

## 1 Einleitung

### 1.1 Die epitheliale Barriere

Epithelien grenzen das Körperinnere vom funktionellen Außenraum ab. Grundsätzlich erfüllen sie dabei zwei wichtige Funktionen: Zum einen wird der Stofftransport (Resorption und Sekretion von Nährstoffen, Elektrolyten und weiteren Soluten sowie von Wasser) effizient reguliert und zum anderen stellen Epithelien eine Schutzbarriere z.B. gegen Toxine oder andere Antigene dar. Der Darm besitzt die größte epitheliale Fläche des Körpers, an der sich der Organismus mit der Außenwelt auseinandersetzen muss. Um pathogenen und potentiell schädlichen Einflüssen entgegenzuwirken, haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Schutzmechanismen entwickelt. Die Gesamtheit dieser Schutzfunktionen im Darm wird als „intestinale Barriere“ bezeichnet. Sie besteht aus den luminalen und epithelialen physiologischen Darmmikroorganismen, dem Epithel mit der Mukusschicht und Teilen des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT; "gut associated lymphoid tissue"). Ein wichtiger Teil dieser intestinalen Barriere ist die den gesamten Intestinaltrakt auskleidende Epithelschicht. Diese Permeabilitätsschranke setzt sich aus einer parazellulären und transzellulären Barriere zusammen (Abb. 1). Eine Abdichtung des parazellulären Weges (zwischen den Epithelzellen hindurch) geschieht durch Tight junctions [130] (Abschnitt 1.1.1). Die transzelluläre Barriere wird durch die apikale und die basolaterale Membran der Epithelzellen gebildet. Prinzipiell sind somit zwei Wege der Passage durch das Epithel möglich, der transzelluläre Weg durch die Zellmembranen und der parazelluläre Weg durch die Tight junctions und den Interzellularspalt.

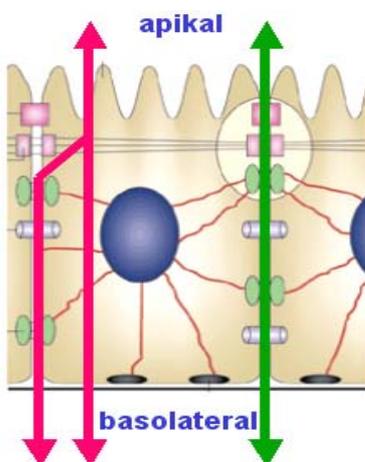


Abb. 1: **Transportwege und Barrieren der Epithelien.** Der transzelluläre Weg (rot) führt durch die apikale Zellmembran und die basale oder laterale Zellmembran. Der parazelluläre Weg (grün) führt durch die Tight junctions und den Interzellularspalt (adaptiert aus [170]).

### 1.1.1 Schlussleisten

Die Fähigkeit von Epithelien, als Diffusionsbarriere zwischen Kompartimenten verschiedener Zusammensetzung zu fungieren und große chemische und elektrische Gradienten aufrechtzuerhalten, erfordert eine weitgehende Abdichtung der Interzellularräume. Diese Abdichtung zwischen Epithelzellen wird durch Strukturen gewährleistet, die aufgrund ihrer Funktion als "Schlussleisten", "terminal bars", "Occluding junctions" oder eben als Tight junctions bezeichnet wurden, wobei letztere Benennung international gebräuchlich ist. Die Ultrastruktur der Tight junctions wurde mittels Dünnschnitt- und Gefrierbruchaufnahmen aufgeklärt: Es handelt sich um kontinuierliche, anastomosierende Netzwerke von intramembranösen Partikelsträngen [161], welche zwischen benachbarten Zellen ausgebildet werden. Erst 1991 wurde das erste Molekül der Tight junction entdeckt, das ca. 60 kDa-Protein Occludin [53]. Anschließend wurden in schneller Folge weitere Proteine einer Familie von bisher 24 Mitgliedern identifiziert, die ca. 20 kDa großen Claudine [52, 174]. Kürzlich wurde schließlich ein weiteres Protein, Tricellulin, entdeckt, das Sequenzhomologien mit Occludin besitzt und an trizellulären Kontakten lokalisiert ist [82]. Zu den Tight junction-Proteinen wird auch das 40 kDa-Protein "junctional adhesion molecule" (JAM) gezählt, [114]. Bisher sind drei weitere Varianten des JAM-Proteins bekannt, die zur Immunglobulin-Superfamilie gezählt werden [170]. Tight junction-Proteine durchspannen die Membran und stehen zellseitig über Tight junction-assoziierte Proteine ZO-1, -2 und -3 ("zonula occludens associated protein"), sowie Cingulin mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung [119, 76].

