwendig ist, um den Zelltod auszulösen (Neubert Philip, 2020). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist ein solcher direkter Kontakt zwischen Darmepithelzellen und Bakterien sichtbar. Interessanterweise sind *E. coli* auch intrazellulär nachweisbar, sowohl in HCT116 Wildtyp als auch HCT116 p53/p73 ko Zellen (Abbildung 23).

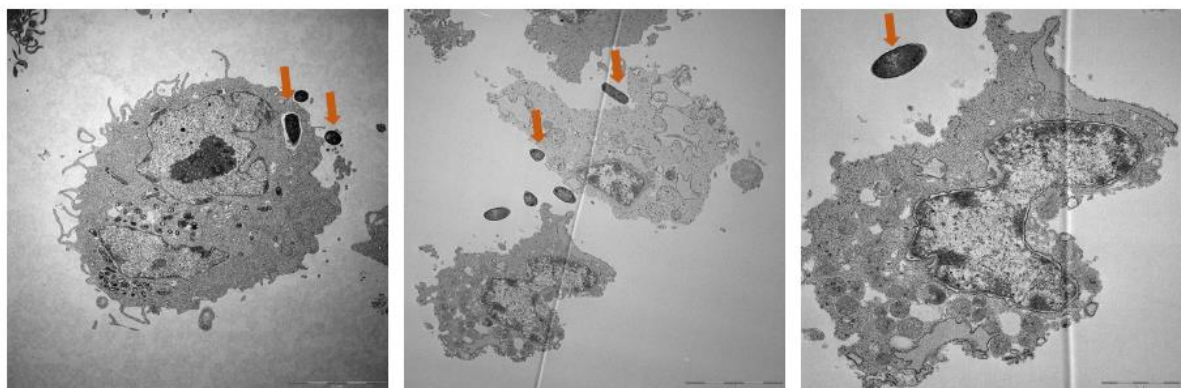
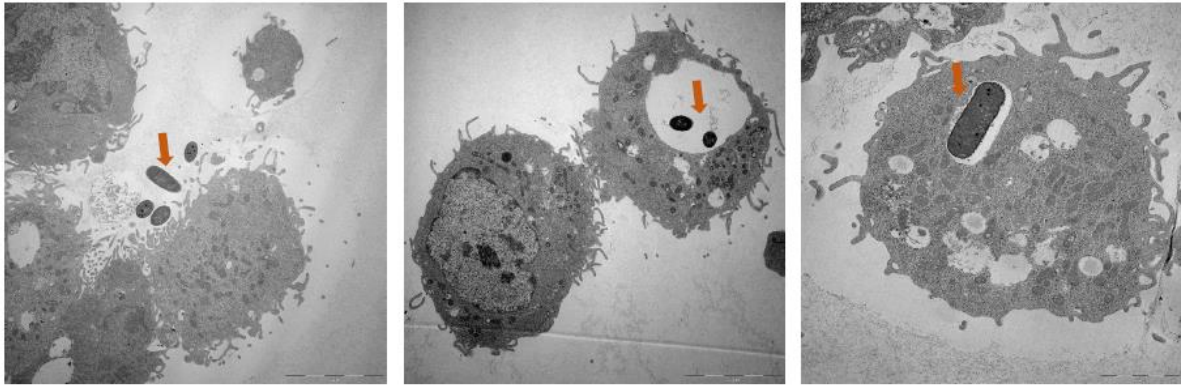


Abbildung 23 - **Enger Bakterien-Epithelzell-Kontakt und intrazellulär gelegene *E. coli* (O6:Hnt).** HCT116 Wildtyp und HCT116 p53/p73 ko Zellen wurden mit *E. coli* (O6:Hnt; MOI 5) für insgesamt 4 Stunden ko-kultiviert. In 30 Minuten-Intervallen wurden die Zellen fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind von links nach rechts Aufnahmen der HCT116 Wildtyp Zellen bei einer Ko-Kulturdauer von 60, 90 und 120 Minuten sowie der HCT116 p53/p73 ko Zellen bei einer Ko-Kulturdauer von 150 und zweimal 240 Minuten. Sowohl bei HCT116 Wildtyp Zellen als auch bei HCT116 p53/p73 ko Zellen waren Bakterien nicht nur in direktem Kontakt mit Epithelzellen, sondern auch intrazellulär nachweisbar (orange Pfeile).

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Menge von p53 und p73 im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose reduziert ist. Bereits in frühen Stadien der Leberzirrhose (Child-Pugh A und Child-Pugh B) ist diese Reduktion festzustellen. Zudem korrelieren niedrige p53- sowie p73-Spiegel mit einer dünnen Mukusschicht.

In unserem *in vitro*-Modell der Adenokarzinomzelllinie HCT116 mit variierenden p53 bzw. p73 Status, wurde der Einfluss von *E. coli* (O6:Hnt) auf die p53 Familie untersucht. Bakterien-Epithel-Kontakt führt nach initialer Induktion von p53 zu einem Abbau von p53. p73 wird ohne vorausgehende Induktion im zeitlichen Verlauf abgebaut. Ein ko von p53 führt zu keinen wesentlichen Unterschieden im p73 Abbau, allenfalls zu einer geringen Beschleunigung. Die p73 Defizienz führt zu einem zeitlich verzögerten und insgesamt geringeren p53 Abbau.

E. coli induzieren Zelltod in Form von Paraptose in HCT116 Zellen. Elektronenmikroskopisch wurden ein stark dilatiertes ER und stark dilatierte Mitochondrien beobachtet, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass *E. coli* intrazellulär in Darmepithelzellen eindringen können. p53 und p73 Defizienz verhindert das Eintreten der Paraptose nicht, verzögern aber deren zeitlichen Ablauf. Die p53 Familie könnte daher eine regulatorische Rolle bei der Kontrolle der Paraptose einnehmen.

4 Diskussion

4.1 Bakterielle Einflussnahme auf die p53 Familie im Kontext der spontan bakteriellen Peritonitis

Die spontan bakterielle Peritonitis ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose. Mit einer 1-Jahres-Mortalität von bis zu 66 % (Schwabl et al., 2015) ist die Prognose sehr ungünstig. Die SBP ist die häufigste bakterielle Infektion bei Leberzirrhose und kann bislang nur durch Antibiotikagabe behandelt werden (Gerbes et al., 2019; Marciano et al., 2019). Antibiotikaresistenzen erschweren die Therapie, auch in Deutschland, zunehmend (Gerbes et al., 2019; Naim Abu-Freha et al., 2021). Bei der SBP ist die bakterielle Translokation von Darmbakterien in das Peritoneum pathologisch ausgeprägt (Wiest et al., 2014). Eine veränderte Zusammensetzung der Darmflora, eine verstärkte bakterielle Translokation, der Verlust wichtiger Zell-Zell-Kontaktproteine sowie eine reduzierte Mukusschicht tragen zur Pathogenese bei (Haderer et al., 2022; Marciano et al., 2019; Wiest et al., 2014). Nichtsdestotrotz ist der Pathomechanismus noch nicht vollständig verstanden. Unsere eigenen Vorarbeiten geben Hinweise auf eine Rolle der p53 Familie bei der Regulation der Interaktion von Epithelzellen und Bakterien im Darmepithel und hierbei auch dem Zelltod Paraptose. Daher knüpft die vorliegende Arbeit an diese Themenkomplexe an.

4.1.1 Auswirkungen der Reduktion der p53 Familie auf die SBP Entstehung

Die Mukusschicht ist im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose reduziert (Haderer et al., 2022). Dies erleichtert den direkten Kontakt von Bakterien mit dem Darmepithel. In einem von uns etablierten *in vitro*-Modell konnten wir in Vorarbeiten die Bakterien-Darmepithel-Interaktion nachstellen und eine bakterielle Einflussnahme auf die p53 Familie beobachten (Haderer et al., 2022; Neubert Philip, 2020).

Es ist bekannt, dass Bakterien der Gattungen *Helicobacter*, *Chlamydia* und *Shigella* p53 reduzieren können (Chumduri et al., 2016). Wei et al. (2010) konnten für *H. pylori* zeigen, dass die Infektion von Magenepithelzellen eine transiente Induktion von p53 auslöst, gefolgt von einem p53 Abbau. Auch in unserem Modell wurde eine initiale Induktion von p53 bei bakterieller Ko-Kultur sowohl in HCT116 Wildtyp als auch HCT116 p73 ko Zellen gemessen. Bei längerer Bakterien-Epithel-Interaktion induzierte *E. coli* einen Abbau von p53. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Arbeiten überein (Haderer, 2019; Neubert Philip, 2020). Wei et al. (2010) führen als

Erklärungsansatz an, dass Bakterien zellulären Stress auslösen und im Rahmen der zellulären Stressantwort zunächst p53 induzieren. Gleichzeitig würden *H. pylori* Bakterien einen Abbau von p53 verursachen und somit nach längerer Exposition p53 reduzieren.

Zu den untersuchten frühen Zeitpunkten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Induktion von p73 beobachtet. Da die initiale Induktion in unseren Vorarbeiten jedoch immer ausschließlich in einem kurzen Zeitfenster nachweisbar war, gehen wir davon aus, dass sie nicht in den hier festgelegten Untersuchungszeitpunkten erfasst wurde. Eine längere Bakterien-Epithel-Interaktion führte zu einem Abbau von p73 (Haderer, 2019; Neubert Philip, 2020).

