

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

Interaktion von Bakterien mit Darmepithelzellen und ihre Auswirkung auf die
Zellviabilität sowie die Signaltransduktion der p53-Familie als Modell der
Pathogenese einer spontan bakteriellen Peritonitis

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Annika Scholtis

2022

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

Interaktion von Bakterien mit Darmepithelzellen und ihre Auswirkung auf die
Zellviabilität sowie die Signaltransduktion der p53-Familie als Modell der
Pathogenese einer spontan bakteriellen Peritonitis

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Annika Scholtis

2022

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

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christina Hackl

Tag der mündlichen Prüfung: 20. September 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Spontan bakterielle Peritonitis	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Klinik	7
1.1.3	Diagnostik	7
1.1.4	Therapie	8
1.1.5	Pathophysiologie	10
1.2	p53-Familie	13
1.2.1	Funktionen der p53-Familie	13
1.2.2	Regulation von p53	14
1.2.3	Rolle der p53-Familie bei Infektionen	15
1.3	Formen und Regulation des Zelltodes	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Laborbedarf	22
2.1.3	Software	23
2.1.4	Chemikalien	23
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	Primer	26
2.2	Mikrobiologische Methoden	26
2.2.1	<i>E. coli</i> -Übernachtskultur	26
2.2.2	Bestimmung der Bakterienzahl	27
2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1	RNA-Isolation, cDNA-Isolation, qPCR	27
2.3.2	ELISA	28
2.4	Proteinbiochemische Methoden	28
2.4.1	BCA-Test	28
2.4.2	Western Blot	28
2.5	Zellbiologische Methoden	30
2.5.1	Zellkultur	30
2.5.2	Zellernte	30

2.5.3	Trennung zytosolischer und mitochondrialer Fraktion	31
2.5.4	Transwell-Experiment.....	32
2.5.5	Bakterien-Wirtszell-Interaktion von HCT-116 Zellen mit <i>E. coli</i>	32
2.5.6	Induktion der NOD-Rezeptoren	32
2.5.7	Durchflusszytometrische Untersuchungen	32
2.5.7.1	Nachweis der Oberflächenrezeptoren TLR2 und TLR4	32
2.5.7.2	Analyse des Zelltodes mittels AnnexinV- /DAPI-Färbung	33
2.5.7.3	TMRE-Färbung	35
2.6	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Charakterisierung des <i>in vitro</i> -Zellmodells	36
3.1.1	Ko-Kultivierung von Bakterien und Darmepithelzellen führt zur Sekretion entzündlicher Zytokine.....	36
3.1.2	HCT-116 tragen die Rezeptoren NOD1 und NOD2.....	36
3.2	Regulation der p53-Familie durch Bakterieninteraktion in Darmepithelzellen	39
3.2.1	<i>E. coli</i> reduzieren die Proteinspiegel von p53-Proteinen	39
3.2.2	p53 wird auf posttranslationaler Ebene durch MDM-2 reguliert.....	39
3.2.3	LPS induziert eine p53-Degradation.....	41
3.2.4	Eine direkte Interaktion von Bakterien und Epithelzellen ist essenziell für die Reduktion von p53-Familienmitgliedern	42
3.3	Bakterien induzieren Zelltod bei Interaktion mit Darmepithelzellen	43
3.3.1	<i>E. coli</i> -induzierter Zelltod in HCT-116 Zellen	43
3.3.2	Der bakteriell-induzierte Zelltod erfordert einen direkten Kontakt zwischen Bakterien und HCT-116 Zellen	44
3.3.3	<i>E. coli</i> löst in HCT-116 Zellen einen Caspase-unabhängigen Zelltod aus	44
3.3.4	Eisenchelator reduziert den Bakterien-induzierten Zelltod	48
3.3.5	Morphologie des <i>E. coli</i> -induzierten Zelltodes – Bakterien induzieren Paraptose	49
4	Diskussion	52
4.1	Oberflächenrezeptoren TLR2 und TLR4 sowie NOD1 und NOD2	52
4.2	Auswirkungen der bakteriellen Ko-Kultur auf die p53-Familie	54
4.3	Auswirkungen der bakteriellen Ko-Kultur auf den Zelltod.....	59

5	Zusammenfassung	63
6	Abkürzungsverzeichnis	65
7	Literaturverzeichnis	69
8	Selbstständigkeitserklärung	91
9	Danksagung	92

1 Einleitung

1.1 Spontan bakterielle Peritonitis

Der Begriff spontan bakterielle Peritonitis (SBP) wurde erstmals durch Harold O. Conn im Jahre 1964 geprägt, als er die Aufmerksamkeit auf dieses zwar bekannte, aber bis dahin wenig beachtete Krankheitsbild lenkte. Die SBP ist definiert als eine Infektion der Aszitesflüssigkeit ohne erkennbare Ursache, wie zum Beispiel einer Perforation im Gastrointestinaltrakt, Appendizitis, Divertikulitis oder Cholezystitis. Die SBP stellt eine häufige und schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose dar [1]. Unter dem Begriff SBP werden drei verschiedene Arten einer Infektion der Aszitesflüssigkeit zusammengefasst: Die klassische SBP, der kultur-negative neutrozytische Aszites (CNNA) und der monomikrobielle Bakteraszites. Zusätzlich kann z.B. nach Perforationen ein polymikrobieller Bakteraszites entstehen. Eine weitere Variante der Aszites-Infektion ist die sekundäre Peritonitis, bei der eine intraperitoneale und operativ behandelbare Ursache der Infektion vorliegen muss [2]. Im Peritoneum finden sich zahlreiche Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems. Zur Abwehr von Bakterien sind außerdem Komplementfaktoren, Mastzellen und einwandernde neutrophile Granulozyten wichtig. Das Peritoneum sezerniert und reabsorbiert die Peritonealflüssigkeit. Unter physiologischen Bedingungen umfasst diese nur 50 – 70 ml, doch wenn das Gleichgewicht aus Produktion und Wiederaufnahme gestört ist, entwickelt sich ein Aszites [3]. Ein Aszites deutet immer auf eine schwere Erkrankung hin und muss stets diagnostisch abgeklärt werden. Häufigste Ursache ist eine Lebererkrankung, wie Zirrhose oder das Budd-Chiari-Syndrom, doch oft finden sich auch ein maligner Prozess an der Leber oder Metastasen im Peritoneum und eine kardiale Ursache muss ebenso ausgeschlossen werden [4]. Bei therapierefraktärem Aszites muss immer an eine SBP gedacht werden.

1.1.1 Epidemiologie

Die spontan bakterielle Peritonitis macht 1 % der Peritonitis-Fälle bei Erwachsenen aus [5], doch bei Patient*innen mit Leberzirrhose und Aszites im Krankenhaus, die keine antibiotische Prophylaxe erhalten haben, stellt sie die häufigste bakterielle Infektion dar, noch vor Harnwegsinfekten und Pneumonien [6,7]. Heute liegt die Prävalenz der SBP bei 10 – 30 % unter Patient*innen mit Leberzirrhose und Aszites [8,9]. Auch die Inzidenz der SBP ist recht hoch. So entwickeln 7 – 30 % aller Aszitespatient*innen innerhalb eines Jahres eine SBP [10]. Dabei wird das Auftreten einer SBP wesentlich durch verschiedene Risikofaktoren beeinflusst, denn ihre Inzi-

denz liegt bei 14 – 23 %, wenn das Gesamtprotein in der Aszitesflüssigkeit < 1,5 g/dl beträgt, bei einem höheren Eiweißgehalt sinkt sie dagegen auf unter 3 % [11–13]. Früher wurde die Mortalität einer SBP mit über 90 % angegeben, doch heute ist die Krankenhausmortalität dank besserer Diagnose- und Therapiemaßnahmen auf 10 – 50 % je nach Risikofaktoren gesunken. Trotzdem beträgt die Ein-Jahres-Mortalität nach stattgehabter SBP noch 31 – 93 %. Grund dafür ist vor allem das fortgeschrittene Stadium der Lebererkrankung bei Patient*innen mit SBP und die damit einhergehenden Komplikationen. Ein großes Problem, auch nach überstandener SBP, ist die hohe Rezidivrate ohne Prophylaxe von bis zu 68 % im ersten Jahr, wobei die Mortalität bei der zweiten Episode einer SBP 31 % beträgt [4,13–15].

1.1.2 Klinik

Die SBP verläuft bei 10 – 33 % der Patient*innen asymptomatisch, deshalb muss sie bei Risikopatient*innen immer als mögliche Differentialdiagnose in Betracht gezogen und die Indikation zur abklärenden Diagnostik frühzeitig gestellt werden [16]. Typische Symptome umfassen sowohl lokale Peritonitis-Zeichen wie abdominelle Schmerzen und Abwehrspannung, Erbrechen, Diarrhoe oder Ileus, als auch systemische Entzündungszeichen wie Hypo- oder Hyperthermie, Schüttelfrost, Leukozytose, Tachykardie und Tachypnoe, aber zusätzlich auch Schock, gastrointestinale Blutungen und Nierenversagen. Zunehmende Verwirrtheit der Patient*innen, verminderte Urinmenge und Hypotonie können ebenfalls auf eine SBP hindeuten [10,16]. Besonders verdächtig für eine SBP ist eine plötzliche und unerklärliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes, der Leberfunktion oder einer hepatischen Enzephalopathie bzw. deren Neuauftreten sowie ein therapierefraktärer Aszites [10,17]. Striebel weist deshalb darauf hin, dass auch nur geringfügig erhöhte Entzündungsparameter und subfebrile Temperaturen bei der SBP vorliegen können [5]. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der großen Varianz der Klinik bei der abdominellen Untersuchung. 50 % der Patient*innen haben außer dem Aszites keinen abdominellen Befund; bei anderen Patienten variieren die Beschwerden von geringer Druckempfindlichkeit über Loslass-Schmerz bis hin zu starker Abwehrspannung und können somit das klinische Bild eines akuten Abdomens bieten [16].

1.1.3 Diagnostik

Als Diagnosemittel der Wahl hat sich die Aszitespunktion mit anschließender Analyse der gewonnenen Aszitesflüssigkeit durchgesetzt. Eine Gesamtzellzahl >500 / μ l im

Aszites deutet auf eine SBP bzw. auf eine sekundäre Peritonitis hin. Der Goldstandard zur Diagnostik einer SBP ist die Zelldifferenzierung mit Zählung der neutrophilen Granulozyten, wobei der heute anerkannte Grenzwert bei 250 neutrophilen Granulozyten pro Kubikmillimeter liegt [6,12,13]. Zur Vervollständigung der Diagnostik wird außerdem eine Kultur der Aszitesflüssigkeit angelegt (vgl. Tabelle 1) [10]. Ein positiver Erregernachweis in der Kultur der Aszitesflüssigkeit ist für die Diagnosestellung einer SBP nicht erforderlich. Zur Diagnostik einer SBP nicht empfohlen sind dagegen Leukozytenesterase-Teststreifen, da ihre Sensitivität nicht ausreichend ist sowie die PCR auf bakterielle DNA, da noch keine eindeutige Datenlage zu dieser Methode vorliegt [13].

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Diagnosekriterien der verschiedenen Arten der Aszitesinfektionen. Unter dem Begriff SBP werden dabei die drei Unterformen SBP, CNNA und monomikrobieller Bakteraszites zusammengefasst. Zudem werden polymikrobieller Bakteraszites und sekundäre Peritonitis unterschieden.

Infektionen der Aszitesflüssigkeit					
Diagnosekriterien	Varianten der SBP			Polymikrobieller Bakteraszites	Sekundäre Peritonitis
	SBP	CNNA	Monomikrobieller Bakteraszites		
Zahl der neutrophilen Granulozyten	$\geq 250/\text{mm}^3$	$\geq 250/\text{mm}^3$	$< 250/\text{mm}^3$	$< 250/\text{mm}^3$	$\geq 250/\text{mm}^3$
Asziteskultur	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv

1.1.4 Therapie

Eine empirische antibiotische Therapie der SBP sollte unmittelbar nach Diagnosestellung auch ohne vorliegende Kulturergebnisse begonnen werden. Bei ambulanten Patient*innen sind meist Gram-negative Erreger die Ursache einer SBP, während bei hospitalisierten Patient*innen auch resistente Gram-positive Keime in die Therapiekalkulation einbezogen werden müssen [4,18]. Häufige Gram-negative Infektionserreger sind typische Darmbakterien, wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Enterokokken und Streptokokken sind wichtige Vertreter der Gram-positiven Infektionserreger [5]. Als Mittel der Wahl werden deshalb für eine ambulant erworbene, erste Episode einer SBP Cephalosporine der Gruppe 3a empfohlen, da sie relativ sicher und gut verträglich sind, ein breites Bakterien-

spektrum abdecken und ihre Effektivität in zahlreichen randomisierten Studien bestätigt wurde [2,15]. Allerdings ist zu beachten, dass auch bei ambulanten Patient*innen die Resistenz gegen Cephalosporine bereits bei 7,1 % liegt [19]. Dabei ist Cefotaxim das am besten untersuchte Cephalosporin der Gruppe 3a und hat sich deshalb als Standardtherapie durchgesetzt [20]. Fluorchinolone haben eine ebenso gute Aszitespenetration wie Cephalosporine. So besitzt beispielsweise Levofloxacin bei *E. coli* und Koagulase-negativen Staphylokokken die gleiche Erregerabdeckung wie Cefotaxim, wenn die Patient*innen zuvor keine Prophylaxe mit Fluorchinolonen erhalten haben [2]. Allerdings wird eine empirische Therapie mit Fluorchinolonen nicht mehr empfohlen, da zunehmende Resistenzen unter den Enterobakterien vorliegen [13]. Zudem sollten in Gebieten mit hohen Resistenzraten der Bakterien auch für eine ambulant erworbene SBP Piperacillin/Tazobactam oder Carbapeneme eingesetzt werden [20]. In 1 – 10 % der SBP tritt eine Infektion durch Anaerobier auf. In diesem Fall ist eine zusätzliche Gabe von Metronidazol sinnvoll [9]. Bei Patient*innen mit nosokomialer oder komplizierter SBP (diese wird definiert durch das Vorliegen von Schock, Ileus, gastrointestinaler Blutung, schwerer Enzephalopathie oder erhöhtem Serumkreatinin [13,21]) ist besonders nach antibiotischer Vortherapie das vermehrte Vorliegen von Resistenzen zu beachten. Außerdem treten hier häufiger schwer therapierbare Erreger wie MRSA, VRE und *Enterococcus faecium* auf. Dabei kann in Regionen mit guter Resistenzlage Piperacillin/Tazobactam zur Therapie geeignet sein. Bei hohen Raten von ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* werden dagegen Carbapeneme empfohlen. Eine Ergänzung der Therapie mit Glykopeptiden wird vor allem auf Grund ihrer nephrotoxischen Wirkung nicht empfohlen [13,20]. Sobald die Ergebnisse der mikrobiologischen Kultur und der Resistenztestung vorliegen, sollte die anfangs ein breites Erregerspektrum abdeckende Antibiose gezielt zu einem Schmalspektrum-Antibiotikum mit hoher antimikrobieller Aktivität deeskaliert werden [4]. Ist ein Erregernachweis nicht möglich, so muss eine empirische Therapie unter Beachtung der lokalen Resistenzlage fortgeführt werden. In 90 % der Fälle heilt eine SBP durch die Antibiotika-Gabe aus [11]. Zur Abschätzung des Therapieerfolgs ist in erster Linie das klinische Befinden der Patient*innen wichtig. Bei einer Verschlechterung der Symptome muss das therapeutische Vorgehen überdacht werden. Ergänzend wird eine Kontrollparazentese 48 h nach Therapiebeginn empfohlen. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten sollte dann wieder unter 250 / μ l liegen, wenigstens aber auf unter 25 % des Ausgangswertes gesunken sein. Gleichbleibende oder

sogar steigende Neutrophilenzahlen legen ein Therapieversagen nahe. In diesem Fall muss eine sekundäre Peritonitis mittels Bildgebung abgeklärt und die Antibiose umgestellt werden. Hierbei sind oft Piperacillin/Tazobactam und Vancomycin mögliche Alternativen [2,4].

Bei der SBP kommt es zu einer Verminderung des effektiven arteriellen Blutvolumens und damit zu einer zirkulatorischen Dysfunktion. Deshalb haben Patient*innen mit SBP ein erhöhtes Risiko für ein hepatorenales Syndrom, besonders bei Vorliegen von Risikofaktoren wie Bilirubin >4 mg/dl und Kreatinin >1 mg/dl [15,22]. Aus diesem Grund wird eine Albuminsubstitution von 1,5 g/kg Körpergewicht am Tag der Diagnostikstellung und von 1 g/kg Körpergewicht am dritten Tag empfohlen. Die Albuminsubstitution bewirkt eine verminderte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und dadurch eine geringere Häufigkeit von zirkulatorischen Dysfunktionen durch eine Verminderung der systemischen Vasodilatation. Die Inzidenz des hepatorenalen Syndroms sank durch die Substitution von Albumin von 33 % auf 10 % und die Mortalität von 41 % auf 22 % [9,23].

Da die SBP mit einer sehr schlechten Prognose behaftet ist, ist es ein etablierter Ansatz die Inzidenz der Erkrankung durch eine effektive Prophylaxe zu senken. Nach einer überstandenen Episode einer SBP beträgt die Rezidivrate 70 % im ersten Jahr [6], deshalb besteht bei allen Patient*innen nach einer SBP die Indikation zu einer Sekundärprophylaxe. Eine Primärprophylaxe ist bei Patient*innen mit Leberzirrhose und gastrointestinaler Blutung angezeigt [17,24]. Außerdem sollten Patient*innen mit einem Gesamtprotein im Aszites $<1,5$ g/dl und zusätzlicher schwerer Leberinsuffizienz (Child-Pugh-Score ≥ 9 und Serumbilirubin ≥ 3 mg/dl) oder Niereninsuffizienz (Serumkreatinin $>1,2$ mg/dl, Harnstoff >25 mg/dl oder Serumnatrium <130 mEq/l) eine Primärprophylaxe erhalten [13,20].

Momentan sind die Gabe von zielgerichteten Antibiotika kombiniert mit Albumin und eine Lebertransplantation die einzigen Möglichkeiten, um das Überleben von Patient*innen mit einer SBP zu verbessern [2].

1.1.5 Pathophysiologie

Die SBP kann bei Aszites jeder Genese auftreten, am häufigsten ist sie jedoch bei portalem Hypertonus auf Grund einer Leberzirrhose [16,25]. Außerdem begünstigt eine Reihe von Risikofaktoren das Entstehen einer SBP. Dazu gehören eine vorhergehende SBP, eine gastrointestinale Blutung, ein niedriges Gesamteiweiß in der Aszitesflüssigkeit, ein Serumbilirubin $>3,2$ mg/dl, eine Thrombozytopenie <98000 /mm³,

die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren und ein höherer MELD-Score [4]. Auch genetische Faktoren spielen eine Rolle bei der SBP. So hat man erkannt, dass Patient*innen mit Toll-like-Rezeptor (TLR) 2-Varianten ein erhöhtes Risiko für eine SBP haben (38,5 % vs. 15,3 %). Der TLR2 ist bei Makrophagen essenziell für das Erkennen von mikrobiellen Komponenten und damit für die funktionierenden Abwehrmechanismen der Patient*innen. Varianten des *nucleotide binding oligomerisation domain* (NOD) 2-Gens sind an der Pathogenese von Morbus Crohn beteiligt und behindern dort die Integrität der Darmmukosa. Bei der SBP erhöhen sie das Erkrankungsrisiko und bedingen bei Patient*innen mit Leberzirrhose und Aszites im Vergleich zu Wildtyp-Genotypen eine höhere Sterblichkeit [2]. Typische Erregerquelle für die SBP ist der Verdauungstrakt, denn der Gastrointestinaltrakt ist von unzähligen, potenziell pathogenen Organismen besiedelt [5]. Aber auch die Infektion mit extraintestinalen Bakterien aus Respirations- und Urogenitaltrakt oder der Haut ist möglich, wenn auch seltener. Ebenso können Katheter und invasive Eingriffe die Infektion begünstigen [26]. Einige Theorien zur Entstehung der SBP gehen von einer transmuralen Besiedelung der Aszitesflüssigkeit mit Keimen der Darmflora aus [16]. In der Regel kann eine Infektion durch erhaltene Darmintegrität und ein suffizientes Immunsystem verhindert werden, doch bei der Entstehung einer SBP wirken eine Reihe von ungünstigen Schlüsselementen zusammen: Bakterielle Fehlbesiedelung im Darm, erhöhte Darmpermeabilität, Bakterientranslokation und Immunsuppression [26]. Eine Leberzirrhose wird häufig von einer bakteriellen Fehlbesiedelung des Darms begleitet, so findet sich diese bei 20 – 60 % der Patient*innen und auch ein Aszites prädisponiert für eine Fehlbesiedelung des Darms. Besonders Gram-negative Bakterien überwuchern die natürliche Darmflora, die physiologisch vor allem aus anaeroben Keimen besteht. Die bakterielle Fehlbesiedelung erleichtert wiederum die Translokation von Bakterien, sodass 30,7 % der Patient*innen mit Leberzirrhose und gleichzeitig vorliegender Fehlbesiedelung des Darms von einer SBP betroffen sind, aber nur 9,1 % der Patient*innen mit intakter Darmflora [3,11,26]. Bei schwerkranken Patient*innen ist häufig die Darmmotilität gestört, was die bakterielle Fehlbesiedelung zusätzlich begünstigt. Zudem liegt eine erhöhte Darmpermeabilität vor, die wiederum die Bakterientranslokation ermöglicht. Ursache hierfür ist in der Regel eine portale Hypertension, die zu erweiterten Gefäßen in der Darmmukosa, einem Ödem der *Lamina propria*, einer fibromuskulären Proliferation, einer Hypertrophie der *Lamina muscularis mucosae* und damit zu einer gestörten Integrität der Darmmukosa führt.

Auch durch traumatische Schädigung, Entzündungen und Darmwandischämien kann die Darmintegrität gestört werden. Die erhöhte Permeabilität scheint dabei proportional zum Grad der portalen Hypertension, aber unabhängig von der Schwere und der Ätiologie der Lebererkrankung zu sein [5,26]. Zusätzlich scheinen Endotoxine, der plättchenaktivierende Faktor und Sauerstoffradikale einen Einfluss auf die Permeabilität der Darmmukosa zu haben [27]. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass bei Patient*innen mit Leberzirrhose die Mukus-Schicht des Kolons signifikant reduziert ist. Auch die Zell-Zell-Kontakte zwischen Kolonepithelzellen waren bei Patient*innen mit SBP deutlich reduziert. Beide Effekte werden durch *E. coli* Bakterien vermittelt, hierbei beeinflussen die Bakterien die Mucin-2 Expression und verursachen den proteasomalen Abbau von E-Cadherin und Occludin. Die Degradation von Occludin geschieht dabei über endogene Proteasen, E-Cadherin wird dagegen von Proteasen vitaler Bakterien abgebaut. Durch die von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen pathologischen Veränderungen im Rahmen einer SBP wird zum einen der Kontakt zwischen Darmepithelzellen und Bakterien erleichtert und zum anderen ist die intestinale Barriere destabilisiert [28,29]. Zur Entstehung einer SBP ist dann noch eine Bakterientranslokation in den Aszites nötig. Vor allem Enterobakterien, Staphylokokken und Enterokokken können translozieren, die meisten Anaerobier, die in der Regel 90 % der Darmflora ausmachen, dagegen nicht oder nur sehr schwer. Aerobe, Gram-negative Bakterien sind sogar in der Lage, eine histologisch intakte Darmwand zu durchdringen [11,26]. Bei einer Leberzirrhose findet man eine verringerte phagozytische Aktivität der neutrophilen Granulozyten und des mononukleären Phagozytensystems, eine gestörte humorale Immunität und eine verringerte Opsonin-Aktivität der Aszitesflüssigkeit. Die neutrophilen Granulozyten bei Patient*innen mit Leberzirrhose zeigen aber nicht nur eine Abnahme ihrer Aktivität, sondern auch verschlechterte metabolische Prozesse, regelmäßige Apoptose und eine deutlich reduzierte Chemotaxis [26]. Die antibakterielle Kapazität (Opsonin-Aktivität) der Aszitesflüssigkeit, die die Immunkompetenz der Patient*innen widerspiegelt, ist positiv korreliert mit dem Gesamtproteingehalt des Aszites, sowie dem Gehalt von Immunglobulinen, Komplementfaktoren und Fibronectin. Dadurch sind Patient*innen mit einem niedrigen Gesamtprotein und Komplementgehalt für die SBP prädispositioniert [26]. Abbildung 1 stellt die bisher bekannten pathologischen Veränderungen dar, welche die Entstehung einer SBP bei Leberzirrhose begünstigen.

