

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer

**Charakterisierung intestinaler Barriereveränderungen bei Ratten
nach Roux-en-Y Magenbypass**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Theresa Christina Langseder

aus Kaufbeuren

Würzburg, September 2022

Referent: Professor Dr. med. Nicolas Schlegel

Korreferent: Professor Dr. med. Martin Fassnacht

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Adipositas	1
1.1.1	Definition	2
1.1.2	Therapieoptionen bei Adipositas	3
1.2	Die bariatrische Chirurgie.....	4
1.2.1	Indikationsstellung	5
1.3	Die Physiologie des RYGB.....	6
1.3.1	Die Auswirkungen des RYGB auf gastrointestinale Hormone.....	8
1.3.2	Die Auswirkungen des RYGB auf den Gallensäurestoffwechsel	12
1.3.3	Die Auswirkungen des RYGB auf das intestinale Mikrobiom	14
1.3.4	Die Auswirkungen des RYGB auf die systemische Endotoxämie	16
1.3.5	Die Auswirkungen des RYGB auf die intestinale epitheliale Barriere	17
1.4	Bedeutung der Darmbarriere	18
1.4.1	Aufbau der Darmbarriere	19
1.5	Regulation der intestinalen Permeabilität und klinische Relevanz.....	29
1.6	Aktueller Forschungsstand und Fragestellung	32
2	Material und Methoden	34
2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	34
2.1.1	Genehmigung des Versuchsvorhabens	34
2.1.2	Versuchstiere	34
2.1.3	Tierhaltung	34
2.1.4	Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll	34
2.1.5	Operationsablauf und Technik.....	35
2.2	Material	36
2.2.1	Zellkultur.....	36
2.2.2	Pufferrezepturen	39
2.2.3	Oligonukleotidprimer für die PCR.....	40
2.2.4	Antikörper für den Western Blot	40
2.3	Experimentelle Methoden.....	42
2.3.1	Herstellung der Gewebelysate	42
2.3.2	Aufbereitung des Darminhalts	43
2.3.3	Behandlung der Zellen mit Darminhalt.....	46
2.3.4	Herstellung der Zelllysate	46
2.3.5	Permeabilitätsmessung mittels Transwellfiltersystem	46

2.3.6	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes	48
2.3.7	Western Blot	49
2.3.8	Transkriptionsanalyse	53
2.4	Statistische Auswertung	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Veränderung von Proteinen der Occludenskontakte nach RYGB in den Vollwandresektaten	60
3.2	Transfereexperimente	67
3.2.1	Veränderung der Barrierefunktion der Caco2-Zellen nach Behandlung mit gepooltem Darminhalt	68
3.2.2	Der Schlussleistenkomplex in Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt	74
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	86
4	Diskussion	88
4.1	Die Vollwandresektate der RYGB-operierten Ratten zeigen regionenspezifische Veränderungen der analysierten Barriereproteine	89
4.2	Der Darminhalt von RYGB-operierten Ratten stabilisiert direkt die Barrierefunktion in Caco2-Zellen	91
4.3	Diskussion möglicher Luminalfaktoren, die die barrierestabilisierenden Effekte vermitteln	92
4.3.1	Tryptophanderivate	93
4.3.2	Kurzkettige Fettsäuren	94
4.3.3	Gallensäuren	94
4.4	Die DSG 2-Proteinmenge in Caco2-Zellen korreliert mit den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen	97
4.5	Ausblick	98
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	100

Appendix

- I Abkürzungsverzeichnis
- II Abbildungsverzeichnis
- III Tabellenverzeichnis
- IV Danksagung
- V Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Fettleibigkeit ist heutzutage ein globales Gesundheitsproblem. Nach aktuellen Statistiken der World Health Organization (WHO) galten im Jahr 2016 bis zu 39 % der über 18-jährigen Weltbevölkerung als übergewichtig. Als übergewichtig gilt, wer einen Body Mass Index (BMI) von über $25,0 \text{ kg/m}^2$ hat. Damit hat sich die Prävalenz der Fettleibigkeit weltweit seit 1975 nahezu verdreifacht (World Health Organization, 2021). Die Prävalenz der Fettleibigkeit in Deutschland ist ebenfalls alarmierend. Laut Daten der GEDA 2014/2015 EHIS Studie sind in Deutschland 54 % der Erwachsenen übergewichtig einschließlich adipös (Schienkiewitz et al., 2017). Die sozialen und wirtschaftlichen Auswirkungen dieser Epidemie sind weitreichend und belasten nicht nur durch Komorbiditäten wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 2 (T2D), Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebserkrankungen (Guh et al., 2009) die Patientinnen und Patienten selbst, sondern durch höhere Gesundheitsausgaben für adipöse Patientinnen und Patienten gegenüber normalgewichtigen (Cawley & Meyerhoefer, 2012) auch unser Gesundheitssystem. Durch Fehlzeiten und Produktivitätsverluste kommen weitere Kosten hinzu, die die wirtschaftspolitische Relevanz der Adipositas für unsere Gesellschaft noch verstärken. Die nachfolgende Abbildung 1 stellt die Gewichtsverteilung der deutschen Bevölkerung graphisch dar. Dabei ist deutlich ersichtlich, dass der Anteil der normalgewichtigen Frauen nur etwa die Hälfte ausmacht, wohingegen der Anteil normalgewichtiger Männer sogar weniger als die Hälfte der männlichen Bevölkerung darstellt.

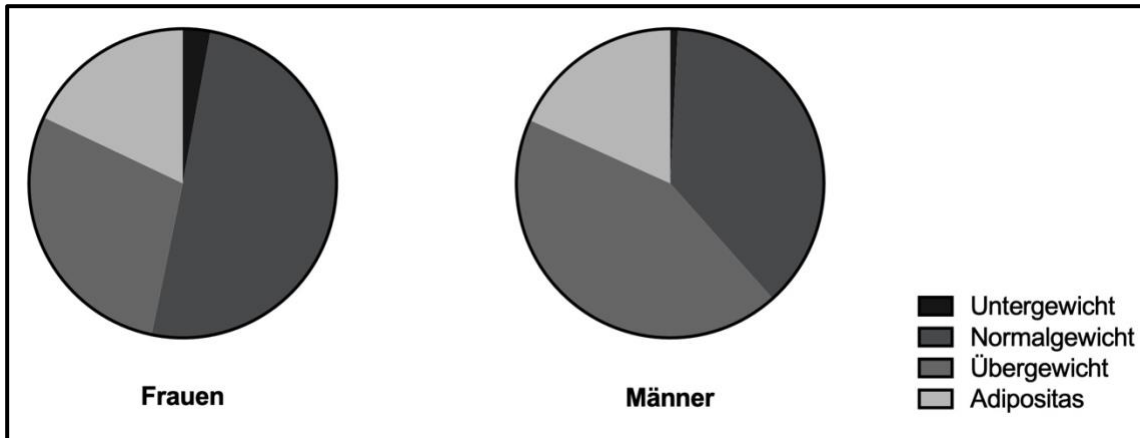


Abbildung 1: Gewichtsverteilung der Bevölkerung Deutschlands

Abbildung 1 stellt die Gewichtsverteilung der Bevölkerung Deutschlands graphisch dar. Das Gewicht wurde dafür anhand des BMI definiert. Für Untergewicht gilt ein BMI von weniger als 18,5 kg/m², für Normalgewicht gilt ein BMI zwischen 18,5 kg/m² und weniger als 25,0 kg/m², für Übergewicht gilt ein BMI von mehr als 25,0 kg/m² bis weniger als 30,0 kg/m² und für Adipositas gilt ein BMI von mehr als 30,0 kg/m² (World Health Organization, 2000) (eigene Abbildung auf Basis von Schienkiewitz et al., 2017). **BMI** = Body Mass Index.

1.1.1 Definition

Adipositas ist ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsbild, welches sich durch eine über die Norm hinausgehende Vermehrung des Körperfetts, die eine Beeinträchtigung der Gesundheit zur Folge haben kann, definiert (Ogden et al., 2007). Da es schwierig ist Körperfett direkt zu messen, wird Adipositas häufig als übermäßiges Körpergewicht und nicht als übermäßiges Fett definiert (Ogden et al., 2007). Um Adipositas für epidemiologische Studien zu klassifizieren, hat sich der BMI als nützliches, wenn auch grobes Maß für Fettleibigkeit auf Bevölkerungsebene etabliert (World Health Organization, 2000). Der BMI berechnet sich wie folgt:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Körpergröße in m})^2}$$

Der BMI ist eine geschlechts- und altersunabhängige Größe. Die nachfolgende Tabelle 1 definiert Übergewicht sowie Adipositas Grad I, II und III anhand des BMI. Zudem stellt die Tabelle eine vereinfachte Beziehung zwischen dem BMI und dem Risiko Folgeerkrankungen zu entwickeln dar. Neben dem Gewicht wird das Risiko durch eine Reihe weiterer Faktoren beeinflusst, darunter die Art der Ernährung, die ethnische Gruppe und das Aktivitätsniveau (World Health Organization, 2000).

Tabelle 1: Klassifikation der Adipositas bei Erwachsenen gemäß dem BMI

Tabelle 1 definiert das Übergewicht eines Erwachsenen anhand des BMI. Die Tabelle zeigt eine vereinfachte Beziehung zwischen dem BMI und dem Risiko eine Komorbidität zu entwickeln (modifiziert nach World Health Organization, 2000). **BMI** = Body Mass Index.

Kategorie	BMI (kg/m ²)	Risiko für Folgeerkrankungen
Übergewicht	25,0 - 29,9	gering erhöht
Adipositas Grad I	30,0 - 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35,0 - 39,9	hoch
Adipositas Grad III	≥ 40,0	sehr hoch

Der BMI stellt allerdings nur ein grobes Maß des Körperfettanteils dar und lässt die Körperproportionen sowie Fettverteilung komplett außen vor. Adipositas prädisponiert für Folgeerkrankungen, von denen oben bereits drei wichtige genannt worden sind. Für genauere Berechnungen des Risikos von Adipositas-assoziierten Folgeerkrankungen ist ein Wissen um die Fettverteilung entscheidend. Hierfür kann der Taillenumfang als Maß verwendet werden. Er stellt, verglichen mit dem BMI, einen besseren Prädiktor für kardiovaskuläre und metabolische Folgen der Adipositas, insbesondere dem T2D dar (Klein et al., 2007). Er korreliert zudem mit dem im Computertomographen gemessenen viszeralen Fettgewebe (Pouliot et al., 1994). Eine Expertenkommission der WHO überprüfte im Jahr 2000 die vorhandenen Daten über den Zusammenhang zwischen Taillenumfang und Morbidität und empfahl geschlechtsspezifische Cut-off-Werte. Ein Taillenumfang von über 94 cm bei Männern sowie über 80 cm bei Frauen weist auf ein erhöhtes Risiko metabolischer Komplikationen hin (World Health Organization, 2000).

1.1.2 Therapieoptionen bei Adipositas

Aufgrund der schwerwiegenden persönlichen, sozialen und ökonomischen Folgen der Adipositas für Individuum und Gesellschaft sind effektive und nachhaltige Therapieansätze nötig. Diese lassen sich unterteilen in konservative, also nicht-operative, und chirurgische Therapien (AWMF, 2018). Im Folgenden wird lediglich auf die chirurgische Therapie eingegangen. Unabhängig von der Art der durchgeführten bariatrischen Operation sind die Auswirkungen auf den Gewichtsverlust und die damit verbundenen Komorbiditäten den nicht-chirurgischen Eingriffen überlegen (Colquitt et al., 2014). Die Operationen stellen somit effektive Therapiemethoden mit andauerndem Erfolg dar.

1.2 Die bariatrische Chirurgie

Die bariatrische Chirurgie ist ein Spezialgebiet der Viszeralchirurgie und umfasst alle chirurgischen Behandlungsmethoden der Adipositas. Die Zahl der adipositaschirurgischen Eingriffe lag in Deutschland 2018 bei etwa 12.000 (Germer & Seyfried, 2018). Weltweit kam es seit Ende der 1990er Jahre zu einer deutlichen Zunahme der Eingriffe (Angrisani et al., 2015). Dies liegt vermutlich unter anderem an der Weiterentwicklung der operativen Technik und der daraus hervorgegangenen Senkung der Mortalität (Nguyen et al., 2016). Einer der wichtigsten Fortschritte der die bariatrische Versorgung revolutionierte, war die Entwicklung der laparoskopischen Technik einer Magenbypass-Operation im Jahr 1994 (Wittgrove et al., 1994). 2013 wurden bereits 95,7 % der adipositaschirurgischen Operationen laparoskopisch durchgeführt (Angrisani et al., 2015). Darüber hinaus trägt wahrscheinlich vor allem die Tatsache, dass die operativen Eingriffe bezogen auf den Gewichtsverlust den konservativen Therapien überlegen sind, zur Zunahme der Eingriffe bei (Colquitt et al., 2014).

Die operativen Eingriffe lassen sich grob in malabsorptive Verfahren, restriktive Verfahren sowie die Kombination beider Verfahren gliedern. Primäres Ziel ist es, die Anatomie und Physiologie des Magen-Darm-Trakts so zu verändern, dass eine nachhaltige Gewichtsreduktion möglich ist. Nahrungsrestriktion lässt sich dabei durch die Verkleinerung des Magenvolumens erreichen, während Malabsorption durch eine funktionelle Verkürzung der Dünndarmpassage erreicht wird. Im Mittel wird dabei ein Jahr nach der Operation eine Gewichtsreduktion von 13,5 BMI-Punkten erzielt (Chang et al., 2014). Nicht nur im Hinblick auf die Gewichtsreduktion ist die chirurgische Therapie den konservativen Therapieverfahren überlegen, sondern auch im Hinblick auf die Kontrolle der Komorbiditäten und die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten (Colquitt et al., 2014). Die Effektgröße der bariatrischen Chirurgie geht somit weit über die reine Gewichtsabnahme hinaus. Die oben beschriebene mechanische Einteilung in malabsorptive und restriktive Verfahren wird den komplexen Veränderungen, die sich nach bariatrischer Chirurgie im Körper vollziehen, nicht gerecht und ist eventuell sogar von untergeordneter Bedeutung (Arble et al., 2015). Inzwischen ist bekannt, dass die bariatrische Chirurgie weitaus komplexere Auswirkungen auf den Organismus hat (Corteville et al., 2014). Daher sollte die Einteilung in malabsorptiv und restriktiv aufgrund der zu einfachen Darstellung verlassen werden.

1.2.1 Indikationsstellung

Der chirurgischen Therapie muss zunächst ein konservativer, multimodaler Behandlungsversuch über mehr als sechs Monate vorausgehen. Dieser beinhaltet eine Ernährungsumstellung, Bewegungstherapie und Verhaltensmodifikation, welche medikamentös unterstützt werden kann (AWMF, 2018). Die konservativen Maßnahmen gelten als erschöpft, wenn der Therapieversuch innerhalb der letzten zwei Jahre nicht zu einer Gewichtsabnahme von über 15 % bei einem BMI zwischen 35,0 kg/m² und 39,9 kg/m² oder über 20 % bei einem BMI von 40,0 kg/m² oder mehr führte (AWMF, 2018). Die Indikation für einen adipositaschirurgischen Eingriff kann gestellt werden, wenn der konservative Therapieversuch gescheitert ist und der BMI über 40,0 kg/m² oder über 35,0 kg/m² liegt und bereits Folgeerkrankungen eingetreten sind. Liegt der BMI über 50,0 kg/m², kann auch ohne vorausgegangene konservative Therapie eine Primärindikation gestellt werden (AWMF, 2018).

Die Verbesserung metabolischer Parameter nach adipositaschirurgischen Eingriffen ist mehr als nur ein Nebeneffekt dieser. Daher bezeichnet der Begriff „metabolische Chirurgie“ Eingriffe, bei denen die Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage im Vordergrund steht (Rubino et al., 2014). Es ist inzwischen bewiesen, dass die Verbesserung des T2D nicht nur auf die Gewichtsreduktion zurückzuführen ist, sondern dass die veränderte Anatomie über eine Modifikation der intestinalen Hormonfreisetzung, eine Veränderung des Gallensäurestoffwechsels und ein verändertes Mikrobiom zu einer Verbesserung des Glucosestoffwechsels führt (Batterham & Cummings, 2016; Corteville et al., 2014; Pournaras et al., 2012). Diese Veränderungen werden im Abschnitt 1.3 genauer aufgeführt. Die Indikation für einen metabolischen Eingriff kann bei einem BMI > 40,0 kg/m² und einem koexistenten T2D auch ohne vorausgegangene konservative Therapie gestellt werden. Auch Patientinnen und Patienten mit einem BMI zwischen 35,0 kg/m² und 40,0 kg/m² und einem koexistenten T2D, bei denen es in der Vergangenheit nicht gelang, die individuellen diabetesspezifischen Zielwerte gemäß der nationalen Versorgungsleitlinie zu erreichen, sollte eine metabolische Operation empfohlen werden. Bei Patientinnen und Patienten mit einem BMI zwischen 30 kg/m² und 35 kg/m² und einem T2D, bei denen es ebenfalls nicht gelang die individuellen diabetesspezifischen Zielwerte gemäß der nationalen Versorgungsleitlinie zu erreichen, sollte ein Eingriff in Erwägung gezogen werden (AWMF, 2018). Es existiert kein für alle Patientinnen und Patienten pauschal zu empfehlendes Operationsverfahren (AWMF, 2018), da sich die Wirkweisen, die Effekte und die Auswirkungen auf bestehende Begleiterkrankungen der adipositaschirurgischen

und der metabolischen Operationen deutlich unterscheiden (Padwal et al., 2011). Die Verfahrenswahl sollte daher unter Berücksichtigung individueller Faktoren wie dem BMI, den Komorbiditäten aber auch psychosozialen Faktoren, individuell und unter Berücksichtigung des Patientenwunsches erfolgen (AWMF, 2018). Bezogen auf die Gewichtsabnahme und die Verbesserung der Komorbiditäten sind der Roux-en-Y Magenbypass (RYGB) sowie die Schlauchmagen-Operation effektiver als andere Verfahren. Bei Personen mit sehr hohem BMI führt allerdings die biliopankreatische Diversion mit duodenalem Switch zu einer größeren Gewichtsabnahme als die RYGB-Operation (Colquitt et al., 2014). Die RYGB- und die Schlauchmagen-Operation sind die in Deutschland am häufigsten durchgeführten Verfahren (Angrisani et al., 2015; AWMF, 2018). Die Eingriffe werden hierzulande an zertifizierten Zentren durchgeführt (AWMF, 2018).

1.3 Die Physiologie des RYGB

Da die Experimente für diese Arbeit ausschließlich an Ratten, die zuvor eine RYGB-Operation erhalten haben, durchgeführt worden sind, wird im Folgenden lediglich diese Operationstechnik genauer vorgestellt. Der Magenbypass wurde erstmals 1969 von Edward E. Mason und Chikashi Ito durchgeführt (Mason & Ito, 1969). Heute wird er in der Regel in einer modifizierten Version der laparoskopischen Technik von Wittgrove et al. operiert (AWMF, 2018; Wittgrove et al., 1994). Das Pouch-Volumen wurde angepasst und die Rekonstruktion des Dünndarms modifiziert, um einen Gallerückfluss in den Magen zu verhindern. Der Pouch wird mit einem Volumen von ca. 15 - 30 ml angelegt und der Restmagen wird vom Nahrungsfluss ausgeschlossen und verbleibt im Körper. Anschließend erfolgt die Rekonstruktion des Dünndarms nach Roux-en-Y. Hier wird die biliopankreatische Schlinge auf ca. 50 cm und die alimentäre Schlinge auf 150 cm ausgemessen. Die alimentäre Schlinge wird an die Pouchhinterwand anastomosiert. Der Wiederanschluss der biliopankreatischen Schlinge erfolgt in der Regel als End-zu-Seit-Anastomose (AWMF, 2018; Nguyen et al., 2016). Die nachfolgende Abbildung 2 zeigt eine schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung der Anatomie des oberen Gastrointestinaltrakts vor und nach einer RYGB-Operation.

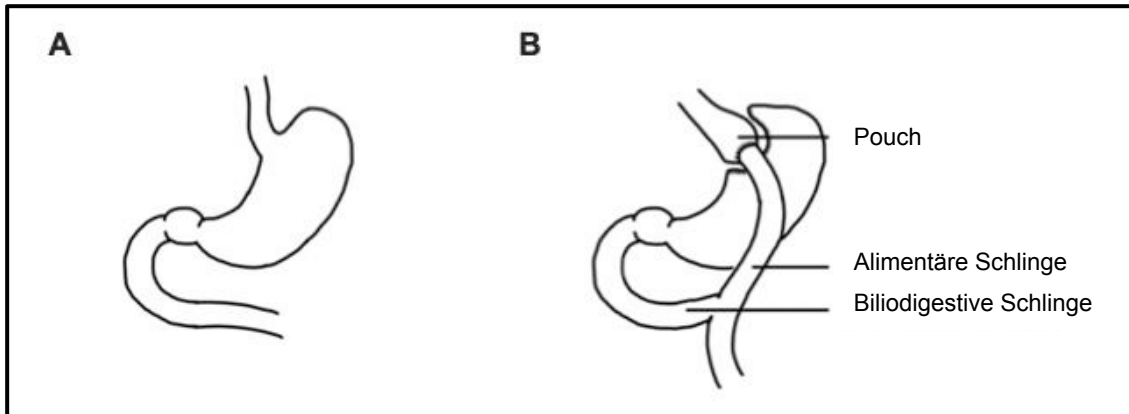


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anatomie des oberen Gastrointestinaltrakts vor und nach der Anlage eines RYGB

Die Abbildung 2 zeigt in **A** die Anatomie des oberen Gastrointestinaltrakt präoperativ, sowie in **B** die Rekonstruktion nach RYGB. Es handelt sich hierbei nicht um eine maßstabsgetreue Darstellung. Die alimentäre Schlinge wird in der Regel auf ca. 150 cm vermessen, die biliodigestive Schlinge auf 50 cm (modifiziert nach Hankir et al., 2020). **RYGB** = Roux-en Y Magenbypass.

Die Effektivität des RYGB im Hinblick auf den Gewichtsverlust und die Verbesserung von Komorbiditäten ist unbestritten. Keine derzeit verfügbare nicht-chirurgische Behandlungsmethode für morbid Adipositas erreicht die klinische Wirksamkeit von metabolischen Operationen wie dem RYGB (Colquitt et al., 2014). Der Eingriff führt ein Jahr nach der Operation zu einer Gewichtsreduktion um im Durchschnitt 14,5 BMI-Punkte. Die Gewichtsreduktion ist dabei über die folgenden Jahre anhaltend (Chang et al., 2014). Ebenso führt die RYGB-Operation in 77 % der Fälle zu einer Remission des T2D (Panunzi et al., 2015). Auch weitere Folgeerkrankungen wie der arterielle Hypertonus, die Dyslipidämie oder die Schlafapnoe konnten durch die Operation signifikant verbessert werden (Chang et al., 2014). Die molekularen Wirkmechanismen sind jedoch nicht abschließend geklärt. Fest steht, dass Malabsorption und Nahrungsrestriktion alleine nicht ausreichen, um die positiven Auswirkungen auf die Folgeerkrankungen der Adipositas zu erklären (Arble et al., 2015; Corteville et al., 2014). Ein multifaktorieller, weitaus komplexerer Wirkmechanismus gilt daher heute als gesichert (Corteville et al., 2014). Inwieweit sich die Adipositas-assoziierten Folgeerkrankungen aufgrund des induzierten Gewichtsverlustes verbessern, bzw. welche Rolle die veränderte Anatomie und Physiologie nach RYGB im Sinne eines magenbypassspezifischen, gewichtsunabhängigen Mechanismus spielt, ist teilweise unklar. Diese beiden Faktoren voneinander zu trennen, stellt mitunter eine wissenschaftliche Herausforderung dar. Beobachtungen, wie zum Beispiel, dass die anti-diabetische Wirkung des RYGB vor dem signifikanten Gewichtsverlust auftritt

(Pories et al., 1995; Pournaras et al., 2010), stützen jedoch die These eines magenbypassspezifischen, gewichtsunabhängigen Mechanismus, der die positiven Wirkungen vermittelt. Zudem sind die Effekte des RYGB auf die Diabetesremission, abgesehen von der biliopankreatischen Diversion, größer als bei anderen bariatrischen Operationen (Panunzi et al., 2015) und unabhängig von der Gewichtsabnahme (Pournaras et al., 2010).

Verschiedene Ursachen für die positiven postbariatrischen Effekte wurden in der Vergangenheit postuliert. Als mögliche Ursachen wurden eine veränderte Nahrungspräferenz (Le Roux et al., 2011), ein gesteigertes Sättigungsgefühl durch die Freisetzung von sättigungsfördernden Darmhormonen wie Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) (Korner et al., 2007) oder Peptid Tyrosin-Tyrosin (PYY) (Oliván et al., 2009), eine Verschiebung des Gallensäurestoffwechsels in Verbindung mit einer veränderten Signalübertragung über Rezeptoren wie zum Beispiel dem nuklearen Gallensäurerezeptor Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) (Arble et al., 2015; W. Wang et al., 2019), eine verringerte Endotoxämie (Monte et al., 2012), ein verändertes Mikrobiom (Ilhan et al., 2020) oder eine Stabilisierung der intestinalen epithelialen Barriere (IEB) (Wang et al., 2020) genannt. In den folgenden Abschnitten soll auf die genannten Faktoren genauer eingegangen werden.

1.3.1 Die Auswirkungen des RYGB auf gastrointestinale Hormone

Enteroendokrine Zellen machen etwa 1 % der Epithelzellpopulation des Gastrointestinaltrakts aus (Sternini et al., 2008). Sie bilden das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers und produzieren eine Vielzahl verschiedener Hormone und Signalmoleküle, die die vielfältigen Aspekte der Verdauungsphysiologie regulieren (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019; Sternini et al., 2008). Im Folgenden wird vor allem auf die gastrointestinalen Hormone GLP-1 und PYY aus den L-Zellen des distalen Ileum und Kolons sowie das glucoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP) aus den duodenalen K-Zellen eingegangen (Löffler, 2014; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

GLP-1 ist ein Inkretin, das nahrungsaufnahmeabhängig aus den L-Zellen des unteren Gastrointestinaltrakts ausgeschüttet wird, die Insulinausschüttung aus den β -Zellen des Pankreas steigert und so zu einer höheren Glucosetoleranz beiträgt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Der sogenannte Inkretineffekt beschreibt die höhere Insulinantwort auf oral zugeführte Glucose, vermittelt durch Darmhormone, im Vergleich zu intravenös aufgenommener Glucose (Nauck et al., 1986). Neben dem insulinotropen Effekt von GLP-1 führt das Hormon zu einer verzögerten Magenentleerung, einer Appetithemmung

(Lüllmann-Rauch & Asan, 2019), einer Hemmung der Glucagonausschüttung (Drucker, 2002) und darüber hinaus zu einem Gewichtsverlust (Todd & Bloom, 2007). So zeigten Patientinnen und Patienten nach Einnahme des Diabetesmedikamentes Exenatide, einem GLP-1 Rezeptoragonisten, einen signifikanten Gewichtsverlust (Todd & Bloom, 2007). Langwirksame GLP-1-Agonisten sind zwar T2D-Medikamente, die eine Gewichtsabnahme bewirken, doch ist das Ausmaß der Gewichtsabnahme deutlich geringer und beträgt schätzungsweise nur etwa ein Drittel der durch die metabolische Chirurgie erreichten Werte (Arble et al., 2015; Bode, 2011). Nach einer RYGB-Operation kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des GLP-1 Spiegels (Korner et al., 2007). Die verstärkte GLP-1 Antwort auf die Einnahme von Mahlzeiten oder auf eine orale Glucosebelastung tritt früh nach der Operation auf und ist weitgehend unabhängig vom Gewichtsverlust (Laferrère et al., 2007; Laferrère et al., 2008; Pournaras et al., 2010). Die vermehrte Ausschüttung und die daraus resultierende Wirkung auf die Insulinsekretion werden von vielen Arbeitsgruppen als Vermittler der im Vergleich zu Diät oder Magenband größeren Verbesserung der Glucosespiegel nach Magenbypass angesehen (Korner et al., 2007; Laferrère et al., 2008). Darüber hinaus konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass die verbesserte Glucosetoleranz nach duodenojenualem Bypass durch die Verabreichung eines GLP-1 Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann. Dies liefert elegant einen Beweis dafür, dass die Verbesserung der Glucosetoleranz nach einer dem RYGB technisch ähnlichen Operation mitunter durch eine verstärkte GLP-1 Wirkung vermittelt wird (Kindel et al., 2009). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Jiménez et al.. Diese zeigen, dass sich die post-operative Erhöhung der GLP-1 Spiegel nicht zwischen den Patientinnen und Patienten mit Diabetes-Remission und ohne Remission unterscheidet (Jiménez et al., 2013). Ihre Daten bestätigen zwar, dass die postprandiale GLP-1 Antwort bei Patientinnen und Patienten mit T2D nach RYGB langfristig erhöht ist, dass dies aber nicht unbedingt mit der Remission des T2D verbunden ist. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass GLP-1 allein nicht für die gesamte metabolische Wirkung der RYGB-Operation verantwortlich sein kann. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass hohe GLP-1-Spiegel in Verbindung mit anderen hormonellen Veränderungen, die nach Operationen auftreten, zu den starken Auswirkungen des Verfahrens auf die Glucoseregulierung beitragen (Arble et al., 2015). PYY ist ein appetitreduzierend (anorektisch) wirkendes Peptidhormon welches ebenfalls aus den L-Zellen stammt (Löffler, 2014). Eine klinische Studie konnte zeigen, dass PYY darüber hinaus Auswirkungen auf die Energiehomöostase des Menschen hat. Nach

Infusion von PYY erhöhte sich der Energieverbrauch der Studienteilnehmer signifikant. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Nahrungsaufnahme der Studienteilnehmer (Sloth et al., 2007). Tierexperimentell konnte ebenfalls belegt werden, dass exogenes PYY die Nahrungsaufnahme reduziert. Die Blockade von endogenem PYY hingegen hatte gegenteilige Effekte und erhöhte die Nahrungsaufnahme (le Roux et al., 2006). Die RYGB-Operation wirkt sich neben dem GLP-1- auch auf den PYY-Spiegel aus. Nach einem solchen Eingriff erhöht sich die Konzentration von PYY postprandial und ist im Vergleich zu einer gewichtsverlustäquivalenten Diät, einem äquivalenten Gewichtsverlust durch Magenband-Operation sowie zu schlanken und fettleibigen Kontrollpersonen signifikant erhöht (le Roux et al., 2006; Oliván et al., 2009). Der ebenso erhöhte Energieumsatz nach RYGB-Operation bei Ratten (Bueter et al., 2010) korreliert mit den Erkenntnissen von Sloth et al. (Sloth et al., 2007). Die Mechanismen, die zu einer Steigerung des Energieumsatzes nach RYGB führen sind bislang nicht gänzlich geklärt. Auch fehlen einheitliche Daten zur Energiebilanz nach RYGB beim Menschen (Corteville et al., 2014). Trotzdem spricht vieles dafür, dass auch hier die veränderten Spiegel der gastrointestinalen Hormone eine Rolle spielen (Corteville et al., 2014). Daneben scheinen GLP-1 und PYY einen synergistischen Effekt auf die Appetithemmung zu haben. Die Infusion beider Hormone reduziert den Appetit stärker als jedes Hormon für sich (Neary et al., 2005). Darüber hinaus besteht eine Beziehung zwischen der Höhe des Gewichtsverlustes nach Magenbypass und der Höhe der GLP-1- und PYY-Spiegel. So weisen Patientinnen und Patienten mit niedrigerem Gewichtsverlust postoperativ auch niedrigere Spiegel beider Hormone postoperativ auf (le Roux et al., 2007). Werden die gastrointestinalen Hormone durch die Gabe von Octreotid, einem Somatostatinanalogon, gehemmt, so kommt es bei Patientinnen und Patienten nach RYGB im Gegensatz zu Patientinnen und Patienten nach einer Magenband-Operation zur Appetitsteigerung und folglich einer Steigerung der Nahrungsaufnahme (le Roux et al., 2007). Als Ursache für die nach RYGB-Operation erhöhten Spiegel von GLP-1 und PYY wird ein sekretorischer Stimulus auf die distalen L-Zellen angenommen, welcher durch die chirurgische Rekonstruktion und die Veränderung der Physiologie und der Anatomie des Gastrointestinaltrakts zustande kommt (Batterham & Cummings, 2016). Es wird angenommen, dass die hohe Konzentration unverdauter Nährstoffe die L-Zellen im Ileum stimuliert (Feng et al., 2013). Ein weiteres Darmhormon, auf das im Folgenden näher eingegangen werden soll, ist GIP. Es wird vorwiegend aus den duodenalen K-Zellen ausgeschüttet und trägt neben GLP-1 zum Inkretineffekt bei (Löffler, 2014; Staiger et al., 2014). Die in der Literatur

beschriebenen Auswirkungen des Magenbypass auf die GIP-Spiegel sind weniger konsistent als die beschriebenen Auswirkungen auf die GLP-1- bzw. PYY-Spiegel. So zeigten verschiedene Studien entweder erhöhte (Laferrère et al., 2007) oder verminderte postprandiale bzw. nach oraler Glucosebelastung gemessene Spiegel (Korner et al., 2007). Korner et al. stellten für ihre nach RYGB-Operation niedriger gemessene GIP-Werte die Vermutung auf, dass durch die Umleitung der Nährstoffe der proximale Dünndarm, in dem GIP vor allem synthetisiert wird, nicht mit Nährstoffen in Kontakt kommt und die K-Zellen daher weniger stimuliert werden (Korner et al., 2007). Diese Vermutung basiert, ebenso wie die oben bereits beschriebene Hypothese, auf der Annahme einer direkten Stimulation der enteroendokrinen Zellen durch Nahrungsbestandteile.

Die RYGB-Operation hat neben den oben genannten Hormonen auch Auswirkungen auf Ghrelin, ein Hormon mit appetitstimulierender (orektischer) Wirkung (Löffler, 2014). Es wird überwiegend im Magen gebildet (Löffler, 2014). Jedoch ist auch hier die Datenlage nicht eindeutig und teils sogar widersprüchlich. Übergewicht sorgt häufig für einen niedrigen Ghrelin-Spiegel, was physiologisch sinnvoll ist (Tschöp et al., 2001). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein diätinduzierter Gewichtsverlust den Ghrelin-Spiegel ansteigen lässt, während ein Gewichtsverlust aufgrund eines Magenbypasses zu einem verminderten Ghrelin-Spiegel führt (Cummings et al., 2002). Holdstock et al. dagegen zeigten, dass es nach der Durchführung des RYGB zu einer Erhöhung des Ghrelin-Spiegels kommt, wobei eine konsistente inverse Beziehung zwischen dem BMI und dem Ghrelin-Spiegel beobachtet werden konnte (Holdstock et al., 2003).

Zusammenfassend zeigen die veränderten Spiegel der gastrointestinalen Hormone nach RYGB wie komplex die Auswirkungen des Magenbypass auf den Organismus sind und dass die Wirksamkeit des RYGB nicht, oder nicht nur in Malabsorption und Restriktion begründet liegt. Die Rolle der einzelnen Hormone und deren Auswirkungen auf den Organismus nach RYGB-Operation ist trotz zahlreicher Studien bisher nicht abschließend geklärt.

1.3.2 Die Auswirkungen des RYGB auf den Gallensäurestoffwechsel

Die Biosynthese der primären Gallensäuren aus Cholesterin geschieht in der Leber. Nach Aktivierung der Carboxylgruppe folgt die Konjugation mit Taurin bzw. Glycin. Die konjugierten Gallensäuren werden in die Gallenflüssigkeit sezerniert. Im Darm entstehen durch enterobakterielle Dehydroxylasen die sekundären Gallensäuren. Über 90 % der Gallensäuren werden im Ileum mit Hilfe eines aktiven Transportsystems resorbiert und über das Pfortadersystem zur Leber zurückgebracht. Dort stehen sie dann wieder für die Sekretion in die Gallenflüssigkeit zur Verfügung (Löffler & Mössner, 2014). Gallensäuren haben pleiotrope Effekte, die über ihre Rolle in der Verdauung hinaus gehen (Löffler & Mössner, 2014). Eine veränderte Zusammensetzung bzw. Konzentration der Gallensäuren kann daher über multiple Effekte eine Verbesserung der Stoffwechsellage des Körpers vermitteln (Batterham & Cummings, 2016; Corteville et al., 2014; Pournaras et al., 2012).

Die mit Fettleibigkeit typischerweise einhergehende, postprandial abgeschwächte Gallensäureantwort kann durch eine bariatrische Operation, wie die RYGB-Operation, wieder hergestellt werden (Ahmad et al., 2013). Der RYGB erhöht postoperativ die Konzentration der im Blut zirkulierenden postprandialen bzw. Nüchtern-Gesamtgallensäure-Spiegel (Ahmad et al., 2013; Albaugh et al., 2015; Pournaras et al., 2012; Tremaroli et al., 2015). Es scheint sich dabei zumindest teilweise um einen magenbypassspezifischen Effekt zu handeln, denn auch die postprandiale bzw. die Nüchtern-Gallensäureantwort nach einer vertikalen Gastroplastik bzw. einem Magenband war gegenüber der des RYGB deutlich abgeschwächt (Pournaras et al., 2012; Tremaroli et al., 2015). Wie genau es zu den erhöhten Plasmagallensäure-Spiegeln nach RYGB kommt, ist bisher nicht bis ins Detail verstanden. Eine verminderte fäkale Ausscheidung (Ilhan et al., 2020) in Kombination mit einer verstärkten bzw. veränderten Resorption könnten ursächlich sein (Ise et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass eine Operation, die einem RYGB technisch sehr ähnlich ist, zu einer verstärkten Gallensäureresorption in der biliopankreatischen Schlinge führt und so die Zirkulation der Gallensäuren nach RYGB grundsätzlich ändert (Ise et al., 2019). Eine Untersuchung von Haange et al. zeigte, dass es im Dickdarm von RYGB-operierten Ratten im Vergleich mit der körperrgewicht-gematchten, schein-operierten Kontrollgruppe zu einer Verminderung der Gesamtgallensäurekonzentration kommt (Haange et al., 2020). Allerdings galt dies für unterschiedliche Gallensäuren in unterschiedlichem Ausmaß. So zeigten sich einzelne Gallensäuren, wie die Chenodesoxycholsäure (CDCA) und die Cholsäure nach RYGB-Operation erhöht.

Ein wichtiger Faktor, der die Zusammensetzung der Gallensäuren darüber hinaus determiniert, ist das intestinale Mikrobiom. Gallensäuren und Darmmikrobiota beeinflussen sich gegenseitig und werden beide durch eine RYGB-Operation verändert. Vor allem die Konzentration und Zusammensetzung der sekundären Gallensäuren wird durch das Mikrobiom determiniert (Sayin et al., 2013).