Es wurde lange angenommen, dass es sich bei der Tight junction um ein statisches System handelt, das den parazellulären Weg nahezu vollständig abdichtet. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten aber, dass es sich bei dieser Struktur um eine dynamisch regulierte Diffusionsbarriere handelt, die auf verschiedene physiologische, pharmakologische und pathologische Bedingungen reagieren kann [6]. Die Tight junction ist als wesentlicher Bestandteil des parazellulären Schlussleistenkomplexes somit für die Aufrechterhaltung und Regulation der epithelialen Barrierefunktion verantwortlich [28]. Als einfaches Maß der Barrierefunktion für Ionen dient der elektrische Widerstand über dem Epithel. Bei lecken Epithelien wie dem Jejunum und Ileum repräsentiert er hauptsächlich die Ionenpermeabilität des parazellulären Weges. Bei dichten Epithelien wie dem distalen Colon kann eine genauere Abschätzung der parazellulären Ionenpermeabilität mit Hilfe der Impedanz-Spektroskopie [57] und der Conductance scanning-Technik [58] erfolgen.

Eine weitere Barrierefunktion der Tight junction wird als "fence function" bezeichnet: Die Tight junction verhindert die laterale Diffusion von Proteinen und Lipiden innerhalb der Zellmembran zwischen apikalem und lateralem Anteil, wodurch die Polarität von Epithelien aufrecht erhalten wird [35].

Pathogene Wirkungen vieler Bakterien, wie z.B. *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Bacteroidis fragilis* und *Vibrio cholerae* beruhen auf einer Modulation der Tight junctions, wodurch es zur Veränderung der intestinalen Permeabilität kommt [41]. Dem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachteten Barrieredefekt [80, 129, 130] konnten ebenfalls Veränderungen der Tight junction im Kolonepithel zugeordnet werden [185, 131, 59].

### 1.1.2 Barrierestörungen und ihre pathophysiologische Bedeutung

Die intestinale Permeabilität ist bei verschiedenen Krankheiten erhöht. Als klinisches Symptom kommt es dabei durch eine gestörte Transport- und Barrierefunktion zu Durchfällen (z.B. Leckfluxdiarrhoe bei gestörter Barrierefunktion). Einerseits können infektiöse Erreger oder deren Toxine diese Transport- und Barrierefunktion direkt manipulieren und so zu Solutverlust oder sekretorischer Aktivität des Darmepithels führen [41, 163], andererseits ist eine Störung der Barrierefunktion oft Ursache oder auch Folge von Entzündungen der Darmmukosa. Bei chronisch entzündlichen Veränderungen des Darmtraktes und auch bei HIV-Patienten ("human immunodeficiency virus") manifestieren sich dadurch massive Diarrhoen [134]. Über Veränderungen der intestinalen Permeabilität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wurde mehrfach berichtet [80, 129, 130]. Der Begriff CED fasst verschiedene Krankheitsbilder unterschiedlicher Genese zusammen. Die beiden wichtigsten sind hierbei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

Morbus Crohn ist durch eine Entzündung gekennzeichnet, die alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes betreffen kann, aber bevorzugt im terminalen Ileum und Kolon auftritt. Typisch sind perianale Läsionen mit Fistelbildungen, vorwiegend axial angeordnete Ulzera und die Bildung epitheloidzelliger Granulome und Aphten. Colitis ulcerosa ist eine fast ausschließlich im Kolon lokalisierte Entzündung, sie tritt fast immer zuerst im distalen Dickdarm (Sigmoid und Rektum) auf und breitet sich unterschiedlich stark nach proximal aus. Charakteristisch sind blutige und schleimige Diarrhöen. Bei beiden Erkrankungen werden extraintestinale Manifestationen an Gelenken, Haut, Augen, Leber, Gallenwegen, seltener an Niere, Lunge und Pankreas beobachtet.

