

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
- Institut für Klinische Physiologie - Campus Benjamin Franklin,
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Escherichia coli α -Hämolysin - ein
Entzündungsmediator bei Colitis ulcerosa

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Emanuel Schulz
aus Paderborn

Datum der Promotion: 4. September 2015

Meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABSTRAKT	6
1.1	Deutsch	6
1.2	English	8
2	EINLEITUNG	10
2.1	Die Mikrobiota des menschlichen Darms	10
2.1.1	<i>Escherichia coli</i>	11
2.1.1.1	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.2	α -Hämolyisin	13
2.1.2.1	Pathologische Eigenschaften des HlyA	13
2.1.2.2	RTX-Proteine	16
2.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	17
2.2.1	Colitis ulcerosa	18
2.2.2	Morbus Crohn	19
2.2.3	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und intestinale Mikrobiota ..	19
2.3	Fragestellung der Arbeit	22
3	METHODIK	23
3.1	Nachweis von α-Hämolyisin im humanen Kolon	23
3.1.1	Entnahme humaner Kolon-Biopsien	23
3.1.2	Bakterienkultur	24
3.1.3	DNS-Präparation	25
3.1.4	Primer-Entwicklung	26
3.1.5	PCR und Agarosegel-Elektrophorese	26
3.1.6	<i>hlyA</i> -Messung mittels qPCR	27
3.2	α-Hämolyisin <i>in vivo</i> Versuche	29
3.2.1	Mausmodell	29
3.2.2	Elektrophysiologische Untersuchungen des Darms in Ussing-Kammern	30
3.2.3	Impedanzspektroskopie	33
3.2.4	Bestimmung der epithelialen HRP-Transzytoserate	33
3.2.5	Klinischer Kolitis-Score	34
3.2.6	Histopathologie	36
3.2.7	Immunofluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	38

3.2.8	Bestimmung epithelialer Apoptose	39
3.3	α-Hämolyisin <i>in vitro</i> Versuche	39
3.3.1	Kolonepithelmodell HT-29/B6 auf Zellkulturfiltern.....	39
3.3.2	Messung des transepithelialen Widerstands	40
3.4	Allgemeines	40
3.4.1	Richtlinien	40
3.4.2	Statistik	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Bakterien am humanen Kolon	42
4.1.1	Bakterienkultur	42
4.1.2	Primer-Auswahl.....	46
4.1.3	<i>HlyA</i> -Messung.....	48
4.2	α-Hämolyisin <i>in vivo</i> Versuche	50
4.2.1	Klinische Symptomatik im Mausversuch.....	50
4.2.2	Histopathologie	52
4.2.3	Elektrophysiologische Messungen und HRP-Flux	54
4.2.4	Bestimmung des intrazellulären HRP	58
4.2.5	Bestimmung epithelialer Apoptose	58
4.2.6	Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie	60
4.2.7	Berechnung der <i>Focal Leak</i> -Fläche.....	62
4.3	α-Hämolyisin <i>in vitro</i> Versuche	65
4.3.1	Hemmung von α -Hämolyisin im Zellmodell mittels Zink	65
5	DISKUSSION	67
5.1	Mukosa-assoziierte Bakterien bei Colitis ulcerosa.....	67
5.2	Erhöhte Prävalenz von <i>HlyA</i> bei CED	69
5.3	<i>HlyA</i> vom EHEC- und vom UPEC-Typ.....	70
5.4	Fokale Läsionen	71
5.5	Epithelialer Barrieredefekt durch <i>E. coli HlyA</i>.....	72
5.6	Entzündungsmodelle.....	73
5.6.1	Intestinale Entzündung und Mikrobiota.....	74
5.7	Ausblick	75
6	ZUSAMMENFASSUNG	78

7	LITERATURVERZEICHNIS	80
8	ANHANG.....	89
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	89
8.2	Eidesstattliche Versicherung.....	91
8.3	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen.....	92
8.4	Patientenaufklärungsbogen	93
8.5	Einverständniserklärung	95
8.6	Lebenslauf	97
8.7	Danksagung.....	99

1 ABSTRAKT

1.1 Deutsch

Einleitung Der Zusammenhang von veränderten intestinalen Mikrobiota und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wird seit langem diskutiert. Neben einer verringerten bakteriellen Diversität konnte auch die Zunahme einzelner Bakteriengruppen diesen Erkrankungen zugeordnet werden. Die Rolle einer möglicherweise kolitogenen Mikrobiota ist in diesem Zusammenhang jedoch weiter unklar. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass α -Hämolysin (HlyA)-produzierende *Escherichia coli* (*E. coli*) an einem Enterozytenzellmodell Läsionen, so genannte *Focal Leaks*, induzieren können. Daher sollte in dieser Arbeit eine intestinale Kolonisation mit HlyA-produzierenden Bakterien in einem *in vivo* Modell untersucht und ihr möglicher Einfluss auf CED geprüft werden.

Methoden Mukosa-assoziierte, Mukus-assoziierte und intraepitheliale Bakterien, die aus Kolonbiopsien von Patienten mit CED und Darmgesunden gewonnen wurden, wurden mittels Bakterienkultur untersucht. In der quantitativen real-time PCR (qPCR) wurde kulturunabhängig die Konzentration HlyA-produzierender Bakterien bestimmt. In Kolonisationsversuchen wurde an Wildtyp-, Interleukin-10-defizienten und monoassoziierten Mäusen der Effekt HlyA-produzierender *E. coli* 536 und HlyA-defizienter *E. coli* 536 Mutanten (HDM) untersucht. Die Auswirkungen der Kolonisation wurden in klinischen, histopathologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen erfasst. Die Darstellung von *Focal Leaks* erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Darüber hinaus wurden *in vitro* im HT-29/B6-Kolonepithelzellmodell Möglichkeiten der HlyA-Inhibierung mit freien Zinkionen geprüft.

Ergebnisse In der Bakterienkultur aus Biopsieproben konnte eine tendenzielle Zunahme hämolysierender Bakterien bei Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) im entzündlichen Schub beobachtet und ein vermehrter bakterieller Übertritt durch die Darmbarriere aufgezeigt werden. In den qPCR-Untersuchungen wurde in einem Großteil der Proben von Patienten mit CED und Darmgesunden das Vorhandensein von UPEC-Typ HlyA nachgewiesen. Jedoch wurde eine mehr als 10-fache Erhöhung der Konzentration von HlyA-produzierenden *E. coli* im entzündlichen Schub einer CU

gegenüber Kontrollen verzeichnet. Auch ließen sich *Focal Leaks* mit HlyA-positiven Signalen darin im Kolon von CU-Patienten im Schub mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen. EHEC-Typ α -Hämolysin wurde in keinem Biopsat nachgewiesen. In den Kolonisationsversuchen konnte in allen drei Mausmodellen eine HlyA-induzierte Epithelschädigung in Form von *Focal Leaks* identifiziert werden. Funktionell konnte diesen Läsionen eine Barrierebeeinträchtigung zugeschrieben werden. Pathologisch und klinisch zeigten sich in der Folge erhöhte Entzündungszeichen. In Untersuchungen am epithelialen Zellmodell konnte der HlyA-induzierte Abfall des transepithelialen elektrischen Widerstands am Zellmonolayer nach Gabe von Zinkchlorid nicht mehr beobachtet werden.

Zusammenfassung *E. coli* HlyA verursacht auch im *in vivo* Modell Barrierschädigungen durch die Bildung von *Focal Leaks*. Diese Schädigungen können durch vermehrten Antigenübertritt eine intestinale Entzündung begünstigen oder intensivieren. Dies konnte besonders am Entzündungsmausmodell nachvollzogen werden. Im Zusammenhang mit dem vermehrten Vorkommen bei CU-Patienten sollte HlyA als Kofaktor bei der Pathogenese intestinaler Entzündungen in Betracht gezogen werden.

400 Wörter

Abkürzungen: CED - Chronisch entzündliche Darmerkrankung; CU - Colitis ulcerosa; EHEC – Enterohämorrhagische *Escherichia coli*; *E. coli* - *Escherichia coli*; HDM - *Escherichia coli* 536 HlyA-defiziente Mutante; HlyA - *Escherichia coli* α -Hämolysin; PCR – Polymerase Kettenreaktion; qPCR – quantitative real-time PCR; UPEC – Uropathogene *Escherichia coli*

1.2 English

Introduction The influence of a changed intestinal microbiota on inflammatory bowel disease (IBD) has been intensively discussed recently. Both reduced microbial diversity and high concentrations of distinct bacterial phyla are common findings in IBD. Still, the impact of possible colitogenic microbiota remains unknown. Recently, *Escherichia coli* α -haemolysin (HlyA) was shown to induce *focal leaks* in colonic cell monolayers. Thus, the aim of the present study was to determine the effect of an infection by HlyA-carrying *Escherichia coli* (*E. coli*) *in vivo* and its possible impact on IBD.

Methods Mucosa-associated, mucus-associated and intraepithelial bacteria from biopsy samples from IBD patients and healthy controls were examined with means of bacterial culture. HlyA-concentrations were assessed culture-independent with quantitative real-time PCR (qPCR). The effect of HlyA-expressing *E. coli* 536 and its isogenic HlyA-deficient mutant (HDM) on the colon was investigated through colonisation experiments *in vivo* in three mouse models; wild type, interleukin-10-deficient and monoassociated mice. The effect of the colonisation was measured by clinical, histopathological and electrophysiological assessments. The presence of *focal leaks* was investigated by confocal laser-scanning microscopy. Furthermore, the inhibitory effects of free zinc ions on HlyA were studied *in vitro* on colonic HT-29/B6 cell monolayers.

Results Bacterial culture from biopsy specimens showed a tendency towards higher levels of haemolytic bacteria in patients with active ulcerative colitis (UC). Furthermore, there were more intraepithelial bacteria in these patients. In the qPCR measurements UPEC-type HlyA could be found in the majority of the analysed specimens. However, HlyA-levels were more than 10-fold increased in patients with active UC compared to controls. Moreover, focal leaks with HlyA-positive signals inside could be found in the colon of patients with UC. EHEC-Type α -haemolysin could not be found in any specimen. All three mouse models infected with HlyA-producing *E. coli* showed an increased focal leak area compared to HDM-colonised animals. In functional measurements, barrier breaking properties could be retraced to these lesions. In addition, signs of increased inflammation could be seen both histopathologically and clinically. In the HT-29/B6 measurements a HlyA-related

decrease in transepithelial electrical resistance could be abolished by supplementation with zinc chloride.

Conclusions HlyA impairs the intestinal barrier function through induction of *focal leaks* and it triggers colitis - particularly in inflammation-prone mice. These *focal leaks* could increase antigen translocation and thereby could promote or intensify intestinal inflammation. In the context of high HlyA-levels in UC it should be considered as a cofactor for intestinal inflammation.

399 words

Abbreviations: EHEC-enterohaemorrhagic *Escherichia coli*; HDM - *Escherichia coli* 536 HlyA-deficient mutant; HlyA - *Escherichia coli* α -haemolysin; IBD - inflammatory bowel disease; PCR – Polymerase chain reaction; qPCR – quantitative real-time PCR; UC - ulcerative colitis; UPEC – uropathogenic *Escherichia coli*;

2 EINLEITUNG

2.1 Die Mikrobiota des menschlichen Darms

Die intestinalen Mikrobiota (umgangssprachlich: Darmflora) besteht aus vielen unterschiedlichen Mikroorganismen, einschließlich Viren, Pilzen, Einzellern und vor allem Bakterien, welche man in der Regel zunächst mit einem kommensalen Vorkommen im Darmlumen assoziiert. Nicht nur quantitativ - mit 10^{11} bis 10^{12} pro Gramm stellen Bakterien etwa 60% der festen Stuhlmasse dar [1] - sondern auch in Bezug auf ihre Vielfalt bilden sie einen großen Komplex, der im Zusammenspiel mit dem Immunsystem des Wirts ein über Jahre stabiles Ökosystem bildet. Die meisten Bakterien des menschlichen Darmtraktes sind harmlos oder sogar nützlich für den Wirt. Diese als kommensale Bakterien bezeichneten Darmbewohner helfen bei der Verdauung, schützen vor der Ansiedlung von Pathogenen, synthetisieren wichtige Zellbausteine und Stoffwechselprodukte bis hin zur Produktion von Vitaminen und stabilisieren unser Immunsystem [2].

Etwa 500-1000 verschiedene Bakterienspezies bewohnen durchschnittlich den Dickdarm. Insgesamt finden sich im Darmlumen etwa zehnmal mehr Bakterien als eukaryotische Zellen im menschlichen Körper [3]. Diese Bakterienstämme werden individuell akquiriert und weisen darüber hinaus durch die Konstitution des Immunsystems und die Ernährungsweise eine große interpersonelle Variabilität in der Bevölkerung auf. Nur sehr wenige Bakterien werden zu den so genannten „Kern-Mikroorganismen“ gezählt, welche in fast jedem Mikrobiom gefunden werden können. Dazu zählen unter anderem *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* und *Bacteroides uniformis* [4]. Auch *Escherichia coli* kann in den meisten Fällen nachgewiesen werden, spielt aber in Bezug auf die Häufigkeit der Kern-Mikroorganismen nur eine untergeordnete Rolle, da sein Anteil an der Gesamtzahl der Bakterien nur 0,1% beträgt [5].

Auch wenn viele verschiedene Bakterienstämme unseren Darm bewohnen, so lassen sich diese jedoch wenigen Phyla zuordnen. Bei Erwachsenen dominieren meist *Bacteroidetes* und *Firmucites*, wohingegen *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobia* zwar häufig vorkommen, aber prozentual nur einen geringen Anteil bilden [5]. Neuere mRNA Untersuchungen im menschlichen Darm zeigen jedoch,

dass sich trotz der sehr unterschiedlichen bakteriellen Komposition in der Bevölkerung die funktionellen Genprofile des Mikrobioms sehr einheitlich darstellen [6]. Zentrale durch die Bakterien metabolisierte Stoffwechselwege finden sich ungeachtet des bakteriellen Aufbaus praktisch in jedem Darm. Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota hin zu einer zeitlichen Stabilität im Erwachsenenalter ist starken Veränderungen in den ersten Lebensjahren unterworfen. So findet sich bei Kindern eine deutlich geringere, aber mit dem Alter zunehmende Bakterienvielfalt mit sehr viel mehr *Bifidobacteriaceae*. Auch funktionell unterscheiden sich die kindlichen Mikrobiota von denen der Erwachsenen. So finden sich im Säugling mehr Genprodukte für Enzyme, welche in der Folsäurebiosynthese eine Rolle spielen [7]. Einflüsse auf die Entwicklung der späteren Mikrobiota, etwa durch Muttermilch, Antibiotikagaben und eine Geburt mittels Sectio sind zwar bekannt, aber noch nicht grundlegend verstanden. Eine Dysbiose, also eine Inbalance des intestinalen Mikrobioms, konnte mittlerweile im Zusammenhang mit Übergewicht, Mangelernährung, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Karzinomen, neurologischen und immunologischen Erkrankungen aufgezeigt werden. Da jedoch die Mechanismen weitgehend unverstanden sind, kommt der besseren Erforschung der Konstituierung der menschlichen Darmmikrobiota besondere Bedeutung zu.

2.1.1 *Escherichia coli*

Erstmals beschrieben wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) im Jahr 1885 vom Wiener Kinderarzt Theodor Escherich unter der Bezeichnung *Bacterium coli commune* [8]. *E. coli* ist ein fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, es findet sich im Darmlumen in Zellzahlen von etwa 10^8 bis 10^9 pro Gramm Darminhalt und macht damit etwa 0,1% aller Bakterien aus. Einige pathogene *E. coli* Stämme können jedoch auch intestinale Entzündungen und extraintestinale Erkrankungen auslösen. Bis heute wurden verschiedene humanpathogene *E. coli* Stämme zu acht Pathovaren zugeordnet und ihre Pathomechanismen näher beschrieben. Diese acht Pathovaren können wiederum in zwei Gruppen eingeordnet werden - entweder Diarrhö-auslösende *E. coli* oder extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) [9]. Während nur das uropathogene *E. coli* (UPEC) und das neonatale Meningitis *E. coli* (NMEC) zu den ExPEC gezählt werden, wird unter den Diarrhö-auslösenden *E. coli* zwischen dem enteropathogenen *E. coli* (EPEC), dem enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), dem enteroinvasiven *E. coli*

(EIEC, inklusive *Shigella* spp.), dem enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) und dem diffus adhärennten *E. coli* (DAEC) unterschieden. Andere Pathovaren, wie etwa das adhärennt-invasive *E. coli* (AIEC), das eine wichtige Rolle beim Morbus Crohn zu spielen scheint, werden zurzeit intensiv beforscht, jedoch sind die Pathomechanismen noch nicht hinreichend aufgeklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Liste der Pathovaren in naher Zukunft noch erweitert werden wird [10].

2.1.1.1 Uropathogene *Escherichia coli*

Jedes Pathovar besitzt eine bestimmte Ausstattung verschiedener Virulenzfaktoren. Viele dieser Virulenzfaktoren sind in mehreren Pathovaren vorhanden. Das in dieser Arbeit verwendete α -Hämolyysin (HlyA) produzierende *E. coli* 536 wird den UPEC zugeordnet. Alle UPEC Stämme besitzen zur Adhäsion an die Zielzelle P-Fimbrien und Typ 1 Pili, außerdem produzieren sie neben HlyA u.a. noch den cytotoxischen nekrotisierenden Faktor 1 (CNF1), das zu den Serinproteasen-Autotransporter der *Enterobacteriaceae* (SPATE) zählende Pic (protease involved in intestinal colonisation) und das sezernierte Autotransporter-Toxin (Sat) [10]. Darüber hinaus besitzen die UPEC die Fähigkeit zur Kapselbildung, welche sie vor den Phagozyten des Wirtsorganismus schützt [11].

UPEC-Infektionen sind von großer Bedeutung bei Harnwegsinfekten - bei etwa 80% aller Zystitiden oder Pyelonephritiden lassen sich UPECs nachweisen. Harnblase oder Niere werden dabei von den Bakterien üblicherweise aufsteigend aus dem Gastrointestinaltrakt erreicht. Mit Hilfe seiner Adhäsine bindet das Bakterium an die Zellen der Blasenwand und mittels einer Bindung an α 3- und β 1-Integrine gelingt ihm die Invasion in die Blasenepithelzelle [12]. Intrazellulär inhibiert sezerniertes HlyA durch den Einbau in die Plasmamembran der Wirtszelle mit konsekutivem Kalzium-Einstrom die Aktivierung von Akt (Protein Kinase B). Akt wirkt als Schlüsselenzym in der Regulierung von Apoptose, Immunreaktion und Zellstoffwechsel. Durch die fehlende Akt-Aktivierung kommt es zur Apoptose und zur Exfoliation des Zellverbandes im Blasenepithel [13].

2.1.2 α -Hämolyisin

Das *E. coli* α -Hämolyisin (HlyA) ist ein porenbildendes Toxin, das zur Familie der repeat-in-toxin (RTX)-Toxine gezählt wird. Das Operon *hlyCABD* für das 1024 Aminosäuren lange und 110-kDa große Multidomänen-Polypeptid HlyA (Abb. 1) gliedert sich, wie bei RTX-Proteinen üblich, in Toxin (*hlyA*), aktivierende Acyltransferase (*hlyC*) und Transportproteine (*hlyB* und *hlyD*). Letztere sorgen gemeinsam mit dem in allen gramnegativen Bakterien vorkommenden Membranprotein TolC für die Sekretion des Toxins. Das *hlyA*-Gen von UPEC-Stämmen befindet sich auf chromosomalen Pathogenitäts-Inseln (PAI). Auch EHEC-Stämme bilden Hämolyisine, so genannte Enterohämolyisine (EhxA), welche jedoch dem UPEC-HlyA genetisch zu weniger als 70% ähneln und auf nicht-konjugativen Plasmiden kodiert sind [15]. Auch funktionell unterscheiden sich beide Toxine [16]. Trotz der Unterschiede werden auch die EHEC-Enterohämolyisine in der Literatur gelegentlich als HlyA bezeichnet.

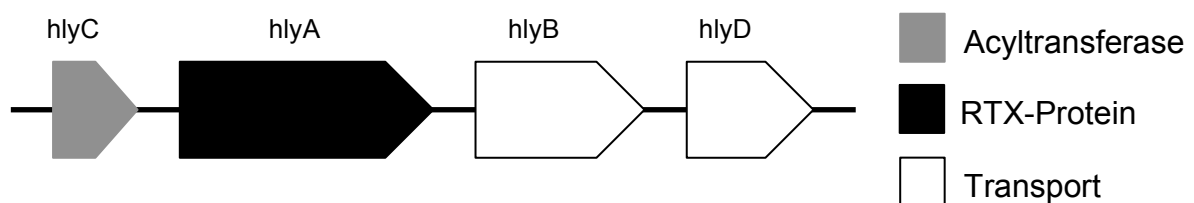


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *E. coli* *hlyCABD* Operon auf der Pathogenitätsinsel I der Spezies 536 (AJ488511.1) nach Linhartova et al. [14]. Die Acyltransferase *hlyC* aktiviert das Toxin, das auf *hlyA* codiert ist, während *hlyB* für einen ABC-Transporter und *hlyD* das Membran-Fusions-Protein kodieren, welche für die Sekretion des Toxins verantwortlich sind.

2.1.2.1 Pathologische Eigenschaften des HlyA

HlyA gehört zu den so genannten porenbildenden Toxinen (pore-forming toxins, PFT). In den frühen 1960er Jahren wurden erstmals Toxine für die hämolytische Wirkung einiger *Escherichia* Spezies identifiziert [17], welche in den folgenden Jahrzehnten weiter erforscht und eingeordnet werden konnten. Heute weiß man, dass das *E. coli* HlyA an der Glycophorin-reichen Erythrozytenoberfläche angreift und so seine hämolytische Wirkung entfaltet. Jedoch scheint diese Wirkung nur ein Nebeneffekt zu sein und allenfalls zur Erhöhung der umgebenden Eisenkonzentration zu dienen. Eine sehr viel größere Spezifität besitzt HlyA zu

Leukozyten. Doch auch zur Lyse von Urothelzellen in der Harnblase ist HlyA fähig, sublytische HlyA-Konzentrationen sind sogar in der Lage, durch die Bindung an das Struktur-Protein Paxillin Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen zu stören und damit in der Harnblase Exfoliationen hervorzurufen. Darüber hinaus induziert HlyA die Proteolyse von Signalfaktoren der Zelle, u.a. zur Immunantwort [13, 18].

Nachdem lange Zeit unklar war, wie ein HlyA-Monomer einen so großen Zellschaden verursachen kann, weisen neuere Studien darauf hin, dass HlyA abhängig von Zeit, Toxin-Konzentration und Membranfluidität zur Oligomerisation in der Plasmamembran in der Lage ist. Voraussetzung für die Oligomerisation scheint eine vorherige Acetylierung durch hlyC zu sein [19]. Darüber hinaus konnten Troeger und Kollegen zeigen, dass HlyA im *in vitro* Modell auch die Integrität von Kolon-Epithelien durch Bildung fokaler Läsionen, so genannter "*Focal Leaks*", stören kann (Abb. 2A und 2B)) [20].