Die Auswirkungen einer RYGB-Operation auf den Gallensäuremetabolismus sind komplex und verändern die Zirkulation, die Zusammensetzung sowie den Gesamt-Spiegel nachhaltig. Es ist aktuell von großem Interesse, inwieweit der veränderte Gallensäurestoffwechsel postoperativ zu den metabolischen Vorteilen, die eine RYGB-Operation mit sich bringt, beiträgt bzw. inwieweit er in die Wirkmechanismen involviert ist. Bisherige Forschungsbemühungen konzentrierten sich oftmals lediglich auf Veränderungen des Gallensäurepools im Plasma. Um die Rolle der Gallensäuren an den metabolischen Veränderungen nach RYGB-Operation weiter aufzuklären, bedarf es in Zukunft weiteren ausführlichen Studien, die neben der Zusammensetzung der Gallensäuren im Plasma nach RYGB auch Auskunft über deren Konzentration und Zusammensetzung in den einzelnen Darmsegmenten sowie fäkal geben. Dies ist entscheidend, da bekannt ist, dass unterschiedliche Gallensäuren verschiedene Effekte auf Rezeptoren wie den FXR oder den G-Protein-gekoppelten Gallensäurezeptor TGR5 haben können. So ist die Gallensäure CDCA ein starker Agonist am FXR-Rezeptor, die Gallensäure Muricholsäure ein Antagonist (Parks et al., 1999; Sayin et al., 2013). Auch für TGR5 konnte belegt werden, dass verschiedene Gallensäuren den Rezeptor mit unterschiedlicher Potenz aktivieren können (Kawamata et al., 2003). Aktuell stehen die beiden Rezeptoren bzw. ihre Rolle als mögliche Vermittler der pleiotropen Effekte des veränderten Gallensäuremetabolismus nach RYGB im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. Mehrere tierexperimentelle Studien belegen die Relevanz von FXR für die Glucosehomöostase. Die Gallensäuren vermittelte FXR-Signalübertragung trägt in einem diabetischen Mausmodell durch Hemmung der Gluconeogenese zur Verbesserung der Hyperglykämie sowie zu einer Verbesserung der Insulinempfindlichkeit bei (Zhang et al., 2006). Durch die Gabe eines FXR-Agonisten an fettleibige Mäuse konnten multiple positive Effekte auf deren Stoffwechsel ausgelöst werden (Cariou et al., 2006). Eine andere Arbeitsgruppe bestätigte die Relevanz von FXR für die Glucosehomöostase nach RYGB, indem sie belegten, dass der Rezeptor körperrgewichtunabhängig zur Blutzuckerkontrolle nach RYGB beiträgt (Li et al., 2020). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass FXR ein potenzieller Vermittler der Stoffwechseleffekte des RYGB sein könnte. Die Erhöhung des

Fibroblast Growth Factor-19-Spiegels durch Aktivierung von FXR stellt einen weiteren Mechanismus dar, durch den die metabolischen Verbesserungen nach RYGB erreicht werden könnten. Fibroblast Growth Factor-19 ist ein intestinaler Faktor der den Glykogen-Spiegel auf eine insulinunabhängige Weise reguliert (Kir et al., 2011) und die hepatische Gluconeogenese hemmen kann (Potthoff et al., 2011). Er reguliert Gallensäure-, Kohlenhydrat-, Lipid- und Energiestoffwechsel und könnte damit in Zukunft eine wichtige therapeutische Option für die Behandlung von T2D und den damit verbundenen Erkrankungen darstellen (Beenken & Mohammadi, 2009).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass primäre und sekundäre Gallensäuren im Tiermodell auch direkten Einfluss auf die Freisetzung von GLP-1 und PYY haben (Pournaras et al., 2012). Pournaras et al. zeigten, dass sowohl Nahrung als auch Gallensäuren die intestinalen enteroendokrinen L-Zellen stimulieren und so die Ausschüttung von GLP-1 fördern, allerdings weniger stark wie die Kombination beider (Pournaras et al., 2012). Die Förderung der GLP-1 Ausschüttung durch die Gallensäuren könnte unter anderem über die Aktivierung von TGR5 in enteroendokrinen Zellen des distalen Dünndarms vermittelt werden (Batterham & Cummings, 2016).

Für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung sind die Auswirkungen der Gallensäurezusammensetzung und -konzentration auf die IEB, da bekannt ist, dass eine RYGB-Operation positive Auswirkungen auf die IEB hat (Guo et al., 2019; Jin et al., 2021), der genaue Wirkmechanismus aber bisher nicht bekannt ist. Die Tatsache, dass eine genetische Inaktivierung von TGR5 sowie FXR bei Mäusen zum Zusammenbruch der IEB führt (Cipriani et al., 2011; Inagaki et al., 2006) unterstützt die Hypothese, dass Gallensäuren neben den bereits beschriebenen Effekten auch an der Barriereregulierung nach RYGB beteiligt sein könnten.

1.3.3 Die Auswirkungen des RYGB auf das intestinale Mikrobiom

Unsere Darmmikroben sind an der Regulierung der Energiehomöostase sowie der Fettspeicherung beteiligt und spielen daher bei der Adipositas und ihren Folgeerkrankungen eine große Rolle (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms sind ein charakteristisches Merkmal vieler Stoffwechselkrankheiten. Fettleibige Personen weisen im Vergleich zu gesunden Personen drastische Unterschiede wie beispielsweise eine geringere mikrobielle Vielfalt oder ein geringeres Genreichtum ihres intestinalen Mikrobioms auf (Turnbaugh et al., 2009). Die Relevanz der Darmmikroben in der Pathogenese der Adipositas konnte unter anderem tierexperimentell untermauert werden. Die Besiedelung keimfreier Mäuse mit

dem intestinalen Mikrobiom von fettleibigen Spendern führte zu einer signifikanten Zunahme der Gesamtkörperfettmasse der Mäuse, ohne dass diese signifikant mehr Kalorien zu sich nahmen als die Mäuse, die mit den Darmmikroben von nicht-adipösen Spendern besiedelt wurden (Turnbaugh et al., 2006). Weitere Studien haben gezeigt, dass keimfreie Mäuse vor Glucoseintoleranz und Insulinresistenz geschützt sind, die durch eine fettreiche Ernährung hervorgerufen werden (Bäckhed et al., 2007; Ding et al., 2010). Ding et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass das Mikrobiom und die kalorienhaltige Diät zusammen proinflammatorische Veränderungen im Dünndarm bewirken, die signifikant mit dem Fortschreiten von Fettleibigkeit und der Entwicklung einer Insulinresistenz korrelieren (Ding et al., 2010).

Die RYGB-Operation hat einen tiefgreifenden Einfluss auf die Zusammensetzung und Vielfalt der mikrobiellen Gemeinschaften, die sich im gesamten Magen-Darm-Trakt befinden (Ilhan et al., 2020; Liou et al., 2013; Tremaroli et al., 2015). Dies führt folglich auch zu einer Veränderung der vom Mikrobiom produzierten und freigesetzten Metabolite, wie zum Beispiel den sekundären Gallensäuren (Ilhan et al., 2020), Tryptophanderivaten (Jennis et al., 2018) oder den kurzkettigen Fettsäuren (Liou et al., 2013). Man geht davon aus, dass dies ein entscheidender Wirkmechanismus des RYGB sein könnte. Gestützt wird diese These vor allem durch Transferexperimente an keimfreien Mäusen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Darminhalt RYGB-operierter Ratten im Vergleich zum Transfer von Darminhalt schein-operierter Ratten zu einer besseren Blutzuckerkontrolle und einer verminderten Endotoxämie der Mäuse führte (Hankir et al., 2020). Der Transfer der Darmmikrobiota von RYGB-behandelten Ratten im Vergleich zu schein-operierten Ratten, die aufgrund einer Loss-of-Function-Mutation im Leptinrezeptor-Gen stark fettleibig und glucoseintolerant waren, auf keimfreie Mäuse, führte zu niedrigeren Blutzuckerspitzenwerten während eines oralen Glucosetoleranztests (OGTT) (Arora et al., 2017). Die von Tremaroli et al. durchgeführten Transferexperimente zeigten, dass es bei keimfreien Mäusen nach Transfer von humanem Darminhalt von Patientinnen, die einen RYGB bekommen hatten, zu einer Verminderung der Fettdepots der Mäuse kam, verglichen mit den Mäusen, die Darminhalt von adipösen Patientinnen transferiert bekommen haben (Tremaroli et al., 2015). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Darmmikrobiota eine direkte Rolle bei der nach bariatrischen Eingriffen beobachteten Verringerung der Adipositas, Verringerung der Endotoxämie und Verbesserung der Glucosehomöostase spielt. Tremaroli et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass die Veränderung der Darmmikrobiota BMI unabhängig ist (Tremaroli et al., 2015). Dem gegenüber steht die

Feststellung von Cottillard et al, dass diätetische Maßnahmen den Genreichtum der Mikrobiota erhöhen und ihre Zusammensetzung in Richtung derjenigen von schlanken Personen verschieben (Cotillard et al., 2013).

Fünf Bakterienabteilungen dominieren das humane intestinale Mikrobiom, darunter sind Aktinobakterien, Bacteroidaceae, Firmicuten, Proteobakterien und Verrucomikrobien, von denen Bacteroidaceae und Firmicuten über 90 % der gesamten Darmmikrobiota ausmachen (Harris et al., 2012). Nach RYGB konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme von Proteobakterien kommt (Guo et al., 2019; Ilhan et al., 2020; Li et al., 2011; Tremaroli et al., 2015), was insofern überraschend ist, da Proteobakterien zu den gram-negativen Bakterien gehören. Sie werden aufgrund ihrer entzündungsfördernden Eigenschaften im Allgemeinen nicht als nützlich betrachtet (Cani et al., 2007). Daneben verändert die RYGB-Operation auch die relative Häufigkeit der Firmicuten und Bacteroidaceae. Beide sind nach RYGB relativ vermindert (Li et al., 2011; Tremaroli et al., 2015). Allerdings gilt das für die Firmicuten in uneinheitlicher Weise, da einzelne Gattungen nach RYGB auch relativ vermehrt vorkamen (Ilhan et al., 2020). Für *Akkermansia muciniphila*, eine Gattung der Verrucomikrobien konnte einheitlich gezeigt werden, dass ihre relative Häufigkeit nach RYGB erhöht ist (Ilhan et al., 2020; Liou et al., 2013) und Fettleibigkeit sowie Diabetes mit einer verringerten relativen Häufigkeit einhergehen (Everard et al., 2013). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass bekannt ist, dass die Anwesenheit von *Akkermansia muciniphila* die Darmepithelbarriere verbessert und vor Insulinresistenz und Adipositas schützt (Chelakkot et al., 2018; Depommier et al., 2019).

1.3.4 Die Auswirkungen des RYGB auf die systemische Endotoxämie

Als systemische Endotoxämie bezeichnet man die Verlagerung entzündungsfördernder, gramnegativer Bakterienspezies und/oder ihrer Produkte wie Lipopolysaccharid (LPS) aus dem Darmlumen in den allgemeinen Kreislauf (Cani et al., 2007). LPS ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterienarten. Auf diese Weise stellt die Darmmikrobiota ein wesentliches Reservoir dar. Es wird angenommen, dass das Vorhandensein von LPS im Blutkreislauf auf seine passive Diffusion durch die Darmschleimhaut zurückzuführen ist, wenn die Integrität der Barriere beeinträchtigt und die Permeabilität des Darms erhöht ist (Harris et al., 2012). LPS enthält ein Pathogen assoziiertes molekulares Muster, das Lipid-A, welches nach Bindung an den Toll-Like Rezeptor-4 viele gut charakterisierte, entzündungsfördernde Signalkaskaden in Gang setzt (Lu et al., 2008).

Mehrere Studien haben über erhöhte zirkulierende LPS-Spiegel bei Personen mit Adipositas und/oder T2D berichtet (Cox et al., 2017; Pussinen et al., 2011; Trøseid et al., 2013). Der Zusammenhang von Adipositas und Endotoxämie konnte auch durch Messung höherer proinflammatorischer Zytokin-Spiegel, wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6), im Blut adipöser Patientinnen und Patienten gegenüber normalgewichtigen belegt werden (Bahceci et al., 2007). In einer Ernährungsstudie konnte gezeigt werden, dass bereits nach einer einmonatigen Diät mit einem Fettanteil von 40 % die LPS-Konzentration im Plasma steigt (Pendyala et al., 2012). Tierexperimentell konnte durch kontinuierliche Infusion von Endotoxinen in Mäuse belegt werden, dass die chronische Entzündung zur Entwicklung von Fettleibigkeit und Insulinresistenz führt (Cani et al., 2007). Eine Störung der Darmbarriere sowie die geringgradige Entzündung sind ein gemeinsames charakteristisches Merkmal von Stoffwechselerkrankungen (Everard & Cani, 2013). Dies stützt folgende These: Ein mit Fettleibigkeit assoziierter undichter Darm ermöglicht die Passage von mikrobiellen Produkten wie LPS durch die Schleimhaut. Diese Passage verursacht eine metabolische Endotoxämie, die sich in einem moderaten Anstieg der LPS-Konzentration im Plasma manifestiert. Die systemische Entzündungsreaktion fördert die Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen (Cani et al., 2007; Everard & Cani, 2013; León-Pedroza et al., 2015; Moreira et al., 2012). Insofern gilt die systemische Endotoxämie zunehmend als anerkannter ätiologischer Faktor der mit Fettleibigkeit einhergehenden Insulinresistenz und des T2D (Chakaroun et al., 2020).

Klinische (Monte et al., 2012; Trøseid et al., 2013; Yang et al., 2014) und präklinische Studien (Guo et al., 2019; Wu et al., 2019) konnten zeigen, dass der RYGB die systemische Endotoxämie abschwächt und zu einer Reduktion des chronischen Entzündungszustandes beiträgt.

1.3.5 Die Auswirkungen des RYGB auf die intestinale epitheliale Barriere

Die ersten Hinweise darauf, dass Adipositas mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität verbunden sein könnte, stammen aus Tiermodellen (Brun et al., 2007; Cani et al., 2009). Als Hauptfolge der Störung der Darmbarriere wird, wie im Abschnitt 1.3.4 bereits beschrieben, das Eindringen von Toxinen aus dem Darmlumen vermutet, welches zu einer chronischen Entzündung führt und Insulinresistenz sowie weitere Stoffwechselerkrankungen vermittelt (Cani et al., 2007; Everard & Cani, 2013; León-Pedroza et al., 2015; Moreira et al., 2012). Das Darmmikrobiom interagiert sehr eng mit dem Darmepithel. Es stellt eine Schlüsselkomponente der Darmbarriere dar, indem es

den Metabolismus, die Proliferation und somit die Aufrechterhaltung der IEB beeinflusst (Neish, 2009). So können zum Beispiel, die von der intestinalen Mikrobiota abgesonderten Fermentationsprodukte wie kurzkettige Fettsäuren zur Unterdrückung der entzündungsbedingten Zytokinsekretion beitragen (Tedelind et al., 2007). Außerdem können von der Darmmikrobiota freigesetzte Stoffwechselprodukte direkt die Darmbarriere stabilisieren (Natividad et al., 2018).

Dass der RYGB die Funktion der IEB positiv beeinflusst, konnte in zahlreichen Tier- und Humanstudien belegt werden (Casselbrant et al., 2015; Guo et al., 2019; Jin et al., 2021; Steensels et al., 2017; Wang et al., 2020). Es wird daher postuliert, dass die verbesserte Barrierefunktion nach RYGB über eine Verminderung der Endotoxämie zu einer Abschwächung der Insulinresistenz und zur verbesserten Blutzuckerkontrolle sowie zur Verbesserung der Adipositas-assoziierten Erkrankungen nach RYGB führt. Die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Mechanismen sind jedoch nach wie vor wenig verstanden. Wie bereits eingeführt, ist möglicherweise die Darmmikrobiota oder das durch sie verursachte Milieu das zentrale externe Organ, welches zu einer Stabilisierung der Integrität der IEB beiträgt. Daneben könnte es sich bei den vermittelnden Faktoren auch um Faktoren des Wirts, wie zum Beispiel die Gallensäuren handeln. Es ist momentan nicht geklärt, ob es sich bei den Faktoren, die die verbesserte Barrierefunktion nach RYGB vermitteln, um Faktoren handelt, die luminal oder systemisch auf die IEB einwirken. Eine Studie von Arora et al. konnte allerdings zeigen, dass eine verbesserte orale Glucosetoleranz bei genetisch fettliebigen und glucoseintoleranten Ratten nach RYGB im Vergleich zu einer Schein-Operation durch ihren Zäkum-, aber nicht ihren Ileuminhalt auf keimfreie Mäuse übertragen werden kann (Arora et al., 2017). Aufgrund dieser Erkenntnis erscheint es wahrscheinlich, dass es sich zumindest teilweise um luminale Faktoren handelt, die auf die apikale Seite der Enterozyten einwirken und die IEB auf bislang unbekannte Weise stabilisieren.

1.4 Bedeutung der Darmbarriere

Der menschliche Körper ist täglich einer Vielzahl potenziell schädlicher Substanzen und Krankheitserreger ausgesetzt. Insbesondere der Darm ist aufgrund seiner Oberfläche von durchschnittlich 32 m² (Helander & Fändriks, 2014) einer besonders hohen Antigenbelastung ausgesetzt. Die Darmmikrobiota eines Erwachsenen beherbergt etwa 10¹³ Bakterienzellen (Sender et al., 2016). Das Immunsystem des Darms muss daher tolerant gegenüber kommensalen Mikroorganismen agieren, den Übertritt von in der Darmflora befindlichen Bakterien in den Blutstrom verhindern und pathogene

Mikroorganismen abwehren (Artis, 2008). Damit der Magen-Darm-Trakt jedoch seiner Hauptaufgabe, der Aufnahme von Nährstoffen und Elektrolyten nachkommen kann, muss die Barriere selektiv bestimmte Stoffe passieren lassen. Nur so kann eine innere Homöostase gewährleistet werden (Salvo Romero et al., 2015; Turner, 2009). Eine intakte Barriere ist somit eine wichtige Voraussetzung für die menschliche Gesundheit. Dies wird vor allem dadurch verdeutlicht, dass eine gestörte intestinale Barrierefunktion mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert ist (Turner, 2009), auf die im Abschnitt 1.5 näher eingegangen wird.

1.4.1 Aufbau der Darmbarriere

Ein komplexes Zusammenwirken chemischer und physikalischer Barrieren sowie immunologischer Verteidigungslinien gewährleistet die Barrierefunktion des Darms (Salvo Romero et al., 2015; Schlegel et al., 2021). Die Bestandteile der IEB können in extrazelluläre und zelluläre Komponenten eingeteilt werden, welche im Folgenden genauer erläutert werden (Schlegel et al., 2021).

1.4.1.1 Extrazelluläre Komponenten

Die am weitesten luminal gelegene extrazelluläre Komponente der IEB ist eine zwei-phasige Muzin-Schicht die von den Becherzellen gebildet wird (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die äußere, dickere und lockerere Phase ist der Lebensraum der kommensalen Bakterien (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die innere Schicht stellt eine Art mechanische Schutzzone dar und verhindert durch ein sehr enges Muzin-Netz das Eindringen der Bakterien (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Zudem beinhaltet sie antimikrobielle Peptide, welche von Paneth-Zellen sezerniert werden, sowie sekretorisches Immunglobulin A (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die dem Epithel aufgelagerte Muzin-Schicht stellt in ihrer Gesamtheit einen wichtigen Teil des Abwehrmechanismus des Darms gegen pathogene Erreger dar.

1.4.1.2 Zelluläre Komponenten

Die sogenannte Darmflora befindet sich in der äußeren Muzin-Schicht (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Im Abschnitt 1.3.5 wurde bereits erläutert, welche wichtige Rolle die Interaktion des Mikrobioms mit dem Darmepithel spielt. Die Mikroben tragen direkt zur Darmbarrierefunktion bei, indem sie den Metabolismus, die Proliferation und die Aufrechterhaltung der Epithelbarriere beeinflussen (Neish, 2009). Darüber hinaus schränkt die Darmflora die Besiedlung durch Krankheitserreger ein, indem sie mit ihnen

um Nährstoffe und die ökologische Nische konkurriert (Neish, 2009). Kommt es zur Dysbiose, einem Ungleichgewicht zwischen physiologischen und pathogenen Bakterien, verändert sich die Barrierefunktion, was zu Kolitis und Reizdarmsyndrom beitragen kann und die Relevanz der Darmflora für die Funktion der IEB belegt (Frosali et al., 2015). Eine weitere Komponente der intestinalen Barriere ist das Darmepithel, das den gesamten Magen-Darm-Trakt in Form eines einschichtigen Zylinderepithels auskleidet (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die Epithelzellschicht besteht vor allem aus Enterozyten, Becherzellen, endokrinen Zellen, Bürstenzellen und Stammzellen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Sie ist ein dynamischer Verbund. Es besteht ein stetiges Gleichgewicht zwischen Erneuerung und Absterben, wobei die Neubildung der Zellen von den multipotenten Stammzellen der Krypten ausgeht (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Die Enterozyten, auch Saumzellen genannt, sind spezialisierte und polarisierte Epithelzellen, die alle drei bis fünf Tage erneuert werden und prozentual den größten Teil des Epithels ausmachen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019; Salvo Romero et al., 2015). Die Aufgabe der Enterozyten besteht vor allem in der Verdauung und der Resorption sowie darin, die physische Integrität der Barriere aufrecht zu erhalten (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019; Salvo Romero et al., 2015). Sie spielen außerdem eine Rolle bei der Immunabwehr, da sie Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr exprimieren (Artis, 2008).

Die Aufgabe der Becherzellen ist es, Muzine zu bilden, die für die in Abschnitt 1.4.1.1 beschriebene Muzin-Schicht notwendig sind (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Weitere spezialisierte Zellen sind die defensin- und lysozymsezernierenden Paneth-Zellen, die enteroendokrinen Zellen und die M-Zellen, die Antigene durch das Darmepithel schleusen (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Adluminal des Epithels befindet sich die aus zellreichem Bindegewebe bestehende Lamina propria (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Sie beherbergt unter anderem eine große Anzahl von Immunzellen und Gliazellen des enterischen Nervensystems (ENS) (Schlegel et al., 2021). Eine Aufgabe der Immunzellen im Darm ist es, das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-Inflammation zu halten und so einen entscheidenden Beitrag zur Regulierung der intestinalen Homöostase, Entzündung und Barrierefunktion zu leisten (Artis, 2008). Das ENS moduliert motorische und sekretorische Aktivitäten des Darm, es kontrolliert die Nährstoffaufnahme, den Blutfluss sowie immunologische und entzündliche Prozesse (Goyal & Hirano, 1996; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die Kommunikation erfolgt dabei über diverse Peptide und Neurotransmitter (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Das ENS

setzt sich aus zwei Hauptbestandteilen zusammen: Neuronen und Gliazellen. Die Gliazellen bilden ein großes Netzwerk über die Schichten des Gastrointestinaltrakts hinweg und fungieren als Vermittler bei der Verarbeitung von Neurotransmission und enterischen Informationen (Rühl, 2005). In vitro Experimente konnten zeigen, dass unter den verschiedenen Faktoren, die vom ENS ausgeschüttet werden, sich vor allem der von der Gliazelllinie abgeleitete neurotrophe Faktor direkt auf die Funktion der IEB auswirkt (Meir et al., 2021). Sowohl die Immunzellen als auch das ENS sind daher maßgeblich an der Regulierung der Darmepithelbarriere beteiligt.

Die Plasmamembran der Enterozyten bildet in ihrer Gesamtheit eine für hydrophile Stoffe ohne spezifische Transporter unüberwindbare Barriere (Turner, 2009). Zwischen den Enterozyten sorgen interzelluläre Verbindungen aus Proteinkomplexen für eine Regulation und gegebenenfalls eine Unterbindung des parazellulären Transport (Balda & Matter, 2008; Turner, 2009) sowie den Erhalt der strukturellen Integrität des Zellverbandes (Salvo Romero et al., 2015). In ihrer Gesamtheit werden diese Zell-Zell Verbindungen als Schlussleistenkomplexe bezeichnet (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Ein Schlussleistenkomplex besteht (von luminal nach adluminal) aus Occludenskontakten (Tight Junctions), Adhärenskontakten und Desmosomen (Farquhar & Palade, 1963). Die Occludenskontakte und die Adhärenskontakte sind im polarisierten Epithel als Gürtel angelegt (Farquhar & Palade, 1963). Die Zonula occludens regulieren die parazelluläre Permeabilität zwischen den Epithelzellen (Balda & Matter, 2008), während die Zonula adhaerens und die Desmosomen als adhäsive Kontakte dienen (Garrod & Chidgey, 2008; Niessen & Gottardi, 2008). Der Schlussleistenkomplex ist somit entscheidend an der Aufrechterhaltung sowie der Regulierung der IEB beteiligt. Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Schlussleistenkomplexes zwischen zwei Enterozyten. Dargestellt sind die Transmembranproteine, die Ankerproteine sowie deren Verbindung zum Zytoskelett. Auf die einzelnen Bestandteile des Schlussleistenkomplexes soll in den folgenden Abschnitten vertieft eingegangen werden.

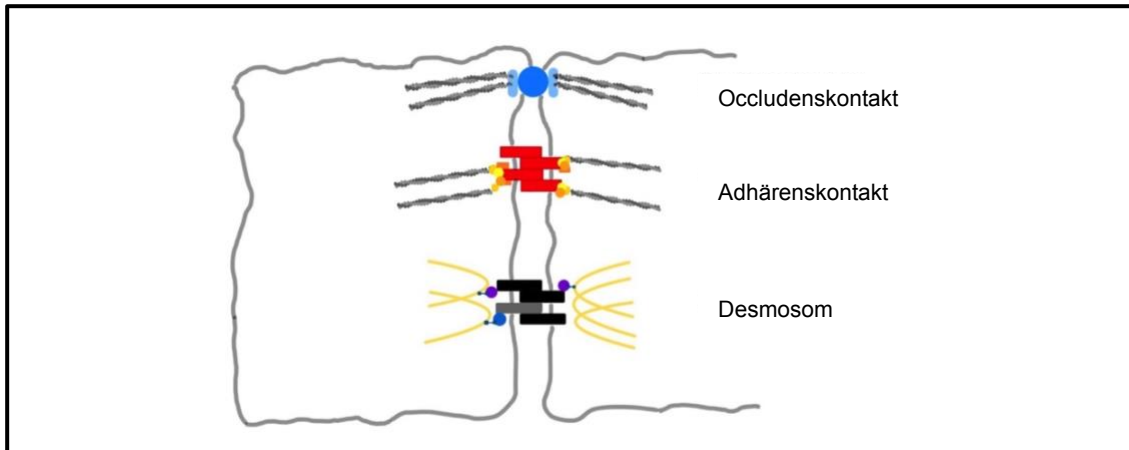


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Schlussleistenkomplexes

Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des Schlussleistenkomplexes zwischen zwei Enterozyten. Dieser besteht von luminal nach adluminal aus Occludenskontakten, Adhärenskontakten und Desmosomen (modifiziert nach Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

1.4.1.2.1 Zonula occludens

Die Occludenskontakte sind die am weitesten apikal gelegenen Interzellularkontakte der Enterozyten. Sie verbinden diese gürtelförmig und verengen den Interzellularraum. (Farquhar & Palade, 1963). Die Occludenskontakte erfüllen gewissermaßen eine Schrankenfunktion und verhindern den ungerichteten parazellulären Transport, erlauben aber auch die Passage kleiner wasserlöslicher Moleküle (Balda & Matter, 2008). Ihre Funktion ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Barriere und der epithelialen Polarität durch Verhinderung von Lateraldiffusion luminal gelegener Proteine nach adluminal und umgekehrt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Occludenskontakte sind Multiproteinkomplexe, bestehend aus einem Transmembranprotein, das über seine extrazelluläre Domäne zu einem Transmembranprotein der Nachbarzelle Kontakt hält und durch Überlappung mit diesem den Interzellularraum versiegelt sowie einem Adapterprotein, das die Verbindung zwischen dem Transmembranprotein und dem Aktinoskelett im Zytosol vermittelt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Zu den Transmembranproteinen der Occludenskontakte gehören die Claudine, die junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAM) und die Tight Junction-assoziierten MARVEL-Proteine Occludin, Tricellulin und MarvelD3 (Balda & Matter, 2008; Furuse et al., 1993; Ikenouchi et al., 2005; Martín-Padura et al., 1998; Steed et al., 2009). Man unterscheidet vierfach die Membran durchspannende Transmembranproteine wie Occludin, Claudin und Tricellulin von einfach die Membran durchspannenden Proteinen wie JAM (Balda & Matter, 2008). Mit ihrer intrazellulären Domäne sind die membranintegralen Proteine an Adapterproteine wie Zonula occludens (ZO) 1, ZO 2 oder ZO 3 gebunden und über diese

mit zytoskelettalen Aktinfilamenten verbunden (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die nachfolgende Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der Verschlusskontakte zwischen zwei Enterozyten. Dargestellt sind die vierfach die membrandurchspannenden Proteine Claudin und Occludin sowie das einfach die membrandurchspannende JAM. Adapterproteine sowie Aktinfilamente sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur auf der linken Seite des Interzellularspaltes dargestellt. Die mechanische Absicherung der Occludenskontakte geschieht zum einen durch ihre unmittelbare Nähe zu den adluminal gelegenen Adhärenskonakten sowie über die JAMs (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

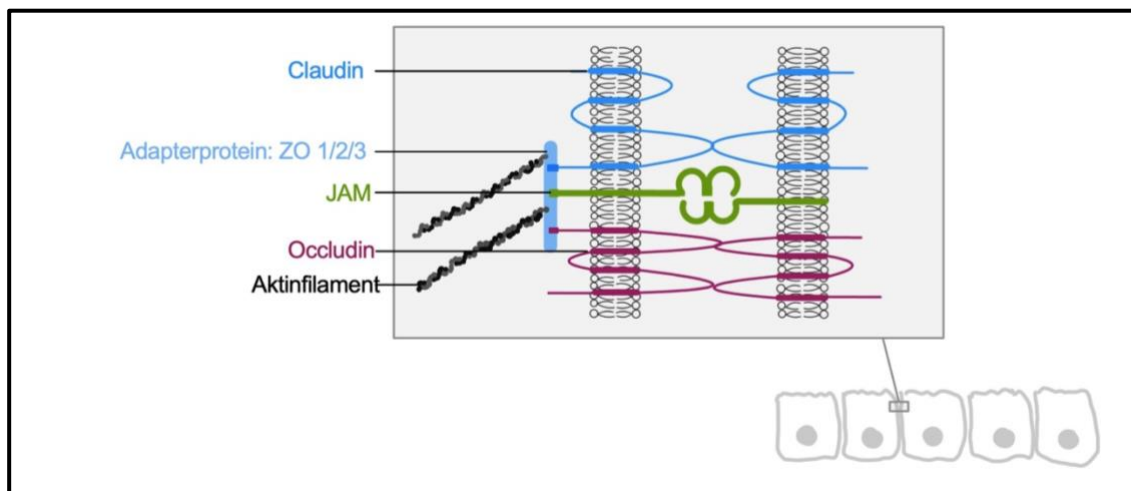


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Occludenskontakts

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung eines Occludenskontakts zwischen zwei Enterozyten. Dargestellt sind die vierfach die Membran durchspannenden Transmembranproteine Claudin und Occludin, sowie das einfach die Membran durchspannende JAM sowie die Adapterproteine ZO 1, ZO 2, ZO 3, die die Transmembranproteine mit dem Zytoskelett (Aktinfilament) verbinden (modifiziert nach Otani & Furuse, 2020). **ZO** = Zonula occludens, **JAM** = junctionales Adhäsionsmolekül.

Wie oben bereits beschrieben ist die selektive Regulierung des parazellulären Effluxes eine wichtige Aufgabe der Zonula occludens. Eine gewebeabhängige Expression der Claudine erlaubt eine selektive Permeabilität (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Je nach Claudin-Typ, trägt der Occludenskontakt entweder zur Abdichtung des Interzellularraums bei oder bildet Kanäle, die ähnliche biophysikalische Eigenschaften wie Ionenkanäle haben und den Durchgang bestimmter Ionen ermöglichen (Amasheh et al., 2002). Die Zellen des humanen Gastrointestinaltrakts exprimieren Claudin 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12 und 15 (Lu et al., 2013). Dabei gelten die Claudine 1, 3, 4, 5 und 8 als abdichtende Claudine und die Claudine 2, 7 und 12 als porenbildende Claudine (Markov et al., 2010). Insbesondere ein vermehrtes Vorkommen

von Claudin 2 ist im Zusammenhang mit pathologischer Undichtigkeit beschrieben worden (Amasheh et al., 2002). Die Expression im Darm unterscheidet sich dabei auch aufgrund der spezifischen physiologischen Funktion in den Darmabschnitten, wobei die Permeabilität in den distalen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts insgesamt geringer ist (Markov et al., 2010). So weist das Kolon von Ratten den höchsten epithelialen Widerstand und eine höhere Gesamtproteinmenge von Claudin 1, 3, 4, 5 und 8 sowie eine geringere Menge von Claudin 2, 7 und 12 als das Jejunum oder das Ileum auf (Markov et al., 2010).

Obwohl Occludin das erste entdeckte membranintegrale Protein der Occludenskontakte war (Furuse et al., 1993), ist seine Bedeutung für die IEB nach wie vor unklar. Es konnte gezeigt werden, dass durch Unterbrechung der Interaktionen zwischen den extrazellulären Domänen von Occludin, unter Verwendung synthetischer Peptide, die parazelluläre Permeabilität steigt (Wong & Gumbiner, 1997). Dies legt die Vermutung nahe, Occludin sei für die Funktion der IEB mitentscheidend. Im Gegensatz dazu, wiesen einige Studien darauf hin, dass intakte Tight Junctions in Abwesenheit von Occludin gebildet werden und stellten die Rolle von Occludin bei der Bildung von Tight Junctions in Frage (Saitou et al., 1998; Saitou et al., 2000). Trotz Deletion des Occludin-Gens in embryonalen Stammzellen konnte die Bildung von Occludenskontakten und die Differenzierung in polarisierte Epithelzellen stattfinden (Saitou et al., 1998). Darüber hinaus zeigte eine Knockout-Maus für Occludin das Vorhandensein normaler Occludenskontakte im Darmepithel (Saitou et al., 2000). Es zeigte sich jedoch, dass die Integrität der Occludenskontakte im Epithelgewebe der Magendrösen, der Hodenkanälchen und der Speicheldrüsen in Abwesenheit von Occludin gestört war (Saitou et al., 2000). Gesammelt weisen diese Erkenntnisse auf eine untergeordnete Rolle von Occludin für das Darmepithel hin.

JAMs sind eine weitere Gruppe von Transmembranproteinen der Occludenskontakte. Sie besitzen zwei immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen und durchspannen, anders als die oben genannten Proteine, die Membran nur einmal (Balda & Matter, 2008; Martín-Padura et al., 1998). In epithelialen Occludenskontakten sind JAMs am Zusammenbau und der Bildung funktioneller, polarisierter Occludenskontakte beteiligt (Liu et al., 2000). Außerdem dienen sie der mechanischen Stabilisierung der Occludenskontakte (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Ihnen kommt zudem eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der intestinalen Permeabilität und Entzündung zu (Laukoetter et al., 2007).

Tricellulin findet sich an den interzellulären Kontakten zwischen drei oder mehr benachbarten Zellen (Ikenouchi et al., 2005). Die Unterdrückung der Tricellulin-Expression beeinträchtigt die Organisation und Funktion der trizellulären Occludenskontakte, aber auch der bizellulären Occludenskontakte (Ikenouchi et al., 2005), was darauf hindeutet, dass Tricellulin eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung intakter Occludenskontakte spielt.

Die oben bereits erwähnten Ankerproteine ZO 1, ZO 2, ZO 3 stellen ein feste, mechanische Bindung zwischen Transmembranproteinen und Aktinzytoskelett her (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Über diese feste Verbindung ist unter anderem die Dynamik des Aktinzytoskeletts an der Regulation der Integrität der Occludenskontakte beteiligt (Schlegel et al., 2021; Turner, 2009). Aufgrund ihrer Interaktion mit verschiedenen Proteinen wie Claudin, Occludin und Aktin, spielen die Ankerproteine eine große Rolle beim Aufbau sowie bei der Aufrechterhaltung der Occludenskontakte (Turner, 2009).

1.4.1.2.2 Zonula adhaerens

Die Adhärenskontakte sind im Schlussleistenkomplex adluminal der Occludenskontakte angeordnet (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Wie ihr Name bereits vermuten lässt, sind sie für eine Bindung zwischen den Zellen verantwortlich und sorgen auch für eine mechanische Absicherung der unmittelbar luminal gelegenen Occludenskontakte (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Ihr Aufbau gleicht vom Prinzip dem der Occludenskontakte. Ihre Hauptbestandteile sind Transmembranproteine vom Cadherin- oder Nektin-Typ, die membranübergreifende Komplexe bilden. Auf der extrazellulären Seite vermitteln sie die Verbindung zwischen zwei Zellen und auf der intrazellulären Seite assoziieren sie mit den Ankerproteinen Catenin und Afadin. Catenin und Afadin vermitteln den Kontakt zum Zytoskelett und wahren so die mechanische Stabilität des Multiproteinkomplexes (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Man unterscheidet zwei Proteinkomplexe: Den Cadherin/Catenin-Komplex und den Nektin/Afadin-Komplex (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Auf elektronenmikroskopischer Ebene ist die Zonula adhaerens eine Region, in der die Membranen perfekt parallel über eine Länge von 0,2 - 0,5 µm erscheinen. In der darunter liegenden zytoplasmatischen Matrix finden sich auffällige, bandartige Strukturen (Farquhar & Palade, 1963). Die nachfolgende Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung eines Adhärenskontakts zwischen zwei Enterozyten.

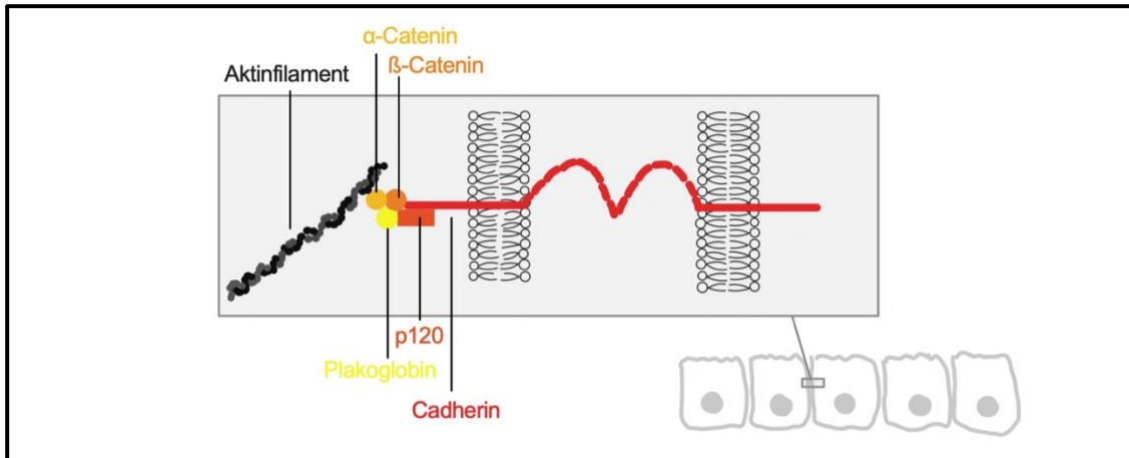


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Adhärenskontakts

Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung eines Adhärenskontakts zwischen zwei Enterozyten. Dargestellt sind das Transmembranprotein Cadherin sowie die Ankerproteine α - und β -Catenin, p120 und Plakoglobin (modifiziert nach Schlegel et al., 2021).

Die Familie der Kalzium (Ca^{2+})-abhängigen Adhäsionsmoleküle, der sogenannten Cadherine, umfasst etwa 20 Mitglieder, die ein gewebespezifisches Expressionsmuster sowie eine gemeinsame Domänenorganisation aufweisen (Meng & Takeichi, 2009; Takeichi, 1988). Im Epithel bildet E-Cadherin die Grundlage der Adhärenskontakte (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Cadherine durchspannen die Membran einmal. Ihre extrazellulären Domänen enthalten Ca^{2+} -bindende Sequenzen (Overduin et al., 1995). Bei der Assoziation mit Ca^{2+} geht die extrazelluläre Domäne der Cadherine einer Zelle eine homophile Interaktion mit der Domäne der Cadherine der angrenzenden Zelle ein (Meng & Takeichi, 2009). Diese Bindung ist essenziell für die Zelldifferenzierung. Ein Verlust der Bindung von E-Cadherin in epithelialen Zellen ist unter anderem am Fortschreiten von epithelialen Tumoren beteiligt (Lozano et al., 2003). Die zytoplasmatische Domäne des Cadherins vermittelt durch ihre Assoziation mit verschiedenen Proteinen die als sogenannte Catenine bekannt sind, wichtige strukturelle und signalgebende Aktivitäten, die für die Adhäsion erforderlich sind (Niessen & Gottardi, 2008; Ozawa et al., 1989). Cadherine binden an α (Vinculin)-, β -, γ (Plakoglobin)- und δ (p120)-Catenin (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019; Ozawa et al., 1989; Reynolds et al., 1994). Die Catenine übernehmen verschiedene Aufgaben, die in ihrer Gesamtheit weit über eine reine Adapterfunktion hinaus gehen. α -Catenin besitzt eine Aktin-Bindungsstelle und erhält über Bindung an das Zytoskelett die strukturelle Absicherung der Adhärenskontakte (Rimm et al., 1995). β -Catenin vermittelt den Transport von E-Cadherin an die Zellmembran sowie einen gewissen Schutz vor Proteolyse (Chen et al., 1999; Huber et al., 2001). Man ging lange davon aus, dass α -

Catenin den Cadherin/ β -Catenin-Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett fest verdrahtet. In vitro Studien zeigten jedoch, dass α -Catenin nicht in der Lage ist, β -Catenin und F-Actin gleichzeitig zu binden. α -Catenin vollzieht einen ständigen Bindungswechsel zwischen Aktin und β -Catenin und reguliert so die Veränderungen der Aktin-Dynamik (Drees et al., 2005). Cadherine assoziieren auch mit p120. p120 verhindert über Bindung an E-Cadherin dessen Endozytose und reguliert so die E-Cadherin-Konzentration (Davis et al., 2003).