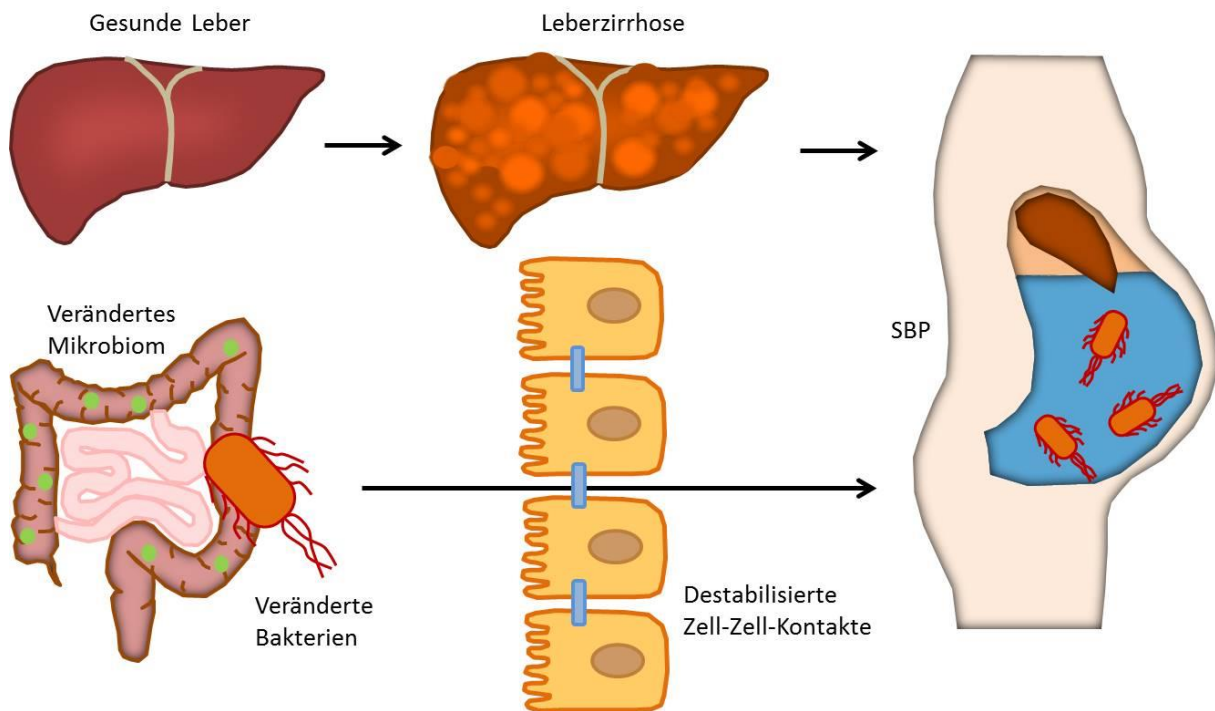


Abbildung 1: Pathogenese der SBP. Aszites entsteht in der Regel erst, nachdem sich eine Leberzirrhose aus einer gesunden Leber entwickelt hat. Bei einer SBP wird der Aszites durch pathogene Keime besiedelt. Hier begünstigen das veränderte Mikrobiom, veränderte Eigenschaften der Bakterien und destabilisierte Zell-Zell-Kontakte die bakterielle Translokation in den Aszites.

1.2 p53-Familie

1.2.1 Funktionen der p53-Familie

Zur p53-Familie gehören die Proteine p53, p63 und p73. Zudem existieren verschiedene Isoformen der Proteine, die beispielsweise durch alternatives Splicing gebildet werden. Der Transkriptionsfaktor p53 ist vor allem durch seine Rolle als Tumorsuppressor bekannt. Seine Strukturhomologe p63 und p73 weisen zum Teil analoge, aber auch gegensätzliche Wirkungen auf. So können manche der Isoformen sogar karzinogen wirken oder eine Resistenz gegenüber Chemotherapien vermitteln [30,31]. Alle drei Familienmitglieder enthalten eine *DNA-binding domain*, über die die Regulation ihrer Zielgene erfolgt [32]. Die Bedeutung von p53 bei der Tumorentstehung wird dadurch evident, dass p53 in 50% aller Tumoren mutiert ist [33]. p53 wird als *guardian of the genome* bezeichnet, da es bei DNA-Schädigung aktiviert wird und die Replikation der Zelle durch einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase aufhält, um so die Reparatur der Schäden zu ermöglichen [34]. Sind die Defekte jedoch zu groß, so kann p53 auch die Apoptose der Zelle auslösen [35]. Dies wird schematisch in Abbildung 2 veranschaulicht. p53 kann in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor dabei sowohl auf den intrinsischen, als auch auf den extrinsischen Apoptose-Signalweg

Einfluss nehmen, indem es die Produktion von Proteinen wie PUMA, BAX, BID, CD95 und TRAIL-R2 begünstigt [36,37]. Außerdem kann zytosolisches p53 durch die Freisetzung von Cytochrom C direkt Apoptose auslösen [38]. Die genauen Abläufe, wie p53 entscheidet, ob eine Zelle gerettet oder zerstört wird, sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung [31]. In Tumorzellen liegt p53 häufig mutiert oder inaktiviert vor, sodass der Zellzyklus-Arrest nicht stattfinden kann [34]. Auch p63 und p73 können Apoptose auslösen, indem sie ebenfalls Zielgene von p53 aktivieren [39]. p53 hat aber noch weitere Funktionen, beispielsweise bei Infektionen. Hierbei kann es als Inhibitor von NF- κ B wirken und dadurch eine Immunantwort und Entzündungsreaktion unterdrücken [40].

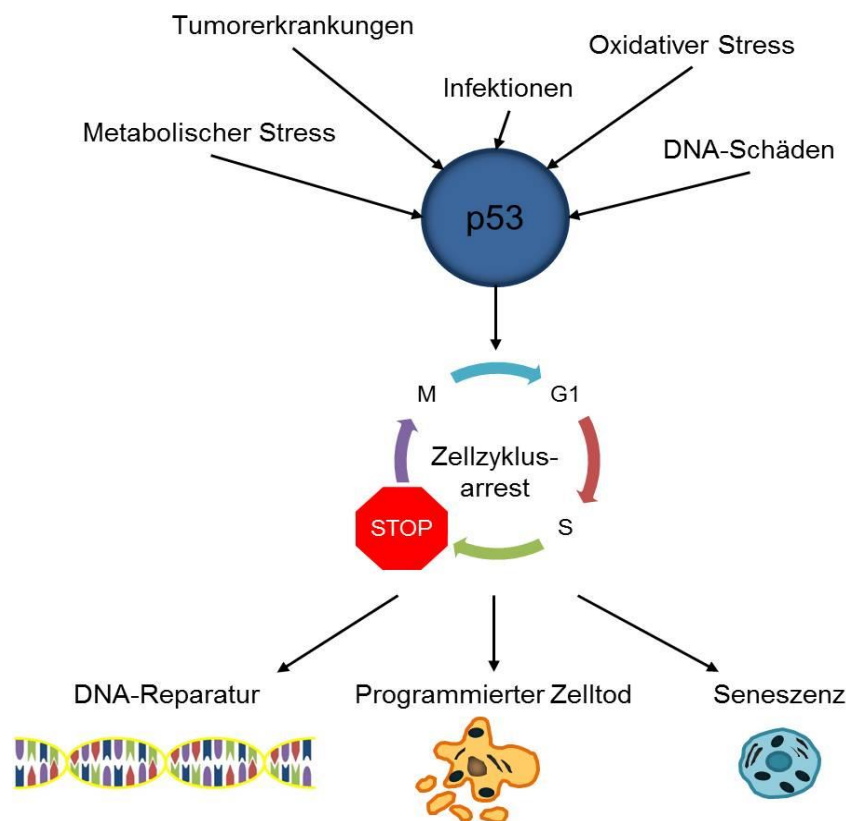


Abbildung 2: Verschiedene Faktoren wie z.B. DNA-Schäden, oxidativer Stress oder auch bakterielle Infektionen führen zur Aktivierung von p53. Über p53 wird schließlich ein Zellzyklusarrest ausgelöst. Anschließend werden die DNA-Schäden entweder repariert oder die Zelle geht zugrunde.

1.2.2 Regulation von p53

Die Aktivität und die Stabilität von p53 unterliegen einer strengen Regulation. Der wichtigste Faktor dabei ist eine autoregulatorische negative Feedbackschleife über die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2. Diese sorgt für die Ubiquitinierung und damit für den Export von p53 aus dem Nukleus, sodass p53 durch das Proteasom abgebaut werden kann. Doch MDM2 reguliert durch Bindung an die N-terminale *transcription-*

activation domain auch die Transkription von p53. Des Weiteren beeinflussen zahlreiche posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Sumoylierung die Aktivität von p53 [41,42].

In der Regel sind die zellulären Spiegel von p53 sehr niedrig und die Halbwertszeit von p53 ist mit ca. 20 min ebenfalls gering. Doch bei Zellstress, z.B. induziert durch Onkogene oder Zellgifte, reaktive Sauerstoffverbindungen oder Energie-Depletion sowie durch DNA-Schäden unterschiedlicher Ätiologie, wird das Protein stabilisiert, wodurch seine Protein-Spiegel ansteigen [43,44]. Dies geschieht durch Hemmung von MDM2 [45]. Zusätzlich werden PI3K/AKT- und mTOR-Signalwege herunterreguliert [46]. Der PI3K/AKT-Signalweg spielt zusammen mit dem JNK-Signalweg auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von p53 während einer bakteriellen Infektion. Lipopolysaccharid (LPS) auf der Bakterienoberfläche kann über diese beiden Wege MDM2 aktivieren, wodurch p53 reduziert wird. Eine spätere Folge des verminderten p53 ist dann wiederum eine Aktivierung des proinflammatorischen NF- κ B, was hilfreich zur Abwehr der Bakterien sein kann [47].

1.2.3 Rolle der p53-Familie bei Infektionen

Intrazelluläre Bakterien sind auf den Metabolismus ihrer Wirtszelle angewiesen. Da p53 zahlreiche metabolische Signalwege kontrolliert, ist eine Interaktion mit p53 wichtig für alle intrazellulären Bakterien, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten und den Tod der Wirtszelle zu verhindern [44]. p53 kann z.B. durch Hemmung des Pentosephosphatwegs die Replikation von intrazellulären Bakterien hemmen [48]. Für *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist bekannt, dass es über den Virulenzfaktor CagA und verschiedene Signalkaskaden das Apoptoseverhalten der Zelle verändern kann und so das Überleben der infizierten Zelle verlängert. Als Folge einer PI3K/AKT-Aktivierung wird dabei MDM2 phosphoryliert, was wiederum zur Degradierung von p53 führt [49]. CagA kann auch durch eine Assoziierung mit *apoptosis-stimulating protein of p53 2* (ASPP2) die Degradierung von p53 bewirken [50]. Ebenso nehmen einige Viren, wie HPV, EBV, HBV und HCV sowie der Malaria-Erreger *Plasmodium yoelii* Einfluss auf p53, um das Überleben der Zelle und somit auch das Überleben der viralen oder bakteriellen Erreger zu verlängern [51–55].

1.3 Formen und Regulation des Zelltodes

Die Entwicklung und das Fortbestehen eines Organismus wird wesentlich durch das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zellabbau bestimmt, es kann also kein

Leben ohne Tod geben [56]. Zelltod ist definiert als Verlust von essenziellen Funktionen der Zelle, wie die ATP-Produktion und das Aufrechterhalten eines Redox-Gleichgewichts, was zum Verlust der zellulären Integrität führt. Es müssen besonders zwei Formen des Zelltodes unterschieden werden: Der traumatische, nicht kontrollierbare Zelltod (*accidental cell death*, ACD) und der regulierte, programmierte Zelltod (*regulated cell death*, RCD). ACD tritt bei starker Schädigung der Zellen durch physikalische, chemische oder mechanische Kräfte (z.B. Scherkräfte, pH-Schwankungen oder osmotische Kräfte) auf. RCD kann dagegen sowohl bei Störungen des intra- und extrazellulären Gleichgewichts, aber auch völlig ohne äußere Einflüsse stattfinden. Genetisch festgelegte molekulare Mechanismen sorgen so für den Abbau von beschädigten, überflüssig gewordenen oder sogar schädlichen Zellen [57]. Die untergehenden Zellen können wiederum sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freisetzen und eine Immunantwort auslösen [58]. Die Mechanismen der verschiedenen Formen des RCD haben dabei zahlreiche Gemeinsamkeiten und können jeweils morphologische Merkmale eines nekrotischen oder apoptotischen Zelltodes aufweisen [57].

Apoptose

Apoptose kann durch zahlreiche Faktoren wie z.B. DNA-Schaden, Stress, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Fehlen von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden [59,60]. *In vivo* werden apoptotische Zellen von Makrophagen oder Phagozyten abgebaut, *in vitro* endet die Apoptose in einer sekundären Nekrose, da die Plasmamembran zerstört wird [61,62]. Die Apoptose kann auch Effekte auf Immunzellen haben [63]. Kontrolliert wird der wichtigste und unumkehrbare Schritt der Apoptose, die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, durch die *B-cell lymphoma* (BCL) 2-Proteinfamilie und ihre Mitglieder BAX, BAK und BOK. Diese werden wiederum von pro-apoptotischen Mitgliedern der BCL2-Familie, wie PUMA, BIM, BID und NOXA, aktiviert. Gehemmt wird die Apoptose dagegen von BCL2, BCL-xL, MCL-1, BCL-W und BFL-1 [31,59,64]. Durch die Poren in der äußeren Mitochondrienmembran werden Proteine, wie Cytochrom C und Smac/DIABLO, aus dem Intermembranraum ins Zytosol freigesetzt. Cytochrom C bildet anschließend durch Bindung von *apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF1) und Pro-Caspase 9 das Apoptosom, welches Caspase 9 aktiviert. Aktive Caspase 9 führt dann zur proteolytischen Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7. Diese sind für die Degradierung der DNA, die

Bildung von Apoptosekörperchen und die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche verantwortlich [65–68].

Die extrinsische Apoptose wird bei Störungen des extrazellulären Milieus über Todesrezeptoren in der Plasmamembran (z.B. FAS/CD95) vermittelt [68–70]. Durch Ligandenbindung an die Todesrezeptoren wird intrazellulär ein *death-inducing signaling complex* (DISC I oder II) gebildet, welcher über FADD die Aktivierung von Caspase 8 bewirkt [71–73]. Daraufhin kann die Apoptose über zwei verschiedene Wege fortschreiten: Erstens können Caspase 3 und 7 proteolytisch aktiviert werden und den Zelltod induzieren oder zweitens kann über die Spaltung von BID Zelltod über BAX, BAK und Caspase 9 ausgelöst werden [57]. Im Gegensatz dazu kann über die Todesrezeptoren auch ein NF- κ B-abhängiger Signalweg aktiviert werden, der ein Überleben der Zelle und eine Entzündungsantwort auslöst [74].

Nekrose

Bei der *mitochondrial membrane permeability transition* (MPT)-abhängigen Nekrose handelt es sich um einen unkontrollierten Zelltod bei dem es durch starken oxidativen Stress oder erhöhte Calciumspiegel in der Zellumgebung zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kommt, wodurch das Membranpotential zusammenbricht. Dies ist die Folge der Öffnung des *permeability transition pore complex* (PTPC), wobei die genauen Abläufe dieser Zelltodesart aktuell noch Gegenstand der Forschung sind [75]. Reguliert wird die MPT-abhängige Nekrose durch Cyclophilin D, die BCL2-Familie, *Dynamin-1-like protein* (DRP1) und p53 [76–78].

Nekroptose

Die Nekroptose ist eine Form des RCD. Vermittelt wird Nekroptose über den Todesrezeptor TNFR1, über *pathogen recognition receptors* (PRR), wie TLR3 und TLR4, oder über ZBP1 [79]. Anschließend wird das sogenannte Nekrosom oder Ripoptosom gebildet. An diesen Plattformen wird dann die *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase* (RIP)-1 aktiviert, die ihrerseits RIP3 anschaltet. RIP3 phosphoryliert die *mixed lineage kinase domain like pseudokinase* (MLKL), die daraufhin oligomerisiert und eine Permeabilisierung der Plasmamembran einleitet [80,81].

Ferroptose

Die Ferroptose ist ein eisenabhängiger Zelltod, bei dem es zur Bildung von Lipidperoxiden und ROS kommt [82]. Sie wird von Erastin, RSL3 und FIN56 begünstigt und

von Ferrostatinen und Liproxstatinen, den Antioxidantien Vitamin E und Coenzym Q10, sowie GPX4 gehemmt. Zudem kann Eisen selbst die Ferroptose durch Lipidoxidation auslösen; Eisenchelatoren wiederum bieten einen wirksamen Weg um diese zu hemmen [83–85].

Pyroptose

Die Pyroptose ist eng mit den Mechanismen einer Entzündungsreaktion verknüpft und wird durch Pathogene wie z.B. bakterielles LPS ausgelöst. Anschließend kommt es zur Aktivierung von Caspasen (Caspase 1, Caspase 3, muriner Caspase 11 oder ihrer humanen Homologe Caspase 4 und Caspase 5) [86]. Zudem kommt es oft zur IL-1 β - oder IL-18-Sekretion und damit zum Auslösen einer Entzündungsantwort [56,87]. Durch die aktiven Caspasen wird Gasdermin D proteolytisch gespalten, was zur Permeabilisierung der Plasmamembran führt [88].

Parthanatos

Parthanatos wird durch eine übermäßige Aktivierung von Poly [ADP-Ribose] Polymerase (PARP) durch reaktive Stickstoffspezies bei DNA-Schaden, oxidativem Stress, Hypoxie, Hypoglykämie oder Entzündung ausgelöst. Die Folge ist ein Zusammenbruch des Redox- und Energiegleichgewichts der Zelle durch den Abbau von NAD⁺ und ATP sowie die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Außerdem kommt es über *apoptosis inducing factor* (AIF) zum Abbau der DNA [57,89].

Entose

Die Entose beschreibt eine Art des Zelltodes, bei der Zellen von nicht-phagozytierenden Zellen in sich aufgenommen werden. Auslöser ist meist ein Ablösen von Epithelzellen und der damit einhergehende Verlust von Integrinen. Die Aufnahme der Zellen ist abhängig von Actomyosin wobei die aufgenommenen Zellen anschließend lysosomal abgebaut werden [90].

NETose

NETose ist eine Sonderform des Zelltodes, der bei neutrophilen Granulozyten auftritt. Bei der NETose produzieren Neutrophile nach Aktivierung durch Rezeptoren wie TLR *neutrophil extracellular traps* (NETs), ein Fasernetzwerk, das Chromatin und Histone enthält. Das Fasernetz dient zur Opsonierung von Bakterien. Die Freisetzung der NETs ist abhängig von NADPH-Oxidasen und der Produktion von ROS,

scheint aber auch von Mechanismen der Nekroptose wie RIP1 und MLKL beeinflusst zu werden. Die Zelle stirbt nach der Sezernierung dieses Fasernetzes [91,92].

Lysosom-abhängiger Zelltod

Entscheidend für den Lysosom-abhängigen Zelltod ist die Permeabilisierung der Lysosom-Membran, was z.B. durch ROS bewirkt werden kann. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen, den Cathepsinen, die über die BCL2-Familie Caspasen aktivieren und die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran bewirken können. Der Lysosom-abhängige Zelltod kann aber auch Caspase-unabhängig zur Plasmamembran-Permeabilisierung führen [93].

Autophagie

Während die Autophagie das Überleben der Zelle durch den Abbau von fehlerhaften Zellbestandteilen begünstigt, so können beim Autophagie-abhängigen Zelltod Mechanismen der Autophagie zur Zerstörung von Zellen genutzt werden. Diese Mechanismen sind auch teilweise bei anderen Arten des RCD wie extrinsischer Apoptose, Nekroptose oder Ferroptose beteiligt [57,94].

Immunogener Zelltod

Der immunogene Zelltod wird durch Virusinfekte, aber auch durch bestimmte Chemotherapeutika ausgelöst und kann über DAMPs und PRRs eine Antwort des adaptiven Immunsystems auslösen. Allerdings können Caspase 3 und Caspase 8 auch die Immunreaktion, die von verschiedenen Arten des RCD ausgelöst wird, hemmen [57,95].

Paraptose

Die Paraptose ist eine Form des RCD und wird oftmals durch IGF1R-Stimulation ausgelöst und über *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Signalwege vermittelt. Sie zeichnet sich morphologisch durch das Anschwellen / Abrunden der Mitochondrien oder des Endoplasmatischen Retikulums und die Bildung von zytoplasmatischen Vakuolen aus. Die physiologische und pathophysiologische Funktion von Paraptose ist noch nicht endgültig geklärt. Bei der neuronalen Entwicklung und verschiedenen neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen konnte Paraptose nachgewiesen werden [96–102].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die SBP ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose mit einer Mortalität von bis zu 93%, die durch bakterielle Translokation verursacht wird [4]. Diese Translokation wird bei Patienten mit Leberzirrhose durch eine bakterielle Dysbiose, eine Reduktion der Mukusschicht, sowie eine geschwächte epitheliale Darmbarriere begünstigt. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass das *tight junction* Protein Occludin bei Kontakt mit *E. coli* proteasomal abgebaut und E-Cadherin, ein Stabilisator der Zell-Zell-Kontakte, durch eine neue bakterielle Protease-Aktivität gespalten wird [29]. Um die Pathomechanismen der SBP und die Rolle der p53-Familie in der Darmbakterien-Epithelzell-Interaktion auf molekularer Ebene zu analysieren, habe ich an einem klinisch relevanten *in vitro*-Modell die p53- und p73-Regulation, sowie die Induktion von bakteriell-induziertem Zelltod untersucht. Dabei standen folgende essenzielle Fragestellungen im Mittelpunkt meiner Dissertation:

- Führt die Ko-Kultivierung von Bakterien und Darmepithelzellen zur Sekretion inflammatorischer Zytokine?
 - Exprimieren Darmepithelzellen als Schutzmechanismus gegenüber pathogenen Darmbakterien Rezeptoren, die Bakterien oder bakterielle Bestandteile detektieren können?
 - Können Darmepithelzellen entzündliche Zytokine wie Interleukin (IL)-6 oder -8 sekretieren und somit eine Immunantwort induzieren?
- Hat eine Ko-Kultivierung von Bakterien und Wirtszellen des gastrointestinalen Epithels einen Einfluss auf die zellulären p53- und p73-Proteinspiegel?
 - Haben Bakterien einen Einfluss auf die Stabilität von p53 und p73?
 - Werden zelluläre Degradationsmechanismen von den Bakterien induziert, um somit einen Überlebensvorteil für die Bakterien zu generieren?
- Induzieren Bakterien Zelltod in Darmepithelzellen oder kann die Darmepithelzelle dem Zelltod in der Interaktion mit Bakterien des Mikrobioms oder pathogenen Keimen entgehen?
 - Induzieren Bakterien einen programmierten oder nicht-programmierten Zelltod?
 - Welche Form des Zelltodes wird induziert?

Ein besseres Verständnis dieser molekularen Mechanismen könnte helfen, dringend benötigte neue Therapieansätze zur Behandlung einer spontan bakteriellen Peritonitis für Patienten mit Leberzirrhose zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biometra Multigel	Analytik Jena AG, Jena
Certomat R	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Consort EV 261	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
EMax® Plus Microplate Reader	Molecular Devices, LLC, San José, USA
Heracell	Heraeus, Hanau
Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ikamag Reo	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
KA 105 Dual Range	Mettler Toledo, Columbus, USA
LaminAir® HB2448	Heraeus, Hanau
Light Cycler 480/93	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
LSR Fortessa™	BD Pharmingen™, Heidelberg
Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
myFUGE™ Mini	Benchmark scientific, Edison, USA
NanoPhotometer	Implen GmbH, München
Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
TE77XP	Hofer, Inc., Holliston, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
TriStar ² LB 942 Multimode Reader	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
UBE125	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
VV3	VWR International, Radnor, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
WT16	Biometra GmbH, Göttingen

2.1.2 Laborbedarf

15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube	Falcon®, Corning, Inc., Corning, USA
24 mm Transwell® with 0,4µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile	Corning, Inc., Corning, USA
25 cm ² Cell Culture Flask, Canted Neck	Corning, Inc., Corning, USA
2 ml Aspirating Pipet	Falcon®, Corning, Inc., Corning, USA
50 ml Polypropylene Conical Tube	Falcon®, Corning, Inc., Corning, USA
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap	Falcon®, Corning, Inc., Corning, USA
Cell Culture Flask, T175	Eppendorf AG, Hamburg
Cell Culture Flask, T75	Eppendorf AG, Hamburg
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Combitips advanced® 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Costar Cell Culture Plate 96-Well	Corning, Inc., Corning, USA
Costar® Stripette® 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, Inc., Corning, USA
Dual Chamber for Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
LightCycler® 480 Sealing Foil	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Nunc MaxiSorp™ flat-bottom	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Plastipak™ 10 ml	BD Pharmingen™, Heidelberg
PVDF Transfer Membrane, 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
QIAshredder	Qiagen N.V., Hilden
Quali-PCR-Tubes	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V., Hilden
Safe-lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Syringe Driven Filter Unit PVDF 0,45 µm	Millex®-HV, Merck KGaA, Darmstadt
TC-Schale 100, Standard	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman™ 3MMCHR	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA

2.1.3 Software

BD FACSDiva Software	BD Pharmingen™, Heidelberg
BIO-1D Version 15.07	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Flow Logic	Inivai Technologies, Mentone, Australien
Image J	National Institute of Health, USA
Image Lab™ Software Version 6.0.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP3	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Soft Max Pro 6.4.2	Molecular Devices, LLC, San José, USA

2.1.4 Chemikalien

10 % APS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10x Annexin V Binding Buffer	BD Pharmingen™, Heidelberg
2,2'-Bipyridyl Reagent Plus ®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2x Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
APC Annexin V	BD Pharmingen™, Heidelberg
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bioimaging Certified Reagent DAPI Solution	BD Pharmingen™, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V	Biomol GmbH, Hamburg
Buffer RLT Lysis Buffer	Qiagen N.V., Hilden
Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl-hydrazone	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ciclosporin	Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg
cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, EASY pack	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO Hybri-Max®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FCS	Bio & Sell GmbH, Feucht
Ferrostatin-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEK-blue Selection™	InvivoGen, San Diego, USA
iE-DAP	InvivoGen, San Diego, USA
iE-Lys	InvivoGen, San Diego, USA
Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> (O55:B5)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
McCoy's 5A (1x) + GlutaMAX™ – I	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MDP	InvivoGen, San Diego, USA
MDP-control	InvivoGen, San Diego, USA
MTS	Promega Corporation, Madison, USA
N-Acetyl-L-cysteine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Necrostatin-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Normocin™	InvivoGen, San Diego, USA
Nutlin-3	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
OptEIA™ Human Elisa Set (IL-1β II, IL-6, IL-8)	BD Pharmingen™, Heidelberg
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Panabinstat (LBH589)	Selleck Chemicals, Houston, USA
p-Coumaric acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PhosSTOP EASY pack	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Merck KGaA, Darmstadt
Ripa Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase-Free Water	Qiagen N.V., Hilden
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Skim Milk Powder	Fluka analytical, München
Stain Buffer (BSA)	BD Pharmingen™, Heidelberg
Temed	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate (TMRE)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TMB Liquid Substrate System for ELISA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trolox	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin +/- EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ultra Pure Proto Gel	National Diagnostics, Atlanta, USA
zVAD-FMK	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Alle übrigen Reagenzien wurden von laborüblichen Herstellern bezogen.