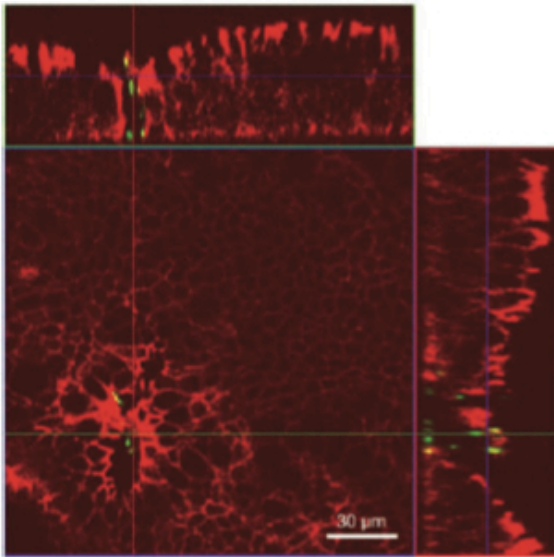
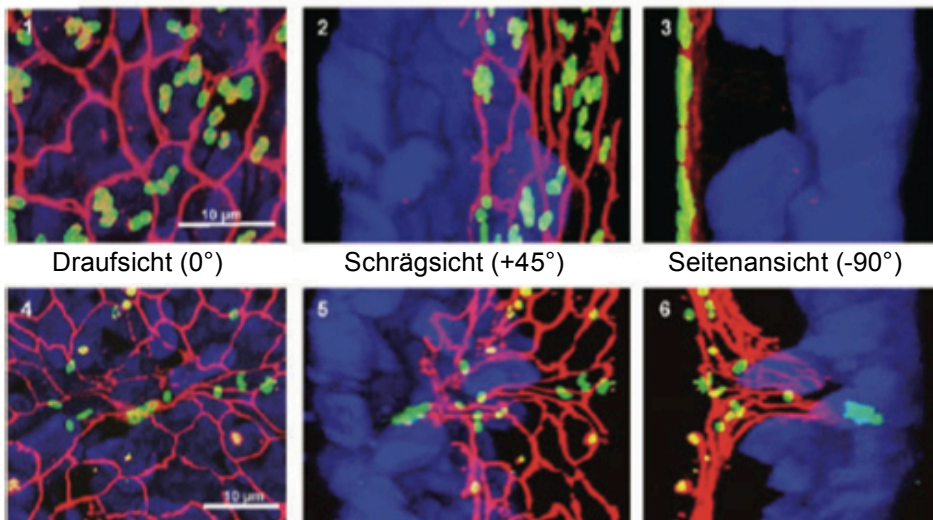
A**B**

Abbildung 2: Morphologie eines *Focal Leak* aus Troeger et al. 2007 [20]. Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen eines HT-29/B6-Monolayers nach Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-E-Cadherin (rot, A) oder Anti-Occludin (rot, B) sowie Anti-O4 (grün) Antikörpern. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. **(A)** Ein einzelnes *E. coli* O4-Signal im Zentrum der Läsions repräsentiert die Bakterientranslokation durch einen epithelialen Monolayer. **(B)** Dreidimensionale Projektion eines *Focal Leak* im HT-29/B6-Monolayer mit Draufsicht, Schrägsicht und Seitenansicht. Die Bilder 1-3 Zeigen ein intaktes Epithel, die Bilder 4-6 zeigen ein *Focal Leak*. (Aus: Troeger et al. 2007 [20])

2.1.2.2 RTX-Proteine

HlyA zählt zu den ‚repeat in toxin‘ (RTX)-Proteinen. RTX-Proteine werden definiert über strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten [21]. Mitglieder der RTX-Familie besitzen Glycin- und Aspartat-reiche Sequenzen, typischerweise Nonapeptide, welche sich in vielen Wiederholungen am carboxy-terminalen Ende des Peptids befinden und nach der Sekretion zahlreiche Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen bereitstellen. Diese Wiederholungen, auf englisch Repeats, sind namensgebend für diese Toxinfamilie: repeat in toxin (RTX). Die zweite Gemeinsamkeit aller Toxine der RTX-Familie ist die Sekretion mittels Typ I Sekretions-System (TISS). Die gesamte gramnegative Zellhülle, bestehend aus cytoplasmatischer Membran, periplasmatischem Raum und äußerer Membran, wird dabei von einem oligomeren Sekretionskanal umspannt, durch den das Protein sezerniert wird. Diese ABC (ATP-binding cassette)-Transporter vermittelte Translokation aus dem bakteriellen Zytosol in den Extrazellulärraum findet also in einem Schritt statt [14]. RTX-Proteinen konnten cytotoxische Eigenschaften spezifisch auf bestimmte Zielzellen, in erster Linie Blut- und Abwehrzellen, nachgewiesen werden. Lediglich dem *E. coli* HlyA und dem *Actinobacillus pleuropneumoniae* Exotoxin IA (ApxIA) wird eine geringere Wirtszellspezifität zugeordnet [14].

2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden in zwei Hauptgruppen unterschieden: Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Die Erstmanifestation einer CED findet in den meisten Fällen zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr statt. Vor allem in Nordamerika und Europa spielen diese Erkrankungen mit 1,4 bzw. 2,2 Millionen Erkrankten eine wichtige Rolle [22]. Während sich in diesen Gebieten mit relativ hohen Prävalenzzahlen die Entwicklung langsam zu stabilisieren scheint, lassen sich für MC und CU in anderen Teilen der Welt in den letzten Jahrzehnten stark steigende Prävalenzzahlen beobachten [23]. Migrantstudien zeigen, dass regionale und ethnische Unterschiede eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen und die Unterschiede viel eher durch den Lebensstil zu erklären sind. Die zunehmenden Prävalenzzahlen in Europa und Nordamerika im vergangenen Jahrhundert werden in erster Linie mit veränderter Ernährung, Antibiotikagebrauch und veränderten Mikrobiota, als auch durch die zunehmende Eradikation von intestinalen Parasiten wie Platt- und Fadenwürmern, erklärt [24, 25]. Die Prävalenzzahlen für MC und CU zeigen deutlich die großen Unterschiede in der geografischen Verteilung der Erkrankungen (Tab. 1).

Auch wenn Genassoziationsstudien klare Zusammenhänge von häufig mutierten Genen und Vorkommen der Erkrankungen aufgezeigt haben, unterstreichen diese offenbar Lebensstil-assoziierten Prävalenzzahlen doch die Bedeutung der Umwelt für den Ausbruch der Erkrankung. Dennoch hilft die Beschreibung assoziierter Gene beim Verständnis der Pathogenese der Erkrankung. So finden sich etwa sowohl bei CU als auch bei MC gehäuft Mutationen in Genen, die für den Interleukin (IL)-23 Signalweg kodieren, und auch die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen aus dem IL-23 Signalweg ist in der Kolonmukosa von CED-Patienten erhöht [26]. Des Weiteren scheinen auch Mutationen in Genen für das anti-inflammatorische IL-10 vor allem bei CU eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen [27]. Diese Erkenntnis nutzt man für die experimentelle Forschung zur Pathophysiologie der Kolitis, z.B. an Mäusen, denen das IL-10-Gen fehlt und die mit der sich in der Folge entwickelnden intestinalen Entzündung als Kolitis-Modell dienen. Doch zeigen gerade diese Mausstudien, dass die Anwesenheit von Darmbakterien die Voraussetzung für die Entwicklung einer immunassoziierten

Kolitis ist und sich somit im genetisch prädisponierten Darm die Entzündung nur in Kontakt zur Umwelt entwickelt [28, 29].

Region	Prävalenz MC	Prävalenz CU
Nordamerika	129-279	191-238
Südamerika	15-41	13-76
Asien	1-19	9-57
Naher Osten	53-68	106-168
West-Europa	151-262	205-505
Ost-Europa	2-35	2-101

Tabelle 1: Prävalenzzahlen (Erkrankte pro 100.000 Einwohner) aus Studien veröffentlicht 2003-2013, nach [23]

2.2.1 Colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa ist definiert als eine schubförmig auftretende Entzündung des Dickdarms [30]. Im Gegensatz zum MC findet sich bei CU eine kontinuierliche, nicht-transmurale Entzündung, die auf den Dickdarm begrenzt ist. In seltenen Fällen lassen sich auch im terminalen Ileum Entzündungen nachweisen, diese werden als ‚backwash-ileitis‘ bezeichnet. Je nach Befallsmuster kann die CU als Proktitis, linksseitige Kolitis oder Pankolitis auftreten. Je begrenzter das Befallsmuster ist, desto milder sind klassischerweise auch die Symptome. Die meisten Patienten berichten von blutigem Durchfall (häufig nachts oder nach dem Essen) sowie Abgängen von Schleim oder Eiter und krampfartigen Bauchschmerzen. Sowohl die akute klinische Symptomatik als auch der Krankheitsverlauf sind jedoch sehr variabel. Bei einem Großteil der Patienten findet sich aber unter Behandlung ein chronisch-rezidivierender Verlauf mit von Exazerbationen unterbrochenen Zeiten kompletter Remission. Histologisch finden sich im frischen Stadium Anhäufungen von

Granulozyten in den Krypten. Diese werden als Kryptenabszesse bezeichnet. Als Zeichen von chronischer Entzündung findet man atrophisierte Schleimhaut mit Infiltration von Lymphozyten und Histiozyten. Häufig finden sich auch Epitheldysplasien, Vorläuferstadien eines kolorektalen Karzinoms.

Sowohl bei CU als auch bei MC treten häufig Beschwerden auf, die mit den Darmbeschwerden alleine nicht zu erklären sind. Die meisten dieser als extraintestinale Symptome bezeichneten Beschwerden sind häufiger bei MC, finden sich jedoch auch bei CU. Diese extraintestinalen Manifestationen finden sich häufig an der Haut, z.B. Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum, den Augen, z.B. Iritis, Uveitis oder Episkleritis, oder den Gelenken, z.B. Arthritis oder ankylosierende Spondylitis. Lediglich die extraintestinalen Manifestationen, welche die Leber betreffen, wie z.B. die primär sklerosierende Cholangitis, sind bei CU häufiger als bei MC.

2.2.2 Morbus Crohn

Auch der MC präsentiert sich meist als schubförmige intestinale Erkrankung. Zwar überwiegen Entzündungen im terminalen Ileum und im Kolon, jedoch können sich Entzündungsherde im gesamten Verdauungstrakt vom Mund bis zum Anus finden. Diese segmentalen, nicht kontinuierlichen Herde zeigen ein transmurales Entzündungsbild über alle Wandschichten hinweg und neigen zur Fistel- und Abszessbildung. Wie bei CU berichten Patienten über Abdominalschmerzen und Durchfälle, jedoch sind Abgänge von Blut, Eiter oder Schleim seltener. Histologisch finden sich häufig hyperplastische Lymphknoten, sowie Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen.

2.2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und intestinale Mikrobiota

Während über Einflüsse von Gen-Variationen auf den Ausbruch einer CED schon seit langem intensiv geforscht wird, rücken die Veränderungen in der intestinalen Mikrobiota bei CED-Patienten erst in den letzten Jahren in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Zwar ist unklar, ob die erhöhte Inzidenz von CED nach einer bakteriellen Gastroenteritis eine Ursachenbeschreibung darstellt [31] oder

lediglich einer erhöhten Rate von Zufallsdiagnosen durch intensivierete Diagnostik zugeschrieben werden muss [32], jedoch ist unstrittig, dass sich die bakterielle Zusammensetzung im Darm von CED-Patienten von den Mikrobiota Darmgesunder unterscheidet. So zeigt sich die Komplexität der mikrobiellen Komposition im Darm von CED-Patienten stark reduziert [33] und die Anzahl von Mucosa-assoziierten Bakterien erhöht [34].

Viele Studien zeigen, dass eine Dysbiose, also ein quantitatives und qualitatives Ungleichgewicht des Mikrobioms, in der Lage ist, eine Entzündung im Darm zu begünstigen oder sogar hervorzurufen. Andererseits können jedoch bestimmte Bakterienspezies auch einer Entzündung entgegenwirken. So konnte etwa das kommensale Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii* in mononukleären Zellen die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interferon-gamma (IFN- γ) verringern und die Ausschüttung des anti-inflammatorischen IL-10 stimulieren [35]. Doch nicht nur der direkte Effekt von Bakterien auf Immunzellen, sondern auch der Effekt löslicher bakterieller Faktoren, welche die humane Immunantwort auf die kommensalen Bakterien regulieren können, wird diskutiert. Als erstes dieser als mikrobielle Symbiose-Faktoren bezeichneten Botenstoffe wurde das Molekül Polysaccharid A (PSA) des *Bacteroides fragilis* im *in vivo* Modell auf seine anti-entzündlichen Eigenschaften untersucht [36]. Hier konnte gezeigt werden, dass mikrobielle Symbiose-Faktoren dazu in der Lage sind, eine entzündliche Antwort des Organismus auf kommensale Bakterienbesiedlung mittels Hemmung von pro-inflammatorischem IL-17 und Stimulation von IL-10-produzierenden CD4⁺-T-Lymphozyten zu verhindern. Und tatsächlich finden sich im Darm von CED-Patienten deutlich weniger *Bacteroidetes*- und *Firmucutes*-Spezies, welche das immunologische Gleichgewicht im Darm nicht nur durch ihre anti-entzündlichen Eigenschaften, sondern auch durch ihre Produktion von kurzkettigen Fettsäuren, welche der Ernährung von humanen Kolon-Epithelzellen dienen, unterstützen [37, 38].

Doch das Fehlen von immun-modulatorischen Bakteriengruppen allein kann nicht die ganze Pathophysiologie der CED erklären. Zwar zeigen CED-Patienten auch auf kommensale Bakterien eine gesteigerte Immunantwort [39], jedoch scheint es eine Reihe pro-inflammatorischer Bakterienspezies zu geben, welche die Initiation der Entzündung begünstigen. So lassen sich im Darm von CED-Patienten im Vergleich

zu Darmgesunden deutlich häufiger *Campylobacter* spp. [40] und *E. coli* der phylogenetischen Gruppe B2 [41, 42] nachweisen und in Maus-Versuchen reicht alleine die Ko-Habitation mit genetisch modifizierten Mäusen, welche eine spontane Kolitis entwickeln, um auch bei einer Wildtyp-Maus eine Kolitis hervorzurufen [43]. Es scheinen also kolitogene Mikrobiota zu existieren, welche in der Lage sind, eine Entzündung hervorzurufen.

2.3 Fragestellung der Arbeit

Lange Zeit war das *E. coli* α -Hämolysin lediglich als Virulenzfaktor für extraintestinale Infektionen bekannt. Vor allem bei Harnwegsinfekten wurde seine hervorstechende Rolle detailliert beschrieben und verschiedene Pathomechanismen konnten aufgezeigt werden. Das Vorkommen von HlyA-tragenden Bakterien im Darm und eine mögliche Virulenz an der Darmoberfläche spielten eine untergeordnete Rolle. Ein Grund dafür ist auch die häufig missverständliche Verwendung der Nomenklatur bei Untersuchungen zum EHEC-Enterohämolysin. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass HlyA an einem Enterozyten-Zellmodell in der Lage ist, fokale Läsionen, so genannte *Focal Leaks* zu induzieren. Diese kegel- bis zylinderförmigen *Focal Leaks* stellen Störungen der epithelialen Integrität dar, welche auch Bakterien den Durchtritt durch das Epithelmodell ermöglichen [20].

Daher war das Ziel dieser Arbeit die *in vivo* Untersuchung der Auswirkungen einer intestinalen Kolonisation mit HlyA-produzierenden Bakterien. Zum Einen war die Frage von Bedeutung, ob die Bildung von *Focal Leaks* sich auch in einem *in vivo* Modell nachvollziehen lassen könnte. Auch sollte geklärt werden, ob das Auftreten von *Focal Leaks* mit einem entzündlichen Geschehen am Kolon assoziiert ist. Zum Anderen stellte sich die Frage, ob der Faktor überhaupt im menschlichen Kolon festzustellen ist.

Mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Versuchen in Zusammenhang mit der Erfassung von Patientendaten sollte so die Rolle von HlyA als Virulenzfaktor an der Darmoberfläche und als möglicher Trigger einer intestinalen Entzündung aufgezeigt werden. So wurden Infektionsversuche in einem *in vivo* Mausmodell durchgeführt. Um den Effekt möglichst genau nachvollziehen zu können, wurden die Auswirkungen der Infektion klinisch, pathologisch und funktionell untersucht. Darüber hinaus wurden die Möglichkeiten einer Inhibierung der HlyA-Wirkung am humanen Epithelzellmodell *in vitro* getestet. Um im Zusammenhang der HlyA-Messung im menschlichen Kolon einen möglichen Einfluss HlyA-produzierender Bakterien auf entzündliche Erkrankungen, bei denen die Bildung von *Focal Leaks* als Trigger einer Entzündung dienen könnte, zu bestimmen, wurde das Vorkommen von HlyA-produzierenden Bakterien bei Patienten mit CED untersucht und mit darmgesunden Personen verglichen.

3 METHODIK

3.1 Nachweis von α -Hämolysin im humanen Kolon

3.1.1 Entnahme humaner Kolon-Biopsien

Zur Identifizierung der epithelnahe und intraepithelialen Bakterien und immunhistologisch-mikroskopischen Darstellung der Bakterien an der Darmwand wurden vier unabhängige Kollektive untersucht. Neben Patienten mit einer klinisch und endoskopisch gesicherten CED (11 Patienten mit aktiver CU, 9 Patienten mit aktivem MC), wurden 11 Patienten mit einer in Remission befindlichen CU und 11 darmgesunde Kontrollen untersucht (Tab. 2). Jeweils vier Kolonbiopsate (ca. 3 x 3 mm) wurden bei Routine-Endoskopieuntersuchungen an der Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin aus dem Colon sigmoideum entnommen (Genehmigungsnummer EA4/123/09, 16.11.2009 Ethikkommission der Charité) und in 0,9%ige NaCl-Lösung gegeben. Jeweils zwei Biopsien wurden unmittelbar für die Anzucht von Bakterienkulturen verwendet. Die restlichen Biopsien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Bei Patienten mit aktiver Entzündung des entsprechenden Darmabschnitts erfolgte die Probenentnahme aus weniger entzündeten Bereichen. Ausgeschlossen wurden Probanden, welche innerhalb von sechs Wochen vor der Probenentnahme eine antibiotische Therapie erhalten hatten. Alle Patienten wurden über die Risiken der zusätzlichen Abnahme von Biopsien für Forschungszwecke mündlich und schriftlich informiert und willigten schriftlich ein (Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung im Anhang).

Diagnose	n	Alter (Mittelwert±SD)	Geschlecht (weibl./männl.)
Darmgesunde Kontrollpatienten	12	53,4±13,9	5/7
MC, Schub	9	43,9±15,9	3/6
CU, Remission	11	50,6±15,3	4/7
CU, Schub	11	45,7±10,9	4/7

Tabelle 2: Übersicht über die vier Patientenkollektive. Aufgelistet sind Anzahl (n), durchschnittliches Alter mit Standardabweichung und Geschlechterverteilung.

3.1.2 Bakterienkultur

Für das Anlegen von Bakterienkulturen wurden jeweils zwei der humanen Kolon-Biopsien verwendet. Zur Unterscheidung von Mukus-assoziierten, Mukosa-assoziierten und intraepithelialen Bakterien wurde eine zuvor publizierte Methode verwendet [44]. Zur Anzucht von Kulturen der Mukosa-assoziierten Bakterien wurden die Biopsien zunächst in jeweils in 500 µl 0,016% Dithiothreitol (DTT)-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0,9%iger NaCl gegeben. Die Mukusschicht wurde durch 15-minütiges Vortexen gelöst und durch kurzes Anzentrifugieren an die Lösungsoberfläche gebracht. 50 µl des Überstandes wurden gleichmäßig auf zwei Platten mit Columbia-Blutagar (10% Hammelblut, VWR International GmbH, Darmstadt) ausgestrichen und diese dann für 24 Stunden zur Anzucht der Mukus-assoziierten Bakterien bei 37°C in aerober bzw. anaerober Atmosphäre inkubiert.

Anschließend wurde eine der Biopsien in 500 µl sterile physiologische NaCl-Lösung gegeben. Die andere Biopsie wurde in 500 µl physiologische NaCl-Lösung mit 50 mg/L Gentamicin transferiert, um die nicht-intrazellulären Bakterien abzutöten. Nach 30 Minuten wurden beide Biopsien jeweils viermal mit 500 µl steriler physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die mit Gentamicin behandelte Biopsie wurde in destilliertes Wasser gegeben, um die umgebenden Zellen zu lysieren und den Austritt der intraepithelialen Bakterien zu ermöglichen. Die nicht mit Gentamicin behandelte Biopsie wurden in ein neues Gefäß mit steriler physiologischer NaCl-Lösung gegeben, um die Mucosa-assoziierten Bakterien zu lösen. Nach 30 Minuten wurden 50 µl aus jedem Gefäß auf einer Platte Columbia-Blutagar verstrichen und

für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien auf den vier Blutagarplatten gezählt und der Anteil der Hämolyse-induzierenden Kolonien bestimmt. Bei Vorhandensein von hämolysierenden Kolonien wurden 10 Hämolyse-Höfe vermessen. Jeweils eine besonders stark hämolysierende Kolonie jeder Platte wurde in 5 ml RPMI 1640-Nährlösung bzw. LB-Medium gebracht und bei 37°C angezüchtet. Die so gewonnene Bakterienkultur wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in 10% Glycerol aufbewahrt.

3.1.3 DNS-Präparation

Die Extraktion der Desoxyribonukleinsäure (DNS) erfolgte mit Hilfe des bead-beating-Verfahrens mit FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) in einem Lysemedium. Die Gewinnung und Aufreinigung der DNS der auf den Biopsien befindlichen Bakterien wurde nach Hersteller-Empfehlung mit dem ZR Fecal DNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurde die Biopsie zur DNS-Extraktion mit 750 µl Lysemedium in einem Gefäß mit 0,5 mm großen BashingBeads™ gegeben und für 40 Sekunden bei 6,5 m/s im FastPrep®-24 homogenisiert und lysiert. Anschließend wurde die Lösung für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert und 400 µl des Überstandes entnommen und durch Zentrifugation bei 7.000 x g für eine Minute in einem Filter (Zymo-Spin™ IV Spin Filter) gereinigt. Zu dem Filtrat wurden nun 1200 µl DNS Bindepuffer hinzugegeben und die insgesamt 1600 µl in zwei Schritten je 800 µl durch Zentrifugation bei 10.000 x g für eine Minute an eine Säule (Zymo-Spin™ IIC Säule) gebunden. Die gebundene DNS an der Säule wurde durch Zentrifugation bei jeweils 10.000 x g für eine Minute mit 200 µl Prä-Wasch-Puffer und 500 µl Wasch-Puffer gereinigt. Anschließend wurde die DNS mit 50 µl Elutionspuffer durch Zentrifugation bei 10.000 x g gelöst und in einem neuen Eppendorfgefäß aufgefangen. Zur endgültigen Reinigung wurde die gelöste DNS erneut durch Zentrifugation bei 8.000 x g für eine Minute durch einen Filter (Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter) gegeben. Anschließend wurde die Konzentration der DNS-Präparation mittels NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) spektrophotometrisch bestimmt.

3.1.4 Primer-Entwicklung

Zur genetischen Identifikation des HlyA-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein Primerpaar benötigt, welches insbesondere an das UPEC-spezifische HlyA erkennen sollte. Mit Hilfe des Primer- Basic Local Alignment Search Tools (PrimerBLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) [45] wurden Primer entwickelt, welche bei 60°C Annealing-Temperatur auf der Pathogenitätsinsel I des *Escherichia coli* 536 an das *hlyA*-Gen binden. Mittels PCR und Agarosegel-Elektrophorese (s.u.) wurden Primerpaare für die weitere Verwendung evaluiert, deren PCR-Produkte die deutlichsten spezifischen Banden ohne Nebenprodukte ergeben hatten.

3.1.5 PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Zur Positivkontrolle der Primer und Proben wurden alle aufgereinigten DNS-Präparationen und alle verwendeten Primer miteinander und mit *E. coli*-536 bzw. *E. coli*-536-HDM mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain-reaction = PCR) und anschließender Agarosegel-Elektrophorese untersucht. Jeder PCR-Ansatz enthielt 2 µl DNS-Probe („Template“), 5 µl 10x PCR-Puffer (enthält 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl), 1 µl dNTP 10 mM, 0,25 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 5x Q-Solution (Qiagen, Hilden), 1 µl forward Primer, 1 µl reverse Primer, 25 µl Hot Star Taq®-Polymerase (Qiagen, Hilden), 8,75 µl H₂O. Im Cycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Mannheim) wurde dieser Ansatz nach folgendem Programm verarbeitet:

15 Minuten Denaturierung/ Polymerase-Aktivierung	95°C	
40 Zyklen	45 Sekunden Denaturierung	94°C
	45 Sekunden Annealing	5°C unter der T _m des Primers
	1 Minute Elongation	72°C
10 Minuten Elongation/ Auffüllen von Fragmenten	72°C	

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Verwendet wurde 0,5%iges Agarosegel (Qbiogene, Heidelberg), dieses wurde bei jedem Versuch frisch in der Mikrowelle in 50 x TAE-Puffer (2 M Trisaminomethan, 1 M Acetat und 0,1 M EDTA) mit 5 µl Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe) pro 100 ml für zwei Minuten gelöst und dann bis zum Erkalten in eine Gelkammer (Bio-Rad, München) gegeben. Das PCR Produkt wurde 1:5 mit 6-fach-Ladepuffer (50 mM EDTA, 50 % v/v Glycerin, 0,25 mM Bromphenolblau). Nach 60 Minuten Agarosegel-Elektrophorese mit 60 V mit Power Pack P25 (Biometra, Göttingen) erfolgte die Analyse der Banden in einem UV-Licht-Visualisierer (MS Laborgeräte, Heidelberg).

3.1.6 *hlyA*-Messung mittels qPCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real-time polymerase-chain-reaction= qPCR) erfolgte mit SYBR-green in einem ABI 7900HT PCR-Gerät nach Herstellerangaben (Applied Biosystems, Mannheim). Verwendet wurde ein Reaktionsansatz mit 25 µl, davon 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Mannheim), 10,5 µl H₂O mit 30 ng Proben-DNS und je 1 µl forward und reverse Primer. Die PCR des Ansatzes in einer 96-well-Platte (Applied Biosystems, Mannheim) wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

10 Minuten Denaturierung		95°C	
40 Zyklen	}	15 Sekunden Denaturierung	95°C
		1 Minute Annealing/Elongation	60°C

Anschließend wurden die Dissoziationskurven bestimmt, um unspezifische Reaktionen detektieren zu können. Jeder Ansatz aus Probe und Primern wurde doppelt hergestellt und bestimmt. Der Mittelwert der beiden Ergebnisse wurde für die weitere Verwendung der Daten benutzt. Bei der qPCR wurden zum Nachweis von Hämolytinen sowohl EHEC-Enterohämolytin-spezifische Primer [41] als auch UPEC-*hlyA*-spezifische Primer verwendet (Tab. 3). Zur Quantifizierung wurden die

ermittelten Werte mit einem Standardwert verglichen und zur Berechnung der Bakterienzahlen eine Standard-Konzentrationskurve berechnet. Die Werte wurden in Verhältnis gesetzt zur ebenfalls ermittelten Anzahl aller Bakterien [46] und aller *E. coli* [47].