Es wird davon ausgegangen, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen durch eine inadequate Reaktion des Immunsystems auf die normale luminalen Flora ausgelöst

werden, wobei unklar ist, ob eine vermehrte Exposition oder eine vermehrte Immunaktivität bezüglich luminaler Antigene vorliegt. Dies ist gleichbedeutend mit der Frage, ob der Barrieredefekt primär oder sekundär für die Erkrankungen ist. Für die Entstehung werden genetische Faktoren, Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora, Mikrozirkulations- und Resorptionsstörungen in der Darmmukosa, Veränderungen im Immunsystem, sowie Belastungsfaktoren, zu denen Infektionen, Schadstoffe und die Ernährung zu zählen sind, diskutiert [118].

Bemerkenswert ist die Entdeckung einer genetischen Prädisposition auf dem Locus IBD1 ("inflammatory bowel disease locus") des Chromosoms 16q12. Hier wurde das Gen *nod2* ("nucleotide oligomerisation domain 2") identifiziert [81]. Es konnte gezeigt werden, dass es sich beim zugehörigen Protein um einen intrazellulären Rezeptor für bakterielle Strukturen handelt. Mutationen im *nod2*-Gen scheinen zu einer veränderten Erkennung intrazellulärer Bakterien oder ihrer Produkte zu führen [55]. Ebenfalls beschrieben sind Mutationen im Gen *mdr1* ("multidrug resistance 1"), das für ein Phosphoglykoprotein kodiert. Dieses wird in intestinalen Zellen stark exprimiert und ist ein Bestandteil der Barriere gegen Xenobiotika. Entsprechend entwickeln *mdr1a*-defiziente Mäuse eine Colitis, die weitgehend der Colitis ulcerosa entspricht [128]. Beim Menschen geht ein Nukleotidpolymorphismus des *mdr1* in Position C3435T mit einer verminderten Phosphoglykoproteinexpression einher. Träger des Genotyps 3435TT zeigen eine gestörte Barrierefunktion und haben ein gesteigertes Risiko für die Ausbildung einer Colitis ulcerosa [148].

Auf die Barrierefunktion des intestinalen Epithels wirken eine Vielzahl von Verbindungen ein. Dazu zählen proinflammatorische und immunogen wirksame Substanzen, die im Darmlumen gebildet werden, z.B. FMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Peptidglykane, Lipopolysaccharide, Toxine mit Proteaseaktivität, sekundäre Gallensäuren, Abbauprodukte von Gallensäuren und Medikamente [26, 142, 41, 125, 155].

Mikroorganismen sind ebenfalls in der Lage, die epitheliale Barriere direkt zu beeinflussen: Pathogene attackieren das Epithel mittels verschiedener Virulenzfaktoren. Ein Weg ist die direkte Zerstörung von Tight junction-Proteinen, was meist zur Erniedrigung des transepithelialen Widerstandes führt. Beispiele hierfür sind enterohämorrhagische *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Vibrio cholerae* und *Rotavirus* [41, 103]. Eine indirekte Veränderung der Tight junctions durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von beteiligten Proteinen ist für enteropathogene *E. coli* beschrieben worden [74]. Eine Permeabilitätserhöhung ohne Veränderung der Tight junction-Struktur wurde für *Clostridium difficile* toxin A and B gezeigt [44]. Eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts der Zellen durch Keime wie *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri*

führt ebenfalls zur Verminderung der Barrierefunktion [150]. Invasion der Epithelzellen, die nachfolgend die Möglichkeit der Translokation eröffnet, ist ein weiterer Weg der Interaktion von Pathogenen mit der intestinalen Barriere. Zur Kategorie der entero-invasiven Bakterien werden z. B. *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia* gerechnet [115].