Costa et al. (2020) beschreiben, dass *H. pylori* einen proteasomalen Abbau von p53 in Magenepithelzellen induziert. Die Infektion mit *H. pylori* hemmt die Expression des Upstream Transcription Factor-1 (USF1) das normalerweise im Komplex mit p53 agiert und dessen Abbau verhindert (Costa et al., 2020). Auch in dem von uns verwendeten *in vitro*-Modell ist es naheliegend, dass *E. coli* den Abbau von p53 und p73 über das Proteasom induzieren. In ubiquitinierte Form werden p53 und p73 durch das Proteasom abgebaut (Levine, 2020). Unsere Vorarbeiten zeigen, dass eine Blockade der Ubiquitinligase MDM2 durch Nutlin-3 zu einer Stabilisierung von p53 und p73 in Ko-Kultur mit *E. coli* führt (Haderer, 2019). Daher gehen wir von einem durch Bakterien ausgelösten proteasomalen Abbau von p53 und p73 aus.

Einzelne Studien haben den Einfluss von Bakterien wie *H. pylori* auf die p53 Familie in Biopsien des Magens untersucht. Saf et al. (2015) untersuchten mittels Immunhistochemie die p53-Proteinexpression in Magenbiopsien von Kindern mit und ohne Gastritis. Die Teilnehmer wurden entsprechend ihres *H. pylori*-Nachweises in Gruppen eingeteilt. Entzündungsassoziiert waren die p53-Spiegel bei Gastritis sowohl in *H. pylori* negativen als auch in *H. pylori* positiven Biopsien erhöht. In Proben, bei denen eine Infektion mit *H. pylori* vorlag, waren die p53 Mengen um das 2,5-fache erhöht. Die Autoren führten somit insbesondere das Vorhandensein von *H. pylori* auf die erhöhten p53-Spiegel zurück (Saf et al., 2015). In Übereinstimmung damit beobachteten Wei et al. (2010), dass eine orale Infektion mit *H. pylori* in den ersten 24 Stunden zu erhöhten p53-Spiegeln in der Magenschleimhaut von Rennmäusen führte. Danach sanken die p53-Spiegel der infizierten Tiere im weiteren zeitlichen Verlauf

innerhalb des Beobachtungszeitraums von zwei Wochen ab (Wei et al., 2010). Bakterielle Infektionen mit *H. pylori* können also langfristig zu einer Verringerung der p53 Menge in der Magenschleimhaut führen. Bei Leberzirrhose ermöglicht die dünnere Mukusschicht einen vermehrten direkten Bakterien-Epithel-Kontakt (Haderer et al., 2022). In Anlehnung an die Ergebnisse der Studien zur bakteriellen Einflussnahme auf p53 in der Magenschleimhaut und basierend auf unserer Annahme, dass die Bakterien-Epithel-Interaktion zu zellulärem Stress führt, vermuteten wir, dass die Expression der Proteine der p53 Familie im Darm bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose verändert sein könnte. Hierfür quantifizierten wir die p53 und p73 Menge in Darmbiopsien von 50 Patient(inn)en mit Leberzirrhose sowie von 70 Kontrollpatient(inn)en und beschreiben somit erstmals den Status der p53 Familie in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose. Patient(inn)en mit Leberzirrhose wiesen signifikant reduzierte p53- und p73-Spiegel im Darmepithel auf (vgl. 3.1.1). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass vermehrter Bakterien-Epithel-Kontakt, wie er bei einer dünneren Mukusschicht anzunehmen ist, zu einer stärkeren Reduktion der p53 Familie führt. Übereinstimmend damit fanden wir eine positive Korrelation zwischen der Mukusschichtdicke und der Menge an p53 und p73 (vgl. 3.1.4). Je dünner die schützende Mukusschicht im Darm ist, umso geringer sind die p53- und p73-Mengen. Somit gehen wir davon aus, dass die Reduktion der p53 Familie im Darm durch den direkten Kontakt der Epithelzellen mit Bakterien vermittelt wird.

In verschiedenen Zelllinien aus Darm, Lunge, Brust und Knochen erhöht p53 die Transkription des *MUC2* Gens, indem es an zwei spezifische Bindungsstellen in der Promotorregion bindet (Ookawa et al., 2002). *MUC2* kodiert für das Mucin-2-Protein, welches die Hauptkomponente der schützenden Mukusschicht des Darms darstellt (Gallego et al., 2023; Luis & Hansson, 2023; Peterson & Artis, 2014). Ein bakteriell-induzierter Verlust von p53 könnte einen *circulus vitiosus* auslösen, der die Transkription und Expression von *MUC2* stört. Die daraus resultierende, verringerte Mukusschicht erleichtert den direkten Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen, was wiederum zu einer bakteriell-vermittelten Reduktion der p53 Familie führen kann.

4.1.2 Intrazelluläre Bakterien und ihre Auswirkungen auf die p53 Familie: Schutzmechanismus oder Überlebensvorteil?

Bei der Entstehung einer SBP translozieren Bakterien vom Darmlumen in die Peritonealhöhle. Die Zell-Zell-Verbindungen des gastrointestinalen Epithels werden

als „second line of defence“ gegenüber der bakteriellen Translokation gesehen; der Mukus als „first line of defence“. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei Leberzirrhose die Integrität der epithelialen Barriere gestört ist. Wichtige Zell-Zell-Kontaktproteine wie E-Cadherin und Occludin sind im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose reduziert (Haderer et al., 2022). Assimakopoulos et al. (2012) sahen neben der Abnahme der Zell-Zell-Kontaktproteine Occludin und Claudin-1 in Duodenalbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose auch eine erhöhte Permeabilität für bakterielle Toxine, nachgewiesen durch erhöhte Serumspiegel von Endotoxinen. Erklärbar ist dies durch eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität des Darmepithels (Assimakopoulos et al., 2012; Wiest et al., 2014). Ob die erhöhte parazelluläre Permeabilität bei Leberzirrhose dazu führt, dass Bakterien über ebendiesen Translokationspfad in das Peritoneum übertreten ist nicht abschließend geklärt (Wiest et al., 2014). Vielmehr wird die transzelluläre Translokation als wichtigster Weg für Bakterien, zelluläre Barrieren zu durchwandern, diskutiert (Wiest et al., 2014). Macutkiewicz et al. (2008) fanden heraus, dass die Überwindung einer Caco-2 Darmepithelschicht durch Bakterien wie *E. coli* (C25), einem nicht klassisch pathogenen Bakterienstamm, unabhängig von der parazellulären Permeabilität ist. Stattdessen erhöhte zellulärer Stress die transzelluläre Translokationsrate (Macutkiewicz et al., 2008). Interessanterweise wies diese Arbeitsgruppe elektronenmikroskopisch intrazelluläre Bakterien nach Bakterien-Epithel-Kontakt in Caco-2 Zellen nach. Auch wir beobachteten intrazelluläre *E. coli* in einem ähnlichen Versuchsaufbau mit Caco-2 Darmepithelzellen (Haderer, 2019). Darüber hinaus wurden in der hier vorgelegten Arbeit intrazellulär lokalisierte *E. coli* in HCT116 Zellen mittels Elektronenmikroskopie detektiert (vgl. 3.3.7). Der Nachweis intrazellulärer Bakterien in verschiedenen Darmzelllinien unterstreicht die Annahme, dass eine transzelluläre Durchwanderung des Darmepithels einen möglichen Translokationspfad bei der Entwicklung einer SBP darstellt.

Wie zuvor beschrieben, konnten elektronenmikroskopisch intrazellulär gelegene Bakterien nachgewiesen werden (vgl. 3.3.7). Weiterhin reduzieren Bakterien bei persistierendem Kontakt mit dem Darmepithel die Proteinmengen der p53 Familie. Sowohl bei der Reduktion der p53 Familie als auch bei der intrazellulären Lokalisation von Bakterien stellt sich die Frage, ob es sich um eine Art Schutzmechanismus des

Darmepithels gegenüber Bakterien handelt oder ob dies zu einem Überlebensvorteil der Bakterien führt.

Es ist denkbar, dass Bakterien zelluläre Prozesse direkt beeinflussen oder schädigen. Bakterien können in Zellen Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche verursachen (Siegl & Rudel, 2015). So induzieren z. B. *H. pylori* genomische Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen in Magenepithelzellen, wenn eine Adhäsion der Bakterien stattfindet (Toller et al., 2011). Obligat und fakultativ intrazelluläre Bakterien sind auf ein möglichst langes Überleben ihrer Wirtszellen angewiesen. Durch den Abbau von p53 verhindern Spezies wie *S. flexneri*, *H. pylori*, *C. trachomatis* oder *N. gonorrhoeae* die Apoptose ihrer Wirtszellen, um ihre eigene intrazelluläre Replikation zu ermöglichen (Siegl & Rudel, 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass der Kontakt mit *E. coli* zu einer Reduktion von p53 und p73 führt. Gleichzeitig waren p53 und p73 defiziente HCT116 Zellen während bakterieller Ko-Kultur länger vital. Es bleibt fraglich, ob Bakterien die p53 Familie reduzieren, um einen Vorteil aus den länger vitalen Zellen zu ziehen. Da wir intrazellulär gelegene *E. coli* elektronenmikroskopisch nachweisen konnten, wäre das Eintreten des Zelltods der HCT116 Zellen für den Lebenszyklus der Bakterien sicher ungünstig, da ihre Wirtszelle abstirbt und keinen Raum mehr für eine intrazelluläre Replikation bietet. Es ist also denkbar, dass Bakterien die Induktion von Zelltod über die Reduktion der p53 Familie verhindern bzw. verzögern. So könnte mehr Zeit für eine intrazelluläre Replikation bleiben oder die Durchwanderung des Epithels mittels Transzytose ermöglicht werden.