Nektine sind eine Familie immunglobulinähnlicher Transmembranproteine, die Ca^{2+} -unabhängige homo- und heterophile Interzellularverbindungen eingehen können. Ihre extrazelluläre Domäne ähnelt der von Immunglobulin G. Sie bestehen aus einer Familie mit vier Mitgliedern. Die zytoplasmatische Domäne von Nektin interagiert mit Afadin, einem Aktin-bindenden Protein (Nakanishi & Takai, 2004). Afadin kann neben der Interaktion mit filamentärem Aktin auch mit anderen Aktin-bindenden Proteinen wie ZO 1 und α -Catenin interagieren (Takai et al., 2003; Yokoyama et al., 2001). Die Interaktion mit α -Catenin deutet darauf hin, dass eine Verbindung zwischen dem Cadherin/Catenin- und dem Nektin/Afadin-Komplex bestehen könnte. Wie die Cadherin/Catenin-Adhäsionseinheit enthält der Nektin/Afadin-Komplex also Komponenten, die die interzelluläre Adhäsion und die Aktin-Assoziation vermitteln können.

1.4.1.2.3 Desmosomen

Die Desmosomen wurden von Marilyn G. Farquhar und George E. Palade als die am weitesten adluminal liegende Komponente des dreiteiligen Schlussleistenkomplexes beschrieben. Aufgrund ihres geringen Durchmessers und ihrer ultrastrukturell punktförmigen Erscheinung werden sie auch als Macula adhaerens bezeichnet (Farquhar & Palade, 1963). Ihr grundsätzlicher Aufbau kann in interzelluläre und intrazelluläre Strukturen unterteilt werden. Interzellulär sorgen die desmosomalen Cadherine, Desmoglein (DSG) und Desmocollin (DSC) für eine adhäsive Zell-Zell-Bindung, indem sie mit dem Transmembranprotein der Nachbarzelle eine homo- oder heterophile Verbindung eingehen (Garrod & Chidgey, 2008). Im Darm kommen die desmosomalen Proteine DSG 2 und DSC 2 vor (Holthöfer et al., 2007). Auf zytoplasmatischer Seite sind die Transmembranproteine über Plakoglobin und Plakophilin durch Plaques-Bildung in der Zelle verankert. Um diesen Komplex zu stützen, bindet Desmoplakin die Komplexe aus Transmembranproteinen und Plaques-Proteinen an Intermediärfilamente (Kowalczyk & Green, 2013). Dadurch entsteht ein

transzelluläres Netzwerk, das den Geweben mechanischen Widerstand verleiht und die Zellmorphologie aufrechterhält. Aufgrund der von Desmosomen vermittelten starken Adhäsion und Netzwerkbildung, die dem Zellverband eine mechanische Festigkeit verleiht, sind die Desmosomen besonders häufig in Geweben zu finden, die ständig hohen mechanischen Kräften ausgesetzt sind (Garrod & Chidgey, 2008). Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung eines Desmosoms zwischen zwei Enterozyten.

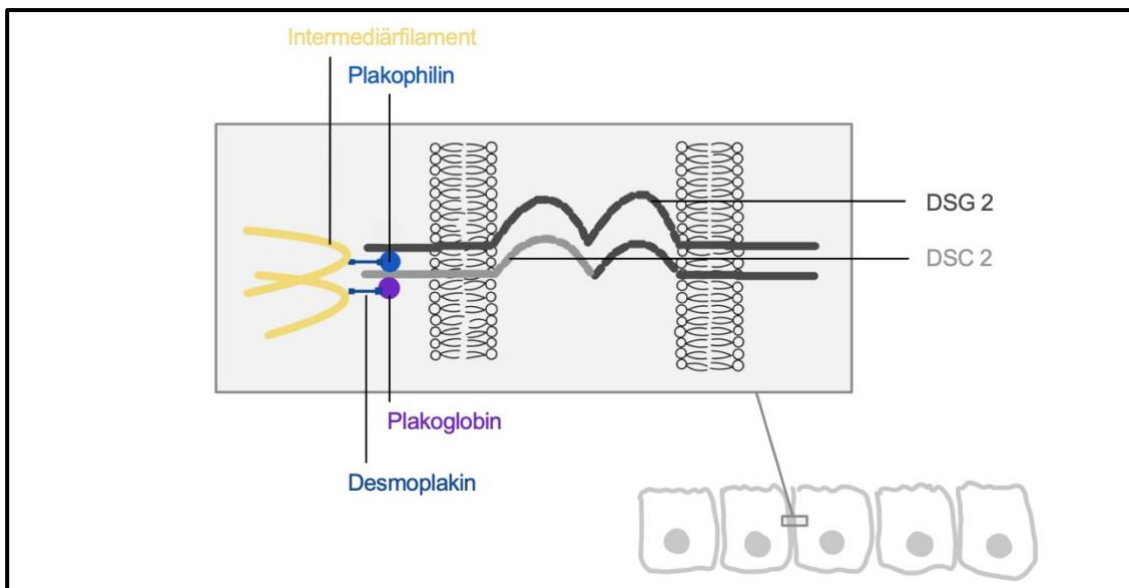


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Desmosoms

Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung eines Desmosoms zwischen zwei Enterozyten. Dargestellt sind die Transmembranproteine DSG 2 und DSC 2, die Plaqueproteine Plakophilin und Plakoglobin sowie das Adapterprotein Desmoplakin, welches den Komplex an Strukturen des Zytoskeletts, die sogenannten Intermediärfilamente, bindet (modifiziert nach Schlegel et al., 2021). **DSG 2** = Desmoglein 2, **DSC 2** = Desmocollin 2.

Desmosome sind dynamische Strukturen, deren Adhäsionskraft sich während Prozessen wie der Wundheilung von einem Zustand hoher zu einem Zustand niedriger Affinität ändern kann (Garrod et al., 2005). Die Transmembranproteine können ihre Bindung Ca^{2+} -unabhängig und Ca^{2+} -abhängig vermitteln, wobei sich der Wechsel schnell vollzieht und über die Hemmung der Proteinkinase C geschieht (Wallis et al., 2000). Ca^{2+} -unabhängige Desmosomen sind hyperadhäsiv, Ca^{2+} -abhängige sind weniger adhäsiv (Garrod & Chidgey, 2008). Die Desmosomen der normalen Epidermis arbeiten Ca^{2+} -unabhängig. Im Gegensatz dazu arbeiten die Desmosomen der Epidermis an einem Wundrand Ca^{2+} -abhängig und haben ihre Hyperadhäsivität verloren, damit die

Keratinocyten der Epidermis mobil und fähig sind, den Wundrand zu verschließen (Garrod et al., 2005). Darüber hinaus können Desmosome als Signalzentren fungieren, die eine regulatorische Rolle bei verschiedenen Zellprozessen wie der Differenzierung und der Proliferation spielen (Garrod & Chidgey, 2008; Schlegel et al., 2021). Wenn die desmosomale Adhäsion versagt, wie dies bei bestimmten genetischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen der Fall ist, können Gewebe ihre Stabilität verlieren und zerfallen. So wird beim Pemphigus vulgaris, einer Autoimmunerkrankung mit Autoantikörperbildung gegen das desmosomale Protein DSG 3, das Versagen der desmosomalen adhäsiven Bindung in einer Blasenbildung der Epidermis sichtbar (Shimizu et al., 2004).

Die wesentliche Rolle der desmosomalen Adhäsion für die Integrität der IEB konnte in vitro bestätigt werden. Eine große Rolle an der Aufrechterhaltung der IEB wird dabei vor allem DSG 2 zugeschrieben (Schlegel et al., 2010). Über eine Regulierung der Occludenskontakte scheint DSG 2 darüber hinaus eine wichtige Rolle für die intestinale Permeabilität zu spielen (Gross et al., 2018; Schlegel et al., 2010).

1.5 Regulation der intestinalen Permeabilität und klinische Relevanz

Die IEB ist keine statische Struktur. Sie ist hochdynamisch und wird ständig erneuert (Schlegel et al., 2021). Außerdem wird die IEB durch verschiedene physiologische, medikamentöse und krankheitsbedingte Reize reguliert (Salvo Romero et al., 2015). Die Permeabilität der Barriere variiert zwischen den proximalen und distalen Regionen sowie zwischen den Krypten und den Zotten (Salvo Romero et al., 2015). Ebenso hängt die Partikeldurchlässigkeit von der Größe und der Ladung der Partikel ab (Garcia-Hernandez et al., 2017; Salvo Romero et al., 2015). Die molekularen Mechanismen, die die Passage von Substanzen durch das Epithel regulieren, sind hingegen im gesamten Darm ähnlich und umfassen interzelluläre Proteininteraktionen, das Aktinzytoskelett, Endozytose und intrazelluläre Signalübertragung (Salvo Romero et al., 2015).

Zum einen erfolgen Permeabilitätsänderungen über das Zytoskelett und werden durch die Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Myosinleichtkettenkinase und die Endozytose von Proteinen der Occludenskontakte reguliert (Shen & Turner, 2006; Utech et al., 2010). Daneben gehören die Regulierung der Expression verschiedener an der Barriere beteiligter Proteine sowie die Apoptose von Epithelzellen zu den langfristigen Veränderungen, die eine Permeabilitätsveränderung induzieren können (Prasad et al., 2005; Schulzke et al., 2006).

Darüber hinaus wird die IEB durch Interaktionen zwischen dem Mikrobiom und den Epithelzellen reguliert und kontrolliert (Neish, 2009). Daneben reguliert das Immunsystem über verschiedene Zytokine die intestinale Permeabilität (Al-Sadi et al., 2009). Andererseits spielen enterische Neuronen bei der Steuerung der parazellulären Permeabilität eine Rolle (Neunlist et al., 2003).

Die IEB des Darms kann durch transzellulären Transport überquert werden. Dieser Weg stellt den physiologischen Weg für Nährstoffe dar. Daneben können Partikel die Barriere auch über den parazellulären Weg überqueren (Schlegel et al., 2021). Lange Zeit wurde angenommen, dass es in erster Linie Veränderungen der Claudinexpression bzw. Claudinverteilung sind, die die Permeabilität von Epithelien modulieren (Garcia-Hernandez et al., 2017; Turner, 2009). Für DSG 2 konnte erst Jahre später anhand eines DSG 2-defizienten Mausmodells gezeigt werden, dass die Expression von DSG 2 eine ebenso wichtige Rolle für die Regulation der intestinalen Permeabilität spielt. Die intestinale Permeabilität war in diesem Modell erhöht, die Ultrastruktur der Desmosomen war verändert und überraschenderweise kam es zu einer Reduktion der Claudin 1- und Occludin-Expression (Gross et al., 2018). Ebenso konnte ein hemmender DSG 2-Antikörper eine tiefgreifende Veränderung der Verteilung der Komponenten der Occludenskante in einer Zellkultur bewirken (Schlegel et al., 2010) und somit belegen, dass DSG 2, vermutlich über eine DSG 2-vermittelte Regulierung der Occludenskante, für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erforderlich ist.

Bei einer Reihe von Erkrankungen die den Magen-Darm-Trakt betreffen ist insbesondere die Regulierung der Komponenten, die den parazellulären Spalt versiegeln, gestört (Schlegel et al., 2021). Dies, sowie die daraus resultierende erhöhte Darmpermeabilität, stellt einen pathogenen Faktor bei der Zöliakie (Pizzuti et al., 2004), den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (Zeissig et al., 2007) und dem Reizdarmsyndrom (Bertiaux-Vandaële et al., 2011) dar. Eine Deregulierung bestimmter Barriereproteine konnte auch direkt durch Infektionserreger wie *Vibrio cholera*, enteropathogene *Escherichia coli* und *Clostridium perfringens* oder deren Toxine hervorgerufen werden (Berkes et al., 2003).

Wie eben erwähnt, gehen CED mit einer erhöhten Permeabilität der IEB einher. Die Veränderungen der Claudine bei CED sind gut charakterisiert. So findet sich bei diesen Patientinnen und Patienten ein erhöhter Claudin 2 Anteil sowie ein erniedrigter Claudin 5 und 8 Anteil (Zeissig et al., 2007). Betroffene Patientinnen und Patienten zeigen ein erhöhtes Profil proinflammatorischer Zytokine (Edelblum & Turner, 2009;

Rogler & Andus, 1998). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ in Zellkulturen den Einbau des porenbildenden Claudin 2 stimuliert (Zhang et al., 2017). Die klinische Relevanz des Entzündungsmediators konnte bereits Ende der 1990er Jahre belegt werden, als Studien die Wirksamkeit eines $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpers bei Morbus Crohn nachwiesen (Targan et al., 1997). Die Anti-TNF-Therapie führt zu einer Wiederherstellung der Darmbarriere bei Morbus Crohn (Suenart et al., 2002).

Darüber hinaus können neben $\text{TNF}\alpha$ weitere proinflammatorische Zytokine eine Dysfunktion der Barriere induzieren, indem sie die Transkription von Verbindungsproteinen hemmen und eine durch das Zytoskelett vermittelte Umverteilung, wie eine vermehrte Internalisierung, von Proteinen bewirken (Bruwer et al., 2005; Prasad et al., 2005).

Für diese Arbeit entscheidend ist die pathogene Rolle der Adipositas an der Regulation der Funktion der IEB. Konzepte, die die Pathophysiologie der Adipositas sowie der assoziierten Folgeerkrankungen mit einer Pathologie der Darmbarriere zusammenbringen, stammen in erster Linie aus Studien an Mäusen. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass Stoffwechselerkrankungen bzw. Überernährung mit einer erhöhten Durchlässigkeit des Darms und der Verlagerung von bakteriellen Produkten wie Endotoxinen aus dem Darm korrelieren (Ahmad et al., 2017; Brun et al., 2007; Everard & Cani, 2013). Eine Beeinträchtigung der Darmbarriere wurde ebenso bei Patientinnen und Patienten mit morbidem Adipositas beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass Adipositas auch beim Menschen mit einer verstärkten systemischen Entzündungsreaktion einher geht (Damms-Machado et al., 2017; Genser et al., 2018). Eine detaillierte Studie an Mäusen belegte die Modulation von Claudin Proteinen sowie die dadurch entstehende Hyperpermeabilität des Darms durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) und einem Fluoresceinisothiocyanate (FITC)-Assay sowie die subklinische Entzündung der Schleimhäute nach Fettleibigkeit induzierender Diät. Im Dünndarm der fettleibigen Mäuse zeigten sich eine signifikante Erniedrigung der Claudine 1, 3, 4 und 15 sowie eine Erhöhung von Claudin 2 (Ahmad et al., 2017). Ahmad et al. konnten darüber hinaus einen signifikanten Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ und Claudin 2 Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression im Darm der Mäuse zeigen.

1.6 Aktueller Forschungsstand und Fragestellung

Für den RYGB konnte bisher einheitlich gezeigt werden, dass er die durch Adipositas induzierte chronische Entzündung reduziert und zur Suppression von LPS sowie proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 β führt (Guo et al., 2019; Monte et al., 2012). Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass es eine verbesserte Funktion der Schlüsselproteine der Schlussleistenkomplexe sein könnte, die über eine Normalisierung der Barrierefunktion nach RYGB zu einer geringeren Entzündung und zu einer Verringerung der mit Fettleibigkeit verbundenen metabolischen Komplikationen führt.

Die Forschungsergebnisse über die Darmpermeabilität und die Proteine der Verschlusskontakte im Darm nach einem RYGB sind jedoch begrenzt und einige Ergebnisse teilweise sogar widersprüchlich. So zeigten Guo et al. neben der eben erwähnten Suppression der Entzündung auch eine Erniedrigung der Permeabilität im in vivo FITC-Assay sowie eine Erhöhung der Proteinmenge von Claudin 1, ZO 1 und Occludin in der Western Blot Analyse im Kolon von Ratten nach RYGB-Operation (Guo et al., 2019). Wang et al. konnten ebenfalls eine Permeabilitätsverminderung im Ileum durch FITC-Assay bei Ratten nach RYGB im Vergleich zu hochkalorisch ernährten Ratten und zu einer Gruppe von pair-fed Ratten feststellen (Wang et al., 2020). Diese Technik, bei der den Ratten nur die Futtermenge der Kontrollgruppe, in diesem Fall den RYGB-operierten Ratten, zur Verfügung steht, schließt diätetisch induzierte Veränderungen aus. Casselbrant et al. stellten fest, dass die jejunale Claudin 3- und 4-Expression nach RYGB anstieg, aber dass sich die Occludin- und ZO 1-Expression verringerte, während die Claudin 1-, 2- und 5-Expression im menschlichen Dünndarm unverändert blieb. Die unter Verwendung von Ussing-Kammern gemessene Permeabilität stellte sich als vermindert und damit konsistent zu den Ergebnissen von Guo et al. und Wang et al. dar (Casselbrant et al., 2015). Steensels et al. berichteten über ähnliche Ergebnisse und zeigten, dass die Darmpermeabilität nach RYGB im Jejunum verringert war. Die epitheliale Integrität wurde ebenfalls mit Ussing-Kammern und mittels FITC-Passage ermittelt. Allerdings zeigte sich, dass die Permeabilität im Kolon durch die Operation nicht verändert wurde (Steensels et al., 2017). Diese Versuche wurden an Mäusen durchgeführt. Jin et al. testeten ortsspezifische Auswirkungen des RYGB auf die IEB, indem sie die Proteinexpression von Claudin 1 und ZO 1 in RYGB-operierten Mäusen analysierten und mit funktionellen in vivo Experimenten kombinierten. Die intestinale Permeabilität zeigte sich im Jejunum sowie im Kolon vermindert. Die Expression von ZO 1 zeigte sich im Jejunum der RYGB-

operierten Mäuse gegenüber den schein-operierten Mäusen erhöht. Die Expression von Claudin 1 zeigte sich im Kolon erhöht (Jin et al., 2021). Im Gegensatz dazu berichteten Savassi-Rocha et al., dass es bei 16 stark fettleibigen Personen, die sich einer RYGB-Operation unterzogen hatten, zu einem signifikanten Anstieg ihrer intestinalen Permeabilität kam. Dies wurde anhand der Laktuloseausscheidungsrate und des Laktulose-Mannitol-Verhältnisses gemessen. Savassi-Rocha et al. führten diesen Anstieg auf das Auftreten einer intestinalen Schleimhauthyperplasie im Sinne eines Adaptionsmechanismus, um die Malabsorption von Mikronährstoffen zu minimieren, zurück (Savassi-Rocha et al., 2014).

Aufgrund der Uneinheitlichkeit der Ergebnisse der genannten Studien war es das Ziel dieser Arbeit, eine Charakterisierung der Veränderungen der Schlüsselproteine der Occludenskontakte in den vier Darmregionen Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon bei Ratten nach RYGB- bzw. Schein-Operation vorzunehmen. Dafür wurden Vollwandresektate aller Darmregionen der Ratten nach RYGB- bzw. nach Schein-Operation verwendet. Um der Frage nachzugehen, ob sich im Darminhalt der operierten Ratten Stoffe befinden, die sich positiv auf die Barriereeigenschaften auswirken, wurden im Anschluss an die quantitative Proteinanalyse der Vollwandresektate Transferexperimente auf Zellkulturen mit dem Darminhalt der Ratten durchgeführt. Das Ziel der Transferexperimente war es herauszufinden, ob es Faktoren im Darminhalt der Ratten gibt, die die Funktion der Darmbarriere regionenspezifisch regulieren und die Proteinmenge der Barriereproteine verändern.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Genehmigung des Versuchsvorhabens

Vor Durchführung der Experimente wurden diese durch den Tierschutzausschuss der Regierung von Unterfranken, Würzburg, Deutschland überprüft und genehmigt (Lizenznummer 55.2-2532-2-467). Alle Experimente wurden im Einklang mit den Tierschutzrichtlinien der Europäischen Union durchgeführt.

2.1.2 Versuchstiere

Für die Experimente dieser Arbeit wurden männliche Albino-Ratten des Stammes Wistar der Firma Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA, verwendet. Zu Beginn der Experimente waren die Ratten vier Wochen alt. Ihr Gewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 324,3 g +/- 2,8 g. Die im Folgenden beschriebene Versorgung der Tiere, die Durchführung der Operationen, die Durchführung der terminalen Anästhesie sowie die Entnahme und Asservierung der Organe erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der experimentellen Viszeralchirurgie des Universitätsklinikum Würzburgs. Die Aufarbeitung und Analyse der entnommenen Gewebe sowie die Auswertung der physiologischen Daten waren neben den unten beschriebenen Zellkulturexperimenten Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

2.1.3 Tierhaltung

Die Ratten wurden bei einer Raumtemperatur von kontinuierlich 22 °C gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus war 12 Stunden mit Beginn des Tageslichts um 7:00 Uhr.

2.1.4 Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll

Für fünf Wochen hatten alle Ratten freien Zugang zu hochkalorischer Nahrung mit 5,2 kcal/g wovon 60 % der Kalorien aus Fett bestanden (C1090-60; Adipositas induzierende Ernährung, Altromin Spezialfutter GmbH und Co. KG, Lage, Deutschland). Das Gewicht der Ratten betrug nach fünf Wochen 477,9 g +/- 6,9 g. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei bei der einen Gruppe eine RYGB-Operation (n = 20, Körpergewicht von 474,2 g +/- 6,7 g) und bei der anderen Gruppe eine Schein-Operation durchgeführt wurde (n = 10, Körpergewicht von 470,6 g +/- 10,1 g). Nach der Operation erhielten die Ratten Zugang zu der oben erwähnten hochkalorischen Nahrung sowie zu niedrigkalorischer Nahrung mit 3,5 kcal/g wobei 10 % der Kalorien aus Fett bestanden (C1090-10; Altromin Spezialfutter GmbH &

Co. KG, Lage, Deutschland). Sechs Wochen nach der Operation erfolgte die terminale Anästhesie. Die nachfolgende Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der im Verlauf des Experiments an den Ratten durchgeführten Maßnahmen.

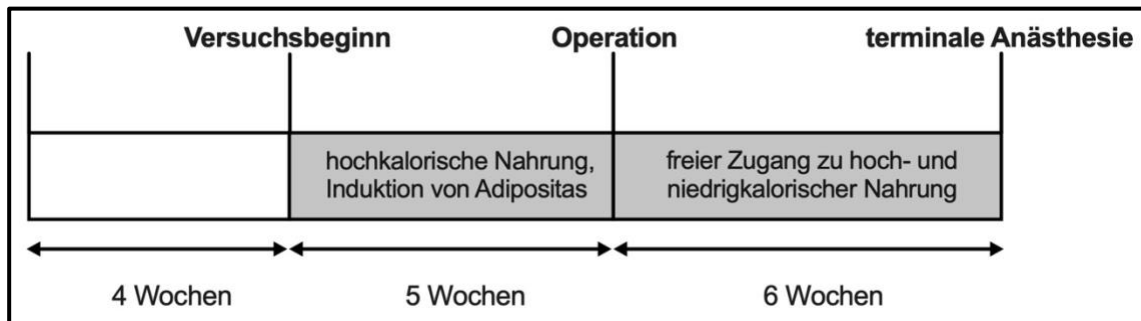


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der im Verlauf des Experiments an den Ratten durchgeführten Maßnahmen. Zwischen dem Versuchsbeginn und der Operation betrug der Zeitraum fünf Wochen, wohingegen sechs Wochen zwischen Operation und terminaler Anästhesie lagen (modifiziert nach Hankir et al., 2020).

2.1.5 Operationsablauf und Technik

2.1.5.1 Narkose und Analgesie

Die Operationen wurden von Herrn Professor Florian Seyfried unter Vollnarkose durchgeführt. Die Narkoseeinleitung geschah mit 5 % Isofluran in 2 % Sauerstoff. Aufrechterhalten wurde die Narkose mit 2 % Isofluran in 2 % Sauerstoff. Die Tiere erhielten jeweils 3 mg/kgKG Caprofen subcutan und 1,25 mg/kgKG Amoxicillin intraperitoneal.

2.1.5.2 RYGB-Operation

Die Durchführung der RYGB-Operation sowie der Schein-Operation bedurften einer Längsschnittlaparotomie. Bei der RYGB-Operation wurde ein kleiner Magenpouch, welcher etwa fünf Prozent des ursprünglichen Magenvolumens entsprach, angelegt. Das Jejunum wurde etwa 15 cm aboral des Pylorus abgesetzt. Es erfolgte ein End-zu-Endanschluss des Magenpouches an das distale Ende des abgesetzten Jejunums. So entstand die sogenannte alimentäre Schlinge, die dem unteren Teil des Gastrointestinaltrakts die Nahrung zuführt. Zudem erfolgte ein End-zu-Seitanschluss des Duodenums an das Jejunum etwa 25 cm oral der Ileozäkalklappe. Dadurch entsteht eine Schlinge, die Nahrungs- und Verdauungssäfte gemeinsam führt sowie die

sogenannte bilipankreatische Schlinge, die die Galle und die Verdauungssäfte aufnimmt und weiterführt.

2.1.5.3 Schein-Operation

Bei der Schein-Operation folgte auf die Laparotomie die Durchführung einer etwa einen Zentimeter langen Gastrostomie mit anschließendem Verschluss.

2.1.5.4 Post-operative Phase und terminale Anästhesie

Die ersten drei post-operativen Tage verbrachten die Ratten jeweils alleine in Käfigen. Die Ratten wurden lediglich mit flüssiger Nahrung gefüttert (Ensure mit Vanillegeschmack; 0,93 kcal/ml, 22 % der Kalorien aus Fett) und erhielten zur Schmerzmilderung weiterhin 0,3 mg/kgKG Caprofen subcutan. Um die Verhältnisse analog zur klinischen Versorgung in der Humanmedizin nachzustellen, erhielten die Ratten ab dem vierten postoperativen Tag Zugang zu sowohl hochkalorischer Nahrung als auch zu niedrigkalorischer Nahrung, wie in 2.1.4 bereits erläutert. Aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz der Seit-zu-Seitanastomose wurden fünf Ratten aus der RYGB-Gruppe innerhalb von sieben Tagen nach der Operation eingeschläfert. Die terminale Anästhesie sowie die Entnahme und Asservierung der Organe erfolgte sechs Wochen nach der Operation in Vollnarkose. Die Ratten der RYGB-Gruppe wogen zum Zeitpunkt der terminalen Anästhesie 451,9 g +/- 12,5 g und die der schein-operierten Gruppe 592,6 g +/- 13,9 g.

2.2 Material

2.2.1 Zellkultur

Für die Experimente dieser Arbeit wurden Caco2-Zellen verwendet. Diese Zellreihe entstammt ursprünglich einem menschlichen kolorektalen Adenocarcinom. Werden diese Zellen unter spezifischen Konditionen kultiviert, so bilden sie eine der IEB ähnliche Monolayer. Caco2-Zellen differenzieren spontan, ohne Zusatz oder Entnahme von Stoffen aus dem Medium. Sie bilden eine polarisierte Morphologie, Mikrovilli und Schlussleistenkomplexe (Lea, 2015a). Caco2-Zellen können aus diesem Grund als in vitro Modell für die IEB fungieren. Die Zellen wurden kommerziell erworben (HTB-37, American Type Cell Culture, Manassas, VA, USA).

2.2.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Caco2-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in einem Medium bestehend aus Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM) (DMEM D5796, Sigma Aldrich, München, Deutschland) unter Zusatz von 10 % Fetal Calf Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland), 50 U/ml Penicillin-G und 50 µg/ml Streptomycin (Sigma Aldrich, München, Deutschland). Die Caco2-Zellen wuchsen unter konstanten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre in einem Brutschrank (Heracell 150, Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bis zur für die Experimente nötigen Konfluenz heran. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Alle Arbeiten erfolgten, um einer Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Viren vorzubeugen, an einer sterilen Werkbank (HersaSafe, Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vor Benutzung wurde die Werkbank für zehn Minuten mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Mehrfach verwendete Geräte oder Behältnisse wurden zur Reduzierung der Keimbelastung mit Terralin Liquid® (Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Die nachfolgende Tabelle 2 stellt die bei der Kultivierung verwendeten Substanzen tabellarisch dar.

Tabelle 2: Zellkulturreagenzien

Tabelle 2 stellt die bei der Kultivierung der Caco2-Zellen verwendeten Substanzen tabellarisch dar. **DMEM** = Dulbeccos Modified Eagle's Medium, **FCS** = Fetal Calf Serum, **P/S** = Penicillin-G und Streptomycin.

Zellkulturmedien	Hersteller
DMEM D5796	Sigma Aldrich, München, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
P/S	Sigma Aldrich, München, Deutschland

2.2.1.2 Passagierung und Aussaat

Die Zellen wurden täglich mikroskopiert (Carl ZeissTM Axiovert 40 C, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Nach dem Erreichen der nötigen Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen im Verhältnis 1:6 in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland) zur Weiterführung der Zelllinie sowie die Aussaat in 6-Well-Platten

(Durchmesser je 3,5 cm) (Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland) auf Transwellfilter (Porengröße 0,4 μm , Falcon, Heidelberg, Deutschland) und auf 8-Well-Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Platten (Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) für die Durchführung der Experimente. Nach ca. fünf Tagen erreichten die Zellen erneut Konfluenz. Für die Passagierung wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellmonolayer einmalig mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit ca. 8 ml Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (1 % EDTA in PBS) im Brutschrank. Ca^{2+} -Chelatoren wie EDTA werden häufig als Reagenzien verwendet, um die Dissoziation von Zellen in Monolayern zu fördern. EDTA bildet stabile Chelatkomplexe mit mindestens zweiwertigen Kationen (Müller-Newen & Petrides, 2014). Man macht sich dabei die Tatsache zunutze, dass die Adhäsion der Caco2-Zellen durch Cadherine aufrechterhalten wird. Diese bilden wie in Abschnitt 1.4.1.2.2 aufgeführt, Ca^{2+} -abhängige Haftkontakte. Der Kalziumentzug reicht aufgrund der Ca^{2+} -unabhängigen Zell-Zell-Adhäsionsmechanismen nicht aus, um eine vollständige Dispersion der Zellen zu erreichen. Aus diesem Grund folgte nach Absaugung der EDTA-Lösung und einer erneuten Spülung mit PBS die Zugabe der Serinprotease Trypsin und eine Inkubation von fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank, um die Zellen gänzlich zu lösen. Danach erfolgte die Zugabe von Nährmedium sowie die Zentrifugation des Zellgemisches bei 1.300 Umdrehungen pro Minute für insgesamt vier Minuten. Es folgte die Absaugung des Überstandes und eine gründliche Resuspension des Pellets. Danach erfolgte die Aussaat der Zellen. Die Zellkulturbehältnisse wurden 30 Minuten vor der Aussaat mit in Wasser gelöster 0,5-prozentiger Gelatine benetzt, um eine bessere Adhäsion und Kultivierbarkeit der Caco2-Zellen zu erreichen. Die Gelatine wurde nach der Inkubationszeit abgesaugt und die Behältnisse zweimalig mit PBS gewaschen. Danach wurde auf 37 °C vorgewärmtes Nährmedium vorgelegt und die Zellsuspension zugegeben.

2.2.2 Pufferrezepturen

In dieser Arbeit wurden insgesamt sechs verschiedene Puffer verwendet. Tabelle 3 zeigt eine tabellarische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer mitsamt ihrer Rezepturen.

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Rezepturen

Tabelle 3 zeigt die für diese Arbeit verwendeten Puffer und Rezepturen. **Aqua dest.** = destilliertes Wasser, **EDTA** = Ethylendiaminetetraacetat, **HCl** = Salzsäure, **HEPES** = Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure, **MOPS** = Morpholinopropansulfonsäure, **NaCl** = Natriumchlorid, **NaF** = Natriumfluorid, **SDS** = Sodiumdodecylsulfat, **TBS** = Tris gepufferte Kochsalzlösung, **Triton X-100** = Octoxinol 9.

Puffer	Inhaltsstoffe
Gewebelysepuffer	1,212 g Ultra Pure™ Tris-Puffer, 4 g NaCl, 0,3723 g EDTA, 5 ml Triton X-100, 50 ml Glycerol; Ad 500 ml Aqua dest.; pH mit HCl auf 8 einstellen
MOPS SDS Running Buffer	50 mM MOPS, 50 mM TRIS Base, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7
Probenpuffer Western Blot	25 ml 1 M Tris HCl pH 6,8 (12,12 g Ultra Pure™ Tris-Puffer ad 100 ml Aqua dest., pH einstellen mit HCl) 40 ml Glycerol 86 %, 8 g 10 % SDS, 1 mg Bromphenolblau; Ad 100 ml Aqua dest.
SDS-Lysepuffer	10 ml 10 % SDS, 0,105 g 25 mM NaF, 0,076 g 2 mM EDTA, 0,595 g 2 mM HEPES (pH 7,6); Ad 100 ml Aqua dest.
TBS	60,6 g Tris Ultra Pure™ Tris-Puffer, 87,6 g NaCl; Ad 800 ml Aqua dest.; pH mit HCl auf 7,6 einstellen
Transferpuffer	50 ml 20x Transferpuffer, 200 ml Methanol; Ad 1000 ml Aqua dest.

2.2.3 Oligonukleotidprimer für die PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) benötigt einen Primer um Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu amplifizieren. Als Primer bezeichnet man Oligonukleotide, bestehend aus etwa 18 – 30 Basen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Sie benötigen zudem ein freies 3'OH-Ende, das der Polymerase als Startpunkt für die DNA-Synthese dient (Brix et al., 2014; Mülhardt, 2013). In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die für diese Arbeit verwendeten Primerpaare aufgeführt.

Tabelle 4: Primer Sequenzen

Tabelle 4 zeigt die für die RT-qPCR verwendeten Primer und deren Sequenzen. **CDH1** = E-Cadherin, **CLDN1** = Claudin 1, **CLDN2** = Claudin 2, **CLDN3** = Claudin 3, **CLDN4** = Claudin 4, **DSG2** = Desmoglein 2, **GAPDH** = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, **OCLN** = Occludin, **RT-qPCR** = quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion.

Gen	Sequenz
CDH1	Vorwärts: AAAGTGCCTTTGTTGGCCTG Rückwärts: AGGGGTTTTTGCTACTGGGG
CLDN1	Vorwärts: CCCAGTCAATGCCAGGTACG Rückwärts: CAAAGTAGGGCACCTCCCAG
CLDN2	Vorwärts: GGATCCCTTTCTCCCTCTCCA Rückwärts: AAGAAGGCATCTAGAAGACAGGG
CLDN3	Vorwärts: GCCACCAAGGTCGTCTACTC Rückwärts: CCTGCGTCTGTCCCTTAGAC
CLDN4	Vorwärts: AAAGTGCCTTTGTTGGCCTG Rückwärts: AGGGGTTTTTGCTACTGGGG
DSG2	Vorwärts: TTGAGGTCAATGAAGGGGTC Rückwärts: GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
GAPDH	Vorwärts: TGCTGCTTCTCCTGATCTGCT Rückwärts: GATCCTCTCCCTCCCGAAGA
OCLN	Vorwärts: CCCCATCTGACTATGTGGAAAG Rückwärts: CAGGCGAAGTTAATGGAAGC

2.2.4 Antikörper für den Western Blot

Die in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgeführten Antikörper wurden für die Proteinanalyse im Western Blot verwendet. Um die gesuchten Proteine nachzuweisen, macht man sich die Antigen-Antikörper Bindung zunutze. Diese geschieht mit hoher Spezifität nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Ein antigenspezifischer Primärantikörper bindet an das Epitop des Antigens. An den konstanten Teil dieses Primärantikörpers bindet ein Sekundärantikörper, über den wiederum die Detektion erfolgt (Kalbitzer, 2014).

Tabelle 5: Primärantikörper

Tabelle 5 zeigt die für den Western Blot verwendeten Primärantikörper und die verwendete Konzentration sowie Hersteller und die zugehörige Bestellnummer. **POX-gek.** = Meerrettichperoxidase-gekoppelt, **WB** = Western Blot.

Antikörper	Konzentration WB	Hersteller und Bestellnummer
Claudin 1 (Kaninchen, polyklonal)	1:250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 51-9000
Claudin 2 (Maus, monoklonal)	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 32-5600
Claudin 3 (Kaninchen, polyklonal)	1:250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; PA5-16867
Claudin 4 (Maus, monoklonal)	1:250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 32-9400
Desmoglein 2 (Maus, monoklonal)	1:250	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA; 32-6100
E-Cadherin (Maus, monoklonal)	1:1000	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA; 610182
Occludin (Maus, monoklonal)	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 33-1500
POX-gek. β -Aktin (Maus, monoklonal)	1:10000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland; A3854

Der Sekundärantikörper wird von einem anderen Tier gebildet. Die für diese Arbeit verwendeten Sekundärantikörper stammen von der Ziege und sind gegen das Immunglobulin G von Maus bzw. Kaninchen gerichtet. In der folgenden Tabelle 6 sind die verwendeten Sekundärantikörper aufgeführt.

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Tabelle 6 zeigt die für den Western Blot verwendeten Sekundärantikörper und die verwendete Konzentration sowie Hersteller und zugehörige Bestellnummer. **IgG** = Immunglobulin G, **gam** = goat anti mouse, **garb** = goat anti rabbit, **POX-gek.** = Meerrettichperoxidase-gekoppelt, **WB** = Western Blot.

Antikörper	Konzentration WB	Hersteller und Bestellnummer
Ziege gegen Maus, IgG; (gam, POX-gek.)	1:3000	Dionova, Hamburg, Deutschland; 115-035-003
Ziege gegen Kaninchen, IgG; (garb, POX-gek.)	1:3000	Dionova, Hamburg, Deutschland; 111-035-003

2.3 Experimentelle Methoden

2.3.1 Herstellung der Gewebelysate

Für die Herstellung der Gewebelysate wurden die einzelnen Darmregionen Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon der Ratten mit einem Skalpell (Cutfix Einmalskalpelle 15, Braun Kronberg, Deutschland) unterteilt. Es wurde pro Versuchstier und Darmregion ein ca. 5 mm langes Stück Darm in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Pro Probe wurden 500 µl Gewebelysepuffer zugegeben. Den Proben wurde ein Proteaseinhibitor (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in der Verdünnung 1:100 zugegeben. Um die Proben zu homogenisieren, wurde den Eppendorf-Gefäßen eine kleine Metallkugel zugegeben. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei einer Frequenz von 30 Hz in einem Tissue Lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) zerkleinert. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend für zehn Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben mit Ultraschall homogenisiert (Sonopuls, Homogenisator HD 2070, 10 Impulse, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Die nachfolgende Abbildung 8 gibt eine Übersicht über die Gewinnung der Lysate sowie deren Verwendung.