Steigerungen der Mukosapermeabilität werden ebenfalls im Rahmen eines hypovolämischen Schocks, einer intestinalen Ischämie oder einer Endotoxinämie beobachtet. Dabei handelt es sich um Zustände, die oft im Rahmen von Stresssituationen, nach Traumen oder Verbrennungen auftreten [175, 121]. Diese Konditionen finden sich bei kritisch kranken Patienten und prädisponieren für bakterielle Translokation, was letztlich zu septischem Schock und multiplem Organversagen führen kann [162]. Nach heutigem Wissensstand ist also eine Stressung oder Schädigung der Mukosa Bedingung für eine pathologische Translokation kommensaler Mikroorganismen.

### 1.1.3 Wirkung von Zytokinen auf die epitheliale Barriere

Zu den Zytokinen rechnet man neben den Interleukinen (IL) auch Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren, Chemokine, "colony stimulating factors" (CSF) und die "tumor-necrosis-factor"-Familie (TNF-Familie). Es sind regulatorische Peptide, die von nahezu allen Zellen des Körpers produziert und in die Umgebung abgegeben werden. Es sind bis heute ca. 50 verschiedene regulatorische Peptide bekannt. Sie sind in der Lage, verschiedenste Funktionen der Körperzellen zu steuern. Wesentliche Funktionen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Intestinaltrakt sind die Steuerung des Immunsystems einschließlich der Regulation von Entzündungsvorgängen, sowie der Regulation von Wundheilungsvorgängen.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Zytokine eine wichtige Rolle bei der Entstehung und im Krankheitsverlauf der CED spielen. Im Zusammenhang mit diesen Erkrankungen unterscheidet man pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine, d.h. Mediatoren, die eine Entzündung verursachen und verstärken und solche, die eine Entzündungsreaktion herunterregulieren bzw. beenden können. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere TNF, IL-1, IL-8, IL-12, IL-18 und IL-13, zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem IL-4, IL-10 und IL-11. Auch im menschlichen Dünn- und Dickdarm werden diese Mediatoren von verschiedenen Zellen gebildet und regulieren verschiedene Funktionen im Verdauungstrakt. Bei CED ist das Gleichgewicht zwischen pro-entzündlichen und anti-entzündlichen Zytokinen dahingehend gestört, dass die entzündungsfördernden Mechanismen überwiegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-13 eingesetzt. Während  $\text{TNF}\alpha$  schon seit längerem als wichtiges Zytokin, besonders bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bekannt ist [20], belegen neuere Daten, dass Interleukin-13 eine Schlüsselrolle bei Colitis ulcerosa zukommt [77]. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion wird vor allem in Makrophagen, aber auch Granulozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen durch Stimuli wie z.B. Lipopolysaccharide induziert. Neben der Koordination der Immunantwort ist eine Hauptwirkung des Zytokins die Induktion des Apoptoseprogrammes von Zielzellen über CD95 (Fas/Apo1 - "fibroblast associated apoptosis receptor") oder CD120a (p55 TNF-Rezeptor-Typ-1). Im Gesamtorganismus treten bei Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  Symptome wie Fieber, Appetitverlust und eine Erhöhung der Akut-Phase-Proteine auf. Funktionelle Untersuchungen am gesunden menschlichen Kolon *in vitro* zeigten, dass  $\text{TNF}\alpha$  dort kurzzeitig eine Chloridsekretion auslöst [145]. Bei CED werden die Diarrhoen jedoch nicht durch aktive Chloridsekretion verursacht, sondern im Wesentlichen durch eine reduzierte aktive Resorption (Malabsorption) und einen gesteigerten sekretorischen Flux aufgrund erhöhter Tight junction-Permeabilität (Leckflux) [140, 24]. In humanen epithelialen Kolonkarzinomzellen verursacht  $\text{TNF}\alpha$  ebenfalls eine Permeabilitätserhöhung ohne Beeinflussung der aktiven Transportmechanismen [144]. Serosale Zugabe des Zytokins reduziert den transepithelialen Widerstand konzentrationsabhängig auf bis zu 20 % des Ausgangswertes, ohne dass eine Chloridsekretion ausgelöst wird. Mit Hilfe von Conductance scanning-Messungen wurde in unserem Labor gezeigt, dass der Barriereverlust sowohl auf eine erhöhte Apoptoserate als auch auf Veränderungen der Tight junction zurückzuführen ist [56]. Die Reparaturfähigkeit des Epithels wird ebenfalls durch  $\text{TNF}\alpha$  beeinflusst, wie an HT-29/B6-Zellen anhand artifizieller Einzelzellläsionen gezeigt werden konnte [47].