Zielstruktur	Primer	Sequenz (5' 3')	Referenz
Universalprimer <i>Eubacteria</i>	UniF350 UniR514	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT ATTACCGCGGCTGCTGGC	[46]
<i>Escherichia coli</i> - Spezies/ <i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457F Eco1652R	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	[47]
UPEC-spezifisches <i>hlyA</i>	HlyA536F HlyA536R	TTCTGCTGTGACACTGGCAA TAACAGCACCTACCAGTGCG	diese Arbeit
EHEC-spezifisches Enterohämolysin (<i>ehyl/hlyA</i>)	HlyA59F HlyA59R	TGCAGCCTCCAGTGCATCCCTC CTTACCACTCTGACTGCGATCAGC	[41]

Tabelle 3: Darstellung der bei der qPCR verwendeten Primerpaare, vorwärts und rückwärts. Dargestellt sind die Primerpaare für die Bindung an alle Bakterien (Uni), *Escherichia coli* / *Enterobacteriaceae* (Eco), UPEC-spezifisches *hlyA* (HlyA536) sowie EHEC spezifisches Hämolysin (HlyA59).

3.2 α -Hämolyisin *in vivo* Versuche

3.2.1 Mausmodell

Für den *in vivo* Infektionsversuch wurden drei verschiedene Mauslinien verwendet. Als Wildtyp-Modell (WT) dienten weibliche C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse, für das Kolitismodell weibliche B6.129.P2-IL10^{-/-} Interleukin-10 Knockout (IL-10^{-/-}) Mäuse (beide Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) und für die monoassoziierte (MA) Infektion mit nur einer Bakterienspezies kamen weibliche keimfreie C3H/ORL WT-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) zur Verwendung. Die Mäuse waren bei Versuchsbeginn 13-15 Wochen alt.

Das HlyA produzierende *Escherichia coli*-536 und die HlyA-defiziente Mutante *E. coli*-536-HDM (*536 Δ hlyI_ Δ hlyII::cat*) [48] (HDM= Hämolyisin defiziente Mutante) wurden über Nacht in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit Ampicillin (100 mg pro ml, MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) bei 37°C kultiviert und bis zur Phase der logarithmischen Vermehrungsphase angezogen. Die Mäuse wurden vor der Infektion wie bei Diard et al. [49] beschrieben mit Streptomycin im Trinkwasser behandelt, um die koliforme Bakterienbesiedlung im Kolon zu reduzieren. Anschließend wurden WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen jeweils 200 μ l der auf 10⁶ CFU (CFU= *colony forming unit*) pro 100 μ l verdünnten Bakteriensuspension mit *E. coli*-536 oder *E. coli*-536-HDM mittels oral-gastraler Sonde appliziert, im MA-Maus-Modell wurde eine verringerte Infektionsdosis von 10⁵ *E. coli* pro 100 μ l verwendet.

Nach der Infektion wurden die Mäuse für eine Woche unter keimfreien Bedingungen gehalten und anschließend durch cervikale Dislokation getötet (Genehmigungsnummer G0279/08, 31.10.2008). Der Magen-Darm-Trakt wurde entfernt und umgehend elektrophysiologischen Messungen zugeführt. Außerdem wurden Teile des Kolons für histologische Färbungen in 2% Paraformaldehyd oder 4% Formalin fixiert. Der Darminhalt wurde zur CFU-Bestimmung in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Selektivmedium ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Auch wurde zum Test auf okkultes Blut im Stuhl ein Haemocult-Test (CARE Diagnostica, Moellersdorf, Österreich) durchgeführt und die Konsistenz des Kots vermerkt. Der Gewichtsverlauf der Mäuse wurde jeden Tag gemessen. Aus den Daten zu Gewichtsabnahme, Konsistenz des Kots und Blutbeimengungen im Kot konnte für

jede Maus nach einem vorbeschriebenen Modell ein klinischer Kolitis-Score ermittelt werden [50].

3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen des Darms in Ussing-Kammern

Zur Messung der Gesamtleitfähigkeit des Gewebes und des Übertritts von elektrogenen Stoffen über die epitheliale Barriere wurden modifizierte Ussing-Kammern verwendet. Die miniaturisierten Ussing-Kammern bestehen aus zwei verschraubbaren Halbkammern, zwischen denen als trennende Membran das zu untersuchende Gewebe mit einer Fläche von $0,049 \text{ cm}^2$ eingespannt wird. Das Gewebe wird dabei konstant von 37°C warmer Lösung umspült, mittels aufsteigender Carbogen-Gasblasen zirkuliert die Lösung um das Gewebe und wird mit Sauerstoff gesättigt. Mit der 4-Elektroden-Technik nach Ussing und Zerahn [51] werden der transepitheliale Widerstand, die transepitheliale Spannung und der Kurzschlussstrom gemessen.

Für die Messung des totalen transmuralen elektrischen Widerstands wurden rechnergesteuerte Spannungsklemmeinrichtungen (Fiebig-Hard&Software, Berlin) verwendet, welche den totalen transmuralen elektrischen Widerstand in regelmäßigen Zeitabständen erfassen und aufzeichnen. Die aufgezeichneten Werte wurden noch um den Widerstand der Spüllösung zwischen den Spannungselektroden korrigiert. Der gesamttransepitheliale Widerstand (R^t oder TER= total transepithelial electrical resistance) besteht aus zwei sich kombinierenden Einzelgrößen; dem epithelialen (R^{epi}) und dem subepithelialen Widerstand (R^{sub}). Mittels Impedanzspektroskopie lassen sich wie bei Bürgel et al. [52] beschrieben R^{epi} und R^{sub} unterscheiden.

Gleichzeitig wurde in der Ussingkammer der Stoffübertritt über die Membran (Flux) gemessen. Als Markersubstanz wurden $100 \text{ }\mu\text{M}$ Fluorescein oder $18 \text{ }\mu\text{M}$ Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf der mukosalen Seite des Gewebes in die Kammer gegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurden an der basolateralen Kammerhälfte Proben entnommen. Die Fluoreszenz (Fluorescein) oder die colorimetrisch bestimmbare enzymatische Aktivität (HRP-Substrat, QuantaBlu, Fischer Scientific, Loughborough,

UK) wurde in einem Spektrofluorimeter (Tecan, Männerdorf, Schweiz) bestimmt. Aus den Konzentrationsunterschieden konnte die Durchlässigkeit des Gewebes bestimmt werden.

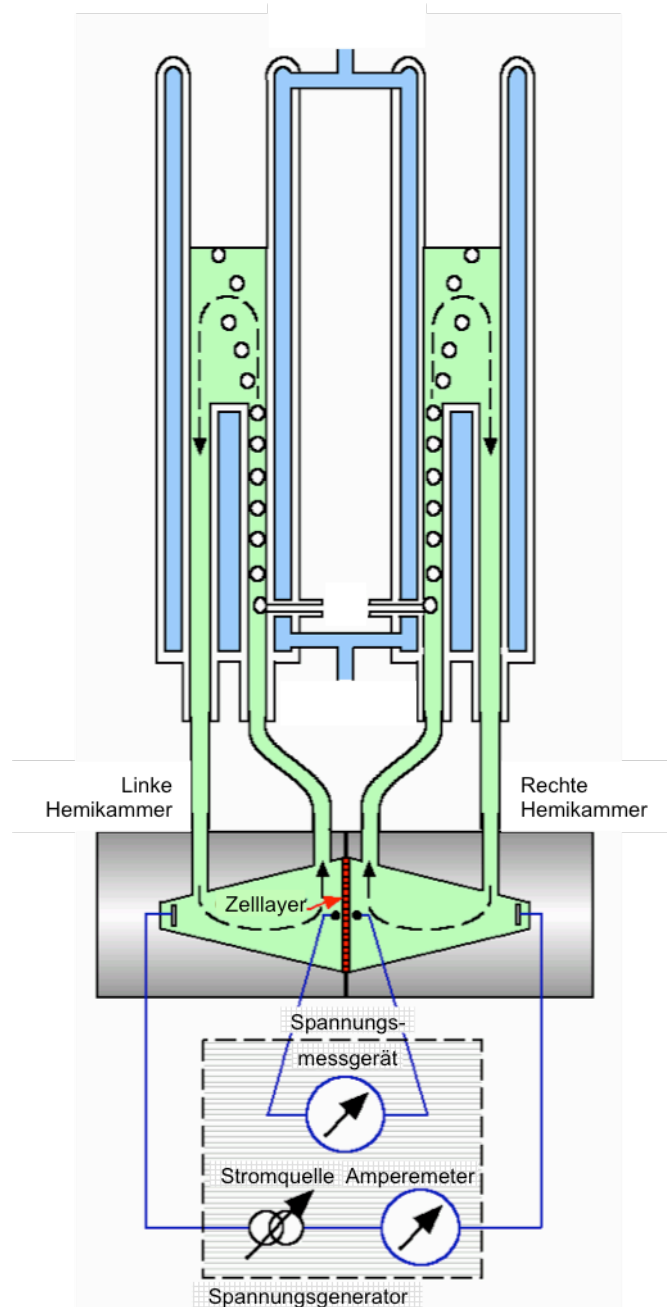


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Michael Fromm, Klinische Physiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin

3.2.3 Impedanzspektroskopie

Mittels der Wechselstrom-Impedanz-Analyse ist es möglich, den Anteil vom epithelialen Widerstand (R^{epi}) und subepithelialen Widerstand (R^{sub}) am transmuralen Widerstand (R^{t}) zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Technik verwendet, welche Bürgel et al. beschrieben haben [52]. Grundlage der Berechnungen ist das 3-Parameter Modell der Darmwand [53], in welchem Epithel und Subepithel als elektrische Parallelschaltung betrachtet werden. Hierbei fungiert das Epithel als parallel geschalteter Kondensator und Widerstand, das Subepithel bildet einen in Reihe geschalteten Widerstand. Zur Detektion der Einzelgrößen werden 48 verschiedene Frequenzen von 1,3 Hz bis 65 kHz mit sinusförmigem Wechselstrom von $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ am Gewebe appliziert und die Spannungsveränderungen am Gewebe mit einem Phasen-sensitiven Verstärker (Solartron Schlumberger, Hampshire, England) abgenommen. Die gemessenen Werte mussten nun noch um den Widerstand der Badlösung und das Frequenzverhalten des Detektors korrigiert werden. Dann konnte für jedes Gewebe ein ortsabhängiges Nyquist-Diagramm aufgezeichnet werden und nach der Methode der kleinsten Quadrate (least square analysis) das passende Kreis-Segment herausgefunden werden. Aufgrund der Frequenz-abhängigen elektrischen Eigenschaften des Kondensators, lassen sich die gemessenen Widerstände mit geringer Frequenz R^{t} zuordnen, die Widerstände bei hohen Frequenzen sind R^{sub} zugehörig. R^{epi} lässt sich durch die Formel $R^{\text{epi}} = R^{\text{t}} - R^{\text{sub}}$ bestimmen.

3.2.4 Bestimmung der epithelialen HRP-Transzytoserate

Das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) dient mit seiner Größe von 44 kDa als Makromolekülen-Markerenzym. Da es nicht über die Tight-Junction-Barriere diffundiert, kann es als Marker für große epitheliale Läsionen verwendet werden. Da eine erhöhte HRP-Translokation über eine Enterozytenmembran jedoch auch über eine erhöhte Transzytoserate erklärt werden könnte, wurde das Kolon von mit *E. coli* 536 oder *E. coli* 536-HDM infizierten Mäusen nach den HRP-Flux-Messungen zusätzlich auf intrazelluläres Vorkommen von HRP untersucht. Dazu wurde das HRP nach Herstellerangaben mit 3,3',4,4'-Tetra-Aminobiphenyl-Tetrahydrochlorid (Carl Roth, Karlsruhe) gefärbt und die

intrazellulären Ansammlungen von HRP lichtmikroskopisch bestimmt.

3.2.5 Klinischer Kolitis-Score

Um den klinischen Verlauf der infizierten Mäuse besser einschätzen zu können, wurde ein klinischer Kolitis-Score nach Araki et al. [50] erhoben. Im verwendeten Score werden für verschiedene klinische Auffälligkeiten additiv Punkte vergeben (Tab. 4). Für Gewichtsverlust, Konsistenz des Kots und intestinale Blutungen wurden jeweils 0 bis 4 Punkte vergeben, diese Punkte wurden addiert und durch 3 dividiert. Die nun berechnete Punktzahl gibt den Score von 0 (nicht entzündet) bis 4 (sehr entzündet) wieder.

Kriterium	Punkte
<u>Gewichtsverlust</u>	0 – 4
kein Gewichtsverlust	0
Verlust von 1 bis 5 % des Ausgangsgewichts	1
Verlust von 5 bis 10 % des Ausgangsgewichts	2
Verlust von 10 bis 20 % des Ausgangsgewichts	3
Verlust von mehr als 20 % des Ausgangsgewichts	4
<u>Kotkonsistenz</u>	0 – 4
klar geformte Pellets	0
weicher, halbgeformter Kot ohne Adhärenz an den Anus	2
flüssiger, ungeformter Kot mit Adhärenz an den Anus	4
<u>Blutung</u>	0 - 4
keine Blutung	0
okkultes Blut im Kot, Haemocult positiv	2
sichtbares Blut im Kot	4

Tabelle 4: Klinischer Kolitis-Score von 0 (nicht entzündet) bis 4 (sehr entzündet) Punkten nach Araki et al. [50]

3.2.6 Histopathologie

Kolon-Gewebeproben der Maus wurden für zwei Stunden in 4% Formalin-Lösung fixiert, dann in Paraffin eingebettet und in 4 µm dicken konsekutiven Schnitten mit Haematoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Die pathologische Befundung wurde verblindet durchgeführt. Die entzündlichen Epithelveränderungen wurden nach Katakura et al. zwischen 0 (gesund) und 12 (entzündet) eingeordnet, dabei wurden 0 bis 6 Punkte für den Epithelschaden vergeben und 0 bis 6 Punkte für die Gewebeeinfiltration mit Entzündungszellen (Tab. 5) [54].

Kriterium	Punkte
<u>Epithelschaden</u>	0 - 6
normales Epithel	0
epitheliale Hyperproliferation, irreguläre Krypten, Becherzellverlust	1
gering- bis mittelgradiger Kryptenverlust	2
schwergradiger Kryptenverlust	3
kompletter Kryptenverlust, Epithel intakt	4
Ulcer, klein bis mittelgradig (Größe < 10 Krypten)	5
großes Ulcer (Größe > 10 Krypten)	6
<u>Gewebeinfiltration mit Entzündungszellen</u>	0 - 6
Mucosa	0 - 3
normal	0
geringgradig	1
mittelgradig	2
schwergradig	3
Submucosa	0 - 2
normal	0
gering- bis mittelgradig	1
schwergradig	2
Serosa	0 - 1
normal	0
gering- bis schwergradig	1

Tabelle 5: Additiver histopathologischer Entzündungsscore bei Kolitis von 0 bis 12 Punkten nach Katakura et al. [54]

3.2.7 Immunofluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Fixierung des Kolongewebes für die Immunofluoreszenzfärbung erfolgte in 2%igem Paraformaldehyd. Um die luminale Bakterienkolonisation in der Fixierung zu erhalten, wurde auf eine vorherige Spülung des Gewebes verzichtet. Anschließend wurden Proteinverbindungen mit 25 mM Glycin-Lösung gelöscht. Die Färbung des Gewebes erfolgte wie bei [55] beschrieben ohne Schnitte. Um die Durchlässigkeit des fixierten Gewebes zu gewährleisten, wurde es für zwei Stunden bei 37°C in 1% Triton X-100 Lösung in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*= PBS) eingelegt und daraufhin für 3 Stunden bei Raumtemperatur (RT) in Blockier-Lösung (10% Ziegen-Serum, 1% Rinder-Serum Albumin, 0,8% Triton X-100 in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in der Blocking-Lösung. Anschließend wurde das Gewebe viermal für jeweils eine Stunde mit Blocking-Lösung gewaschen, erneut über Nacht bei 4°C mit einem zweiten IgG-Antikörper inkubiert und am nächsten Tag viermal gewaschen. Die Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und Phalloidin-AlexaFluor647N (jeweils 1:1000) erfolgte bei RT für eine halbe Stunde. Für die Immunofluoreszenzfärbung wurden folgende Antikörper verwendet: anti-HlyA, anti-*E.coli*-O (1:200, Lothar Beutin, Institut für Risikobewertung, Berlin), anti-occludin (1:100), anti-E-cadherin (1:250), AlexaFluor-488 goat-anti-mouse, AlexaFluor-488 goat-anti-rabbit, AlexaFluor-594 goat-anti-mouse oder AlexaFluor-549 goat-anti-rabbit IgG (1:500, Invitrogen, Karlsruhe). Die Sensitivität der Antikörper wurde zuvor an *E. coli*-536-infizierten HT-29/B6 Zellkulturen evaluiert. Die HT-29/B6 Monolayer wuchsen wie bei Schmitz et al. beschrieben in Antibiotika-freiem RPMI 1640-Medium auf durchlässigen Polycarbonatfiltern, zur Befestigung (Mounting) diente ProTaq MountFluor (Biocyc, Luckenwalde) [56].

Die optische Darstellung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM, Zeiss LSM510META, Jena) mit einem 40X /1.2 W C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen). Zur 2 mm tiefen Darstellung des Gewebes wurden in zweidimensionaler XY-Schnittführung viele Schnittebenen (Z-stacks) zu einem dreidimensionalen mikroskopischen Bild kombiniert.

3.2.8 Bestimmung epithelialer Apoptose

Direkt nach dem Tod der Mäuse wurde das Kolon in 2% Paraformaldehyd fixiert, anschließend in Tissue-Tek O.C.T. medium (Sakura, Alphen, Niederlande) für die Kryosektionierung eingebettet und in 5 µm Schnitte zerteilt. Mittels 0,2% Triton X-100 Lösung wurde die Durchlässigkeit für die Färbung mit rabbit-anti-cleaved-caspase-3 (1:400, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) und mouse-anti-cytokeratin-20 Antikörper (1:100, Invitrogen, Karlsruhe) gewährleistet. Die Zählung der apoptotischen Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

3.3 α-Hämolyisin *in vitro* Versuche

3.3.1 Kolonepithelmodell HT-29/B6 auf Zellkulturfiltern

Als Kolonepithelmodell diente die Kolonkarzinomlinie HT-29, wobei der Subklon B6 dieser Zelllinie in unserem Labor etabliert wurde [57]. Werden HT-29/B6-Zellen auf Zellkulturfiltern (Millicell-PCF-Zellkulturfilter mit 0,6 cm² Grundfläche, Millipore, Schwalbach) ausgesät, so bilden sie bei entsprechender Kultivierung einen polarisierten Monolayer, der mit interzellulären Tight Junctions und einem apikalen Bürstensaum ein hochdifferenziertes Modell des menschlichen Kolonepithels bildet. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieser Monolayer auch Barrierequalitäten der Darmwand besitzt [58].

Zur Kultivierung des Zellfilters wurden 7x10⁵ Zellen pro cm² auf Zellkulturfilter gegeben und in Kulturschalen (Nunc, Dänemark) mit RPMI-Zellkulturmedium (plus 10% fetales Kälberserum, 1% Penicillin, 1% Streptomycin) für sieben bis acht Tage bei 37°C in mit 5% CO₂ angereicherter Umgebungsluft kultiviert. Anschließend wurde durch die apikale Gabe von HlyA-tragenden und HlyA-defizienten *E. coli* die intestinale Infektion mit hämolysierenden Bakterien simuliert.

Die Möglichkeit der Inhibierung der HlyA-Wirkung mittels Zink wurde durch die gleichzeitige Gabe von Zinkchlorid auf die apikale Seite des Zellfilters simuliert. Das Zinkchlorid wurde mit Zellkulturmedium auf 2 mM verdünnt und im Verhältnis 1:3 zu dem apikal vorhandenen Medium gegeben, sodass sich an der Enterozytenmembran eine Konzentration von 500 µM ZnCl₂ ergab.

3.3.2 Messung des transepithelialen Widerstands

Mit einem Widerstandsmessgerät (Chopstick-Elektroden: EVOM, World Precision Instruments, FL, USA und Voltometer: Eigenbau, D. Sorgenfrei, Institut für klinische Physiologie, Charité Berlin) wurde vor Beginn und im Verlauf der Infektion der transepitheliale Widerstand (R^t) in der Zellkultur gemessen. Mit zwei fixierten Elektrodenpaaren auf der apikalen und basalen Seite des Zellfilters wurden dabei Spannungsveränderungen eines Rechteckstroms zwischen den Elektroden erfasst. Während der Messung wurde die Temperatur des Kulturmediums mit einem Heizblock auf 37°C konstant gehalten. Zwischen den Messungen wurde die Kultivierung der Zellfilter unter Standardbedingungen im Zellkulturbrutschrank fortgeführt. Nach Korrektur der Messwerte um den Widerstand des Kulturmediums sowie des zellfreien Filters und die Berechnung des Widerstands auf die Zellfläche ($\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$) konnte so auf die Dichtigkeit der epithelialen Barriere zurückgeschlossen werden. Zum Vergleich der verschiedenen Zellfilter wurden die ermittelten Werte in Relation zu den initialen Widerständen vor Infektion gesetzt.

3.4 Allgemeines

3.4.1 Richtlinien

Die Versuche mit gentechnisch veränderten Bakterien wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Im Labor der Klinischen Physiologie, Gentechnische Anlage 357/02, von Herrn Prof. Dr. Schulzke liegt eine Genehmigung zum Umgang mit diesen Mikroorganismen vor. Vor Beginn der Versuche wurde richtiger Umgang mit gefährlichen Mikroorganismen und hygienisches Arbeiten erlernt. Die Genehmigung für die dargestellten Versuche an Tieren wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin unter der Genehmigungsnummer G0279/08 am 31.10.2008 erteilt. Bei der Durchführung der Experimente und dem Schreiben der Dissertationsschrift wurden „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten. Die Arbeit entstand im Rahmen des DFG-geförderten Projekts „Mechanismen epithelialer

Barrierestörung bei gastrointestinalen Infektionen“, wesentlich war die Bearbeitung des Abschnitts "Hämolyisinprävalenz bei CED-Patienten" (DFG Schu 559/11). Diese Studie mit Erhebung von Patientendaten ist konform mit der Deklaration von Helsinki zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen. Das Votum der Ethikkommission der Charité wurde erteilt (EA4/098/09).

3.4.2 Statistik

Die ermittelten Werte werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean= SEM) dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels zweiseitigem Student's T-Test oder dem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test für nicht-parametrische Daten. Die statistische Auswertung von nominalskalierten Werten erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur. Eine ermittelte Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($P < 0,05$) wurde als statistisch signifikant bewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bakterien am humanen Kolon

4.1.1 Bakterienkultur

Bei der Anzucht der Mukus-assoziierten Bakterien in aerober und anaerober Atmosphäre zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen (Darmgesunde, Colitis ulcerosa Patienten in Schub und Remission). Jedoch ergab sich eine Tendenz zu geringeren Bakterienzahlen bei CU, welche sowohl bei aerober als auch bei anaerober Anzucht zu beobachten war; aus dem Mukus der darmgesunden Kontrollen bildeten sich bei Anzucht auf Blutagarplatten mehr CFU (aerob: 439 ± 202 ; anaerob: 773 ± 144 ; n=9) als bei Patienten mit CU, wobei sich bei Patienten im Schub wiederum mehr Kolonien anziehen ließen (aerob: 287 ± 137 ; anaerob: 493 ± 132 ; n=10) als bei Patienten in Remission (aerob: 221 ± 88 ; anaerob: 411 ± 115 ; n=12) (Abb. 3A). Eine andere Verteilung ergab sich bei der Bestimmung des Anteils Hämolyse-bildender Kolonien an der Gesamtheit der CFU. Während bei Patienten im Schub in aerober und anaerober Anzucht $59\% \pm 14\%$ bzw. $33\% \pm 14\%$ der angezüchteten Kolonien zur Bildung von alpha- oder beta-Hämolyse imstande war, war dieser Anteil bei Patienten in Remission mit $51\% \pm 12\%$ bzw. $25\% \pm 10\%$ sowohl in aerober als auch in anaerober Anzucht geringer. Am niedrigsten war der Anteil Hämolyse-bildender Kolonien in aerober und anaerober Anzucht mit $32\% \pm 10\%$ bzw. $6\% \pm 6\%$ bei der Anzucht aus dem Mukus von darmgesunden Kontrollen (Abb. 3B).