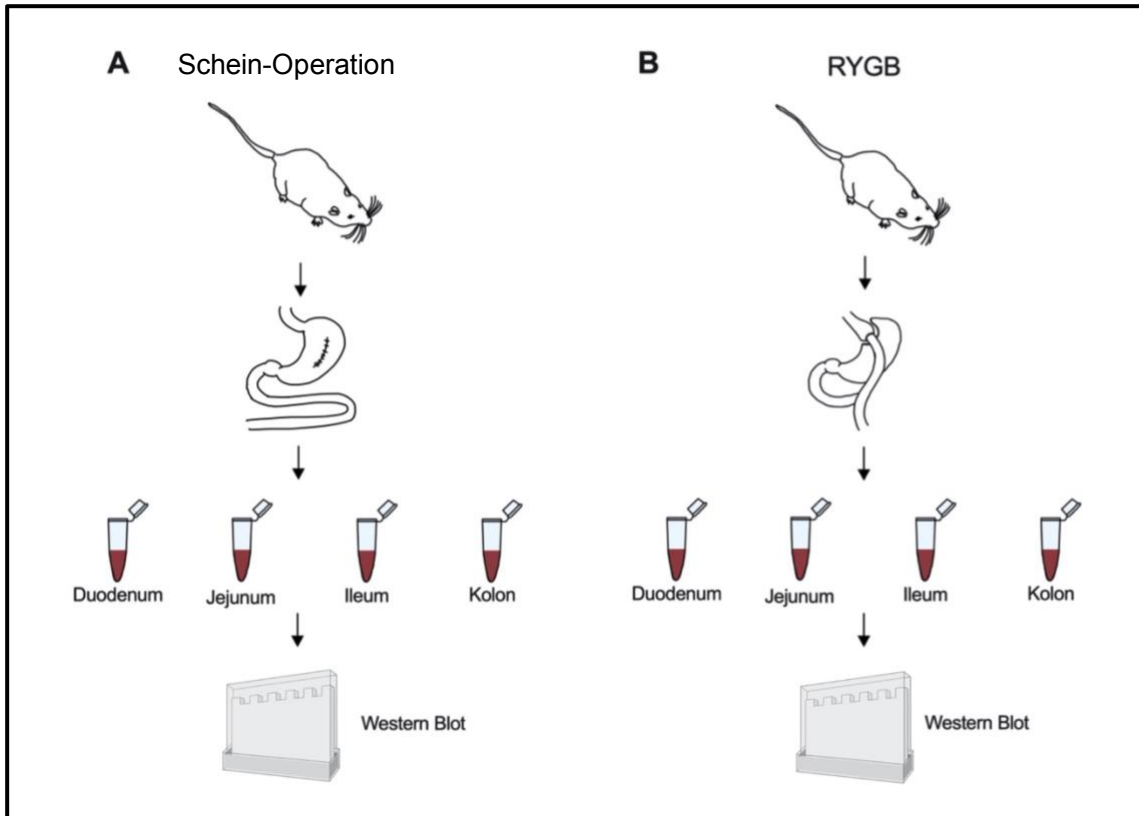


Abbildung 8: Schematische Darstellung über die Gewinnung der Gewebelysate und deren Verwendung

Abbildung 8 zeigt in **A** die schein-operierten Ratten und in **B** die RYGB-operierten Ratten. Es wurden jeweils 5 mm der Darmsegmente entnommen und in Reaktionsgefäße überführt. Nach Herstellung der Lysate folgte die Analyse der Proben mittels Western Blot (eigene Abbildung; modifiziert nach Hankir et al., 2020; Teile der Abbildung erstellt mit BioRender.com). **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass.

2.3.2 Aufbereitung des Darminhalts

Noch bevor die Segmente des Darmes in etwa 5 mm große Stücke geschnitten worden sind, um daraus Gewebelysate herzustellen, wurde mit Hilfe eines Wattestäbchens der Darminhalt des jeweiligen Darmabschnitts herausgeschoben, ohne dabei den Darm zu verletzen. Der Inhalt wurde sofort in ein Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverwendung gelagert. Der Inhalt des Duodenums sowie des Jejunums wurde in destilliertem Wasser mit einer Konzentration von 100 mg/ml aufgelöst, der Inhalt von Ileum und Kolon wurde mit einer Konzentration von $100\text{ mg}/1,5\text{ ml}$ aufgelöst und in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Um die Proben zu homogenisieren, wurde den Eppendorf-Gefäßen eine kleine Metallkugel zugegeben und sie wurden für zehn Minuten bei einer Frequenz von 30 Hz in einem Tissue Lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) zerkleinert. Der dadurch entstandene halbflüssige Brei wurde anschließend für zehn Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro

Minute zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde durch einen 70 µm Nylon-Zell-Sieb gefiltert und nach RYGB- und schein-operierter Gruppe gepoolt. Der aufbereitete Darminhalt wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung verwahrt. Die nachfolgende Abbildung 9 gibt eine Übersicht über die Gewinnung des Darminhaltes sowie dessen Verwendung.

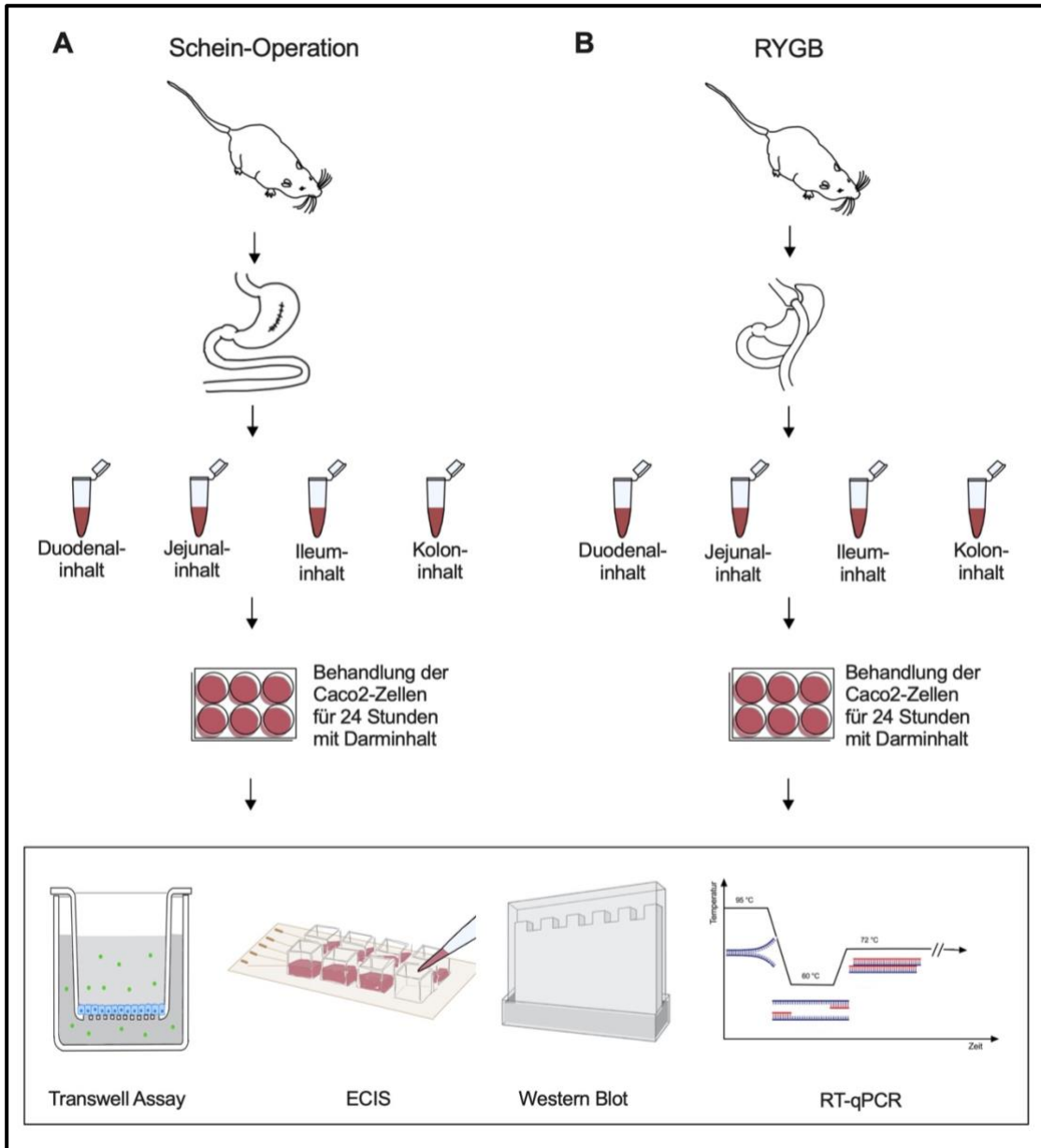


Abbildung 9: Schematische Darstellung über die Gewinnung des Darminhalts und dessen Verwendung

Abbildung 9 zeigt in **A** die schein-operierten Ratten und in **B** die RYGB-operierten Ratten. Der Darminhalt der Ratten wurde in Reaktionsgefäße überführt und aufbereitet. Danach wurden Caco2-Zellen für 24 Stunden damit behandelt. Es folgten verschiedene Versuche mit den Zelllysaten der Caco2-Zellen wie das Transwellassay, die ECIS-Messung, die Western Blot Untersuchung oder die RT-qPCR (eigene Abbildung; modifiziert nach Hankir et al., 2020; Teile der Abbildung erstellt mit BioRender.com). **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass, **ECIS** = Electric Cell-Substrate Impedance Sensing; **RT-qPCR** = quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion.

2.3.3 Behandlung der Zellen mit Darminhalt

Die konfluenten, in 6-Well-Platten ausgesäten Caco2-Zellen, wurden für diese Arbeit über 24 Stunden mit dem, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, aufbereiteten Darminhalt behandelt. Dafür wurde der gepoolte Darminhalt 1:10 mit DMEM (DMEM D5796, Sigma Aldrich, München, Deutschland) verdünnt.

2.3.4 Herstellung der Zelllysate

Nach der 24-stündigen Inkubation erfolgte die Zellernte. Dafür wurde das mit Darminhalt versetzte Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 µl Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lysepuffer unter Zuhilfenahme eines Zellscrapers abgelöst und in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben mit Ultraschall homogenisiert (Sonopuls, Homogenisator HD 2070, 10 Impulse, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland).

2.3.5 Permeabilitätsmessung mittels Transwellfiltersystem

Das Transwellassay bietet die Möglichkeit die Barrierefunktion eines Epithels anhand der parazellulären Permeabilität für einen fluoreszierenden Farbstoff (4kDa FITC-Dextran, Sigma Aldrich, München, Deutschland) zu beurteilen. Dafür wurden Caco2-Zellen auf semipermeable Filter (Porengröße 0,4 µm, 353180, Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Diese Filter wurden, wie in untenstehender Abbildung 10 dargestellt, in eine 12-Well-Platte gehängt, sodass sich ein unteres und ein oberes Kompartiment bildete. Das Nährmedium wurde mit dem, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, aufbereiteten Darminhalt versetzt (Duodenum 1:20, Jejunum 1:20, Ileum 1:20; Kolon 1:10) und zu den Filtern in die obere sowie untere Kammer der 12-Well-Platte gegeben. In das obere Kompartiment wurden 500 µl und in das untere 1600 µl hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Danach wurde das Medium abgesaugt. Es folgte eine vorsichtige Spülung mit PBS, um alle Reste des Mediums zu entfernen. Dieser Schritt ist wichtig, da das im Medium enthaltene Phenolrot, bei unvollständiger Spülung die Fluoreszenzmessung beeinflussen könnte. Im Anschluss folgte eine zweistündige Inkubation mit frischem Medium ohne Phenolrot. Dafür wurden dem oberen Kompartiment, wie bereits beschrieben, 500 µl zugegeben, dem unteren Kompartiment 1600 µl. Dem oberen Kompartiment wurden zudem zusätzlich 150 µl von 10 mg/ml 4kDa FITC-Dextran zugegeben. Der parazelluläre Fluss wurde durch die Entnahme von 50 µl Flüssigkeit aus der oberen Kammer zum

Ausgangszeitpunkt des Experiments sowie durch Entnahme von 100 μ l aus der unteren Kammer nach jeweils 30, 60, 90 und 120 Minuten quantifiziert.

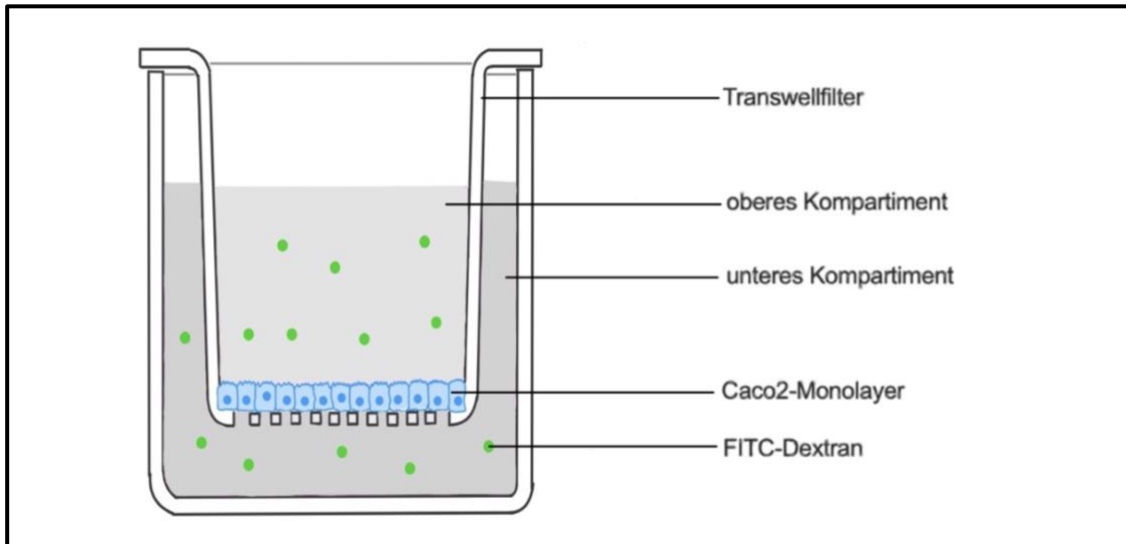


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Transwellassays

Abbildung 10 zeigt schematisch den Aufbau einer Kammer bei der Durchführung eines Transwellassays. Der mit einer Caco2-Zellmonolayer beschichtete Transwellfilter teilt die Kammer in ein oberes und unteres Kompartiment. Dem oberen Kompartiment wurden zu Beginn des Experiments 10 mg/ml 4kDa FITC-Dextran, in grün dargestellt, zugegeben. Während des Experiments gelangt durch parazellulären Fluss FITC-Dextran durch die Caco2-Zellmonolayer in das untere Kompartiment (Teile der Abbildung erstellt mit BioRender.com). **FITC** = Fluoresceinisothiocyanat.

Während des Experiments wurde die 12-Well-Platte bei 37 °C auf einem horizontalen Schüttler abgestellt. Die zu Beginn des Experimentes sowie die nach jeweils 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommenen Proben wurden in eine 96-Well-Platte überführt. Diese wurde bis zur Abnahme des 120 Minuten Wertes in einer Dunkelbox bei 4 °C verwahrt. Es erfolgte die Messung der Exzitation bei 485 nm und der Emission bei 535 nm mittels eines Fluoreszenzspektrometers.

Für die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten (P_E) in cm/s wurde folgende Formel verwendet (Schlegel et al., 2010):

$$P_E = \frac{(\Delta C_A \div \Delta t) \cdot V_A}{\Delta C_L \cdot S}$$

Dabei gilt:

P_E = Permeabilitätskoeffizient in cm/s

ΔC_A = Änderung der FITC-Dextran-Konzentration

Δt = Zeitänderung in s

V_A = Volumen des unteren Kompartiments in μ l

ΔC_L = FITC-Dextran-Konzentration im oberen Kompartiment zum Zeitpunkt 0

S = Oberfläche in cm^2

2.3.6 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Messung des TEER stellt eine sensitive Methode dar, um funktionelle Veränderungen einer Epithelbarriere zu quantifizieren (Lea, 2015b). Durch die kontinuierliche Messung des TEER kann im Vergleich zu Endpunktassays wie dem Transwellassay eine Quantifizierung der Barrierefunktion im Zeitverlauf durchgeführt werden. Dafür wurden Caco2-Zellen auf einer ECIS-8-Well-Platte ausgesät (8W10E+ PET, Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellmonolayer wurde zu Beginn des Experiments mit 200 μ l Medium behandelt. Da die Stromleitung über der Zellmonolayer vor allem über die Ionen geschieht, die sich im Medium befinden, ist es essenziell, dieses vor der Messung zu wechseln und exakt 200 μ l in jede Vertiefung zu geben. Es erfolgte eine zehnmünütige Äquibrierung zur Bestimmung der Ausgangswerte. Danach wurde den Wells 200 μ l des mit Darminhalt versetzten Mediums zugegeben. Das zugesetzte Medium wurde 1:10 mit Darminhalt von Duodenum und Kolon sowie 1:20 mit Darminhalt von Jejunum und Ileum versetzt. Danach begannen die Messungen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Das verwendete Messsystem ECIS-1600R (Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) misst mit 40 Elektroden die durch den elektrischen Wechselstrom mit einer Stromstärke von 1 μ A bei einer Frequenz von 400 Hz induzierten Spannungsänderungen zwischen den Elektroden. Ein Spannungsabfall geschieht in erster Linie durch parazelluläre Diffusion der Ionen, daher korreliert dieser mit Barriereveränderungen der Epithelschicht. Die Impedanz wird aus den Spannungsänderungen berechnet. Parameter wie die

Resistance, über die sich die Qualität und Funktion der Zellbarriere quantifizieren lässt, lassen sich aus der Impedanzmessung ableiten (Szulcek et al., 2014). Die Messreihen wurden in Microsoft Excel in Prozent relativ zur Baseline für jede Behandlung ausgewertet.

2.3.7 Western Blot

Der Western Blot ist eine hochspezifische Methode zum Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch (Kalbitzer, 2014), in diesem Fall aus Zelllysaten bzw. aus Gewebelysaten. Dieses Verfahren erlaubt neben dem Nachweis des gesuchten Proteins auch eine semiquantitative Bestimmung. Im Folgenden werden die für die Durchführung des Western Blots nötigen Schritte genauer beschrieben.

2.3.7.1 Quantitative Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Test ist eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. In den durchgeführten Experimenten diente sie zur Gesamtproteinbestimmung jedes einzelnen Lysats. Diese Quantifizierung ist wichtig, um beim Western Blot verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können. Aufgrund der identische Gesamtproteinmenge können später semiquantitativ spezifische Proteine verschiedener Proben verglichen werden. Der Test wurde mithilfe eines Kits der Firma Thermo Fisher (Pierce® BCA Protein Assay, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf einer Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Protein zu einwertigen Kupferionen im alkalischen Milieu. Diese Reaktion ist auch als Biuret-Reaktion bekannt. Im zweiten Schritt reagieren die einwertigen Kupferionen mit BCA zu einem violetten Komplex. Dieser Komplex kann bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden (Smith et al., 1985). Die Durchführung des Tests sieht zunächst das Anlegen einer Standardkonzentrationsreihe bestehend aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) in neun verschiedenen Konzentrationen vor. Hierbei wurde exakt nach Herstellerangabe vorgegangen. Um mögliche Abweichungen beim Pipettieren auszugleichen, wurden die Proteinstandards, genauso wie später auch die Proben, als Doubletten pipettiert. So ist es möglich mit Hilfe einer Durchschnittsberechnung die Abweichungen zu reduzieren. Es wurden für jede Konzentrationsstufe zweimal 10 µl BSA in einer 96-Well-Platte (Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland) vorgelegt. Die zu analysierenden Proben wurden 1:10 mit Lysepuffer (entsprechend Gewebelysepuffer bzw. SDS-Lysepuffer) verdünnt, um den Proteingehalt zu minimieren. Danach wurden je zweimal 10 µl in die 96-Well-Platte pipettiert. Die im

Set enthaltenen Reagenzien wurden wie angegeben im Verhältnis 50:1 (Reagenz A : Reagenz B) vermischt und je 200 µl pro Well zu den BSA-Standards sowie den Proben gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die spektralphotometrische Messung der Extinktion. Mittels der über die BSA-Standards erstellten Kalibriergeraden, konnte die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

2.3.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) dient der Auftrennung der Proteine eines Proteingemisches anhand ihres Molekulargewichtes. Das Prinzip beruht darauf, dass Proteine verschiedener Molekülgrößen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch eine Gelmatrix, bestehend aus Polyacrylamid, in einem elektrischen Feld wandern. (Kalbitzer, 2014). Damit sich die Proteine ausschließlich aufgrund ihres Größenunterschieds auf dem Weg Richtung Anode auftrennen, müssen sie einheitlich geladen und linear vorliegen. Dies geschieht mit Hilfe des anionischen Detergens SDS. Dies bindet an die Proteine und maskiert deren Ladung. Zudem wird die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) und Erhitzung zerstört. Für die Elektrophorese wurden vorgefertigte Zwei-Komponenten Gele verwendet (NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris-Gel, Novex™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Gele wurden in die mit MOPS SDS Puffer (siehe 2.2.2) gefüllte Elektrophoresekammer (X-Cell sure lock mini cell electrophoresis system, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gespannt. Es wurden 5 µl eines Pageruler™ Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen. Vor dem Auftragen der Proben in die Gelkammern wurden diese 1:1 mit dem Probenpuffer für Western Blot (siehe 2.2.2) versetzt. Neben SDS enthielt der Puffer auch DTT (AppliChem GmbH, Darmstadt), das Disulfidbrücken reduziert und so Aminosäuren spaltet sowie Glycerin, das aufgrund seiner hohen Dichte dafür sorgt, dass die Proben gleichmäßig in die Taschen sinken sowie Bromphenolblau zur Visualisierung der Lauffront. Das Gemisch aus Probe und Probenpuffer wurde anschließend noch für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Danach wurden je nach Qualität 10 µg bis 30 µg Protein in jede Gelkammer pipettiert. An die Elektrophoresekammer (X-Cell sure lock mini cell electrophoresis system, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt und gewartet bis die farblich markierte Front das untere Ende des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel herausgenommen und für den Immunoblot vorbereitet.

2.3.7.3 Immunoblot

Die durch die SDS-Page der molekularen Größe nach aufgetrennten Proteine wurden im Nassblot-Verfahren (Towbin et al., 1979) vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Novex™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) übertragen. Die Nitrozellulosemembran wurde dafür mit Transferpuffer befeuchtet und das Gel passgenau und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Um diese beiden Lagen wurden nun mit Transferpuffer angefeuchtete Filterpapiere gelegt. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen zwei Schwämme geklemmt und in die vertikale, mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingespannt (PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web; Preqlab, Erlangen, Deutschland). Dabei musste unbedingt darauf geachtet werden, dass das Gel zur Kathode bzw. die Membran zur Anode zeigt, da die negativ geladenen Proteine Richtung Anode wandern. Es wurde eine Stromstärke von 140 mA angelegt und die Proteine wanderten aus dem Gel auf die Membran und blieben dort hängen. Während dieses ca. eineinhalb Stunden dauernden Vorganges wurde die Blotkammer im Kühlraum aufbewahrt. Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau des „Sandwiches“ in der Blotkammer.

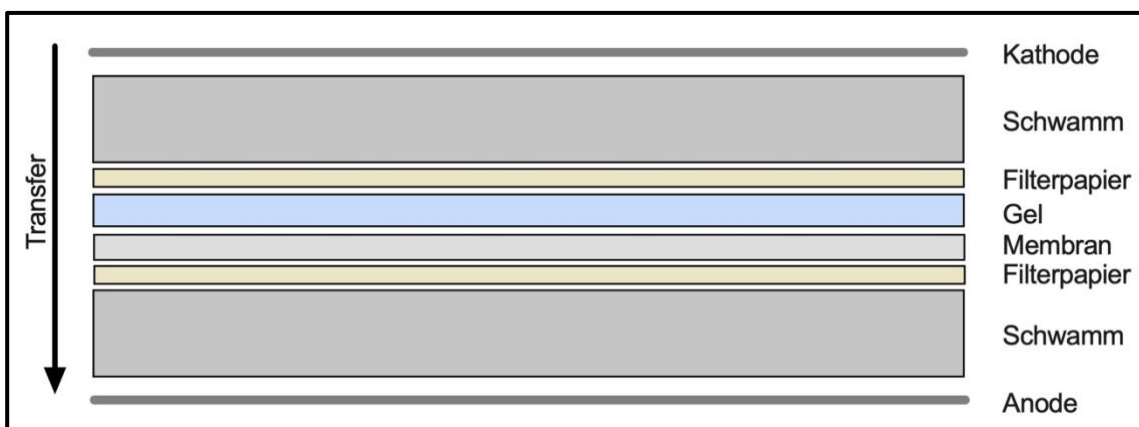


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Nassblotverfahrens

Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau des sich in der Blotkammer befindenden Sandwichs aus Schwämmen, Filterpapier, Gel und Membran. Dargestellt ist die Aufsicht von oben auf die Blotkammer. Der Pfeil markiert die Laufrichtung der Proteine Richtung Anode.

Der Nachweis spezifischer auf der Membran gebundener Proteine gelingt mit Hilfe von Primärantikörpern die gegen spezifische Epitope der Proteine gerichtet sind. Ein Sekundärantikörper bindet danach an den konstanten Teil des Primärantikörpers (Kalbitzer, 2014).

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Nitrocellulosemembran zuerst für eine Stunde in einer Suspension aus 5 % Magermilchpulver in Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS) + 0,05 % Tween unter ständigem Schütteln auf einer Schüttelplatte (GFL 3017, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Danach wurde die Membran über Nacht im Kühlraum ebenfalls unter ständigem Schütteln mit dem Primärantikörper inkubiert. Das Schütteln dient der gleichmäßigen Verteilung der Antikörper über der Membran. Für die Inkubation wurde die Membran in Folie eingeschweißt und die Antikörpersuspension hinzugegeben. Dies verhindert eine Verdunstung der Suspension bei längerer Inkubationszeit. Die Antikörper wurden dafür in den in Tabelle 5 genannten Konzentrationen mit 5 % Magermilchpulver in TBS + 0,05 % Tween verdünnt.

Am nächsten Tag wurden die mit dem Primärantikörper inkubierten Membranen drei Mal für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur mit TBS + 0,05 % Tween gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper, welcher ebenfalls in den in der Tabelle 6 genannten Konzentrationen in 5 % Magermilchpulver in TBS + 0,05 % Tween verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte ein erneuter drei Mal fünfminütiger Waschgang mit TBS + 0,05 % Tween auf dem Schüttler, um den überschüssigen Sekundärantikörper abzuwaschen. Die Nitrocellulosemembran wurde für eine Minute in einer Luminol und Wasserstoffperoxid enthaltenden Belichtungslösung inkubiert. Die Lösung, bestehend aus Enhanced Chemilumineszenz I (enthält Luminol) und Enhanced Chemilumineszenz II (enthält H_2O_2), wurde im Verhältnis 1:1 gemischt (AppliChem, Darmstadt, Deutschland). An die Sekundärantikörper ist eine Meerettich-Peroxidase gekoppelt. Diese katalysiert die Reaktion von Luminol mit H_2O_2 . Luminol reagiert mit Oxidationsmitteln unter Emission von Photonen (Chemilumineszenz), welche in einem Fotosystem (BioRad ChemiDoc Touch Imaging System, Hercules, CA, USA) unter Belichtung nachgewiesen werden können. Um sicherzustellen, dass initial alle Gelfaschen mit der gleichen Menge Gesamtprotein beladen worden sind, wurde eine sogenannte Ladungskontrolle mit dem Strukturprotein β -Aktin durchgeführt. Analog dem oben bereits beschriebenen Vorgehen wurden die Nitrocellulosemembranen mit einem Primärantikörper gegen β -Aktin, einem sogenannten Housekeeping Gen, inkubiert und entwickelt. Diese endogene Kontrolle wird benötigt, um die Menge des gesuchten Proteins relativ quantifizieren zu können. Die Menge des Housekeeping Gens ist zwischen den Vergleichsgruppen konstant. Im Anschluss erfolgte die digitale Auswertung mit Hilfe der Software BioRad Image Lab (BioRad Hercules, CA, USA). Es

wurde die optische Dichte der Banden des zu quantifizierenden Proteins sowie die Bande von β -Aktin gemessen. Im Anschluss wurden diese beiden Werte für jede Probe ins Verhältnis gesetzt ($\text{Optische Dichte}_{\text{gesuchtes Protein}} / \text{Optische Dichte}_{\beta\text{-Aktin}}$).

2.3.8 Transkriptionsanalyse

Die Analyse der Transkription erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR). Dabei folgt auf die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) eine Umschreibung der RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Erst danach kann die PCR erfolgen (Mülhardt, 2013). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer beschrieben.

2.3.8.1 Extraktion der RNA

Besonders wichtig beim Arbeiten mit RNA ist es, Verunreinigungen zu vermeiden. Aus diesem Grund erfolgten alle beschriebenen Prozesse mit Ribonuklease (RNase)-freien Verbrauchsgegenständen und Chemikalien sowie unter einer Werkbank. Die Isolierung der totalen RNA-Fraktion erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen RNeasy™ plus micro kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Hierfür wurden Caco2-Zellen in einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden im Anschluss für 24 Stunden mit Kulturmedium, das den wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben aufbereiteten Darminhalt in einer Verdünnung von 1:10 enthielt, inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Danach folgte die Zelllyse mit 350 μ l RNeasy™ Lysis Buffer (RLT) (Qiagen, Hilden, Deutschland) und einem Zellscraper. Das Lysat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und gründlich gevortext, bevor es im Anschluss in eine Qiashredder Spin-Säule überführt und für drei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem Reaktionsgefäß wurde nun 1:1 70 % Ethanol zugegeben und es wurde durch hoch und runter pipettieren gemischt. Das Gemisch wurde in eine RNeasy Spin-Säule pipettiert. Um diese Säule befindet sich ein 2 ml Reaktionsgefäß. Die Spin-Säule mit dem Reaktionsgefäß wurden für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Eluat, welches sich im Reaktionsgefäß befand, verworfen. Die RNA befindet sich in der zentralen Säule. Diese wurde erneut in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Anschließend wurden 700 μ l RW1 Puffer zugegeben, um die Probe durch einen weiteren Zentrifugationsschritt mit gleichen Einstellungen zu waschen. Der Vorgang wurde in zwei weiteren Zentrifugationsschritten mit jeweils 500 μ l RPE-Puffer

zunächst für 15 Sekunden bei 10.000 rpm und anschließend für zwei Minuten bei 10.000 rpm wiederholt. Die Säule wurde vorsichtig in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule in ein neues RNase-freies Gefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Es folgte eine letzte Zentrifugation bei 10.000 rpm für eine Minute. Direkt im Anschluss erfolgte mit dem Nanodrop™ 2000 C Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) die RNA-Konzentrationsbestimmung bei 260 nm. Die Reinheit der Probe wurde mit einer zusätzlichen Messung der Absorption bei 280 nm überprüft (Mülhardt, 2013). Die RNA wurde danach direkt für die Reverse Transkription verwendet oder für die Lagerung bei -80 °C aliquotiert.

2.3.8.2 Reverse Transkription

Um mittels PCR die mRNA-Expression zu analysieren, muss diese mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA-Synthese für die RT-qPCR wurde mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad Hercules, CA, USA) durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 1 µg RNA welcher mit RNase-freiem Wasser auf ein einheitliches Volumen von 15 µl verdünnt wurde. Durch Zugabe von Reaktion Mix und Reverser Transkriptase wurde ein Reagenzgemisch mit den in Tabelle 7 aufgeführten Bestandteilen und Volumina angelegt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 20 µl.

Tabelle 7: Mastermix Reverse Transkription

Tabelle 7 zeigt den verwendeten Mastermix für die Reverse Transkription. Da die RNA in verschiedenen Konzentrationen vorlag, wurde sie mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg / 15 µl verdünnt. **RNA** = Ribonukleinsäure, **RNase** = Ribonuklease.

Substanz	Volumen
Totale RNA Fraktion	x µl
RNase-freies Wasser	x µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
5x iScript Reaction Mix	4 µl

Die Umschreibung der RNA in komplementäre cDNA erfolgte in einem Thermocycler (Primus 96 Thermocycler Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) nach dem in Tabelle 8 beschriebenen Temperaturprotokoll.

Tabelle 8: Thermocycler Konditionen

Tabelle 8 zeigt die Einstellung des Thermocyclers für die Reverse Transkription. Die angegebenen Temperaturen wurden entsprechend der in der Tabelle aufgeführten Zeiten einmalig durchlaufen.

Thermocycler Konditionen	
25 °C	5 Minuten
42 °C	30 Minuten
82 °C	5 Minuten

2.3.8.3 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Die RT-qPCR ist eine molekularbiologische Methode und dient der Vervielfältigung von DNA in vitro (Brix et al., 2014). Die PCR findet in drei sich wiederholenden Schritten statt. Die Denaturierung, das Annealing und die Polymerasereaktion. Die hohen Temperaturen im ersten Schritt, der Denaturierung, sorgen für ein Auftrennen des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge. Beim Annealing lagern sich die Primer an den komplementären DNA-Strängen an. Bei der Polymerasereaktion synthetisiert die Polymerase komplementäre Stränge (Brix et al., 2014). Die PCR wurde erstmals in den 1980er Jahren von Kary Mullis und seinen Mitarbeitern durchgeführt (Saiki et al., 1985). Folgende Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Funktionsweise der PCR.

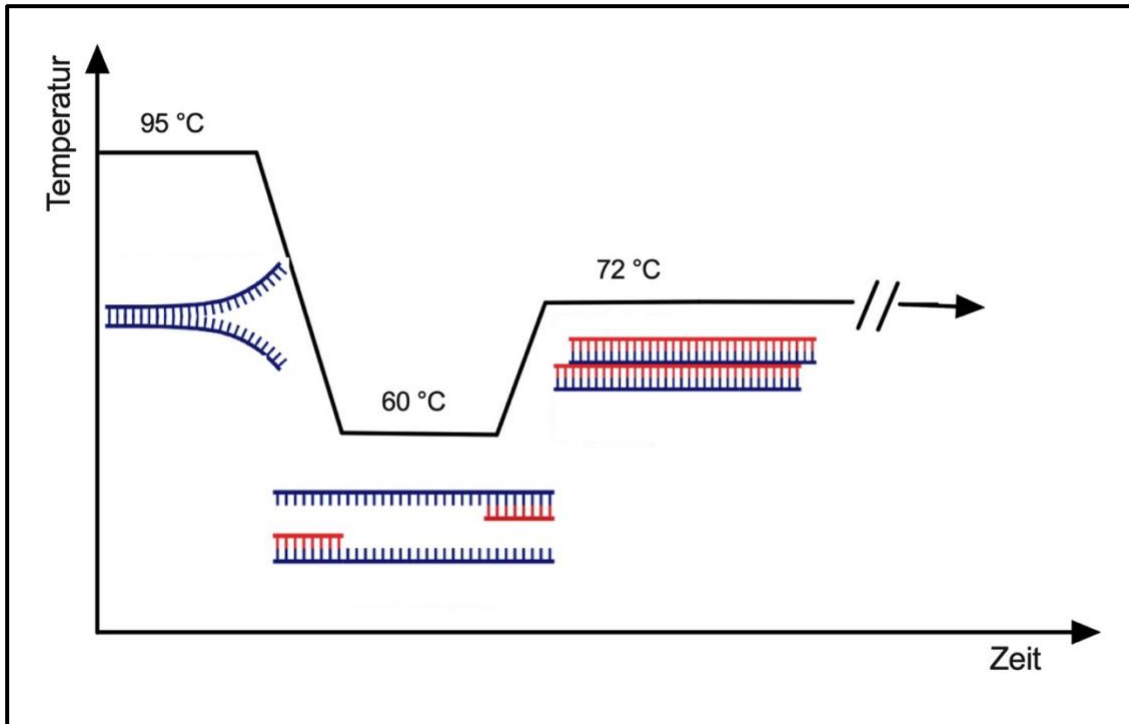


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Polymerasekettenreaktion

Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung der Funktionsweise der PCR. Abgebildet sind die Temperatur im Verlauf sowie die cDNA-Stränge während der Denaturierung bei 95 °C, dem Annealing bei 60 °C und der Elongation bei 72 °C. **cDNA** = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, **PCR** = Polymerasekettenreaktion (eigene Abbildung; Teile der Abbildung erstellt mit BioRender.com).

Die real-time PCR ist eine Weiterentwicklung der PCR und ermöglicht eine kontinuierliche Quantifizierung der PCR-Produkte (Mülhardt, 2013). Über die im Abschnitt Reverse Transkription beschriebene Umschreibung der mRNA in cDNA, welche nötig ist, da die PCR nur DNA als Substrat akzeptiert, kann man mit Hilfe der PCR Aussagen über die Transkription bestimmter Zielgene treffen. Die RT-qPCR verwendet Fluoreszenzfarbstoffe, die an DNA binden. In den Experimenten für diese Arbeit wurde SYBRGreen™ verwendet. SYBRGreen™ bindet an neu synthetisierte PCR-Produkte und emittiert bei Anregung Licht der Wellenlänge 520 nm (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2014). Der Anstieg des Fluoreszenzsignals geschieht proportional zur Zunahme der während eines PCR-Zyklus produzierten DNA. Der Cycle of threshold (C_T)-Wert beschreibt jenen Amplifikationszyklus in dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über das Hintergrundsignal ansteigt (Mülhardt, 2013). Ein kleiner C_T -Wert bedeutet also das frühe Erreichen des Schwellenwertes und folglich das Vorliegen der gesuchten cDNA in einer hohen Konzentration. Um die cDNA-Expression der Proben relativ quantifizieren zu können, benötigt man eine endogene Kontrolle entsprechend der Kontrolle, die auch für die Quantifizierung der Western Blots benötigt wird. In den

PCR-Experimenten wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping Gen verwendet. Normalisiert auf dieses Referenzgen lassen sich die Proben anhand ihrer C_T -Werte relativ zueinander quantifizieren.

Alle für die Durchführung der PCR benötigten Materialien wurden zunächst für zehn Minuten mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Für die Durchführung der PCR wurde der MESA GREEN MasterMix Plus für SYBR™ Assay Kit (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Die verwendeten Primerpaare wurden bereits publizierten Primerpaaren nachempfunden (Eurofins Genomics Germany, Ebersberg, Deutschland) oder stammten aus dem Bestand des Labors. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt. Mittels Erstellung exponentieller cDNA-Verdünnungsreihen wurde die Effizienz der Primerpaare untersucht. Die cDNA wurde, ebenso wie die Primer, im Verhältnis 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland). Der PCR Reaktionsmix wurde, wie in Tabelle 9 beschrieben, vorbereitet.

Tabelle 9: Mastermix RT-qPCR

Tabelle 9 beschreibt die Zusammensetzung des Mastermixes für die RT-qPCR. Das Gesamtvolumen beträgt 25 μ l. **Aqua dest.** = destilliertes Wasser, **cDNA** = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, **RT-qPCR** = quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion.

Substanz	Endkonzentration	Volumen
SYBRGreen™	zweifach	12,5 μ l
Forward Primer	5 μ mol/l	0,5 μ l
Reverse Primer	5 μ mol/l	0,5 μ l
Aqua dest.		9,5 μ l
cDNA	50 ng/ μ l	2,0 μ l

Der Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25 μ l und einen cDNA-Gehalt von 100 ng. Jede Probe wurde als Doublette angelegt. Die PCR wurde in einem PCR-Cycler (CFX 96, BioRad, Hercules, CA, USA) mit der Steuerungssoftware CFX Manager (Version 2.0, BioRad, Hercules, CA, USA) umgesetzt. Die nachfolgende Tabelle 10 zeigt das Temperaturprotokoll der PCR. Schritt 1, der initiale Denaturierungsschritt, wurde dabei nur einmal zu Beginn der PCR durchlaufen. Die Schritte 2 bis 4, also Denaturierung, Annealing und Amplifikation wurden 40 Mal wiederholt. Anschließend wurde in einem letzten Schritt die Temperatur bei 72 °C für fünf Minuten gehalten.

Tabelle 10: Einstellung PCR-Zyklen

Tabelle 10 stellt die Temperatur sowie die Dauer der PCR-Zyklen, die nach Eingabe in die Steuerungssoftware vom PCR-Cycler in den entsprechenden Teilschritten automatisch durchlaufen werden, tabellarisch dar.