Der Schwerpunkt der Forschung über IL-13 liegt auf dessen Einfluss auf das Lungenepithel und auf andere Zellen des Atmungstraktes. In Tiermodellen bewirkte IL-13 eine erhöhte Mukussekretion und eine Hypersensibilität der Atemwege [67]. Die Durchführung elektrophysiologischer Versuche an Calu-3 (humanen Lungenepithel)-Zellen, die mit IL-13 vorinkubiert wurden, ergaben einen reversiblen Abfall der Barrierefunktion. Analysen der Tight junction-assoziierten Proteine ZO-1 und Occludin zeigten eine Reduktion der Expression von ZO-1 und eine schwache Verminderung der Occludinexpression im Vergleich zu Kontrollen. In Studien zur Wundheilung führte die Applikation von IL-13 zu einer Hemmung der Migration von Calu-3-Zellen [2].

In einem Mausmodell für Colitis schien IL-13 die Epithelzellen zur Mukus- und Flüssigkeitssekretion zu stimulieren und führte darüber hinaus zur Zerstörung der Tight junction, was als möglicher Eintrittsweg für Bakterien diskutiert wurde [27]. Der barriereermindernde Effekt des Zytokins konnte in Kolonepithelzellen (HT-29/B6) demonstriert werden: Es zeigten sich Veränderungen der Tight junction, eine Erhöhung der Apoptoserate und eine verlangsamte Wundheilung [77].

#### 1.1.4 Bakterielle Translokation

In letzter Zeit hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass der Gastrointestinaltrakt ein komplexes Organ mit mehr Funktionen als der Verdauung und Ausscheidung von Nahrung ist. Der Darm ist ebenfalls ein metabolisches und immunologisches Organ, das eine Barriere gegen in seinem Lumen lebende Organismen und Antigene darstellt [36].

Die Tatsache, dass im intestinalen Lumen Bakterienkonzentrationen der Größenordnung  $10^{12}$  Organismen pro Milliliter Faeces (Caecum) [154] vorkommen, illustriert anschaulich die Effizienz dieser Barriere eingedenk der Sterilität angrenzender funktionaler Kompartimente wie z.B. des portalen Blutes und der mesenterialen Lymphknoten unter Normalbedingungen. 70-80 % des immunologischen Gewebes des Körpers befindet sich im Gastrointestinaltrakt, 90 % der zirkulierenden Antikörper zeigen Spezifitäten gegen intestinale Bakterien.

Die Vorstellung, dass der Gastrointestinaltrakt unter bestimmten Bedingungen eine Quelle für mikrobielle Kontamination normalerweise steriler Kompartimente des Körpers bei z.B. Sepsis sein könnte, ist nicht neu und interessiert Kliniker bereits seit vielen Jahren. Im ausgehenden neunzehnten Jahrhundert entwickelte sich die Idee, dass Peritonitis als Ergebnis der Passage viabler Bakterien vom angrenzenden Darm ausgelöst wird, damals Durchwanderungs-Peritonitis genannt. Zwei Forschergruppen postulierten 1891 und 1895 unabhängig voneinander den Übertritt lebender Bakterien durch die intakte Darmwand in-vivo [49, 45]. Diese Resultate wurden 1949 durch Schweinburg et al. [149] bestätigt, die lebende Bakterien im Peritoneum von Hunden nach hämorrhagischem Schock fanden. Schatten et al. [143] zeigten beim Menschen, dass Bakterien auch in Abwesenheit eines infektiösen Prozesses vom intestinalen Lumen in die portale Zirkulation übertreten können. Nachfolgend wurde klar, dass neben gramnegativen Bakterien auch Endotoxin, grampositive Bakterien und Pilze die mukosale Barriere überwinden können [102].