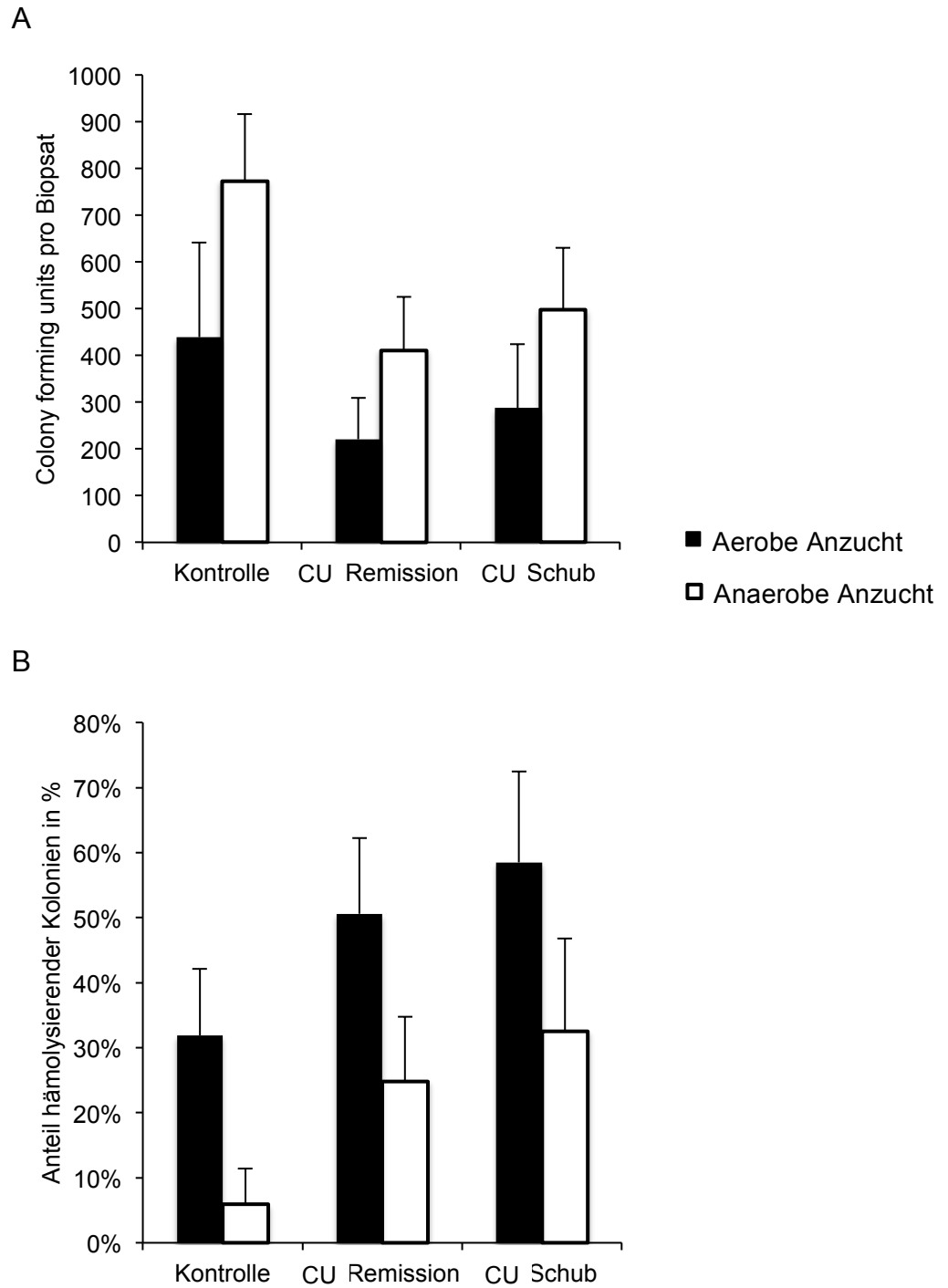


Abbildung 3: Quantifizierung der **Mucus-assoziierten Bakterien** nach aerober und anaerober Anzucht in gruppierten Säulendiagrammen. **(A)** CFU in absoluten Zahlen mit SEM. **(B)** Anteil hämolysierender Kolonien in Prozent. Dargestellt sind die Werte von 10 Patienten mit CU im Schub, 12 Patienten mit CU in Remission und 9 darmgesunden Kontrollen.

Die Auszählung der angezüchteten Mukosa-assoziierten bzw. intraepithelialen Bakterien ergab bei Patienten mit CU im Schub 21 ± 14 CFU bzw. 33 ± 15 CFU (n=10), bei Patienten mit CU in Remission 2 ± 1 CFU bzw. 6 ± 4 CFU (n=12) und bei darmgesunden Kontrollen 2 ± 1 CFU bzw. 1 ± 1 CFU (n=9) (Abb. 4A). Der Vergleich der Ergebnisse aus der Anzucht Mukosa-assoziiierter und intraepithelialer Bakterien von Patienten mit CU im Schub mit CU Patienten in Remission bzw. darmgesunden Kontrollen erreichte mit $P=0,070$ bzw. $P=0,061$ nicht das definierte Signifikanzniveau von $P<0,05$. Jedoch zeigte sich beim Vergleich der intraepithelialen Bakterien zwischen CU Patienten im Schub mit Proben von nicht entzündeten CU Patienten in Remission und darmgesunden Kontrollen zusammengenommen ein signifikanter Unterschied ($P<0,05$). Auch der Vergleich der Gruppen auf das Vorkommen von intraepithelialen Bakterien zeigte signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit CU im Schub (8 von 10) mit CU Patienten in Remission (2 von 12) ($P<0,01$) und darmgesunden Kontrollen (2 von 9) ($P<0,05$, Abb. 4B).

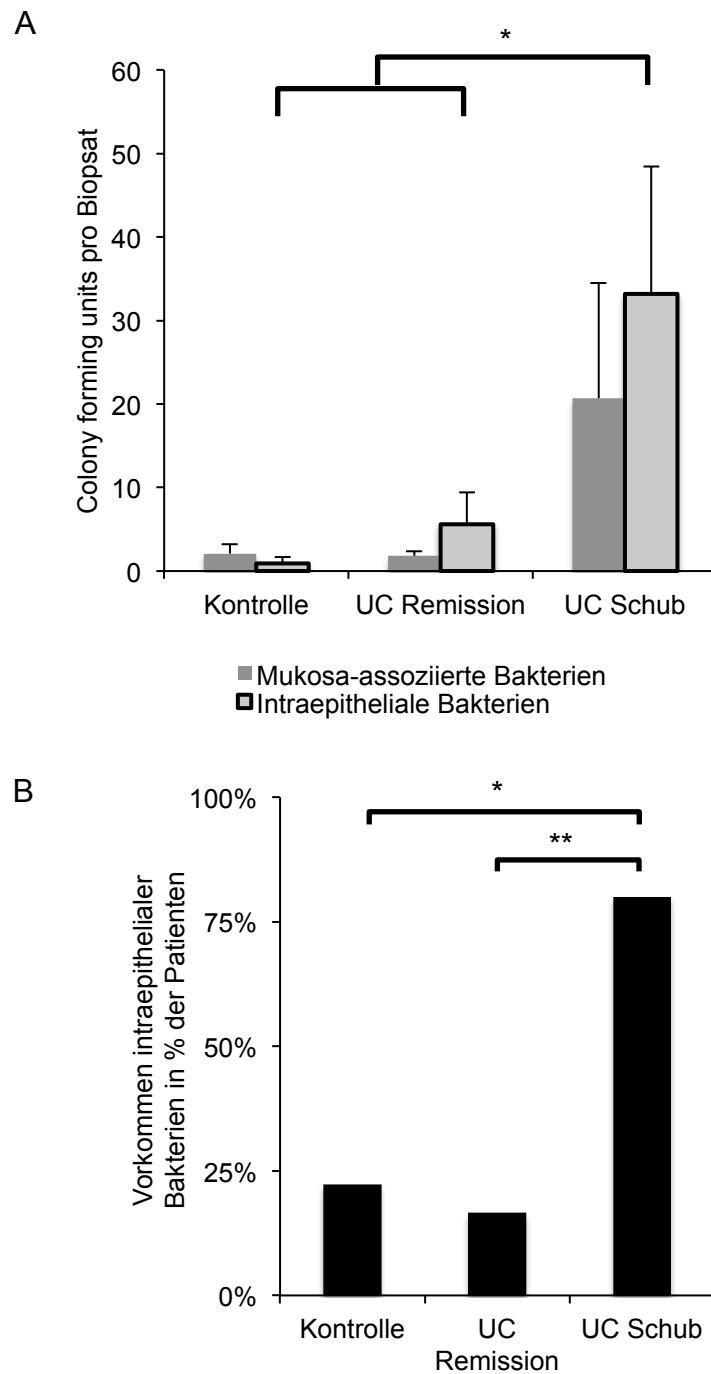


Abbildung 4: (A) Quantifizierung der **Mukosa-assoziierten und intraepithelialen Bakterien** in gruppierten Säulendiagrammen. Mittelwerte als CFU in absoluten Zahlen mit SEM. * $P < 0,05$ im zweiseitigen T-Test. **(B)** Vorkommen von intraepithelialen Bakterien in Prozent der Patienten aus aerober Anzucht bei darmgesunden Kontrollen und Patienten mit CU in Remission jeweils im Vergleich zu Patienten mit CU im Schub. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ im Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur. Dargestellt sind die Werte von 10 Patienten mit CU im Schub, 12 Patienten mit CU in Remission und 9 darmgesunden Kontrollen.

4.1.2 Primer-Auswahl

Die in dieser Arbeit verwendete Differenzierung zwischen den verschiedenen α -Hämolysinen der verschiedenen *E. coli* Pathovaren begründet sich im Unterschied der Nukleotidsequenzen, etwa im Vergleich von EHEC-Typ *hlyA* im Vergleich zum UPEC-Typ *hlyA*. Der paarweise Vergleich mittels Nucleotid-BLAST [59] zeigt eine nur ~70%ige Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz zwischen den Hämolysinen des UPEC-Stamms *E.coli* 536 und dem EHEC-Stamm *E. coli* O157:H7. Auch auf Proteinebene finden sich ähnlich große Unterschiede. Da bei vielen Arbeiten beim Versuch vom Nachweis von *hlyA* im menschlichen Kolon Primer für das EHEC-Typ Hämolysin verwendet werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit vier verschiedene Primerpaare für die Detektion von UPEC-Typ *hlyA* entwickelt. Unter vier verschiedenen Primern für UPEC-Typ *hlyA* wurde durch PCR das Primerpaar für die weiteren qPCR-Untersuchungen ausgewählt, welches unter den für die quantitative Bestimmung benötigten Bedingungen spezifische Banden in der Agarosegel-Elektrophorese erzeugte. Der Abgleich mit den NCBI-Datenbanken bestätigte seine Spezifität für die Detektion vom UPEC-Typ *hlyA* im Vergleich zum bei Kotlowski et al. 2007 [41] verwendeten Primerpaar (Tab. 6).

Stamm	Pathovar	PCR Primer HlyA536 diese Arbeit	PCR Primer HlyA59 [41]
<i>E. coli</i> 536	UPEC	+	
<i>E. coli</i> UMNK88	EPEC	+	
<i>E. coli</i> ABU 83972	UPEC-ähnlich	+	
<i>E. coli</i> O26:NM	EHEC	+	
<i>E. coli</i> ABU 37	UPEC-ähnlich	+	
<i>E. coli</i> ABU 27	UPEC-ähnlich	+	
<i>E. coli</i> O83:K24:H31	kommensal	+	
<i>E. coli</i> J96	UPEC	+	
<i>E. coli</i> 83-75	EHEC		+
<i>E. coli</i> O157:H7	EHEC		+
<i>E. coli</i> O111:H-	EHEC		+
<i>E. coli</i> O103:H2	EHEC		+
<i>E. coli</i> O26:H11	EHEC		+
<i>E. coli</i> EH41	EHEC		+

Tabelle 6: Auszug positiver PCR-Produkte für *E. coli* HlyA mittels Primer-BLAST [60]. UPEC-ähnliche Stämme in der Liste sind klinisch durch asymptomatische Bakteriurie gekennzeichnet.

4.1.3 *HlyA*-Messung

Bei der Bestimmung von *hlyA* in Biopsien aus dem Colon sigmoideum mittels qPCR ohne vorherige Anzucht wurden in 9 von 12 darmgesunden Kontrollen, 9 von 9 Patienten mit MC im Schub und 19 von 22 Patienten mit CU *hlyA*-tragende *E. coli* gefunden. In der quantitativen Auswertung konnten bei Patienten mit einer CU im Schub mehr als 10 mal so viele Kopien des *HlyA*-Gens detektiert werden als bei den darmgesunden Kontrollen ($P < 0,05$, Abb. 5A). Das vermehrte Vorkommen von *hlyA*-tragenden *E. coli* im Kolon war auf Patienten mit CU im Schub beschränkt. Bei Patienten mit MC im Schub, Patienten mit CU in Remission und darmgesunden Kontrollen fanden sich deutlich weniger Kopien des Gens (Abb. 5B). Auch wurden in Kolon-Biopsien von Patienten mit CU mikroskopisch *Focal Leaks* gefunden. Mittels IF-Färbung und LSM konnten *hlyA*-positive *E. coli* innerhalb der *Focal Leaks* dargestellt werden (Abb. 5C).

Während sich die Anzahl aller insgesamt detektierten Bakterien zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschied (7110 ± 3620 Kopien pro ng DNS bei CU im Schub, bzw. 4150 ± 3700 Kopien pro ng DNS bei darmgesunden Kontrollen), konnte mit dem Eco-Primer eine Tendenz zu einer Zunahme von *Enterobacteriaceae* bei CU im Schub gemessen werden (Abb. 5A).

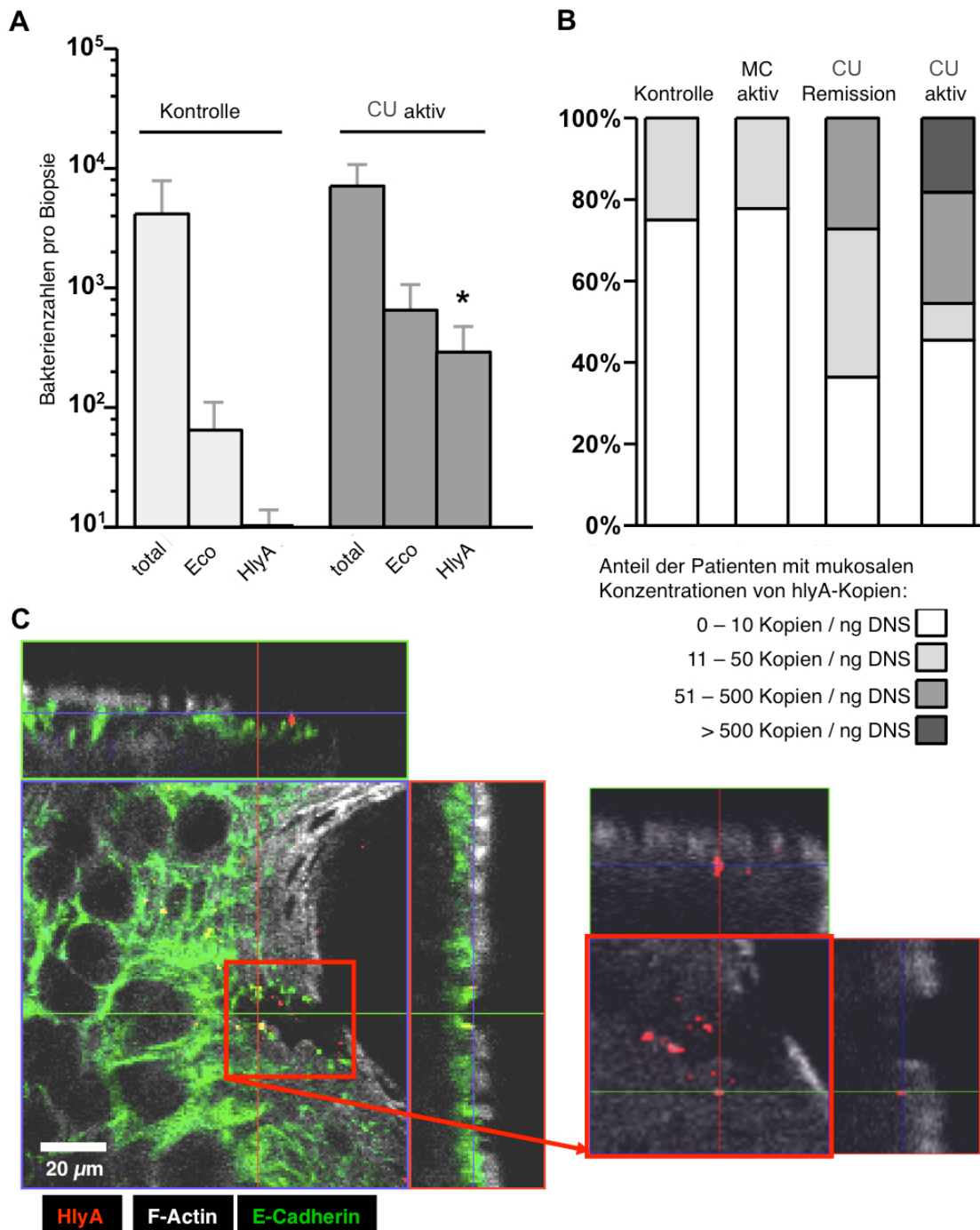


Abbildung 5: (A) *hlyA*-Messungen in humanen Kolon-Biopsien mittels qPCR. Anzahl aller Bakterien (total), *E. coli* (Eco) und *hlyA*-tragende *E. coli* (HlyA) pro ng DNS (entspricht etwa 10 μ g Biopsie) von 12 darmgesunden Kontrollen und 11 Patienten mit aktiver CU. * $P < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. (B) Anteil der Patienten mit den angegebenen unterschiedlichen Konzentrationen von mukosalen *hlyA*-tragenden *E. coli* pro ng DNS von 12 darmgesunden Kontrollen, 9 Patienten mit MC im Schub, 11 Patienten mit CU in Remission und 11 Patienten mit CU im Schub. (C) *Focal Leak* mit positiven Signalen von *hlyA*-tragenden *E. coli* in der menschlichen Kolon-Mukosa eines UC-Patienten mit Vergrößerung des apikalen Randes einer Krypte. Zu sehen ist ein intakter endogener Kontrollbereich ohne HlyA-Signal und ein *Focal Leak* bei Vorhandensein von HlyA (rot), während die Struktur von E-Cadherin (grün) und F-Actin (weiß) an dieser Stelle gestört ist. Im Ausschnitt des Epithels auf der rechten Seite sind nur F-Actin und HlyA dargestellt.

4.2 α -Hämolysin *in vivo* Versuche

4.2.1 Klinische Symptomatik im Mausversuch

Die orale Infektion der drei verwendeten Mauslinien mit *E. coli* 536 und *E. coli* 536-HDM mittels Schlundsonde führte zur erfolgreichen Kolonisation des Gastrointestinaltrakts. 48 Stunden nach Infektion betrug die Konzentration des entsprechenden Bakteriums zwischen 10^6 und 10^8 CFU pro g Faeces. Bei allen erfolgreich kolonisierten Mäusen wurde der klinische Colitis Score ermittelt, dazu wurde Körpergewicht, Kotkonsistenz und das Vorkommen von okkultem Blut im Kot ermittelt. Da das hier verwendete Mausmodell die frühe Phase einer intestinalen Entzündung repräsentiert, waren die klinischen Symptome nur schwach ausgeprägt. Die mildesten Symptome zeigten sich bei der Untersuchung der Wildtyp (WT)-Mäuse. Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit *E. coli* 536- und *E. coli* 536-HDM-infizierten Mäusen ergab sich in der Gruppe der Interleukin-10 defizienten (IL-10^{-/-}) und der monoassozierten (MA) Mäuse (Abb. 6).

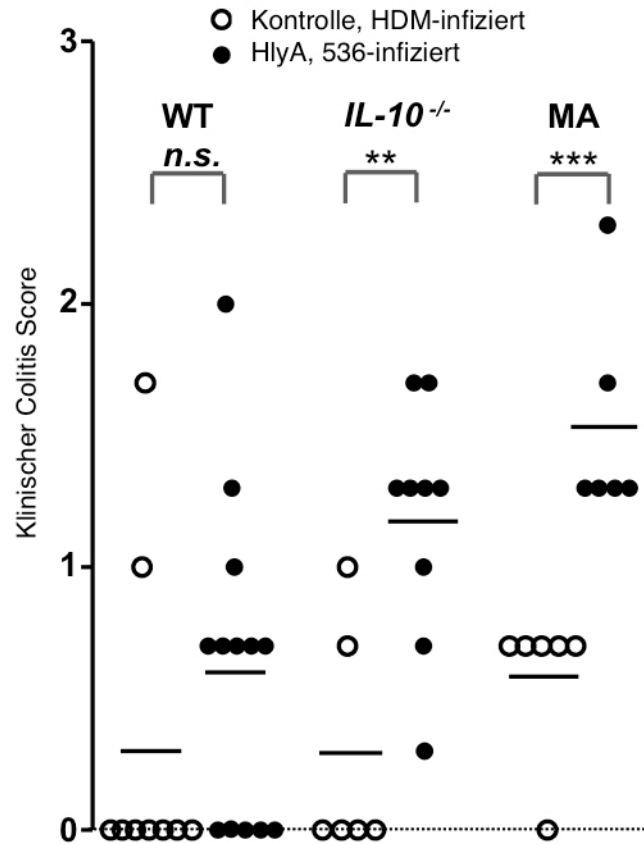


Abbildung 6: Klinischer Colitis Score, erfasst an Mäusen nach Kolonisation mit *E. coli* 536, verglichen mit dem HlyA-defizienten *E. coli* 536-HDM. Dargestellt sind WT- (Wildtyp), das IL-10^{-/-} Colitis Modell und die monoassoziierten (MA) Wildtyp-Mäuse. Die dargestellten Punkte entsprechen Einzelwerten, die Striche repräsentieren die Mittelwerte von 0 (gesund) bis 4 (maximale Colitis-Aktivität). **P<0.01, ***P<0.001, n.s.=nicht signifikant mit dem Student T-Test. Bei einer der sieben HDM-infizierten IL-10^{-/-} Mäuse gelang keine erfolgreiche gastrointestinale Kolonisation, sie wurde von der Analyse ausgeschlossen.

4.2.2 Histopathologie

Die Ergebnisse im klinischen Colitis Score ließen sich auch histopathologisch nachvollziehen. Die Mukosa von *E. coli* 536-infizierten Mäusen zeigte Anzeichen von Entzündung in Form von epithelialen Hyperproliferationen, fokalem Verlust von Krypten, vergrößerten Lymphfollikeln und einer leicht erhöhten lymphozytären Infiltration in die Lamina propria. Während sich das histologische Erscheinungsbild des Kolons der infizierten WT-Mäuse weitestgehend normal darstellte, konnten im Kolon von IL-10^{-/-}- und MA-Mäusen deutliche Unterschiede zwischen *E. coli* 536- und *E. coli* 536-HDM-infizierten Mäusen gesehen werden (Abb. 7). Besonders deutlich waren diese Veränderungen bei den genetisch vorbelasteten IL-10^{-/-}-Mäusen. Hier entwickelten die 536-infizierten Mäuse mit $1,8 \pm 0,4$ einen höheren histopathologischen Entzündungsscore als die HDM-infizierten Mäuse mit $0,6 \pm 0,2$ ($P < 0,05$, $n=5$, 3 bis 8 Tage post infectionem). In keinem der histologischen Schnitte war das histopathologische Bild zu einer ausgeprägten Colitis zu beobachten. Damit scheinen die Ergebnisse das Korrelat einer beginnenden Entzündungsreaktion zu sein. Das Vorhandensein von Epithel ohne größere Epithelläsionen wie Ulcera war zudem Voraussetzung für die elektrophysiologischen Messungen der epithelialen Barrierefunktion.

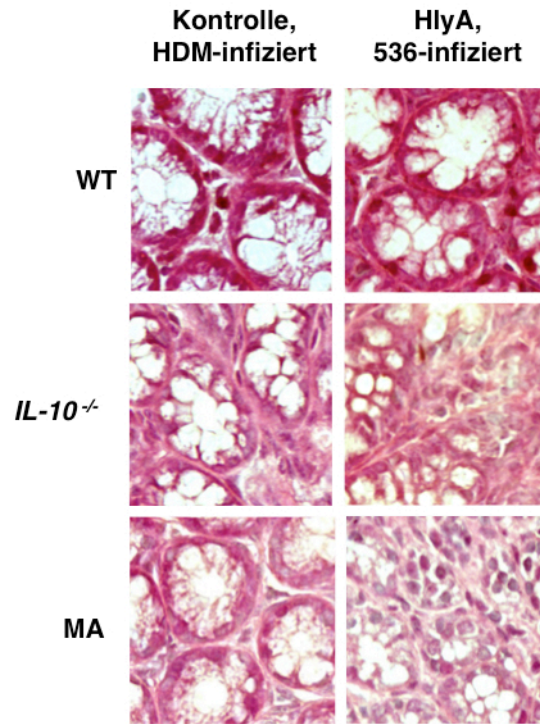


Abbildung 7: Repräsentative Darstellung der histopathologischen Ergebnisse an H&E-gefärbten Schnitten der Kolon-Mukosa von *E. coli* 536-infizierten WT-, IL-10^{-/-}, und MA-Mäusen. Zum Vergleich sind in der linken Spalte Schnitte von gesunder Mukosa *E. coli* 536-HDM-infizierter Mäuse dargestellt.

4.2.3 Elektrophysiologische Messungen und HRP-Flux

In Ussing-Experimenten konnten Rückschlüsse auf die Barrierefunktion des mukosalen Epithels von entnommenem Mäuse-Kolon gewonnen werden. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen dem Kolon *E. coli* 536-infizierter Mäuse und dem von *E. coli* 536-HDM-infizierten Kontrollen. Mittels Impedanzspektroskopie konnte in allen Maus-Modellen nach *E. coli* 536-Infektion ein signifikanter Abfall des transepithelialen Widerstands der Darmwand (R^t) gemessen werden (Abb. 8). Dieser Widerstandsabfall kann durch einen Verlust des epithelialen (R^{epi}) und/oder subepithelialen (R^{sub}) Widerstands zustande kommen. Im MA-Maus-Modell konnte der relative Abfall von R^t einem verminderten R^{epi} zugeordnet werden, R^{sub} blieb dagegen unverändert. Diese Tendenz war auch in den beiden anderen Maus-Modellen IL-10^{-/-} und WT zu beobachten, jedoch blieben die Ergebnisse hier knapp unterhalb des definierten Signifikanzniveaus.