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Proteindetektion mittels Western Blot.

Antigen	ID	Stamm	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mouse IgG	A9044	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:3000
Anti-Rabbit IgG	A0545	Ziege	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:10000
Caspase-3	CS9662	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
Cleaved PARP	Asp214/D64E10	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
Cytochrom C	37BA11	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
IL8	ab106350	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
MDMX	phospho S367	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
MDMX	MDMX-82	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Nod1	3545	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
Nod2	2D9	Maus	Invitrogen AG, Carlsbad, USA	1:1000
p53	DO-1	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	1:1000
p73	D3G10	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
p73	EP436Y	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
PARP Antibody	CS9542	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	1:1000
TIM23	ab230253	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	1:1000

TLR2	TL2.1	Maus	BioLegend, San Diego, USA	1:1000
TLR2	TL2.1	Maus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	1:1000
TLR4	HTA125	Maus	BioLegend, San Diego, USA	1:1000
TLR4	76B357.1	Maus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	1:1000
TOM20	ab56783	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
β -Aktin	A3854	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:3000

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Hersteller	Volumen
Anti-Human CD284 (TLR4) HTA125, Alexa Fluor 488	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	10 μ l
Mouse IgG2a kappa Isotype Control, Alexa Fluor 488	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4 μ l
Anti-Human CD282 (TLR2) PE	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	10 μ l
eBioscience™ Mo IgG2a κ Isotype Control PE	Invitrogen AG, Carlsbad, USA	10 μ l
PE Mouse Anti-Human TLR4 (CD284) Clone TF901 (RUO)	BD Pharmingen™, Heidelberg	5 μ l
PE Mouse IgG1 κ Isotype Control Clone MOPC-21 (RUO)	BD Pharmingen™, Heidelberg	1,25 μ l

2.1.6 Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer für die qPCR. Diese stammen alle von Qiagen N.V., Hilden.

Primer	Katalognummer
GAPDH	QT00079247
TP53	QT00060235
TP73	QT00030240
NOD1	QT00054082
NOD2	QT00025872

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 *E. coli*-Übernachtskultur

LB0-Medium

10 g Bacto-Trypton, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl mit H₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

Der *E. coli*-Stamm 25922 (O6:Hnt) von ATCC wurde bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Bakterien im Verhältnis 1:1000 in LB0-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zur Herstellung von inaktivierten Bakterien (HI) diente Erhitzen bei 65°C für 5 min.

2.2.2 Bestimmung der Bakterienzahl

Die Optische Dichte₆₀₀ wurde photometrisch bestimmt und die Bakterienzahl pro µl gemäß einer laborinternen Eichgeraden berechnet. Die Ko-Kultur von Bakterien und Zellen erfolgte bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0, MOI 1, MOI 5 oder MOI 10. MOI 0 steht dabei für die Kontrolle aus LB0-Medium, in dem keine Bakterien enthalten waren. Bei MOI 1 wurde die gleiche Anzahl an Bakterien zu der Kultur hinzugefügt, wie sich Zellen darin befanden; bei MOI 5 wurden die Zellen mit der 5-fachen Menge an Bakterien behandelt und bei MOI 10 mit der 10-fachen Menge.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolation, cDNA-Isolation, qPCR

Zur Gewinnung von RNA wurden die Proben, die bei der Zellernte in RLT lysiert wurden gemäß dem Protokoll „RNeasy Mini Protocol“ von Qiagen aufbereitet.

Für das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA gemäß dem QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen wurden 2000 ng RNA eingesetzt. Die enthaltene RNA-Konzentration pro Probe wurde dafür photometrisch bestimmt. Nach der Zugabe von Wipe Out Buffer wurden die Proben für 2 min bei 42 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben 1:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Um die in den Proben enthaltene Menge an RNA der *genes of interest* zu ermitteln, wurde eine qPCR durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Mastermix aus 1 µl Primer für die zu untersuchende RNA, 3 µl RNase freiem H₂O und 5 µl SYBR® Green hergestellt. Bei jeder qPCR wurde zusätzlich zu den zu untersuchenden RNAs GAPDH als Ladekontrolle analysiert. Die Proben wurden in Triplikaten auf eine 384-Well-Platte pipettiert, die Platte mit einer Sealing Foil abgedeckt, zentrifugiert und bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die qPCR lief nach folgendem Schema ab: 8 min Denaturierung bei 95 °C, anschließend 40 Zyklen der Amplifikation (95 °C für 1 s, 64 °C für 15 s, 72 °C für 20 s) und Kühlung bei 40 °C. Die Auswertung erfolgte nach der Delta-Delta-CT-Methode, als Referenz diente GAPDH.

2.3.2 ELISA

Waschpuffer

9 Teile Millipore-H₂O, 1 Teil 10x PBS, 0,05 % Tween 20.

Die Durchführung des ELISA erfolgte entsprechend der Herstellerangaben von BD Pharmingen™. Die Proben aus HCT-116 Zellen wurden 1:50 mit 1x PBS vorverdünnt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Berechnung der Standardkurve erfolgte mit der 4-Parameter-Hill-Formel.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den jeweiligen Proteinlysaten wurde ein BCA-Test durchgeführt. Dazu wurden auf einer 96-Well-Platte Duplikate eines BSA-Standards in Konzentrationen zwischen 0 und 2000 µg/ml pipettiert. Die Proben wurden 1:10 in RIPA-Lysepuffer verdünnt und in Triplikaten gemessen. Unter Verwendung von 200 µl Working Reagent (50 Teile Bicinchoninic Acid Solution und 1 Teil Kupfer-2-sulfat) wurde die Proteinmenge nach einer Inkubationszeit von 5 min photometrisch (OD₄₉₂) bestimmt.

2.4.2 Western Blot

RIPA-Lysepuffer

10 ml Ripa Buffer, 1 Tablette Complete, 1 Tablette PhosphoStop.

2x Laemmli

2,5 ml 0,5 M Tris HCL pH 6,8, 2 ml 10 % SDS, 0,2 ml 0,2 M EDTA, 3,1 ml H₂O, 2 ml 100 % Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, pro Milliliter 1 Spatelspitze DTT.

Western Blot-Gele

10 % Gel:	12 % Gel:	15 % Gel:
4,0 ml H ₂ O	3,3 ml H ₂ O	2,3 ml H ₂ O
3,3 ml 30 % Acrylamid-Mix	4,0 ml 30 % Acrylamid-Mix	5,0 ml 30 % Acrylamid-Mix
2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
0,1 ml 10 % SDS	0,1 ml 10 % SDS	0,1 ml 10 % SDS
0,1 ml 10 % APS	0,1 ml 10 % APS	0,1 ml 10 % APS
0,004 ml TEMED	0,004 ml TEMED	0,004 ml TEMED

Sammelgel

3,4 ml H₂O, 0,83 ml 30 % Acrylamid-Mix, 0,63 ml 1,0 M Tris (pH 6,8), 0,05 ml 10 % SDS, 0,05 ml 10 % APS, 0,005 ml TEMED.

Waschpuffer

9 Teile Millipore-H₂O, 1 Teil 10x PBS, 0,05 % Tween 20.

Detektionslösung

2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarin-Säure in DMSO, 0,1M Tris-HCl (pH 8,5).

Anodenpuffer A

18,2 g Tris, 100 ml MeOH, mit H₂O auf 500 ml auffüllen (pH 10,4).

Anodenpuffer B

1,5 g Tris, 100 ml MeOH, mit H₂O auf 500 ml auffüllen (pH 10,4).

Kathodenpuffer C

1,5 g Tris, 2,6 g 6-Aminohexansäure, 100 ml MeOH, mit H₂O auf 500 ml auffüllen (pH 9,4).

Für die Western Blot Analyse wurden die Proben mit RIPA-Lysepuffer so verdünnt, dass in jeder Probe eine einheitliche Proteinmenge (i.d.R. 30 µg) enthalten war. Außerdem wurde jeder Probe 2x Laemmli-Puffer hinzugefügt und die Proben bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proteine durch eine Gelelektrophorese in einem Acrylamidgel (je nach Versuchsanforderung 10-, 12-, oder 15 %) nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Die Stromstärke betrug 25 mA pro Gel für 20 min und danach 40 mA pro Gel für 40 min. Bei 80 mA pro Gel für 50 min erfolgte anschließend der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran.

Mit BSA oder Milchpulver, die jeweils 5 % ig in Waschpuffer angesetzt wurden, wurden für 1 h unspezifische Bindungsstellen blockiert. Die Primärantikörper wurden wiederum in BSA oder Milchpulver verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit 5 ml Detektionslösung, die mit 1,52 µl 30 % Wasserstoffperoxid versetzt wurde, behandelt, um die Proteinbanden durch Belichtung detektieren zu können. Wenn anschließend ein weiteres Protein auf die-

ser Membran nachgewiesen werden sollte, wurde sie für 20 min in 1x Re-Blot Plus Strong Solution gestrippt und die Schritte des Protokolls – beginnend mit dem Blocken – wiederholt.

Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit der Software BIO-1D.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

Bei HCT-116 Zellen handelt es sich um adhärenente humane Epithelzellen, die dem Kolonkarzinom eines erwachsenen Mannes entstammen [103]. HCT-116 exprimieren Wildtyp-p53 und -p73 [104].

Die Zelllinie U937 stammt aus einem histiozytischen Lymphom der Lunge eines Mannes [105]. Diese Monozyten sind Suspensionszellen und exprimieren TLR4 [106]. Die Zelllinie HEKblue-2 ist zurückzuführen auf die Zelllinie HEK-293. Dies sind adhärenente, epitheliale Zellen aus einer humanen fetalen Niere [107]. Zur Herstellung der HEKblue-2 wurden die HEK-293 mit TLR2 transfiziert [108].

Die Zelllinien HCT-116, HEKblue-2 und U937 wurden in Kulturmedium in 75 cm²- oder 175 cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ (HEKblue-2: 10 % CO₂) kultiviert. Dabei wurde für die HCT-116 McCoy's Medium, für die U937 RPMI und für die HEKblue-2 das Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) Selektionsmedium verwendet. Die Zellkulturmedien McCoy und RPMI wurden mit 10 % FCS versetzt. Für das Selektionsmedium der Zelllinie HEK-blue 2 wurde zu DMEM 10 % FCS, sowie 1x Selektin, 100 µg/ml Normocin und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert (HCT-116 1:10, U937 1:6, HEKblue-2 1:2). Dazu wurden die adhärenenten Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die HCT-116 mit 1x Trypsin/EDTA für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. HEKblue-2 Zellen wurden lediglich abgeklopft und erneut in Kulturmedium aufgenommen, um die gewünschte Menge in eine neue Kulturflasche zu überführen. Von der Suspensionszelllinie U937 wurde zum Splitten ein Teil der Population in ihrem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese mit frischem Medium aufgefüllt.

2.5.2 Zellernte

Um Proben für ELISA-Analysen zu gewinnen, wurde nach Ende der Kulturdauer das Medium der Zellkulturschalen abgenommen, bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und

je 1 ml des Überstands bei -20 °C gelagert. Die Zellkulturschalen wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 800 µl 1x PBS abgeschabt und in Eppendorf-Tubes überführt. Nach einer Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min wurden die Zellen in 900 µl 1x PBS re-suspendiert. Sollte in dem Versuchsansatz auch RNA isoliert werden, so wurde die Probe geteilt und es wurden 500 µl der Suspension in ein weiteres Eppendorf-Tube überführt. Diese Proben wurden zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden sie in 600 µl RLT-Buffer re-suspendiert, gevortext und bei -20 °C gelagert. Die zur Proteingewinnung bestimmten Proben wurden ebenfalls zentrifugiert und, nachdem der Überstand abgenommen wurde, in 350 µl RIPA-Lysepuffer re-suspendiert. Anschließend wurden sie für 1 h auf Eis inkubiert und dann für 1 h bei 13000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Trennung zytosolischer und mitochondrialer Fraktion

Zytosol-Extraktionspuffer

250 mM Saccharose, 70 mM KCl, 137 mM NaCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄ pH 7,2, 200 µg/ml Digitonin, pro 10 ml Puffer 1 Tablette Complete.

Mitochondrien-Lysepuffer

50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,2 % Triton X-100, 0,3 % NP-40, pro 10 ml Puffer 1 Tablette Complete.

Es wurden 10x10⁶ HCT-116 Zellen in 10 cm-Schalen für 2 d ausgesät. Diese wurden nun für 2 h oder 4 h mit *E. coli* der MOI 0 oder MOI 5 behandelt. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und zusammen mit ihrem Medium in Falcons überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 g für 5 min wurde der Überstand verworfen, 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer zu den Proben gegeben und diese auf Eis inkubiert. Die Permeabilisierung der Plasmamembran wurde dabei mit Trypanblaufärbung kontrolliert und bei ausreichendem Grad der Permeabilisierung folgte eine Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C für 5 min. Der Überstand, der nun die zytosolischen Anteile enthielt, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nachdem das entstandene Pellet in 1 ml Mitochondrien-Lysepuffer re-suspendiert worden war, wurde es bei 10000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dieser Überstand enthielt nun die mitochondrialen Anteile und wurde ebenfalls in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

2.5.4 Transwell-Experiment

Für das Transwell-Experiment wurden 6×10^5 Zellen der HCT-116 pro Well in 6-Wells mit Polycarbonat-Membranen ausgesät. Das Volumen betrug 2,5 ml. Nach 2 h Inkubation wurden die Filter eingesetzt und mit 1 ml Medium überschichtet. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die Ernte erfolgte am 6. Tag. Hierbei wurden die Bakterien entweder direkt mit den Zellen kultiviert (Ko-Kultur) oder durch eine semi-permeable Filtermembran getrennt von den Zellen für 4 h inkubiert.

2.5.5 Bakterien-Wirtszell-Interaktion von HCT-116 Zellen mit *E. coli*

Für die Ko-Kultur mit *E. coli* wurde für 6 Tage eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Anschließend wurden *E. coli* in einer MOI 0, MOI 1, MOI 5 oder MOI 10 für 2-4 h zugegeben.

Für die LPS-Stimulation wurden 5×10^6 Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Am 6. Tag wurden HCT-116 Zellen mit LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 1 µg/ml behandelt. PBS-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Inkubationszeit mit Stimulanzien betrug 2 oder 4 h.

Für die Nutlin-3-Stimulation wurden HCT-116 Zellen für 6 Tage in 10 cm-Schalen bei einer ursprünglichen Zellzahl von 5×10^6 Zellen ausgesät. Am Tag der Ernte wurde für 2 h mit Nutlin-3 in einer Endkonzentration von 10 µM behandelt. Das gleiche Volumen EtOH diente als Kontrolle. Anschließend wurde das Medium entfernt und *E. coli* in den Mengen MOI 0 und MOI 5 mit neuem Medium für weitere 2 h hinzugegeben.

2.5.6 Induktion der NOD-Rezeptoren

Für die Induktion einer (erhöhten) Expression von NOD-Rezeptoren wurden 5×10^6 HCT-116 in 10 cm-Schalen ausgesät. Am fünften Tag erfolgte die Behandlung mit 10 µg/ml iE-DAP oder iE-Lys sowie 100 ng/ml MDP, MDP-control oder TNF. iE-DAP und MDP dienten dabei als spezifische Induktoren von NOD1 bzw. NOD2; iE-Lys und MDP-control waren die jeweiligen Negativkontrollen.

2.5.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen

2.5.7.1 Nachweis der Oberflächenrezeptoren TLR2 und TLR4

Für die Analyse der Oberflächenrezeptoren wurden HCT-116 Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Zur Induktion erhöhter TLR2- bzw. TLR4-Spiegel wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 µg/ml LPS oder PMA bzw. den Lösungsmitteln PBS und EtOH als Kontrolle behandelt. Am zweiten Tag nach Aussaat wurden die Zellen ge-

erntet; die Zelllinien U937 und HEKblue-2 dienten als Positivkontrolle. 1×10^6 Zellen wurden für die Färbung verwendet. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm für 2 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 μ l 1x PBS mit 10 % FCS für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Es wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l Stain Buffer aufgenommen und der entsprechende Antikörper oder die Isotyp-Kontrolle zugegeben (vgl. 2.1.5). Die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Dann wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Zellen zu waschen, wurden sie in 500 μ l 1x PBS re-suspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 750 μ l Stain Buffer aufgenommen und in die FACS-Röhrchen pipettiert. Die Analyse der Zellen erfolgte am LSR Fortessa im Alexa Fluor 488- oder PE-Kanal.

2.5.7.2 Analyse des Zelltodes mittels AnnexinV- /DAPI-Färbung

Annexin Binding Buffer

2,38 g Hepes, 8,18 g NaCl, 0,32 g CaCl_2 , mit H_2O auf 1l auffüllen.

Um den Effekt von sezernierten Substanzen einer Bakterien-Zellen-Ko-Kultur zu untersuchen, wurden 1×10^6 HCT-116 Zellen für 6 d in 10 cm-Schalen ausgesät. Zwei dieser Schalen wurden für 4 h mit MOI 0 bzw. MOI 5 (*E. coli*) ko-kultiviert (vgl. Abbildung 3 A und B). Die Überstände dieser Schalen wurden abgenommen, steril filtriert und für weitere 4 h auf die Zellen in den übrigen Schalen gegeben. Die Filtergröße von 0,22 μ m garantierte dabei eine Abtrennung von lebenden Bakterien. Im Filtrat befanden sich stattdessen lösliche bakterielle und zelluläre Metabolite etc.

Die Ko-Kultur mit direktem Zellkontakt von HCT-116 Zellen und *E. coli* dienten als Positivkontrolle (vgl. Abbildung 3 E und F). Zwei weitere Schalen wurden mit den Überständen aus einer *E. coli*-Übernachtskultur vergleichsweise zu MOI 5 behandelt. Dazu wurde die Bakteriensuspension für 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert und anschließend entweder steril filtriert oder direkt auf die Zellen gegeben (vgl. Abbildung 3 C und D).

Nach der Inkubation wurde die AnnexinV/DAPI-Färbung wie folgt durchgeführt: Das Medium wurde von den Schalen abgenommen und in 50 ml-Falcons gesammelt. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, welches dann ebenfalls zum Medium in den Falcons hinzugefügt wurde.

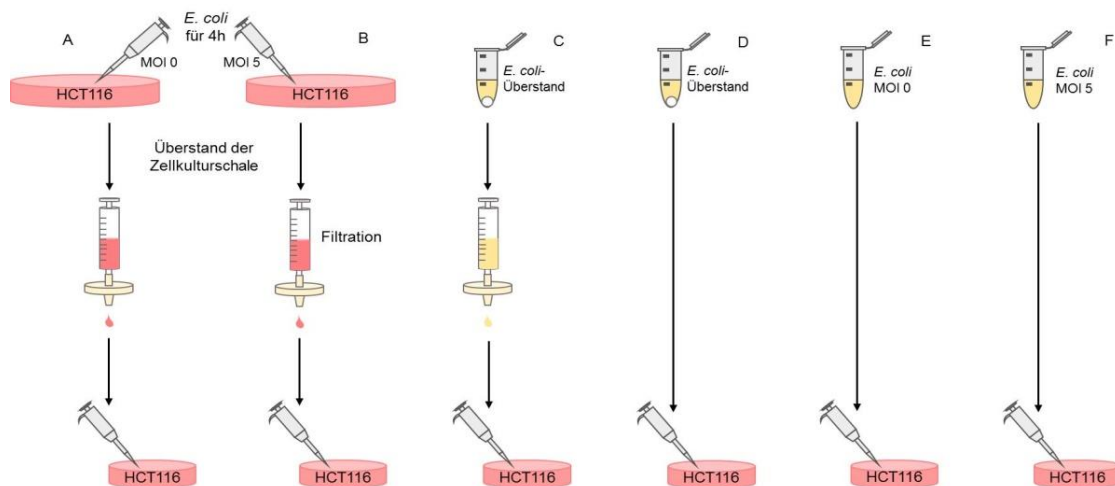


Abbildung 3: Schaubild zur Stimulation der HCT-116

Nun wurden die Schalen mit je 2 ml Trypsin/EDTA für wenige Minuten behandelt, die proteolytische Wirkung mit Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellen vorsichtig abgespült und in das jeweilige Falcon überführt. Anschließend wurde bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml Annexin Binding Buffer re-suspendiert. Für die Färbung wurden je 1×10^6 Zellen in je 10 μ l AnnexinV und DAPI (DAPI wurde 1:100 in PBS mit Ca^{2+} vorverdünnt) verwendet und diese für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben mit 1 ml Annexin Binding Buffer verdünnt und in die FACS-Röhrchen überführt. Dann erfolgte die Analyse am LSR Fortessa im Pacific Blue- und APC-Kanal bzw. im FSC/SSC.

Als Positivkontrolle einer apoptotischen Zelltodinduktion dienten mit Panobinostat (\pm zVAD-FMK) behandelte HCT-116 Zellen. Die Stimulation erfolgte hierbei für 48 h. Sollte nur eine Aussage über die Viabilität der Zellen getroffen werden, so wurde eine Färbung mit DAPI durchgeführt. Dazu wurden vom vorverdünnten DAPI jeweils 5 μ l direkt ins Medium gegeben. Der Überstand wurde nach einer Inkubationszeit von 10 min in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS mit Ca^{2+} gespült und dieses ebenfalls in das Falcon pipettiert. Dann wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin abgelöst, in 2 ml Medium suspendiert und in ein weiteres Falcon gegeben. Beide Falcons wurden bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen. Die Zellen wurden in PBS mit Ca^{2+} aufgenommen und jeweils die Proben aus den zwei zusammengehörigen Falcons wurden in einem FACS-Röhrchen vereint. Die Analyse der Zellen erfolgte am LSR Fortessa im Pacific Blue-Kanal.

Der spezifische Zelltod wurde anhand folgender Formel ermittelt: Spezifischer Zelltod in % = (Zelltodrate der behandelten Zellen in % - Zelltodrate der Kontrollbedingung in %) / (100 - Zelltodrate der Kontrollbedingung in %)

2.5.7.3 TMRE-Färbung

In einem Vorversuch mit Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl-hydrazone (CCCP) wurde eine Konzentration von 25 μM tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate (TMRE) festgesetzt. Die HCT-116 Zellen wurden für 2 d in 10 cm-Schalen ausgesät, anschließend wurde mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin abgelöst und in PBS/FCS aufgenommen. Nun wurden 1×10^6 Zellen für 30 min mit 25 μM TMRE gefärbt. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in 500 μl PBS/FCS resuspendiert und in die FACS-Röhrchen gegeben. Die Analyse der Zellen erfolgte am LSR Fortessa im FITC-Kanal.

2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Resultate wurde Microsoft Excel 2010 verwendet. Zur Auswertung wurde der Student's t-Test durchgeführt. Es wurde jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des *in vitro*-Zellmodells

3.1.1 Ko-Kultivierung von Bakterien und Darmepithelzellen führt zur Sekretion entzündlicher Zytokine

Der direkte Kontakt von Bakterien und Wirtszellen kann Entzündungsreaktionen auslösen. Dabei sekretieren die Wirtszellen inflammatorische Zytokine, die Immunzellen aktivieren. In unseren Vorarbeiten haben wir gezeigt, dass infolge einer Leberzirrhose die Mukusschicht im Darm reduziert vorliegt und ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen möglich ist [29]. Um zu klären, ob Darmepithelzellen auf Inkubation mit Bakterien mit einer erhöhten Produktion entzündlicher Zytokine reagieren, wurden die Überstände von Zellen, die mit *E. coli* behandelt wurden, in einem ELISA auf IL-1 β , IL-6 und IL-8 Sekretion untersucht. IL-1 β war in den Überständen nicht nachweisbar (nicht gezeigt), wohingegen HCT-116 Zellen als Reaktion auf die Inkubation mit Bakterien IL-6 und IL-8 ausschütteten. Hierbei beobachteten wir eine deutliche IL-8 und eine schwächere IL-6 Sekretion. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 100 ng/ml TNF stimuliert.

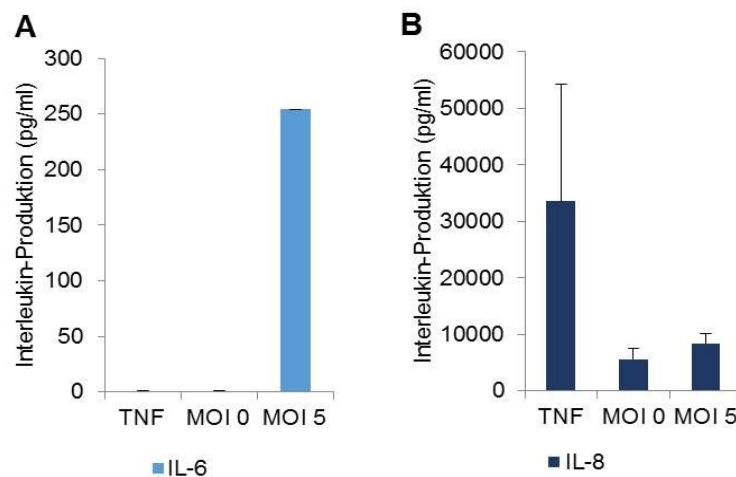


Abbildung 4: HCT-116 produzieren IL-6 und IL-8. ELISA-Analyse der Zellkultur-Überstände von HCT-116 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml TNF bzw. *E. coli* (MOI 0 und MOI 5) für 2 h. Für IL-6 (A) ist jeweils ein exemplarisches Experiment dargestellt, für IL-8 (B) gilt n=3.