4.2 Charakterisierung der durch Bakterien induzierten Paraptose und ihre Bedeutung für die SBP - Eine neue Rolle von p53 und p73

Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der durch *E. coli* induzierte Zelltod in HCT116 Zellen Paraptose ist und andere Arten des Zelltods wie z. B. Apoptose, Nekrose, Pyroptose oder Autophagie ausgeschlossen sind (Neubert Philip, 2020; Scholtis, 2021). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der bakteriell-induzierte Zelltod in unserem *in vitro*-Modell Caspase-unabhängig und nicht durch zVAD-FMK blockierbar ist (vgl. 3.3.1). Damit lag bei unserem verwendeten Versuchsaufbau nicht die Apoptose als Zelltod zugrunde. Stattdessen zeigte sich eine Reduktion des spezifischen Zelltods durch Transkriptionsblockade mit Actinomycin D, als klassisches Merkmal der Paraptose (3.3.2). Gleichzeitig wurde die Paraptose

anhand der spezifischen Morphologie in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen. Hier bedanken wir uns bei Professor Brochhausen, Mannheim und seiner Arbeitsgruppe für die gute Kooperation. In der durchflusszytometrisch bestimmten Zelltodkinetik der bakteriell-induzierten Paraptose beobachteten wir zunächst Annexin positiv gefärbte HCT116 Zellen, die im zeitlichen Verlauf mehrheitlich Annexin-DAPI positiv wurden (vgl. Abbildung 12 - Abbildung 15). Obwohl keine Apoptose als Zelltod vorlag, sahen wir Annexin positiv gefärbte Zellen, was möglicherweise ein neues Charakteristikum der (bakteriell-induzierten) Paraptose darstellen könnte.

4.2.1 Die zytoplasmatischen Vakuolen gehen vom dilatierten ER und von dilatierten Mitochondrien aus

Sperandio et al. beschrieben im Jahr 2000 erstmalig den Zelltod Paraptose. Damals wie heute wird Paraptose insbesondere durch elektronenmikroskopische Charakteristika nachgewiesen (Kessel, 2019; Kunst et al., 2024; Najdawi & Abu-Asab, 2022; Yan et al., 2020). Hierzu zählen vor allem das Auftreten multipler zytoplasmatischer Vakuolen mit einfacher Membran. Diese gehen vom dilatierten endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder von dilatierten Mitochondrien aus (Kessel, 2019; Sperandio et al., 2000; Yan et al., 2020). Gleichzeitig fehlen die für die Apoptose typischen Morphologien wie Apoptosekörperchen, DNA-Fragmentierung oder -Kondensation (Sperandio et al., 2000).

Die Schwellung der Mitochondrien und des ER werden insbesondere auf osmotisch bedingte Ursachen zurückgeführt (Kim et al., 2020; Yan et al., 2020). Gandin et al. (2012) sahen, dass der Phosphin-Kupfer(I)-Komplex einen paraptotischen Zelltod in mehreren Darmkrebszelllinien induzierte. Dieser Kupferkomplex führte über die Hemmung des Proteasoms zu einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine, was Stress im ER auslöste, und es anschwellen ließ. Gandin et al. (2012) nutzten LoVo Darmkrebszellen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung des durch den Phosphin-Kupfer(I)-Komplex induzierten paraptotischen Zelltods. Sie stellten in den zwei Untersuchungszeitpunkten, nach 12 h und 24 h Behandlung, eine zunehmende Dilatation des ER über 24 h fest. Darüber hinaus konnten sie durch Immunfluoreszenzfärbung zeigen, dass die Mehrheit der Vakuolen Calnexin enthielt, ein Protein, das im ER lokalisiert ist (Gandin et al., 2012). Auch wir fanden eine starke Dilatation des ER, die zur Vakuolisierung des Zytoplasmas führte. Im Gegensatz zu

Gandin et al. (2012) beobachteten wir im zeitlichen Verlauf zusätzlich zunehmend dilatierte Mitochondrien, die ebenfalls zur Vakuolisierung des Zytoplasmas beitragen. Dies entspricht den Ergebnissen der Vakuolen-Immunfluoreszenzfärbung von Gandin et al. (2012), da auch hier ein Teil der Vakuolen kein Calnexin aufwies, also nicht endoplasmatischen Ursprungs war. Auch Yoon et al. (2014) wiesen elektronenmikroskopisch sowohl das dilatierte ER als auch die dilatierten Mitochondrien als Ursprung der zytoplasmatischen Vakuolen in der durch den Naturstoff Celastrol induzierten Paraptose nach (Yoon et al., 2014).

Diese Studie zeigte zudem eine Akkumulation polyubiquitinerter Proteine als Hinweis auf eine Funktionsstörung des Proteasoms (Yoon et al., 2014). Auch Gandin et al. (2012) sahen, dass Phosphin-Kupfer(I)-Komplex über die Hemmung des Proteasoms zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt, wodurch ER-Stress sowie der Zelltod Paraptose induziert wurden. Es wird angenommen, dass die Akkumulation fehlgefalteter Proteine ER-Stress verursacht und konsekutiv ein osmotisches Anschwellen des ER auslöst (Kim et al., 2020). Weiterhin wird beschrieben, dass sowohl ein Calciumausstrom aus dem ER als auch ein nachfolgender Calciumeinstrom in die Mitochondrien die Celastrol-induzierte Paraptose wesentlich vermitteln (Yoon et al., 2014). Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Mitochondrien wird als osmotische Ursache der mitochondrialen Schwellung diskutiert (Kim et al., 2020). In der TMRE-Färbung beobachteten wir einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials bei der durch Bakterien induzierten Paraptose (vgl. 3.3.4). Dies kann als Ausdruck des mitochondrialen Schadens und des daraus resultierenden Funktionsverlusts gewertet werden. Elektronenmikroskopisch konnten wir ab 90 - 120 Minuten bakterieller Ko-Kultur eine beginnende Dilatation der Mitochondriencristae in HCT116 Wildtyp Zellen beobachten. Erst etwas später, ab 150 Minuten Ko-Kulturdauer, war eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in der TMRE-Färbung zu erkennen. Wir zeigen hier somit erstmals, dass die Dilatation der Mitochondrien während der Paraptose einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials zur Folge hat und mittels TMRE-Färbung detektiert werden kann. Bislang fehlten detaillierte elektronenmikroskopische Aufnahmen zur morphologischen Kinetik der Paraptose. Yoon et al. (2014) untersuchten die Celastrol-induzierte Paraptose zu zwei Zeitpunkten, nach 3 h und 6 h Behandlungsdauer. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt beschreiben sie dilatierte Mitochondrien und ein erweitertes

ER. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt nach 6 h nahm die Schwellung weiter zu, und es wurde eine Fusion zwischen Mitochondrien und dem ER beobachtet (Yoon et al., 2014). Wir charakterisieren hier somit erstmals die Kinetik der morphologischen Veränderungen bei bakteriell-induzierter Paraptose mittels Elektronenmikroskopie. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Dilatation der Mitochondrien zeitlich der Dilatation des ER vorausgeht und dass die zytoplasmatische Vakuolisierung von diesen beiden Zellorganellen ausgeht (Abbildung 24). Erst im weiteren Verlauf der Paraptose erscheinen die Zellkerne aufgeheilt und die Zellen nehmen eine überwiegend abgerundete Form an (vgl. 3.3.5). Eine Fusion zwischen Mitochondrien und ER konnten wir nicht feststellen.