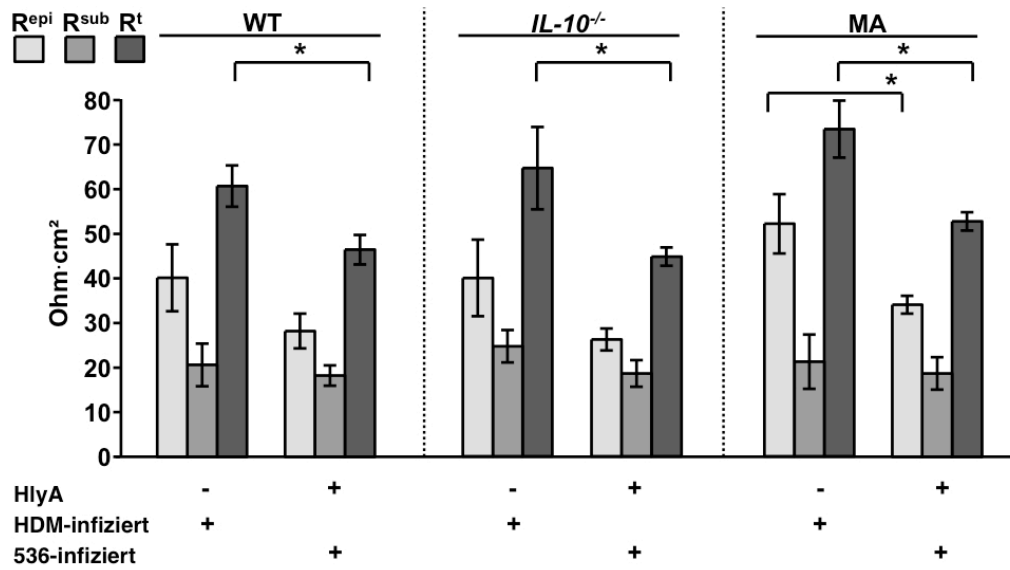


Abbildung 8: Darstellung des R^t (dunkelgraue Säulen) nach Infektion mit *E. coli* 536 bzw. *E. coli* 536 HDM, aufgeteilt in R^{sub} (graue Säulen) und R^{epi} (hellgraue Säulen) als gruppiertes Säulendiagramm. Der linke Bereich zeigt die Ergebnisse aus Versuchen mit WT-Mäusen (n=8 bzw. 7), in der Mitte sind die Ergebnisse der IL-10^{-/-}-Mäuse dargestellt (n=8 bzw. 6), rechts die Ergebnisse der MA-Mäuse (n=5 bzw. 5). *P<0,05 mit dem Student's T-Test.

Darüber hinaus ließ sich in den HRP-Flux-Messungen am Kolon von *E. coli* 536-infizierten Mäusen eine erhöhte Durchlässigkeit für Makromoleküle mit einer Molekülmasse von 44 kDa im Vergleich zu *E. coli* 536-HDM-infizierten Mäusen feststellen (Abb. 9). Im genetisch prädisponierten IL-10^{-/-}-Maus-Modell ist auch in der HDM-Kontrollgruppe ein erhöhter HRP-Molekülflux zu beobachten, dieser ist auf eine entzündlich vorgeschädigte Darmwand zurückzuführen und war bei 536-infizierten Mäusen darüber hinaus deutlich erhöht.

Selbst bei Fehlen eines messbaren Makromolekülfluxes über eine Darmbarriere ohne *Focal Leaks* oder *Ulcers* könnten *Tight Junction* (TJ)-Veränderungen im Epithel Einfluss auf die Flux-Rate haben und auch kleineren Molekülen oder Ionen den Übertritt durch die Darmbarriere ermöglichen. Daher wurde als zusätzlicher Marker für den Molekülflux über die Darmbarriere der Übertritt des 332 Da großen Fluorescein über die Darmwand bestimmt. Während am Kolon von WT- und MA-Mäusen nur eine verdoppelte Zunahme der Fluorescein-Durchlässigkeit zu beobachten war (1,04 ± 0,11 nmol·cm⁻²·h⁻¹ bei *E. coli* 536-infizierten WT-Mäusen, 0,47 ± 0,17 nmol·cm⁻²·h⁻¹ bei *E. coli* 536-HDM-infizierten Kontrollen, P<0,05, jeweils n=5; 0,79 ± 0,10 nmol·cm⁻²·h⁻¹ bei *E. coli* 536-infizierten MA-Mäusen, 0,41 ± 0,11 nmol·cm⁻²·h⁻¹ bei *E. coli* 536-HDM-infizierten Kontrollen, P<0,05, jeweils n=5) blieb die Zunahme des Fluorescein-Flux im IL-10^{-/-}-Maus-Modell noch unter der statistischen Signifikanzgrenze (0,91 ± 0,21 nmol·cm⁻²·h⁻¹ bei *E. coli* 536-infizierten IL-10^{-/-}-Mäusen, 0,51 ± 0,10 nmol·cm⁻²·h⁻¹ bei *E. coli* 536-HDM-infizierten Kontrollen, jeweils n=5). Diese vergleichsweise geringe Zunahme der Fluorescein-Durchlässigkeit lässt sich allein durch das Vorhandensein von *Focal Leaks* erklären und deutet nicht auf globale TJ-Veränderungen oder größere Veränderungen am Zytoskelett durch die HlyA-Infektion hin.

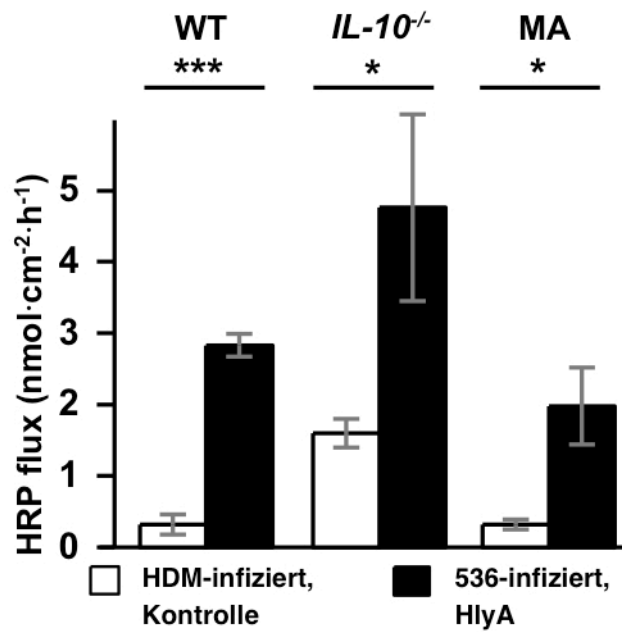


Abbildung 9: Darstellung des HRP-Flux über die Darmwand von mukosal nach serosal bei WT-, IL-10^{-/-}- und MA-Mäusen nach Infektion mit *E. coli* 536 (schwarz) bzw. *E. coli* 536 HDM (weiß) als gruppiertes Säulendiagramm. Die Konzentrationsmessung erfolgte über Bestimmung der enzymatischen Aktivität auf der basolateralen Seite der Membran. *P<0,05, ***P<0,001 mit dem Student T-Test.

4.2.4 Bestimmung des intrazellulären HRP

Um den Einfluss von Transzytose auf den Übertritt von HRP über die Darmbarriere zu bestimmen, erfolgte die Messung des intrazellulären HRP. Die lichtmikroskopische Darstellung von intrazellulärem HRP an Kolonschnitten von *E. coli* 536- und *E. coli* 536-HDM-infizierten MA-Mäusen zeigte häufige Akkumulation von intrazellulärem HRP. Jedoch unterschied sich die Häufigkeit von intrazellulärem HRP nicht zwischen den beiden Gruppen (62 % \pm 2 % HRP-positive Zellen in HlyA-infiziertem Mäusekolon bzw. 65 % \pm 5 % HRP-positive Zellen in HDM-infizierten Kontrollen, nicht signifikant, n = 3).

4.2.5 Bestimmung epithelialer Apoptose

Zur Bestimmung epithelialer Apoptose und insbesondere zur Detektierung von Bereichen in der Mukosa mit einem gehäuften Vorkommen von Apoptose wurde das Kolon-Gewebe von WT- (n=3), IL-10^{-/-} (n=4) und MA-Mäusen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen aktivierte gespaltene Caspase-3 gefärbt. Bereiche mit einer erhöhten Apoptoserate waren im Kolon von IL-10^{-/-} und MA-Mäusen, die mit HlyA tragendem *E. coli* 536 infiziert worden waren, nur sehr selten zu finden, wohingegen Apoptose an einzelnen Enterozyten gleichverteilt in allen Gewebeproben vorkamen (Abb. 10A). Insgesamt ließen sich weder im Vergleich der verschiedenen Mauslinien noch zwischen HlyA- und HDM-infizierten Mäusen signifikante Unterschiede feststellen (Abb. 10B).

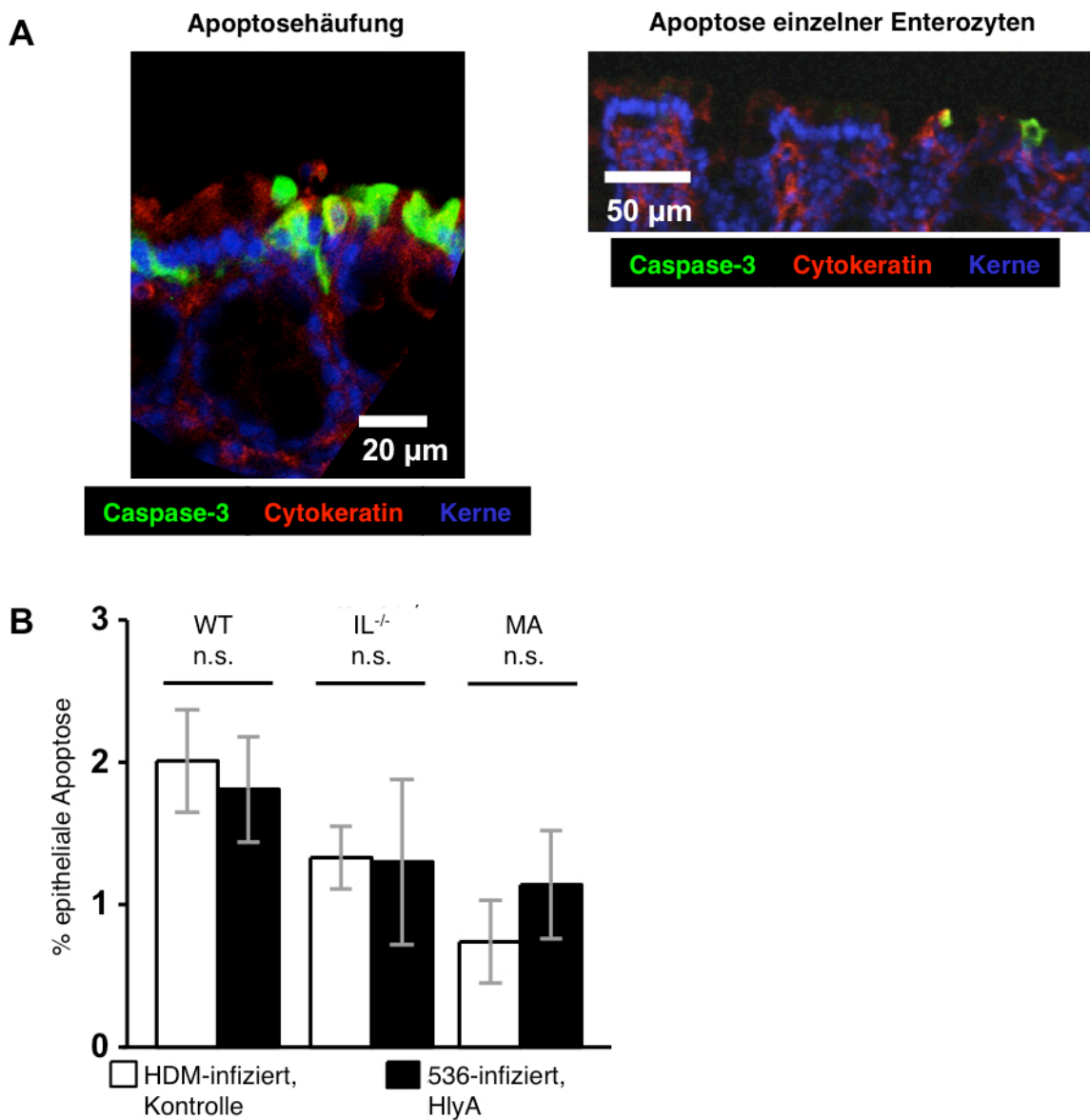


Abbildung 10: (A) Beispielhafte Darstellung von einem Bereich mit erhöhter Apoptoserate und Apoptose einzelner Enterozyten mittels Caspase-3-Färbung in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Das dargestellte Kolon-Gewebe wurde fünf Tage post infectionem direkt nach dem Tod der Mäuse fixiert. Während Apoptosehäufungen selten zu finden waren, waren Apoptosen einzelner Enterozyten in allen Präparaten gleichmäßig über das Gewebe verteilt. **(B)** Quantifizierung der Apoptoserate im Kolongewebe von WT- (n=3), IL-10^{-/-} (n=4) und MA-Mäusen (n=3) nach Infektion mit *E. coli* 536 (HlyA) oder *E. coli* 536 HDM (Kontrolle). Angabe in Prozent apoptotischer Zellen in einem Vergrößerungsfeld. Ausgezählt wurden vier verschiedene repräsentative Ausschnitte mit mindestens 1000 DAPI- und Cytokeratin-20-positiven Zellen. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) färbt Zellkerne blau. n.s. = nicht signifikant im Student T-Test.

4.2.6 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Fähigkeit von *E. coli* HlyA an einer Enterozytenoberfläche *Focal Leaks* zu induzieren, konnte bereits IF-mikroskopisch am Zellmodell aufgezeigt werden (siehe Abb. 2) [20]. Zur Darstellung von Läsionen mit bakterieller Kolokalisation aus einem *in vivo* Modell wurden ungeschnittene IF-Färbungen von Mäusekolon mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie begutachtet. Hier konnten in der Mukosa von *E. coli* 536-infizierten Mäusen *Focal Leaks* mit *E. coli* in der Läsion dargestellt werden (Abb. 11A). Diese Läsionen entsprachen in Größe und Form den im HT-29/B6-Monolayer beobachteten *Focal Leaks* (Abb. 11B). Typisch ist eine trichter- bis zylinderförmige Epithelaussparung mit Bakterienbesatz in der Läsion (Abb. 11C).

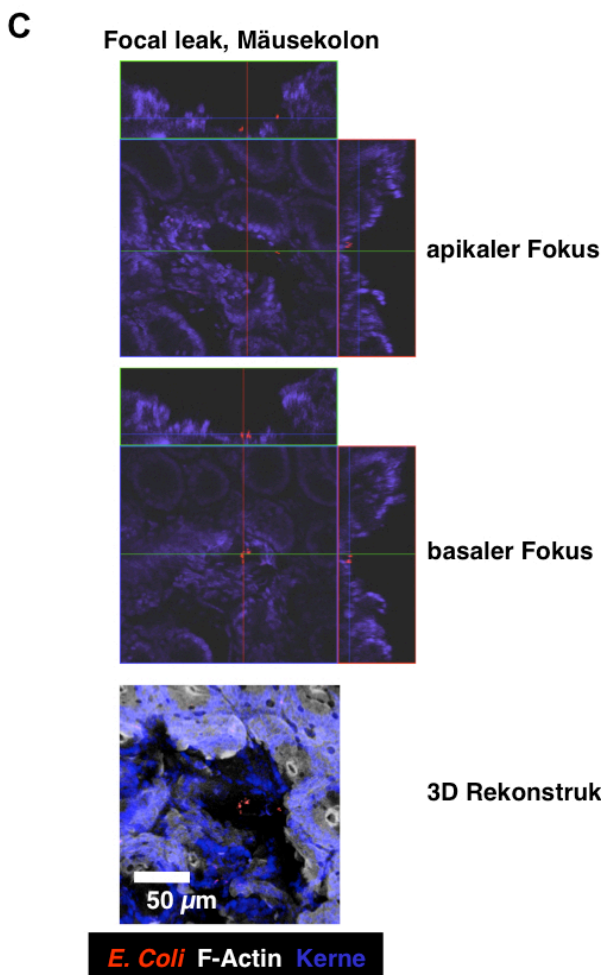
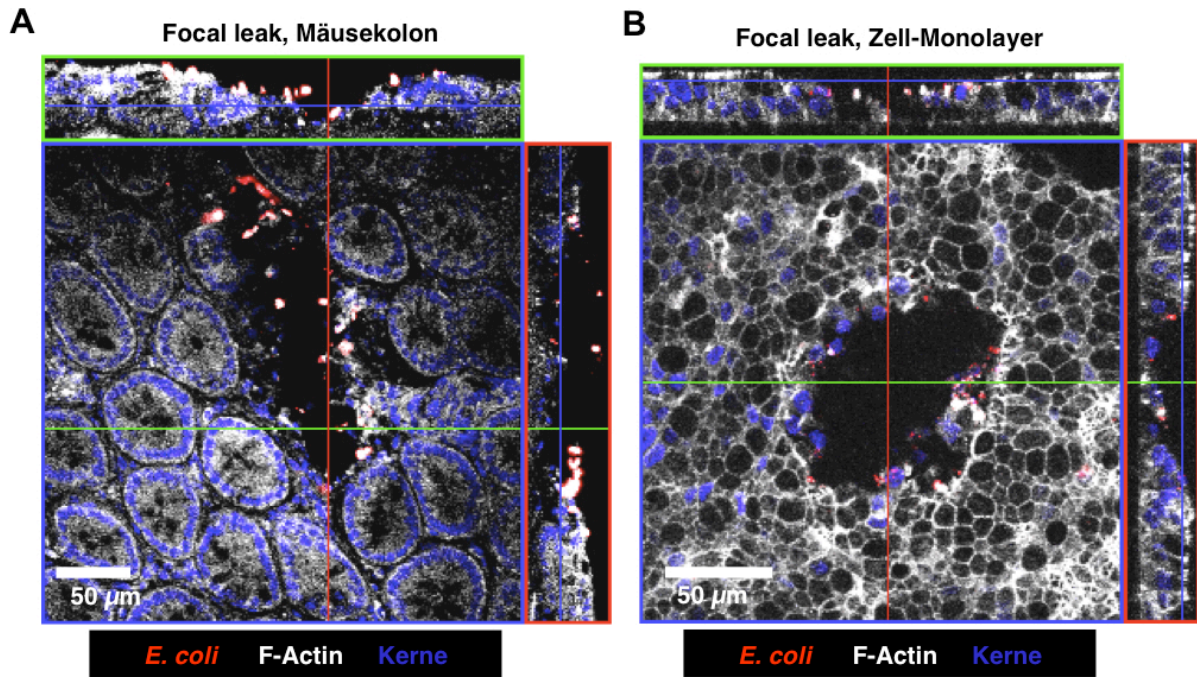


Abbildung 11: Darstellung von *Focal Leaks* mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach Immunfluoreszenzfärbung gegen *E. coli* (rot), F-Aktin (weiß) und Zellkerne mittels DAPI (blau). **(A)** *Focal Leak* im Kolon einer *E. coli* 536-infizierten WT-Maus **(B)** *Focal Leak* im Zellmodell der humanen Enterozytenzelllinie HT-29/B6 **(C)** apikaler und basaler Fokus auf ein kleineres *Focal Leak* mit kolokalisierten Bakterien im Mäusekolon sowie dreidimensionale Rekonstruktion des *Focal Leak*.

Interaktive dreidimensionale Rekonstruktion eines *Focal Leak* unter folgendem Link:



<http://gut.bmj.com/content/early/2014/02/17/gutjnl-2013-306099/suppl/DC1>

4.2.7 Berechnung der *Focal Leak*-Fläche

Zur IF-mikroskopischen Darstellung von Läsionen und kolokalisierten Bakterien wurde die MA Maus verwendet (Abb. 12A). Das Vorkommen von konfokalmikroskopisch darstellbaren *Focal Leaks* mit gleichzeitig darstellbarem Bakteriensignal beschränkte sich jedoch auf die Kolonproben *E. coli* 536-infizierter Mäuse (n=3). Im Kolon von *E. coli* 536-HDM-infizierten Mäusen (n=3) konnten keine *Focal Leaks* gefunden werden. Zur Quantifizierung der *Focal Leak*-Fläche wurden die dargestellten Läsionen digital markiert und vermessen. Auf einer Fläche von 0,049 cm², welche mit 4 900 000 µm² die in der Ussing-Kammer untersuchte Epithelfläche repräsentiert, wurden eine bis vier Läsionen mit einer Fläche von jeweils 2000 bis 50 000 µm² gefunden. Mit einer akkumulierten Gesamt-*Focal Leak*-Fläche von durchschnittlich 54 000 µm² nahmen die Läsionen in *E. coli* 536-infizierten MA-Mäusen etwa 1,1% der insgesamt untersuchten Epithelfläche ein. Auch in den *E. coli* 536-infizierten WT-Mäusen konnten *Focal Leak*-ähnliche Strukturen gefunden werden, das Kolongewebe von *E. coli* 536-HDM-infizierten WT-Mäusen jedoch war intakt und ohne Läsionen (Abb. 13B). Dennoch konnten auch im *E. coli* 536-HDM-infizierten Kolongewebe von IL-10^{-/-}-Mäusen Läsionen gefunden werden. Diese waren jedoch deutlich kleiner als die Läsionen im Kolon von *E. coli* 536-infizierten IL-10^{-/-}-Mäusen und entsprechen damit am ehesten dem pathologischen Korrelat einer schon beginnenden intestinalen Entzündung (n=3, Abb. 12B). Insgesamt konnte in jedem der drei Maus-Modelle eine Zunahme der mukosalen *Focal Leak*-Fläche bei Infektion mit HlyA produzierenden *E. coli* 536 im Vergleich zur Infektion mit HlyA-defizientem *E. coli* 536-HDM gemessen werden. Zum Vergleich des in den Ussing-Experimenten bestimmten HlyA-induzierten Widerstandsabfalls mit der gemessenen *Focal-Leak*-Fläche wurden Berechnungen zur epithelialen Leitwert (G), dem inversen ohmschen Widerstand, durch *Focal Leaks* mit folgender Formel durchgeführt:

$$G_{\text{epi leak}} = G_{\text{epi}} \cdot (100\% - \% \text{ Focal Leak-Fläche}) + G_{\text{leak}} \cdot \% \text{ Focal Leak-Fläche}$$

Hierbei steht $G_{\text{epi leak}}$ für den Leitwert des *Focal Leak*-geschädigten Epithels, G_{epi} entspricht dem Leitwert des ungeschädigten Epithels und G_{leak} dem Leitwert der *Focal Leak*-Fläche. Unter Kontrollbedingungen ergeben Widerstandsmessungen einen G_{epi} von 20 mS·cm⁻² (entsprechend einem Widerstand von 50 Ω · cm²), ein

Einzelzellschaden entspricht dem Leitwert von 1,73 μS [61]. Bei einer Zellgröße von 5 bis 7 μm ergeben Berechnungen einen ungefähren G_{leak} von 1000 bis 2000 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ für die gegebene *Focal Leak*-Fläche. Bei vorsichtiger Annahme eines G_{leak} von 1000 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ und 1% *Focal Leak*-Fläche ergibt sich für die Rechnung:

$$G_{\text{epi leak}} = 20 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2} \cdot (100\% - 1\%) + 1000 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2} \cdot 1\% = 29,8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$$

Da der Leitwert dem inversen ohmschen Widerstand entspricht, ergibt sich für das *Focal Leak*-geschädigte Gewebe folgender Widerstand ($R_{\text{epi leak}}$):

$$R_{\text{epi leak}} = 1000 \cdot (G_{\text{epi leak}})^{-1} = 1000 \cdot (29,8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2})^{-1} = 33,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$$

Der anhand der *Focal Leak*-Fläche berechnete Widerstand des *Focal Leak*-geschädigten Gewebes entspricht damit in etwa den mittels Impedanzspektroskopie gemessenen Werten am Mäusekolon (vgl. Abb. 8). Darüber hinaus konnte durch Bestimmung der *Focal Leak*-Fläche an einem Zellmodell mit der humanen Enterozytenzelllinie HT-29/B6 nach Infektion mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli* 536 gezeigt werden, dass die Schädigung des Epithels durch die Bildung von *Focal Leaks* konzentrationsabhängig ist (Abb. 12C).