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95 °C	5 Minuten
2	95 °C	15 Sekunden
3	60 °C	30 Sekunden
4	72 °C	30 Sekunden
5	72 °C	5 Minuten

Über ein Schmelztemperaturprofil zwischen 60 °C und 95 °C konnten Primer-Artefakte ausgeschlossen werden. Für die Quantifizierung können verschiedene Rechenmodelle herangezogen werden. In dem vorliegenden Experiment wurde GAPDH als Referenzgen verwendet. Dessen Expression wurde gemessen, um die Expression der gesuchten Gene relativ in Bezug auf GAPDH quantifizieren zu können. Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte dann mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Die mRNA-Expression des interessierenden Gens, normalisiert auf ein Referenzgen, wurde im Verhältnis zur mRNA-Expression der schein-operierten Gruppe ausgedrückt. Im ersten Rechenschritt werden die C_T -Werte normalisiert: Vom C_T -Wert des Zielgens (in diesem Fall X) wurde der C_T -Wert des Referenzgens (in diesem Fall GAPDH) abgezogen ($\Delta C_T = C_{T;X} - C_{T;GAPDH}$). In einem weiteren Rechenschritt bildet man die Differenz zwischen den ΔC_T -Werten zweier Versuchsgruppen (in diesem Fall schein-operierte Gruppe = Schein und RYGB-operierten Gruppe = RYGB) ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T;Schein} - \Delta C_{T;RYGB}$). Der $\Delta\Delta C_T$ gibt den relativen Unterschied der auf das Referenzgen normalisierten Expression des Zielgens in den zwei Gruppen im Vergleich an. Mittels der Formel $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ kann der relative Unterschied der mRNA-Expression zwischen RYGB- und der Schein-Gruppe (= Kontrollgruppe) ermittelt werden. Der Mittelwert der Schein-Gruppe wurde hierbei für jede Probe als = 1 festgelegt und die Werte der RYGB-Gruppe hierauf bezogen. Fold change (fc) = 1 bedeutet kein Unterschied in der Expression des untersuchten Gens zwischen den beiden Gruppen. Fc > 1 bedeutet eine höhere und fc < 1 eine niedrigere Expression in der RYGB-Gruppe.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten sowie ihre graphische Darstellung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit dem standard error off the mean (SEM), der als Fehlerbalken angezeigt wird, dargestellt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Zum Vergleich der beiden Gruppen bei den Western Blots mit Gewebelysaten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, da bei einer Gruppengröße zwischen $n = 4$ und $n = 9$ nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Die Daten der Western Blots mit den Zelllysaten wurden mittels des Shapiro Wilk Test auf Normalverteilung getestet. Es erfolgte die Auswertung der Daten mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test. Mittels des F-Tests wurde die Varianz ermittelt und bei ungleicher Varianz die Welch's Korrektur angewendet. Genauso wurde bei der Analyse der Daten der RT-qPCR verfahren. Die Daten der Transwellassays wurden mit Hilfe eines two-way ANOVA ausgewertet. Die statistische Auswertung des 60 Minuten Wertes erfolgte nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Shapiro Wild Test mittels eines ungepaarten t-Tests und bei ungleichen Varianzen, wie oben bereits beschrieben, mit Welch's Korrektur. Für die statistische Auswertung der TEER Messungen wurde ebenfalls eine two-way ANOVA Analyse sowie eine Area under the Curve (AUC) Analyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits als folgende Publikation veröffentlicht:

Hankir, M. K., Langseder, T., Bankoglu, E. E., Ghoreishi, Y., Dischinger, U., Kurlbaum, M., Kroiss, M., Otto, C., le Roux, C. W., Arora, T., Seyfried, F., & Schlegel, N. (2020). Simulating the Post-gastric Bypass Intestinal Microenvironment Uncovers a Barrier Stabilizing Role for FXR. *iScience*, 23(12): 101777. doi: 10.1016/j.isci.2020.101777. PMID: 33294786; PMCID: PMC7689555.

Eine veränderte Nahrungspräferenz (Le Roux et al., 2011), eine verringerte Insulinresistenz und eine verminderte Endotoxämie (Monte et al., 2012) sowie ein Gewichtsverlust sind wichtige Merkmale des RYGB beim Menschen. Um die Gültigkeit unseres Rattenmodells zu belegen, wurde das Essverhalten der Tiere nach den Operationen beobachtet. Es zeigte sich, dass die RYGB- im Vergleich zu den scheinoperierten Ratten im Beobachtungszeitraum weniger Nahrung zu sich nahmen und außerdem die fettarme Ernährung gegenüber der fettreichen präferierten. Sie wogen dementsprechend kurz vor der terminalen Anästhesie, sechs Wochen nach der Operation, $23,7\% \pm 2,1\%$ weniger als ihre Artgenossen. Außerdem wiesen sie niedrigere Nüchternplasmainsulinwerte und niedrigere LPS-Spiegel auf (Hankir et al., 2020). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das Rattenmodell den klinischen Merkmalen des RYGB nahekommt und somit ein valides Modell darstellt. Die beschriebenen Messungen wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat Mohamed Hankir sowie Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der experimentellen Viszeralchirurgie des Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt.

3.1 Veränderung von Proteinen der Occludenskontakte nach RYGB in den Vollwandresektaten

Die ursprüngliche Betrachtungsweise einer bariatrischen Operation als rein mechanischer Eingriff wurde inzwischen widerlegt. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Fettleibigkeit einhergehende Insulinresistenz, vermittelt durch eine Störung der IEB und einer daraus resultierenden Endotoxämie (Everard & Cani, 2013) durch den RYGB rekonstruiert werden kann (Bojsen-Møller et al., 2014; Monte et al., 2012). Tierexperimentelle Studien zeigten, dass die durch Adipositas induzierte Erhöhung der intestinalen Permeabilität (Cani et al., 2008) durch einen RYGB reduziert werden kann (Guo et al., 2019; Jin et al., 2021; Wang et al., 2020). Um ortsspezifische Veränderungen

der IEB nach RYGB zu untersuchen, wurden Analysen der Proteinmenge einiger Schlüsselproteine der Occludenskontakte mit Hilfe einer Western Blot Untersuchung für die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Es wurden als Vertreter der Transmembranproteine der Occludenskontakte die Claudine 1, 2, 3 und 4 im Hinblick auf quantitative Veränderungen nach RYGB sowie im Hinblick auf ihr Verteilungsmuster im Intestinum untersucht. Von den Claudinen 1, 3 und 4 ist bekannt, dass sie den Interzellulärspalt versiegeln (Markov et al., 2010). Claudin 2 hingegen gilt als porenbildendes Transmembranprotein dessen Vorkommen mit einem erhöhten parazellulären Efflux von Wasser und Kationen einhergeht (Amasheh et al., 2002). In der nachfolgenden Abbildung 13 ist die Veränderung der Proteinmenge von Claudin 1 im Intestinum der schein-operierten und der RYGB-operierten Ratten dargestellt. Die Analyse der einzelnen Darmregionen ergab eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge von Claudin 1 im Duodenum (**A**) sowie leichte Reduktion im Jejunum (**B**) und im Ileum (**C**) sowie eine leichte Erhöhung im Kolon (**D**) nach RYGB-Operation gegenüber der Schein-Operation. Die letztgenannten Proteinmengenveränderungen waren nicht signifikant. In Abbildung 13 ist oberhalb der Balkendiagramme jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen.

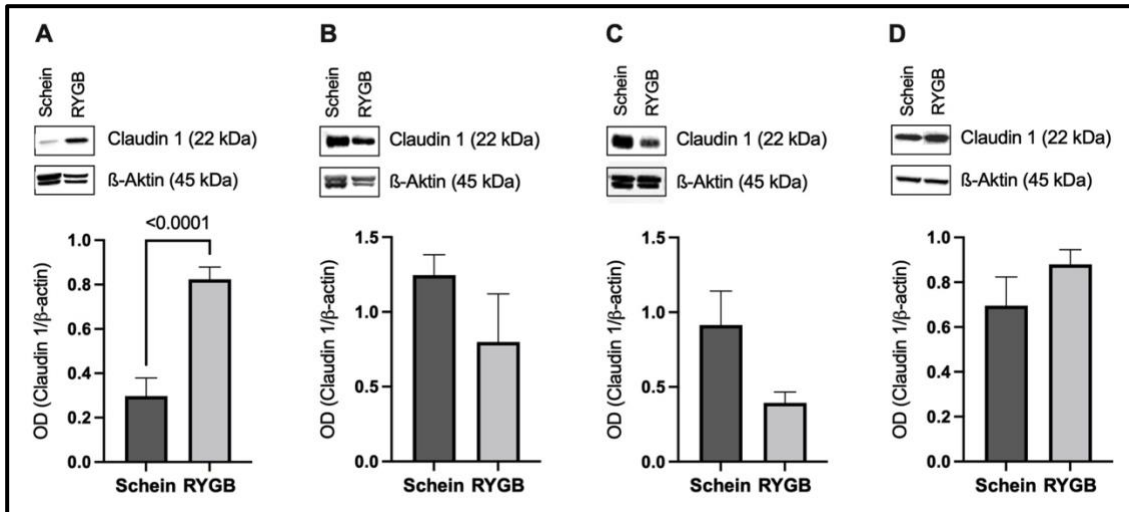


Abbildung 13: Proteinmenge von Claudin 1 im Intestinum von schein- und RYGB-operierten Ratten

Abbildung 13 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 1. Über den Balkendiagrammen ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. In **A** wurde die Proteinmenge von Claudin 1 im Duodenum der schein-operierten sowie der RYGB-operierten Ratten verglichen, in **B** die Proteinmenge im Jejunum, in **C** die Proteinmenge im Ileum und in **D** die Proteinmenge im Kolon. Die Western Blot Analysen wurden durch Messung der optischen Dichte der einzelnen Banden für Claudin 1 und β -Aktin quantifiziert. Diese Werte wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt ($OD_{\text{Claudin 1}} / OD_{\beta\text{-Aktin}}$). Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 5 - 9$. **OD** = Optische Dichte, **RYGB** = RYGB-operierte Ratten, **Schein** = schein-operierte Ratten.

Die Ergebnisse der Analyse von Claudin 2 sind in der nachfolgenden Abbildung 14 dargestellt. Im Duodenum (**A**) sowie im Ileum (**C**) zeigte sich keine signifikante Veränderung der Proteinmenge von Claudin 2 nach RYGB-Operation gegenüber Schein-Operation, auch wenn dies im gezeigten Western Blot auf den ersten Blick den Eindruck vermittelt. Allerdings zeigte die Analyse des Jejunums (**B**) sowie des Kolons (**D**) eine signifikante Reduktion von Claudin 2 in der RYGB-operierten Gruppe.

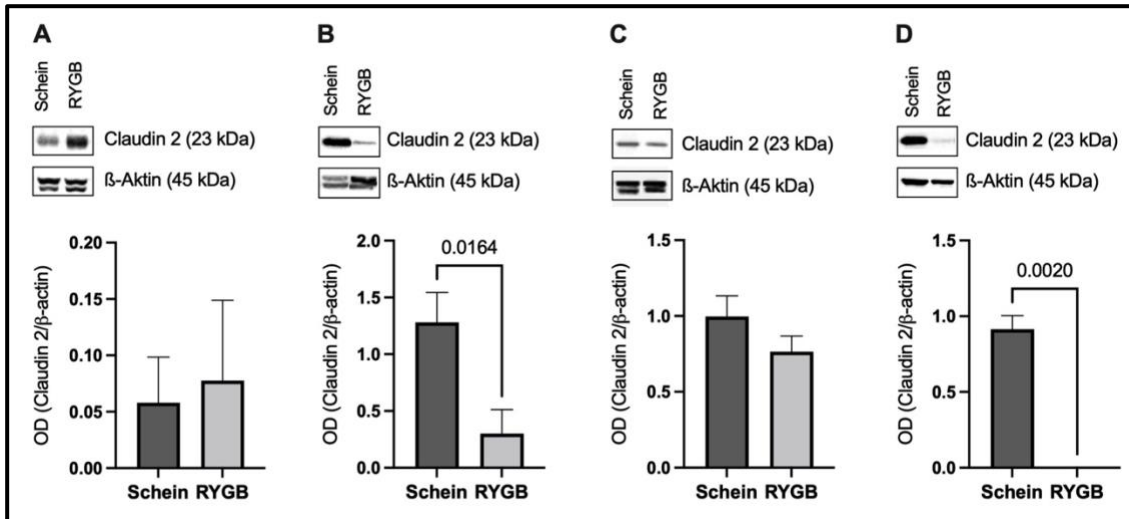


Abbildung 14: Proteinmenge von Claudin 2 im Intestinum von schein- und RYGB-operierten Ratten
 Abbildung 14 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 2. Über den Balkendiagrammen ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. In **A** wurde die Proteinmenge von Claudin 2 im Duodenum der schein-operierten sowie der RYGB-operierten Ratten verglichen, in **B** die Proteinmenge im Jejunum, in **C** die Proteinmenge im Ileum und in **D** die Proteinmenge im Kolon. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 4 - 6$. Siehe Abbildung 13 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, unterscheidet sich die Proteinmenge von Claudin 3 deutlich zwischen den einzelnen Darmregionen. Im Duodenum (**A**) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge von Claudin 3 nach RYGB. In den distalen Darmregionen zeigte sich ebenfalls eine Veränderung der Proteinmenge: Dabei war eine signifikante Reduktion der Claudin 3-Proteinmenge im Ileum (**C**) sowie im Kolon (**D**) zu beobachten. In der Analyse von Claudin 3 im Duodenum (**B**) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

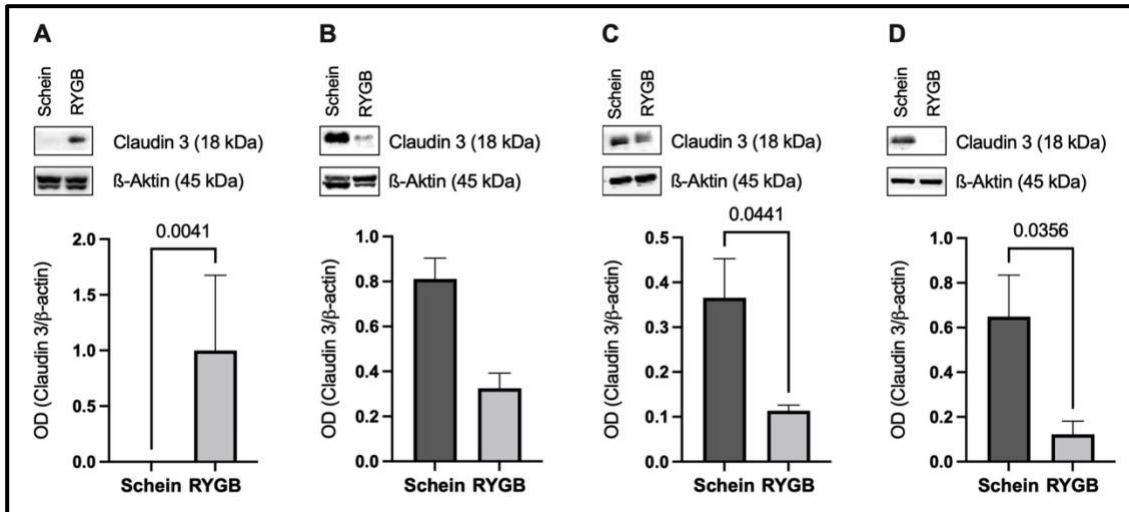


Abbildung 15: Proteinmenge von Claudin 3 im Intestinum von schein- und RYGB-operierten Ratten

Abbildung 15 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 3. Über den Balkendiagrammen ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. In **A** wurde die Proteinmenge von Claudin 3 im Duodenum der schein-operierten sowie der RYGB-operierten Ratten verglichen, in **B** die Proteinmenge im Jejunum, in **C** die Proteinmenge im Ileum und in **D** die Proteinmenge im Kolon. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 4 - 8$. Siehe Abbildung 13 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, ergab die Auswertung der Western Blots für Claudin 4 keinerlei Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Es war eine allenfalls geringe Verminderung der Proteinmenge nach RYGB-Operation im Jejunum (**B**), im Ileum (**C**) und im Kolon (**D**) zu beobachten, die aufgrund der Streuung der Daten keine statistisch messbaren Unterschiede ergab.

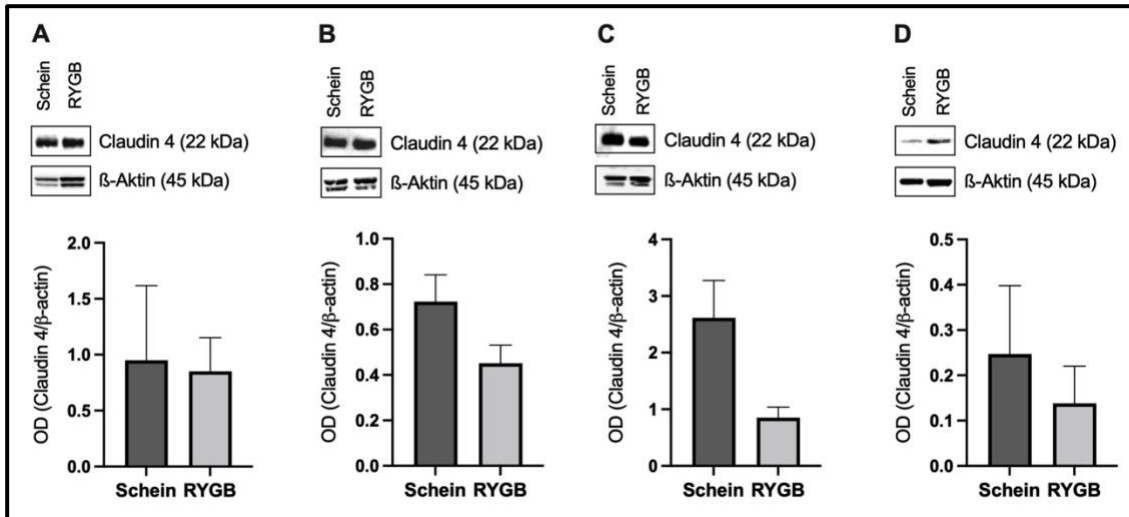


Abbildung 16: Proteinmenge von Claudin 4 im Intestinum von schein- und RYGB-operierten Ratten
 Abbildung 16 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 4. Über den Balkendiagrammen ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. In **A** wurde die Proteinmenge von Claudin 4 im Duodenum der schein-operierten sowie der RYGB-operierten Ratten verglichen, in **B** die Proteinmenge im Jejunum, in **C** die Proteinmenge im Ileum und in **D** die Proteinmenge im Kolon. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 4 - 7$. Siehe Abbildung 13 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

Die nachstehende Tabelle 11 zeigt zusammenfassend die Veränderung der Proteinmenge der mit Hilfe der Western Blots analysierten Proteine. Im Duodenum der RYGB-operierten Ratten zeigte sich insgesamt eine vermehrte Proteinmenge der den Interzellularspalt versiegelnden Claudine 1 und 3. Für die anderen beiden analysierten Claudine ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Im Jejunum zeigte sich ein anderes Muster. Die Gesamtmenge von Claudin 2 war im Jejunum der RYGB-operierten Ratten signifikant vermindert. Im Ileum zeigte sich eine Reduktion von Claudin 3 in den Resektaten der RYGB-operierten Ratten verglichen mit denen der schein-operierten Ratten. Im Kolon zeigte sich ebenso eine Verminderung von Claudin 3. Zudem zeigte sich eine Verminderung von Claudin 2 in den Resektaten der RYGB-operierten Ratten gegenüber denen der schein-operierten Ratten. In nachfolgender Tabelle 11 sind nur die Veränderungen der Proteinmengen dargestellt, die sich als signifikant unterschiedlich herausgestellt haben. Ein nicht signifikanter Nachweis von Veränderungen ist mit ↔ gekennzeichnet.

Tabelle 11: Vergleich der Proteinmengen ausgewählter Transmembranproteine der Occludenskontakte in den Vollwandresektaten schein-operierter bzw. RYGB-operierter Ratten

Tabelle 11 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Western Blots aller analysierten Proteine. Die Tabelle stellt die Differenz der Mittelwerte (RYGB – Schein-Operation) der optischen Dichte der gesuchten Proteine im Verhältnis zu β -Aktin \pm SEM dar. \uparrow = signifikante Erhöhung der Proteinmenge in den Resektaten der RYGB-operierten Ratten gegenüber denen der schein-operierten Ratten, \downarrow = signifikante Reduktion der Proteinmenge in den Resektaten der RYGB-operierten Ratten gegenüber denen der schein-operierten Ratten, \leftrightarrow = keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge, **RYGB** = Roux-en Y Magenbypass, **SEM** = Standard error of the mean.

Darmregion	Analysierte Proteine			
	Claudin 1	Claudin 2	Claudin 3	Claudin 4
Duodenum	0,53 \pm 0,09 \uparrow	0,02 \pm 0,06 \leftrightarrow	1,00 \pm 0,24 \uparrow	-0,10 \pm 0,29 \leftrightarrow
Jejunum	-0,45 \pm 0,38 \leftrightarrow	-0,98 \pm 0,33 \downarrow	-0,49 \pm 0,11 \leftrightarrow	-0,27 \pm 0,14 \leftrightarrow
Ileum	-0,52 \pm 0,24 \leftrightarrow	-0,23 \pm 0,17 \leftrightarrow	-0,25 \pm 0,09 \downarrow	-1,76 \pm 0,68 \leftrightarrow
Kolon	0,18 \pm 0,14 \leftrightarrow	-0,91 \pm 0,09 \downarrow	-0,53 \pm 0,20 \downarrow	-0,11 \pm 0,17 \leftrightarrow

Die Barrierefunktion wird neben Veränderungen des zellulären Gehalts von Barriere-assoziierten Proteinen auch durch deren zelluläre Verteilung determiniert. Die zelluläre Verteilung hätte an dieser Stelle zum Beispiel mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden können. Leider war dies zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente nicht möglich, da die Gewebe hierfür nicht gesammelt und aufbereitet wurden. Aufgrund dessen, sowie aufgrund der durchgeführten Analyse von nur vier am Schlussleistenkomplex beteiligten Proteine, die die Vielzahl der beteiligten Proteine nicht vollständig repräsentieren, ist es nicht möglich von den Ergebnissen der Western Blot Analysen auf eine dichtere oder weniger dichte Barriere in den untersuchten Darmregionen zu schließen. Um einen funktionell besseren Eindruck zu bekommen, wurden danach zusätzliche Versuche in der Zellkultur, also einem reduktionistischen System, durchgeführt.

3.2 Transferexperimente

In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass sich die intestinale Permeabilität nach RYGB vermindert (Guo et al., 2019; Jin et al., 2021; Wang et al., 2020). Darüber hinaus gelang es, die IEB durch eine Mikrobiom-Transplantation zu stabilisieren bzw. die Insulinsensitivität zu erhöhen (Depommier et al., 2019; Natividad et al., 2018; K. Wang et al., 2019). Wie genau es zu diesen Effekten kommt, ist bis heute nicht ins letzte Detail verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass die verbesserte Glucosetoleranz genetisch fettleibiger und glucoseintoleranter Ratten nach RYGB im Vergleich zur Schein-Operation durch Transplantation ihres Zökuminhaltes auf keimfreie Mäuse übertragen werden konnte. Allerdings hatte die Transplantation des Ileuminhaltes keine positiven Auswirkungen auf die Glucosetoleranz der Mäuse (Arora et al., 2017). Wir postulierten daher, dass es Faktoren im intestinalen Inhalt der Ratten nach RYGB sein müssen, die die Barrierefunktion der Darmregionen regulieren und so weitere positive Effekte, wie die verbesserte Glucosetoleranz oder die verminderte Endotoxämie, im Anschluss an eine RYGB-Operation vermitteln.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Simulationsexperimente durchgeführt. Für die Experimente dienten Caco2-Zellen als in vitro Modell für die IEB. Die regionale intestinale Mikroumgebung wurde simuliert, indem der Darminhalt auf die apikale Seite der konfluenten Caco2-Zellmonolayer aufgetragen wurde. Das Zellkulturmedium wurde mit Antibiotika versetzt um eine Auswirkung der löslichen, aus der Mikrobiota stammenden Faktoren, die bereits bei Entnahme aus dem Intestinum der Ratten enthalten waren, auf die Barriere beurteilen zu können. Es wurden zwei komplementäre funktionelle Untersuchungen, das Transwellassay und die Bestimmung des transepithelialen Widerstandes durchgeführt. Danach erfolgte mit dem Western Blot Verfahren eine Analyse der Proteinmenge von wichtigen Transmembranproteinen der Occludenskontakte (Claudin 1, 2, 3, 4 und Occludin), der Adhärenskontakte (E-Cadherin) sowie der Desmosomen (DSG 2). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression der oben genannten Proteine mittels RT-qPCR.

3.2.1 Veränderung der Barrierefunktion der Caco2-Zellen nach Behandlung mit gepooltem Darminhalt

An der mit Darminhalt von schein- und RYGB-operierten Ratten behandelten Caco2-Zellmonolayer wurde ein Transwellassay sowie die Bestimmung des TEER durchgeführt. Beide Untersuchungen erlauben Aussagen über die Funktionalität der IEB (Lea, 2015b; Schlegel et al., 2010). Zunächst wurde mittels des zur Messung der Permeabilität von Zellkulturen etablierten Transwellassays der parazelluläre 4 kDa FITC-Dextran-Fluss von der apikalen zur basolateralen Seite der Caco2-Zellen analysiert. Aus diesen Werten wurde, wie bereits ausführlich in 2.3.5. beschrieben, der P_E berechnet.

Die nachfolgende Abbildung 17 stellt die P_E während des Transwellassays dar. Die Messungen erfolgten zu vier verschiedenen Zeitpunkten, mit einem Abstand von je 30 Minuten. Die Ergebnisse des Transwellassays ergaben, dass der Duodenal- (**A**), der Jejunal- (**B**) und der Koloninhalt (**D**) von RYGB-operierten Ratten im Vergleich zum Darminhalt schein-operierten Ratten die Passage von 4 kDa FITC-Dextran durch die Caco2-Zellmonolayer deutlich verringerte, was sich direkt im verringerten P_E widerspiegelte. Interessanterweise zeigte sich nach Behandlung der Zellmonolayer mit Ileuminhalt der schein-operierten Ratten gegenüber der Behandlung mit Ileuminhalt der RYGB-operierten Ratten kein Unterschied des P_E zwischen den beiden Gruppen.

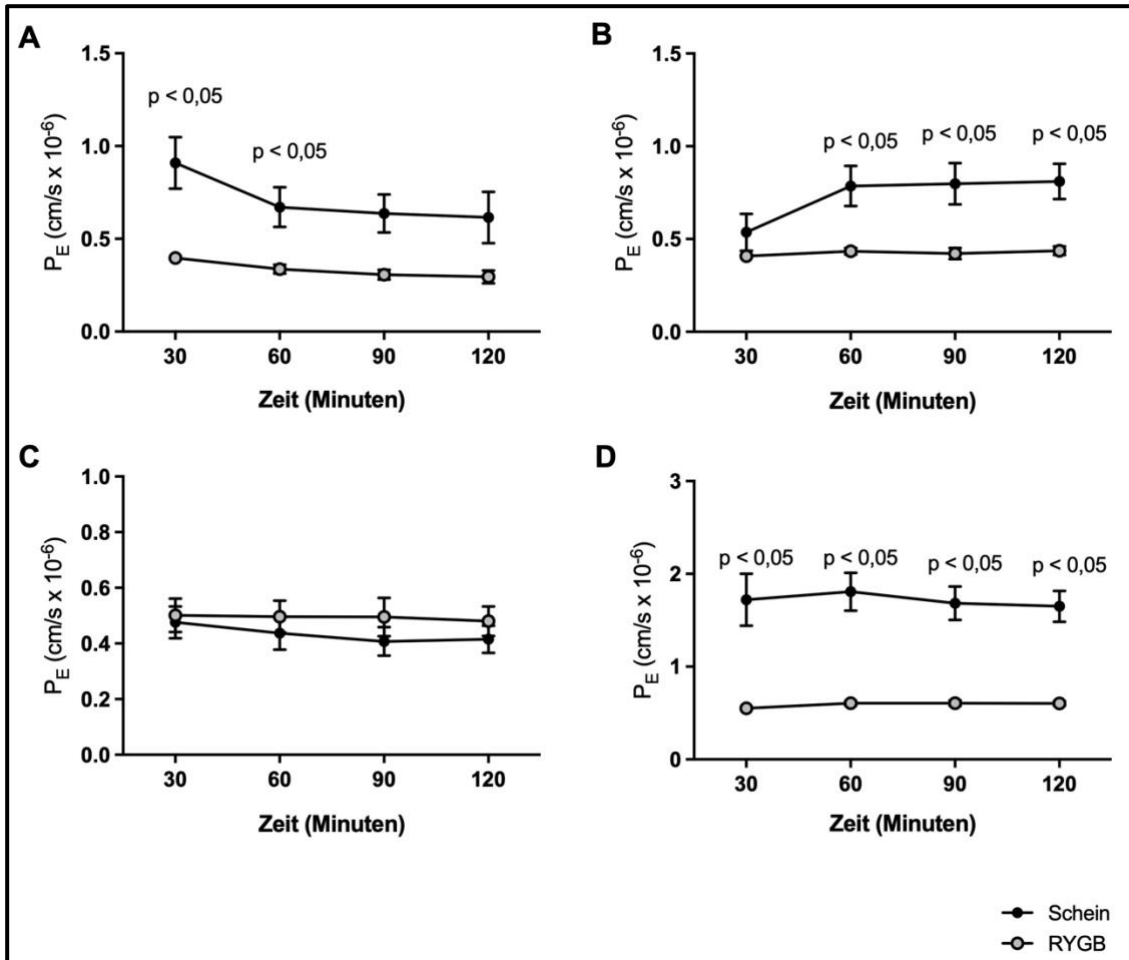


Abbildung 17: Darstellung des Permeabilitätskoeffizienten im Transwellfilterversuch

Abbildung 17 zeigt in **A-D** den P_E zu den Zeitpunkten 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten und 120 Minuten, nachdem die ausgereifte Zellmonolayer aus Caco2-Zellen zuvor für 24 Stunden mit gepooltem Darminhalt der schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurde. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 5$ Zellkulturen / Gruppe. P_E = Permeabilitätskoeffizient, **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass, **Schein** = Schein-Operation.

Die nachfolgende Tabelle 12 zeigt eine Gegenüberstellung der P_E der Caco2-Zellkulturen eine Stunde nach Zugabe von 4 kDa FITC-Dextran in das obere Kompartiment der Transwellkammer. Der niedrigste P_E zeigt sich hierbei nach Behandlung der Zellen mit Koloninhalt.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Permeabilitätskoeffizienten zum Zeitpunkt 60 Minuten

Tabelle 12 zeigt eine Gegenüberstellung der P_E ($\text{cm/s} \times 10^{-6}$) 60 Minuten nach Zugabe von 4 kDa FITC-Dextran nach vorangegangener 24-stündiger Behandlung der Caco2-Zellen mit Darminhalt der scheinoperierten bzw. RYGB-operierten Ratten. Die P_E der Caco2-Zellkulturen, die mit Darminhalt scheinoperierter Ratten behandelt worden sind, sind zur besseren Vergleichbarkeit auf 1 normalisiert. Der P_E -Wert ist als Mittelwert ($n = 5$) mit dem SEM angegeben. **FITC** = Fluoresceinisothiocyanat, **P_E** = Permeabilitätskoeffizient, **SEM** = Standard error of the mean.

Behandlung der Caco2-Zellen	P_E ($\text{cm/s} \times 10^{-6}$)	P_E ($\text{cm/s} \times 10^{-6}$)
	Schein-Operation	RYGB
Duodenalinhalt	$1 \pm 0,1067$	$0,5016 \pm 0,0240$
Jejunalinhalt	$1 \pm 0,1079$	$0,5527 \pm 0,0179$
Ileuminhalt	$1 \pm 0,0592$	$1,1370 \pm 0,0569$
Koloninhalt	$1 \pm 0,2039$	$0,3347 \pm 0,0245$

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde zusätzlich die Messung des TEER durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem Transwellassay ist die kontinuierliche Aufzeichnung des transepithelialen Widerstandes als Maß für die Integrität der Epithelbarriere. Die Caco2-Zellen wurden für dieses Experiment auf ECIS-Elektroden ausgesät. Ihnen wurde am Tag der Konfluenz Medium mit Darminhalt aus dem Duodenum, dem Jejunum, dem Ileum und dem Kolon der beiden Vergleichsgruppen zugesetzt. Direkt im Anschluss begann die 24-stündige Messung. In der Auswertung fiel auf, dass es bei den mit Duodenal- sowie Koloninhalt behandelten Zellen bereits nach drei Stunden zu einem signifikanten Abfall des Widerstandes über der mit Darminhalt der scheinoperierten Ratten behandelten Zellmonolayer kam. Nach fünf Stunden zeigte sich erstmals eine signifikante Reduktion des Widerstandes in der Zellmonolayer, die mit Jejunalinhalt der scheinoperierten Ratten behandelt worden war. Interessanterweise zeigte sich auch in diesem Experiment, konsistent zu den Ergebnissen des Transwellassays, kein Unterschied bei Behandlung der Zellkultur mit Ileuminhalt. Die nachfolgende Abbildung 18 zeigt auf der linken Seite in **A**, **C**, **E** und **G** die graphische Darstellung des Widerstandsverlustes gemessen in Prozent über der Grundlinie über der Caco2-Zellschicht über 24 Stunden. Deutlich sichtbar ist der signifikant höhere Widerstandsverlust der mit Duodenal- (**A**), Jejunal- (**C**), oder Koloninhalt (**G**) der scheinoperierten Ratten behandelten Caco2-Zellkulturen gegenüber den Caco2-Zellkulturen, die mit Duodenal-, Jejunal oder Koloninhalt der RYGB-operierten Ratten behandelt worden sind. Die Behandlung der Zellschicht mit

Ileuminhalt (**E**) der beiden Vergleichsgruppen ergab konsistent zu den Ergebnissen des Transwellassays keine Veränderungen. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die AUC in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Sie beschreibt die Fläche unter der Widerstandszeitkurve der Messungen, des jeweils links daneben abgebildeten Graphen. Dadurch wird der Widerstandsverlust der Caco2-Zellkulturen, die mit dem Duodenal- (**B**), dem Jejunal- (**D**) und dem Koloninhalt (**H**) der schein-operierten Ratten behandelt worden sind, gegenüber der Behandlung mit dem Darminhalt der RYGB-operierten Ratten, verdeutlicht. Die AUC der mit Ileuminhalt behandelten Zellen ist zwischen den beiden Vergleichsgruppen entsprechend nahezu gleich groß (**F**). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die AUC der Caco2-Zellkulturen, die mit Darminhalt der schein-operierten Ratten inkubiert worden sind, auf 1 normalisiert.

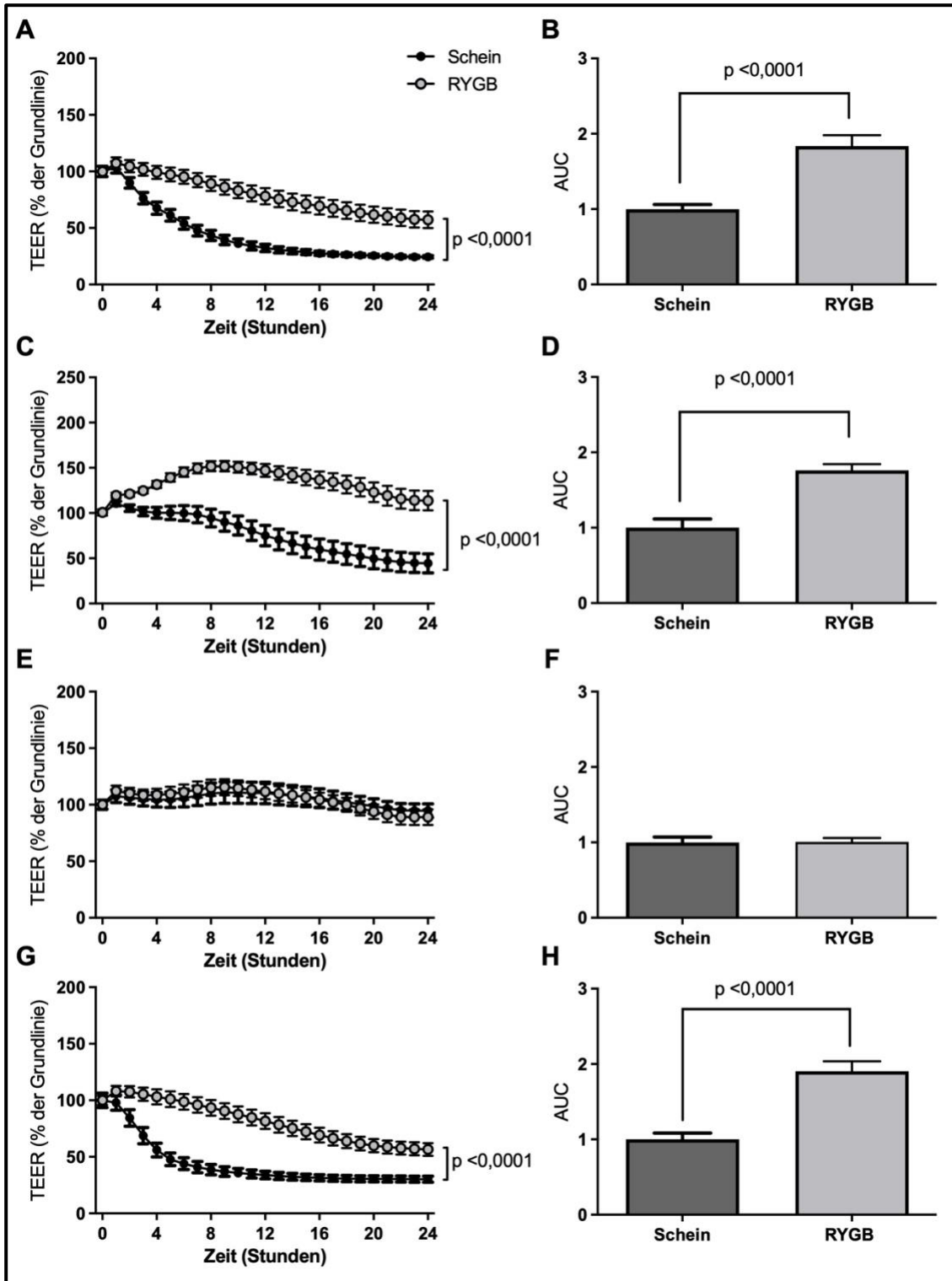


Abbildung 18: Darstellung der kontinuierlichen Messung des TEER

Abbildung 18 zeigt in **A** und **B** die Messergebnisse nach Behandlung der konfluenten Caco2-Zellmonolayer mit Duodenalinhalt von schein- bzw. RYGB-operierten Ratten, in **C** und **D** nach Behandlung mit Jejunalinhalt von schein- bzw. RYGB-operierten Ratten, in **E** und **F** nach Behandlung mit Ileuminhalt von schein- bzw. RYGB-operierten Ratten und in **G** und **H** nach Behandlung mit Koloninhalt von schein- bzw. RYGB-operierten Ratten. **A**, **C**, **E** und **G** zeigen die Veränderung des TEER, gemessen in Prozent von der

Grundlinie über 24 Stunden. In **B**, **D**, **F** und **H** ist die AUC dargestellt. Die AUC-Werte der Caco2-Zellkulturen, die mit Darminhalt der schein-operierten Ratten behandelt worden sind, sind zur besseren Vergleichbarkeit auf 1 normalisiert. Die AUC-Werte sind als Mittelwerte mit dem SEM angegeben. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 16$ Zellkulturen / Gruppe. **AUC** = Area under the curve, **ECIS** = Electric Cell-Substrate Impedance Sensing, **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass, **Schein** = Schein-Operation, **TEER** = transepithelialer elektrischer Widerstand.

Die nachfolgende Tabelle 13 stellt die AUC der Widerstandsmessungen tabellarisch dar. Dabei besteht der größte Unterschied zwischen den mit Koloninhalt der schein-operierten bzw. Koloninhalt der RYGB-operierten Ratten behandelten Caco2-Zellen. In den Transwellexperimenten war der Unterschied zwischen den mit Koloninhalt der RYGB-operierten bzw. der schein-operierten Ratten behandelten Zellen ebenfalls am größten.