4.2.2 Die regulatorische Rolle von p53 und p73 in der Paraptose

Die p53 Familie hat eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Apoptose und in anderen Caspase-unabhängigen Zelltodarten wie z. B. der Ferroptose, Nekroptose

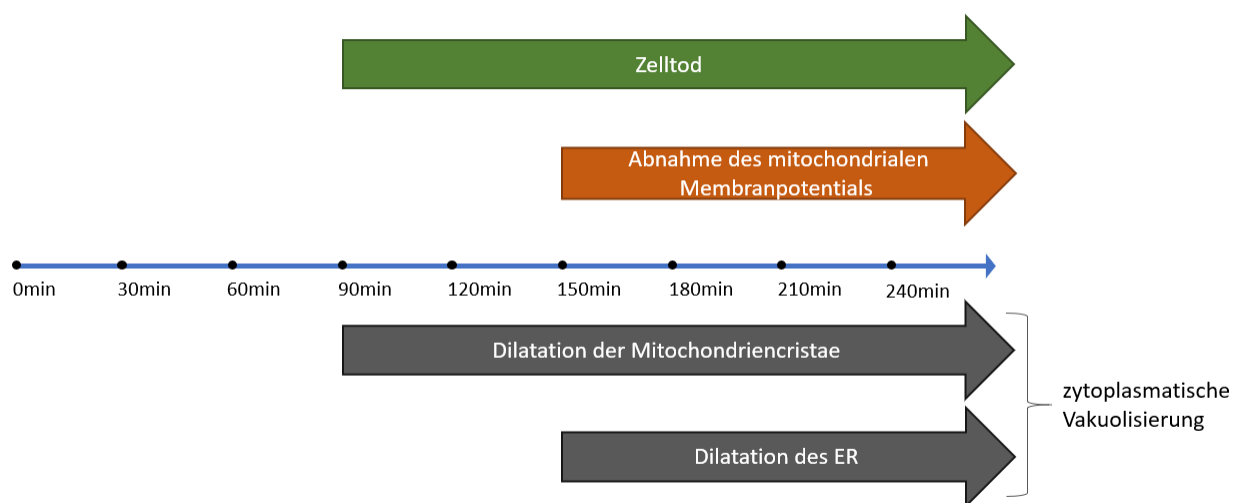


Abbildung 24 – **Schematische Kinetik der bakteriell-induzierten Paraptose.** HCT116 Wildtyp Zellen zeigten durchflusszytometrisch nach bakterieller Ko-Kultur mit *E. coli* (O6:Hnt) ab 90 Minuten einen beginnenden Zelltod, der im zeitlichen Verlauf zunahm (grüner Pfeil). Elektronenmikroskopisch wurde ab 90 Minuten die Dilatation der Mitochondriencristae beobachtet, die gemeinsam mit der ab 150 Minuten einsetzenden Dilatation des ER zu einer Vakuolisierung des Zytoplasmas führte (graue Pfeile). Erst nach elektronenmikroskopisch sichtbarer Dilatation der Mitochondriencristae, ab 150 Minuten Ko-Kulturdauer, wurde in der TMRE-Färbung eine beginnende Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials detektiert, die im zeitlichen Verlauf zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führte (oranger Pfeil).

oder der Autophagie (Le Jiang et al., 2015; Lane et al., 1994; Pflaum et al., 2014; Ranjan & Iwakuma, 2016). Welche Bedeutung die p53 Familie für die Paraptose hat, ist bislang noch unzureichend verstanden. Es wurde gezeigt, dass das Ginsenosid Rh2 Apoptose und Paraptose in einer p53-abhängigen Weise induziert (Li et al., 2011).

Li et al. (2011) beobachteten nach Behandlung von HCT116 Darmzelllinien mit Rh2 eine Induktion von p53 sowie eine lichtmikroskopische Zunahme der zytoplasmatischen Vakuolisierung als Zeichen der Paraptose. Die Behandlung mit Rh2 führte zu einer lichtmikroskopisch quantifizierbaren Vakuolenbildung bei ca. 80 % der HCT116 Wildtyp Zellen, wohingegen nur 10 % der mit Rh2 behandelten HCT116 p53 ko Zellen eine Vakuolisierung zeigten (Li et al., 2011). Eine weitere Assoziation zwischen p53 und Paraptose wurde durch Pehar et al. (2010) beschrieben. Die p53-Isoform $\Delta 40p53$ (p44), bei der die N-terminale Region fehlt, führte zur Induktion des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I-Rezeptors (IGF-IR). Die erhöhten IGF-IR-Spiegel wiederum lösen den paraptotischen Zelltod aus (Pehar et al., 2010). Dies wird über nachgeschaltete Signalwege vermittelt, an denen Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) und JNK-Signalwege beteiligt sind (Sperandio et al., 2004; Yan et al., 2020).

Die Rolle der p53 Familie bei der (bakteriell-induzierten) Paraptose ist bisher nur unzureichend untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Li et al. (2011), führte der ko von p53 in unserem HCT116 Zellmodell nicht zum Ausbleiben der durch Bakterien induzierten Paraptose. Auch der einfache ko von p73 verhinderte nicht das Auftreten der Paraptose im HCT116 Zellmodell. Ebenso wenig wurde die Paraptose in HCT116 p53/p73 ko Zellen durch das gleichzeitige Fehlen beider Proteine nach bakterieller Ko-Kultur verhindert. Zu einer regulatorischen Funktion von p73 in der Paraptose wurden bisher keine Studien veröffentlicht. Wir beschreiben somit erstmals eine Rolle von p73 in der bakteriell-induzierten Paraptose. Interessanterweise war sowohl die Geschwindigkeit als auch die Häufigkeit von Paraptose in HCT116 p73 ko und HCT116 p53/p73 ko Zellen nach bakterieller Ko-Kultur reduziert. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass sowohl p53 als auch p73 eine Rolle bei der Regulation der Paraptose von Darmepithelzellen nach Ko-Kultur mit Bakterien spielen.

4.2.3 Paraptose als möglicher Pathomechanismus in der SBP-Entstehung

Unter dem Begriff des sogenannten „leaky gut“ wird eine generelle Störung der Darmpermeabilität verstanden, die mit einer erhöhten Durchlässigkeit des Darmepithels einhergeht (Camilleri et al., 2019; Usuda et al., 2021). Zugrundeliegend sind lokale Erkrankungen des Darms wie chronisch entzündliche oder ulzerierende Darmerkrankungen oder auch Systemerkrankungen wie Diabetes, kardiovaskuläre

Erkrankungen oder chronische Niereninsuffizienz (Usuda et al., 2021). Camilleri et al. (2019) benennen einen gesteigerten parazellulären Transport, eine erhöhte transzelluläre Durchlässigkeit sowie den Zelltod Apoptose als zugrundeliegende Ursachen der Permeabilitätssteigerung. Auch bei der SBP ist die Durchlässigkeit des Darms für Pathogene erhöht. In unserem *in vitro*-SBP-Modell beobachteten wir einen durch Bakterien induzierten Zelltod der Darmepithelzellen, den wir als Paraptose identifizierten. Eine intakte Darmbarriere benötigt vitale Zellen. Daher könnte die bakteriell-induzierte Paraptose eine weitere Ursache für die gestörte Darmpermeabilität bei der Entstehung einer SBP sein. Angesichts einer 1-Jahres-Mortalität der SBP von 66 %, werden neuartige Therapieoptionen dringend benötigt. Die Inhibition der bakteriell-induzierten Paraptose könnte einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen.

Es ist denkbar, dass die Inhibition des Zelltods Paraptose zukünftig therapeutisch und/oder für die SBP-Prävention nutzbar sein könnte und einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung spezifischer Medikamente darstellen kann. Zudem lassen unsere Ergebnisse auf eine regulatorische Rolle der p53 Familie in der Paraptose schließen. Darmbakterien wie *E. coli* reduzieren die p53 Familie *in vitro* und – von klinischer Relevanz: Patient(inn)en mit Leberzirrhose weisen signifikant erniedrigte p53- und p73-Proteinspiegel auf. Daher könnte eine Stabilisierung der p53 Familie durch MDM2-Hemmstoffe wie z. B. Nutlin-3 oder Milademetan, das bereits in einer onkologischen, klinischen Phase-3-Studie eingesetzt wurde, ein Angriffspunkt neuer Therapiestrategien sein und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein (Gounder et al., 2023; Rusiecki et al., 2019).

5 Zusammenfassung

Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose mit äußerst ungünstiger Prognose. Bereits einen Monat nach Diagnosestellung beträgt die Mortalität 34 % und wächst auf eine 1-Jahres-Mortalität von 66 % an (Schwabl et al., 2015). Bislang kann eine SBP lediglich entsprechend der S2k-Leitlinie der DGVS (Gerbes et al., 2019) durch Antibiotikagabe behandelt werden. Zunehmende Resistenzen erschweren die Therapie heute und in Zukunft. Neue Therapieoptionen werden daher dringend benötigt (Marciano et al., 2019; Naim Abu-Freha et al., 2021).

Die molekularen Grundlagen der Pathogenese der SBP sind bislang nicht ausreichend verstanden. Wir konnten zeigen, dass die schützende Mukusschicht im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose dünner ist (Haderer et al., 2022). Dadurch wird ein vermehrter Bakterien-Epithel-Kontakt ermöglicht (Abbildung 25). Zunächst zeigten wir durch Mukusfärbung von Kolonbiopsien mit den Farbstoffen Alcian-Blau sowie Muzikarmin, dass die Mukusschicht im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose signifikant reduziert ist. Ausgehend von der Hypothese, dass der hierdurch vermehrte Bakterien-Epithel-Kontakt zellulären Stress induziert, haben wir in dieser Arbeit erstmals die Proteinspiegel der p53 Familie als wichtigen Stresssensoren der Zelle in einer großen Patientenkohorte untersucht. Die Studie an 50 Darmbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose zeigte, dass sowohl p53 als auch p73 verglichen mit 70 Kontrollbiopsien signifikant reduziert waren. Interessanterweise trat diese Reduktion der p53 Familie bereits in frühen Stadien der Leberzirrhose, gemessen am Child-Pugh Score, auf. Die Immunfluoreszenzfärbungen der Kolonbiopsien bestätigte und visualisierte die reduzierten p53- und p73-Proteinspiegel der Zirrhosepatient(inn)en.