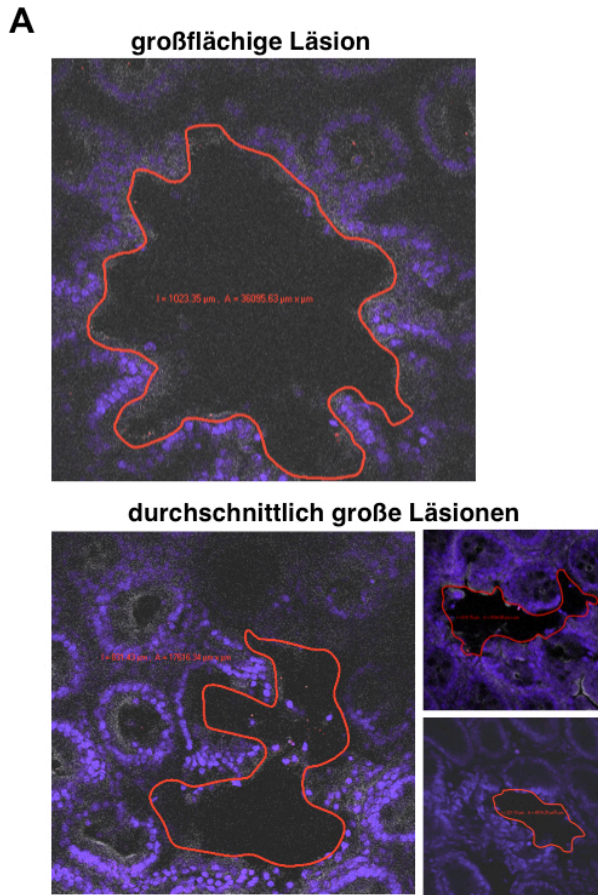
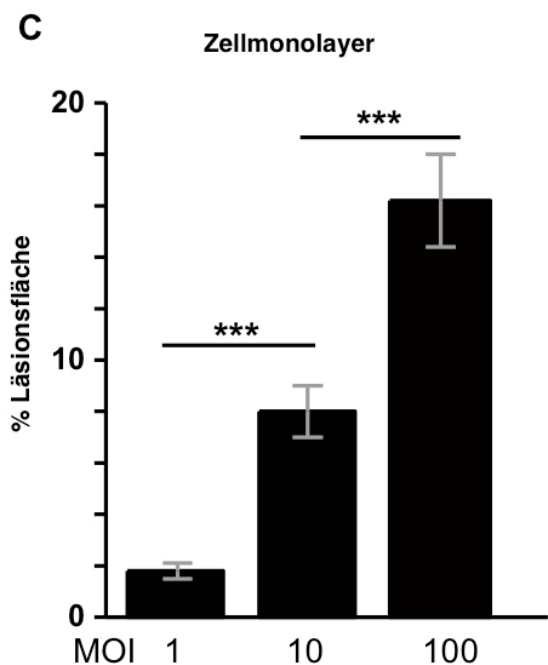
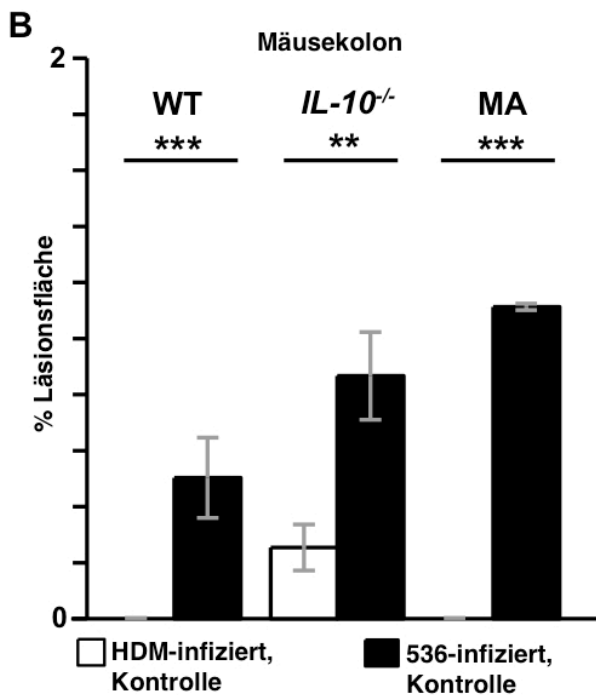


Abbildung 12: (A) Exemplarische Darstellung von großflächigen und durchschnittlich großen Läsionen aus MäusekOLON nach IF-Färbung mit F-Aktin (weiß) und DAPI (blau). Der Rand der Läsion ist durch eine rote Linie markiert. Die Vermessung der *Focal Leak*-Fläche erfolgte mit der Zeiss LSM Image Examiner Software (B) Quantifizierung der *Focal Leak*-Fläche pro Vergrößerungsfeld in Prozent. Vermessen wurden etwa 0,1 cm² eines IF-gefärbten ungeschnittenen MäusekOLON, *Focal Leaks* wurden mikroskopisch gesucht und digital markiert. Die Fläche der 1 bis 4 markierten *Focal Leaks* wurde durch die gesamte Vermessungsfläche geteilt. Während in *E. coli* 536 HDM-infiziertem MäusekOLON von IL-10^{-/-}-Mäusen *Focal Leaks* dargestellt werden konnten, konnten in *E. coli* 536 HDM-infizierten MA- und WT- Mäusen in drei unterschiedlichen Färbungen von mindestens drei Versuchstieren keine *Focal Leaks* gefunden werden (n=3). (C) Dosisabhängiges Vorkommen von *Focal Leaks* am Enterozyten-Zellmodell mit humanen HT-29/B6 Zellen nach dreistündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationsstufen (MOI, multiplicity of infection; Infektionsvervielfachung) von *E. coli* 536 (je n=3 pro MOI). **P<0,01, ***P<0,001 mit dem Student T-Test.



4.3 α -Hämolyisin *in vitro* Versuche

4.3.1 Hemmung von α -Hämolyisin im Zellmodell mittels Zink

Die Fähigkeit von *E. coli* 536 zur Barrierschädigung am Enterozyten-Zellmodell konnte bereits durch Tröger und Kollegen gezeigt werden. Durch den Vergleich mit HlyA-defizienten *E. coli* 536-HDM und IF-mikroskopischer Darstellung von *Focal Leaks* konnte α -Hämolyisin als Pathogenitätsfaktor nachgewiesen werden [20]. Zur Überprüfung der Möglichkeit, die HlyA-Wirkung an der Enterozytenmembran zu inhibieren, wurden *E. coli* 536 (n=4) und ein abzentrifugierter Überstand von *E. coli* 536 in Zellkulturmedium (n=4) alleine und zusammen mit Zinkchlorid (jeweils n=4) auf einen HT-29/B6 Zellmonolayer in Zellkulturmedium gegeben und der transepitheliale elektrische Widerstand (R^t) im Zeitverlauf bestimmt. Zur Überprüfung der Wirkung von $ZnCl_2$ an der Enterozytenmembran wurde $ZnCl_2$ ohne bakteriellen Zusatz auf den Zellmonolayer gegeben (n=4).

Nach Gabe von *E. coli* 536 Überstand in Zellmedium auf den Zellmonolayer fiel der über das Epithel gemessene R^t im Zeitverlauf zunehmend ab. Dieser R^t -Abfall konnte bei alleiniger Zugabe von $ZnCl_2$ und bei Zugabe von *E. coli* 536 Überstand in Zellmedium mit $ZnCl_2$ nicht gemessen werden (Abb. 13A). Auch die Gabe von *E. coli* 536 auf den Zellmonolayer konnte im Vergleich zur Gabe von *E. coli* 536 mit $ZnCl_2$ den R^t signifikant senken (Abb. 13B).

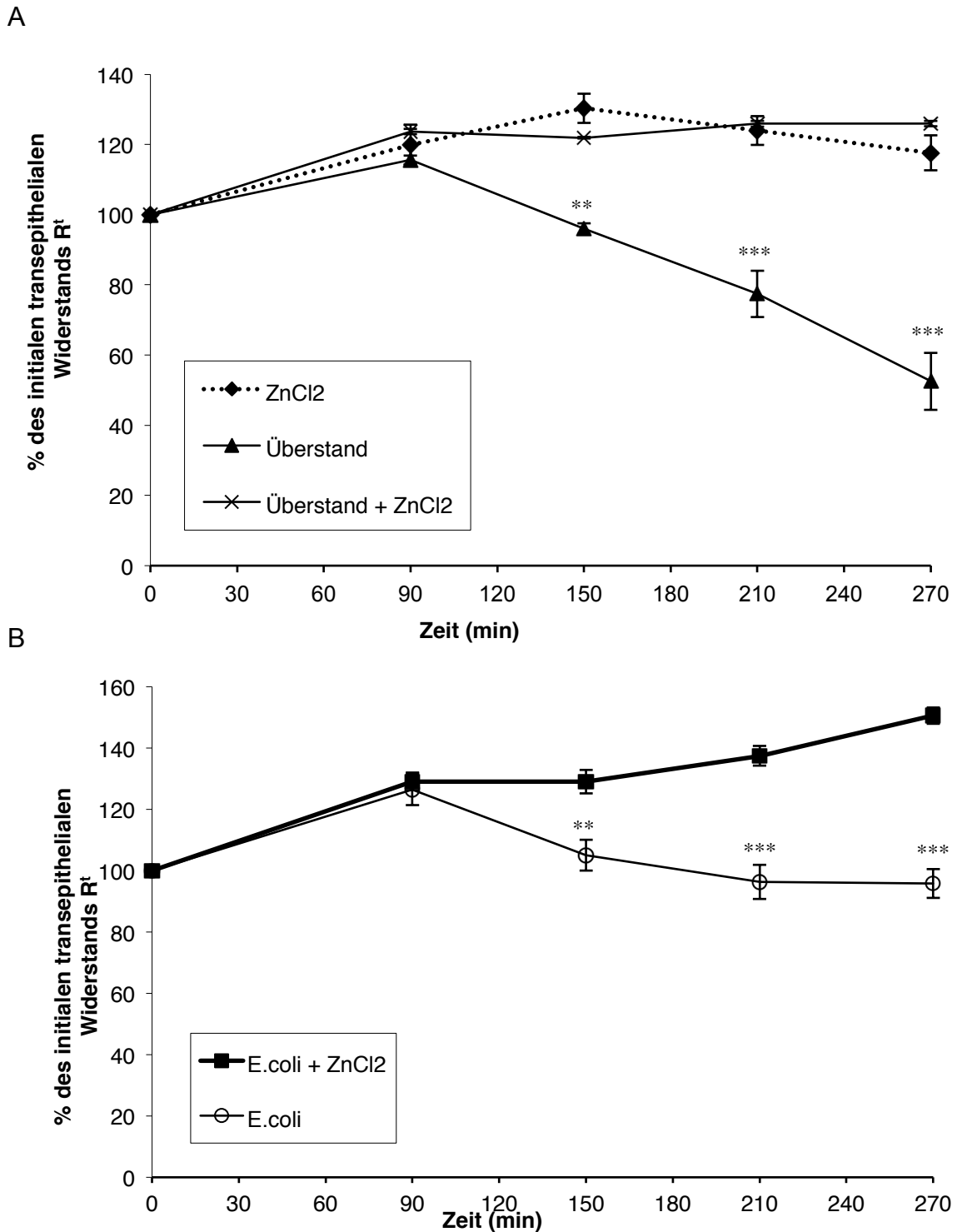


Abbildung 13: Darstellung der Veränderung des transepithelialen elektrischen Widerstands (R_t) eines HT-29/B6-Monolayers in Zellkulturmedium im Zeitverlauf. **(A)** R_t nach Zugabe von Zinkchlorid, *E. coli* 536 Überstand in Zellmedium und *E. coli* 536 Überstand in Zellmedium mit ZnCl₂ **(B)** R_t nach Zugabe von *E. coli* 536 und *E. coli* 536 mit ZnCl₂ (jeweils n=4). **P<0,01; ***P<0,001

5 DISKUSSION

Die Interaktion der intestinalen Mikrobiota mit der Darmoberfläche des Wirtes ist für seine metabolische und immunologische Homöostase von großer Bedeutung. Viele Infektionserkrankungen können einzelnen Bakterienspezies oder Bakterienstämmen als definierte Auslöser zugeordnet werden. In einer Arbeit unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass der UPEC-Stamm *E. coli* 536 mit Hilfe seines α -Hämolysins in der Lage ist, Läsionen an Kolonzellen in einem Zellmodell (HT-29/B6) auszulösen [20]. Daher sollte in dieser vorliegenden Arbeit nun die Auswirkung einer intestinalen Kolonisierung mit *E. coli* 536 in einem *in vivo* Modell sowie das Vorkommen von Hämolysin-bildenden *E. coli* im menschlichen Darm an Patienten untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte insbesondere auch die Rolle von HlyA-produzierenden Bakterien im Zusammenhang mit CED überprüft werden.

Zwischen 420 000 und 470 000 Menschen in Deutschland sind an einer CED erkrankt [62]. Zur Pathogenese der Erkrankung wird bereits seit Jahrzehnten geforscht. In den letzten Jahren sind vor allem intestinale Barrierestörungen und veränderte Mikrobiota in den Fokus der CED-Forschung gerückt [63, 64]. Um einen möglichen Einfluss bakterieller Toxine auf einen intestinalen Barrieredefekt zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Schleimhautproben von Patienten mit einer CED auf ihre bakterielle Besiedlung hin überprüft. Insbesondere die quantitative Messung HlyA-produzierender Bakterien sollte einen Anhalt dafür geben, ob das α -Hämolysin einen Einfluss auf die intestinale Entzündung haben könnte. Hierzu war insbesondere die Unterscheidung von Remission und Schubphase bei CU von Bedeutung.

5.1 Mukosa-assoziierte Bakterien bei Colitis ulcerosa

Die in dieser Arbeit in der Bakterienkultur gemessene Tendenz zur Zunahme Mukosa-assoziiierter Bakterien im Schub bei Patienten mit CU konnte in anderen Arbeiten auch mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) aufgezeigt werden. Swidsinski et al. konnten zeigen, dass eine Zunahme von mukosalen Bakterien, insbesondere *Bacteroides* spp. und *E. coli*, bei CED-Patienten im Schub unabhängig

vom Vorkommen fäkaler Bakterien zu beobachten ist [65]. Mylonaki et al. konnten die Zunahme Epithel-assoziiierter Bakterien durch molekulare Charakterisierung noch genauer einzelnen Bakteriengruppen zuordnen und damit möglicherweise probiotische und darmpathogene Bakterien bei CU benennen. Während sich bei Patienten mit CU in Schub und Remission am Epithel weniger *Bifidobacteria* fanden als bei darmgesunden Kontrollen, war gleichzeitig eine Zunahme von *E. coli*-Stämmen bei CU-Patienten im Schub im Vergleich zu Patienten in Remission zu beobachten [66].

Mit einer Kombination von *ex vivo* FISH-Färbung und konfokaler Laser-Endomikroskopie *in vivo* konnten Moussata et al. intraepitheliale Bakterien bei Patienten mit CU nachweisen [67]. Bei 60% der untersuchten CU-Patienten fanden sich intraepitheliale *E. coli*. Bei gesunden Kontrollen konnten diese in nur 14% der untersuchten Probanden nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Nachweis nun auch mittels Bakterienkultur erbracht werden. Darüber hinaus konnte das Ergebnis mittels Unterscheidung zwischen CU-Patienten in Schub und in Remission noch genauer differenziert werden. Mit einem Anteil von 80% CU-Patienten im Schub, bzw. 17% CU-Patienten in Remission und 22% darmgesunden Kontrollen mit intraepithelialen Bakterien (vgl. Abb. 4B) sind die hier erhobenen Daten mit denen der konfokalen Laser-Endomikroskopie vergleichbar.

Insgesamt konnte so in der vorliegenden Dissertation mittels Bakterienkultur gezeigt werden, dass es im Schub einer CU tendenziell zur Zunahme hämolysierender Bakterien an der Kolonmukosa kommt. Der vermehrte Nachweis intraepithelialer Bakterien zeigt, dass es den Bakterien im Schub gelingt, die gastrointestinale Barriere zu überwinden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass bei CU die intestinale Barriere u.a. durch eine verringerte Mukusschicht mit geringeren antimikrobiellen Eigenschaften gestört ist [64]. So scheint den luminalen Mikrobiota der Zugang zum Epithel erleichtert zu werden. Der Übergang von Bakterien in den Intraepithelialraum jedoch ist hierdurch alleine nicht zu erklären. Ein Einfluss weiterer Pathogenitätsfaktoren, etwa von Toxinen, welche die Integrität des Zellverbandes stören können, erscheint im Zusammenhang mit dem vermehrten intraepithelialen Nachweis hämolysierender Bakterien wahrscheinlich.

5.2 Erhöhte Prävalenz von HlyA bei CED

Dass HlyA, ein Toxin eines für extraintestinale Infektionen bekannten Bakteriums, so häufig an der menschlichen Darmwand gefunden werden kann, wurde lange Zeit lediglich als Epiphänomen interpretiert. Das häufige Vorkommen schien durch seine Rolle als kommensales Bakterium im Darm bedingt zu sein. Seine Wirkung als Pathobiont im Harntrakt wurde getrennt davon bewertet. Jedoch scheint das Vorkommen der chromosomalen Pathogenitätsinseln (PAI I und PAI II) des *E. coli* 536, auf denen HlyA kodiert wird, die Fähigkeit des Bakteriums zur intestinalen Kolonisation zu begünstigen [49]. Das in dieser Arbeit gemessene Vorkommen von HlyA in einem großen Teil der untersuchten Proben, darunter auch im Kolon von darmgesunden Kontrollen, ist konsistent mit dem hohen Anteil von hämolysierenden *E. coli* gemessen im humanen Stuhl [68]. Auch im Vergleich von Kolon-Biospien von CED-Patienten mit denen darmgesunder Kontrollen konnten mittels PCR mit ähnlichen Primern in beiden Gruppen bei etwa 20% der mittels Bakterienkultur angezogenen *E. coli hlyA* nachgewiesen werden [69]. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch in Untersuchungen von *E. coli*-Isolaten aus CU Patienten mittels genomischer Hybridisierung mit Microarray. Hier konnte in zwei der fünf untersuchten Isolate *hlyA* gefunden werden [70].

Noch vor der Erfindung des genetischen Nachweises durch PCR untersuchten Cooke und Kollegen Stuhl von Patienten mit CU im Schub und in Remission [71]. Sie fanden bei Patienten im Schub in der Bakterienkultur häufiger hämolysierende *E. coli* als bei Patienten in Remission. Auch im Längsschnitt konnte bei Patienten, die in Schub und Remission untersucht worden waren, eine entsprechende Konversion des Trägerstatus hämolysierender *E. coli* aufgezeigt werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun mittels qPCR gezeigt werden, dass HlyA-produzierende *E. coli* im menschlichen Darm regelmäßig vorkommen. Somit scheint das häufigere Vorkommen hämolysierender *E. coli* an der Darmwand von Patienten mit CU im Schub den UPEC-Stämmen zugeordnet werden zu können. Dieses Ergebnis ist nicht nur qualitativ durch Gennachweis gesichert, durch die Quantifizierung mittels qPCR konnten auch absolute Zahlen (copy numbers) bestimmt werden. Diese zeigen, dass HlyA-tragende Bakterien im Schub einer CU in höheren Zahlen zu finden sind.

In der vorliegenden Studie konnten an fast allen untersuchten Kolonbiopsaten HlyA-

tragende Bakterien gefunden werden. Dieser im Vergleich zu den o.g. Studien vermehrte Nachweis lässt sich mit der kulturunabhängigen Nachweisteknik erklären. Durch die direkte Gewinnung bakterieller DNA aus der Biopsie ohne vorherige Kultivierung können sowohl eine größere Anzahl an Bakterien als auch nicht anzüchtbare Bakterien untersucht werden (z.B. alle Bakterien in der Probe mit Eubac-Primer vs. Eco-Primer). Darüber hinaus scheint die quantitative PCR besonders vorteilhaft für Untersuchungen im komplexen Darmmikrobiom (vergleiche dazu [72]). Somit lassen die vorliegenden Ergebnisse die Aussage zu, dass HlyA-tragende Bakterien auch im gesunden Darm häufig vorkommen. Dass im Rahmen dieser Arbeit HlyA-tragende *E. coli* auch in Läsionen in einer endoskopisch unauffälligen Schleimhaut eines insgesamt nur milde entzündeten Kolons gefunden werden konnten, spricht dafür, dass HlyA eine Rolle bei der Initiierung von mukosalen Läsionen zugeschrieben werden könnte.

Somit konnte in dieser Arbeit nicht nur zum ersten Mal aufgezeigt werden, dass HlyA-tragende Bakterien im menschlichen Kolon häufig vorkommen, sondern auch, dass das vermehrte Vorkommen von HlyA-produzierenden *E. coli* im Kolon mit dem Schub einer CU assoziiert zu sein scheint. Dies wirft die Frage nach dem Einfluss von HlyA auf die Entwicklung einer CU bzw. der Initiierung eines Schubs der Erkrankung auf.

5.3 HlyA vom EHEC- und vom UPEC-Typ

Trotz ähnlicher Proteingrößen und prinzipiell gleichen Genstrukturen weisen die Proteine der RTX-Familie große Unterschiede in Sequenz, Aufbau und Funktionsweise der verschiedenen Toxine auf [14]. Zwar stammt das auf der chromosomalen Pathogenitätsinseln liegende HlyA vom UPEC-Typ und das Plasmid-kodierte HlyA vom EHEC-Typ von einem gemeinsamen Gen ab [15], doch konnte in dieser Dissertation im Vergleich der Nukleotidsequenz der *hlyA*-Gene von UPEC- und EHEC-Stämmen nur eine Homologie von ~70% festgestellt werden. Während HlyA von UPEC-Stämmen bei Untersuchungen an der Darmwand auch bei nicht-blutigen Durchfällen gefunden wird, konnten Untersuchungen auf HlyA von EHEC-Stämmen keine Resultate liefern [41, 42, 73]. Auch in unseren Untersuchungen

konnte in keiner der untersuchten Patientenproben EHEC-spezifisches HlyA nachgewiesen werden. Daher liegt der Schluss nahe, dass das HlyA von EHEC-Stämmen als ein prinzipiell anderes Toxin der RTX-Familie eingeordnet werden muss [16].

5.4 Fokale Läsionen

Schon seit einigen Jahrzehnten wird die Rolle von HlyA als Virulenzfaktor bei Diarrhöerkrankungen diskutiert [74]. Ein möglicher Pathomechanismus konnte jedoch bislang nicht gefunden werden. In einer Arbeit aus unserer Gruppe konnte im Zellmodell die Bildung von *Focal Leaks* am Kolonepithelzellen durch HlyA nachgewiesen werden und erstmals auch als neuartiger Mechanismus für die bakterielle Translokation aufgezeigt werden [20]. Die durch UPEC-HlyA induzierten Läsionen unterscheiden sich jedoch von den Läsionen, welche die als enteropathogen definierten *E. coli*-Stämme an der Darmschleimhaut bilden (attaching and effacing (E/A) lesions). Dieser Unterschied ist genetisch determiniert. Dem in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* 536 fehlt das auf der LEE (Locus of enterocyte effacement)-Pathogenitätsinsel kodierte *E. coli* attaching and effacing-Gen (*eae*-Gen), welches alle enteropathogenen *E. coli* tragen. Die durch enteropathogene *E. coli* induzierten Intimin- und EspF-vermittelten Läsionen mit füßchenförmiger Aktin-Formation lassen sich nach Infektion mit *E. coli* 536 nicht nachweisen [75]. Also scheint der Pathomechanismus der *Focal Leaks* am Kolonepithel sich von den durch enteropathogene *E. coli* induzierten Läsionen grundsätzlich zu unterscheiden.

In dieser vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals eine HlyA-induzierte *Focal Leak*-Bildung am Kolonepithel in einem *in vivo*-Modell aufgezeigt werden. Der genaue Mechanismus der *Focal Leak*-Bildung bleibt bislang jedoch ungeklärt. Zwar ist bekannt, dass sich bei CED im Kolonepithel durch das Th2-exprimierte Zytokin IL-13 erhöhte Apoptoseraten finden lassen [76], doch war in dieser Dissertation kein Einfluss apoptotischer Ereignisse im Epithelverband auf die *Focal Leak*-Bildung darstellbar. Dennoch ist ein fokaler apoptosebedingter Effekt durch HlyA an der Darmwand nicht völlig auszuschließen. So ist HlyA z.B. am renalen Epithelmodell in

der Lage Apoptose zu induzieren [77].

Ein weiterer Mechanismus der HlyA-induzierten Zellschädigung scheint durch eine gesteigerte Kationen-Permeabilität der Epithelzelle möglich zu sein. Untersuchungen an renalen Epithelzellen zeigen schnelle Calcium-Oszillationen nach HlyA-Infektion [78]. Diese intrazellulären Konzentrationsschwankungen wirken in der Zielzelle als Second-Messenger. Und auch unabhängig von einem Calcium-Influx oder Kalium-Efflux wirkt eine Infektion mit HlyA auf zellulärer Ebene auf verschiedene regulative Signalkaskaden. Neuere Untersuchungen zeigen, dass HlyA im Gegensatz zu anderen RTX-Toxinen in der Lage ist, die zelluläre Immunabwehr und den Aufbau des Zytoskeletts zu stören [13, 18]. Durch seine vielfältigen Bindekapazitäten ist das HlyA im Gegensatz zu anderen RTX-Toxinen zur Insertion in Membranen verschiedenster Zielzellen fähig. Möglich ist diese „Promiskuität“, da HlyA keinen Proteinrezeptor zur Insertion in die Membran benötigt [79]. Da die Insertion von HlyA in die Oberfläche eines Kolonepithels wahrscheinlich wie an renalen Zellverbänden rezeptorunabhängig geschieht, ist es denkbar, dass an der Enterozytenmembran ähnliche Mechanismen zur Störung des epithelialen Zellverbandes beitragen. So könnten Veränderungen im Aufbau des Zytoskeletts die epitheliale Integrität stören. Doch der Einfluss von HlyA auf Zell-Reparatur-Mechanismen und Autophagie am Kolonepithel ist noch weitestgehend unverstanden, sodass zur genaueren Beschreibung des Pathomechanismus der *Focal Leak*-bedingten Schädigungen dringend weitere Forschung nötig ist.