3.1.2 HCT-116 tragen die Rezeptoren NOD1 und NOD2

Um zu klären, über welchen Signalweg die Sekretion von IL-6 und IL-8 induziert wird, wurde die Anwesenheit der Oberflächenrezeptoren TLR2 und TLR4 überprüft. TLR gehören zu den PRR, die Pathogene anhand ihrer PAMPs (*pathogen-associated*

molecular patterns) erkennen. Sie spielen damit eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und regulieren die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. TLR4 erkennt dabei speziell LPS von Gram-negativen Bakterien [109]. TLR2 erkennt ebenfalls LPS, aber zusätzlich auch den bakteriellen Bestandteil Peptidoglykan [110].

Um eine Expression der TLR-Rezeptoren zu induzieren, wurden die Zellen mit den Liganden LPS und PMA stimuliert [111]. Als Positivkontrolle dienten die Zellen U937 und HEKblue-2, da diese bereits ohne Stimulation die Rezeptoren TLR2 bzw. TLR4 auf ihrer Zelloberfläche aufweisen [106,108]. Während die Kontrollzellen ein deutliches Signal für die Oberflächenrezeptoren TLR2 bzw. TLR4 aufwiesen, war ein Nachweis dieser Proteine bei HCT-116 Zellen nicht möglich (Abbildung 5 A). Im Western Blot zeigte sich in An- und Abwesenheit des TLR-Liganden LPS kein Hinweis auf eine Expression der Proteine TLR2 und TLR4 (Abbildung 5 B).

Eine weitere Möglichkeit für die Induktion von IL-6 und IL-8 sind die NOD-like-Rezeptoren NOD1 und NOD2. Auch sie gehören zu den PRR und erkennen Peptidoglykane Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien [112]. Um das Vorhandensein dieser intrazellulären Rezeptoren zu untersuchen, wurden HCT-116 mit verschiedenen Aktivator (TNF, MDP und iE-DAP) und Kontrollsubstanzen (MDP-control und iE-Lys) sowie mit *E. coli* ko-kultiviert. HT-29 Zellen dienten als Kontrollzelllinie für NOD-Expression. Im Western Blot zeigte sich, dass HCT-116 Zellen sowohl NOD1 als auch NOD2 exprimieren, aber keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in der Proteinmenge durch eine Behandlung mit Bakterien oder Aktivator hervorgerufen wurden (Abbildung 6). Auch in der qPCR ließ sich eine Expression der NOD1- und NOD2-Gene nachweisen, allerdings wurde keine Regulation der Genexpression nach Behandlung mit *E. coli* oder den Liganden beobachtet (nicht gezeigt).

HCT-116 Zellen weisen sowohl NOD1- als auch NOD2-Rezeptoren auf. Daher ist davon auszugehen, dass die IL-6 und IL-8 Sekretion nach Ko-Kultivierung mit Bakterien über diesen Signalweg induziert wird.

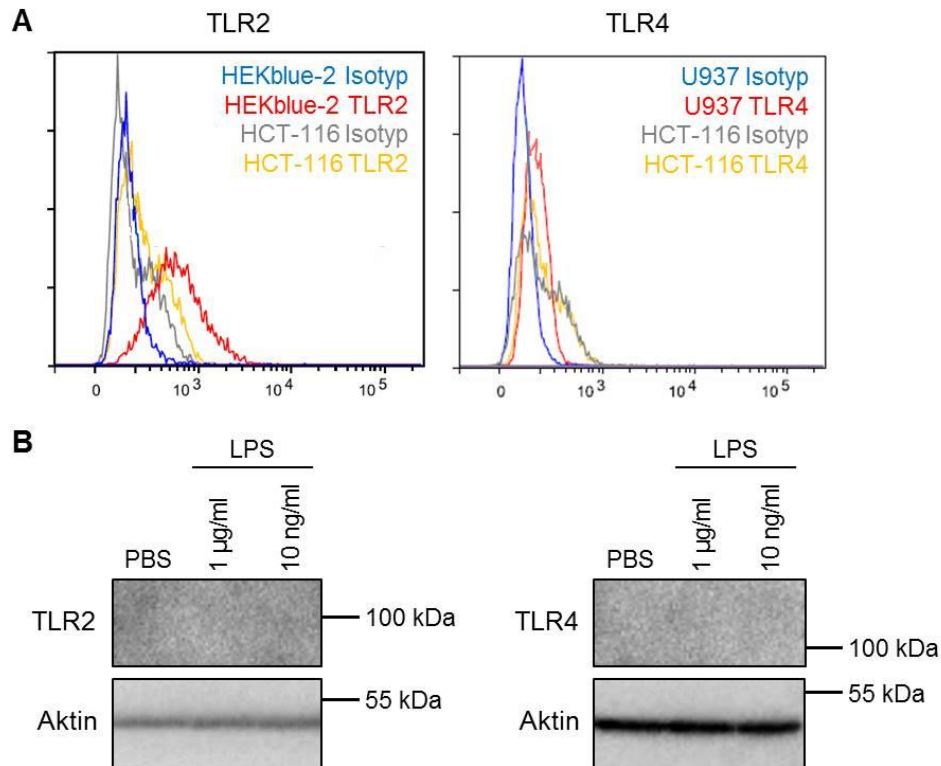


Abbildung 5: Untersuchung von TLR2 und TLR4 auf HCT-116 Zellen. Die gezeigten Daten sind jeweils repräsentativ für drei unabhängige Experimente. A) Durchflusszytometrische Untersuchung von HCT-116 nach Behandlung mit 10 µg/ml LPS oder PMA für 24 h (gelbe Linien). U937 und HEKblue-2 (rote Linien) dienen als Positivkontrolle ohne vorhergehende Stimulation. Die Bedingung „Isotyp“ diente jeweils als Negativkontrolle (blaue bzw. graue Linien). B) Analyse von Proteinlysaten von HCT-116 Zellen nach Stimulation mit LPS für 4 h. PBS diente als Negativkontrolle.

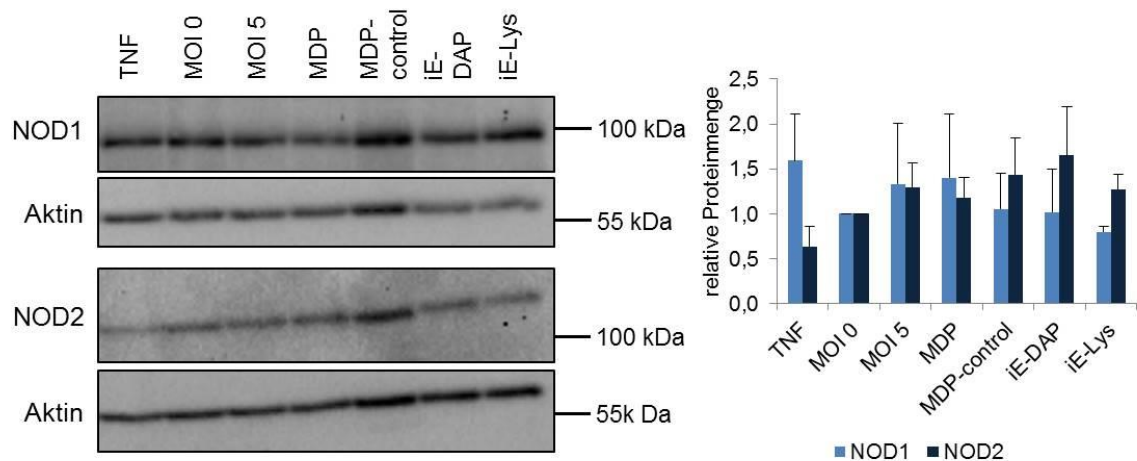


Abbildung 6: HCT-116 Zellen bilden NOD1 und NOD2 Rezeptoren. Western Blot-Analyse von Proteinlysaten. Die relative Proteinmenge von NOD1 und NOD2 wurde durch verschiedene Stimulanzen (100ng/ml TNF, MOI 5 *E. coli*, 100 ng/ml MDP und 10 µg/ml iE-DAP) nicht signifikant beeinflusst. MOI 0 *E. coli*, 100 ng/ml MDP-control und 10 µg/ml iE-Lys stellten jeweils die Negativkontrollen dar. Die bakterielle Stimulation erfolgte für 2 h, die übrigen Stimulanzen wurden über Nacht mit den Darmepithelzellen inkubiert (n=3).

3.2 Regulation der p53-Familie durch Bakterieninteraktion in Darmepithelzellen

3.2.1 *E. coli* reduzieren die Proteinspiegel von p53-Proteinen

Die bakterielle Translokation stellt einen essenziellen Faktor während der Entstehung einer SBP dar. Um die Pathomechanismen dieser Erkrankung und hierbei besonders die Interaktion zwischen Darmepithelzellen und Bakterien zu untersuchen, verwendeten wir ein *in vitro*-Modell aus HCT-116 Zellen und *E. coli*. p53 spielt eine wichtige Rolle bei bakteriellen Infektionen, so können bestimmte Bakterien die zellulären p53-Spiegel beeinflussen, um dadurch ihr eigenes Überleben zu verlängern [44]. Zusätzlich kann p53 als Protein der zellulären Stressantwort aber auch eine wichtige Rolle bei Abwehrmechanismen der Zellen gegen Infektionen spielen. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, wie sich bakterielle Reize auf die Regulation der p53-Familie auswirken. Wir konzentrierten uns dabei auf die Proteinspiegel von p53 und p73. Hierzu wurden HCT-116 Zellen für 2 oder 4 h mit *E. coli* verschiedener MOI sowie mit hitzeinaktivierten *E. coli* (HI) ko-kultiviert und die intrazellulären Mengen von p53 und p73 bestimmt. Die Ko-Inkubation von HCT-116 Zellen mit *E. coli* führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme der Proteinspiegel von p53 und p73. Hitzeinaktivierte Bakterien (HI) dienten in allen Experimenten als Negativkontrolle und zeigten keine Reduktion von p53 und p73 (Abbildung 7). Auf mRNA-Ebene zeigten sich keine vergleichbaren Effekte in der reduzierenden Wirkung der Bakterien auf die TP53- und TP73-mRNA (nicht gezeigt).

3.2.2 p53 wird auf posttranslationaler Ebene durch MDM-2 reguliert

Nachdem *E. coli* reduzierende Effekte auf die p53-Familie bei Ko-Kultur mit HCT-116 Zellen zeigte, haben wir die Mechanismen, die für diese Herunterregulation verantwortlich sein können, weiter untersucht. Unter physiologischen Bedingungen ist die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 für die Ubiquitinierung von p53 und p73 verantwortlich. Die Ubiquitinierung markiert die Proteine für den Abbau durch das Proteasom und trägt so dazu bei, die Mengen an p53 und p73 in der Zelle niedrig zu halten [41,42]. Da wir in Gegenwart von Bakterien eine Reduktion von p53-Proteinen in Darmepithelzellen beobachtet haben, haben wir im nächsten Schritt untersucht, ob diese Regulation über einen MDM2-abhängigen Mechanismus erfolgt. Zunächst wurde daher die Phosphorylierung von MDM2 nach bakterieller Ko-Kultur analysiert. Die Ge-

genwart von Bakterien führte zu einer deutlichen Phosphorylierung und somit Aktivierung von MDM2 (p-MDM2) (Abbildung 8 A).

Um zu ermitteln, ob die bakteriell induzierte Herunterregulation von p53 und p73 darauf beruht, dass die Bakterien MDM2 aktivieren, wurden die Zellen zunächst für 2 h mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3 behandelt und anschließend für 2 h mit *E. coli* stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass eine Vorbehandlung mit 10 μ M Nutlin-3 die Gesamtmenge an p53 und p73 deutlich stabilisiert und so die bakterielle Herunterregulation von p53 und p73 verhindert (Abbildung 8 B). Die Ergebnisse zeigen, dass der Abbau von p53 und p73 in HCT-116 Zellen nach Ko-Inkubation mit *E. coli* über MDM2 vermittelt wird.

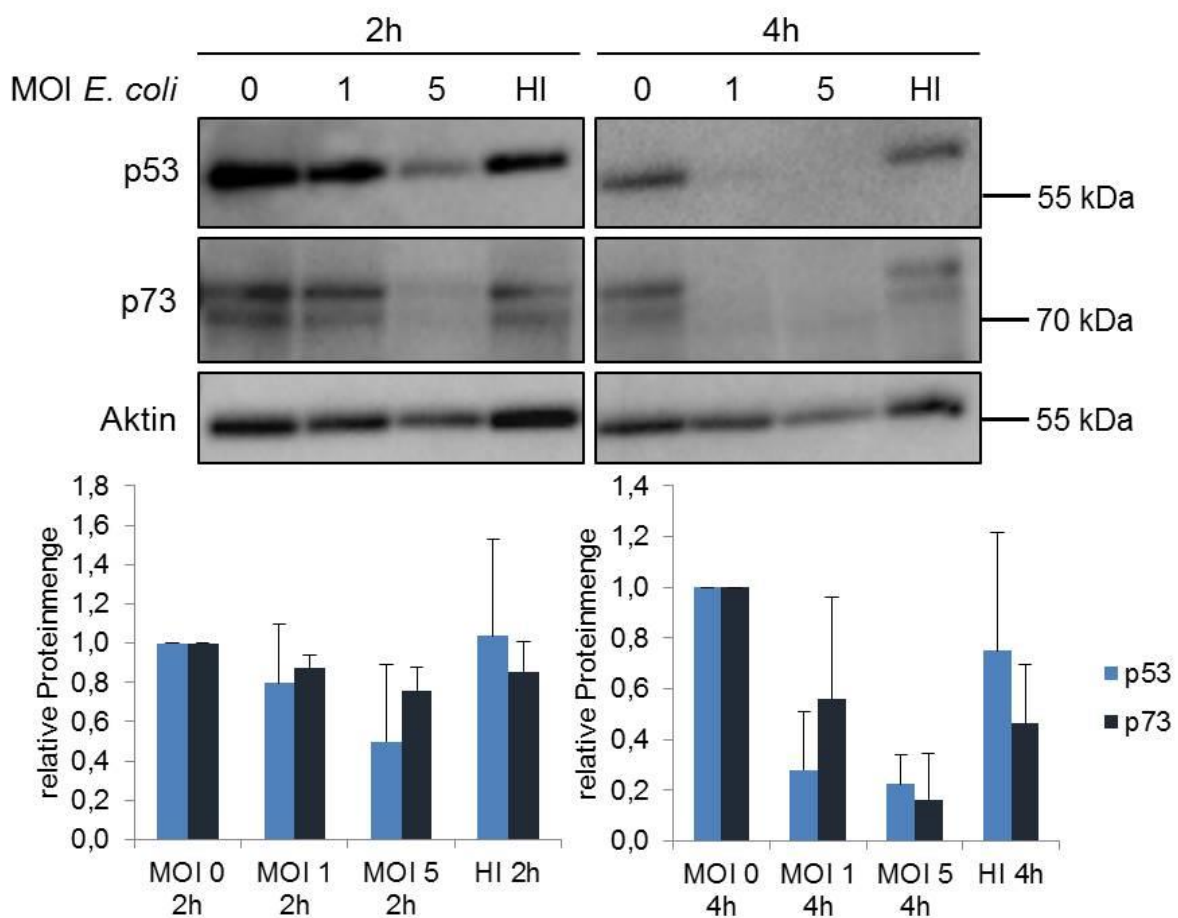


Abbildung 7: Zeit- und dosisabhängige Reduktion von p53 und p73 Protein durch Ko-Inkubation mit *E. coli*. Analyse der Proteinlysate von HCT-116 Zellen mittels Western Blot und ihre densitometrische Auswertung nach Stimulation mit *E. coli* verschiedener MOI über 2 und 4 h. Hitzeinaktivierte Bakterien (HI) dienten als Negativkontrolle. Unter dem Western Blot sind die densitometrischen Analysen für drei unabhängige Experimente als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

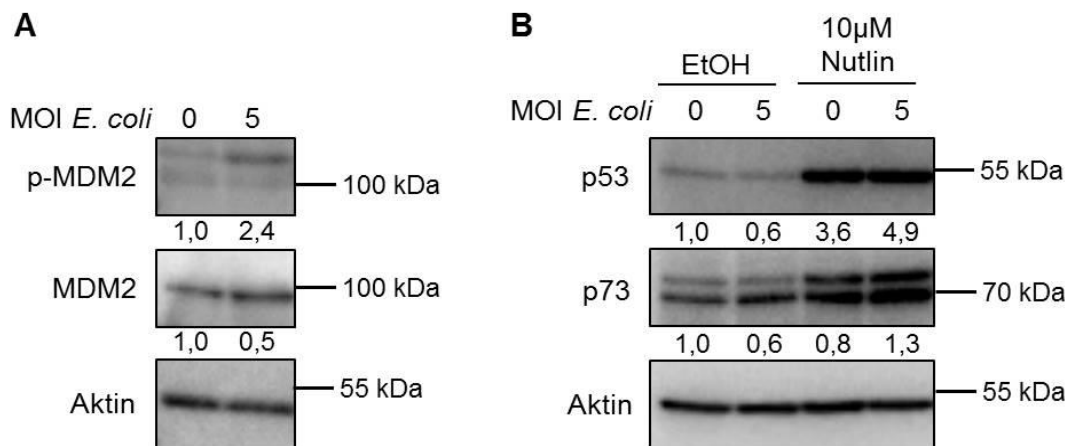


Abbildung 8: Nutlin-3 hemmt die p53- und p73-Degradation in HCT-116 Zellen. A) Der Western Blot zeigt exemplarisch die Zunahme von aktiviertem p-MDM2 durch bakterielle Stimulation für 2 h. B) Exemplarischer Western Blot von HCT-116 Proteinlysaten nach zweistündiger Inkubation mit Nutlin-3 und anschließender bakterieller Stimulation für weitere 2 h. Ethanol (EtOH) als Lösungsmittel diente als Kontrolle. Unter allen Blots ist das Ergebnis der densitometrischen Auswertung angegeben.

3.2.3 LPS induziert eine p53-Degradation

Es ist beschrieben, dass LPS bei Makrophagen zu einer Reduktion von p53 führt [47]. Da das Bakterium *E. coli* in den Darmepithelzellen HCT-116 in der Lage ist, den p53-Spiegel zu beeinflussen, wollten wir herausfinden, ob der Bakterienbestandteil LPS allein ähnliche Effekte vermitteln kann. Dazu wurden die Zellen für 2-4 h mit *E. coli*-LPS behandelt. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Konzentration von 10 ng/ml nach Stimulation für 2 h eine leichte, transiente Abnahme der Proteinmenge von p53 bewirkt (Abbildung 9). Da die LPS-induzierte p53 Abnahme deutlich niedriger ist als die in Abbildung 7 gezeigte bakteriell-induzierte p53-Depletion, ist von zusätzlichen Bakterien-inhärenten Regulationsmechanismen der p53-Spiegel auszugehen.

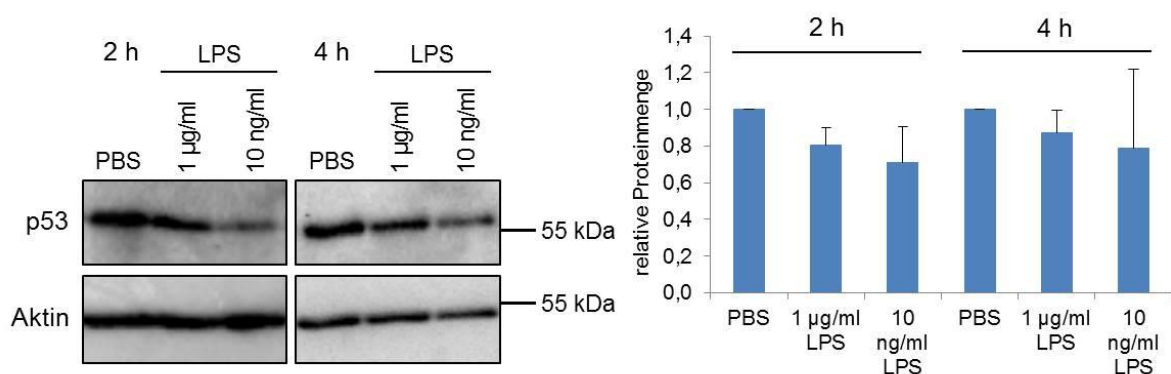


Abbildung 9: LPS-induzierte Degradation von p53 in HCT-116 Zellen in der Western Blot-Analyse. PBS diente als Negativkontrolle. Links ist ein repräsentativer Western Blot gezeigt. Rechts ist die rela-

tive Proteinmenge bei unterschiedlichen Kultur-Bedingungen als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.2.4 Eine direkte Interaktion von Bakterien und Epithelzellen ist essenziell für die Reduktion von p53-Familienmitgliedern

Um zu untersuchen, ob neben LPS weitere lösliche Bakterienbestandteile bei der Reduktion von p53 und p73 involviert sind oder ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle vorliegen muss, haben wir ein Transwell-Experiment durchgeführt.

In einem Ko-Kultivierungsansatz wurden HCT-116 Zellen und *E. coli* für 4 h zusammen in einer Kammer kultiviert, sodass ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Epithelzellen möglich war. Diese Versuchsbedingungen führten zu einer Reduktion der p53- und p73-Spiegel. In einem parallel durchgeführten Ansatz waren Bakterien und Epithelzellen durch eine semi-permeable Membran (Transwell) getrennt. Ohne direkten Kontakt zwischen Epithelzellen und *E. coli* Bakterien blieben die Proteinmengen von p53 und p73 konstant (Abbildung 10). Diese Daten belegen, dass für die bakteriell-induzierte Reduktion von p53- und p73-Proteinen in HCT-116 Zellen ein direkter Kontakt zwischen HCT-116 Zellen und *E. coli* notwendig ist.

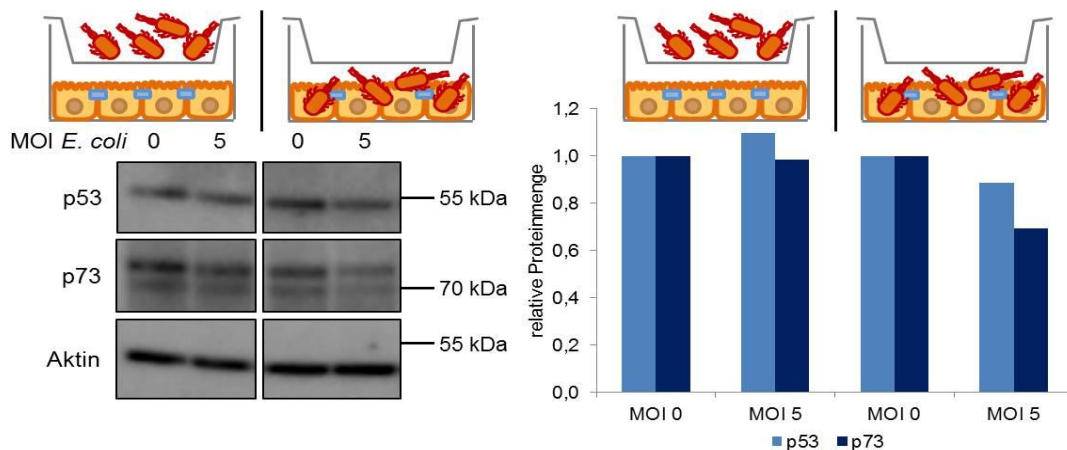


Abbildung 10: Notwendigkeit des direkten Kontaktes zwischen *E. coli* und HCT-116 Zellen für reduzierende Effekte auf p53 und p73. Hier wurde ein Transwell-Experiment durchgeführt. Dabei wurden HCT-116 Zellen und *E. coli* bei der Inkubation für 4 h durch eine semi-permeable Membran getrennt kultiviert (siehe linke Hälfte des oben dargestellten exemplarischen Western Blots und Diagramms). Als Positivkontrolle wurden HCT-116 Zellen mit *E. coli* ko-kultiviert (siehe rechte Hälfte des oben dargestellten exemplarischen Western Blots und Diagramms). Nur bei direktem Kontakt von Epithelzellen und *E. coli* erfolgt eine Reduktion von p53- und p73-Proteinen, das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des exemplarisch dargestellten Western Blots.

3.3 Bakterien induzieren Zelltod bei Interaktion mit Darmepithelzellen

3.3.1 *E. coli*-induzierter Zelltod in HCT-116 Zellen

Bei Ko-Inkubation von HCT-116 Zellen mit *E. coli* trat eine deutliche Zunahme des Zelltodes auf. Daher untersuchten wir, welche Art des Zelltodes durch die bakterielle Ko-Kultur induziert wird. Dazu wurden HCT-116 Zellen für 2-4 h mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli* Bakterien (MOI 0 bis MOI 10) behandelt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote Zellen werden kleiner und weisen eine höhere Granularität auf und können so durchflusszytometrisch bestimmt werden. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet. Da er intakte Zellmembranen nicht durchdringt, färbt er nur tote Zellen mit geschädigter Plasmamembran an (Abbildung 11 B und D, rot umrandet) [113].

Die Ko-Kultivierung von Bakterien und HCT-116 Zellen führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion von Zelltod (Abbildung 11, lebendige Anteile der Zellpopulation grün umrandet, tote Zellen rot umrandet). Hitzeinaktivierte Bakterien sowie *E. coli* LPS lösten dagegen keinen Zelltod aus (nicht gezeigt).