Die RNA Untersuchungen der Kolonbiopsien ergaben keine Hinweise auf eine verminderte Transkription von p53 und p73. Somit gehen wir davon aus, dass die bei Leberzirrhose reduzierte Proteinmenge der p53 Familie auf posttranskriptionale Ursachen zurückzuführen sind. Weiterhin beobachteten wir eine signifikante Korrelation zwischen einer dünneren Mukusschicht und niedrigen p53 und p73 Protein-Mengen in Kolonbiopsien von Patient(inn)en mit Leberzirrhose. Dies stützt unsere Hypothese, dass durch die dünnere Mukusschicht die Interaktion von Bakterien

mit dem Darmepithel ermöglicht wird und die Reduktion der p53 Familienmitglieder durch Einwirkung der Bakterien vermehrt induziert wird (Abbildung 25).

Daher haben wir im nächsten Schritt in einem von uns entwickelten, klinisch relevanten *in vitro*-SBP-Modell (Haderer, 2019) die Interaktion von *E. coli* (O6:Hnt) mit HCT116 Wildtyp Darmepithelzellen analysiert und die Kinetik der Regulation von p53 Familienmitgliedern bestimmt. Um die Konsequenzen der herabgesetzten Proteinexpression von p53 oder p73 im Darm von Patient(inn)en mit Leberzirrhose zu adressieren, verwendeten wir zusätzlich drei weitere HCT116 Zellmodelle mit einfachem ko von p53 bzw. p73 sowie einem doppelten ko von p53 und p73. Die bakterielle Ko-Kultur mit *E. coli* führte in HCT116 Wildtyp Zellen sowie in HCT116 p73 ko Zellen zunächst zu einer transienten Induktion von p53, gefolgt von einer anschließenden Reduktion der p53-Proteinspiegel. Darmbakterien wie *E. coli* regulieren also die p53 Familie in HCT116 Darmepithelzellen herunter, auch wenn bereits ein Protein der p53 Familie fehlt.

Interessanterweise führte die bakterielle Ko-Kultur von HCT116 Darmepithelzellen mit *E. coli* zur Induktion eines Zelltods, den wir als Paraptose charakterisieren konnten. Diese Form des programmierten Zelltods zeichnet sich unter anderem durch eine besondere Morphologie mit charakteristischen Vakuolen im Zytoplasma aus und ist bisher nur unzureichend untersucht. Unsere Untersuchungen zeigten, dass nicht der Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK, sondern der Transkriptioninhibitor Actinomycin D diesen Zelltod blockiert. Sowohl der ko von p73 als auch der gleichzeitige ko von p53 und p73 verzögerten den Eintritt in die Paraptose nach bakterieller Ko-Kultur. Diese Daten deuten darauf hin, dass die p53 Familie eine Rolle bei der Regulation der Paraptose spielt.

Erstmals erstellten wir eine detaillierte elektronenmikroskopische Kinetik der durch *E. coli* induzierten Paraptose in HCT116 Wildtyp sowie HCT116 p53/p73 ko Darmzellen und konnten so neue Erkenntnisse zum morphologischen Ablauf dieser Form des Zelltods generieren. Die Vakuolisierung des Zytoplasmas ging sowohl von dilatierten Mitochondrien als auch von einem dilatierten ER aus und nahm über die Zeit zu. Die Dilatation der Mitochondriencristae führte folglich zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, was durch TMRE-Färbung sichtbar gemacht

wurde. Bei anhaltender Bakterien-Epithel-Interaktion brach das mitochondriale Membranpotential im zeitlichen Verlauf zusammen.

Der ko von p53 und p73 verhinderte nicht die Induktion der Paraptose, führte aber zu einem zeitlich deutlich verzögerten Beginn des Zelltods.

Wir gehen davon aus, dass die bakteriell-induzierte Paraptose sowie die Reduktion der p53 Familie wichtige Komponenten des Pathomechanismus der SBP darstellen. Eine Stabilisierung der p53 Familie, z. B. durch MDM2-Inhibitoren wie Nutlin-3 oder Milademetan (für das bereits eine klinischen Phase-3-Studie in der Tumorthherapie durchgeführt wurde) könnte daher einen neuen therapeutischen Ansatz zur Stabilisierung der epithelialen Barriere bei Patient(inn)en mit Leberzirrhose darstellen.

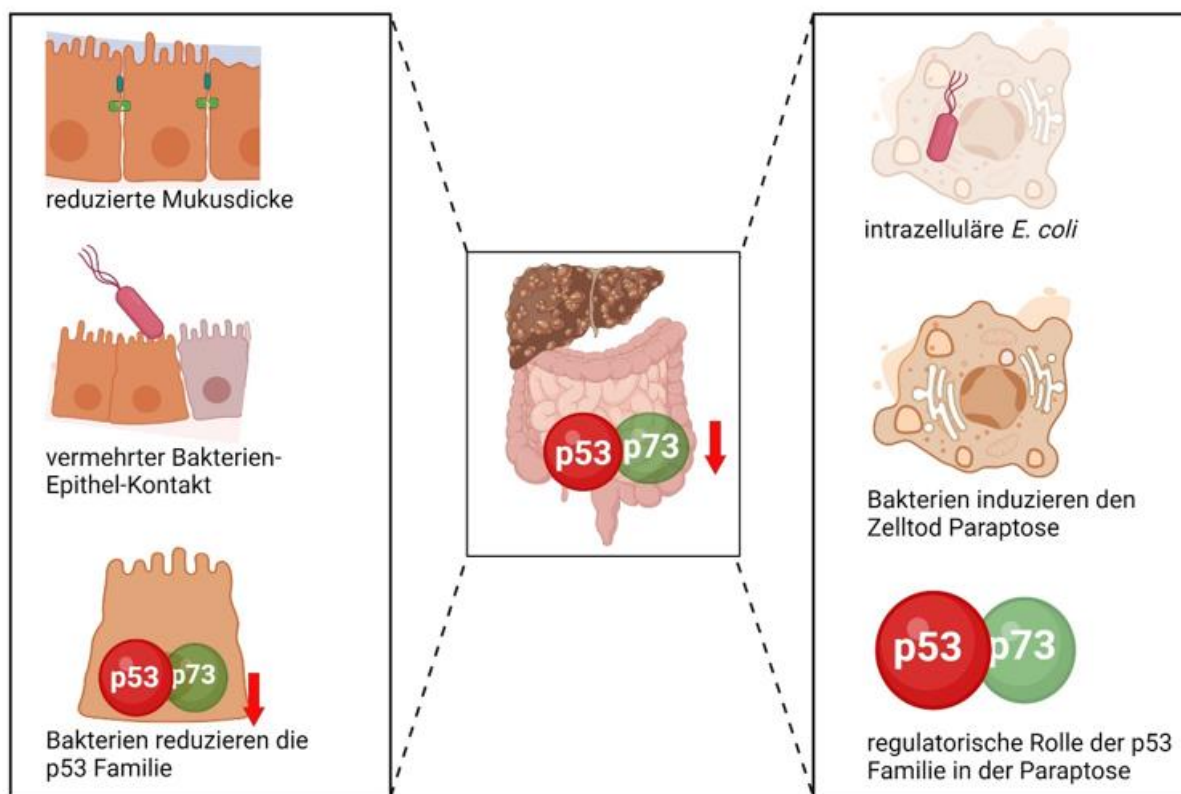


Abbildung 25 – Die Reduktion der p53 Familie erhöht die bakterielle Translokation und fördert so die Entstehung einer SBP: Die schützende Mukusschicht ist im Darm bei Leberzirrhose reduziert, wodurch vermehrter Bakterien-Epithel-Kontakt entsteht. Bakterien reduzieren die p53 Familie bei anhaltendem Bakterien-Epithel-Kontakt in einem klinisch relevanten in vitro-SBP-Modell. Auch in Darmbiopsien von 50 Patient(inn)en mit Leberzirrhose sind sowohl p53 als auch p73 signifikant reduziert, wobei eine dünne Mukusschicht mit niedrigen p53- bzw. p73-Proteinspiegeln korreliert. Nach bakterieller Ko-Kultur lassen sich *E. coli* intrazellulär in HCT116 Zellen nachweisen. Das deutet darauf hin, dass auch eine transzelluläre Durchwanderung des Darmepithels einen Weg der bakteriellen Translokation bei der Entstehung einer SBP darstellt. Vitale Zellen sind eine Voraussetzung für eine intakte Darmbarriere. Folglich begünstigt der bakteriell-induzierte Zelltod Paraptose die bakterielle Translokation und damit die Entstehung einer SBP. Paraptose als besondere Form des programmierten Zelltods zeichnet sich insbesondere durch seine charakteristische Morphologie aus und wird in gleichzeitiger Abwesenheit von p53 und p73 langsamer in HCT116 Zellen induziert. Die p53 Familie spielt daher offenbar eine regulatorische Rolle in der Paraptose und stellt einen Angriffspunkt für zukünftige Therapieoptionen dar.