Tabelle 13: Darstellung der AUC der Widerstandsmessungen an Caco2-Zellen

Tabellarische Darstellung der Werte der AUC des in Abschnitt 3.2.1 bereits beschriebenen ECIS-Experiments. Die AUC-Werte der Caco2-Zellen die mit dem Darminhalt der schein-operierten Ratten behandelt worden sind, sind zur besseren Vergleichbarkeit auf 1 normalisiert. Die AUC-Werte sind als Mittelwerte mit dem SEM angegeben. $n = 16$. AUC = Area under the curve, **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass, **SEM** = Standard error of the mean.

Behandlung der Caco2-Zellen	AUC Schein-Operation	AUC RYGB
Duodenalinhalt	$1 \pm 0,06154$	$1,837 \pm 0,1429$
Jejunalinhalt	$1 \pm 0,11680$	$1,761 \pm 0,08155$
Ileuminhalt	$1 \pm 0,07078$	$1,006 \pm 0,05302$
Koloninhalt	$1 \pm 0,08287$	$1,903 \pm 0,1320$

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der funktionellen Experimente eine deutliche Erhöhung der Integrität der Barriere der Caco2-Zellmonolayer nach Behandlung mit Duodenal-, Jejunal- und Koloninhalt der RYGB-operierten Ratten. Dabei zeigten die Experimente übereinstimmend, dass durch Behandlung mit Koloninhalt der RYGB-operierten Ratten im Vergleich zur Behandlung mit Koloninhalt der schein-operierten Ratten der größte Einfluss auf die Barrierefunktion genommen werden kann. Die Behandlung mit dem Ileuminhalt der beiden Vergleichsgruppen führte hingegen zu keiner Veränderung der Barrierefunktion. Zusammenfassend stützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass es lösliche mikrobiotische und/oder vom Wirt stammende

Metaboliten im Intestinum nach RYGB sein könnten, die direkte, die Barrierefunktion stabilisierende Auswirkungen haben.

3.2.2 Der Schlussleistenkomplex in Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt

Um die Barrierefunktion der Caco2-Zellmonolayer nach Behandlung mit Darminhalt auch strukturell zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierbei wurden mögliche Veränderungen der Proteinmenge wichtiger Schlüsselproteine des Schlussleistenkomplexes nach Behandlung der Caco2-Zellen über 24 Stunden mit dem Darminhalt der schein- und RYGB-operierten Ratten untersucht.

3.2.2.1 Mengenveränderungen von Proteinen der Occludenskontakte in Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt

Die Proteinmenge von Claudin 1 in den Caco2-Zellen wurde durch Behandlung mit Duodenal- (**A**) und Koloninhalt (**D**) RYGB-operierter Ratten signifikant erhöht, wie in Abbildung 19 graphisch dargestellt ist. Auf den ersten Blick führt auch die Behandlung mit Jejunalinhalt (**B**) RYGB-operierter Ratten zu einer Erhöhung der Proteinmenge von Claudin 1, allerdings waren die Ergebnisse der Analyse nicht signifikant. Die Behandlung mit Ileuminhalt (**C**) RYGB-operierter Ratten führte ebenfalls nicht zu signifikanten Unterschieden in der Proteinmenge von Claudin 1. Die nachfolgende Abbildung 19 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Analysen der Proteinmenge von Claudin 1, dabei ist links der Balkendiagramme jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen.

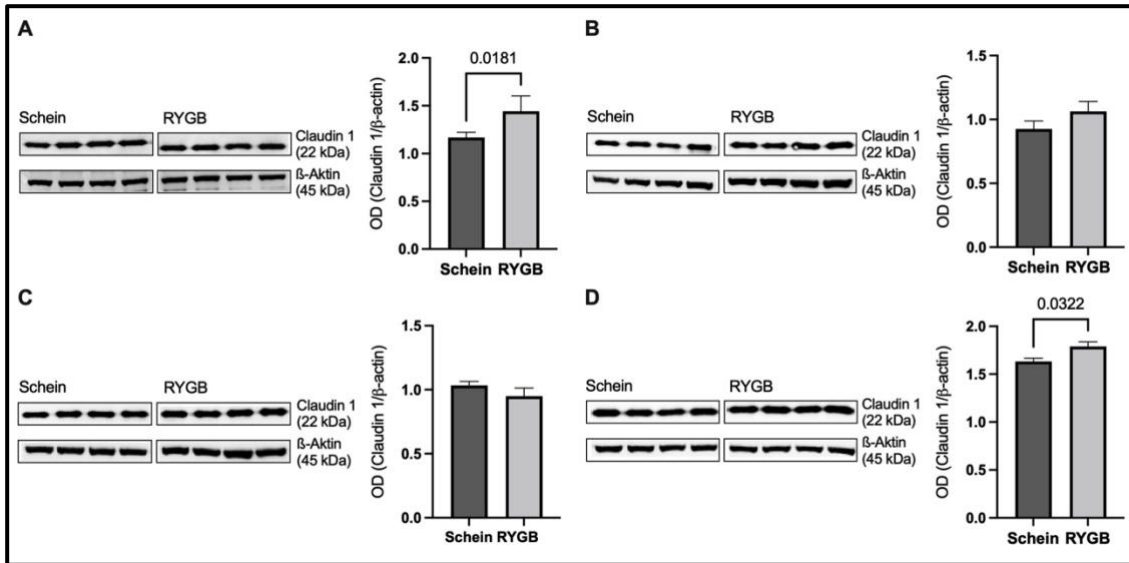


Abbildung 19: Proteinmenge von Claudin 1 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Abbildung 19 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 1 in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (**A**), Jejunal- (**B**), Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Die Western Blot Analysen wurden durch Messung der optischen Dichte der einzelnen Banden für Claudin 1 und β -Aktin quantifiziert. Diese Werte wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt ($OD_{\text{Claudin 1}} / OD_{\beta\text{-Aktin}}$). Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. **OD** = optische Dichte, **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass, **Schein** = Schein-Operation.

Wie in der nachfolgenden Abbildung 20 graphisch dargestellt, wurde die Proteinmenge von Claudin 2 in Caco2-Zellen durch die Behandlung mit Duodenal- (**A**) und Ileuminhalt (**C**) RYGB-operierter Ratten im Vergleich zur Behandlung mit dem Darminhalt schein-operierter Ratten signifikant vermindert. Eine Tendenz war auch nach Behandlung mit Jejunal- (**B**) und Koloninhalt (**D**) der RYGB-operierten Ratten zu sehen, allerdings waren die Ergebnisse hierbei nicht signifikant.

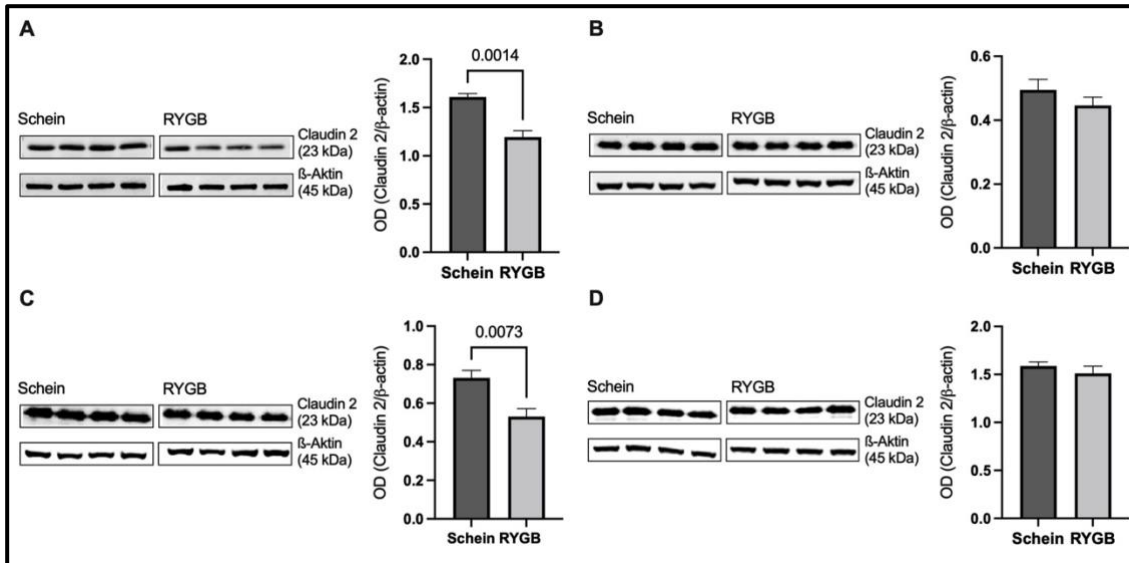


Abbildung 20: Proteinmenge von Claudin 2 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Abbildung 20 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 2 in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (**A**), Jejunal- (**B**), Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. Siehe Abbildung 19 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

Die Proteinmenge von Claudin 3 erhöhte sich signifikant nach Behandlung der Zellmonolayer mit Duodenalinhalt (**A**) der RYGB-operierten Ratten im Vergleich zur Behandlung mit Duodenalinhalt schein-operierter Ratten. Sie verminderte sich nach Behandlung mit Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) RYGB-operierter Ratten, wie in Abbildung 21 graphisch dargestellt ist. Die Behandlung mit dem Jejunalinhalt (**B**) führte zu keiner signifikanten Veränderung von Claudin 3 in den Caco2-Zellen.

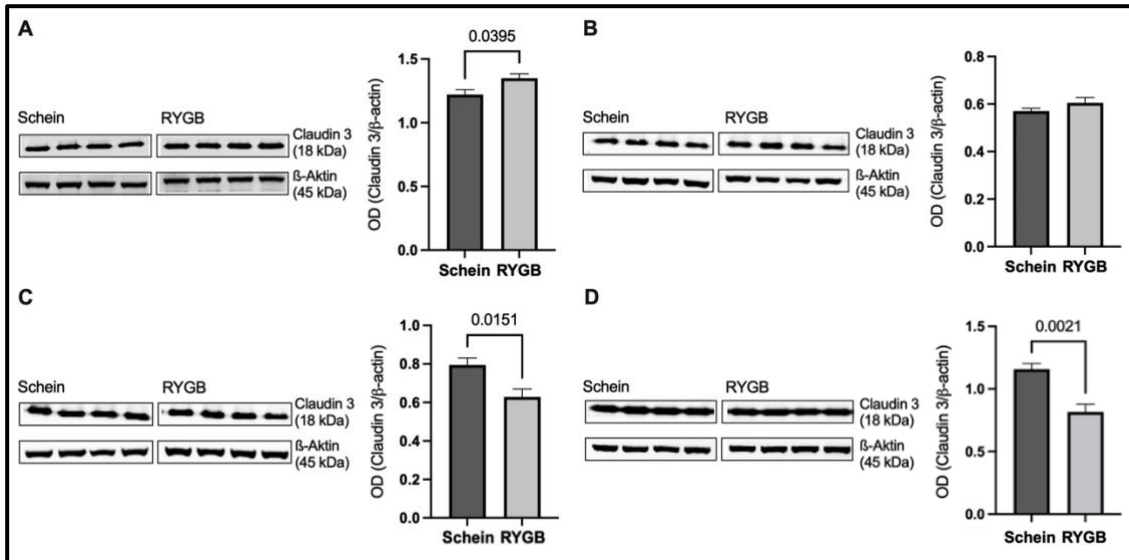


Abbildung 21: Proteinmenge von Claudin 3 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Abbildung 21 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 3 in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (**A**), Jejunal- (**B**), Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. Siehe Abbildung 19 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

In der nachfolgenden Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Proteinanalysen von Claudin 4 graphisch dargestellt. Das Muster, mit dem sich die Proteinmenge von Claudin 4 nach Behandlung der Caco2-Zellen veränderte, entspricht dem von Claudin 3. Die Behandlung mit Duodenalinhalt (**A**) der RYGB-operierten Ratten führte ebenfalls zu einer erhöhten Proteinmenge von Claudin 4. Die Behandlung mit Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) führte zu einer Reduktion der Proteinmenge von Claudin 4 in den Caco2-Zellen. Die Behandlung mit dem Jejunalinhalt (**B**) führte zu keiner signifikanten Veränderung von Claudin 4 in den Caco2-Zellen.

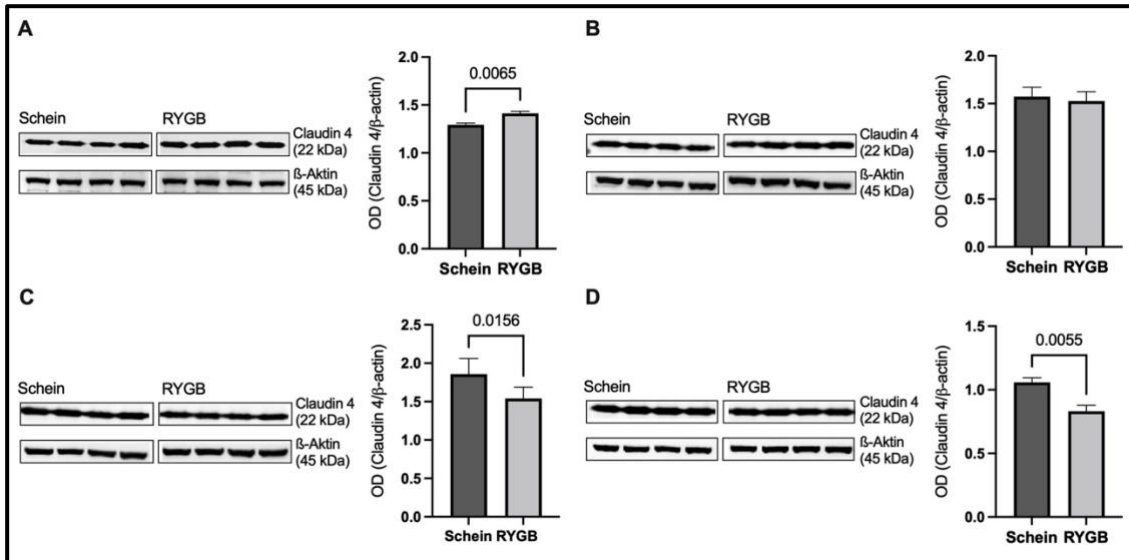


Abbildung 22: Proteinmenge von Claudin 4 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Abbildung 22 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Claudin 4 in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (**A**), Jejunalinhalt (**B**), Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. Siehe Abbildung 19 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

Die Proteinmenge von Occludin, einem weiteren Transmembranprotein der Verschlusskontakte, zeigte lediglich eine signifikante Zunahme nach Behandlung der Caco2-Zellen mit Jejunalinhalt (**B**) der RYGB-operierten Ratten gegenüber der Behandlung mit Jejunalinhalt der schein-operierten Ratten, wie in Abbildung 23 graphisch dargestellt ist.

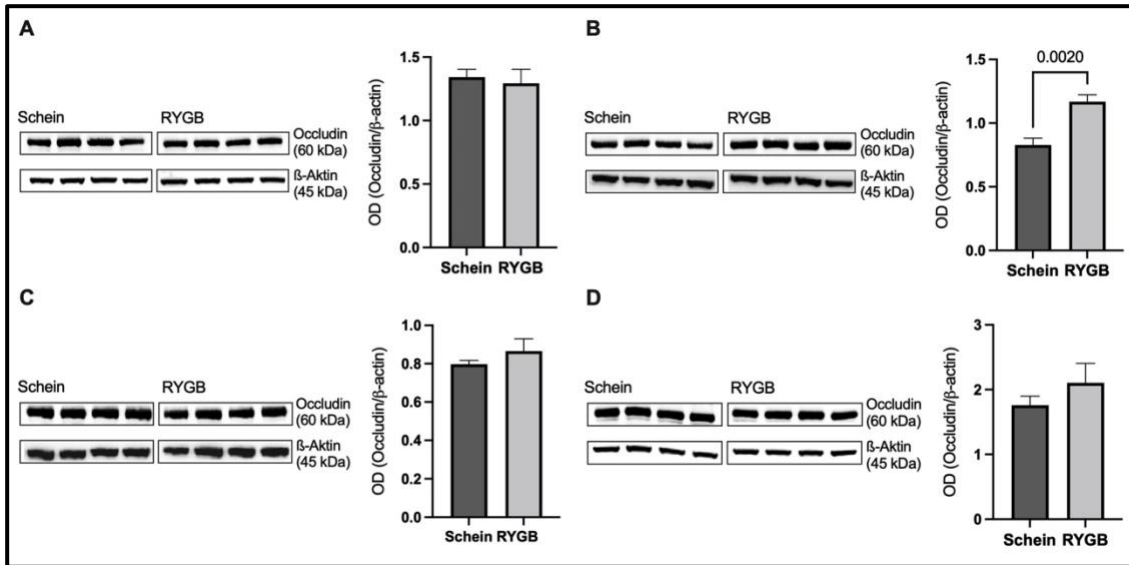


Abbildung 23: Proteinmenge von Occludin in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten

Abbildung 23 zeigt in **A-D** eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für Occludin in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (**A**), Jejunal- (**B**), Ileum- (**C**) und Koloninhalt (**D**) von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. Siehe Abbildung 19 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

3.2.2.2 Mengenveränderung von E-Cadherin in Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt

Die Analyse der Proteinmenge von E-Cadherin, einem Transmembranprotein der Adhärenskontakte, zeigte eine Herabregulierung nach Behandlung der Zellen mit Ileuminhalt (C) der RYGB-operierten Ratten gegenüber dem der schein-operierten Ratten, wie in Abbildung 24 graphisch dargestellt. Die Behandlung mit Duodenal- (A), Jejunal- (B) und Koloninhalt (D) RYGB- bzw. schein-operierter Ratten führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinmenge von E-Cadherin in den Caco2-Zellen.

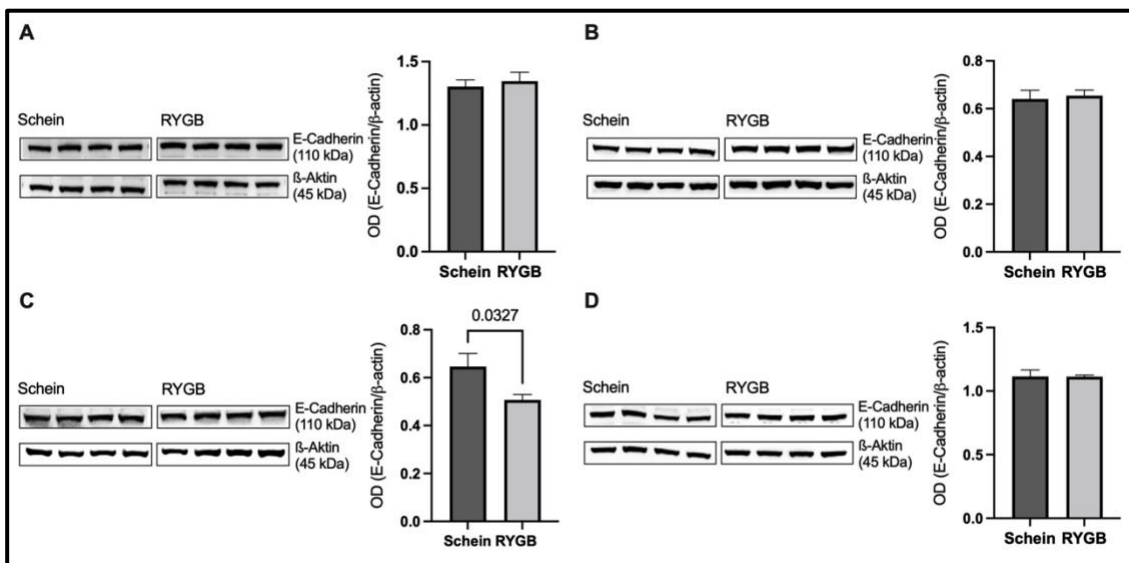


Abbildung 24: Proteinmenge von E-Cadherin in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Abbildung 24 zeigt in A-D eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für E-Cadherin in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (A), Jejunal- (B), Ileum- (C) und Koloninhalt (D) von schein-operierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. Siehe Abbildung 19 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung.

3.2.2.3 Mengenveränderung von DSG 2 in Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt

Als nächstes folgte die Untersuchung des desmosomalen Proteins DSG 2. Wie in nachstehender Abbildung 25 dargestellt, zeigte sich, dass der Duodenal- (A), der Jejunal- (B) und der Koloninhalt (D) von RYGB-operierten Ratten im Vergleich zu scheinoperierten Ratten die Proteinmenge des barriestabilisierenden desmosomalen Proteins DSG 2 (Schlegel et al., 2021) in Caco2-Zellen erhöht.

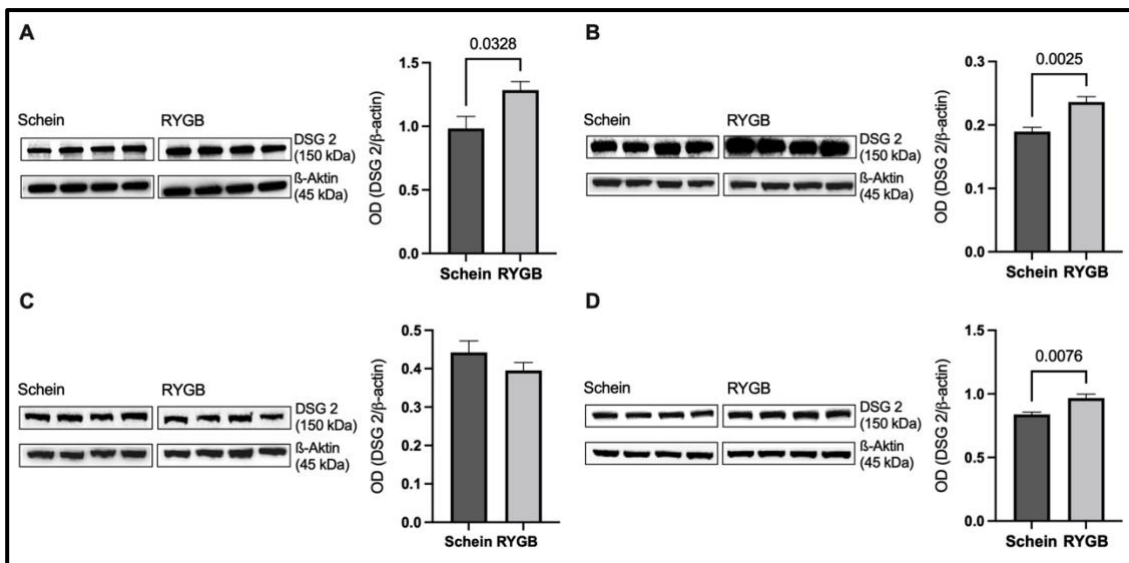


Abbildung 25: Proteinmenge von Desmoglein 2 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Abbildung 25 zeigt in A-D eine graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für DSG 2 in konfluenten Caco2-Zellen, die 24 Stunden lang mit gepooltem Duodenal- (A), Jejunal- (B), Ileum- (C) und Koloninhalt (D) von scheinoperierten bzw. RYGB-operierten Ratten behandelt wurden. Links der Balkendiagramme ist jeweils ein repräsentativer Western Blot zu sehen. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 10 - 12$ Zellkulturen / Gruppe. Siehe Abbildung 19 für nähere Erklärungen zu Beschriftung und Auswertung. **DSG 2** = Desmoglein 2.

3.2.2.4 Zusammenfassung der Mengenveränderungen junctionaler Proteine in Caco2-Zellen

Die nachfolgende Tabelle 14 zeigt zusammenfassend die Veränderungen der analysierten Proteine des Schlussleistenkomplexes der Caco2-Zellen nach Behandlung mit gepooltem Darminhalt. Dabei sind nur signifikante Veränderung dementsprechend gekennzeichnet. Für fehlende Veränderungen wurde einheitlich ↔ verwendet.

Tabelle 14: Proteinmengenveränderung ausgewählter Proteine der Occludenskontakte, Adhärenskontakte und Desmosomen in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt

Tabelle 14 fasst die Veränderungen der Proteinmenge der analysierten Proteine in Caco2-Zellen zusammen. Die Tabelle stellt die Differenz der Mittelwerte (RYGB – Schein-OP) der optischen Dichte der gesuchten Proteine im Verhältnis zu β -Aktin dar. ↑ = signifikante Erhöhung der Proteinmenge in den mit Darminhalt der RYGB-operierten Ratten behandelten Zellen gegenüber den mit Darminhalt der schein-operierten Ratten behandelten Zellen, ↓ = signifikante Reduktion der Proteinmenge in den mit Darminhalt der RYGB-operierten Ratten behandelten Zellen gegenüber den mit Darminhalt der schein-operierten Ratten behandelten Zellen, ↔ = keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. **E-Cad.** = Epitheliales Cadherin; **DSG 2** = Desmoglein 2, **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass.

Darminhalt	Analysierte Proteine						
	Claudin 1	Claudin 2	Claudin 3	Claudin 4	Occludin	E-Cad.	DSG 2
Duodenalinhalt	↑	↓	↑	↑	↔	↔	↑
Jejunalinhalt	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↑
Ileuminhalt	↔	↓	↓	↓	↔	↓	↔
Koloninhalt	↑	↔	↓	↓	↔	↔	↑

Es lässt sich zusammenfassen, dass der Duodenalinhalt deutliche Auswirkungen auf die Proteinmengen der Transmembranproteine hatte. Die Behandlung mit dem Duodenalinhalt RYGB-operierter Ratten führte gegenüber der Behandlung mit dem Duodenalinhalt schein-operierter Ratten zu einer Erhöhung der barriestabilisierenden Proteine Claudin 1, 3, und 4 sowie DSG 2 und einer Reduktion von Claudin 2. Diese Veränderungen lassen sich mit der verbesserten Barrierefunktion der Caco2-Zellen in den funktionellen Experimenten korrelieren. Auch der Jejunalinhalt RYGB-operierter Ratten hatte gegenüber dem der schein-operierten Ratten insgesamt positive Auswirkungen auf die Proteine des Schlussleistenkomplexes. Die Behandlung führte zu

einer Erhöhung von Occludin und DSG 2. Diese Veränderungen lassen sich ebenfalls mit der verbesserten Barrierefunktion der Caco2-Zellen nach Behandlung mit Jejunalinhalt in den funktionellen Experimenten korrelieren. Die Applikation von Ileuminhalt RYGB-operierter Ratten führte zu einer Reduktion der barriestabilisierenden Proteine Claudin 3, 4 und E-Cadherin sowie zu einer Verminderung des porenbildenden Claudins Claudin 2. Die funktionellen Messungen zeigten nach Applikation von Ileuminhalt der beiden Vergleichsgruppen auf die Caco2-Zellen keine signifikante Funktionsverbesserung bzw. Verschlechterung der Barriere. Die Behandlung der Caco2-Zellen mit Koloninhalt RYGB-operierter Ratten führte verglichen mit der Behandlung mit Koloninhalt schein-operierter Ratten zu einer Reduktion der Proteinmenge von Claudin 3 und 4 sowie zu einer Erhöhung der Proteinmenge von Claudin 1 und DSG 2. Der Koloninhalt der RYGB-operierten Ratten führte im Vergleich zum Koloninhalt der schein-operierten Ratten zu den deutlichsten positiven Veränderungen der Barrierefunktion der Caco2-Zellen im Transwellassay sowie im ECIS-Experiment. Insofern ist es überraschend, dass die Ergebnisse der Proteinanalyse nach Behandlung mit Koloninhalt weniger eindeutig waren und die Ergebnisse der funktionellen Experimente nur bedingt widerspiegeln. Diese Diskrepanz ist möglicherweise damit zu erklären, dass viele Proteine, die neben den analysierten ebenfalls wesentlich für die Funktion der Barriere sind, nicht analysiert worden sind. Ebenso könnte es sich aber auch um nur ein oder zwei Proteine handeln, die maßgeblich die Funktionsverbesserung der Barriere verantworten. Dabei könnte es sich um DSG 2 handeln, da das Muster der Veränderungen der Proteinanalysen von DSG 2 direkt mit den Ergebnissen der funktionellen Experimente korrelierte. Die wichtige Rolle von DSG 2 an der Aufrechterhaltung der epithelialen Darmbarrierefunktion konnte bereits durch in vivo Experimente an Caco2-Zellkulturen mittels eines DSG 2 Antikörpers gezeigt werden. In diesen Experimenten verringerte die Zugabe des Antikörpers den elektrischen transepithelialen Widerstand signifikant und erhöhte den FITC-Dextran-Fluss (Schlegel et al., 2010).

3.2.2.5 Transkriptionsanalyse

Um mögliche Unterschiede in der Transkription von Proteinen der Schlussleistenkomplexe in Caco2-Zellen als Reaktion auf die Behandlung mit duodenalem, jejunalem, ilealem und kolonalem Inhalt von RYGB-operierten Ratten im Vergleich zu Darminhalt schein-operierter Ratten zu bewerten, wurden RT-qPCRs durchgeführt. Die verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die nachfolgende Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analysen. Es zeigten sich keine signifikanten Effekte der Behandlung mit Darminhalt der Ratten auf die mRNA-Expression von Claudin 1, Claudin 3, Claudin 4, Occludin, E-Cadherin und DSG 2, was darauf hindeutet, dass posttranskriptionelle Prozesse, die in den Western Blot Analysen beobachteten Veränderungen der Barriereproteine unter in vitro Bedingungen steuern. Eine solche Dissoziation zwischen mRNA-Expression- und Proteinniveaus verschiedener Barriereproteine wurde auch für Darm-Enteroide von Patientinnen und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Patientinnen und Patienten gezeigt (Meir et al., 2020). Auch Jin et al., die das Expressionsniveau des Tight Junction-Proteins Occludin im Jejunum von RYGB-operierten Mäusen gegenüber schein-operierten Mäusen sowie das Tight Junction-assoziierte Protein ZO 1 im Dickdarm analysierten, konnten dabei jeweils eine Erhöhung der Proteinmenge des jeweiligen Proteins feststellen, allerdings keine signifikante Veränderung im mRNA-Expressionsniveau (Jin et al., 2021). Wie in Abbildung 26 dargestellt, wurde für Claudin 2 eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression nach Behandlung mit Duodenal- (A), Ileum- (C) und Koloninhalt (D) RYGB-operierter gegenüber der Behandlung mit Darminhalt schein-operierter Ratten festgestellt.

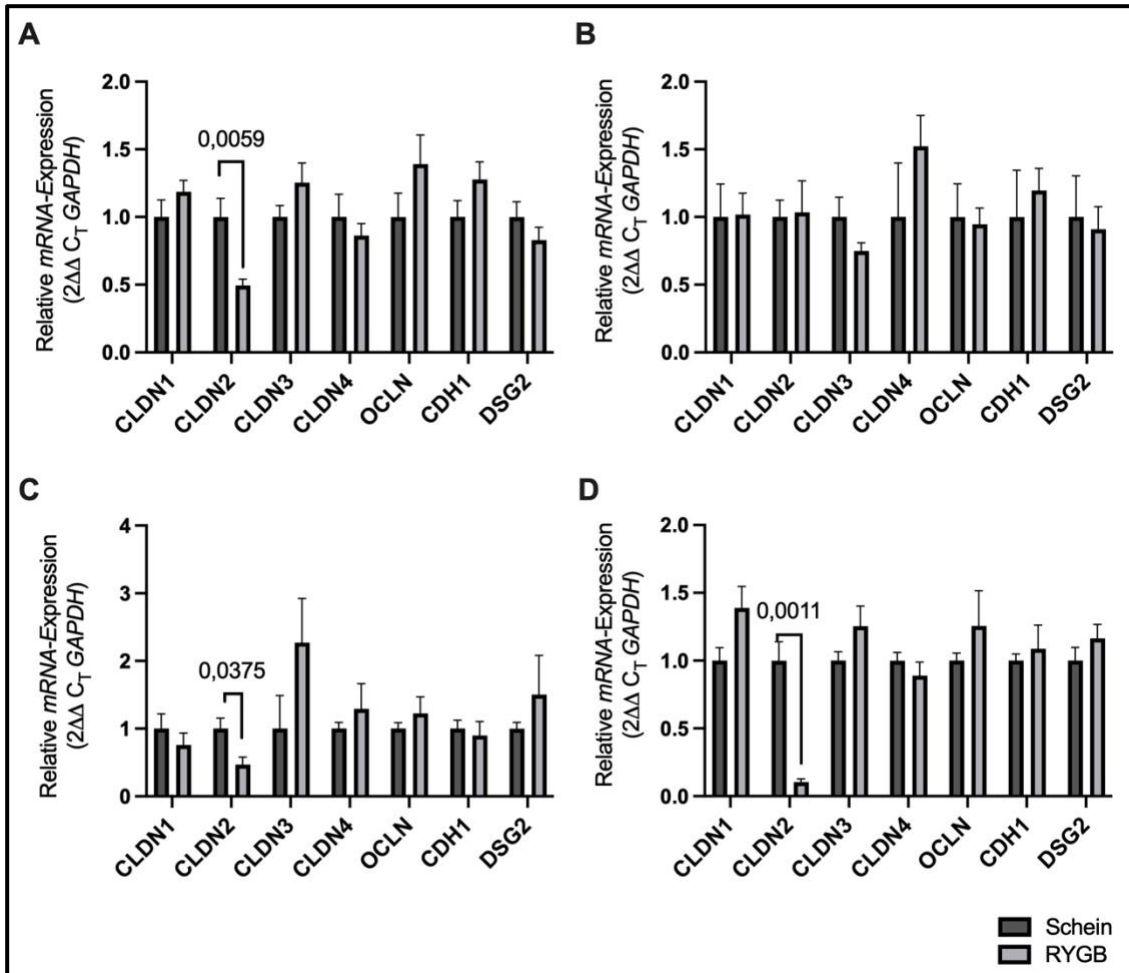


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der RT-qPCR

Abbildung 26 zeigt eine graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression verschiedener Schlüsselproteine des Schlussleistenkomplexes in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Duodenalin (A), Jejunalinhalt (B), Ileuminhalt (C) und Koloninhalt (D) schein- bzw. RYGB-operierter Ratten. Die relative mRNA-Expression der Caco2-Zellen, die mit Darminhalt der schein-operierten Ratten behandelt worden sind, sind zur besseren Vergleichbarkeit auf 1 normalisiert. Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. $n = 6$ pro Gruppe und Zellkultur. **CDH1** = E-Cadherin, **CLDN1** = Claudin 1, **CLDN2** = Claudin 2, **CLDN3** = Claudin 3, **CLDN4** = Claudin 4, **C_T** = Cycle of threshold, **DSG2** = Desmoglein 2, **GAPDH** = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, **OCLN** = Occludin, **RYGB** = Roux-en-Y Magenbypass, **Schein** = Schein-Operation.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Transferexperimente war es, zu untersuchen, ob sich durch die Inkubation mit Darminhalt der Ratten gleichartige Veränderungen der Proteine der Schlussleistenkomplexe in den Caco2-Zellen induzieren lassen, wie sie nach Operation der Ratten an deren Darm zu finden waren. Ein weiteres Ziel war es, zu untersuchen, ob sich die Barrierefunktion von Caco2-Zellen durch Inkubation mit Darminhalt verändern lässt. Die nachstehende Tabelle 15 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blot Analysen sowie eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der Analysen der Vollwandresektate mit den Analysen der Caco2-Stimulationsexperimenten. Dabei ist zu sehen, dass einige der in den Vollwandresektaten vollzogenen Veränderungen ebenfalls in den korrespondierenden Simulationsexperimenten zu sehen sind. Daneben kam es aber auch zu signifikanten Veränderungen der Proteinmengen in den Caco2-Zellen, die so nicht in den Vollwandresektaten zu finden waren und andersherum.

Tabelle 15: Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse der Western Blot Analysen

Tabelle 15 zeigt eine zusammenfassende und vergleichende Analyse der Verteilungsmuster der Barriereproteine zwischen Vollwandresektaten und den Caco2-Zellen. ↑ = signifikante Erhöhung der Proteinmenge in den Vollwandresektaten der RYGB-operierten Ratten im Vergleich zu den Vollwandresektaten schein-operierter Ratten (**Resekt.**) bzw. in den Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt RYGB-operierter Ratten im Vergleich zur Behandlung mit Darminhalt schein-operierter Ratten (**Caco2**), ↓ = signifikante Reduktion der Proteinmenge in den Vollwandresektaten der RYGB-operierten Ratten im Vergleich zu den Vollwandresektaten schein-operierter Ratten (**Resekt.**) bzw. in den Caco2-Zellen nach Behandlung mit Darminhalt RYGB-operierter Ratten im Vergleich zur Behandlung mit Darminhalt schein-operierter Ratten (**Caco2**), ↔ = keine signifikante Veränderung der Proteinmenge, ↔ (↑) = keine signifikante Veränderung der Proteinmenge, allerdings eine nicht signifikante Erhöhung, ↔ (↓) = keine signifikante Veränderung der Proteinmenge, allerdings eine nicht signifikante Reduktion. **DSG 2** = Desmoglein 2, **Resekt.** = Vollwandresektat.

Protein	Duodenum / Duodenalinhalt		Jejunum / Jejunalinhalt		Ileum / Ileuminhalt		Kolon / Koloninhalt	
	Resekt.	Caco2	Resekt.	Caco2	Resekt.	Caco2	Resekt.	Caco2
Claudin 1	↑	↑	↔ (↓)	↔ (↑)	↔ (↓)	↔ (↓)	↔ (↑)	↑
Claudin 2	↔ (↑)	↓	↓	↔ (↓)	↔ (↓)	↓	↓	↔ (↓)
Claudin 3	↑	↑	↔ (↓)	↔	↓	↓	↓	↓
Claudin 4	↔	↑	↔ (↓)	↔	↔ (↓)	↓	↔ (↓)	↓
Occludin		↔		↑		↔ (↑)		↔ (↑)
E-Cadherin		↔		↔		↓		↔
DSG 2		↑		↑		↔ (↓)		↑

4 Diskussion

Tier- und Humanstudien weisen darauf hin, dass Fettleibigkeit mit einer erhöhten Darmpermeabilität einhergehen kann (Brun et al., 2007; Teixeira et al., 2012). Als eine der Hauptfolgen der erhöhten Darmpermeabilität wird das Eindringen von Endotoxinen aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf angesehen. Die Translokation von LPS führt zu einer systemischen Entzündung (Moreira et al., 2012). Der chronische niedriggradige Entzündungszustand zieht weitere Stoffwechselerkrankungen nach sich (Cani et al., 2007; León-Pedroza et al., 2015; Moreira et al., 2012). Darmbarrierestörungen stehen in erster Linie im Zusammenhang mit Expressionsveränderungen bzw. Veränderungen der Proteinmenge von Proteinen der Occludenskontakte. In der Vergangenheit wurde auch die Reduktion desmosomaler Kontakte wie DSG 2 als relevant für den Zusammenbruch der Darmbarriere beschrieben (Garcia-Hernandez et al., 2017; Gross et al., 2018; Schlegel et al., 2010). Bariatrische Operationen wie die RYGB-Operation verbessern den chronischen Entzündungszustand (Guo et al., 2019; Monte et al., 2012), verändern die Zusammensetzung der Darmmikrobiota (Tremaroli et al., 2015) und tragen zu einer Stabilisierung der intestinalen Barrierefunktion bei (Guo et al., 2019). Die normalisierte Barrierefunktion korreliert dabei mit der Verringerung der Entzündung (Guo et al., 2019) und trägt dadurch potenziell zur Verbesserung der mit Fettleibigkeit verbundenen metabolischen Komplikationen wie der Insulinresistenz bei. Die Mechanismen die zu diesen Veränderungen führen sind jedoch weitgehend unklar.

Um zunächst deskriptiv die Auswirkungen einer RYGB-Operation auf die Proteinmenge von Proteinen der Occludenskontakte zu ermitteln, wurde hier eine detaillierte Charakterisierung der Veränderung der Proteinmengen nach RYGB-Operation im Vergleich zu Schein-Operation bei Ratten durchgeführt. Darüber hinaus war das Hauptziel dieser Arbeit, ein besseres Verständnis darüber zu gewinnen, wie der RYGB die intestinale Barriere stabilisiert und die Endotoxämie vermindert (Guo et al., 2019). Dafür wurden die oben genannten Analysen durch Simulationsexperimente ergänzt. Das intestinale Milieu wurde durch Transfer von Darminhalt RYGB- bzw. schein-operierter Ratten auf Caco2-Zellen simuliert. Im Anschluss wurde untersucht, ob durch Darminhalttransfer auf eine Zellmonolayer die Barrierefunktion stabilisiert werden kann. Ergänzend wurde untersucht, ob durch Darminhalttransfer die gleichen Proteinmengenveränderungen in der Zellkultur hervorgerufen werden, wie in vivo in den Vollwandresektaten der Ratten zu finden waren, um herauszufinden, ob es sich um luminale Faktoren handeln könnte, die zu den Barriereveränderungen nach RYGB

beitragen. Darüber hinaus wurden an der Zellkultur weitere Schlüsselproteine der Adhärenskontakte und der Desmosomen untersucht.