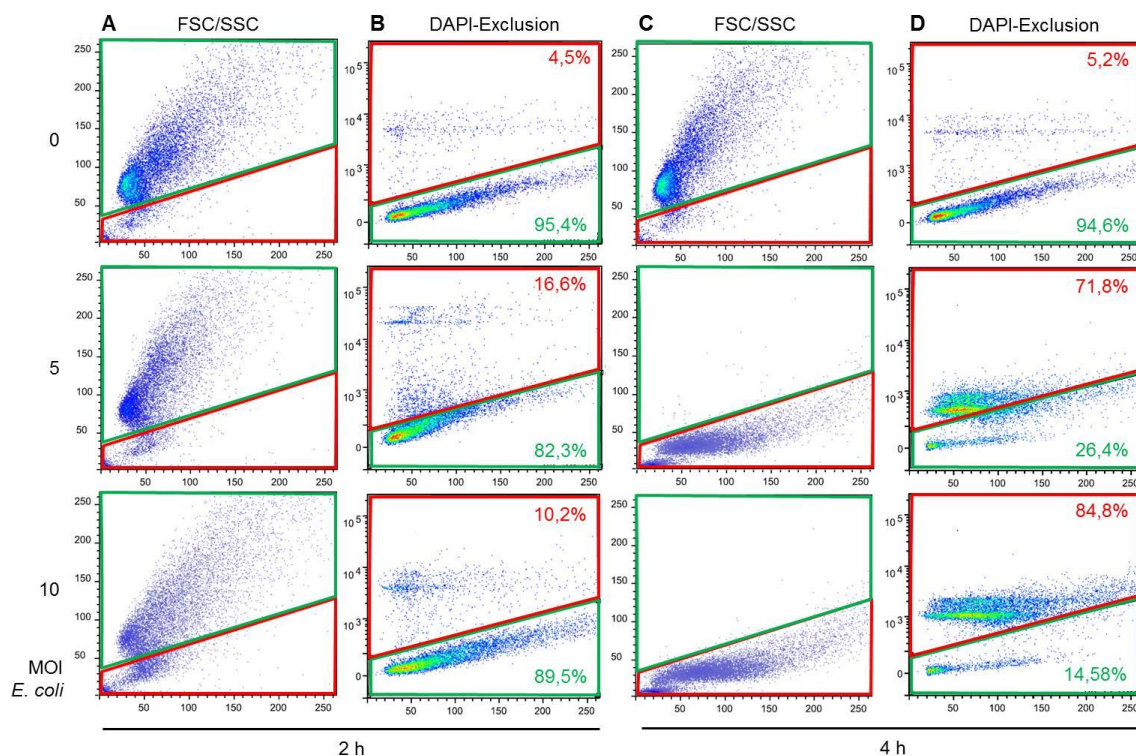


Abbildung 11: Zeit- und dosisabhängige Zelltod-Induktion durch *E. coli* in HCT-116 Zellen. FACS-Analyse der HCT-116 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen MOI für 2 h (A und B) oder 4 h (C und D). Die lebendige HCT-116 Population ist mit grün umrandet dargestellt, tote Zellen dagegen mit rot umrandet. Für jede untersuchte Bedingung ist jeweils ein exemplarischer FACS-Plot in der FSC/SSC-Ansicht (A und C) und in der DAPI-Exklusion (B und D) dargestellt. Für die DAPI-Exklusion

ist jeweils der Anteil der vitalen und toten Zellen an der Gesamtpopulation zu jedem Plot angegeben. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.3.2 Der bakteriell-induzierte Zelltod erfordert einen direkten Kontakt zwischen Bakterien und HCT-116 Zellen

Um zu untersuchen, ob in Analogie zur Regulation von p53 ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Epithelzelle für die Zelltod-Induktion erforderlich ist, wurden *E. coli* zunächst für 4 h mit Darmepithelzellen ko-kultiviert. Der Überstand mit bakteriellen / zellulären Bestandteilen wurde filtriert, um vitale *E. coli* Bakterien abzutrennen. Das erhaltene Filtrat wurde anschließend zur Inkubation mit naiven HCT-116 Zellen verwendet. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit intakten Bakterien und mit Bakterien-Überstand ohne vorherigen Zellkontakt behandelt (Schema des Versuchs siehe Abbildung 3). Übereinstimmend mit den Vorergebnissen (siehe 3.3.1) führte die Ko-Inkubation mit *E. coli* zu einer durchschnittlichen Zelltodrate von 79% (n=3). Filtrierte Überstände von Bakterien / HCT-116-Ko-Kulturen resultierten in Zelltodraten von durchschnittlich 33%, wohingegen die bakteriellen Überstände alleine ohne vorherigen Kontakt zu HCT-116-Zellen nur sehr geringe Zelltodraten von maximal 9% induzierten (Abbildung 12).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass für den Zelltod-induzierenden Effekt von Bakterien auf HCT-116 Zellen ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Darmepithelzellen essenziell ist. Dieser Kontakt induziert die Bildung bakterieller / zellulärer Mediatoren, die zur Induktion des Zelltodes beitragen.

3.3.3 *E. coli* löst in HCT-116 Zellen einen Caspase-unabhängigen Zelltod aus

In einem nächsten Schritt untersuchten wir, welche Art des Zelltodes bei der Behandlung von Darmepithelzellen mit *E. coli* auftritt. Da die bakterielle Inkubation Einfluss auf die p53-Spiegel zeigte, konzentrierten wir uns zunächst auf die Apoptose. Caspase 3 ist als Effektor-Caspase der Apoptose, ebenso wie PARP, das von Caspase 3 gespalten wird, ein guter Marker für den Nachweis einer Apoptose-Induktion. In HCT-116 Zellen waren nach zweistündiger Ko-Kultur mit *E. coli* im Western Blot keine Veränderung der Proteinmengen von Caspase 3 und insbesondere keine Bildung von cleaved-Caspase 3 zu beobachten. Auch eine Spaltung von PARP fand nicht statt (Abbildung 13).

Wir analysierten den Zelltod durchflusszytometrisch. Dazu wurde vor bakterieller Stimulation der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-FMK zugegeben, um so eine möglich-

erweise auftretende Apoptose zu hemmen. Auch in Gegenwart von zVAD-FMK blieb der durch *E. coli* induzierte Zelltod unverändert (vgl. 3.3.4).

Ein wesentlicher Faktor bei der Apoptose ist zudem die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytosol (vgl. 1.3). Um zu untersuchen, ob durch die bakterielle Stimulation mitochondriale Schäden induziert werden und auf diesem Weg Apoptose ausgelöst wird, wurden nach Behandlung der HCT-116 Zellen mit *E. coli* für 2-4 h die mitochondriale und zytosolische Fraktion der Zelllysate voneinander getrennt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Die Proteine *translocase of inner mitochondrial membrane 23* (TIM23) und *translocase of outer mitochondrial membrane 20* (TOM20) sind entscheidend für den Transport von Proteinen aus dem Zytosol der Zelle ins Innere des Mitochondriums. TOM20 sitzt dabei in der äußeren Mitochondrienmembran, TIM23 in der inneren [114]. Passend dazu konnte in der mitochondrialen Fraktion der HCT-116 Zellen TIM23 und TOM20 detektiert werden, in der zytosolischen dagegen nicht, was auf eine gute Trennung der beiden Fraktionen hindeutet. Cytochrom C fungiert als Elektronentransporter im Intermembranraum zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Wird Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt, so kann dies Apoptose auslösen (vgl. 1.3) [115]. Cytochrom C konnte deutlich in der mitochondrialen Fraktion von HCT-116 Zellen nachgewiesen werden. In sehr geringer Menge trat Cytochrom C nach bakterieller Behandlung auch in der zytosolischen Fraktion der HCT-116 Zellen auf (Abbildung 13).

Dass HCT-116 Zellen grundsätzlich Apoptose einleiten können, zeigen die Daten der Positivkontrolle: für die Apoptoseinduktion wurden HCT-116 Zellen für 48 h mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat behandelt. Diese Stimulation führte zu Zelltodraten von bis zu 86%. Der durch Panobinostat ausgelöste Zelltod war in Gegenwart von zVAD-FMK signifikant vermindert (Zelltod-Rate von 36%; $p=0.03$) (Abbildung 14) [116]. Dies zeigt, dass HCT-116 Zellen in der Lage sind, Apoptose einzuleiten z.B. nach Behandlung mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Der durch *E. coli* induzierte Zelltod zeigt allerdings keine Eigenschaften klassischer Apoptose. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass durch den Kontakt von *E. coli* mit Darmepithelzellen ein Caspase-unabhängiger Zelltod induziert wird. Somit kann Apoptose als Form des hier vorliegenden Zelltodes ausgeschlossen werden.

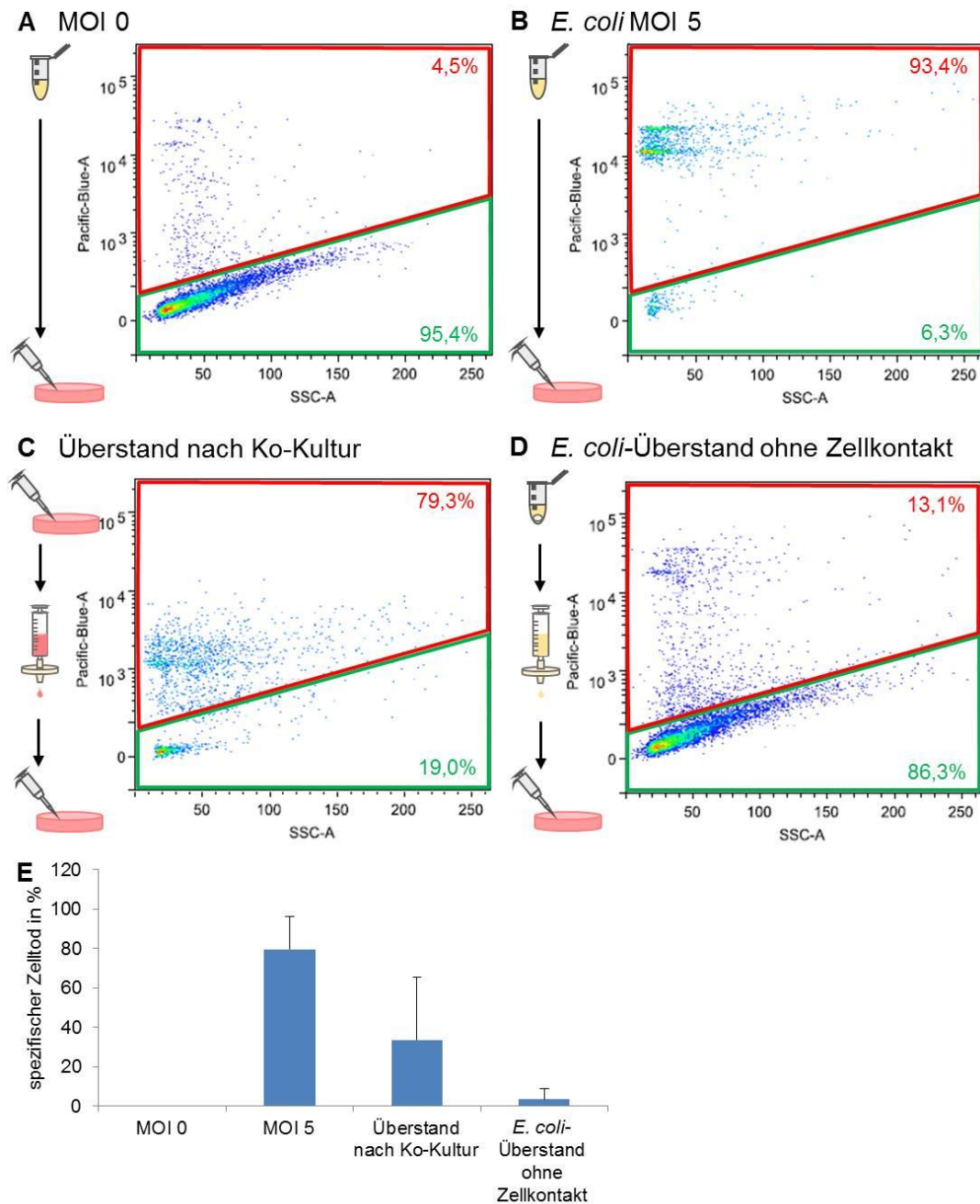


Abbildung 12: Induktion des Zelltodes durch lösliche Mediatoren nach Kontakt zwischen HCT-116 Zellen und *E. coli*. Die vitale Population ist jeweils mit grün umrandet, die toten Zellen mit rot. A) FACS-Plot der Kontrollbedingung MOI 0. HCT-116 wurden für 4 h stimuliert. B) Durch vierstündige Behandlung mit *E. coli* MOI 5 wurde in HCT-116 Zellen Zelltod ausgelöst. C) Lösliche zelluläre oder bakterielle Bestandteile, die bei der Ko-Kultur von HCT-116 und *E. coli* über 4 h gebildet wurden, lösten in naiven HCT-116 Zellen nach erneuter Behandlung über 4 h ebenfalls Zelltod aus. D) Überstände aus einer *E. coli*-Übernachtkultur ohne vorherigen Zellkontakt lösten durch vierstündige Stimulation keinen vermehrten Zelltod aus. A) - D) zeigen exemplarische FACS-Plots mit den zugehörigen prozentualen Anteilen der vitalen (grün) und toten (rot) Zellen an der Population. Die Differenzierung der Zellen erfolgte mittels DAPI-Exklusion. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. E) zeigt die statistische Auswertung des spezifischen Zelltodes (n=3).

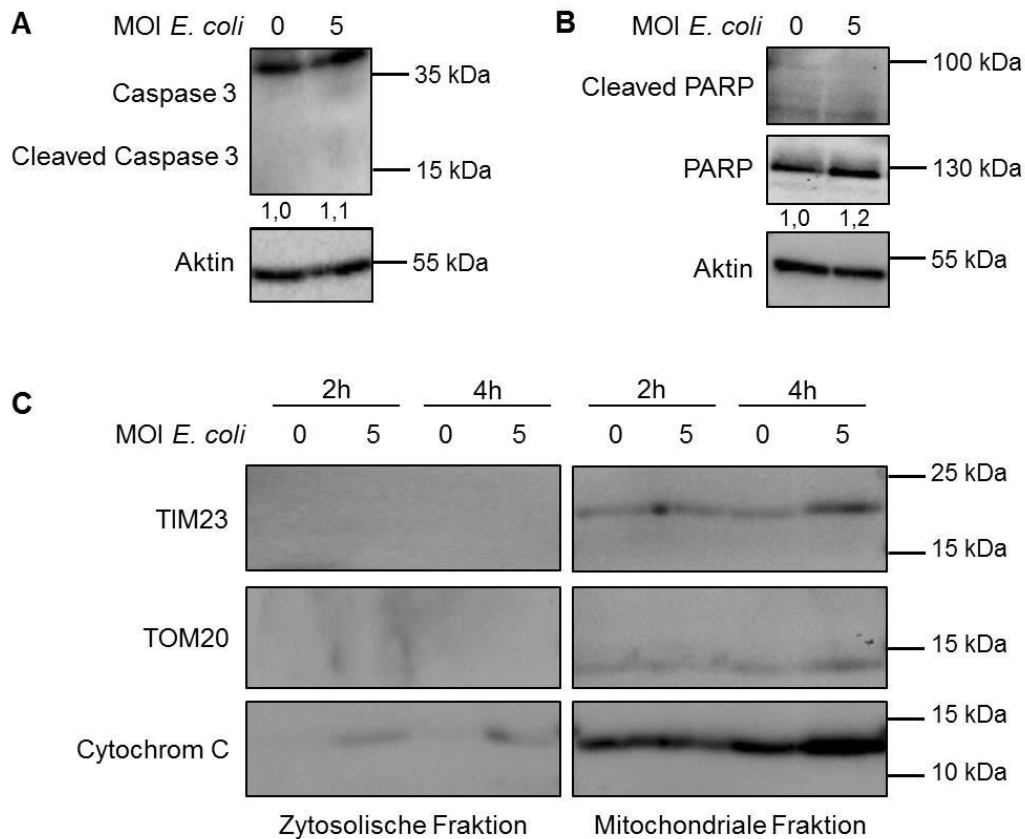


Abbildung 13: Apoptose-unabhängiger Zelltod nach Bakterien-Ko-Kultur von HCT-116 Zellen. A und B) Gezeigt sind die Western Blot-Analysen und jeweils die exemplarischen densitometrischen Auswertungen unter den Blots für HCT-116 Zellen nach zweistündiger Ko-Kultur mit *E. coli* MOI 0 bzw. MOI 5. Untersucht wurden als Apoptosemarker A) die Effektor-Caspase-3 (cleaved und full-length) und B) ihr Substrat PARP (cleaved und full-length). C) Zudem wurde das Auftreten eines Cytochrom C-Release ins Zytosol nach bakterieller Stimulation von HCT-116 Zellen untersucht. Dafür wurden nach Stimulation mit *E. coli* für 2 bis 4 h die mitochondriale und zytosolische Fraktion voneinander getrennt. Die Proteine TIM23 und TOM20 aus der Mitochondrienmembran dienten dabei als Kontrolle für die Aufreinigung. Darstellung eines exemplarischen Western Blots, dieser ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

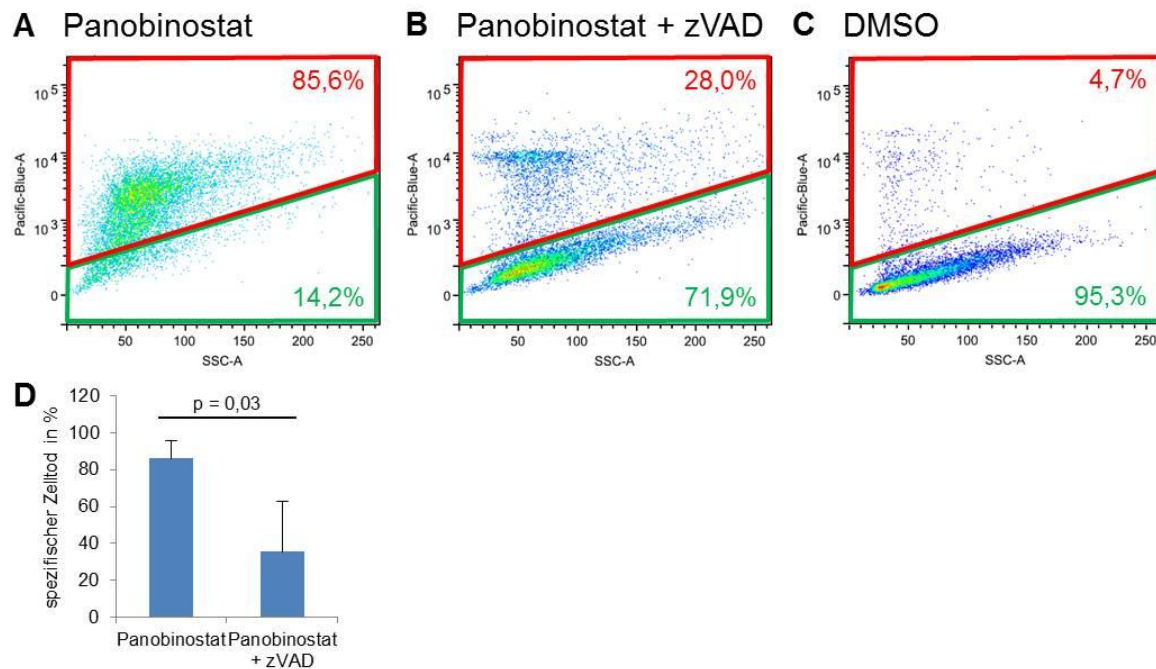


Abbildung 14: Panobinostat löst Apoptose in HCT-116 Zellen aus. Die lebendige Population ist jeweils grün umrandet, die avitalen Anteile rot. Zudem sind die prozentualen Anteile der avitalen und vitalen Zellen an der Gesamtpopulation für den hier gezeigten exemplarischen Plot angegeben. A) FACS-Plot der HCT-116 Zellen nach Behandlung mit 100 μ M Panobinostat über 48 h. B) Bei Ko-Inkubation mit 100 μ M Panobinostat und 50 μ M zVAD für 48 h kommt es zu einem partiellen Rescue des Zelltodes. C) Negativkontrolle mit DMSO für 48 h. D) Graphische Darstellung und statistische Auswertung der spezifischen Zelltodraten (n=4).

3.3.4 Eisenchelator reduziert den Bakterien-induzierten Zelltod

Da Apoptose als bakteriell-induzierter Zelltod in unserem Modell ausgeschlossen werden kann, haben wir mithilfe verschiedener Inhibitoren (vgl. Tabelle 5) systematisch die bekannten Formen des Zelltodes untersucht. Mit Ausnahme des Eisenchelators *2,2'-Bipyridyl Reagent Plus®* (DP) war keiner der Inhibitoren in der Lage den bakteriell-induzierten Zelltod zu blockieren.

Wir konnten ausschließen, dass *E. coli* Apoptose, Nekroptose, Pyroptose, NETose, RIP1-, ROS- und Calcium-abhängigen Zelltod in HCT-116 Zellen auslösen. Wie wir weiterhin zeigen konnten, resultieren die Effekte des Eisenchelators DP auf einer Inhibition der Proliferation der *E. coli* Bakterien, sodass auch ein Eisen-abhängiger Mechanismus bzw. Ferroptose für den hier vorliegenden Zelltod ausgeschlossen werden kann [117].

Tabelle 5: Tabellarische Aufstellung der verwendeten Zelltod-Inhibitoren.

Inhibitor	Verwendete Konzentration	Funktion	Gehemmter Zelltod
zVAD-FMK	50 μ M	Pan-Caspase-Inhibitor	Apoptose [118]
Necrostatin-1	50 μ M	RIP1-Inhibitor	Nekroptose, NETose [57,92]
Ferrostatin-1	5 μ M	Ferroptose-Inhibitor	Ferroptose [83]
Trolox	100 μ M	Vitamin-E-Derivat	ROS-abhängiger Zelltod [83]
NAC	20 mM	Antioxidans	ROS-abhängiger Zelltod [119]
DP	100 μ M	Eisenchelator	Eisen-abhängiger Zelltod [120]
Ciclosporin A	1200 ng/ml	Cyclophilin-Inhibitor	NETose [121]
BAPTA-AM	10 μ M	Calcium-Chelator	Calcium-abhängiger Zelltod [122]

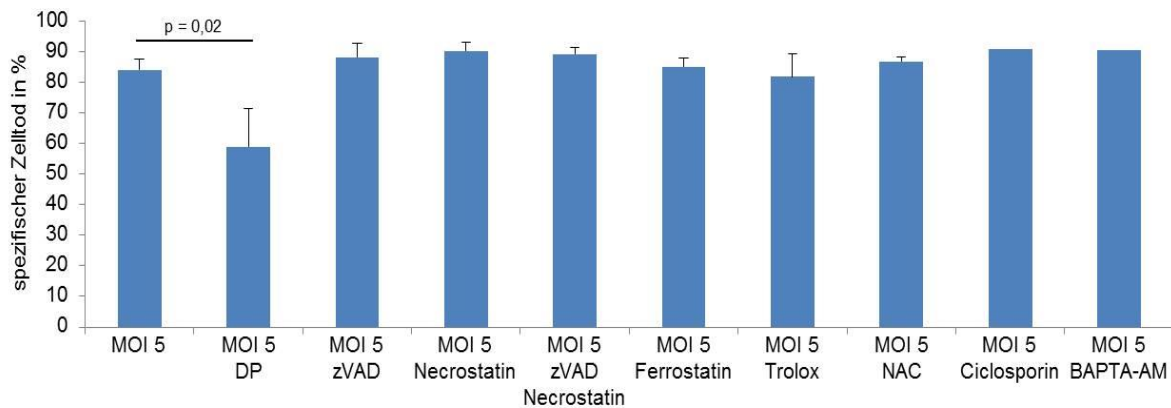


Abbildung 15: Statistische Auswertung des spezifischen Zelltodes für drei unabhängige Experimente (bzw. ein Experiment für die Behandlung mit Ciclosporin und BAPTA-AM). HCT-116 Zellen wurden mit den verschiedenen Zelltod-Inhibitoren stimuliert (vgl. Tabelle 5) und anschließend für 4 h mit *E. coli* MOI 5 ko-inkubiert, die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Der durch *E. coli* induzierte Zelltod der HCT-116 Zellen wird durch den Eisenchelator DP signifikant vermindert.

3.3.5 Morphologie des *E. coli*-induzierten Zelltodes – Bakterien induzieren Paraptose

Da der in unserem *in vitro*-Modell beobachtete Zelltod durch keinen der verwendeten Inhibitoren blockiert werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt die Morphologie des Zelltodes geklärt werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brochhausen-Delius vom Institut für Pathologie der Universität Regensburg angefertigt haben, belegen deutliche morphologische Veränderungen von HCT-116 Zellen und ihren Organellen nach Ko-Kultur mit *E. coli* (Abbildung 16) [123]. Man erkennt deutlich eine Kondensation der DNA an der Kernmembran, eine starke Va-

kuolisierung sowie einen Integritätsverlust der Plasmamembran. In Ergänzung wurden auch Veränderungen an den Mitochondrien, wie ein Abrunden und ein Ausbleichen sichtbar (Abbildung 16).

Um die Mitochondrien genauer zu untersuchen, wurden die Effekte von *E. coli* auf das mitochondriale Membranpotential untersucht. Mittels TMRE-Färbung wurde das Membranpotential intakter Mitochondrienmembranen in HCT-116 Zellen sichtbar gemacht (Abbildung 17, blaue Linien). Eine starke Fluoreszenz steht hierbei für ein intaktes Membranpotential, eine niedrige dementsprechend für eine Depolarisation des Mitochondriums. Nach Bakterienzugabe zeigte sich eine Depolarisation der Mitochondrien (Abbildung 17, rote Linien).

Fasst man die morphologischen Veränderungen, wie Kernmembran-assoziierte DNA-Kondensation, Vakuolisierung sowie den Integritätsverlust der Plasmamembran und den Verlust des Membranpotentials zusammen, erlaubt es die Gesamtheit dieser Befunde den Zelltod durch Ko-Kultur von *E. coli* mit Darmepithelzellen als Paraptose zu klassifizieren.



Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Untersuchung des bakteriell-induzierten Zelltodes. Nach Inkubation mit Bakterien werden deutliche morphologische Veränderungen der Paraptose, wie Kern-

membran-assoziierte DNA-Kondensation, Vakuolisierung und Verlust der Integrität der Plasmamembran beobachtet. Bakterium mit Pfeil gekennzeichnet. Elektronenmikroskopie durch Prof. Dr. Brochhausen-Delius, Institut für Pathologie, Universität Regensburg.

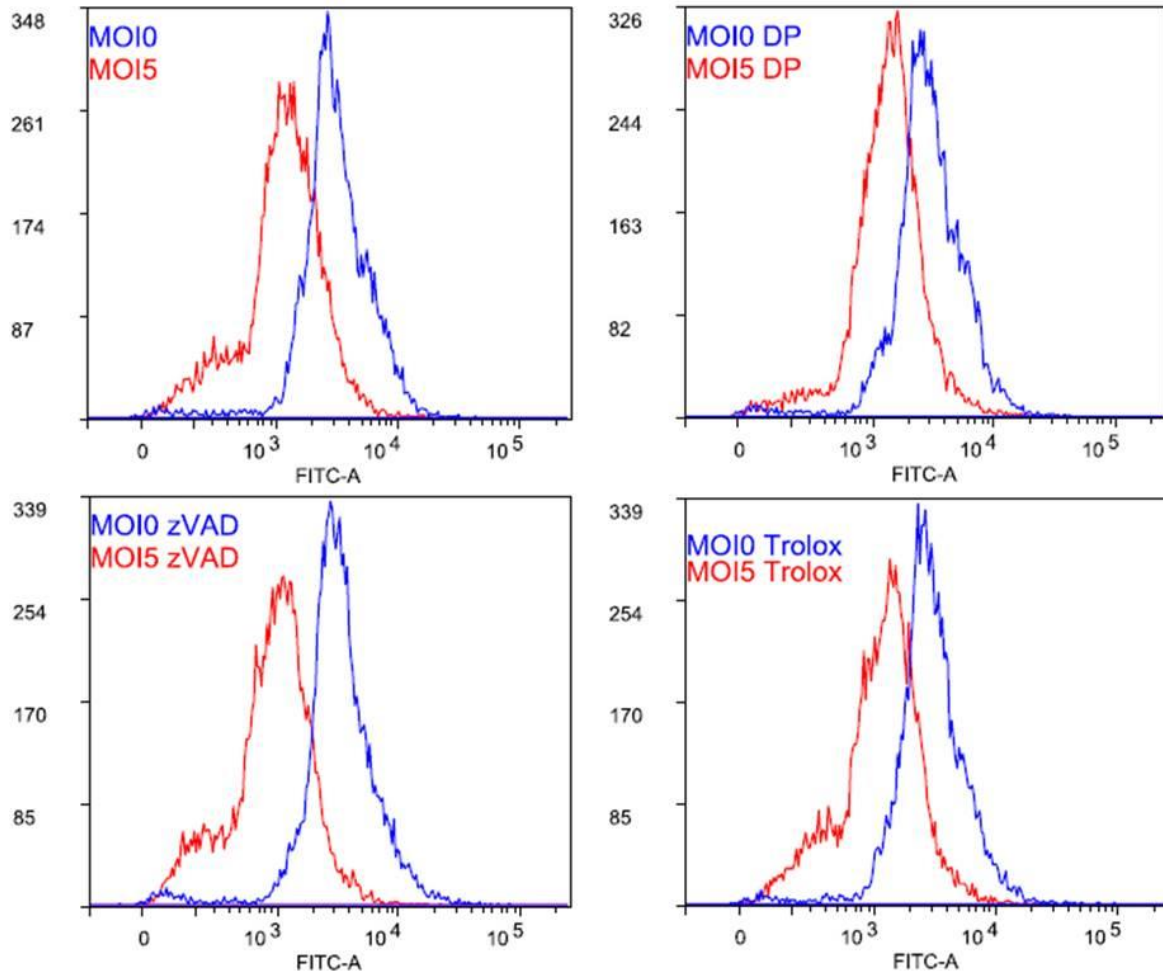


Abbildung 17: *E. coli* lösen nach Ko-Kultur für 3 h mit HCT-116 Zellen eine Depolarisierung des Membranpotentials der Mitochondrien aus. Dies zeigt sich in der durchflusszytometrischen Analyse durch einen Shift nach links nach bakterieller Ko-Kultur (B, rote Linien) im Vergleich zu der Kontrollbedingung MOI 0 (B, blaue Linien). Auch die verschiedenen Zelltodinhhibitoren (vgl. Tabelle 5) zeigen keinen Effekt auf die Depolarisierung des Mitochondrienpotentials. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (n=2).

4 Diskussion

Die SBP ist eine häufige und schwere Komplikation der Leberzirrhose. Die genauen Mechanismen ihrer Pathogenese sind noch nicht bekannt, jedoch geht man von einer bakteriellen Translokation aus dem Darmlumen in den Aszites aus [26]. Daher entwickelten wir ein *in vitro*-Modell aus Darmepithelzellen (HCT-116) und *E. coli* Bakterien als häufigsten Erreger der SPB um die Mechanismen hinter der Entstehung einer SBP genauer zu untersuchen [5]. Die Zelllinie HCT-116 stammt aus einem kolorektalen Karzinom und weist eine Mutation (G13D) des KRAS-Proto-Onkogens auf [103]. HCT-116 Zellen können auch Lungen- und Lebermetastasen in Mäusen ausbilden [124]. Die Zellen exprimieren Wildtyp-p53 und -p73 und eignen sich deshalb gut zur Untersuchung der p53-Familie [104]. Zudem bildet die Zelllinie HCT-116 einen dichten Zellverband aus polygonalen Zellen und bildet damit den engen Zusammenhalt der Epithelbarriere des Darms gut ab. Allerdings können bei Langzeitkulturen immer Veränderungen der Zelllinien auftreten, sodass ihre Eigenschaften nicht denen des Primärtumors entsprechen müssen [125]. In der vorliegenden Arbeit sind aber weniger die tumorigenen Aspekte der HCT-116 Zellen von Bedeutung als ihre Ähnlichkeiten zu Darmepithelzellen *in vivo*.

Im Gastrointestinaltrakt treffen zahlreiche Mikroorganismen auf das Darmepithel, wobei *E. coli* als häufigster SBP-Erreger auch ein bedeutender Bestandteil der physiologischen Darmflora ist [126]. Bei Patient*innen mit Leberzirrhose gerät diese Homöostase jedoch aus dem Gleichgewicht und die bakterielle Translokation trägt wesentlich zur Entstehung von Komplikationen wie der SBP und anderen Infektionen bei. Weitere begünstigende Faktoren sind die Veränderungen der Darmflora und die funktionelle Immunsuppression von Zirrhosepatient*innen [127–130]. Wenn Darmepithelzellen Zellstress ausgesetzt sind, kann dies die bakterielle Translokation begünstigen, da der transepitheliale Widerstand abnimmt [131]. Für manche Bakterien (meist aerob und Gram-negativ) ist zudem bekannt, dass sie auch ein intaktes Epithel überwinden können. Zu diesen Bakterien gehören *E. coli*, *K. pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*, die häufige SBP-Erreger sind [132–134].

4.1 Oberflächenrezeptoren TLR2 und TLR4 sowie NOD1 und NOD2

Bei der Entwicklung einer SBP spielen auch genetische Faktoren eine Rolle. Beispielsweise haben Patient*innen mit TLR2-Varianten ein erhöhtes Risiko, eine SBP zu entwickeln (38,5% vs. 15,3%). Bei Makrophagen ist TLR2 essenziell für das Er-

kennen von mikrobiellen Komponenten und damit für die funktionierenden antibakteriellen Abwehrmechanismen der Patient*innen [2].

In der Literatur finden sich divergente Beobachtungen zum TLR2- und TLR4-Rezeptorstatus der Darmepithelzelllinie HCT-116 [135–138], die in dieser Arbeit verwendete HCT-116 Zelllinie exprimiert weder TLR2 noch TLR4 (vgl. 4.1.1) [138]. Die Interaktion mit Bakterien in unserem Zellkulturmodell muss deshalb über andere Signalwege, wie z.B. über NOD-Proteine stattfinden. *In vivo* besteht allerdings die Möglichkeit der Interaktion zwischen Darmepithelzellen und Bakterien über TLR, da humanes Kolongewebe TLR2, -3, -4 und -5 exprimiert und damit die Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen [135,139].

Varianten des NOD2-Gens sind an der Pathogenese von Morbus Crohn beteiligt und schwächen dort die Integrität der Darmmukosa. Bei der SBP erhöhen sie das Erkrankungsrisiko und bedingen bei Patient*innen mit Leberzirrhose und Aszites im Vergleich zu Wildtyp-Genotypen eine erhöhte Mortalität [2,140].

NOD-Rezeptoren sind intrazellulär lokalisiert und erkennen Erregerbestandteile im Zytosol, sodass für die Detektion der NOD-Rezeptoren keine Oberflächenfärbung wie bei den TLR eingesetzt werden konnte, sondern die Proteinmenge im Western Blot bestimmt wurde. Hierbei zeigte sich, dass HCT-116 Zellen die Rezeptoren NOD1 und NOD2 tragen, allerdings konnte keine Induktion der exprimierten mRNA- oder Proteinmenge durch die bakterielle Ko-Kultur nachgewiesen werden.

Es ist daher möglich, dass die NOD-Rezeptoren zwar durch Liganden-Bindung aktiviert werden, aber dies keine Effekte auf die Proteinexpression oder auf die mRNA-Synthese von NOD hat. So könnte ein geeigneter Weg, um dies nach zu vollziehen, die Bestimmung der NF- κ B-Aktivität sein, da dieser Transkriptionsfaktor ein nachgeschaltetes Zielprotein von NOD1 und NOD2 ist [141].

In Makrophagen kann durch den Kontakt mit *E. coli* die Immunantwort, die über TLR vermittelt wird, reduziert werden, die Signalkaskade über NOD bleibt aber intakt. In HCT-116 Zellen kann also – bei Abwesenheit von TLR2 und -4 – den Signalwegen der NOD-Rezeptoren eine umso größere Bedeutung bei der Abwehr bakterieller Infektionen zukommen [142].

NOD2 aktiviert nach Liganden-Bindung (z.B. von MDP) NF- κ B und löst so eine Immunantwort aus. Allerdings wird vermutet, dass manche NOD-Mutationen nur eine unzureichende NF- κ B-Aktivierung bewirken und so keinen ausreichenden Schutz vor bakterieller Infektion und bakterieller Translokation bewirken, sodass bei Pati-

ent*innen mit diesen genetischen Varianten höhere Raten an SBP und ein schlechteres Outcome vorliegen [140,143].

NOD-Rezeptoren sind also ein wichtiger Mechanismus der Zelle, um im Rahmen bakterieller Infektionen das angeborene Immunsystem zu aktivieren und so das Überleben der Zelle / des Menschen möglich zu machen. Sie gewinnen dabei in Abwesenheit von TLR-Rezeptoren sogar noch an Bedeutung. *In vivo* können somit abhängig vom PRR-Expressionsmuster weitere Signalwege eine Rolle bei der Bakterienabwehr spielen [144]. Für das Verständnis der Pathogenese der SBP ist somit die detaillierte Analyse der Epithelzell-Bakterien-Interaktion essenziell.

4.2 Auswirkungen der bakteriellen Ko-Kultur auf die p53-Familie

Mitglieder der p53-Familie von Transkriptionsfaktoren werden bei Zellstress, beispielsweise durch DNA-Schäden und bei oxidativen oder metabolischen Stress hochreguliert [43,44]. Durch die Aktivierung entsprechender Zielgene können p53-Proteine dann die Reparatur der zellulären Schäden induzieren oder bei irreversiblen Defekten Zelltod einleiten. Weiterhin ist bekannt, dass p53 durch Kontrolle des Zellmetabolismus die Entwicklung intrazellulärer Bakterien beeinträchtigen kann. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Rolle die p53-Proteinfamilie im Rahmen der Pathogenese der SBP und in der bakteriellen Abwehr in der Bakterien-Epithelzell-Interaktion spielt.

Bestimmte Bakterien, wie z.B. *H. pylori* bewirken den Abbau von p53, um so das Absterben der (infizierten) Wirtszelle zu verhindern und den Zellstoffwechsel für ihren Vorteil zu nutzen [44]. Im Tierversuch wurde p53 in Magenepithelzellen durch eine Infektion mit *H. pylori* zunächst induziert und anschließend reduziert. Die Inhibition von p53 kann es *H. pylori* erleichtern, die Epithelbarriere zu schädigen um Zugang zu Nährstoffen zu bekommen oder eine Immunantwort zu unterdrücken [49,145,146].

Übereinstimmend mit diesen Daten im zellulären Modell des Magenkarzinoms wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach zwei- bis vierstündiger Ko-Kultur von HCT-116 Zellen mit *E. coli* eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der Proteine p53 und p73 beobachtet. Daher gehen wir davon aus, dass in unserem *in vitro*-Modell ein ähnlicher bakteriell-induzierter Mechanismus, wie bei *H. pylori* zur Inhibition p53-abhängiger Defense-Mechanismen beiträgt und damit die bakterielle Translokation im Rahmen einer SBP begünstigt. Weitere Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem, dass direkt nach bakteriellem Kontakt der Epithelzellen mit *E. coli* ein transien-

ter Anstieg von p53 und p73 erfolgt, das kann auf einen bakteriell-induzierten Stress wie z.B. einen DNA-Schaden hindeuten [117,123].

In der Literatur wurde eine Induktion von p73 *in vitro* durch *H. pylori* in Magenepithelzellen festgestellt [49,147]. p73 und p63 können ähnliche Funktionen wie p53 übernehmen, so aktivieren auch sie die Transkription von p53-Zielgenen zur Regulation des Zellzyklus und der Apoptose. p73 ist ebenfalls wichtig als Mediator bei der Reaktion der Zellen auf DNA-Schäden [147,148]. *H. pylori* löst durch die posttranslationelle Stabilisierung von p73 auch bei fehlendem p53 Apoptose über pro-apoptotisches PUMA, NOXA und p21/Waf1 aus. Auch CD95 wird induziert. Zudem reguliert *H. pylori* Δ Np63 herunter. Δ Np63 ist eine verkürzte Isoform von p63, die normalerweise die pro-apoptotischen Funktionen von p73 hemmt. So bewirkt *H. pylori* durch die Verminderung von Δ Np63 eine vermehrte Aktivität von p73 und löst dadurch Apoptose der infizierten Zellen aus [147,149]. *In vivo* könnte die Hochregulation von p73 zusätzlich über Entzündungsprozesse verstärkt werden, da z.B. TNF die p73-Expression induziert [150]. Durch die in unseren Versuchen beobachtete Bakterien-induzierte Reduktion der Proteine der p53-Familie werden damit die Mechanismen der Stressantwort, die normalerweise über die p53-Familie vermittelt wird, gehemmt. Dies könnte im Rahmen der Entstehung einer SBP die bakterielle Translokation in den Aszites begünstigen.

Aber nicht nur *H. pylori* und – wie von uns in dieser Arbeit beschrieben – *E. coli* beeinflussen die Proteine der p53-Familie, auch einige weitere Pathogene versuchen sich so einen Überlebensvorteil zu verschaffen. So wird z.B. durch eine Infektion mit SV40 (in Sf21 Zellen [151]), Adenoviren (in H1299 Zellen [152]), Papillomaviren (in H1299 Zellen [153]), EBV (in SaOS-2 und 293/EBV Zellen [52]), *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*; in HUVEC, HeLa und Epithelzellen der Fimbrien des Eileiters [48]) oder *Shigella flexneri* (*S. flexneri*; in HCT-116, HeLa, MCF-7 und MEF Zellen [154]) p53 vermindert. Bei *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*; in HCT-116, Caco-2 BBE, HT29 cl.19A, MEF und murinen Kolonepithelzellen [44,155]) findet dagegen eine Induktion statt und bei *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) ist nur in bestimmten Zellarten (in VK2/E6E7, aber nicht in ME-180 Zellen [44]) ein vermin-dernder Effekt auf das Protein p53 zu beobachten [44,145].

N. gonorrhoeae hat auch eine reduzierende Wirkung auf die p53-mRNA [44], für *H. pylori* konnten aber keine Veränderungen in der mRNA-Menge festgestellt werden [156]. Passend dazu zeigten sich in unserem Modell keine reduktiven Effekte auf

TP53- und TP73-mRNA. Die Proteine p53 und p73 werden somit über Degradation abgebaut, da keine Veränderungen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnten (vgl. 3.2.1).

Für die Charakterisierung der Pathomechanismen der bakteriellen Translokation bei einer SBP ist es essenziell zu verstehen, über welche Signalwege die beobachtete Reduktion von p53 und p73 vermittelt wird. p53 als bedeutender Tumorsuppressor unterliegt einer „strengen“ Regulation. Diese wird vor allem über eine autoregulatorische Feedback-Schleife über MDM2 gewährleistet [33,44]. Um zu klären, ob die Effekte von *E. coli* auf p53 und p73 durch eine Interaktion mit MDM2 oder durch Beeinflussung der Aktivität von MDM2 verursacht werden, wurden die Zellen mit Nutlin-3, einem MDM2-Inhibitor vorbehandelt. Meine Ergebnisse zeigen, dass es nach bakterieller Ko-Kultur zu einer Zunahme von pMDM2 (der aktivierten Form von MDM2) kommt. Durch die Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3 wird p53 restituiert, sodass es seine Funktion in der bakteriellen Abwehr wieder ausüben kann. Dies beweist, dass die vermehrte Degradation von p53 durch Ko-Kultur mit Bakterien über eine Interaktion der Bakterien mit MDM2 vermittelt wird. Für p73 waren im Rahmen dieser Arbeit analoge Effekte zu beobachten (vgl. 3.2.2). In Bezug auf p73 ist beschrieben, dass MDM-2 auch hier eine Degradation induzieren und die Aktivität blockieren kann [31,157,158]. Abbildung 18 zeigt eine schematische Darstellung der Wirkweise von Nutlin-3.

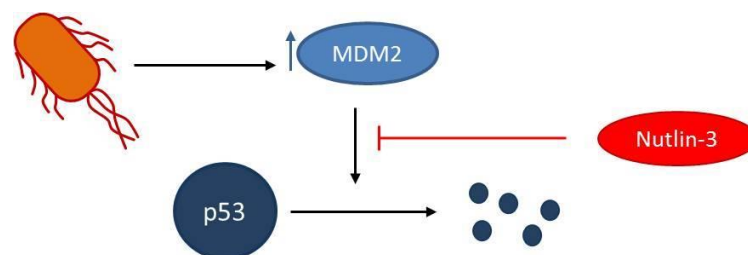


Abbildung 18: Schematische Darstellung des neuen Wirkmechanismus des Bakterien-induzierten Abbaus von p53 über MDM2. Nutlin-3 hemmt diesen Abbau.

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde für *H. pylori* die Degradation von p53 durch proteasomalen Abbau nach Ubiquitinierung über MDM2 beschrieben. MDM2 wird dabei durch Phosphorylierung durch AKT aktiviert. [49]. Hierbei spielen die Virulenzfaktoren VacA und cagPAI eine bedeutende Rolle. Sie sezernieren das Protein CagA in *H. pylori*-infizierte Zellen, das dann die Degradation von p53 auslöst, da es an der Phosphorylierung von MDM2 beteiligt ist. CagA wird wiederum von ASPP2

reguliert und auch p14ARF ist ein wichtiger Stabilisator für p53, da es MDM2 inhibiert [49,50,145]. p73 wird im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion über cagPAI und c-Abl reguliert [147].

Auch *C. trachomatis* führt über einen MDM2- und PI3K-AKT-abhängigen Mechanismus zur Degradation von p53, sodass eine Behandlung mit Nutlin-3 das Chlamydien-Wachstum inhibieren kann [48]. Nutlin-3 konnte zudem die Parasitenzahl in der Leber bei einer Infektion mit dem Malaria-Erreger *Plasmodium yoelii* deutlich verringern, da auch dieser Parasit die Konzentration von p53 durch die Interaktion mit MDM2 vermindert [44,55].

Bei einer Infektion mit *S. flexneri* kann p53 entweder über den schon beschriebenen Weg über PI3K-AKT abgebaut werden oder nach Aktivierung von Calpain durch den VirA-Virulenzfaktor von dieser Caspase gespalten werden. Die Hemmung von Calpain konnte die Infektion mit *S. flexneri* reduzieren. VirA besitzt Homologien zu EspG, einem *E. coli*-Virulenzfaktor, der ebenfalls Calpain aktivieren kann [44,159]. Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob in unserem Versuchsansatz ein vergleichbarer Mechanismus vorliegt.

S. typhimurium erhöht über AvrA die Transkription von p53 in HCT-116 Zellen, was zum Zellzyklusarrest führt. Dabei ist unklar, wie dies die Infektion begünstigt, aber es macht deutlich, dass je nach Bakterienspezies andere Mechanismen zum Tragen kommen [155].

Hierbei könnte es auch sein, dass die Schwere des zellulären Stresses die unterschiedlichen Reaktionen determiniert. So wird vermutet, dass geringer Zellstress p53 intermittierend aktiviert, um die Reparatur des Schadens zu bewirken, während stärkere Schäden durch langfristige p53-Vermehrung den Zelltod auslösen [60].

Nicht nur im Rahmen bakterieller Infektionen kommt p53 je nach Pathogen und Zellart eine unterschiedliche Bedeutung zu, auch bei Tumorzellen konnte dies beobachtet werden. So konnte zum einen gezeigt werden, dass in bestimmten Zellarten p53 aktiv sein muss, damit Ferroptose ausgelöst werden kann, in Zellen eines kolorektalen Karzinoms begünstigt dagegen inaktiviertes oder mutiertes p53 diesen Zelltod [160,161].

Wir konnten im Transwell-Experiment keine reduzierenden Effekte auf p53 und p73 der HCT-116 Zellen nachweisen, wenn Zellen und Bakterien durch eine semi-permeable Membran getrennt waren (vgl. 3.2.4). Dies kann also entweder bedeuten, dass ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Zelle dafür notwendig ist oder

dass die bakteriellen Effekte auf die p53-Familie nicht über lösliche Substanzen vermittelt werden.

Nachdem die Behandlung mit *E. coli* eine Verminderung des Proteinspiegels von p53 in den HCT-116 Zellen bewirkt und da beschrieben ist, dass LPS bei Makrophagen ähnliche Effekte hat, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Reduktion in HCT-116 Zellen ebenfalls LPS-abhängig ist [47]. Durch 10 ng/ml LPS konnte eine Wirkung auf p53 beobachtet werden (vgl. 3.2.3). Besonders im klinischen Alltag spielt LPS eine wichtige Rolle, da durch seine Freisetzung aus Bakterien ein septischer Schock ausgelöst werden kann. Für die Signalwege sind dabei unterschiedliche wichtige Mediatoren identifiziert worden. Hierzu zählen Caspase 1, Caspase 11 und Gasdermin D, aber auch CD14 und TNF [57,162,163]. Auch unabhängig von der Rolle des LPS in der Entstehung einer Sepsis hat man zahlreiche Signalkaskaden entdeckt, die LPS beeinflussen kann, darunter NF- κ B, PI3K, JAK und MAP-Kinasen [164–169].

Auch p53 wird durch LPS beeinflusst. In Lungengewebe konnte eine Verminderung von p53 durch Stimulation mit LPS nachgewiesen werden. Diese wird durch Degradation von p53 über MDM2 vermittelt und kann durch Hsp90 gehemmt werden. LPS aktiviert AKT, welches wiederum MDM2 phosphoryliert und aktiviert [47,170–172]. Dieser Mechanismus entspricht unseren Beobachtungen in HCT-116 Zellen nach Ko-Kultur mit *E. coli* und bietet einen Erklärungsansatz für die Verminderung von p53 bei Behandlung dieser Zellen mit *E. coli*-LPS. Im Gegensatz dazu wurde in Fibroblasten eine Aktivierung von p53 als Reaktion auf LPS festgestellt, was wiederum die Produktion von ROS und eine darauffolgende Entzündungsantwort auslöst [173]. Diese Immunantwort ist vor allem durch das Freisetzen von Zytokinen wie TNF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 charakterisiert. Hier sind für verschiedene Zelltypen verschiedene Reaktionen auf LPS oder Bakterien wie *E. coli* beschrieben. So zeigten z.B. Fibroblasten, SW620 und HT29 (Darmepithelzellen) eine erhöhte Zytokinfreisetzung über den MAP-Kinase-Signalweg, während Caco-2 Zellen keine Erhöhung der IL-8 Produktion zeigten. Zudem ist eine NF- κ B-abhängige IL-8-Freisetzung nachgewiesen worden [164,168,173–176]. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie HCT-116 produziert die Interleukine 6 und 8, jedoch erfolgt durch bakterielle Ko-Kultur keine weitere Induktion der beiden Proteine, sodass durch weiterführende Arbeiten untersucht werden sollte, welche Immunreaktionen *E. coli* in den Darmepithelzellen auslösen.

Im Rahmen der Pathogenese der SBP können die Zytokine auch eine bedeutende Rolle spielen, denn IL-6, Interferon γ und TNF erhöhen die Permeabilität des Darme-

pithels und begünstigen so die Translokation von Pathogenen wie *E. coli*. Zudem sind bei Patient*innen mit Leberzirrhose die Plasmaspiegel von IL-6 und TNF erhöht. Diese werden wiederum durch LPS und bakterielle Bestandteile stimuliert, sodass ein regelrechter „*circulus vitiosus*“ entsteht [127,177–179]. Auch bei Patient*innen mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung ist die Produktion von IL-6 durch die Darmepithelzellen deutlich erhöht. Dadurch kommt es über STAT-3 zur Aktivierung der anti-apoptotischen Faktoren BCL2 und BCL-XL [139]. Auch NETs können als Antwort auf IL-8 oder TNF gebildet werden [91]. p53 kann dagegen das Auslösen einer Immunantwort und die Freisetzung von Interleukinen unterdrücken [40]. Da aber in unseren Versuchen p53 reduziert wird, sollte das eher begünstigend auf die Zytokin-Ausschüttung und das Auslösen einer Entzündungsantwort wirken.