Seit 1979 definiert man nach Berg und Garlington [11] dieses Phänomen als *bakterielle Translokation (BT)*. Der Ausdruck beschreibt die Passage lebender Bakterien durch die

epitheliale Mukosa in die Lamina propria, weiter in mesenteriale Lymphknoten und möglicherweise andere Gewebe. Es ist sinnvoll, dieses Konzept weiter zu fassen und jede Art von Translokation einzuschließen, nämlich sowohl den Übertritt lebender und nichtlebender Mikroorganismen und ihrer Produkte (z.B. Endotoxin) als auch den Übertritt inerter Partikel und Makromoleküle.

#### 1.1.5 Faktoren, die bakterielle Translokation beeinflussen

Neben bekannten pathogenen Keimen mit der Fähigkeit des Durchtritts durch die Barrieren des Körpers, wie z.B. *Listeria monocytogenes* [100], *Shigella flexneri* [141] oder *Yersinia enterocolitica* [61], gilt das Interesse der Forschung der Frage, ob Anteile der normalen enteralen Flora unter bestimmten Umständen vermehrt (oder überhaupt) aus dem Gastrointestinaltrakt in andere Kompartimente des Körpers übertreten können. Im Tiermodell wurden daher in vielen Studien verschiedene Einflüsse auf die bakterielle Translokation meist mittels Kultur viabler Organismen aus mesenterialen Lymphknoten untersucht; Tabelle 1 gibt hierüber einen Überblick. Grundsätzlich erzeugen diese Studien durch Variation exogener Parameter Veränderungen entweder in der Darmflora (z.B. Antibiotika), der Integrität der intestinalen Barriere (z.B. Ischämie) oder des Immunsystems (z.B. Graft-versus-Host-Disease). Brathwaite et al. zeigten mittels Nachweis von *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase in Makrophagen von Mesenteriallymphknoten, dass die Zahl der tatsächlich translozierten Keime weitaus größer sein muss als bisher angenommen, da die Werte eine deutliche Diskrepanz zu positiven Kulturen zeigten [21]. Weit weniger Studien gingen der Frage des initialen Durchtrittsereignisses intestinaler Keime nach. Die Fähigkeit zur Translokation ist in der residenten Flora des Intestinaltraktes nicht gleich verteilt: Obwohl anaerobe Bakterien gegenüber Aerobiern im Verhältnis von 100:1 bis 1000:1 überwiegen, translozieren sie nur unter extremen Bedingungen, wie in athymischen [127], letal bestrahlten [22] oder schwerst verbrannten Nagern [180]. In diesen Konditionen ist die enterale Integrität geschädigt und es scheint, dass anaerobe Keime dann in direktem Verhältnis zur Gewebsschädigung translozieren. Im Gegensatz zu Anaerobiern translozieren gramnegative Aerobier (bzw. fakultative Anaerobier) vergleichsweise massiv – sogar durch intaktes intestinales Epithel [180, 181]. Gramnegative fakultative Anaerobier, insbesondere *E. coli*, sind die am häufigsten und in größter Anzahl aus mesenterialen Lymphknoten kultivierten Keime.

Modell	Spezies
Verbrennung	Maus, Schwein
Hämorrhagischer Schock	Ratte
Intestinale Ischämie	Ratte
Intestinale Obstruktion	Ratte
Bakterielle Fehlbesiedlung	Ratte
Akute Leberschädigung	Ratte
Leberzirrhose	Ratte
Portale Hypertension	Ratte
Gelbsucht	Ratte
Hepatopulmonales Syndrom	Ratte
Akute Pankreatitis	Ratte
Totale parentale Ernährung	Ratte
Proteinmangelernährung	Maus
Dünndarmtransplantation	Ratte
Graft-vs-Host-Reaktion	Ratte
Chemotherapie	Maus
Antibiotika (oral)	Maus
Clostridium difficile	Maus
Lektin-Diarrhoe	Ratte
Schlafentzug	Ratte
Endotoxin (Niedrigdosis)	Maus

Tabelle 1: : **Überblick über Translokationsmodelle im Tier** (adaptiert aus [182]).

Somit ist evident, dass die absolute intraluminale Populationsdichte einzelner Mikroorganismen nicht die Hauptdeterminante der Translokation darstellt und damit die beobachteten Translokationsszenarien über Änderungen der Darmpermeabilität allein nicht erklärt werden können.