6 Abkürzungsverzeichnis

ABB	Annexin bindin buffer
AUD	Alcohol Use Disorder
BT	Bakterielle Translokation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DGVS	Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)
DDR	DNA-Damage Response
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IGF-IR	Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I-Rezeptors
INR	International normalized ratio
Knock-out	Ko
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MELD	Model for End Stage Liver Disease
MLK	Mesenteriale Lymphknoten
MOI	Infektionsmultiplikation
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMN	Polymorphonukleäre Lymphozyten
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis

<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SLD	Steatotic Liver Disease
TMRE	Tetramethylrhodamin-Ethylester
USF1	Upstream Transcription Factor-1

7 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J. & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology*, 70(1), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Assimakopoulos, S. F., Tsamandas, A. C., Tsiaoussis, G. I., Karatza, E., Triantos, C., Vagianos, C. E., Spiliopoulou, I., Kaltezioti, V., Charonis, A., Nikolopoulou, V. N., Scopa, C. D. & Thomopoulos, K. C. (2012). Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *European journal of clinical investigation*, 42(4), 439–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02609.x>
- Bajaj, J. S., Kakiyama, G., Zhao, D., Takei, H., Fagan, A., Hylemon, P., Zhou, H., Pandak, W. M., Nittono, H., Fiehn, O., Salzman, N., Holtz, M., Simpson, P., Gavis, E. A., Heuman, D. M., Liu, R., Kang, D. J., Sikaroodi, M. & Gillevet, P. M. (2017). Continued Alcohol Misuse in Human Cirrhosis is Associated with an Impaired Gut-Liver Axis. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 41(11), 1857–1865. <https://doi.org/10.1111/acer.13498>
- 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. *Infection and immunity*, 23(2), 403–411. <https://doi.org/10.1128/iai.23.2.403-411.1979>
- Bergounioux, J., Elisee, R., Prunier, A.-L., Donnadieu, F., Sperandio, B., Sansonetti, P. & Arbibe, L. (2012). Calpain activation by the Shigella flexneri effector VirA regulates key steps in the formation and life of the bacterium's epithelial niche. *Cell host & microbe*, 11(3), 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.013>
- Bernardi, M. & Caraceni, P. (2018). Novel perspectives in the management of decompensated cirrhosis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(12), 753–764. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0045-2>

- Boutelle, A. M. & Attardi, L. D. (2021). p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends in cell biology*, 31(4), 298–310.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011>
- Bundesärztekammer (2025). Richtlinie für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation. *Deutsches Ärzteblatt*.
- Cai, B.-H., Hsu, Y.-C [Yun-Chien], Yeh, F.-Y., Lin, Y.-R., Lu, R.-Y., Yu, S.-J., Shaw, J.-F., Wu, M.-H., Tsai, Y.-Z., Lin, Y.-C., Bai, Z.-Y., Shih, Y.-C., Hsu, Y.-C [Yi-Chiang], Liao, R.-Y., Kuo, W.-H., Hsu, C.-T., Lien, C.-F. & Chen, C.-C. (2022). P63 and P73 Activation in Cancers with p53 Mutation. *Biomedicines*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071490>
- Camilleri et al., M. (2019). Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*, 68(8), 1516–1526. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318427>
- 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. *Cancer research*, 48(7), 1936–1942.
- Chen, Y [Yanfei], Ji, F., Guo, J., Shi, D., Fang, D. & Li, L. (2016). Dysbiosis of small intestinal microbiota in liver cirrhosis and its association with etiology. *Scientific reports*, 6, 34055. <https://doi.org/10.1038/srep34055>
- Chen, Y [Yanfei], Yang, F., Lu, H., Wang, B., Chen, Y [Yunbo], Lei, D., Wang, Y [Yuezhu], Zhu, B. & Li, L. (2011). Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(2), 562–572. <https://doi.org/10.1002/hep.24423>
- Chopyk, D. M. & Grakoui, A. (2020). Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders. *Gastroenterology*, 159(3), 849–863.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.077>
- Chumduri, C., Gurumurthy, R. K., Zietlow, R. & Meyer, T. F. (2016). Subversion of host genome integrity by bacterial pathogens. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(10), 659–673. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.100>

- Costa, L., Corre, S., Michel, V., Le Luel, K., Fernandes, J., Ziveri, J., Jouvion, G., Danckaert, A., Mouchet, N., Da Silva Barreira, D., Torres, J., Camorlinga, M., D'Elios, M. M., Fiette, L., Reuse, H. de, Galibert, M.-D. & Touati, E. (2020). USF1 defect drives p53 degradation during *Helicobacter pylori* infection and accelerates gastric carcinogenesis. *Gut*, 69(9), 1582–1591. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318640>
- Crowley, L. C., Christensen, M. E. & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. *Cold Spring Harbor protocols*, 2016(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087361>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Dong, T. S., Jacobs, J. P. & Hussain, S. K. (2019). Microbial Profiles of Cirrhosis in the Human Small Intestine. *Current Gastroenterology Reports*, 21(10), 50. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0717-2>
- Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K. & Hansson, G. C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 305(5), G341-7. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2013>
- Evans, L. T., Kim, W. R., Poterucha, J. J. & Kamath, P. S. (2003). Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(4), 897–901. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50119>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fernández, J., Navasa, M., Gómez, J., Colmenero, J., Vila, J., Arroyo, V. & Rodés, J. (2002). Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(1), 140–148. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.30082>

- Gallego, P., Garcia-Bonete, M.-J., Trillo-Muyo, S., Recktenwald, C. V., Johansson, M. E. V. & Hansson, G. C. (2023). The intestinal MUC2 mucin C-terminus is stabilized by an extra disulfide bond in comparison to von Willebrand factor and other gel-forming mucins. *Nature communications*, 14(1), 1969. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37666-8>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gandin, V., Pellei, M., Tisato, F., Porchia, M., Santini, C. & Marzano, C. (2012). A novel copper complex induces paraptosis in colon cancer cells via the activation of ER stress signalling. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(1), 142–151. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01292.x>
- García-Tsao, G. (2001). Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *Journal of hepatology*, 34(1), 150–155. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)00006-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)00006-4)
- Ge, P. S. & Runyon, B. A. (2016). Treatment of Patients with Cirrhosis. *The New England journal of medicine*, 375(8), 767–777. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1504367>
- Gerbes, A. L., Labenz, J., Appenrodt, B., Dollinger, M., Gundling, F., Gülberg, V., Holstege, A., Lynen-Jansen, P., Steib, C. J., Trebicka, J., Wiest, R. & Zipprich, A. (2019). Updated S2k-Guideline "Complications of liver cirrhosis". German Society of Gastroenterology (DGVS) [Aktualisierte S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) „Komplikationen der Leberzirrhose“]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 57(5), e168. <https://doi.org/10.1055/a-0928-2800>
- Ghosh, K., De, S., Das, S., Mukherjee, S. & Sengupta Bandyopadhyay, S. (2016). Withaferin A Induces ROS-Mediated Paraptosis in Human Breast Cancer Cell-

- Lines MCF-7 and MDA-MB-231. *PloS one*, 11(12), e0168488.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168488>
- Ginès, P., Krag, A., Abraldes, J. G., Solà, E., Fabrellas, N. & Kamath, P. S. (2021). Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)*, 398(10308), 1359–1376.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01374-X)
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019–2040.
<https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Goudsmit, B. F. J. & Putter, H. (2021). Refitting the Model for End-Stage Liver Disease for the Eurotransplant Region. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 74(1), 351–363. <https://doi.org/10.1002/hep.31677>
- Goudsmit, B. F. J., Putter, H. & Braat, A. E. (2021). Validation of the Model for End-stage Liver Disease sodium (MELD-Na) score in the Eurotransplant region. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 21(1), 229–240. <https://doi.org/10.1111/ajt.16142>
- Gounder, M. M., Bauer, T. M., Schwartz, G. K., Weise, A. M., LoRusso, P., Kumar, P., Tao, B., Hong, Y., Patel, P., Lu, Y., Lesegretain, A., Tirunagaru, V. G., Xu, F., Doebele, R. C. & Hong, D. S. (2023). A First-in-Human Phase I Study of Milademetan, an MDM2 Inhibitor, in Patients With Advanced Liposarcoma, Solid Tumors, or Lymphomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(9), 1714–1724. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01285>
- Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze Schleithoff, E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Lena, A. M., Candi, E., Terrinoni, A., Catani, M. V., Oren, M [Moshe], Melino, G., Krammer, P. H [Peter H.], Stremmel, W [Wolfgang] & Müller, M [Martina] (2005). TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *The EMBO journal*, 24(13), 2458–2471. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600708>
- Guarner, F. & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet (London, England)*, 361(9356), 512–519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)

- Guo, Q., Chen, M., Chen, Q., Xiao, G., Chen, Z., Wang, X. & Huang, Y. (2021). Silencing p53 inhibits interleukin 10-induced activated hepatic stellate cell senescence and fibrotic degradation in vivo. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 246(4), 447–458. <https://doi.org/10.1177/1535370220960391>
- Haderer, M. (2019). *Spontan bakterielle Peritonitis - Mechanismus der Pathogenese: Eine neue Funktion der p53 Familie in der bakteriellen Abwehr.*
- Haderer, M., Neubert, P., Rinner, E., Scholtis, A., Broncy, L., Gschwendtner, H., Kandulski, A., Pavel, V., Mehrl, A., Brochhausen, C., Schlosser, S., Gülow, K., Kunst, C. & Müller, M [Martina] (2022). Novel pathomechanism for spontaneous bacterial peritonitis: disruption of cell junctions by cellular and bacterial proteases. *Gut*, 71(3), 580–592. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321663>
- Hanson, S., Dharan, A., P V, J., Pal, S., Nair, B. G., Kar, R. & Mishra, N. (2023). Paraptosis: a unique cell death mode for targeting cancer. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1159409. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1159409>
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaiss, C. A., Kau, A. L., Eisenbarth, S. C., Jurczak, M. J., Camporez, J.-P., Shulman, G. I., Gordon, J. I., Hoffman, H. M. & Flavell, R. A. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 482(7384), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature10809>
- Hsu, C. L. & Schnabl, B. (2023). The gut-liver axis and gut microbiota in health and liver disease. *Nature reviews. Microbiology*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00904-3>
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.-K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R. T., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J. & Kliewer, S. A. (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3920–3925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509592103>
- Jass, J. R. (1996). Mucin staining. *Journal of clinical pathology*, 49(10), 787–790. <https://doi.org/10.1136/jcp.49.10.787>