4.1 Die Vollwandresektate der RYGB-operierten Ratten zeigen regionenspezifische Veränderungen der analysierten Barriereproteine

Die in dieser Arbeit beschriebene Charakterisierung der Proteinmengenveränderungen der Occludenskontakte nach RYGB ist die bisher umfassendste Analyse ihrer Art. Es wurden im Vergleich zu früher publizierten Arbeiten alle Bereiche des Intestinums der RYGB-operierten Ratten auf die Proteinmengenveränderungen der Claudine 1, 2, 3 und 4 untersucht. Eine erhöhte Menge von Claudin 1, 3 und 4 wirkt barriereversiegelnd, während eine erhöhte Menge von Claudin 2 eine erhöhte Permeabilität der Barriere mit sich bringt (Markov et al., 2010). Die barriestabilisierende Wirkung der RYGB-Operation konnte in der Vergangenheit übereinstimmend und speziesübergreifend belegt werden (Casselbrant et al., 2015; Guo et al., 2019; Jin et al., 2021; Wang et al., 2020). Die in dieser Arbeit beschriebenen Western Blot Analysen zeigten jedoch keine einheitliche Erhöhung der Proteinmenge der Claudine 1, 3 und 4 sowie eine Reduktion von Claudin 2. Die Analyse zeigte jedoch eindeutig ein regional unterschiedliches Veränderungsmuster der analysierten Proteine. Eine signifikante Erhöhung nach RYGB ergab sich für Claudin 1 im Duodenum. Ebenso ergab sich eine leichte Proteinemengenerhöhung im Kolon der RYGB-operierten Ratten, die aufgrund der Streuung der Daten nicht signifikant war. Guo et al. untersuchten ebenfalls die Expression von Claudin 1 nach RYGB-Operation mittels einer Western Blot Analyse. Sie untersuchten dabei lediglich das Kolon und konnten hierbei eine signifikante Steigerung der Proteinmenge von Claudin 1 nach RYGB zeigen (Guo et al., 2019). Die Daten von Casselbrant et al. sind schwer mit den für diese Arbeit analysierten Daten vergleichbar, da sie die Proteinveränderung an humanen, jejunalen Proben analysierten. Sie konnten keine signifikante Veränderung für Claudin 1 zeigen. Dies ist vergleichbar mit Proben aus Patientinnen und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, die auch heterogene Muster für Claudin 1 in unterschiedlichen Kollektiven zeigen (Meir et al., 2020).

Für Claudin 2 wurde eine signifikante Herunterregulierung im Jejunum sowie im Kolon beobachtet. Casselbrant et al. konnten dagegen keine Veränderung der Proteinmenge von Claudin 2 im humanen Jejunum zeigen. Für Claudin 3 zeigte sich eine signifikante Erhöhung im Duodenum, allerdings entgegen der Erwartung eine signifikante Reduktion im Ileum und im Kolon sowie eine nicht signifikante Herabregulierung im Jejunum.

Casselbrant et al. konnten ebenso für Claudin 3 in humanen jejunalen Proben eine Erhöhung der Proteinmenge feststellen (Casselbrant et al., 2015). Für Claudin 4 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen stellen eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen an Barriereproteinen sowie funktionellen in vivo und ex vivo Untersuchungen der Barrierefunktion nach RYGB dar. Die Ergebnisse zeigten darüber hinaus eindeutig, dass es regional zu unterschiedlichen Proteinverteilungsmustern der Junctionsproteine nach RYGB-Operation kam. Diese Erkenntnis wird auch durch Untersuchungen von Jin et al. unterstützt, die ebenfalls regional verschiedene Expressionsmuster von ZO 1 und Occludin im Jejunum sowie im Kolon nach RYGB- bzw. Schein-Operation an Mäusen zeigen konnten. Darüber hinaus zeigten sie, dass es in beiden untersuchten Regionen zu einer Permeabilitätsabnahme des Epithels nach RYGB-Operation kam (Jin et al., 2021). Eine Limitation der Analysen dieser Arbeit ist, dass vor der terminalen Anästhesie bzw. danach ex vivo keine funktionellen Messungen der IEB durchgeführt wurden. Damit hätten Erkenntnisse über die Funktion der Darmbarriere im Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon gewonnen werden können und diese mit den Ergebnissen der Proteinanalyse korreliert werden können.

Neben den analysierten Proteinen gibt es viele weitere Proteine und Faktoren, die an der Regulation der IEB beteiligt sind und die es zu diesem Zeitpunkt nicht zulassen, von den beobachteten Proteinveränderungen auf die Funktionalität der Darmbarriere zu schließen. Eines dieser Proteine ist DSG 2. Ihm wird über eine Regulation der Occludenskontakte ein großer Einfluss auf die Integrität der Darmbarriere und die Regulation der Permeabilität zugeschrieben (Gross et al., 2018; Schlegel et al., 2010). In zukünftigen Studien sollte die Veränderung von DSG 2 nach RYGB im Darm der Ratten untersucht werden, insbesondere aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Transferexperimente, die zeigten, dass die Veränderungen von DSG 2 in den Caco2-Zellen direkt mit den funktionellen Messungen korrelierten. Zusammenfassend wurden an der Darmschleimhaut vor und nach der RYGB-Operation mehrere junctionale Proteinveränderungen festgestellt, die auf eine veränderte Barrierefunktion der Schleimhaut in den unterschiedlichen Regionen des Intestinums hinweisen. Diese Untersuchungen liefern als erste ihrer Art deutliche Hinweise auf einen regionenspezifischen Faktor, der die Regulation der Darmbarriere nach RYGB-Operation vermittelt.

4.2 Der Darminhalt von RYGB-operierten Ratten stabilisiert direkt die Barrierefunktion in Caco2-Zellen

Indem in den Versuchen für die vorliegende Arbeit der Darminhalt von RYGB-operierten und schein-operierten Ratten direkt auf die apikale Seite von Caco2-Zellen aufgebracht wurde, wurde die regionale intestinale Mikroumgebung der jeweiligen Operationsgruppe simuliert. Dabei zeigten sich regionenspezifische, barriestabilisierende Effekte des Duodenal-, Jejunal- und Koloninhalts von RYGB-operierten Ratten im Vergleich zum Darminhalt schein-operierter Ratten. Die Inkubation der Zellen mit dem Ileuminhalt RYGB-operierter Ratten im Vergleich zur Inkubation mit dem Ileuminhalt schein-operierter Ratten zeigte keinen Unterschied in der Barrierefunktion der Caco2-Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Arora et al., die zeigen konnten, dass sich die Transplantation des Ileuminhaltes RYGB-operierter genetisch fettleibiger und glucoseintoleranter Ratten im Vergleich zu schein-operierten Ratten auf keimfreie Mäuse nicht positiv auf deren Glucosetoleranz auswirkte, wohingegen die Transplantation des Zökuminhaltes zu einer verbesserten Glucosetoleranz führte (Arora et al., 2017). Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass es sich zumindest teilweise um luminale Faktoren handelt, die auf die apikale Seite der Enterozyten einwirken und auf bislang unbekannt Weise die IEB stabilisieren.

Die Wirkung des Darminhaltes wird möglicherweise durch verschiedene vom Wirt und/oder der Mikrobiota erzeugten, löslichen Faktoren vermittelt. Da keine Analyse des Darminhaltes durchgeführt wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich die Inhaltsstoffe des Darminhalts der schein- gegenüber des Darminhalts der RYGB-operierten Ratten unterscheiden. Ebenso kann die intestinale Mikroumgebung durch den Transfer von Darminhalt auf eine Zellkultur nur unvollständig abgebildet werden. Durch Zugabe von antibiotischen Substanzen zum Kulturmedium wurde der Darminhalt von lebenden Bakterien bereinigt, sodass nur noch deren Stoffwechselprodukte enthalten waren. Dies führte zwar zum Ausschluss direkter Signale zwischen Mikrobiota und Wirt als Vermittler der stabilisierenden Effekte, auf der anderen Seite kam es dadurch aber zu einer unvollständigen Abbildung der intestinalen Mikroumgebung. Die Caco2-Zellmonolayer wird routinemäßig als Modell für die intestinale Barriere verwendet. Allerdings bildet dieses Modell die intestinale Barriere nur unvollständig ab (Lea, 2015a). Dies liegt unter anderem daran, dass sie ausschließlich aus Epithelzellen besteht und Immunzellen sowie Zellen des ENS, die einen Einfluss auf die intestinale Barriere ausüben (Al-Sadi et al., 2009; Neunlist et al., 2003), fehlen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass für die Transferexperimente der Darminhalt von Wistar

Ratten auf eine humane Zellkultur aufgetragen wurde, es sich also um ein speziesübergreifendes Experiment handelt. Nichtsdestotrotz bietet dieses Modell einen neuartigen Ansatz und konnte eindrücklich zeigen, dass der Darminhalt direkt Einfluss auf die Barrierefunktion und die Proteinmenge der Barriereproteine hat. Das Modell unterstützt die in dieser Arbeit beschriebenen regionenspezifischen Proteinmengenveränderungen der Barriereproteine im Darmepithel der operierten Ratten. Die Veränderungen der Proteine in den mit Darminhalt behandelten Caco2-Zellen entsprachen nur teilweise den zuvor beobachteten Veränderungen in den Vollwandresektaten der Ratten. Dies spricht zum einen für einen luminalen, im Darminhalt enthaltenen Faktor, der Veränderungen in der Proteinmenge der Caco2-Zellen sowie auch in vivo nach RYGB vermittelt und der durch das reduktionistische Zellkulturmodell abgebildet werden konnte. Zum anderen aber auch für weitere Faktoren, die die Veränderungen in vivo induziert haben und durch das Caco2-Modell nicht abgebildet werden konnten. Bei diesen, vom Wirt stammenden Faktoren könnte es sich unter anderem um Faktoren des ENS handeln, da diese Faktoren, sowie das gesamte ENS im Caco2-Modell nicht abgebildet werden konnten. In vitro Kulturmodellstudien von enterischen Gliazellen, Hauptakteuren des ENS und Caco2-Zellen konnten belegen, dass enterische Gliazellen eine Rolle bei der Regulierung der intestinalen Barriere spielen (Meir et al., 2021). Die wichtige Rolle von Mediatoren des ENS wie zum Beispiel dem von der Gliazelllinie abgeleiteten neurotrophen Faktor wird durch die Tatsache unterstrichen, dass eine therapeutische Verabreichung dieses Faktors bei Mäusen mit induzierter Kolitis die Funktion der Barriere verbessert, indem es die intestinale Permeabilität herabsetzt (Meir et al., 2019).

4.3 Diskussion möglicher Luminalfaktoren, die die barriestabilisierenden Effekte vermitteln

Die Auswirkungen der Funktion der IEB auf Adipositas-assoziierte Erkrankungen sind anerkannt (Everard & Cani, 2013). Forschungsbestrebungen die vermittelnden Faktoren zu identifizieren, gelangen bisher nicht in ausreichendem Maße. Dies gilt insbesondere für die nach RYGB-Operation beobachteten Darmbarriereveränderungen. Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen legen nahe, dass es im Darminhalt der RYGB-operierten Ratten Faktoren geben muss, die regional in unterschiedlicher Konzentration bzw. Zusammensetzung vorliegen und so die regionenspezifischen Barriereveränderungen am Caco2-Modell hervorrufen. Dabei könnte es sich um Nebenprodukte des Mikrobiom-Metabolismus sowie um direkt vom Wirt stammende

Faktoren handeln. Es ist bekannt, dass Nebenprodukte des Mikrobiom-Metabolismus eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiom spielen (Meijer et al., 2010; K. Wang et al., 2019).

4.3.1 Tryptophanderivate

Unter den von der intestinalen Mikrobiota produzierten Stoffwechselprodukte sind Tryptophanderivate. Das Mikrobiom von Patientinnen und Patienten mit metabolischem Syndrom ist nur bedingt fähig Tryptophan in Derivate umzuwandeln (Natividad et al., 2018), wohingegen das Mikrobiom von RYGB-operierten Probanden insgesamt eine größere Kapazität hat, Tryptophanderivate herzustellen (Li et al., 2021). Tryptophan kann durch bakterielle Enzyme in Indol umgewandelt werden, welches weiter, ausschließlich durch bakterielle Enzyme in Indol-3-Propionsäure (IPA) oder Tryptamin verstoffwechselt werden kann (Jennis et al., 2018). In einem Experiment wurde Mäusen ein *Lactobacillus*-Stamm mit hoher Tryptophan-Metabolisierungsfähigkeit verabreicht. Diese Supplementierung führte zur Verbesserung des Glucosestoffwechsels und zur Verbesserung der Darmbarrierefunktion (Natividad et al., 2018). Ein zellbiologisches Experiment belegte, dass die Exposition gegenüber physiologisch relevanten Mengen von Indol eine erhöhte Expression von Genen, die an der Stärkung der Schleimhautbarriere beteiligt sind, wie Claudin 3, induzierte. Dies ging auch mit einer Erhöhung der transepithelialen Resistenz der HCT-8-Zellen, die in der Zellkultur die intestinale Barriere modellierten, einher (Bansal et al., 2010). Für IPA, welches durch bakterielle Tryptophanasen aus Indol entsteht, konnte durch direkte orale Verabreichung gezeigt werden, dass es in keimfreien Mäusen entzündungshemmend und Darmbarrierefunktion verbessernd wirkt (Venkatesh et al., 2014). Auch Jennis et al. untersuchten anhand einer Zellkultur die Auswirkungen von IPA auf die Darmbarriere *in vitro* sowie *in vivo* an Mäusen und konnten dessen barrierestabilisierende Effekte bestätigen. Sie konnten darüber hinaus auch belegen, dass der IPA-Spiegel im Plasma schlanker Probanden über dem der fettleibigen, an T2D erkrankten Probanden lag. Außerdem konnten sie zeigen, dass die niedrigen IPA-Spiegel durch eine RYGB-Operation dieser Probanden wiederhergestellt werden konnten (Jennis et al., 2018). IPA scheint dabei wesentliche regulatorische Effekte auf die intestinale Barrierefunktion über einen Kernrezeptor, den Pregnane-X-Rezeptor zu vermitteln und so die Transkription von TNF α herunterzuregulieren während die mRNA von Junctionsproteinen hochreguliert wird (Venkatesh et al., 2014). Wie groß die Rolle der Tryptophanderivate an der Regulation der Barriere nach RYGB ist, ist derzeit noch unklar.

4.3.2 Kurzkettige Fettsäuren

Neben den Tryptophanderivaten könnten als luminale, die Barrierefunktion modulierende Faktoren auch kurzkettige Fettsäuren in Frage kommen. Kurzkettige Fettsäuren, hauptsächlich Essigsäure, Buttersäure und Propionsäure, entstehen durch bakterielle Fermentation unverdauter Kohlenhydrate im Darm (Daniel & Wenzel, 2014). Ihr Vorkommen wird also ebenso wie das der Tryptophanderivate durch das Mikrobiom des Wirts determiniert. Die positiven Auswirkungen der kurzkettigen Fettsäuren wie Propionat und Butyrat sind vielfach belegt. Kurzkettige Fettsäuren sind für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere von großer Bedeutung (Peng et al., 2009) und stehen außerdem mit einer Verringerung der systemischen Entzündung im Zusammenhang (Meijer et al., 2010). Eine Studie am Mausmodell belegte, dass die RYGB-Gruppe eine signifikant höhere Gesamtmenge kurzkettiger Fettsäuren im Zökum aufwies (Liou et al., 2013). Ebenso zeigte eine Längsschnittstudie an humanen Probanden eine erhöhte fäkale Konzentration von Propionat und Butyrat nach RYGB (Ilhan et al., 2020). Im Gegensatz dazu zeigte eine jüngere Publikation von Seyfried et al., dass es nach RYGB-Operation an Ratten zu einer verminderten Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren in den Fäkalien der Ratten kam (Seyfried et al., 2021). Zur gleichen Erkenntnis kamen Tremaroli et al., die ebenso eine verminderte fäkale Produktion kurzkettiger Fettsäuren in Menschen nach RYGB-Operation beschrieben (Tremaroli et al., 2015). Die in der Literatur beschriebenen Auswirkungen des RYGB auf die von der Darmflora produzierten kurzkettigen Fettsäuren sind teilweise widersprüchlich. An dieser Stelle sind weitere Studien sinnvoll, um herauszufinden, wie sich die Gesamtkonzentration der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren nach RYGB-Operation verändert und welche Rolle diese Veränderungen nach RYGB-Operation spielen.

4.3.3 Gallensäuren

Weitere Stoffwechselprodukte, die als Vermittler der Effekte nach RYGB-Operation diskutiert werden, sind die Gallensäuren. Bei den Gallensäuren unterscheidet man primäre, vom Wirt produzierte Gallensäuren von sekundären, durch enterobakterielle Dehydroxylierung, also durch das Mikrobiom determinierte Gallensäuren (Löffler & Mössner, 2014). Übereinstimmende Daten zeigten, dass die RYGB-Operation die Plasmagallensäure-Spiegel postprandial sowie nüchtern signifikant erhöht (Ahmad et al., 2013; Pournaras et al., 2012). Die Operation führt neben der Erhöhung der Plasmagallensäure-Spiegel zu einer Verminderung fäkaler Gallensäure-Spiegel (Ilhan

et al., 2020). Die aus der Leber stammenden primären Gallensäuren konzentrieren sich aufgrund der Umleitung der Nahrung nach RYGB in der biliopankreatischen Schlinge. Physiologischerweise würden die Gallensäuren erst im Ileum absorbiert werden. Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass ein großer Teil nach Bypass bereits in der biliopankreatischen Schlinge reabsorbiert wird (Ise et al., 2019). Gallensäuren haben pleiotrope Effekte, die über ihre Rolle in der Verdauung der Lipide hinausgeht. Sie sind endokrine Faktoren, die verschiedene Rezeptoren wie FXR und TGR5 aktivieren und die Freisetzung von Stoffwechselformen wie PYY und GLP-1 anregen, die wiederum den Glucose- und Lipidstoffwechsel regulieren (Batterham & Cummings, 2016; Häussinger & Löffler, 2014). Darüber hinaus könnten sie auch an der Regulation der IEB beteiligt sein. Speziell für sekundäre Gallensäuren konnte gezeigt werden, dass sie einen direkten stabilisierenden Effekt auf die Darmbarrierefunktion haben (Lajczak-McGinley et al., 2020). Die sekundären Gallensäuren Ursodesoxycholsäure und Litocholsäure wirkten in einem Mausmodell, bei dem eine Darmentzündung durch Induktion des Zusammenbruchs der epithelialen Barriere hervorgerufen wurde, stabilisierend auf die epitheliale Barrierefunktion und schützten vor Entzündung (Lajczak-McGinley et al., 2020). Tremaroli et al. konnten zeigen, dass im Mikrobiom RYGB-operierter Patientinnen mikrobielle Gene, die an der Dehydroxylierung von primären zu sekundären Gallensäuren beteiligt sind, vermehrt vorkommen (Tremaroli et al., 2015). In einer Längsschnittstudie fanden Albaugh et al. heraus, dass sich die Spiegel von Ursodesoxycholsäure, einer sekundären Gallensäure, im ersten Monat nach RYGB signifikant erhöhten (Albaugh et al., 2015).

4.3.3.1 Der Duodenal- und der Koloninhalt RYGB-operierter Ratten stabilisiert die intestinale Barriere teilweise FXR-abhängig

Ein möglicher molekularer Mechanismus über den die sekundären, aber auch die primären Gallensäuren, also die direkten Produkte des Wirts, ihre Wirkungen vermitteln, könnte in der Aktivierung der Gallensäurerezeptoren FXR und TGR5 liegen. Die Relevanz beider Rezeptoren für die Integrität der IEB konnte bereits tierexperimentell belegt werden. Eine genetische Inaktivierung der Rezeptoren führt zum Zusammenbruch der IEB im Mausmodell (Cipriani et al., 2011; Inagaki et al., 2006). Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit wurden deshalb in weiteren Simulationsexperimenten die Auswirkungen des Duodenal-, Jejunal- und Koloninhalts von RYGB-operierten Ratten im Vergleich zu den Auswirkungen des Duodenal-, Jejunal- und Koloninhalts von schein-operierten Ratten auf den transepithelialen Widerstand einer

Caco-2-Zellmonolayer in Gegenwart von selektiven TGR5-/FXR-Antagonisten bzw. TGR5-/FXR-Agonisten gemessen (Hankir et al., 2020). Mit dem Ileuminhalt fanden keine Messungen statt. Da diese Experimente nicht von mir persönlich durchgeführt worden sind, wurden die Ergebnisse nicht im Kapitel 3. Ergebnisse aufgeführt. Die Behandlung mit dem FXR-Antagonisten hob in den Experimenten die positiven Auswirkungen des Duodenal- und des Koloninhaltes, nicht jedoch die Auswirkungen des Jejunalinhaltes auf die Barriere auf. Die Behandlung mit dem TGR5-Antagonisten ergab keine signifikanten Veränderungen des TEER. Der Duodenal-, Jejunal- und Koloninhalt der scheinoperierten Ratten wurde in einem weiteren Experiment mit jeweils einem TGR5-/FXR-Agonisten versetzt. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass nur die Behandlung mit dem mit dem FXR-Agonisten versetzten Duodenal- und Koloninhalt die TEER-Werte der Caco2-Zellen leicht erhöhte (Hankir et al., 2020).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass duodenale und kolonale Luminalfaktoren die intestinale Barriere zumindest teilweise FXR-abhängig verbessern, während jejunale Faktoren dies FXR-unabhängig tun. Diese Erkenntnis wird durch die Tatsache gestützt, dass der Gallefluss postoperativ große Teile des Jejunums der Ratten umgeht. Der Kernrezeptor FXR könnte somit nicht nur bezogen auf die Regulierung des Kohlenhydrat-, Lipid- und Energiestoffwechsels (Beenken & Mohammadi, 2009; Li et al., 2020; Zhang et al., 2006) sondern auch bezogen auf die Regulation der intestinalen Barriere nach RYGB eine Schlüsselrolle einnehmen (Hankir et al., 2020). In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, dass übereinstimmend gezeigt werden konnte, dass die Gallensäure-Spiegel nach RYGB im Plasma erhöht sind, fäkal jedoch erniedrigt (Ilhan et al., 2020). Die fäkale Erniedrigung der Konzentration der Gallensäuren ist dabei nicht gleichzusetzen mit einer Erniedrigung im gesamten Darmtrakt. Die meisten Forschungsbemühungen konzentrierten sich bisher lediglich auf die Gesamtveränderungen des Gallensäurepools. Da Gallensäuren aber sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten an den Rezeptoren wirken können (Sayin et al., 2013) und sich zudem in ihrer Potenz unterscheiden (Kawamata et al., 2003; Makishima et al., 1999), kann nicht pauschal angenommen werden, dass durch eine höhere Konzentration an Gallensäuren FXR und TGR5 stärker aktiviert werden als durch eine niedrige Konzentration. Die Gallensäureprofile müssen daher detailliert betrachtet werden. Interessanterweise konnten Haange et al. zeigen, dass es im Dickdarm von RYGB-operierten Ratten im Vergleich mit der körpergewicht-gematchten, scheinoperierten Kontrollgruppe zu einer Verminderung der Gesamtgallensäurenkonzentration kam, die Konzentrationen von CDCA und Cholsäure aber erhöht waren (Haange et al.,

2020). CDCA ist sehr potent, bezogen auf die Aktivierung von FXR (Makishima et al., 1999). Darüber hinaus fanden sich im Dickdarm der RYGB-operierten Ratten eine verminderte Konzentration von α - und β -Tauromuricholsäure. Für diese beiden Gallensäuren konnte gezeigt werden, dass sie potente Antagonisten am FXR Rezeptor sind (Sayin et al., 2013). Diese Daten liefern zusammen mit den Daten aus den Simulationsexperimenten einen Hinweis darauf, dass es in Bezug auf die Regulierung der Barrierefunktion nach RYGB wahrscheinlich nicht auf die Gesamtgallensäurekonzentration im Darm sondern auf das Gallensäureprofil ankommt. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die RYGB-Operation die intestinale Barriere durch eine Interaktion zwischen intestinalen luminalen Faktoren und intestinaler FXR-Signalgebung stabilisiert. Neben den Gallensäuren müssen noch weitere luminalen und zirkulierende Faktoren an der Regulation der intestinalen Barriere nach RYGB beteiligt sein, darunter möglicherweise Tryptophanderivate, kurzkettige Fettsäuren oder Faktoren des ENS. Zukünftige Studien sind erforderlich, um dies zu bestätigen und möglicherweise neue Faktoren zu entdecken.

4.4 Die DSG 2-Proteinmenge in Caco2-Zellen korreliert mit den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen

Wie oben bereits erwähnt, entsprechen die Veränderungen der Proteinmenge der Barriereproteine in den Vollwandresektaten denen der Caco2-Zellen nur teilweise. Dies spricht dafür, dass neben den luminalen Faktoren zirkulierende, vom Wirt oder von der Mikrobiota abgeleitete Faktoren, eine Rolle spielen. Auffallend war, dass die Proteinmenge von DSG 2 mit den funktionellen Veränderungen im Transwellassay sowie in der TEER-Messung korrelierte. Korrelation stellt jedoch keinen Beweis für Kausalität dar. Trotzdem sollte in zukünftigen Experimenten, basierend auf dieser Feststellung, die Rolle von DSG 2 an der Regulation der IEB nach RYGB untersucht werden. Leider war es zum Zeitpunkt der Arbeit nicht möglich, das Muster der Proteinmengenveränderung von DSG 2 nach Schein-Operation bzw. RYGB in den Vollwandresektaten zu analysieren. Die Rolle von DSG 2 nach RYGB könnte in Simulationsexperimenten, entsprechend dem in dieser Arbeit verwendeten Caco2-Modell, allerdings mit DSG 2 Knockout-Zellen untersucht werden. Sollte sich hierbei eine entscheidende Rolle von DSG 2 bestätigen, könnte dies mit Hilfe von DSG 2-Knockout-Mäusen bestätigt werden.

4.5 Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine regionenspezifische Regulation der Schlüsselproteine der intestinalen Barriere nach RYGB gezeigt werden. Mittels eines neuartigen Ansatzes konnte gezeigt werden, dass es sich bei den vermittelnden Faktoren unter anderem um luminal wirkende, im Darminhalt befindliche Faktoren handelt. Lange Zeit wurden die Effekte des RYGB auf die reine Gewichtsabnahme reduziert. Mittlerweile ist bekannt, dass die Effekte der Operation weit über den Gewichtsverlust hinaus gehen und unter anderem die systemische Entzündung und die damit einhergehende Insulinresistenz senken (Bojsen-Møller et al., 2014; Monte et al., 2012). Diese Arbeit konnte einen Teil dazu beitragen, die komplexen molekularen Auswirkungen einer RYGB-Operation auf die intestinale Barriere besser zu verstehen und soll als Grundlage für weitere in vitro und in vivo Forschungsreihen dienen. Langfristiges Ziel ist eine Identifikation der Faktoren, die nach RYGB zu einer Barrierestabilisierung und zur Verbesserung der post-operativen Glucosehomöostase wie der Senkung der Insulinresistenz beitragen. Dies könnte helfen, in Zukunft weitere innovative Ansätze für die Therapie des T2D zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Die bariatrische Chirurgie ist momentan die einzige Therapieoption der morbidem Adipositas mit der eine langfristige Gewichtsreduktion erreicht werden kann. Unter den Operationsmethoden gilt der RYGB als eine der wirksamsten Behandlungen bezogen auf den Gewichtsverlust und die Verbesserung von Begleiterkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ 2. Darüber hinaus belegt eine wachsende Zahl an Veröffentlichungen, dass der RYGB den Zustand chronischer Entzündung, wie er typischerweise mit Adipositas einhergeht, verringern kann. Diese sogenannte Endotoxämie geht unter anderem mit einer gestörten Integrität der intestinalen Epithelbarriere einher. Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Analyse der Veränderungen von für die Darmbarriere wichtigen Junktionsproteinen vorzunehmen, um eine Grundlage für künftige mechanistische Untersuchungen zu schaffen. Dafür wurden die Veränderungen von Barriereproteinen in Vollwandresektaten des Duodenums, des Jejunums, des Ileums sowie des Kolons von Ratten, die einen RYGB erhalten hatten, mittels Western Blot Untersuchungen quantifiziert. Als Kontrollgruppe dienten schein-operierte Ratten. Es kam zu tiefgreifenden Veränderungen der analysierten Barriereproteine in den Vollwandresektaten. Interessanterweise unterschieden sich die Verteilungsmuster der Veränderungen der Barriereproteine deutlich zwischen den einzelnen Darmregionen. Um herauszufinden, ob diese Veränderungen durch regionale Veränderungen der Mikroumgebung nach RYGB-Operation induziert wurden, wurden im reduktionistischen Zellkultursystem Stuhl-Transferexperimente durchgeführt. Caco2-Zellkulturen dienten hierbei als Modell für die intestinale epitheliale Barriere. Es wurden funktionelle Messungen und quantitative Analysen der Veränderungen der Barriereproteine der Zellkultur durchgeführt. Die Funktionsmessungen zeigten, dass der Inhalt des Duodenums, des Jejunums sowie des Kolons deutliche barriestabilisierende Effekte auf die Caco2-Zellmonolayer hatte. Zudem zeigten sich tiefgreifende Veränderungen der untersuchten Barriereproteine. Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine regionenspezifische Regulation der intestinalen Barriereproteine in Korrelation mit funktionellen Messungen nach RYGB nachgewiesen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, N., Pfalzer, A., & Kaplan, L. (2013). Roux-en-Y Gastric Bypass Normalizes the Blunted Postprandial Bile Acid Excursion Associated With Obesity. *Int J Obes.*, *37*(12), 1553-1559.
- Ahmad, R., Rah, B., Bastola, D., Dhawan, P., & Singh, A. B. (2017). Obesity-Induces Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching. *Sci Rep.*, *7*(1).
- Al-Sadi, R., Boivin, M., & Ma, T. (2009). Mechanism of Cytokine Modulation of Epithelial Tight Junction Barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. *14*, 2765-2778.
- Albaugh, V. L., Flynn, C. R., Cai, S., Xiao, Y., Tamboli, R. A., & Abumrad, N. N. (2015). Early Increases in Bile Acids Post Roux-En-Y Gastric Bypass Are Driven by Insulin-Sensitizing, Secondary Bile Acids. *J Clin Endocrinol Metab.*, *100*(9), 1225-1233.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. r. D., & Fromm, M. (2002). Claudin-2 Expression Induces Cation-Selective Channels in Tight Junctions of Epithelial Cells. *J Cell Sci.*, *115*(24), 4969-4976.
- Angrisani, L., Santonicola, A., Iovino, P., Formisano, G., Buchwald, H., & Scopinaro, N. (2015). Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes Surg.*, *25*(10), 1822-1832.
- Arble, D. M., Sandoval, D. A., & Seeley, R. J. (2015). Mechanisms Underlying Weight Loss and Metabolic Improvements in Rodent Models of Bariatric Surgery. *Diabetologia.*, *58*(2), 211-220.
- Arora, T., Seyfried, F., Docherty, N. G., Tremaroli, V., le Roux, C. W., Perkins, R., & Bäckhed, F. (2017). Diabetes-Associated Microbiota in Fa/Fa Rats Is Modified by Roux-en-Y Gastric Bypass. *ISME J.*, *11*(9), 2035-2046.
- Artis, D. (2008). Epithelial-Cell Recognition of Commensal Bacteria and Maintenance of Immune Homeostasis in the Gut. *Nat Rev Immunol.*, *8*(6), 411-420.
- AWMF. (2018). *S3-Leitlinie: Chirurgie der Adipositas und metabolischer Erkrankungen*. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. Retrieved 19.12.21 from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/088-001l_S3_Chirurgie-Adipositas-metabolische-Erkrankungen_2018-02.pdf
- Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms Underlying the Resistance To Diet-induced Obesity in Germ-free Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *104*(3), 979-984.
- Bahceci, M., Gokalp, D., Bahceci, S., Tuzcu, A., Atmaca, S., & Arikan, S. (2007). The Correlation Between Adiposity and Adiponectin, Tumor Necrosis Factor α , Interleukin-6 and High Sensitivity C-reactive Protein Levels. Is Adipocyte Size Associated With Inflammation in Adults? *J Endocrinol Invest.*, *30*(3), 210-214.
- Balda, M. S., & Matter, K. (2008). Tight Junctions at a Glance. *J Cell Sci.*, *121*(22), 3677-3682.
- Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2010). The Bacterial Signal Indole Increases Epithelial-Cell Tight-Junction Resistance and Attenuates Indicators of Inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *107*(1), 228-233.
- Batterham, R. L., & Cummings, D. E. (2016). Mechanisms of Diabetes Improvement Following Bariatric/Metabolic Surgery. *Diabetes Care.*, *39*(6), 893-901.
- Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009). The FGF Family: Biology, Pathophysiology and Therapy. *Nat Rev Drug Discov.*, *8*(3), 235-253.
- Berkes, J., Viswanathan, V., Savkovic, S., & Hecht, G. (2003). Intestinal Epithelial Responses to Enteric Pathogens: Effects on the Tight Junction Barrier, Ion Transport, and Inflammation. *Gut.*, *52*(3), 439-451.
- Bertiaux-Vandaële, N., Youmba, S. B., Belmonte, L., Lecleire, S., Antonietti, M., Gourcerol, G., Leroi, A. M., Déchelotte, P., Ménard, J. F., Ducrotté, P., & Coëffier,

- M. (2011). The Expression and the Cellular Distribution of the Tight Junction Proteins Are Altered in Irritable Bowel Syndrome Patients With Differences According to the Disease Subtype. *Am J Gastroenterol.*, 106(12), 2165-2173.
- Bode, B. (2011). Liraglutide: A Review of the First Once-Daily Glp-1 Receptor Agonist. *Am J Manag Care.*, 17(2 Suppl), 59-70.
- Bojsen-Møller, K. N., Dirksen, C., Jørgensen, N. B., Jacobsen, S. H., Serup, A. K., Albers, P. H., Hansen, D. L., Worm, D., Naver, L., Kristiansen, V. B., Wojtaszewski, J. F. P., Kiens, B., Holst, J. J., Richter, E. A., & Madsbad, S. (2014). Early Enhancements of Hepatic and Later of Peripheral Insulin Sensitivity Combined With Increased Postprandial Insulin Secretion Contribute to Improved Glycemic Control After Roux-En-Y Gastric Bypass. *Diabetes.*, 63(5), 1725-1737.
- Brix, J., Heinrich, P. C., Koch, H.-G., & Löffler, G. (2014). Gentechnik In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie.* (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2005). Interferon- γ Induces Internalization of Epithelial Tight Junction Proteins via a Macropinocytosis-Like Process. *FASEB J.*, 19(8), 923-933.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Leo, V. D., Buda, A., Pinzani, M., Palù, G., & Martines, D. (2007). Increased Intestinal Permeability in Obese Mice: New Evidence in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 292(2), 518-525.
- Bueter, M., Löwenstein, C., Olbers, T., Wang, M., Cluny, N. L., Bloom, S. R., Sharkey, K. A., Lutz, T. A., & Le Roux, C. W. (2010). Gastric Bypass Increases Energy Expenditure in Rats. *Gastroenterology.*, 138(5), 1845-1853.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Casteilla, L., . . . Burcelin, R. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes.*, 56(7), 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes.*, 57(6), 1470-1481.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G., & Delzenne, N. M. (2009). Changes in Gut Microbiota Control Inflammation in Obese Mice Through a Mechanism Involving Glp-2-Driven Improvement of Gut Permeability. *Gut.*, 58(8), 1091-1103.
- Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J.-C., Gonzalez, F. J., Kuipers, F., & Staels, B. (2006). The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice. *J Biol Chem.*, 281(16), 11039-11049.
- Casselbrant, A., Elias, E., Fändriks, L., & Wallenius, V. (2015). Expression of Tight-Junction Proteins in Human Proximal Small Intestinal Mucosa Before and After Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. *Surg Obes Relat Dis.*, 11(1), 45-53.
- Cawley, J., & Meyerhoefer, C. (2012). The Medical Care Costs of Obesity: An Instrumental Variables Approach. *J Health Econ.*, 31(1), 219-230.
- Chakaroun, R. M., Massier, L., & Kovacs, P. (2020). Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients.*, 12(4), 1082.
- Chang, S.-H., Stoll, C. R., Song, J., Varela, J. E., Eagon, C. J., & Colditz, G. A. (2014). The Effectiveness and Risks of Bariatric Surgery: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis, 2003-2012. *JAMA Surg.*, 149(3), 275-287.

- Chelakkot, C., Choi, Y., Kim, D.-K., Park, H. T., Ghim, J., Kwon, Y., Jeon, J., Kim, M.-S., Jee, Y.-K., Gho, Y. S., Park, H.-S., Kim, Y.-K., & Ryu, S. H. (2018). Akkermansia Muciniphila-Derived Extracellular Vesicles Influence Gut Permeability Through the Regulation of Tight Junctions. *Exp Mol Med.*, *50*(2), e450-e450.
- Chen, Y.-T., Stewart, D. B., & Nelson, W. J. (1999). Coupling Assembly of the E-cadherin/ β -Catenin Complex to Efficient Endoplasmic Reticulum Exit and Basal-Lateral Membrane Targeting of E-cadherin in Polarized MDCK Cells. *J Cell Biol.*, *144*(4), 687-699.
- Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M. G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., & Fiorucci, S. (2011). The Bile Acid Receptor GPBAR-1 (TGR5) Modulates Integrity of Intestinal Barrier and Immune Response to Experimental Colitis. *PLoS One.*, *6*(10), e25637.
- Colquitt, J. L., Pickett, K., Loveman, E., & Frampton, G. K. (2014). Surgery for Weight Loss in Adults. *Cochrane Database Syst Rev.*(8).
- Corteville, C., Fassnacht, M., & Bueter, M. (2014). Chirurgie als pluripotentes Instrument gegen eine metabolische Erkrankung. *Chirurg.*, *85*(11), 963-968.
- Cotillard, A., Kennedy, S. P., Kong, L. C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., Gougis, S., Rizkalla, S., Batto, J.-M., & Renault, P. (2013). Dietary Intervention Impact on Gut Microbial Gene Richness. *Nature.*, *500*(7464), 585-588.
- Cox, A., Zhang, P., Bowden, D., Devereaux, B., Davoren, P., Cripps, A., & West, N. (2017). Increased Intestinal Permeability as a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab.*, *43*(2), 163-166.
- Cummings, D. E., Weigle, D. S., Frayo, R. S., Breen, P. A., Ma, M. K., Dellinger, E. P., & Purnell, J. Q. (2002). Plasma Ghrelin Levels After Diet-Induced Weight Loss or Gastric Bypass Surgery. *N Engl J Med.*, *346*(21), 1623-1630.
- Damms-Machado, A., Louis, S., Schnitzer, A., Volynets, V., Rings, A., Basrai, M., & Bischoff, S. C. (2017). Gut Permeability Is Related to Body Weight, Fatty Liver Disease, and Insulin Resistance in Obese Individuals Undergoing Weight Reduction. *Am J Clin Nutr.*, *105*(1), 127-135.
- Daniel, H., & Wenzel, U. (2014). Makronährstoffe und ihre Bedeutung. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie.* (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Davis, M. A., Ireton, R. C., & Reynolds, A. B. (2003). A Core Function for p120-Catenin in Cadherin Turnover. *J Cell Biol.*, *163*(3), 525-534.
- Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., Falony, G., Raes, J., Maiter, D., Delzenne, N. M., de Barsey, M., Loumaye, A., Hermans, M. P., Thissen, J.-P., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2019). Supplementation With Akkermansia Muciniphila in Overweight and Obese Human Volunteers: A Proof-Of-Concept Exploratory Study. *Nat Med.*, *25*(7), 1096-1103.
- Ding, S., Chi, M. M., Scull, B. P., Rigby, R., Schwerbrock, N. M., Magness, S., Jobin, C., & Lund, P. K. (2010). High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates With Obesity and Insulin Resistance in Mouse. *PLoS One.*, *5*(8).
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2005). A-Catenin Is a Molecular Switch That Binds E-cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell.*, *123*(5), 903-915.
- Drucker, D. J. (2002). Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology.*, *122*(2), 531-544.
- Edelblum, K. L., & Turner, J. R. (2009). The Tight Junction in Inflammatory Disease: Communication Breakdown. *Curr Opin Pharmacol.*, *9*(6), 715-720.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013).