5.5 Epithelialer Barrieredefekt durch *E. coli* HlyA

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Zusammenhang mit der HlyA-induzierten Bildung von *Focal Leaks* eine Störung der gastrointestinalen Barriere festgestellt werden. Eine Tendenz zur epithelialen Barrierschädigung durch *E. coli* HlyA-Infektion konnte bereits durch den gemessenen Widerstandsabfall am Darm HlyA-infizierter Mäuse beobachtet werden. Hinweisend auf die Barriestörung war jedoch die erhöhte Permeabilität des Gewebes für Makromoleküle wie HRP. Die Entscheidung zur Verwendung von HRP als Markermolekül beruhte dabei in erster Linie auf zwei Überlegungen. Zum Einen kann HRP nicht parazellulär durch intakte TJs diffundieren,

zum Anderen kann die HRP-Konzentration enzymatisch bestimmt werden. Da nur intaktes HRP die Reduktion von Peroxiden katalysiert, können Fehlmessungen durch Erfassung auch von kleineren Spaltprodukten des Enzyms – wie das bei vielen anderen Tracern üblich ist - prinzipiell ausgeschlossen werden. Da auch eine erhöhte Transzytoserate als Grund für einen vermehrten Übertritt von HRP über das Kolon-Epithel in dieser Arbeit ausgeschlossen werden konnte, kann die Zunahme des HRP-Fluxes nur durch die HlyA-induzierte *Focal Leak*-Bildung erklärt werden. Dies wird unterstützt durch den Befund, dass an allen Kolonepithelien von Mäusen, die mit dem HlyA-tragenden *E. coli* 536 infiziert wurden, *Focal Leaks* gefunden werden konnten. Insgesamt betrug der Anteil der *Focal Leaks* an der untersuchten Kolonoberflächen im Durchschnitt 1%. Diese Läsionsfläche ist groß genug, um den erhöhten Makromolekülflux allein erklären zu können. Auch erklären sich durch den fokal erhöhten Leitwert in diesem einen Prozent der Epithelfläche die Widerstandsveränderungen des Gesamtepithels. Da bekannt ist, dass auch am Kolon von Patienten mit CED Widerstandsveränderungen häufig sind [60], könnte die Frage, ob eine *Focal Leak*-bedingte Barrierestörung im Rahmen dieser Erkrankungen Einfluss auf die Widerstandsveränderungen am Epithel hat, zum Gegenstand zukünftiger Forschung erkoren werden. Da ein Einfluss von TJ-Veränderungen auf die gemessenen Effekte nicht auszuschließen ist, wird auch die Rolle der Proteine der Claudin-Familie zu bestimmen sein, um den Mechanismus der HlyA-induzierten Barrierschädigung hinreichend zu erklären. Dies ist besonders vor dem Hintergrund zielführend, dass TJ-Veränderungen auch bei der Pathogenese der CED eine Rolle spielen [60].

5.6 Entzündungsmodelle

Neben der Fähigkeit des *E. coli* HlyA mittels *Focal Leaks* eine Barrierestörung zu induzieren, konnte auch beobachtet werden, dass eine Infektion mit HlyA-tragenden Bakterien die Entwicklung einer intestinalen Entzündung beschleunigt und intensiviert. Im Entzündungsmodell der IL-10-defizienten Maus konnte nach Kolonisation mit *E. coli* 536 die beschleunigte Entwicklung einer Colitis im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die mit *E. coli* 536-HDM kolonisiert wurden, erfasst werden.

Das Zytokin IL-10 spielt als anti-inflammatorischer Regulator eine wesentliche Rolle bei der intestinalen Immunität. So entwickeln etwa Mäuse, denen das IL-10-Gen fehlt, eine intestinale Entzündung als Reaktion auf die residente kommensale Mikrobiota [80]. Da Störungen in der IL-10-Regulation auch auf die Entwicklung einer CU Einfluss zu nehmen scheinen, eignet sich das IL-10^{-/-}-Mausmodell besonders zur experimentellen Simulation einer Kolitis mit Analogien zu CED [27]. Andere Studien zeigen darüber hinaus, dass eine intestinale Entzündung vor allem das Wachstum von *Enterobacteriaceae* begünstigt [81]. So scheint es eine wechselseitige Beziehung zwischen Mikrobiota und intestinaler Immunabwehr zu geben, welche die Entzündungsreaktion im genetisch prädisponierten Darm aufrecht hält. Während alle Mäuse des Entzündungsmausmodells eine Entzündungsantwort auf die *E. coli* 536-Kolonisation bereits in der 14. Lebenswoche zeigten, konnte diese bei den infizierten WT-Mäusen nicht beobachtet werden. Bei den monoassoziiert kolonisierten Mäusen hingegen waren die Unterschiede auf die Kolonisation mit *E. coli* 536 bzw. *E. coli* 536-HDM vor allem im frühen Stadium der Entzündung zu beobachten. Dass das IL-10^{-/-}-Mausmodell besonders für die Beobachtung früher Entzündungsreaktionen geeignet ist, wurde schon von Martin et al. gezeigt [82].

5.6.1 Intestinale Entzündung und Mikrobiota

Bei der gemeinsamen Betrachtung der im Mausmodell erhobenen Daten mit den Ergebnissen aus den HlyA-Prävalenzuntersuchungen bei Patienten mit CED stellt sich nun die Frage nach einem Zusammenhang von HlyA-tragenden Bakterien mit der Entzündungsphase einer CU. Uropathogene und HlyA-tragende *E. coli* können sowohl im Darm des Menschen als auch bei Nutztieren gewöhnlicherweise gefunden werden [68, 83]. Auch wissen wir, dass darmpathogene *E. coli*-Stämme an der Kolonmukosa residieren können, ohne eine Entzündung auszulösen [84]. So scheint die intestinale Immunantwort auf die Bakterien eine bedeutende Rolle im Pathomechanismus der Entzündungsinitiation zu spielen. So konnte etwa im Tiermodell gezeigt werden, dass sich auch in einem genetisch prädisponierten Kolon nur in Gegenwart von luminalen Bakterien eine Entzündung entwickelt [80]. Viele Untersuchungen konnten zeigen, dass die Kolonmukosa und der Mukus von Patienten mit einer CED im Vergleich zu Darmgesunden weniger protektive Eigenschaften besitzt [85]. Darüber hinaus scheinen Veränderungen der mukosalen

Mikrobiota sogar direkt mit entzündlichen Reaktionen bei CU und MC in Zusammenhang zu stehen [65, 86]. Auch in dieser Arbeit konnte mittels Bakterienkultur eine Zunahme von intraepithelialen und Mukosa-assoziierten Bakterien im Schub einer CU gemessen werden. Im Mausmodell war die entzündliche Reaktion im Kolon auf die Kolonisation mit HlyA-tragendem *E. coli* zwar auch bei monoassoziierten Mäusen zu beobachten, jedoch entwickelte sich die Entzündungsreaktion im Entzündungsmausmodell schneller. Die *Focal Leak*-induzierte Barrierestörung könnte durch einen vermehrten Antigenübertritt eine Entzündungsantwort triggern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Entzündungsantwort vor allem mit einer genetischen Prädisposition für eine veränderte intestinale Immunabwehr assoziiert zu sein scheint.

5.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die zuvor am HT-29/B6-Zellmodell gezeigte HlyA-assoziierte Induktion von *Focal Leaks* auch am *in vivo*-Modell gefunden werden. Darüber hinaus konnten in Läsionen im Kolon von Patienten mit CU im Schub HlyA-tragende *E. coli* mittels Immunfluoreszenzfärbung und LSM dargestellt werden. Die durch den erhöhten Makromolekülflux belegte Barrierestörung kann im Zusammenhang mit dem Modell der erhöhten intestinalen Durchlässigkeit, der so genannten ‚leaky gut‘-Hypothese, als ein möglicher Pathomechanismus einer CED gesehen werden [87]. Die *Leaky Gut*-Hypothese geht davon aus, dass durch einen erhöhten Antigeninflux über die Darmwand bei einer CED eine Entzündungsantwort im Kolon ausgelöst wird. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass extraintestinal-pathogene *E. coli* in großen Zahlen im Kolon gefunden werden können und eine Entzündung initiieren oder eine schon beginnende Entzündung intensivieren können. Der modulierende Einfluss von Probiotika auf intestinale Entzündungen zeigt deutlich, dass der Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota eine große therapeutische Bedeutung zukommen wird [88]. So wirkt etwa die Gabe von *E. coli* Nissle 1917, eines apathogenen *E. coli*-Stammes, remissionserhaltend bei CU, wenngleich eine Remissionseinleitung aus dem Schub heraus durch *E. coli* Nissle 1917 nicht zu erreichen ist [89, 90]. Als weitere Methode zur selektiven Modulation der intestinalen

Mikrobiota könnte die Stuhltransplantation als neuer Therapieansatz in der Humanmedizin in Betracht kommen. Während für die Therapie einer rezidivierenden *Clostridium difficile*-Kolitis bereits der Vorteil einer Transplantation fäkaler Mikrobiota gegenüber der Standardtherapie mit Vancomycin gezeigt werden konnte, fehlen für den Einsatz der Stuhltransplantation bei CED systematische randomisierte Studien [91]. Jedoch scheinen erste Untersuchungen und Case reports erfolgsversprechend. In 19 der 25 publizierten Behandlungen mit fäkaler Mikrobiotatransplantation konnte eine Symptomreduzierung erreicht werden, in 13 von 17 publizierten Fällen konnte die medikamentöse Therapie beendet werden und in 15 von 24 Patienten konnte sogar eine Remission induziert werden [92].

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass bestimmte pathogene Bakterien durchaus in der Lage sind, eine intestinale Entzündung zu intensivieren, wäre auch eine Therapie mit selektiver Reduktion von Bakterien, welche Toxine wie das α -Hämolysin tragen, eine neue Therapieoption. So sind etwa bei rezidivierenden Infekten des Urogenitaltrakts bereits Impfungen mit inaktivierten *E. coli*-Stämmen und weiteren *Enterobacteriaceae* zugelassen worden (StroVac[®]) [93]. Doch auch andere Therapiekonzepte, welche die Interaktion von intestinalen Mikrobiota mit der Darmwand beeinflussen, scheinen denkbar. In der vorliegenden Arbeit konnte in Versuchen am Zellmodell gezeigt werden, dass Metallionen, wie etwa Zinkionen, die Hämolysin-Wirkung in HT-29/B6-Zellen stören können. Der genaue Mechanismus ist derweil unklar, da die protektive Wirkung von Zink am Kolon multifaktoriell ist. Darüber hinaus zeigt sich bei Zinkmangel eine gestörte intestinale Immunabwehr [94]. Auch die intestinale Bakterienkomposition wird durch Zink beeinflusst. Zum Beispiel wird durch Fütterung von Ferkeln mit erhöhten Dosen von Zinkoxid die intestinale Diversität der vorkommenden Bakterien erhöht [95]. Sogar die Sterblichkeit an Durchfallerkrankungen von Kindern in Indien konnte durch die Verwendung von Zink als Nahrungsergänzungsmittel gesenkt werden [96]. Studien zeigen, dass durch die Gabe von Zink bei Durchfallerkrankungen die Dauer und Mortalität der Erkrankung signifikant gesenkt werden kann [97]. So empfiehlt auch die Weltgesundheitsorganisation WHO und das Kinderhilfswerk UNICEF eine standardmäßige Zinksubstitution zur Behandlung und Prophylaxe von Durchfallerkrankungen bei Kindern [98]. Andererseits scheint auch die Verminderung der Zinkkonzentration an der Darmwand antimikrobiell zu wirken. So hemmt die

Chelatbildung mit Zink durch das von apoptotischen neutrophilen Granulozyten ausgestoßene Calprotektin das Bakterienwachstum im Darm [99]. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse bei der Forschung zum Einfluss von Zink auf die Darmwand machen deutlich, dass der Zusammenhang der intestinalen und mukosalen Zinkkonzentration auf die intestinale Immunabwehr und auf das Bakterienwachstum noch weitestgehend unverstanden ist. Jedoch deuten unsere Ergebnisse am *E. coli* 536-infizierten und mit Zink behandelten Zellmodell darauf hin, dass auch intestinale bakterielle Infektionen mit Zink behandelt werden könnten. Weitere Forschung, etwa an einem *in vivo*-Modell, könnten diese Vermutung konkretisieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In den Untersuchungen zu bakteriellen Mikrobiota an der Darmwand mittels Bakterienkultur konnte dargestellt werden, dass im entzündlichen Schub einer CU eine andere Bakterienkomposition an der Darmwand residiert als in der Remissionsphase der Erkrankung oder bei Darmgesunden. Konkret konnte eine Tendenz zur Zunahme Hämolysin-bildender Bakterien im Mukus des Colon sigmoideum aufgezeigt werden. Der vermehrte Nachweis intraepithelialer Bakterien im Schub der Erkrankung zeigt darüber hinaus, dass die Bakterien im intestinalen Entzündungsgeschehen in der Lage sind, die Darmbarriere zu schwächen und sie zu überwinden.

Mit kulturunabhängigem genetischem Nachweis mittels qPCR konnte erstmals das Vorkommen HlyA-produzierender UPEC-Stämmen in einem Großteil der untersuchten Probanden, also auch der Kontrollen, nachgewiesen werden. Das Vorkommen dieser Bakterienstämme beschränkt sich dabei nicht auf Patienten mit einer CED, sondern lässt sich bei Darmgesunden gleichermaßen nachweisen. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Messwerte deuten jedoch ebenfalls an, dass hohe HlyA-Konzentrationen vor allem bei Patienten mit einer CU eine besondere Rolle zu spielen scheinen. Die Unterscheidung zwischen Remissionsphase und entzündlichem Schub der Erkrankung in dieser Arbeit konnte die Ergebnisse dahingehend genauer eingrenzen, dass die Zunahme HlyA-produzierender UPEC-Stämme an der Kolonmukosa vor allem während der Entzündung zu messen war. Auch der Nachweis von *Focal Leaks* im Kolon von Patienten mit CU verdeutlicht die Bedeutung HlyA-produzierender Bakterien für die Pathogenese der Erkrankung.

Auch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass bei Untersuchungen zu RTX-Toxinen Hämolysine von UPEC- und EHEC-Stämme prinzipiell zu unterscheiden sind. In vielen Arbeiten findet sich die Bezeichnung HlyA auch für das EHEC-Enterohämolysin. Jedoch unterscheiden sich diese beiden Toxine sowohl genetisch als auch strukturell in erheblichem Maße. Auch konnten selbst mit kulturunabhängigen qPCR-Untersuchungen Enterohämolysin-produzierende EHEC bei keinem der untersuchten Probanden an der Darmwand nachgewiesen werden. Somit konnte in dieser Arbeit die Bedeutung einer eindeutigen Terminologie bei der Beschreibung von Forschungsergebnissen in diesem Bereich noch einmal

verdeutlicht werden.

Von großer Wichtigkeit für das Verständnis der medizinischen Bedeutung einer intestinalen Kolonisation mit HlyA-produzierenden *E. coli* ist der vermehrte Nachweis von fokalen Läsionen im Mäusekolon im Rahmen dieser Arbeit. Erstmals konnte gezeigt werden, dass HlyA auch in einem *in vivo* Modell zur Bildung von Läsionen, so genannten *Focal Leaks*, in der Lage ist. Auch konnte ein Barrieredefekt durch diese intestinale Epithelschädigung gemessen werden. Dieser ermöglichte sogar Makromolekülen einen gesteigerten Übertritt über die Darmbarriere. Besonders ausgeprägt waren diese Ergebnisse im Mausmodell mit genetischer Prädisposition zu intestinalen Entzündungen. Sie können im Rahmen der *Leaky-Gut*-Hypothese eingeordnet werden und liefern einen weiteren Erklärungsansatz für die Entzündungsinitiation bei einer Colitis ulcerosa. Diese Einordnung wird gestützt durch die hier erhobenen Daten zur Intensivierung der Kolitis im Entzündungsmausmodell nach HlyA-Infektion. Und auch bei Wildtyp-Mäusen waren bei Monoassoziation Unterschiede in den Entzündungszeichen zwischen Kolonisation mit HlyA-tragenden und HlyA-defizienten *E. coli* zu beobachten.

Da durch einen einzelnen Erreger klinische Symptome und nachweisbare Schäden an der Darmwand verursacht werden konnten, stellt sich die Frage nach einem möglichen therapeutischen Ansatz. Im Zellmodell konnte in dieser Arbeit an einem HT-29/B6 Monolayer gezeigt werden, dass durch Zugabe von Zink der HlyA-induzierte Widerstandsabfall verhindert werden kann. Die Möglichkeiten einer gezielten Toxininhibierung in einem *in vivo* Modell könnten somit das Thema möglicher weiterer wissenschaftlicher Forschung werden. Auch andere therapeutische Ansätze, welche auf die gezielte Modulation der bakteriellen Mikrobiota zielen, müssten in diesem Zusammenhang diskutiert werden. So lassen die Ergebnisse dieser Arbeit therapeutische Konzepte wie Bakterientherapie (z.B. mit *E. coli* Nissle), bakterielle Impfungen oder antibiotische Behandlung als Optionen für die Therapie einer Colitis ulcerosa denkbar erscheinen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Guarner, F and Malagelada, JR, *Gut flora in health and disease*. Lancet 2003;361(9356): 512-9.
2. Lozupone, CA, Stombaugh, JI, Gordon, JI, Jansson, JK, and Knight, R, *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. Nature 2012;489(7415): 220-30.
3. Bengmark, S, *Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora*. Gut 1998;42(1): 2-7.
4. Qin, J, Li, R, Raes, J, Arumugam, M, Burgdorf, KS, Manichanh, C, Nielsen, T, Pons, N, Levenez, F, Yamada, T, Mende, DR, Li, J, Xu, J, Li, S, Li, D, Cao, J, Wang, B, Liang, H, Zheng, H, Xie, Y, Tap, J, Lepage, P, Bertalan, M, Batto, JM, Hansen, T, Le Paslier, D, Linneberg, A, Nielsen, HB, Pelletier, E, Renault, P, Sicheritz-Ponten, T, Turner, K, Zhu, H, Yu, C, Jian, M, Zhou, Y, Li, Y, Zhang, X, Qin, N, Yang, H, Wang, J, Brunak, S, Dore, J, Guarner, F, Kristiansen, K, Pedersen, O, Parkhill, J, Weissenbach, J, Bork, P, and Ehrlich, SD, *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature 2010;464(7285): 59-65.
5. Eckburg, PB, Bik, EM, Bernstein, CN, Purdom, E, Dethlefsen, L, Sargent, M, Gill, SR, Nelson, KE, and Relman, DA, *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science 2005;308(5728): 1635-8.
6. Turnbaugh, PJ, Hamady, M, Yatsunenko, T, Cantarel, BL, Duncan, A, Ley, RE, Sogin, ML, Jones, WJ, Roe, BA, Affourtit, JP, Egholm, M, Henrissat, B, Heath, AC, Knight, R, and Gordon, JI, *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature 2009;457(7228): 480-4.
7. Yatsunenko, T, Rey, FE, Manary, MJ, Trehan, I, Dominguez-Bello, MG, Contreras, M, Magris, M, Hidalgo, G, Baldassano, RN, Anokhin, AP, Heath, AC, Warner, B, Reeder, J, Kuczynski, J, Caporaso, JG, Lozupone, CA, Lauber, C, Clemente, JC, Knights, D, Knight, R, and Gordon, JI, *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature 2012;486(7402): 222-7.
8. Escherich, T, *Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings*. Fort. Med. 1885;3: 515-528, 547-554.
9. Kaper, JB, Nataro, JP, and Mobley, HL, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004;2(2): 123-40.
10. Croxen, MA and Finlay, BB, *Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity*. Nat Rev Microbiol 2010;8(1): 26-38.
11. Burns, SM and Hull, SI, *Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic Escherichia coli O75:K5 strain*. Infect Immun 1999;67(8): 3757-62.
12. Eto, DS, Jones, TA, Sundsbak, JL, and Mulvey, MA, *Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli*. PLoS Pathog 2007;3(7): e100.

13. Wiles, TJ, Dhakal, BK, Eto, DS, and Mulvey, MA, *Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins*. Mol Biol Cell 2008;19(4): 1427-38.
14. Linhartova, I, Bumba, L, Masin, J, Basler, M, Osicka, R, Kamanova, J, Prochazkova, K, Adkins, I, Hejnova-Holubova, J, Sadilkova, L, Morova, J, and Sebo, P, *RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism*. FEMS Microbiol Rev 2010;34(6): 1076-112.
15. Burgos, Y and Beutin, L, *Common origin of plasmid encoded alpha-hemolysin genes in Escherichia coli*. BMC Microbiol 2010;10: 193.
16. Bauer, ME and Welch, RA, *Association of RTX toxins with erythrocytes*. Infect Immun 1996;64(11): 4665-72.
17. Smith, HW, *The haemolysins of Escherichia coli*. J Pathol Bacteriol 1963;85: 197-211.
18. Dhakal, BK and Mulvey, MA, *The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways*. Cell Host Microbe 2012;11(1): 58-69.
19. Herlax, V, Mate, S, Rimoldi, O, and Bakas, L, *Relevance of fatty acid covalently bound to Escherichia coli alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process*. J Biol Chem 2009;284(37): 25199-210.
20. Troeger, H, Richter, JF, Beutin, L, Gunzel, D, Dobrindt, U, Epple, HJ, Gitter, AH, Zeitz, M, Fromm, M, and Schulzke, JD, *Escherichia coli alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation*. Cell Microbiol 2007;9(10): 2530-40.
21. Welch, RA, *RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology*. Curr Top Microbiol Immunol 2001;257: 85-111.
22. Loftus, EV, Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology 2004;126(6): 1504-17.
23. Molodecky, NA, Soon, IS, Rabi, DM, Ghali, WA, Ferris, M, Chernoff, G, Benchimol, EI, Panaccione, R, Ghosh, S, Barkema, HW, and Kaplan, GG, *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. Gastroenterology 2012;142(1): 46-54 e42; quiz e30.
24. Eckburg, PB and Relman, DA, *The role of microbes in Crohn's disease*. Clin Infect Dis 2007;44(2): 256-62.
25. Walk, ST, Blum, AM, Ewing, SA, Weinstock, JV, and Young, VB, *Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth Heligmosomoides polygyrus*. Inflamm Bowel Dis 2010;16(11): 1841-9.
26. Fujino, S, Andoh, A, Bamba, S, Ogawa, A, Hata, K, Araki, Y, Bamba, T, and Fujiyama, Y, *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut 2003;52(1): 65-70.