- Le Jiang, Kon, N., Li, T., Wang, S.-J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R. & Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 520(7545), 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>
- Johansson, M. E. V., Larsson, J. M. H. & Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4659–4665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Kaminski, M., Kiessling, M., Süss, D., Krammer, P. H [Peter H.] & Gülow, K. (2007). Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Molecular and cellular biology*, 27(10), 3625–3639. <https://doi.org/10.1128/MCB.02295-06>
- Kessel, D. (2019). Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 95(1), 119–125. <https://doi.org/10.1111/php.12952>
- Kim, E., Lee, D. M., Seo, M. J., Lee, H. J. & Choi, K. S. (2020). Intracellular Ca²⁺ + Imbalance Critically Contributes to Paraptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 607844. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.607844>
- Kunst, C., Haderer, M., Heckel, S., Schlosser, S. & Müller, M [Martina] (2016). The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Translational Cancer Research*, 2016.
- Kunst, C., Schmid, S., Michalski, M., Tümen, D., Buttenschön, J., Müller, M [Martina] & Gülow, K. (2023). The Influence of Gut Microbiota on Oxidative Stress and the Immune System. *Biomedicines*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051388>

- Kunst, C., Tümen, D., Ernst, M., Tews, H. C., Müller, M [Martina] & Gülow, K. (2024). Paraptosis-A Distinct Pathway to Cell Death. *International journal of molecular sciences*, 25(21). <https://doi.org/10.3390/ijms252111478>
- Lane, D. P., Lu, X., Hupp, T. & Hall, P. A. (1994). The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 345(1313), 277–280. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0106>
- Levine, A. J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature reviews. Cancer*, 20(8), 471–480. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0262-1>
- Li, B., Zhao, J., Wang, C.-Z., Searle, J., He, T.-C., Yuan, C.-S. & Du, W. (2011). Ginsenoside Rh2 induces apoptosis and paraptosis-like cell death in colorectal cancer cells through activation of p53. *Cancer letters*, 301(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.11.015>
- Liu, Y. & Bodmer, W. F. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 976–981. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510146103>
- Llopis, M., Cassard, A. M., Wrzosek, L., Boschats, L., Bruneau, A., Ferrere, G., Puchois, V., Martin, J. C., Lepage, P., Le Roy, T., Lefèvre, L., Langelier, B., Cailleux, F., González-Castro, A. M., Rabot, S., Gaudin, F., Agostini, H., Prévot, S., Berrebi, D., . . . Perlemuter, G. (2016). Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut*, 65(5), 830–839. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310585>
- Luis, A. S. & Hansson, G. C. (2023). Intestinal mucus and their glycans: A habitat for thriving microbiota. *Cell host & microbe*, 31(7), 1087–1100. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.026>
- Macutkiewicz, C., Carlson, G., Clark, E., Dobrindt, U., Roberts, I. & Warhurst, G. (2008). Characterisation of Escherichia coli strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes and infection*, 10(4), 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.01.001>

- Marciano, S., Díaz, J. M., Dirchwolf, M. & Gadano, A. (2019). Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis: incidence, outcomes, and treatment strategies. *Hepatic medicine : evidence and research*, 11, 13–22.
<https://doi.org/10.2147/HMER.S164250>
- McDonald, B., Zucoloto, A. Z., Yu, I.-L., Burkhard, R., Brown, K., Geuking, M. B. & McCoy, K. D. (2020). Programing of an Intravascular Immune Firewall by the Gut Microbiota Protects against Pathogen Dissemination during Infection. *Cell host & microbe*, 28(5), 660-668.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.014>
- Michalski, M., Bauer, M., Walz, F., Tümen, D., Heumann, P., Stöckert, P., Gunckel, M., Kunst, C., Kandulski, A., Schmid, S., Müller, M [Martina] & Gülow, K. (2023). Simultaneous Inhibition of Mcl-1 and Bcl-2 Induces Synergistic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 11(6).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11061666>
- Müller, M [M.], Schleithoff, E. S., Stremmel, W [Wolfgang], Melino, G., Krammer, P. H [Peter H.] & Schilling, T. (2006). One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 9(6), 288–306.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.01.001>
- Müller, M [M.], Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H [H.], Hofmann, W. J., Stremmel, W [W.], Krammer, P. H [P. H.] & Galle, P. R. (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. *The Journal of clinical investigation*, 99(3), 403–413.
<https://doi.org/10.1172/JCI119174>
- Müller, M [M.], Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W [W.], Oren, M [M.] & Krammer, P. H [P. H.] (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *The Journal of experimental medicine*, 188(11), 2033–2045. <https://doi.org/10.1084/jem.188.11.2033>
- Naim Abu-Freha, Tal Michael, Liat Poupko, Asia Estis-Deaton, Muhammad Aasla, Omar Abu-Freha & Ohad Etzion and Lior Neshher (2021). Spontaneous

Bacterial Peritonitis among Cirrhotic Patients: Prevalence, Clinical Characteristics, and Outcomes.

- Najdawi, Z. R. & Abu-Asab, M. S. (2022). An Ultrastructural Perspective on Cell Death. *Jordan medical journal*, 56(1). <https://doi.org/10.35516/jmj.v56i1.232>
- Neubert Philip. (2020). *Bacterial-induced cell death in SBP – the role of the p53 family*.
- Ookawa, K., Kudo, T., Aizawa, S., Saito, H. & Tsuchida, S. (2002). Transcriptional activation of the MUC2 gene by p53. *The Journal of biological chemistry*, 277(50), 48270–48275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207986200>
- Pehar, M., O'Riordan, K. J., Burns-Cusato, M., Andrzejewski, M. E., Del Alcazar, C. G., Burger, C., Scrabble, H. & Puglielli, L. (2010). Altered longevity-assurance activity of p53:p44 in the mouse causes memory loss, neurodegeneration and premature death. *Aging cell*, 9(2), 174–190. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00547.x>
- Peterson, L. W. & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 14(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Pflaum, J., Schlosser, S. & Müller, M [Martina] (2014). p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 285. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00285>
- Ranjan, A. & Iwakuma, T. (2016). Non-Canonical Cell Death Induced by p53. *International journal of molecular sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122068>
- Rusiecki, R., Witkowski, J. & Jaszczewska-Adamczak, J. (2019). MDM2-p53 Interaction Inhibitors: The Current State-of-Art and Updated Patent Review (2010-Present). *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 14(4), 324–369. <https://doi.org/10.2174/1574892814666191022163540>
- Saf, C., Gulcan, E. M., Ozkan, F., Cobanoglu Saf, S. P. & Vitrinel, A. (2015). Assessment of p21, p53 expression, and Ki-67 proliferative activities in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* gastritis. *European journal*

of gastroenterology & hepatology, 27(2), 155–161.

<https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000246>

Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M. & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista espanola de enfermedades digestivas*, 107(11), 686–696. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>

Scholtis, A. (2021). Interaktion von Bakterien mit Darmepithelzellen und ihre Auswirkungen auf die Zellviabilität sowie die Signaltransduktion der p53-Familie als Modell der Pathogenese einer spontan bakteriellen Peritonitis.