Zusammengefasst führt die Ko-Kultur der Darmepithelzellen HCT-116 mit *E. coli* oder dessen LPS zu reduzierten Proteinspiegeln von p53 und p73. Dieser Effekt erfordert die Aktivierung von MDM2 sowie einen direkten Kontakt zwischen Zelle und Bakterium. In der Literatur gibt es sehr unterschiedliche Beobachtungen bezüglich der Reaktion von Darmepithelzellen auf Pathogene. Dies kann an unterschiedlichen Zellarten, unterschiedlichen Erreger(bestandteilen) oder an unterschiedlichen Expressionsmustern von Rezeptoren liegen. p53 ist hierbei eine wichtige Verknüpfung zwischen Immunsystem, DNA-Schaden und Zelltod [180] und scheint damit ein wichtiger Abwehrmechanismus bei der Interaktion zwischen Bakterien und Darmepithelzellen im Rahmen einer SBP zu sein.

4.3 Auswirkungen der bakteriellen Ko-Kultur auf den Zelltod

Sehr rasch nach Ko-Kultur von *E. coli* mit Darm-Epithelzellen konnten wir die Induktion von Zelltod der Epithelzellen nachweisen. Zelltod ist bei bakteriellen Infektionen von großer Bedeutung, um die Replikationsnische des intrazellulären Erregers zu zerstören oder um die Überlebensstrategien des Pathogens zu inhibieren. Dabei soll möglichst keine Entzündungsantwort ausgelöst werden, um weiteren Gewebeschaden zu verhindern [181]. Die Reaktion der Zellen auf Pathogene ist dabei je nach Zell- und Pathogenart unterschiedlich. So spielt Apoptose häufig eine wichtige Rolle. *S. flexneri* hemmt aber in bestimmten Geweben auch die Apoptose und induziert stattdessen Pyroptose [181,182]. Der Zelltod von Enterozyten erhöht die Permeabilität der Barriere des Darmepithels und bietet so Erregern eine Eintrittspforte [183]. Dies kann die bakterielle Translokation im Rahmen einer SBP begünstigen.

Der durch *E. coli* vermittelte Zelltod wurde nur bei direktem Kontakt zwischen Bakterien und HCT-116 Zellen ausgelöst (vgl. 3.3.2). Das entspricht auch den Ergebnissen im Transwell-Experiment, in dem ohne Kontakt zwischen Bakterium und HCT-116 Zellen keine Auswirkungen auf die p53-Familie nachgewiesen werden konnten. Auch in der Literatur hatten *E. coli* keine zytotoxischen Effekte auf verschiedene Zelltypen, wenn sie durch eine Membran von ihnen getrennt waren [184]. Dies wird von weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe unterstützt, wonach bei Patient*innen mit Leberzirrhose die intestinale Mukusschicht signifikant vermindert ist, wodurch der direkte Bakterien-Darmepithelzell-Kontakt ermöglicht wird [29]. Zu klären bleibt, ob die Zelltod-induzierenden Substanzen von den Bakterien (*E. coli*) oder von den Darmepithelzellen selbst produziert werden. Dies zu untersuchen könnte wichtige Einblicke in die Interaktion zwischen Bakterien und Darmepithelzellen geben und mögliche Behandlungsansätze für Infektionen wie die SBP aufzeigen.

Zahlreiche Studien zeigen eine Induktion von Apoptose bei Infektionen auf Grund von DNA-Schäden [185,186], so z.B. auch durch *E. coli*-LPS, sodass wir zunächst die Apoptose-Marker PARP und (cleaved) Caspase 3 untersuchten [187]. PARP ist ein Protein, das bei der DNA-Reparatur beteiligt ist und während der Apoptose und auch während der Nekrose gespalten wird. Je nach Zelltodmechanismus entstehen dabei unterschiedlich große Spaltprodukte. Die Spaltung während der Apoptose geschieht durch Caspase 3 und 7, wobei auch PARP-unabhängige Apoptose bekannt ist. PARP ist aber auch wesentlich an Nekroptose und Parthanatos beteiligt [89,98,188]. Cytochrom C ist ein bedeutendes Protein der Atmungskette, das im Intermembranraum der Mitochondrien zu finden ist. Seine Freisetzung löst über den intrinsischen Signalweg Apoptose aus [115]. Nach bakterieller Ko-Kultur sehen wir eine minimale Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol der HCT-116 Zellen, was aber nach unseren Ergebnissen nicht dafür ausreicht, um Apoptose auszulösen.

Nach Behandlung mit *E. coli* wiesen HCT-116 Zellen keine Spaltung von Caspase 3 oder PARP auf (vgl. 3.3.3). Dies zeigt, dass es sich bei dem bakteriell induzierten Zelltod in unserem *in vitro*-Modell nicht um Apoptose handelt.

Es ist bekannt, dass *E. coli* LPS in Epithelzellen Apoptose mit Caspase 3-Erhöhung und PARP-Cleavage auslöst [187]. Zudem induziert der *E. coli*-Bestandteil Colibactin DNA-Doppelstrangbrüche [184]. *C. trachomatis*, *S. flexneri* und *N. gonorrhoeae* verursachen ebenfalls Zellstress und DNA-Schäden. *S. flexneri* verhindert dabei aber

die Caspase 3- und PARP-Aktivierung, um dem apoptotischen oder nekrotischen Zelltod zu entgehen [181,189–193].

Zur weiteren Charakterisierung des bakteriell-induzierten Zelltodes wurden die HCT-116 Zellen daher vor Ko-Kultur mit *E. coli* mit verschiedenen Zelltod-Inhibitoren inkubiert. Die verwendeten Inhibitoren und ihre Wirkungsweise sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Da die entsprechenden Inhibitoren keinen Einfluss, auf den durch *E. coli* induzierten Zelltod hatten, können wir neben Apoptose auch Nekroptose, Pyroptose, NETose, Ferroptose, RIP1-, ROS-, Eisen- und Calcium-abhängigen Zelltod als zu Grunde liegenden Mechanismus für die Induktion von Zelltod in HCT-116 Zellen ausschließen.

Um den Zelltod weiter zu charakterisieren, führten wir anschließend sowohl morphologische Analysen als auch Untersuchungen zur Integrität der Mitochondrien nach Ko-Kultivierung der HCT-116 Zellen mit Bakterien durch. Der Kontakt mit *E. coli* führt zu einer Bakterien-abhängigen Depolarisierung der Mitochondrienmembran der Zellen. Dass eine Ko-Kultivierung von Bakterien mit Zellen zu mitochondrialen Schäden führen kann, steht in Einklang mit den Beobachtungen, dass eine Infektion mit Shigellen die Mitochondrien und ihre Membranen beschädigt [194]. In unserem Modell war aber im Gegensatz zu dem Shigellen-Modell nur eine geringe Cytochrom C Freisetzung zu beobachten. Dieser Befund verdeutlicht, dass hier ein nicht-apoptotischer Zelltod vorliegt. Betrachtet man die Morphologie des *E. coli*-induzierten Zelltodes, erkennt man deutlich eine Abrundung und ein Ausbleichen der Mitochondrien in den Epithelzellen. Das Abrunden der Mitochondrien spricht für einen erhöhten mitochondrialen Stress [195]. Zusätzlich erkennt man deutlich, dass die DNA an der Kernmembran kondensiert und dass sich Vakuolen bilden. Diese morphologischen Veränderungen und die Schädigung der Mitochondrien zeigen, dass es sich bei dem hier beschriebenen Zelltod um Paraptose handeln muss (vgl. 3.3.5).

Die Paraptose wurde erstmals im Jahr 2000 von Sperandio et al. beschrieben. Sie ist eine Art des programmierten Zelltodes, der eine zytoplasmatische Vakuolisierung, DNA-Kondensation und eine Schwellung / Abrundung von Mitochondrien und/oder Endoplasmatischem Retikulum aufweist [96]. Über die physiologische Funktion der Paraptose ist noch wenig bekannt [98]. Paraptose tritt während der neuronalen Entwicklung auf und sie wurde bei verschiedenen neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet [102]. Außerdem scheint sie bei verschiedenen Neurodegenerationspathologien beteiligt zu sein [99–101]. Über bakteriell-induzierte Paraptose ist

noch weniger bekannt, außer, dass der bakterielle Virulenz-Faktor Pyocyanin in den Epithelzellen der Nierentubuli Paraptose induzieren kann [196]. Daher konnte ich hier erstmalig zeigen, dass lebende Bakterien nach Kontakt mit Darmepithelzellen Paraptose auslösen können und diese Form des Zelltodes eine Rolle in der Pathophysiologie der SPB spielt.

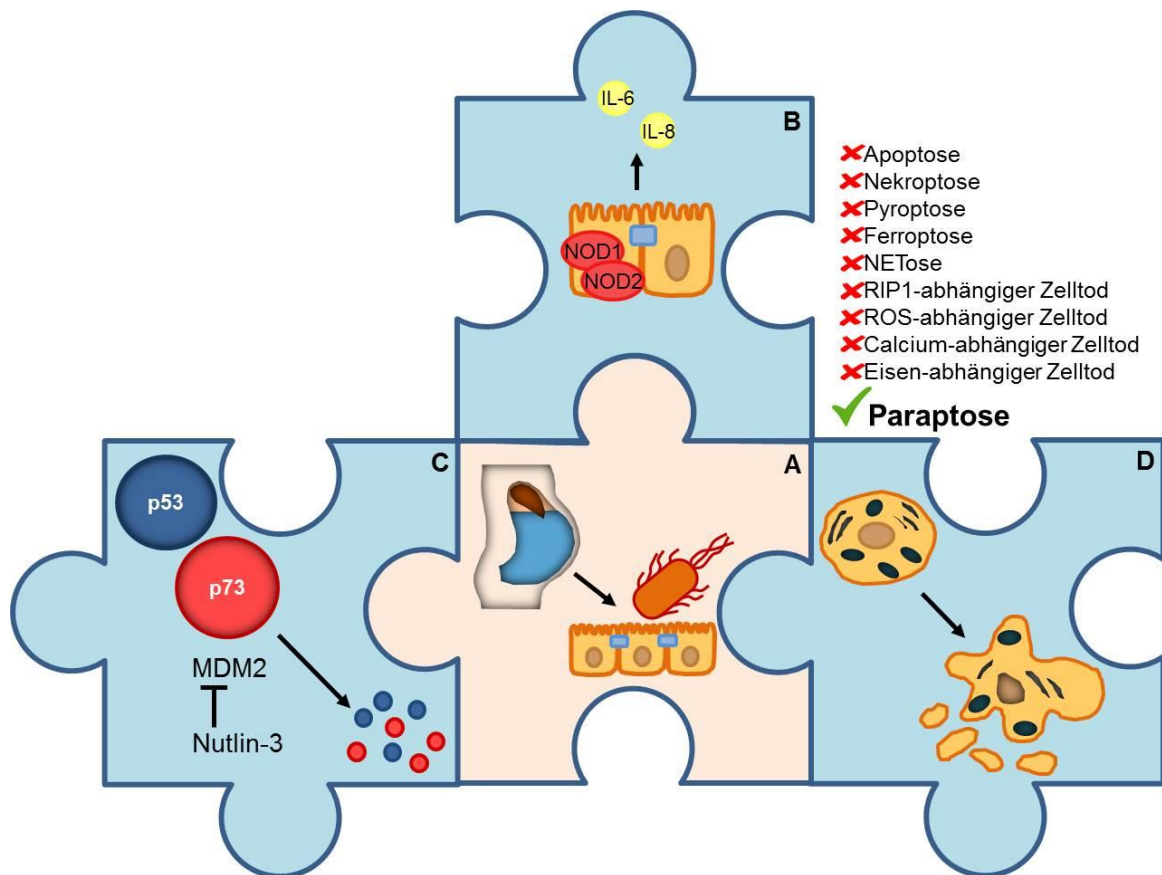


Abbildung 19: A) Im Rahmen einer Leberzirrhose kommt es durch ein verändertes Mikrobiom des Darms und durch eine reduzierte intestinale Mukusschicht zum Kontakt zwischen Darmepithelzellen und Pathogenen wie *E. coli*. In dieser Arbeit wurde dies in einem *in vitro*-Modell nachgebildet, um die Effekte dieses direkten Kontaktes im Rahmen der Pathogenese der SBP zu untersuchen. B) Die verwendeten Darmepithelzellen HCT-116 wiesen dabei die Rezeptoren NOD1 und NOD2 auf und sezernierten sowohl IL-6 als auch IL-8. C) Durch direkten Kontakt zwischen Darmepithelzellen und *E. coli* (oder durch Stimulation mit *E. coli* LPS, nicht dargestellt) wurden die Proteine der p53-Familie MDM2-abhängig abgebaut, was durch Nutlin-3 verhindert werden konnte. D) Zudem resultiert der direkte Kontakt zwischen *E. coli* und HCT-116 Zellen in einem vermehrten Zelltod, welcher über lösliche Mediatoren oder direkten Kontakt zwischen Bakterium und Epithelzelle vermittelt wird. Der Zelltod konnte als Paraptose identifiziert werden und wird in meiner Arbeit erstmals im Zusammenhang mit Bakterien-induziertem Zelltod beschrieben.

5 Zusammenfassung

Die SBP ist eine häufige und schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose. Die genauen Mechanismen der Pathogenese sind dabei noch nicht vollständig geklärt, aber es wird von einer Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen ausgegangen. Zudem sind die therapeutischen Möglichkeiten auf eine antibiotische Behandlung limitiert, wobei hier hohe Rezidivraten und zunehmende Resistenzen eine große klinische Herausforderung darstellen. Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines klinisch relevanten *in vitro*-Modells, den Pathomechanismen der SBP, sowie die Rolle der p53-Familie in der Darmbakterien-Epithelzell-Interaktion und die Induktion von bakteriell-induziertem Zelltod auf molekularer Ebene zu analysieren.

Die erste wichtige Frage, die ich in meiner Dissertation klären konnte, war ob auch Darmepithelzellen entzündliche Zytokine nach Ko-Kultivierung mit Bakterien sekretieren können und so zur Entstehung eines pro-inflammatorischen Milieus beitragen. Hierbei zeigte sich, dass die Darmzellen sowohl IL-6 als auch IL-8 nach Inkubation mit Bakterien sekretieren. Beide Interleukine gehören zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine.

Danach untersuchte ich, ob Bakterien in der Lage sind, den p53- und p73-Proteinspiegel in den Darmepithelzellen zu verändern. Ko-Kultivierung mit *E. coli* führte hier bei direktem Kontakt mit Darmepithelzellen zu einer sehr starken Reduktion von p53 und p73 auf Proteinebene. Ich konnte zeigen, dass dies über MDM2-abhängige proteasomale Degradation vermittelt wird und den direkten Kontakt zwischen Darmepithelzellen und *E. coli* voraussetzt. Die Degradation von p53 konnte erfolgreich durch Nutlin-3, einen MDM2-Inhibitor blockiert werden. Dieser Befund ist von großer klinischer Relevanz, da eine MDM2-Blockade oder Inhibition des Proteasoms und die daraus resultierende Stabilisierung der p53-Protein-Spiegel somit eine mögliche neue Therapieoption für die SBP darstellen kann. p53 und p73 kommt hier eine neue Funktion in der bakteriellen Abwehr zu.

Nach bakterieller Ko-Kultur konnte zudem eine zeit- und dosisabhängige Zelltodinduktion bei den HCT-116 Zellen beobachtet werden. Dafür war ebenfalls ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Darmepithelzellen notwendig. Klassische Formen des Zelltodes wie Apoptose und Nekrose konnten in diesem Fall ausgeschlossen werden. Die Bakterien induzierten auch keinen entzündlichen Zelltod wie Pyroptose und wir konnten auch Ferroptose, NETose, RIP1-, ROS-, Eisen- und Calcium-abhängigen Zelltod ausschließen. Eine detaillierte Analyse der Mitochondrien und

der Morphologie der sterbenden Darmepithelzellen nach Ko-Kultur mit *E. coli* identifizierte den Zelltod als Paraptose. Paraptose ist ein programmierter, entzündlich verlaufender Zelltod. Er zeichnet sich durch Kernmembran-assoziierte DNA-Kondensation, Schädigung der Mitochondrien und starke Vakuolisierung der Zellen aus. Ein solcher Zelltod, zusammen mit der von mir beobachteten Ausschüttung von IL-6 und IL-8, aktiviert das Immunsystem und kann zur Invasion von neutrophilen Granulozyten führen, die bei der SBP eine besondere Rolle spielen.

Zusammenfassend konnte ich in meiner Dissertation zeigen, dass die Interaktion von Bakterien mit Darmepithelzellen zu einer Reduktion von p53 und p73, die eine erste Verteidigungslinie gegen Bakterien darstellen, führt. Kommt es zu einem anhaltenden Kontakt von Bakterien und Darmzellen bei reduzierter Mukusschicht, wie bei einer fortgeschrittenen Leberzirrhose, führt dies zu einem gesteigerten proteasomalen Abbau von p53 und p73 und einer Schwächung dieser zellulären Abwehr, sodass die Bakterien die epitheliale Barriere durchdringen können. Wir beschreiben eine neue Rolle der p53-Familie in der Pathogenese der SBP, die die Grundlage einer zukünftigen therapeutischen Intervention darstellen kann. Weiterhin beschreiben wir mit der Paraptose erstmals einen Bakterien-induzierten Zelltod, der bei der Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen in den Aszites auftritt und somit eine entscheidende Rolle für die Entstehung einer spontan bakteriellen Peritonitis spielt.

6 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
ACD	<i>accidental cell death</i>
ASPP2	<i>apoptosis-stimulating protein of p53 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	<i>BCL2 antagonist/killer 1</i>
BAPTA-AM	<i>1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-W	<i>BCL2 like protein 2</i>
BCL-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BFL-1	<i>BCL2 related protein A1</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIM	<i>BCL2-like protein 11</i>
BOK	<i>BCL2 related ovarian killer</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
c-Abl	Tyrosinkinase ABL1
CagA	<i>cytotoxin-associated gene A</i>
cagPAI	<i>cag pathogenicity island</i>
CCCP	<i>Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl-hydrazone</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
d	Tag(e)
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>2,2'-Bipyridyl Reagent Plus®</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESBL	<i>extended spectrum Betalactamase</i>
EspG	<i>E. coli secreted protein G</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIN56	<i>N2,N7-Dicyclohexyl-9-(hydroxyimino)-9H-fluorene-2,7-disulfonamide</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX4	Glutathion-Peroxidase 4
h	Stunde(n)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l
mA	Milliampere

MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCL-1	<i>BCL2 family apoptosis regulator</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
mEq	Milliäquivalente
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>
mM	mmol/l
mm ³	Kubikmillimeter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPT	<i>mitochondrial membrane permeability transition</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
mTOR	<i>mechanistic target of Rapamycin</i>
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NAC	<i>N-Acetyl-L-cysteine</i>
NAD ⁺	Nicotinamidadeninukleotid
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NOD	<i>nucleotide binding oligomerisation domain</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
p14ARF	<i>alternative reading frame tumor suppressor</i>
p21/Waf1	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PARP	Poly [ADP-Ribose] Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pMDM2	phosphoryliertes MDM2
PMS	Phenazin-methosulfat
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
RCD	<i>regulated cell death</i>
RIP	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low PI</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TIM23	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 23</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMRE	<i>tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TOM20	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 20</i>
TRAIL-R2	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>
Trolox	<i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid</i>
U	<i>unit</i>
VacA	vakuolisierendes Cytotoxin
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
ZBP1	<i>Z-DNA binding protein 1</i>
zVAD-FMK	<i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>

7 Literaturverzeichnis

1. Marciano S, Díaz JM, Dirchwolf M, Gadano A. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis: Incidence, outcomes, and treatment strategies. *Hepat Med.* 2019;1113–22. doi:10.2147/HMER.S164250
2. Dever JB, Sheikh MY. Review article: Spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(11):1116–31. doi:10.1111/apt.13172
3. Ganten TM. *Infektionen in der Gastroenterologie.* 1st ed. Bremen: UNI-MED Verl.; 2004. 284 p. (UNI-MED SCIENCE). ger.
4. Gerbes AL, Gülberg V, Sauerbruch T, Wiest R, Appenrodt B, Bahr MJ, Dollinger MM, Rössle M, Schepke M. S3-Leitlinie "Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom" [German S 3-guideline "ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome"]. *Z Gastroenterol.* 2011;49(6):749–79. ger. doi:10.1055/s-0031-1273405
5. Striebel HW. *Operative Intensivmedizin: Sicherheit in der klinischen Praxis ; mit 273 Tabellen.* 2nd ed. Stuttgart: Schattauer; 2015. 1054 p. ger.
6. Moore KP, Aithal GP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut.* 2006;55 Suppl 6vi1-12. doi:10.1136/gut.2006.099580
7. Herold V, editor. *Internistische Intensivmedizin: Eine praxisorientierte Darstellung: 1263 Abbildungen, 330 Tabellen.* 6th ed. Regensburg: Herold; 2016. 1343 p. ger.
8. Canbay A, Gerken G, editors. *Gastroenterologie für Intensivmediziner: 68 Abbildungen.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2017. 223 p. ger.
9. Pohle T, Domschke W, Appenrodt B. *Therapeutische Plasmapräparate in der Gastroenterologie.* 1st ed. Bremen: UNI-MED Verl.; 2005. 78 p. (UNI-MED SCIENCE). ger.
10. Koulaouzidis A, Bhat S, Karagiannidis A, Tan WC, Linaker BD. Spontaneous bacterial peritonitis. *Postgrad Med J.* 2007;83(980):379–83. doi:10.1136/pgmj.2006.056168
11. Messmann H. *Klinische Gastroenterologie: Das Buch für Fort- und Weiterbildung plus DVD mit über 1.000 Befunden.* 1st ed. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2012. 824 p. ger.

12. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1986;91(6):1343–6.
13. Gerbes AL, Labenz J, Appenrodt B, Dollinger M, Gundling F, Gülberg V, Holstege A, Lynen-Jansen P, Steib CJ, Trebicka J, Wiest R, Zipprich A. Aktualisierte S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) „Komplikationen der Leberzirrhose“ [Updated S2k-Guideline "Complications of liver cirrhosis". German Society of Gastroenterology (DGVS)]. *Z Gastroenterol*. 2019;57(5):611–80. ger. doi:10.1055/a-0873-4658
14. Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: An explosion of information. *Hepatology*. 1988;8(1):171–5.
15. Koulaouzidis A, Bhat S, Saeed AA. Spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(9):1042–9.
16. Zundler J, Bode JC. Die spontane bakterielle Peritonitis. *Med Klin*. 1998;93(10):612–8. doi:10.1007/BF03042676
17. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol*. 2010;53(3):397–417. doi:10.1016/j.jhep.2010.05.004
18. Fernández J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodés J. Bacterial infections in cirrhosis: Epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology*. 2002;35(1):140–8. doi:10.1053/jhep.2002.30082
19. Ariza X, Castellote J, Lora-Tamayo J, Girbau A, Salord S, Rota R, Ariza J, Xiol X. Risk factors for resistance to ceftriaxone and its impact on mortality in community, healthcare and nosocomial spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol*. 2012;56(4):825–32. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.010
20. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2018;69(2):406–60. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.024
21. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas V, Rimola A, Marco F, Guarner C, Forné M, Planas R, Bañares R, Castells L, Jimenez De Anta MT, Arroyo V, Rodés J. Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus in-

- travenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1996;111(4):1011–7. doi:10.1016/s0016-5085(96)70069-0
22. Kasper DL, Fauci AS, Harrison TR. *Harrisons Innere Medizin*. 19th ed. Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo JL, Suttrop N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. New York, NY, Berlin, Stuttgart: McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; THIEME; 2016. 1180 p. ger.
 23. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, Castells L, Vargas V, Soriano G, Guevara M, Ginès P, Rodés J. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med*. 1999;341(6):403–9. doi:10.1056/NEJM199908053410603
 24. Götz M, Anders M, Biecker E, Bojarski C, Braun G, Brechmann T, Dechêne A, Dollinger M, Gawaz M, Kiesslich R, Schilling D, Tacke F, Zipprich A, Trebicka J. S2k-Leitlinie Gastrointestinale Blutung [S2k Guideline Gastrointestinal Bleeding - Guideline of the German Society of Gastroenterology DGVS]. *Z Gastroenterol*. 2017;55(9):883–936. ger. doi:10.1055/s-0043-116856
 25. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2010. 1 com.
 26. Lata J, Stiburek O, Kopacova M. Spontaneous bacterial peritonitis: A severe complication of liver cirrhosis. *WJG*. 2009;15(44):5505. doi:10.3748/wjg.15.5505
 27. Jansen PL. Spontaneous bacterial peritonitis. Detection, treatment and prophylaxis in patients with liver cirrhosis. *Neth J Med*. 1997;51(4):123–8.
 28. Wächter LB. Einfluss von Bakterien auf die Integrität der epithelialen Barriere im Darm als möglicher Pathomechanismus der spontan bakteriellen Peritonitis bei Leberzirrhose: Universität Regensburg; 2022.
 29. 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. Novel pathomechanism for spontaneous bacterial peritonitis: Disruption of cell junctions by cellular and bacterial proteases. *Gut*. 2022;71(3):580–92. doi:10.1136/gutjnl-2020-321663

30. Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: Hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2010;17(6):901–11. doi:10.1038/cdd.2010.35
31. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:285. doi:10.3389/fonc.2014.00285
32. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat.* 2006;9(6):288–306. doi:10.1016/j.drug.2007.01.001
33. Kunst C, Haderer M, Heckel S, Schlosser S, Müller M. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Transl. Cancer Res.* 2016;5(6):632–8. doi:10.21037/tcr.2016.11.79
34. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15–6. doi:10.1038/358015a0
35. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* 1991;352(6333):345–7. doi:10.1038/352345a0
36. Beckerman R, Prives C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(8):a000935. doi:10.1101/cshperspect.a000935
37. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998;188(11):2033–45. doi:10.1084/jem.188.11.2033
38. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11(3):577–90.
39. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(9):a004887.
40. Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan M-L, Golovkina TV, Rokhlin OW, Kuprash DV, Nedospasov SA, Hazen SL, Feinstein E, Gudkov AV. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB J.* 2005;19(8):1030–2. doi:10.1096/fj.04-3213fje

41. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307–10. doi:10.1038/35042675
42. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992;69(7):1237–45.
43. Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*. 2006;13(6):941–50. doi:10.1038/sj.cdd.4401925
44. Siegl C, Rudel T. Modulation of p53 during bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(12):741–8. doi:10.1038/nrmicro3537
45. Perry ME. The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a000968. doi:10.1101/cshperspect.a000968
46. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993;75(4):805–16.
47. Odkhuu E, Mendjargal A, Koide N, Naiki Y, Komatsu T, Yokochi T. Lipopolysaccharide downregulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor-kappa B. *Immunobiology*. 2015;220(1):136–41. doi:10.1016/j.imbio.2014.08.010
48. Siegl C, Prusty BK, Karunakaran K, Wischhusen J, Rudel T. Tumor suppressor p53 alters host cell metabolism to limit *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Rep*. 2014;9(3):918–29. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.004
49. Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, Zaika E, Ogden SR, Romero-Gallo J, Piazuelo MB, Correa P, Washington MK, El-Rifai W, Peek RM, Zaika A. Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1333–43. doi:10.1053/j.gastro.2010.06.018
50. Buti L, Spooner E, van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9238–43. doi:10.1073/pnas.1106200108

51. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129–36.
52. Sato Y, Kamura T, Shirata N, Murata T, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T. Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000530. doi:10.1371/journal.ppat.1000530
53. Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, Jay G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet*. 1995;9(1):41–7. doi:10.1038/ng0195-41
54. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol*. 2001;75(3):1401–7. doi:10.1128/JVI.75.3.1401-1407.2001
55. Kaushansky A, Ye AS, Austin LS, Mikolajczak SA, Vaughan AM, Camargo N, Metzger PG, Douglass AN, MacBeath G, Kappe SHI. Suppression of host p53 is critical for Plasmodium liver-stage infection. *Cell Rep*. 2013;3(3):630–7. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.010
56. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenaebelle P. Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):135–47. doi:10.1038/nrm3737
57. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK-M, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, Laurenzi V de, Maria R de, Debatin K-M, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H,

- Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine J-C, Martin SJ, Martinou J-C, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon H-U, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
58. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(12):860–75. doi:10.1038/nrc3380
59. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49–63. doi:10.1038/nrm3722
60. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):20–33. doi:10.1038/nrc.2015.2
61. Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: Table for two. *Cell Death Differ.* 2016;23(6):915–26. doi:10.1038/cdd.2015.172
62. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P. Necroptosis,

- necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 2010;17(6):922–30. doi:10.1038/cdd.2009.184
63. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):262–75. doi:10.1038/nri.2017.9
64. Chen H-C, Kanai M, Inoue-Yamauchi A, Tu H-C, Huang Y, Ren D, Kim H, Takeda S, Reyna DE, Chan PM, Ganesan YT, Liao C-P, Gavathiotis E, Hsieh JJ, Cheng EH. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat Cell Biol.* 2015;17(10):1270–81. doi:10.1038/ncb3236
65. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33–42. doi:10.1016/s0092-8674(00)00008-8
66. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479–89. doi:10.1016/s0092-8674(00)80434-1
67. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770–6. doi:10.1038/35037710
68. Debatin K-M, Fulda S, editors. *Apoptosis and Cancer Therapy.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2006.
69. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012;119(3):651–65. doi:10.1182/blood-2011-04-325225
70. Wajant H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science.* 2002;296(5573):1635–6. doi:10.1126/science.1071553
71. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The 'complexities' of life and death: Death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res.* 2012;318(11):1269–77. doi:10.1016/j.yexcr.2012.04.005
72. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 2):265–7. doi:10.1242/jcs.01610
73. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000;407(6805):789–95. doi:10.1038/35037728

74. Karstedt S v., Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(6):352–66. doi:10.1038/nrc.2017.28
75. Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*. 2016;26(9):655–67. doi:10.1016/j.tcb.2016.04.006
76. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012;149(7):1536–48. doi:10.1016/j.cell.2012.05.014
77. Xu S, Wang P, Zhang H, Gong G, Gutierrez Cortes N, Zhu W, Yoon Y, Tian R, Wang W. CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation. *Nat Commun*. 2016;7:13189. doi:10.1038/ncomms13189
78. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999;399(6735):483–7. doi:10.1038/20959
79. Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, Linkermann A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;35:24–32. doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.006
80. Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He W-T, Song Y, Yang C, Li W, Zheng X, Chen P, Han J. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*. 2014;24(1):105–21. doi:10.1038/cr.2013.171
81. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012;148(1-2):213–27. doi:10.1016/j.cell.2011.11.031
82. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, Kang R, Tang D. Ferroptosis: Process and function. *Cell Death Differ*. 2016;23(3):369–79. doi:10.1038/cdd.2015.158
83. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol*. 2014;10(1):9–17. doi:10.1038/nchembio.1416

84. Shimada K, Skouta R, Kaplan A, Yang WS, Hayano M, Dixon SJ, Brown LM, Valenzuela CA, Wolpaw AJ, Stockwell BR. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nat Chem Biol.* 2016;12(7):497–503. doi:10.1038/nchembio.2079
85. Zilka O, Shah R, Li B, Friedmann Angeli JP, Griesser M, Conrad M, Pratt DA. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci.* 2017;3(3):232–43. doi:10.1021/acscentsci.7b00028
86. Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(4):245–54. doi:10.1016/j.tibs.2016.10.004
87. Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, Stacey KJ. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(3):319–26. doi:10.1016/j.mib.2013.04.004
88. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature.* 2016;535(7610):153–8. doi:10.1038/nature18629
89. Virág L, Robaszkiewicz A, Rodriguez-Vargas JM, Oliver FJ. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med.* 2013;34(6):1153–67. doi:10.1016/j.mam.2013.01.007
90. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* 2007;131(5):966–79. doi:10.1016/j.cell.2007.10.040
91. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):581–8. doi:10.1038/cdd.2011.1
92. Desai J, Kumar SV, Mulay SR, Konrad L, Romoli S, Schauer C, Herrmann M, Bilyy R, Müller S, Popper B, Nakazawa D, Weidenbusch M, Thomasova D, Krautwald S, Linkermann A, Anders H-J. PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *Eur J Immunol.* 2016;46(1):223–9. doi:10.1002/eji.201545605

93. Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 9):1905–12. doi:10.1242/jcs.091181
94. Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(6). doi:10.1101/cshperspect.a008813
95. Bezu L, Gomes-de-Silva LC, Dewitte H, Breckpot K, Fucikova J, Spisek R, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. *Front Immunol.* 2015;6:187. doi:10.3389/fimmu.2015.00187
96. Sperandio S, Belle I de, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14376–81. doi:10.1073/pnas.97.26.14376
97. Sperandio S, Poksay K, Belle I de, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE. Paraptosis: Mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* 2004;11(10):1066–75. doi:10.1038/sj.cdd.4401465
98. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Di Domizio A, Limonta P. The emerging role of paraptosis in tumor cell biology: Perspectives for cancer prevention and therapy with natural compounds. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020;1873(2):188338. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188338
99. Wei T, Kang Q, Ma B, Gao S, Li X, Liu Y. Activation of autophagy and paraptosis in retinal ganglion cells after retinal ischemia and reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med.* 2015;9(2):476–82. doi:10.3892/etm.2014.2084
100. Torriglia A, Valamanesh F, Behar-Cohen F. On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1878–86. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.012
101. Valamanesh F, Torriglia A, Savoldelli M, Gandolphe C, Jeanny J-C, BenEzra D, Behar-Cohen F. Glucocorticoids induce retinal toxicity through mechanisms mainly associated with paraptosis. *Mol Vis.* 2007;13:1746–57.
102. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev.* 2018;98(2):813–80. doi:10.1152/physrev.00011.2017
103. HCT 116 ATCC ® CCL-247™ Homo sapiens colon colorectal carcin [Internet] [cited 2018 Nov 15]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-247.aspx?geo_country=de

104. Vilgelm AE, Washington MK, Wei J, Chen H, Prassolov VS, Zaika AI. Interactions of the p53 protein family in cellular stress response in gastrointestinal tumors. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(3):693–705. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0912
105. U-937 ATCC ® CRL-1593.2™ Homo sapiens Pleura/pleural effusio [Internet] [cited 2018 Nov 15]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx?geo_country=de
106. Jin J, Samuvel DJ, Zhang X, Li Y, Lu Z, Lopes-Virella MF, Huang Y. Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. *Mol Immunol.* 2011;49(3):423–32. doi:10.1016/j.molimm.2011.08.026
107. 293 [HEK-293] ATCC® CRL-1573™ [Internet] [cited 2018 Nov 15]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo_country=de
108. hTLR and mTLR Cell-based Assays | InvivoGen [Internet] [cited 2018 Nov 15]. Available from: <https://www.invivogen.com/hek-blue-tlr2>
109. Alvarado-Tapias E, Guarner-Argente C, Oblitas E, Sánchez E, Vidal S, Román E, Concepción M, Poca M, Gely C, Pavel O, Nieto JC, Juárez C, Guarner C, Soriano G. Toll-like receptor 4 polymorphisms and bacterial infections in patients with cirrhosis and ascites. *World J Hepatol.* 2018;10(1):124–33. doi:10.4254/wjh.v10.i1.124
110. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11(4):443–51.
111. Jang B-C, Jung T-Y, Paik J-H, Kwon Y-K, Shin S-W, Kim S-P, Ha J-S, Suh M-H, Suh S-I. Tetradecanoyl phorbol acetate induces expression of Toll-like receptor 2 in U937 cells: Involvement of PKC, ERK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(1):70–7. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.144
112. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* 2009;227(1):106–28. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x

113. Wallberg F, Tenev T, Meier P. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(4):pdb.prot087387. doi:10.1101/pdb.prot087387
114. Wiedemann N, Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem.* 2017;685–714. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014352
115. Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, Polticelli F, Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *Int J Biol Macromol.* 2019;1237–46. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180
116. van Veggel M, Westerman E, Hamberg P. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Panobinostat. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57(1):21–9. doi:10.1007/s40262-017-0565-x
117. Neubert P. Bacterial-induced cell death in SBP – the role of the p53 family. Regensburg: Universität Regensburg; 2021.
118. Chauvier D, Ankri S, Charriaut-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E. Broad-spectrum caspase inhibitors: From myth to reality? *Cell Death Differ.* 2007;14(2):387–91. doi:10.1038/sj.cdd.4402044
119. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, Sergio F. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: The reasons why. *Free Radic Res.* 2018;52(7):751–62. doi:10.1080/10715762.2018.1468564
120. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 2007;130(5):797–810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049
121. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e97088. doi:10.1371/journal.pone.0097088
122. Collatz MB, Rüdell R, Brinkmeier H. Intracellular calcium chelator BAPTA protects cells against toxic calcium overload but also alters physiological calcium responses. *Cell Calcium.* 1997;21(6):453–9. doi:10.1016/s0143-4160(97)90056-7

123. Haderer M. Spontan bakterielle Peritonitis bei Leberzirrhose – Mechanismen der Pathogenese und Identifizierung potentieller Biomarker. Regensburg: Universität Regensburg; 2019.
124. Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R, Beko A, Levea C, Sharratt E, Mazurchuk R, Hoffman RM, Brattain MG, Wang J. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *J Surg Res.* 2008;147(2):276–81. doi:10.1016/j.jss.2007.04.021
125. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 1981;41(5):1751–6.
126. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123–40. doi:10.1038/nrmicro818
127. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2014;60(1):197–209. doi:10.1016/j.jhep.2013.07.044
128. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology.* 2005;41(3):422–33. doi:10.1002/hep.20632
129. Schmid S, Scherm S, Haderer M, Gülow K, Müller-Schilling M. Infektionen bei Leberzirrhose – von bakterieller Translokation über spontan-bakterielle Peritonitis und Pneumonie zum akut-auf-chronischen Leberversagen. *Gastroenterologie.* 2020;15(3):201–10. doi:10.1007/s11377-020-00439-6
130. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: Pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* 2013;33(1):31–9. doi:10.1111/liv.12021
131. Lewis K, Lutgendorff F, van Phan, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(7):1138–48. doi:10.1002/ibd.21177
132. Wells CL. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplant Proc.* 1996;28(5):2653–6.
133. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis.* 1988;157(5):1032–8. doi:10.1093/infdis/157.5.1032

134. Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect.* 2008;10(4):424–31. doi:10.1016/j.micinf.2008.01.001
135. Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology.* 2005;115(4):565–74. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x
136. Doan HQ, Bowen KA, Jackson LA, Evers BM. Toll-like receptor 4 activation increases Akt phosphorylation in colon cancer cells. *Anticancer Res.* 2009;29(7):2473–8.
137. Guo H, Chen Y, Hu X, Qian G, Ge S, Zhang J. The regulation of Toll-like receptor 2 by miR-143 suppresses the invasion and migration of a subset of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2013;1277. doi:10.1186/1476-4598-12-77
138. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun.* 2003;71(6):3503–11. doi:10.1128/iai.71.6.3503-3511.2003
139. Hoffmann JC, Kroesen AJ. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. 2nd ed. s.l.: THIEME; 2009. ger.
140. Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology.* 2010;51(4):1327–33. doi:10.1002/hep.23440
141. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003;278(11):8869–72. doi:10.1074/jbc.C200651200
142. Kim Y-G, Park J-H, Shaw MH, Franchi L, Inohara N, Núñez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense

- after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008;28(2):246–57. doi:10.1016/j.immuni.2007.12.012
143. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: Intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*. 2003;5(9):581–92. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00304.x
144. Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun*. 2004;72(3):1487–95. doi:10.1128/iai.72.3.1487-1495.2004
145. Zaika AI, Wei J, Noto JM, Peek RM. Microbial Regulation of p53 Tumor Suppressor. *PLoS Pathog*. 2015;11(9):e1005099. doi:10.1371/journal.ppat.1005099
146. Bhardwaj V, Noto JM, Wei J, Andl C, El-Rifai W, Peek RM, Zaika AI. Helicobacter pylori bacteria alter the p53 stress response via ERK-HDM2 pathway. *Oncotarget*. 2015;6(3):1531–43. doi:10.18632/oncotarget.2828
147. Wei J, O'Brien D, Vilgelm A, Piazzuelo MB, Correa P, Washington MK, El-Rifai W, Peek RM, Zaika A. Interaction of Helicobacter pylori with gastric epithelial cells is mediated by the p53 protein family. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1412–23. doi:10.1053/j.gastro.2008.01.072
148. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000;404(6773):99–103. doi:10.1038/35003607
149. Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Müller M. Dominant negative (ΔN) p63 α induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(2):335–41. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.093
150. Chau BN, Chen T-T, Wan YY, DeGregori J, Wang JYJ. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation. *Mol Cell Biol*. 2004;24(10):4438–47. doi:10.1128/mcb.24.10.4438-4447.2004
151. Bargonetti J, Reynisdóttir I, Friedman PN, Prives C. Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev*. 1992;6(10):1886–98. doi:10.1101/gad.6.10.1886

152. Cheng CY, Gilson T, Dallaire F, Ketner G, Branton PE, Blanchette P. The E4orf6/E1B55K E3 Ubiquitin Ligase Complexes of Human Adenoviruses Exhibit Heterogeneity in Composition and Substrate Specificity. *J Virol.* 2011;85(2):765–75. doi:10.1128/JVI.01890-10
153. Bernard X, Robinson P, Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, Deryckere F, Travé G, Orfanoudakis G, Zhang Y. Proteasomal Degradation of p53 by Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Relies on the Structural Integrity of p53 Core Domain. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25981. doi:10.1371/journal.pone.0025981
154. Bergounioux J, Elisee R, Prunier A-L, Donnadiou F, Sperandio B, Sansonetti P, Arbibe L. 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.* 2012;11(3):240–52. doi:10.1016/j.chom.2012.01.013
155. Wu S, Ye Z, Liu X, Zhao Y, Xia Y, Steiner A, Petrof EO, Claud EC, Sun J. *Salmonella typhimurium* infection increases p53 acetylation in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(5):G784-94. doi:10.1152/ajpgi.00526.2009
156. Nagappan A, Park HS, Park KI, Hong GE, Yumnam S, Lee HJ, Kim MK, Kim EH, Lee WS, Lee WJ, Cho MJ, Lee WK, Won CK, Cho JH, Kim GS. *Helicobacter pylori* infection combined with DENA revealed altered expression of p53 and 14-3-3 isoforms in *Gulo*^{-/-} mice. *Chem Biol Interact.* 2013;206(2):143–52. doi:10.1016/j.cbi.2013.09.002
157. Bálint E, Bates S, Vousden KH. Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene.* 1999;18(27):3923–9. doi:10.1038/sj.onc.1202781
158. Wu H, Leng RP. MDM2 mediates p73 ubiquitination: A new molecular mechanism for suppression of p73 function. *Oncotarget.* 2015;6(25):21479–92. doi:10.18632/oncotarget.4086
159. Dean P, Mühlen S, Quitard S, Kenny B. The bacterial effectors EspG and EspG2 induce a destructive calpain activity that is kept in check by the co-delivered Tir effector. *Cell Microbiol.* 2010;12(9):1308–21. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01469.x

160. Le Jiang, Kon N, Li T, Wang S-J, Su T, Hibshoosh H, Baer R, Gu W. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*. 2015;520(7545):57–62. doi:10.1038/nature14344
161. Xie Y, Zhu S, Song X, Sun X, Fan Y, Liu J, Zhong M, Yuan H, Zhang L, Billiar TR, Lotze MT, Zeh HJ, Kang R, Kroemer G, Tang D. The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Rep*. 2017;20(7):1692–704. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.055
162. Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*. 1996;4(4):407–14. doi:10.1016/s1074-7613(00)80254-x
163. Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, Hagimoto N, Miyazaki H, Kaneko Y, Kawasaki M, Maeyama T, Hara N. Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;117(3):202–8. doi:10.1159/000024011
164. Böcker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, Kalina U, Herweck F, Rossol S, Singer MV. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18(1):25–32. doi:10.1007/s00384-002-0415-6
165. Arditi M, Zhou J, Torres M, Durden DL, Stins M, Kim KS. Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells. *J Immunol*. 1995;155(8):3994–4003.
166. Herrera-Velit P, Reiner NE. Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol*. 1996;156(3):1157–65.
167. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(1):125–30. doi:10.1016/0952-7915(94)90043-4

168. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol.* 2000;164(2):966–72. doi:10.4049/jimmunol.164.2.966
169. Choi KB, Wong F, Harlan JM, Chaudhary PM, Hood L, Karsan A. Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20185–8. doi:10.1074/jbc.273.32.20185
170. Barabutis N, Dimitropoulou C, Birmpas C, Joshi A, Thangjam G, Catravas JD. p53 protects against LPS-induced lung endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(8):L776-87. doi:10.1152/ajplung.00334.2014
171. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 2003;1(14):1001–8.
172. Monick MM, Carter AB, Robeff PK, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J Immunol.* 2001;166(7):4713–20. doi:10.4049/jimmunol.166.7.4713
173. Liu J, Zeng J, Wang X, Zheng M, Luan Q. P53 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2018;89(9):1142–51. doi:10.1002/JPER.18-0026
174. Eckmann L, Jung HC, Schürer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: Regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology.* 1993;105(6):1689–97. doi:10.1016/0016-5085(93)91064-o
175. Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic Escherichia coli. *Am J Physiol.* 1997;273(4):C1160-7. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1160
176. Tracey KJ, Lowry SF. The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv Surg.* 1990;23:21–56.
177. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31263–71. doi:10.1074/jbc.M111.238147

178. Clark E, Hoare C, Tanianis-Hughes J, Carlson GL, Warhurst G. Interferon gamma induces translocation of commensal *Escherichia coli* across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1258–67. doi:10.1053/j.gastro.2005.01.046
179. Lee FY, Lu RH, Tsai YT, Lin HC, Hou MC, Li CP, Liao TM, Lin LF, Wang SS, Lee SD. Plasma interleukin-6 levels in patients with cirrhosis. Relationship to endotoxemia, tumor necrosis factor-alpha, and hyperdynamic circulation. *Scand J Gastroenterol*. 1996;31(5):500–5. doi:10.3109/00365529609006772
180. Lemercier C. When our genome is targeted by pathogenic bacteria. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(14):2665–76. doi:10.1007/s00018-015-1900-8
181. Günther SD, Fritsch M, Seeger JM, Schiffmann LM, Snipas SJ, Coutelle M, Kufer TA, Higgins PG, Hornung V, Bernardini ML, Höning S, Krönke M, Salvesen GS, Kashkar H. Cytosolic Gram-negative bacteria prevent apoptosis by inhibition of effector caspases through lipopolysaccharide. *Nat Microbiol*. 2020;5(2):354–67. doi:10.1038/s41564-019-0620-5
182. Ashida H, Kim M, Sasakawa C. Manipulation of the host cell death pathway by *Shigella*. *Cell Microbiol*. 2014;16(12):1757–66. doi:10.1111/cmi.12367
183. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J*. 2000;14(12):1749–53. doi:10.1096/fj.99-0898com
184. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006;313(5788):848–51. doi:10.1126/science.1127059
185. Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: Implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(1):16–26. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03447.x
186. Moss JE, Aliprantis AO, Zychlinsky A. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *Int Rev Cytol*. 1999;187:203–59. doi:10.1016/s0074-7696(08)62419-5

187. Chin AC, Flynn AN, Fedwick JP, Buret AG. The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(10):1043–50. doi:10.1139/y06-056
188. Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): Implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.* 2001;8(6):588–94. doi:10.1038/sj.cdd.4400851
189. Chumduri C, Gurumurthy RK, Zadora PK, Mi Y, Meyer TF. Chlamydia infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response. *Cell Host Microbe.* 2013;13(6):746–58. doi:10.1016/j.chom.2013.05.010
190. Faherty CS, Maurelli AT. Spa15 of *Shigella flexneri* is secreted through the type III secretion system and prevents staurosporine-induced apoptosis. *Infect Immun.* 2009;77(12):5281–90. doi:10.1128/IAI.00800-09
191. Vielfort K, Söderholm N, Weyler L, Vare D, Löfmark S, Aro H. *Neisseria gonorrhoeae* infection causes DNA damage and affects the expression of p21, p27 and p53 in non-tumor epithelial cells. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 1):339–47. doi:10.1242/jcs.117721
192. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40(2):179–204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019
193. Price BD, D'Andrea AD. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell.* 2013;152(6):1344–54. doi:10.1016/j.cell.2013.02.011
194. Carneiro LAM, Travassos LH, Soares F, Tattoli I, Magalhaes JG, Bozza MT, Plotkowski MC, Sansonetti PJ, Molkentin JD, Philpott DJ, Girardin SE. *Shigella* induces mitochondrial dysfunction and cell death in nonmyeloid cells. *Cell Host Microbe.* 2009;5(2):123–36. doi:10.1016/j.chom.2008.12.011
195. Kamiński MM, Sauer SW, Kamiński M, Opp S, Ruppert T, Grigaravičius P, Grudnik P, Gröne H-J, Krammer PH, Gülow K. T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell Rep.* 2012;2(5):1300–15. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.009
196. Mossine VV, Waters JK, Chance DL, Mawhinney TP. Transient Proteotoxicity of Bacterial Virulence Factor Pyocyanin in Renal Tubular Epithelial Cells Induces

ER-Related Vacuolation and Can Be Efficiently Modulated by Iron Chelators.
Toxicol Sci. 2016;154(2):403–15. doi:10.1093/toxsci/kfw174

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Annika Scholtis, geboren am 19.03.1996 in Regensburg, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater*in oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling für die Überlassung des spannenden Themas meiner Doktorarbeit und für die Möglichkeit, die Forschungsarbeit für meine Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg durchführen zu dürfen. Die interessanten Forschungsseminare haben mir dabei einen faszinierenden Einblick in weitere Forschungsfelder der Gastroenterologie ermöglicht und die stets äußerst konstruktive Kritik zu aktuellen Entwicklungen im Rahmen meines Forschungsprojekts trug maßgeblich zum Gelingen meiner Doktorarbeit bei. Ausgesprochen dankbar bin ich Prof. Dr. med. Müller-Schilling vor allem für die Gelegenheit an zahlreichen Kongressen teilzunehmen und wertvolle Erfahrungen beim Vorstellen meiner Forschungsdaten sammeln zu dürfen. Hierbei durfte ich auch jederzeit auf die großartige Unterstützung von Prof. Dr. med. Müller-Schilling bei der Präsentation meiner Forschungsergebnisse zählen.

PD Dr. Claudia Kunst und PD Dr. Karsten Gülow danke ich außerordentlich für die wertvolle Unterstützung bei der Planung und Umsetzung von Experimenten, die wegweisende Hilfe beim Verfassen von Abstracts sowie für das sorgfältige und außerordentlich konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Beim Team der AG Müller-Schilling, und hier vor allem bei Dr. Marika Haderer, bedanke ich mich nachdrücklich für die tatkräftige Unterstützung bei diversen Versuchen und die großartige Hilfe bei kleineren und größeren Schwierigkeiten im Laboralltag.

Dr. Marika Haderer und Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius (Institut für Pathologie, Universität Regensburg) danke ich zudem sehr herzlich für die Anfertigung und Überlassung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben und auf diesem Weg mit moralischer Unterstützung und unzähligen aufmunternden Worten immer für mich da waren.

Ohne Ihre und eure Unterstützung hätte es diese Arbeit nicht in ihrer jetzigen Form gegeben, herzlichen Dank dafür!