27. Franke, A, Balschun, T, Karlsen, TH, Sventoraityte, J, Nikolaus, S, Mayr, G, Domingues, FS, Albrecht, M, Nothnagel, M, Ellinghaus, D, Sina, C, Onnie, CM, Weersma, RK, Stokkers, PC, Wijmenga, C, Gazouli, M, Strachan, D, McArdle, WL, Vermeire, S, Rutgeerts, P, Rosenstiel, P, Krawczak, M, Vatn, MH, Mathew, CG, and Schreiber, S, *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. Nat Genet 2008;40(11): 1319-23.
28. Sellon, RK, Tonkonogy, S, Schultz, M, Dieleman, LA, Grenther, W, Balish, E, Rennick, DM, and Sartor, RB, *Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice*. Infect Immun 1998;66(11): 5224-31.
29. Pedrosa, E, Loren, V, Cabre, E, Domenech, E, Ojanguren, I, Gassull, MA, and Mane, J, *Bacteria and spontaneous experimental colitis: immunological changes*. Eur J Clin Invest 2011;41(10): 1047-53.
30. Baumgart, DC and Sandborn, WJ, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet 2007;369(9573): 1641-57.
31. Gradel, KO, Nielsen, HL, Schonheyder, HC, Ejlersen, T, Kristensen, B, and Nielsen, H, *Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis*. Gastroenterology 2009;137(2): 495-501.
32. Jess, T, Simonsen, J, Nielsen, NM, Jorgensen, KT, Bager, P, Ethelberg, S, and Frisch, M, *Enteric Salmonella or Campylobacter infections and the risk of inflammatory bowel disease*. Gut 2011;60(3): 318-24.
33. Manichanh, C, Rigottier-Gois, L, Bonnaud, E, Gloux, K, Pelletier, E, Frangeul, L, Nalin, R, Jarrin, C, Chardon, P, Marteau, P, Roca, J, and Dore, J, *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut 2006;55(2): 205-11.
34. Swidsinski, A, Loening-Baucke, V, and Herber, A, *Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview*. J Physiol Pharmacol 2009;60 Suppl 6: 61-71.
35. Sokol, H, Pigneur, B, Watterlot, L, Lakhdari, O, Bermudez-Humaran, LG, Gratadoux, JJ, Blugeon, S, Bridonneau, C, Furet, JP, Corthier, G, Grangette, C, Vasquez, N, Pochart, P, Trugnan, G, Thomas, G, Blottiere, HM, Dore, J, Marteau, P, Seksik, P, and Langella, P, *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(43): 16731-6.
36. Mazmanian, SK, Round, JL, and Kasper, DL, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. Nature 2008;453(7195): 620-5.
37. Noor, SO, Ridgway, K, Scovell, L, Kemsley, EK, Lund, EK, Jamieson, C, Johnson, IT, and Narbad, A, *Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota*. BMC Gastroenterol 2010;10: 134.
38. Frank, DN, St Amand, AL, Feldman, RA, Boedeker, EC, Harpaz, N, and Pace,

- NR, *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(34): 13780-5.
39. Saitoh, S, Noda, S, Aiba, Y, Takagi, A, Sakamoto, M, Benno, Y, and Koga, Y, *Bacteroides ovatus as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease*. Clin Diagn Lab Immunol 2002;9(1): 54-9.
 40. Mukhopadhyay, I, Thomson, JM, Hansen, R, Berry, SH, El-Omar, EM, and Hold, GL, *Detection of Campylobacter concisus and other Campylobacter species in colonic biopsies from adults with ulcerative colitis*. PLoS One 2011;6(6): e21490.
 41. Kotlowski, R, Bernstein, CN, Sepehri, S, and Krause, DO, *High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease*. Gut 2007;56(5): 669-75.
 42. Sepehri, S, Khafipour, E, Bernstein, CN, Coombes, BK, Pilar, AV, Karmali, M, Ziebell, K, and Krause, DO, *Characterization of Escherichia coli isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 2010.
 43. Garrett, WS, Lord, GM, Punit, S, Lugo-Villarino, G, Mazmanian, SK, Ito, S, Glickman, JN, and Glimcher, LH, *Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system*. Cell 2007;131(1): 33-45.
 44. Martin, HM, Campbell, BJ, Hart, CA, Mpofo, C, Nayar, M, Singh, R, Englyst, H, Williams, HF, and Rhodes, JM, *Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer*. Gastroenterology 2004;127(1): 80-93.
 45. National Library of Medicine, US. *Primer-BLAST - A tool for finding specific primers*. 2013 (Accessed 28/12/2013 at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)
 46. Amann, RI, Binder, BJ, Olson, RJ, Chisholm, SW, Devereux, R, and Stahl, DA, *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations*. Appl Environ Microbiol 1990;56(6): 1919-25.
 47. Bartosch, S, Fite, A, Macfarlane, GT, and McMurdo, ME, *Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol 2004;70(6): 3575-81.
 48. Nagy, G, Altenhoefer, A, Knapp, O, Maier, E, Dobrindt, U, Blum-Oehler, G, Benz, R, Emody, L, and Hacker, J, *Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic Escherichia coli strain 536*. Microbes Infect 2006;8(8): 2006-12.
 49. Diard, M, Garry, L, Selva, M, Mosser, T, Denamur, E, and Matic, I, *Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic Escherichia coli*

- are fitness elements involved in intestinal colonization.* J Bacteriol 2010;192(19): 4885-93.
50. Araki, A, Kanai, T, Ishikura, T, Makita, S, Uraushihara, K, Iiyama, R, Totsuka, T, Takeda, K, Akira, S, and Watanabe, M, *MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis.* J Gastroenterol 2005;40(1): 16-23.
 51. Ussing, HH and Zerahn, K, *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.* Acta Physiol Scand 1951;23(2-3): 110-27.
 52. Burgel, N, Bojarski, C, Mankertz, J, Zeitz, M, Fromm, M, and Schulzke, JD, *Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis.* Gastroenterology 2002;123(2): 433-43.
 53. Gitter, AH, Schulzke, JD, Sorgentfrei, D, and Fromm, M, *Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues.* J Biochem Biophys Methods 1997;35(2): 81-8.
 54. Katakura, K, Lee, J, Rachmilewitz, D, Li, G, Eckmann, L, and Raz, E, *Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis.* J Clin Invest 2005;115(3): 695-702.
 55. Bratz, K, Bucker, R, Golz, G, Zakrzewski, SS, Janczyk, P, Nockler, K, and Alter, T, *Experimental infection of weaned piglets with Campylobacter coli--excretion and translocation in a pig colonisation trial.* Vet Microbiol 2013;162(1): 136-43.
 56. Schmitz, H, Fromm, M, Bentzel, CJ, Scholz, P, Detjen, K, Mankertz, J, Bode, H, Epple, HJ, Riecken, EO, and Schulzke, JD, *Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6.* J Cell Sci 1999;112 (Pt 1): 137-46.
 57. Kreusel, KM, Fromm, M, Schulzke, JD, and Hegel, U, *Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6).* Am J Physiol 1991;261(4 Pt 1): C574-82.
 58. Gitter, AH, Bendfeldt, K, Schulzke, JD, and Fromm, M, *Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis.* FASEB J 2000;14(12): 1749-53.
 59. National Library of Medicine, US. *Standard Nucleotide BLAST.* 2013 (Accessed 28/12/2013 at http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
 60. Schulzke, JD, Ploeger, S, Amasheh, M, Fromm, A, Zeissig, S, Troeger, H, Richter, J, Bojarski, C, Schumann, M, and Fromm, M, *Epithelial tight junctions in intestinal inflammation.* Ann N Y Acad Sci 2009;1165: 294-300.
 61. Gunzel, D, Florian, P, Richter, JF, Troeger, H, Schulzke, JD, Fromm, M, and Gitter, AH, *Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006;290(6): R1496-507.

62. Stallmach, A, Häuser, W, L'hoest, H, and Marschall, U, *Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa*, in *Gesundheitswesen aktuell 2012*. 2012, BARMER GEK: Berlin. p. 286-309.
63. Allegretti, JR and Hamilton, MJ, *Restoring the gut microbiome for the treatment of inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol 2014;20(13): 3468-3474.
64. Jager, S, Stange, EF, and Wehkamp, J, *Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease*. Langenbecks Arch Surg 2013;398(1): 1-12.
65. Swidsinski, A, Ladhoff, A, Pernthaler, A, Swidsinski, S, Loening-Baucke, V, Ortner, M, Weber, J, Hoffmann, U, Schreiber, S, Dietel, M, and Lochs, H, *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology 2002;122(1): 44-54.
66. Mylonaki, M, Rayment, NB, Rampton, DS, Hudspith, BN, and Brostoff, J, *Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 2005;11(5): 481-7.
67. Moussata, D, Goetz, M, Gloeckner, A, Kerner, M, Campbell, B, Hoffman, A, Biesterfeld, S, Flourie, B, Saurin, JC, Galle, PR, Neurath, MF, Watson, AJ, and Kiesslich, R, *Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo*. Gut 2011;60(1): 26-33.
68. Opal, SM, Cross, AS, Gemski, P, and Lyhte, LW, *Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in Escherichia coli isolated from human blood, urine, and stool*. J Infect Dis 1990;161(4): 794-6.
69. Martinez-Medina, M, Aldeguer, X, Lopez-Siles, M, Gonzalez-Huix, F, Lopez-Oliu, C, Dahbi, G, Blanco, JE, Blanco, J, Garcia-Gil, LJ, and Darfeuille-Michaud, A, *Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis 2009;15(6): 872-82.
70. Vejborg, RM, Hancock, V, Petersen, AM, Krogh, KA, and Klemm, P, *Comparative genomics of Escherichia coli isolated from patients with inflammatory bowel disease*. BMC Genomics 2011;12: 316.
71. Cooke, EM, Ewins, SP, Hywel-Jones, J, and Lennard-Jones, JE, *Properties of strains of Escherichia coli carried in different phases of ulcerative colitis*. Gut 1974;15(2): 143-6.
72. Carey, CM, Kirk, JL, Ojha, S, and Kostrzynska, M, *Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness*. Can J Microbiol 2007;53(5): 537-50.
73. Pilarczyk-Zurek, M, Chmielarczyk, A, Gosiewski, T, Tomusiak, A, Adamski, P, Zwolinska-Wcislo, M, Mach, T, Heczko, PB, and Strus, M, *Possible role of Escherichia coli in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis*. BMC Gastroenterol 2013;13: 61.

74. Elliott, SJ, Srinivas, S, Albert, MJ, Alam, K, Robins-Browne, RM, Gunzburg, ST, Mee, BJ, and Chang, BJ, *Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic Escherichia coli linked to human diarrhea*. Infect Immun 1998;66(5): 2040-51.
75. Vingadassalom, D, Kazlauskas, A, Skehan, B, Cheng, HC, Magoun, L, Robbins, D, Rosen, MK, Saksela, K, and Leong, JM, *Insulin receptor tyrosine kinase substrate links the E. coli O157:H7 actin assembly effectors Tir and EspF(U) during pedestal formation*. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(16): 6754-9.
76. Heller, F, Fromm, A, Gitter, AH, Mankertz, J, and Schulzke, JD, *Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function*. Mucosal Immunol 2008;1 Suppl 1: S58-61.
77. Chen, M, Tofighi, R, Bao, W, Aspevall, O, Jahnukainen, T, Gustafsson, LE, Ceccatelli, S, and Celsi, G, *Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic Escherichia coli toxins*. Pediatr Nephrol 2006;21(3): 382-9.
78. Uhlen, P, Laestadius, A, Jahnukainen, T, Soderblom, T, Backhed, F, Celsi, G, Brismar, H, Normark, S, Aperia, A, and Richter-Dahlfors, A, *Alpha-haemolysin of uropathogenic E. coli induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells*. Nature 2000;405(6787): 694-7.
79. Ostolaza, H, Bartolome, B, Ortiz de Zarate, I, de la Cruz, F, and Goni, FM, *Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin*. Biochim Biophys Acta 1993;1147(1): 81-8.
80. Madsen, KL, Malfair, D, Gray, D, Doyle, JS, Jewell, LD, and Fedorak, RN, *Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora*. Inflamm Bowel Dis 1999;5(4): 262-70.
81. Lupp, C, Robertson, ML, Wickham, ME, Sekirov, I, Champion, OL, Gaynor, EC, and Finlay, BB, *Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae*. Cell Host Microbe 2007;2(2): 119-29.
82. Martin, FP, Rezzi, S, Philippe, D, Tornier, L, Messlik, A, Holzlwimmer, G, Baur, P, Quintanilla-Fend, L, Loh, G, Blaut, M, Blum, S, Kochhar, S, and Haller, D, *Metabolic assessment of gradual development of moderate experimental colitis in IL-10 deficient mice*. J Proteome Res 2009;8(5): 2376-87.
83. Jakobsen, L, Garneau, P, Bruant, G, Harel, J, Olsen, SS, Porsbo, LJ, Hammerum, AM, and Frimodt-Moller, N, *Is Escherichia coli urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31(6): 1121-9.
84. Schultsz, C, Moussa, M, van Ketel, R, Tytgat, GN, and Dankert, J, *Frequency of pathogenic and enteroadherent Escherichia coli in patients with inflammatory bowel disease and controls*. J Clin Pathol 1997;50(7): 573-9.
85. Schultsz, C, Van Den Berg, FM, Ten Kate, FW, Tytgat, GN, and Dankert, J, *The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls*. Gastroenterology

- 1999;117(5): 1089-97.
86. Kleessen, B, Kroesen, AJ, Buhr, HJ, and Blaut, M, *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls*. Scand J Gastroenterol 2002;37(9): 1034-41.
 87. Ma, TY, *Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease*. Proc Soc Exp Biol Med 1997;214(4): 318-27.
 88. Bai, AP, Ouyang, Q, Xiao, XR, and Li, SF, *Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis*. Int J Clin Pract 2006;60(3): 284-8.
 89. Kruis, W, Frick, P, Pokrotnieks, J, Lukas, M, Fixa, B, Kascak, M, Kamm, MA, Weismueller, J, Beglinger, C, Stolte, M, Wolff, C, and Schulze, J, *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. Gut 2004;53(11): 1617-23.
 90. Mallon, P, McKay, D, Kirk, S, and Gardiner, K, *Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis*. Cochrane Database Syst Rev 2007(4): CD005573.
 91. van Nood, E, Dijkgraaf, MG, and Keller, JJ, *Duodenal infusion of feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med 2013;368(22): 2145.
 92. Anderson, JL, Edney, RJ, and Whelan, K, *Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther 2012;36(6): 503-16.
 93. Moriel, DG and Schembri, MA, *Vaccination approaches for the prevention of urinary tract infection*. Curr Pharm Biotechnol 2014;14(11): 967-74.
 94. Scott, ME and Koski, KG, *Zinc deficiency impairs immune responses against parasitic nematode infections at intestinal and systemic sites*. J Nutr 2000;130(5S Suppl): 1412S-20S.
 95. Vahjen, W, Pieper, R, and Zentek, J, *Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets*. J Anim Sci 2011;89(8): 2430-9.
 96. Gupta, DN, Mondal, SK, Ghosh, S, Rajendran, K, Sur, D, and Manna, B, *Impact of zinc supplementation on diarrhoeal morbidity in rural children of West Bengal, India*. Acta Paediatr 2003;92(5): 531-6.
 97. Penny, ME, *Zinc supplementation in public health*. Ann Nutr Metab 2013;62 Suppl 1: 31-42.
 98. (WHO), WHO. *e-Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA)*. 2014 (Accessed 02/05/2014 at http://www.who.int/elena/titles/zinc_diarrhoea/en/)
 99. Corbin, BD, Seeley, EH, Raab, A, Feldmann, J, Miller, MR, Torres, VJ, Anderson, KL, Dattilo, BM, Dunman, PM, Gerads, R, Caprioli, RM, Nacken, W, Chazin, WJ, and Skaar, EP, *Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses*. Science 2008;319(5865): 962-5.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding cassette
AIEC	adhärent-invasive <i>Escherichia coli</i>
ApxIA	Actinobacillus pleuropneumoniae Exotoxin IA
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis ulcerosa
CNF1	cytotoxischer nekrotisierender Faktor 1
DAEC	diffus adhärente <i>Escherichia coli</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
ee-Gen	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EhxA	EHEC-Enterohämolysin
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	extraintestinale <i>Escherichia coli</i>
FimH	fimbriales Adhäsion H
HDM	Hämolysin-defiziente Mutante
H&E	Haematoxylin und Eosin
HlyA	α -Hämolysin
IF	Immunfluoreszenz
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IL-10 ^{-/-}	weibliche B6.129.P2-IL10 ^{tm1Cgn} J Interleukin-10 Knockout Mäuse
LEE	Locus of enterocyte effacement

LSM	Laser-Scanning Mikroskop
MA	monoassoziierte weibliche keimfreie C3H/ORL WT-Mäuse
MC	Morbus Crohn
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMEC	neonatale Meningitis <i>Escherichia coli</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAI	Pathogenitäts-Insel
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung= phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain-reaction (polymerase Kettenreaktion)
PFT	pore-forming toxin, Poren-bildendes Toxin
Pic	protease involved in intestinal colonisation
PSA	Polysaccharid A
PrimerBLAST	Primer Basic Local Alignment Search Tools
R ^{epi}	epithelialer Widerstand
R ^{sub}	subepithelialer Widerstand
RT	Raumtemperatur
RTX	repeat in toxin
Sat	sezerniertes Autotransporter Toxin
SDS	sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean= Standardfehler des Mittelwerts
SPATE	Serinproteasen-Autotransporter der Enterobacteriaceae
TER	total transepithelial resistance = gesamtepithelialer Widerstand
TISS	Typ I Sekretions-System
TJ	Tight Junction
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
WT	weibliche C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse

8.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Emanuel Schulz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Escherichia coli* α -Hämolysin - ein Entzündungsmediator bei Colitis ulcerosa“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8.3 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Emanuel Schulz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Originalarbeiten

- 1) Bücken R, Schulz E, Günzel D, Bojarski C, Lee IF, John LJ, Wiegand S, Janßen T, Wieler LH, Dobrindt U, Beutin L, Ewers C, Fromm M, Siegmund B, Troeger H, Schulzke JD. *α -Haemolysin of Escherichia coli in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon.* Gut. 2014; 63(12): 1893-1901. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306099.

Impact factor (2013): 13,3

Beitrag im Einzelnen: Organisation und Durchführung der Patientenaquise und Messung humaner HlyA-Daten, Durchführung der histopathologischen Befundung, Mitarbeit an Kolonisation und Präparation der Versuchstiere, Mitarbeit an elektrophysiologischen Messungen, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts.

Kongressbeiträge

- 1) 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V., Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (dgi) e. V., 22.-25. September 2013, Rostock: Poster; R. Bücken, E. Schulz, H. Troeger, J.-D. Schulzke *E. coli α -hemolysin as potential mediator of inflammatory activities in colitis*

Beitrag im Einzelnen: Gestaltung des Posters, inhaltlicher Beitrag wie in der Originalarbeit

- 2) Digestive Disease Week 2014, 3.-6. Mai 2014, Chicago, IL, USA: Roland Bücken, Emanuel Schulz, Stephanie Wiegand, Britta Siegmund, Hanno Troeger and Jörg-Dieter Schulzke. *E. coli α -hemolysin (HlyA) mediates colonic inflammation.*

Beitrag im Einzelnen: Gestaltung des Posters, inhaltlicher Beitrag wie in der Originalarbeit

Univ.-Prof. Dr. med.
Jörg-Dieter Schulzke
Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Emanuel Schulz
Unterschrift des Doktoranden

8.4 Patientenaufklärungsbogen



Charité, Campus Benjamin Franklin, 12200 Berlin,
Germany
Klinik für Allgemeinmedizin

Klinik für Allgemeinmedizin
Direktor: Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke

Charité Centrum für Magen-, Darm-,
Nieren- und Stoffwechselmedizin (CC10)

Charité, Campus Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin, Germany

☎ +49 30 8445-2666
FAX +49 30 8445-4493
e-mail joerg.schulzke@charite.de

Aufklärungsbogen

zur Entnahme zusätzlicher Schleimhautproben für Forschungszwecke
in der Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
CharitéCentrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin

Titel des Forschungsprojektes:

Tight Junction-Proteine bei entzündlichen Darmerkrankungen
und

Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen als Barriere- oder Kanalbildner
und

Mechanismen epithelialer Barriestörung bei gastrointestinalen Infektionen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie werden sich demnächst aus medizinischen Gründen einem endoskopischen Eingriff unterziehen.

Wir möchten Sie hiermit bitten, dass bei der Endoskopie zusätzlich zu den für die feingewebliche Untersuchung routinemäßig entnommenen Gewebeproben ca. 3-4 weitere Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke entnommen werden dürfen, die der Krankheitserforschung dienen.

Sinn und Zweck des Forschungsvorhabens:

Darmentzündungen und Durchfall können nach heutigem Wissen durch eine "Undichtigkeit" der Darmschleimhaut mit verursacht werden. Sinn und Zweck des Vorhabens ist es, an den zusätzlich zu den Routinebiopsien entnommenen Schleimhautproben eine solche Barriestörung zu verschiedenen Darmerkrankungen (vor allem Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, kollagene Colitis, lymphozytäre Colitis, HIV-Enteropathie, Sprue, intestinales Lymphom, infektiöse Diarrhoen und Colon irritabile) zu untersuchen.

Die Ergebnisse haben für Sie und Ihre weitere Therapie keine Bedeutung, da es sich um Grundlagenforschung handelt.

Risiken und Nutzen:

In weniger als 0.5% der endoskopischen Untersuchungen mit Schleimhautproben-Entnahme können Schleimhautverletzungen oder Nachblutungen auftreten. Dieses Risiko besteht

bereits bei der routinemäßigen Biopsieentnahme und wird durch die zusätzliche Biopsieentnahme nicht wesentlich erhöht. Sie selbst werden voraussichtlich keinen direkten Nutzen aus dieser wissenschaftlichen Untersuchung ziehen können. Der Nutzen ist indirekt, indem die Diagnostik und Behandlung von Darmerkrankungen in Zukunft verbessert wird.

Die entsprechende wissenschaftliche Untersuchung geschieht selbstverständlich nur mit Ihrer freiwilligen Einwilligung. Ihre Entscheidung hat keinerlei Auswirkungen auf Ihre medizinische Betreuung und kann jederzeit widerrufen werden.

Durch Ihre Unterschrift auf der Einwilligungserklärung erklären Sie sich damit einverstanden, dass der/die Arzt/Ärztin Dr. _____ und die Mitarbeiter des Instituts für Klinische Physiologie und der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie Ihre personenbezogenen Daten zum Zweck der o.g. Untersuchung erheben und verarbeiten dürfen. Personenbezogenen Daten sind z.B. Ihr Geburtsdatum, Ihr Geschlecht, Ihre ethnische Zugehörigkeit, Daten zu Ihrer Gesundheit oder andere persönliche Daten, die während Ihrer Teilnahme an der Untersuchung erhoben wurden.

Der/Die Arzt/Ärztin wird Ihre personenbezogenen Daten für Zwecke der Verwaltung und Durchführung der Studie sowie für Zwecke der Forschung und statistischen Auswertung verwenden. Sie haben das Recht auf Auskunft über alle Ihre personenbezogenen Daten. Sie haben auch Anrecht auf Korrektur eventueller Ungenauigkeiten in Ihren personenbezogenen Daten.

Bitte beachten Sie, dass die Ergebnisse der Untersuchung in der medizinischen Fachliteratur veröffentlicht werden können, wobei Ihre Identität jedoch anonym bleibt.

Die Studiendaten und die Gewebeproben werden in verschlüsselter Form verarbeitet und gespeichert. Hierzu versieht der Studienarzt die Studiendaten und die Proben mit einer Codenummer (Pseudonymisierung der Daten). Die Referenzliste, die Daten und Personenidentität zusammenführt, wird von Prof. Dr. med. J.-D. Schulzke aufbewahrt und 5 Jahre nach Projektende gelöscht (Laufzeit des Projektes bis Ende 2012).

Die Proben werden im Institut für Klinische Physiologie kryokonserviert.

Die Proben werden über einen Zeitraum von fünf Jahren in dem Labor gelagert und danach vernichtet.

Sie haben das Recht auf Auskunft über alle beim Studienarzt oder dem Auftraggeber der Studie vorhandenen personenbezogenen Daten über Sie.

Sie können jederzeit der Weiterverarbeitung Ihrer im Rahmen der o.g. Untersuchung erhobenen Daten und/oder der Ihnen entnommenen Proben widersprechen und ihre Löschung bzw. Vernichtung verlangen.

Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke

8.5 Einverständniserklärung



Charité, Campus Benjamin Franklin, 12200 Berlin,
Germany
Klinik für Allgemeinmedizin

Klinik für Allgemeinmedizin
Direktor: Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke

Charité Centrum für Magen-, Darm-,
Nieren- und Stoffwechselmedizin (CC10)

Charité, Campus Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin, Germany

☎ +49 30 8445-2666
FAX +49 30 8445-4493
e-mail joerg.schulzke@charite.de

Einverständniserklärung

zur Entnahme zusätzlicher Schleimhautproben für Forschungszwecke in der
Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
CharitéCentrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin

Titel des Forschungsprojekts:

Tight Junction-Proteine bei entzündlichen Darmerkrankungen
und
Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen als Barriere- oder Kanalbildner
und
Mechanismen epithelialer Barriestörung bei gastrointestinalen Infektionen

Hiermit erkläre ich,

Vorname, Name, Adresse, Geburtsdatum des/der Studienteilnehmer/in

Patienten-Nr.....,

dass ich durch Herrn/Frau Dr.....Name des/der Studienarzt/Studienärztin

mündlich und schriftlich über das Wesen, die Bedeutung, Tragweite und Risiken der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie informiert wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit dem/der Studienarzt/Studienärztin zu klären.

Ich habe insbesondere die mir vorgelegte Patienteninformation (Aufklärungsbogen) verstanden und eine Ausfertigung derselben und dieser Einwilligungserklärung erhalten.

Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten und Proben jederzeit widersprechen und ihre Löschung bzw. Vernichtung verlangen kann.

Ich bin bereit, an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie teilzunehmen.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten/Angaben über meine Gesundheit verschlüsselt (pseudonymisiert) und auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet verarbeitet und die anonymisierten Studienergebnisse veröffentlicht werden.

Darüber hinaus bin ich mit der Entnahme, Herauslösung, Verschlüsselung, Untersuchung sowie Lagerung meines im Rahmen dieser Studie entnommenen Gewebes für den Zweck der Studie durch den/die Studienarzt/-Studienärztin einverstanden.

Unterschrift des Patienten

Datum

Name des Patienten in Druckbuchstaben

Arzt/Ärztin, welche(r) die Einwilligung einholt

Hiermit erkläre ich, den/die o.g. Versuchsteilnehmer/in am über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken der o.g. Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihm/ihr eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

Unterschrift

Datum

Name in Druckbuchstaben

8.6 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.7 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Jörg Schulzke möchte ich für die freundliche Überlassung meines Dissertationsthemas und für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes herzlich danken. Seine engagierte Unterstützung und seine konstruktiven Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders dankbar bin ich für seine ständige Bereitschaft, Probleme in der offenen Diskussion zu klären und mich in meiner Arbeit zu unterstützen. Auch Univ.-Prof. Dr. Michael Fromm danke ich für seine konstruktiven Kritiken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Roland Bücken, ohne dessen kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit ich diese Arbeit nicht so hätte bewerkstelligen können. Für sein großes Engagement bei der Betreuung meiner Promotion empfinde ich Hochachtung. Auch für seine Hilfestellungen bei den Versuchsdurchführungen und die häufigen kreativen Diskussionen möchte ich ihm meinen Dank aussprechen. Für die hilfsbereite Unterstützung meiner Arbeit durch die vielen Abnahmen von Kolonbiopsaten für meine Untersuchungen möchte ich mich bei den ärztlichen und pflegerischen Mitarbeitern in der Zentralen Endoskopie der Gastroenterologischen Klinik des Campus Benjamin Franklin, besonders aber bei Priv.-Doz. Dr. Christian Bojarski sehr herzlich bedanken. Auch Dr. Hanno Tröger, der mir viele konstruktive Anregungen für meine Arbeit gab, möchte ich dankend erwähnen.

Anja Fromm, Detlef Sorgenfrei und In-Fah Lee danke ich für die technische Assistenz und die guten Tipps bei der Durchführung von Experimenten. Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie für die freundliche Aufnahme in ihrer Abteilung und ihre professionelle Hilfe bei meiner Arbeit danken. In dem netten Arbeitsklima habe ich mich sehr wohl gefühlt.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung vor und während meines Studiums und ihr bedingungsloses Vertrauen in mich von ganzem Herzen danken.