Schwabl, P., Bucsics, T., Soucek, K., Mandorfer, M., Bota, S., Blacky, A., Hirschl, A. M., Ferlitsch, A., Trauner, M., Peck-Radosavljevic, M. & Reiberger, T. (2015). Risk factors for development of spontaneous bacterial peritonitis and subsequent mortality in cirrhotic patients with ascites. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35(9), 2121–2128. <https://doi.org/10.1111/liv.12795>

Siegl, C., Prusty, B. K., Karunakaran, K., Wischhusen, J. & Rudel, T. (2014). Tumor suppressor p53 alters host cell metabolism to limit *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell reports*, 9(3), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.004>

Siegl, C. & Rudel, T. (2015). Modulation of p53 during bacterial infections. *Nature reviews. Microbiology*, 13(12), 741–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3537>

Sperandio, S., Belle, I. de & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14376–14381. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14376>

Sperandio, S., Poksay, K., Belle, I. de, Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J. & Bredesen, D. E. (2004). Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell death and differentiation*, 11(10), 1066–1075. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401465>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of

- Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Teltschik, Z., Wiest, R., Beisner, J., Nuding, S., Hofmann, C., Schoelmerich, J., Bevins, C. L., Stange, E. F. & Wehkamp, J. (2012). Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(4), 1154–1163.
<https://doi.org/10.1002/hep.24789>
- Thursby, E. & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical journal*, 474(11), 1823–1836.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Toller, I. M., Neelsen, K. J., Steger, M., Hartung, M. L., Hottiger, M. O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A. A., Lopes, M. & Müller, A. (2011). Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), 14944–14949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100959108>
- Tümen, D., Heumann, P., Gülow, K., Demirci, C.-N., Cosma, L.-S., Müller, M [Martina] & Kandulski, A. (2022). Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10123202>
- Usuda, H., Okamoto, T. & Wada, K. (2021). Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. *International journal of molecular sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147613>
- Vaddavalli, P. L. & Schumacher, B. (2022). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends in genetics : TIG*, 38(6), 598–612. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.010>
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K. & Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5560), 1726–1729. <https://doi.org/10.1126/science.1069094>

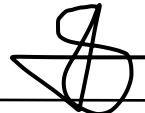
- Vilgelm, A. E., Washington, M. K., Wei, J., Chen, H., Prassolov, V. S. & Zaika, A. I. (2010). Interactions of the p53 protein family in cellular stress response in gastrointestinal tumors. *Molecular cancer therapeutics*, 9(3), 693–705. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0912>
- Wei, J., Nagy, T. A., Vilgelm, A., Zaika, E., Ogden, S. R., Romero-Gallo, J., Piazuolo, M. B., Correa, P., Washington, M. K., El-Rifai, W., Peek, R. M. & Zaika, A. (2010). Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 139(4), 1333–1343. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.018>
- Wiest, R., Lawson, M. & Geuking, M. (2014). Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of hepatology*, 60(1), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.044>
- Wilde, B. & Katsounas, A. (2019). Immune Dysfunction and Albumin-Related Immunity in Liver Cirrhosis. *Mediators of inflammation*, 2019, 7537649. <https://doi.org/10.1155/2019/7537649>
- Yan, G., Elbadawi, M. & Efferth, T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal*. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.40>
- Ying Liu and Walter F. Bodmer Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines.
- Yoon, M. J., Lee, A. R., Jeong, S. A., Kim, Y.-S., Kim, J. Y., Kwon, Y.-J. & Choi, K. S. (2014). Release of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells. *Oncotarget*, 5(16), 6816–6831. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2256>
- Yu, S., Ji, G. & Zhang, L. (2022). The role of p53 in liver fibrosis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 1057829. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1057829>

8 Eigenständigkeitserklärung

Ich, Carina Steindl, geboren am 11.04.1998 in Trostberg, 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 in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, 05.03.2026

Ort, Datum

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'S' and 'C' intertwined, written over a horizontal line.

Unterschrift

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. med. Dr. h. c. Müller-Schilling, die mich während meiner gesamten Promotion besonders unterstützt und gefördert hat, ganz herzlich danken. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, in diesem spannenden Forschungsgebiet der Gastroenterologie zu promovieren. Besonders dankbar bin ich für Ihre intensive Förderung und tatkräftige Unterstützung, durch die erst der Erhalt des Promotionsstipendiums der Fakultät Medizin, der beiden Reisestipendien zu (inter-)nationalen Kongressen, des MLP Medical Excellence Stipendiums in der Kategorie Science sowie die Aufnahme in das Frauenförderungs-Netzwerk RegensburgEXZELLENZ ermöglicht wurde.

Ausdrücklich erwähnt sei hier, dass Frau Prof. Dr. med. Dr. h. c. Müller-Schilling meine Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen jederzeit ermutigte und sogar die Präsentation meiner Ergebnisse auf der AASLD in Washington D.C. ermöglicht hat. Nicht zu vergessen sei Ihre tatkräftige Unterstützung sowohl bei der Vorbereitung auf den Young Investigator Award als auch vor Ort bei der DGIM, die maßgeblich zum Erreichen des 1. Platzes beitrug.

Herrn Prof. Dr. med. Jonathan Jantsch und Herrn PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow danke ich sehr für ihre Mentorentätigkeit im Rahmen des strukturierten Promotionsprogramms des Promotionsstipendiums der Fakultät Medizin.

Ein großer Dank geht auch an die Studienstiftung des deutschen Volkes, deren Förderung mir die Forschung in vielerlei Hinsicht erst ermöglicht hat und deren Austausch mit anderen Stipendiat(inn)en mir in den herausfordernden Phasen der Promotion stets weitergeholfen hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Claudia Kunst und Herrn PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow für die großartige Unterstützung bei der Entwicklung des Projektes. Danke für die ständige Erreichbarkeit und das geduldige Beantworten meiner unzähligen Fragen und Anliegen. Mein Dank gilt auch dem gesamten Laborteam. Danke, Kirstin, dass du so viele Versuche mit mir durchgeführt hast. Danke, Heidi, für die hervorragende Einarbeitung in den Laboralltag. Danke, Manu und Lisa, für die Unterstützung bei den zahlreichen Biopsien. Vom ersten Tag an habe ich mich gut aufgehoben gefühlt und konnte in jeder Hinsicht auf eure Unterstützung zählen.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. med. Arne Kandulski, Frau Dr. med. Patricia Mester-Pavel, das Pfllegeteam der Endoskopie sowie das gesamte Team der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg. Vielen Dank für die große Unterstützung der klinischen Studie zu den Kolonbiopsien und die enge Zusammenarbeit zwischen Labor und Klinik. Besonders dankbar bin ich allen Patient(inn)en, die in meiner klinischen Studie eingeschlossen werden konnten, für ihr Vertrauen und ihre aktive Unterstützung der Forschung.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich ebenso beim Team der Pathologie Regensburg bedanken. Ein großer Dank richtet sich hier an Herrn Prof. Dr. med. Christoph Brochhausen-Delius, jetzt Mannheim, Frau PD Dr. med. Kirsten Utpatel und Herrn Heiko Sigmund.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, ihr offenes Ohr und ihren Glauben an mich bedanken.

10 Lebenslauf

Carina Steindl



Werdegang

Schulbildung	2004 – 2008 2008 – 2016	Volksschule St. Georgen Traunreut Johannes Heidenhain-Gymnasium Traunreut, Allgemeine Hochschulreife (Note 1,2)
Studium	2016 – 2017 2018 – 2025	Studium der Biologie, Universität Regensburg Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg; 1. Staatsexamen, September 2020, Note „sehr gut“; 2. Staatsexamen, Oktober 2024, Note „gut“; 3. Staatsexamen, November 2025
Forschung	Okt. 2021 – März 2026	Experimentelle Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I „Die Rolle der p53 Familie bei der Entstehung einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP)“
Kongressteilnahmen	Mai 2022 Mai 2022 Sep. 2022 Okt. 2022 Nov. 2022 Jan. 2023	DGIM – 129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin; Posterpräsentation und Vortrag; 1. Platz im Young Investigator Award GFGB – 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V.; Posterpräsentation DGVS – 76. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten; Zwei Posterpräsentationen UEG – 30. United European Gastroenterology Week; Zwei Posterpräsentationen AASLD – American Association for the Study of Liver Disease (Washington D.C.); Posterpräsentation GASL – 39. Jahrestagung der German Association for the Study of the Liver; Posterpräsentation

Förderung und Preise

Biozukunftspreis	Juni 2016	Stiftung natur mensch kultur; Beste Absolventin im Fach Biologie
Studienstiftung des deutschen Volkes	April 2021 - heute	Vorschlag durch Prof. Dr. Ernst Tamm, Vizepräsident für Forschung und Nachwuchsförderung, Universität Regensburg
Promotionsstipendium	Feb. – Okt. 2022	Promotionsstipendium der Fakultät Medizin Regensburg
Young Investigator Award	Mai 2022	Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin; 1. Platz des mit 3000€ dotierten Young Investigator Award
Reisestipendium DGIM	Mai 2022	Reisestipendium der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. zum DGIM Kongress

Reisestipendium UEG	Okt. 2022	Reisestipendium der United European Gastroenterology für die besten eingereichten wissenschaftlichen Abstracts bei der UEG week
Netzwerk RegensburgEXZELLENZ	Okt. 2022	Aufnahme in das Frauenförderungs-Netzwerk RegensburgEXZELLENZ als hochschul- und fakultätsübergreifendem Netzwerk für herausragende Studentinnen
MLP Medical Excellence	Nov. 2023	Medical Excellence Stipendium im Wert von 4000€ in der Kategorie „Science“
Außercurriculares Engagement		
Ehrenamtliche Tätigkeiten	Mai – Okt. 2018 März - Mai 2020 Okt. 2019 – heute Juni 2021 – Nov. 2025 Okt. 2021 – Okt. 2024 Okt. 2021 – Okt. 2024 Okt. 2022 – Okt. 2024	Bundesfreiwilligendienst im Seniorenheim St. Martin, Waging am See Corona-Hilfe im Institut für Mikrobiologie und Virologie am Universitätsklinikum Regensburg Aktives Mitglied der Fachschaft Humanmedizin; Engagement insbesondere in der Kommission Lehre; Semestersprecherin Studierendenvertretung im Fakultätsrat für Medizin als gewählte 1. Fachschaftssprecherin Studierendenvertretung in Berufungskommissionen der Fakultät Medizin Studierendenvertretung in dem Stipendienauswahlausschuss des Deutschland-Stipendiums der Universität Regensburg