- Cross-Talk Between Akkermansia Muciniphila and Intestinal Epithelium Controls Diet-Induced Obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(22), 9066-9071.
- Everard, A., & Cani, P. D. (2013). Diabetes, Obesity and Gut Microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 27(1), 73-83.
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). Junctional Complexes in Various Epithelia. *J Cell Biol.*, 17, 375-412.
- Feng, X., Zhong, S., Yang, J., Wang, Y., & Liu, J. (2013). Effects on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion by Distal Ileal Administration of Nutrients. *Obes Surg.*, 23(11), 1774-1782.
- Frosali, S., Pagliari, D., Gambassi, G., Landolfi, R., Pandolfi, F., & Cianci, R. (2015). How the Intricate Interaction Among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.*
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions. *J Cell Biol.*, 123(6), 1777-1788.
- Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., & Nusrat, A. (2017). Intestinal Epithelial Claudins: Expression and Regulation in Homeostasis and Inflammation. *Ann N Y Acad Sci.*, 1397(1), 66-79.
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome Structure, Composition and Function. *Biochim Biophys Acta.*, 1778(3), 572-587.
- Garrod, D. R., Berika, M. Y., Bardsley, W. F., Holmes, D., & Taberner, L. (2005). Hyper-Adhesion in Desmosomes: Its Regulation in Wound Healing and Possible Relationship to Cadherin Crystal Structure. *J Cell Sci.*, 118(24), 5743-5754.
- Genser, L., Aguanno, D., Soula, H. A., Dong, L., Trystram, L., Assmann, K., Salem, J. E., Vaillant, J. C., Oppert, J. M., Laugerette, F., Michalski, M.-C., Wind, P., Rousset, M., Brot-Laroche, E., Leturque, A., Clément, K., Thenet, S., & Poitou, C. (2018). Increased Jejunal Permeability in Human Obesity Is Revealed by a Lipid Challenge and Is Linked to Inflammation and Type 2 Diabetes. *J Pathol.*, 246(2), 217-230.
- Germer, C.-T., & Seyfried, F. (2018). Metabolische und bariatrische Chirurgie. *Chirurg.*, 89(8), 575-576.
- Goyal, R. K., & Hirano, I. (1996). The Enteric Nervous System. *N Engl J Med.*, 334(17), 1106-1115.
- Gross, A., Pack, L. A., Schacht, G. M., Kant, S., Ungewiss, H., Meir, M., Schlegel, N., Preisinger, C., Boor, P., Guldiken, N., Krusche, C. A., Sellge, G., Trautwein, C., Waschke, J., Heuser, A., Leube, R. E., & Strnad, P. (2018). Desmoglein 2, but Not Desmocollin 2, Protects Intestinal Epithelia From Injury. *Mucosal Immunol.*, 11(6), 1630-1639.
- Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The Incidence of Co-morbidities Related to Obesity and Overweight: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Public Health.*, 9(88).
- Guo, Y., Liu, C. Q., Liu, G. P., Huang, Z. P., & Zou, D. J. (2019). Roux-en-Y Gastric Bypass Decreases Endotoxemia and Inflammatory Stress in Association With Improvements in Gut Permeability in Obese Diabetic Rats. *J Diabetes.*, 11(10), 786-793.
- Haange, S.-B., Jehmlich, N., Krügel, U., Hintschich, C., Wehrmann, D., Hankir, M., Seyfried, F., Froment, J., Hübschmann, T., Müller, S., Wiesenbach, D. K., Kang, K., Buettner, C., Panagiotou, G., Noll, M., Rolle-Kampczyk, U., Fenske, W., & von Bergen, M. (2020). Gastric Bypass Surgery in a Rat Model Alters the Community Structure and Functional Composition of the Intestinal Microbiota Independently of Weight Loss. *Microbiome.*, 8(1), 1-17.
- Hankir, M. K., Langseder, T., Bankoglu, E. E., Ghoreishi, Y., Dischinger, U., Kurlbaum, M., Kroiss, M., Otto, C., le Roux, C. W., Arora, T., Seyfried, F., & Schlegel, N.

- (2020). Simulating the Post-gastric Bypass Intestinal Microenvironment Uncovers a Barrier-Stabilizing Role for FXR. *iScience.*, 23(12).
- Harris, K., Kassis, A., Major, G., & Chou, C. J. (2012). Is the Gut Microbiota a New Factor Contributing to Obesity and Its Metabolic Disorders? *J Obes.*, 2012.
- Häussinger, D., & Löffler, G. (2014). Leber - Zentrales Stoffwechselorgan. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie.* (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface Area of the Digestive Tract—Revisited. *Scand J Gastroenterol.*, 49(6), 681-689.
- Holdstock, C., Engström, B. E. n., Öhrvall, M., Lind, L., Sundbom, M., & Karlsson, F. A. (2003). Ghrelin and Adipose Tissue Regulatory Peptides: Effect of Gastric Bypass Surgery in Obese Humans. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88(7), 3177-3183.
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., & Leube, R. E. (2007). Structure and Function of Desmosomes. *Int Rev Cytol.*, 264, 65-163.
- Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2001). The Cadherin Cytoplasmic Domain Is Unstructured in the Absence of β -Catenin: A Possible Mechanism for Regulating Cadherin Turnover. *J Biol Chem.*, 276(15), 12301-12309.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2005). Tricellulin Constitutes a Novel Barrier at Tricellular Contacts of Epithelial Cells. *J Cell Biol.*, 171(6), 939-945.
- Ilhan, Z. E., DiBaise, J. K., Dautel, S. E., Isern, N. G., Kim, Y.-M., Hoyt, D. W., Schepmoes, A. A., Brewer, H. M., Weitz, K. K., Metz, T. O., Crowell, M. D., Kang, D.-W., Rittmann, B. D., & Krajmalnik-Brown, R. (2020). Temporospatial Shifts in the Human Gut Microbiome and Metabolome After Gastric Bypass Surgery. *NPJ Biofilms and Microbiomes.*, 6(1), 1-12.
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.-K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Ruth, T. Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2006). Regulation of Antibacterial Defense in the Small Intestine by the Nuclear Bile Acid Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(10), 3920-3925.
- Ise, I., Tanaka, N., Imoto, H., Maekawa, M., Kohyama, A., Watanabe, K., Motoi, F., Unno, M., & Naitoh, T. (2019). Changes in Enterohepatic Circulation after Duodenal–Jejunal Bypass and Reabsorption of Bile Acids in the Bilio-Pancreatic Limb. *Obes Surg.*, 29(6), 1901-1910.
- Jennis, M., Cavanaugh, C., Leo, G., Mabus, J., Lenhard, J., & Hornby, P. (2018). Microbiota-Derived Tryptophan Indoles Increase After Gastric Bypass Surgery and Reduce Intestinal Permeability in Vitro and in Vivo. *Neurogastroenterol Motil.*, 30(2).
- Jiménez, A., Casamitjana, R., Flores, L., Delgado, S., Lacy, A., & Vidal, J. (2013). GLP-1 and the Long-Term Outcome of Type 2 Diabetes Mellitus After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in Morbidly Obese Subjects. *Ann Surg.*, 257(5), 894-899.
- Jin, Z., Chen, K., Zhou, Z., Peng, W., & Liu, W. (2021). Roux-En-Y Gastric Bypass Potentially Improved Intestinal Permeability by Regulating Gut Innate Immunity in Diet-Induced Obese Mice. *Sci Rep.*, 11(1), 14894.
- Kalbitzer, H. R. (2014). Proteine-Analytische Untersuchungsmethoden, Synthese und Isolierung. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie.* (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., & Fujino, M. (2003). A G Protein-Coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *J Biol Chem.*, 278(11), 9435-9440.
- Kindel, T. L., Yoder, S. M., Seeley, R. J., D'Alessio, D. A., & Tso, P. (2009). Duodenal-jejunal Exclusion Improves Glucose Tolerance in the Diabetic, Goto-Kakizaki

- Rat by a GLP-1 Receptor-Mediated Mechanism. *J Gastrointest Surg.*, 13(10), 1762-1772.
- Kir, S., Beddow, S. A., Samuel, V. T., Miller, P., Previs, S. F., Suino-Powell, K., Xu, H. E., Shulman, G. I., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2011). FGF19 as a Postprandial, Insulin-Independent Activator of Hepatic Protein and Glycogen Synthesis. *Science.*, 331(6024), 1621-1624.
- Klein, S., Allison, D. B., Heymsfield, S. B., Kelley, D. E., Leibel, R. L., Nonas, C., & Kahn, R. (2007). Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: A Consensus Statement From Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; Naaso, the Obesity Society; The American Society for Nutrition; And the American Diabetes Association. *Am J Clin Nutr.*, 85(5), 1197-1202.
- Korner, J., Bessler, M., Inabnet, W., Taveras, C., & Holst, J. J. (2007). Exaggerated Glucagon-Like Peptide-1 and Blunted Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Secretion Are Associated With Roux-en-Y Gastric Bypass but Not Adjustable Gastric Banding. *Surg Obes Relat Dis.*, 3(6), 597-601.
- Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (2013). Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 116, 95-118.
- Laferrère, B., Heshka, S., Wang, K., Khan, Y., McGinty, J., Teixeira, J., Hart, A. B., & Olivan, B. (2007). Incretin Levels and Effect Are Markedly Enhanced 1 Month After Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery in Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.*, 30(7), 1709-1716.
- Laferrère, B., Teixeira, J., McGinty, J., Tran, H., Egger, J. R., Colarusso, A., Kovack, B., Bawa, B., Koshy, N., Lee, H., Yapp, K., & Olivan, B. (2008). Effect of Weight Loss by Gastric Bypass Surgery Versus Hypocaloric Diet on Glucose and Incretin Levels in Patients With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.*, 93(7), 2479-2485.
- Lajczak-McGinley, N. K., Porru, E., Fallon, C. M., Smyth, J., Curley, C., McCarron, P. A., Tambuwala, M. M., Roda, A., & Keely, S. J. (2020). The Secondary Bile Acids, Ursodeoxycholic Acid and Lithocholic Acid, Protect Against Intestinal Inflammation by Inhibition of Epithelial Apoptosis. *Physiol Rep.*, 8(12).
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., Dermody, T. S., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2007). JAM-A Regulates Permeability and Inflammation in the Intestine in Vivo. *J Exp Med.*, 204(13), 3067-3076.
- le Roux, C. W., Aylwin, S. J., Batterham, R. L., Borg, C. M., Coyle, F., Prasad, V., Shurey, S., Ghatei, M. A., Patel, A. G., & Bloom, S. R. (2006). Gut Hormone Profiles Following Bariatric Surgery Favor an Anorectic State, Facilitate Weight Loss, and Improve Metabolic Parameters. *Ann Surg.*, 243(1), 108-114.
- Le Roux, C. W., Bueter, M., Theis, N., Werling, M., Ashrafian, H., Löwenstein, C., Athanasiou, T., Bloom, S. R., Spector, A. C., Olbers, T., & Lutz, T. A. (2011). Gastric Bypass Reduces Fat Intake and Preference. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 301(4).
- le Roux, C. W., Welbourn, R., Werling, M., Osborne, A., Kokkinos, A., Laurenus, A., Lönroth, H., Fändriks, L., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., & Olbers, T. (2007). Gut Hormones as Mediators of Appetite and Weight Loss After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Ann Surg.*, 246(5), 780-785.
- Lea, T. (2015a). Caco-2 Cell Line. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. (pp. 103-111). Springer International Publishing.
- Lea, T. (2015b). Epithelial Cell Models; General Introduction. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka,

- & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer International Publishing.
- León-Pedroza, J. I., González-Tapia, L. A., del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., & González-Chávez, A. (2015). Low-Grade Systemic Inflammation and the Development of Metabolic Diseases: From the Molecular Evidence to the Clinical Practice. *Cir Cir.*, *83*(6), 543-551.
- Li, J. V., Ashrafiyan, H., Bueter, M., Kinross, J., Sands, C., le Roux, C. W., Bloom, S. R., Darzi, A., Athanasiou, T., Marchesi, J. R., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (2011). Metabolic Surgery Profoundly Influences Gut Microbial–Host Metabolic Cross-Talk. *Gut.*, *60*(9), 1214-1223.
- Li, J. V., Ashrafiyan, H., Sarafian, M., Homola, D., Rushton, L., Barker, G., Cabrera, P. M., Lewis, M. R., Darzi, A., Lin, E., Gletsu-Miller, N. A., Atkin, S. L., Sathyapalan, T., Gooderham, N. J., Nicholson, J. K., Marchesi, J. R., Thanos, A., & Holmes, E. (2021). Roux-En-Y Gastric Bypass-Induced Bacterial Perturbation Contributes to Altered Host-Bacterial Co-metabolic Phenotype. *Microbiome.*, *9*(1), 1-15.
- Li, K., Zou, J., Li, S., Guo, J., Shi, W., Wang, B., Han, X., Zhang, H., Zhang, P., Miao, Z., & Li, Y. (2020). Farnesoid X Receptor Contributes to Body Weight-Independent Improvements in Glycemic Control After Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery in Diet-Induced Obese Mice. *Mol Metab.*, *37*, 100980.
- Liou, A. P., Paziuk, M., Luevano, J.-M., Machineni, S., Turnbaugh, P. J., & Kaplan, L. M. (2013). Conserved Shifts in the Gut Microbiota Due to Gastric Bypass Reduce Host Weight and Adiposity. *Sci Transl Med.*, *5*(178).
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Reaves, T. A., Walsh, S., Pochet, M., & Parkos, C. A. (2000). Human Junction Adhesion Molecule Regulates Tight Junction Resealing in Epithelia. *J Cell Sci.*, *113*(13), 2363-2374.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT Method. *Methods.*, *25*(4), 402-408.
- Löffler, G. (2014). Integration und hormonelle Regulation des Energiestoffwechsels. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie*. (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Löffler, G., & Mössner, J. (2014). Gastrointestinaltrakt. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie*. (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Lozano, E., Betson, M., & Braga, V. M. (2003). Tumor Progression: Small GTPases and Loss of Cell–Cell Adhesion. *Bioessays.*, *25*(5), 452-463.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine.*, *42*(2), 145-151.
- Lu, Z., Ding, L., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2013). Claudins in Intestines: Distribution and Functional Significance in Health and Diseases. *Tissue Barriers.*, *1*(3).
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie* Georg Thieme Verlag.
- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., & Shan, B. (1999). Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science.*, *284*(5418), 1362-1365.
- Markov, A. G., Veshnyakova, A., Fromm, M., Amasheh, M., & Amasheh, S. (2010). Segmental Expression of Claudin Proteins Correlates With Tight Junction Barrier Properties in Rat Intestine. *J Comp Physiol B.*, *180*(4), 591-598.
- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., & Dejana, E. (1998). Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *J Cell Biol.*, *142*(1), 117-127.

- Mason, E. E., & Ito, C. (1969). Gastric Bypass. *Ann Surg.*, *170*(3), 329-339.
- Meijer, K., de Vos, P., & Priebe, M. G. (2010). Butyrate and Other Short-Chain Fatty Acids as Modulators of Immunity: What Relevance for Health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, *13*(6), 715-721.
- Meir, M., Burkard, N., Ungewiß, H., Diefenbacher, M., Flemming, S., Kannapin, F., Germer, C.-T., Schweinlin, M., Metzger, M., Waschke, J., & Schlegel, N. (2019). Neurotrophic Factor GDNF Regulates Intestinal Barrier Function in Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Invest.*, *129*(7), 2824-2840.
- Meir, M., Kannapin, F., Diefenbacher, M., Ghoreishi, Y., Kollmann, C., Flemming, S., Germer, C.-T., Waschke, J., Leven, P., Schneider, R., Wehner, S., Burkard, N., & Schlegel, N. (2021). Intestinal Epithelial Barrier Maturation by Enteric Glial Cells Is GDNF-Dependent. *Int J Mol Sci.*, *22*(4), 1887.
- Meir, M., Salm, J., Fey, C., Schweinlin, M., Kollmann, C., Kannapin, F., Germer, C. T., Waschke, J., Beck, C., Burkard, N., Metzger, M., & Schlegel, N. (2020). Enteroids Generated From Patients With Severe Inflammation in Crohn's Disease Maintain Alterations of Junctional Proteins. *J Crohns Colitis.*, *14*(10), 1473-1487.
- Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, *1*(6).
- Monte, S. V., Caruana, J. A., Ghanim, H., Sia, C. L., Korzeniewski, K., Schentag, J. J., & Dandona, P. (2012). Reduction in Endotoxemia, Oxidative and Inflammatory Stress, and Insulin Resistance After Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery in Patients With Morbid Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Surgery.*, *151*(4), 587-593.
- Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio Mdo, C., & Alfenas Rde, C. (2012). Influence of a High-Fat Diet on Gut Microbiota, Intestinal Permeability and Metabolic Endotoxaemia. *Br J Nutr.*, *108*(5), 801-809.
- Mülhardt, C. (2013). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. Springer Spektrum
- Müller-Newen, G., & Petrides, P. E. (2014). Blut-Bestandteile und Blutplasma In *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie*. (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Nakanishi, H., & Takai, Y. (2004). Roles of Nectins in Cell Adhesion, Migration and Polarization. *J Biol Chem.*, *385*(10), 885-892.
- Natividad, J. M., Agus, A., Planchais, J., Lamas, B., Jarry, A. C., Martin, R., Michel, M.-L., Chong-Nguyen, C., Roussel, R., Straube, M., Jegou, S., McQuitty, C., Le Gall, M., & da Costa, G. (2018). Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab.*, *28*(5), 737-749.
- Nauck, M. A., Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, P., Ebert, R., & Creutzfeldt, W. (1986). Incretin Effects of Increasing Glucose Loads in Man Calculated From Venous Insulin and C-Peptide Responses. *J Clin Endocrinol Metab.*, *63*(2), 492-498.
- Neary, N. M., Small, C. J., Druce, M. R., Park, A. J., Ellis, S. M., Semjonous, N. M., Dakin, C. L., Filipsson, K., Wang, F., Kent, A. S., Frost, G. S., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (2005). Peptide YY3–36 and Glucagon-Like Peptide-17–36 Inhibit Food Intake Additively. *Endocrinology.*, *146*(12), 5120-5127.
- Neish, A. S. (2009). Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology.*, *136*(1), 65-80.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisie, C. L., Galmiche, J. P., & Jarry, A. (2003). Human ENS Regulates the Intestinal Epithelial Barrier Permeability and a Tight Junction-Associated Protein ZO-1 via VIPergic Pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, *285*(5).
- Nguyen, N. T., Vu, S., Kim, E., Bodunova, N., & Phelan, M. J. (2016). Trends in Utilization of Bariatric Surgery, 2009–2012. *Surg Endosc.*, *30*(7), 2723-2727.

- Niessen, C. M., & Gottardi, C. J. (2008). Molecular Components of the Adherens Junction. *Biochim Biophys Acta.*, 1778(3), 562-571.
- Ogden, C. L., Yanovski, S. Z., Carroll, M. D., & Flegal, K. M. (2007). The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterology.*, 132(6), 2087-2102.
- Oliván, B., Teixeira, J., Bose, M., Bawa, B., Chang, T., Summe, H., Lee, H., & Laferrère, B. (2009). Effect of Weight Loss by Diet or Gastric Bypass Surgery on Peptide YY3–36 Levels. *Ann Surg.*, 249(6), 948.
- Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biol.*, 30(10), 805-817.
- Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M., & Ikura, M. (1995). Solution Structure of the Epithelial Cadherin Domain Responsible for Selective Cell Adhesion. *Science.*, 267(5196), 386-389.
- Ozawa, M., Baribault, H., & Kemler, R. (1989). The Cytoplasmic Domain of the Cell Adhesion Molecule Uvomorulin Associates With Three Independent Proteins Structurally Related in Different Species. *EMBO J.*, 8(6), 1711-1717.
- Padwal, R., Klarenbach, S., Wiebe, N., Birch, D., Karmali, S., Manns, B., Hazel, M., Sharma, A., & Tonelli, M. (2011). Bariatric Surgery: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Trials. *Obes Rev.*, 12(8), 602-621.
- Panunzi, S., De Gaetano, A., Carnicelli, A., & Mingrone, G. (2015). Predictors of Remission of Diabetes Mellitus in Severely Obese Individuals Undergoing Bariatric Surgery: Do BMI or Procedure Choice Matter? A Meta-Analysis. *Ann Surg.*, 261(3), 459-467.
- Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel, J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D., & Lehmann, J. M. (1999). Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science.*, 284(5418), 1365-1368.
- Pendyala, S., Walker, J. M., & Holt, P. R. (2012). A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology.*, 142(5), 1100-1101.
- Peng, L., Li, Z.-R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J Nutr.*, 139(9), 1619-1625.
- Pizzuti, D., Bortolami, M., Mazzon, E., Buda, A., Guariso, G., D'Odorico, A., Chiarelli, S., D'Inca, R., De Lazzari, F., & Martines, D. (2004). Transcriptional Downregulation of Tight Junction Protein ZO-1 in Active Coeliac Disease Is Reversed After a Gluten-Free Diet. *Dig Liver Dis.*, 36(5), 337-341.
- Pories, W. J., Swanson, M. S., MacDonald, K. G., Long, S. B., Morris, P. G., Brown, B. M., Barakat, H. A., DeRamon, R. A., Israel, G., & Dolezal, J. M. (1995). Who Would Have Thought It? An Operation Proves to Be the Most Effective Therapy for Adult-Onset Diabetes Mellitus. *Ann Surg.*, 222(3), 339-350.
- Potthoff, M. J., Boney-Montoya, J., Choi, M., He, T., Sunny, N. E., Satapati, S., Suino-Powell, K., Xu, H. E., Gerard, R. D., Finck, B. N., Burgess, S., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2011). FGR15/19 Regulates Hepatic Glucose Metabolism by Inhibiting the CREB-PGC-1 α Pathway. *Cell Metab.*, 13(6), 729-738.
- Pouliot, M.-C., Després, J.-P., Lemieux, S., Moorjani, S., Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., & Lupien, P. J. (1994). Waist Circumference and Abdominal Sagittal Diameter: Best Simple Anthropometric Indexes of Abdominal Visceral Adipose Tissue Accumulation and Related Cardiovascular Risk in Men and Women. *Am J Cardiol.*, 73(7), 460-468.
- Pournaras, D. J., Glicksman, C., Vincent, R. P., Kuganlipava, S., Alaghband-Zadeh, J., Mahon, D., Bekker, J. H., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Walters, J. R., Welbourn, R., & le Roux, C. W. (2012). The Role of Bile After Roux-En-Y Gastric Bypass in

- Promoting Weight Loss and Improving Glycaemic Control. *Endocrinology.*, 153(8), 3613-3619.
- Pourmaras, D. J., Osborne, A., Hawkins, S. C., Vincent, R. P., Mahon, D., Ewings, P., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Welbourn, R., & le Roux, C. W. (2010). Remission of Type 2 Diabetes After Gastric Bypass and Banding: Mechanisms and 2 Year Outcomes. *Ann Surg.*, 252(6), 966-971.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T., & Collins, J. E. (2005). Inflammatory Processes Have Differential Effects on Claudins 2, 3 and 4 in Colonic Epithelial Cells. *Lab Invest.*, 85(9), 1139-1162.
- Pussinen, P. J., Havulinna, A. S., Lehto, M., Sundvall, J., & Salomaa, V. (2011). Endotoxemia Is Associated With an Increased Risk of Incident Diabetes. *Diabetes Care.*, 34(2), 392-397.
- Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J., & Zhang, Z. (1994). Identification of a New Catenin: The Tyrosine Kinase Substrate p120cas Associates With E-cadherin Complexes. *Mol Cell Biol.*, 14(12), 8333-8342.
- Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D., & Morrow, J. S. (1995). Alpha 1 (E)-catenin is an actin-binding and-bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(19), 8813-8817.
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2014). Identification Methods | Real-Time PCR. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 2, pp. 344-350). Academic Press.
- Rogler, G., & Andus, T. (1998). Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World J Surg.*, 22(4), 382-389.
- Rubino, F., Shukla, A., Pomp, A., Moreira, M., Ahn, S. M., & Dakin, G. (2014). Bariatric, Metabolic, and Diabetes Surgery: What's in a Name? *Ann Surg.*, 259(1), 117-122.
- Rühl, A. (2005). Glial Cells in the Gut. *Neurogastroenterol Motil.*, 17(6), 777-790.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science.*, 230(4732), 1350-1354.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (1998). Occludin-Deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate Into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. *J Cell Biol.*, 141(2), 397-408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol Biol Cell.*, 11(12), 4131-4142.
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The Intestinal Barrier Function and Its Involvement in Digestive Disease. *Rev Esp Enferm Dig.*, 107(11), 686-696.
- Savassi-Rocha, A. L., Diniz, M. T., Vilela, E. G., Diniz Mde, F., Sanches, S. R., da Cunha, A. S., Ferrari Mde, L., Torres, H. O., Maciente, B. A., Ataliba, G. S., Araújo, P. M., Guerra, T. B., & Balbino, I. K. (2014). Changes in Intestinal Permeability After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Obes Surg.*, 24(2), 184-190.
- Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., & Bäckhed, F. (2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-Beta-Muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab.*, 17(2), 225-235.
- Schienkiewitz, A., Mensink, G., & Kuhnert, R. (2017). Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. *Journal of Health Monitoring.*, 2(2).

- Schlegel, N., Boerner, K., & Waschke, J. (2021). Targeting Desmosomal Adhesion and Signalling for Intestinal Barrier Stabilization in Inflammatory Bowel Diseases—Lessons From Experimental Models and Patients. *Acta Physiol (Oxf)*, 231(1).
- Schlegel, N., Meir, M., Heupel, W. M., Holthöfer, B., Leube, R. E., & Waschke, J. (2010). Desmoglein 2-Mediated Adhesion Is Required for Intestinal Epithelial Barrier Integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298(5).
- Schulzke, J. D., Bojarski, C., Zeissig, S., Heller, F., Gitter, A. H., & Fromm, M. (2006). Disrupted Barrier Function Through Epithelial Cell Apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1072, 288-299.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*, 14(8).
- Seyfried, F., Phetcharaburanin, J., Glymenaki, M., Nordbeck, A., Hankir, M., Nicholson, J. K., Holmes, E., Marchesi, J. R., & Li, J. V. (2021). Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery in Zucker Rats Induces Bacterial and Systemic Metabolic Changes Independent of Caloric Restriction-Induced Weight Loss. *Gut Microbes*, 13(1), 1-20.
- Shen, L., & Turner, J. R. (2006). Role of Epithelial Cells in Initiation and Propagation of Intestinal Inflammation. Eliminating the Static: Tight Junction Dynamics Exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(4).
- Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Tsunoda, K., Amagai, M., & Nishikawa, T. (2004). IgG Binds to Desmoglein 3 in Desmosomes and Causes a Desmosomal Split Without Keratin Retraction in a Pemphigus Mouse Model. *J Invest Dermatol*, 122(5), 1145-1153.
- Sloth, B., Holst, J. J., Flint, A., Gregersen, N. T., & Astrup, A. (2007). Effects of PYY1–36 and PYY3–36 on Appetite, Energy Intake, Energy Expenditure, Glucose and Fat Metabolism in Obese and Lean Subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(4).
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Staiger, H., Stefan, N., Kellerer, M., & Häring, H.-U. (2014). Insulin-das wichtigste anabole Hormon In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides. Biochemie und Pathobiochemie*. (Vol. 9.). Springer-Verlag.
- Steed, E., Rodrigues, N. T., Balda, M. S., & Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a Tight Junction-Associated Transmembrane Protein of the Occludin Family. *BMC Cell Biol*, 10(95).
- Steensels, S., Lannoo, M., Avau, B., Laermans, J., Vancleef, L., Farré, R., Verbeke, K., & Depoortere, I. (2017). The Role of Nutrient Sensing in the Metabolic Changes After Gastric Bypass Surgery. *J Endocrinol*, 232(3), 363-376.
- Sternini, C., Anselmi, L., & Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine Cells: A Site of ‘Taste’ in Gastrointestinal Chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 15(1), 73-78.
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J. L., & Rutgeerts, P. (2002). Anti-tumor Necrosis Factor Treatment Restores the Gut Barrier in Crohn’s Disease. *Am J Gastroenterol*, 97(8), 2000-2004.
- Szulcek, R., Bogaard, H. J., & van Nieuw Amerongen, G. P. (2014). Electric Cell-Substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility. *J Vis Exp*(85).
- Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., & Ikeda, W. (2003). Nectins and Nectin-Like Molecules: Roles in Cell Adhesion, Migration, and Polarization. *Cancer Sci*, 94(8), 655-667.

- Takeichi, M. (1988). The Cadherins: Cell-Cell Adhesion Molecules Controlling Animal Morphogenesis. *Development.*, 102(4), 639-655.
- Targan, S. R., Hanauer, S. B., van Deventer, S. J., Mayer, L., Present, D. H., Braakman, T., DeWoody, K. L., Schaible, T. F., & Rutgeerts, P. J. (1997). A Short-Term Study of Chimeric Monoclonal Antibody cA2 to Tumor Necrosis Factor Alpha for Crohn's Disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med.*, 337(15), 1029-1035.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory Properties of the Short-Chain Fatty Acids Acetate and Propionate: A Study With Relevance to Inflammatory Bowel Disease. *World J Gastroenterol.*, 13(20), 2826-2832.
- Teixeira, T. F., Souza, N. C., Chiarello, P. G., Franceschini, S. C., Bressan, J., Ferreira, C. L., & Maria do Carmo, G. P. (2012). Intestinal Permeability Parameters in Obese Patients Are Correlated With Metabolic Syndrome Risk Factors. *Clin Nutr.*, 31(5), 735-740.
- Todd, J., & Bloom, S. (2007). Incretins and Other Peptides in the Treatment of Diabetes. *Diabet Med.*, 24(3), 223-232.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(9), 4350-4354.
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional Interactions Between the Gut Microbiota and Host Metabolism. *Nature.*, 489(7415), 242-249.
- Tremaroli, V., Karlsson, F., Werling, M., Ståhlman, M., Kovatcheva-Datchary, P., Olbers, T., Fändriks, L., le Roux, C. W., Nielsen, J., & Bäckhed, F. (2015). Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab.*, 22(2), 228-238.
- Trøseid, M., Nestvold, T. K., Rudi, K., Thoresen, H., Nielsen, E. W., & Lappegård, K. T. (2013). Plasma Lipopolysaccharide Is Closely Associated With Glycemic Control and Abdominal Obesity: Evidence From Bariatric Surgery. *Diabetes Care.*, 36(11), 3627-3632.
- Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, P. A., Devanarayan, V., Ravussin, E., & Heiman, M. L. (2001). Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. *Diabetes.*, 50(4), 707-709.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., & Henrissat, B. (2009). A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. *Nature.*, 457(7228), 480-484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An Obesity-Associated Gut Microbiome With Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature.*, 444(7122), 1027-1031.
- Turner, J. R. (2009). Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease. *Nat Rev Immunol.*, 9(11), 799-809.
- Utech, M., Mennigen, R., & Brewer, M. (2010). Endocytosis and Recycling of Tight Junction Proteins in Inflammation. *J Biomed Biotechnol.*, 2010.
- Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benechet, A. P., Qiu, Z., Maher, L., Redinbo, M. R., Phillips, R. S., & Fleet, J. C. (2014). Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-Like Receptor 4. *Immunity.*, 41(2), 296-310.
- Wallis, S., Lloyd, S., Wise, I., Ireland, G., Fleming, T. P., & Garrod, D. (2000). The α Isoform of Protein Kinase C Is Involved in Signaling the Response of Desmosomes to Wounding in Cultured Epithelial Cells. *Mol Biol Cell.*, 11(3), 1077-1092.

- Wang, G., Wang, Q., Bai, J., Zhao, N., Wang, Y., Zhou, R., Kong, W., Zeng, T., Tao, K., Wang, G., & Xia, Z. (2020). Upregulation of Intestinal nlrp6 Inflammasomes After Roux-en-Y Gastric Bypass Promotes Gut Immune Homeostasis. *Obes Surg.*, *30*(1), 327-335.
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., & Liu, S.-J. (2019). Parabacteroides Distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Rep.*, *26*(1), 222-235.
- Wang, W., Cheng, Z., Wang, Y., Dai, Y., Zhang, X., & Hu, S. (2019). Role of Bile Acids in Bariatric Surgery. *Front Physiol.*, *10*, 374.
- Wittgrove, A. C., Clark, G. W., & Tremblay, L. J. (1994). Laparoscopic Gastric Bypass, Roux-en-Y: Preliminary Report of Five Cases. *Obes Surg.*, *4*(4), 353-357.
- Wong, V., & Gumbiner, B. M. (1997). A Synthetic Peptide Corresponding to the Extracellular Domain of Occludin Perturbs the Tight Junction Permeability Barrier. *J Cell Biol.*, *136*(2), 399-409.
- World Health Organization. (2000). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. World Health Organisation. Technical Report Series 894.
- World Health Organization. (2021, 09.07.21). *Obesity and Overweight*. Retrieved 16.12.2021 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Wu, J., Zhang, P.-B., Ren, Z.-Q., Zhou, F., Hu, H.-H., Zhang, H., Xue, K.-K., Xu, P., & Shao, X.-Q. (2019). Changes of Serum Lipopolysaccharide, Inflammatory Factors, and Cecal Microbiota in Obese Rats With Type 2 Diabetes Induced by Roux-En-Y Gastric Bypass. *Nutrition.*, *67*, 110565.
- Yang, P.-J., Lee, W.-J., Tseng, P.-H., Lee, P.-H., Lin, M.-T., & Yang, W.-S. (2014). Bariatric Surgery Decreased the Serum Level of an Endotoxin-Associated Marker: Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Surg Obes Relat Dis.*, *10*(6), 1182-1187.
- Yokoyama, S., Tachibana, K., Nakanishi, H., Yamamoto, Y., Irie, K., Mandai, K., Nagafuchi, A., Monden, M., & Takai, Y. (2001). A-Catenin-Independent Recruitment of ZO-1 to Nectin-Based Cell-Cell Adhesion Sites Through Afadin. *Mol Biol Cell.*, *12*(6), 1595-1609.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2007). Changes in Expression and Distribution of Claudin 2, 5 and 8 Lead To Discontinuous Tight Junctions and Barrier Dysfunction in Active Crohn's Disease. *Gut.*, *56*(1), 61-72.
- Zhang, C., Yan, J., Xiao, Y., Shen, Y., Wang, J., Ge, W., & Chen, Y. (2017). Inhibition of Autophagic Degradation Process Contributes to Claudin-2 Expression Increase and Epithelial Tight Junction Dysfunction in TNF- α Treated Cell Monolayers. *Int J Mol Sci.*, *18*(1), 157.
- Zhang, Y., Lee, F. Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F. J., Willson, T. M., & Edwards, P. A. (2006). Activation of the Nuclear Receptor FXR Improves Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Diabetic Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *103*(4), 1006-1011.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the Curve
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BSA	Rinder-Serum-Albumin
Ca ²⁺	Kalzium
CDCA	Chenodesoxycholsäure
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
C _T	Cycle of Threshold
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ENS	Enterisches Nervensystem
Fc	Fold change
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIP	Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-1	Glucagon like Peptide 1
IEB	Intestinale epitheliale Barriere
IL	Interleukin
IPA	Indol-3-Propionsäure
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
P _E	Permeabilitätskoeffizient

PYY	Peptid Tyrosin-Tyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
RYGB	Roux-en-Y Magenbypass
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGR5	G-Protein-gekoppelter Gallensäurenrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization
ZO	Zonula Occludens

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gewichtsverteilung der Bevölkerung Deutschlands	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anatomie des oberen Gastrointestinaltrakts vor und nach der Anlage eines RYGB	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Schlussleistenkomplexes	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Occludenskontakts	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Adhärenskontakts	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Desmosoms	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls	35
Abbildung 8: Schematische Darstellung über die Gewinnung der Gewebelysate und deren Verwendung	43
Abbildung 9: Schematische Darstellung über die Gewinnung des Darminhalts und dessen Verwendung	45
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Transwellassays	47
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Nassblotverfahrens	51
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Polymerasekettenreaktion	56
Abbildung 13: Proteinmenge von Claudin 1 im Intestinum von schein- und RYGB- operierten Ratten	62
Abbildung 14: Proteinmenge von Claudin 2 im Intestinum von schein- und RYGB- operierten Ratten	63
Abbildung 15: Proteinmenge von Claudin 3 im Intestinum von schein- und RYGB- operierten Ratten	64
Abbildung 16: Proteinmenge von Claudin 4 im Intestinum von schein- und RYGB- operierten Ratten	65
Abbildung 17: Darstellung des Permeabilitätskoeffizienten im Transwellfilterversuch	69
Abbildung 18: Darstellung der kontinuierlichen Messung des TEER	72
Abbildung 19: Proteinmenge von Claudin 1 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	75
Abbildung 20: Proteinmenge von Claudin 2 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	76
Abbildung 21: Proteinmenge von Claudin 3 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	77

Abbildung 22: Proteinmenge von Claudin 4 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	78
Abbildung 23: Proteinmenge von Occludin in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt von schein-operierten bzw. RYGB- operierten Ratten	79
Abbildung 24: Proteinmenge von E-Cadherin in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	80
Abbildung 25: Proteinmenge von Desmoglein 2 in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	81
Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der RT-qPCR	85

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Adipositas bei Erwachsenen gemäß dem BMI	3
Tabelle 2: Zellkulturreagenzien	37
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Rezepturen	39
Tabelle 4: Primer Sequenzen	40
Tabelle 5: Primärantikörper	41
Tabelle 6: Sekundärantikörper	41
Tabelle 7: Mastermix Reverse Transkription	54
Tabelle 8: Thermocycler Konditionen	55
Tabelle 9: Mastermix RT-qPCR	57
Tabelle 10: Einstellung PCR-Zyklen	58
Tabelle 11: Vergleich der Proteinmengen ausgewählter Transmembranproteine der Occludenskontakte in den Vollwandresektaten schein-operierter bzw. RYGB-operierter Ratten	66
Tabelle 12: Gegenüberstellung der Permeabilitätskoeffizienten zum Zeitpunkt 60 Minuten	70
Tabelle 13: Darstellung der AUC der Widerstandsmessungen an Caco2-Zellen	73
Tabelle 14: Proteinmengenveränderung ausgewählter Proteine der Occludenskontakte, Adhärenskontakte und Desmosomen in Caco2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit gepooltem Darminhalt	82
Tabelle 15: Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse der Western Blot Analysen	87

IV. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben, indem sie mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn Professor Nicolas Schlegel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in der experimentellen Viszeralchirurgie durchzuführen sowie für sein Vertrauen und die Unterstützung, die er mir in jeder Phase dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Dr. rer. nat. Mohamed Hankir gebührt mein größter Dank für die stete fachliche und menschliche Betreuung. In unzähligen Stunden hat er mich in die Methodik eingeführt, mich unterstützt und motiviert, wenn etwas nicht gleich auf Anhieb funktioniert hat. Auf seinen kompetenten Rat konnte ich zu jeder Zeit zählen. Ohne seine Anleitung, Ideen und Unterstützung wäre das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mich herzlich aufgenommen haben und mir bei Fragen mit viel Geduld und vor allem Expertise zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Fassnacht für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke meinen Eltern, meiner Schwester und Simon, dafür dass sie immer und in allen Lebenslagen für mich da sind. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung wären weder mein Studium noch diese Dissertation möglich gewesen.