#### 1.1.6 Bakterielle Translokation beim Menschen

Das Vorkommen bakterieller Translokation beim Menschen ist unbestritten [151], die Datenlage zu mechanistischen Zusammenhängen aber vergleichsweise rar im Vergleich zu Tiermodellen (siehe Abschnitt 1.1.5). Diese Schwierigkeiten bei Aufklärung von Fragestellungen zur bakteriellen Translokation beim Menschen sind den ethischen und methodischen Limitationen bei der Entnahme repräsentativer Proben z.B. portalen Blutes oder mesenterialer Lymphknoten von Probanden geschuldet. Selbst diese Art der Bestimmung würde wahrscheinlich die Durchtrittsmenge mikrobieller Antigene maßgeblich unterschätzen, wie Studien mit radioaktiv markierten Bakterien zeigten [3], da die meisten Keime nach Durchtritt durch die Epithelbarriere abgetötet werden.

Trotzdem ist klar, dass bakterielle Translokation durch verschiedene Konditionen, wie (1) Veränderungen der normalen intestinalen Flora (2) physische Zerstörung der mukosalen Darmbarriere durch z.B. direkte Schädigung der Enterozyten durch Strahlung oder Toxine oder durch reduzierte Blutversorgung des Gastrointestinaltraktes und (3) ein geschwächtes Immunsystem begünstigt wird.

In einer Studie wurde bei 15 % der Patienten mit einer Bauchoperation bakterielle Translokation festgestellt [124]. Die Translokation war assoziiert mit einem erhöhten Risiko septischer Komplikationen [108] und das Spektrum der translozierten Keime entsprach dem der später entwickelten Sepsis. Noch öfter tritt bakterielle Translokation bei Patienten mit Darmverschluss auf, ebenso bei immungeschwächten Individuen. Diese und andere Studien unterstützen das Konzept des Darmes als "Reservoir für Bakterien und Endotoxin" [38, 112]; ob aber bakterielle Translokation der initiale Mechanismus der Sepsis ist, bleibt umstritten.

Es muss außerdem zwischen pathologischer und nichtpathologischer Translokation unterschieden werden, da sich abzeichnet, dass ein stetiges „normales sampling“ sowohl luminaler Antigene als auch lebender Bakterien im Gastrointestinaltrakt stattfindet. Ein neben M-Zell-vermittelter Aufnahme [94, 97] existierender Durchtrittsweg durch dendritische Zellen im Epithel wird von Rescigno et al. postuliert und konnte im Zellkulturmodell nachexperimentiert werden [55]. Eine elegante Studie von MacPherson & Uhr ergab weitere Hinweise auf ein normales, aber strikt reguliertes intestinales Antigensampling zur Aufrechterhaltung der Homöostase (über IgA-Bildung und Sekretion). Die Verwendung eines Maus-Loop-Modells, wobei zwei Loops im gleichen Tier mit verschiedenen markierten Keimen inokuliert wurden, die beide nachfolgend in mesenterialen Lymphknoten nachweisbar waren, zeigte, dass Keime in verschiedenen Bereichen des Intestinaltraktes die Mukosa überwandern [110].

### 1.1.7 Die menschliche Darmflora

Die Flora des Gastrointestinaltraktes besteht aus einem hochkomplexen Gemisch von Mikroorganismen, wobei bestimmte Bakterienspezies in verschiedenen Darmabschnitten vorherrschen. Die Flora der Mundhöhle besteht aus ca. 200 verschiedenen Bakterienspezies mit einer Konzentration von  $10^9$  Bakterien pro Milliliter Flüssigkeit, wobei dentale Plaques sogar bis zu  $10^{11}$  Bakterien pro Gramm enthalten. Im Magen finden sich weit weniger Bakterien, hier hängt die Kolonialisierung von Ernährungsgewohnheiten ab und variiert sehr stark. Es finden sich zwischen  $10^1$  bis  $10^5$  Keime pro Milliliter Mageninhalt. Normalerweise wirkt das sehr saure Magenmilieu stark bakterizid, seit

einem Jahrzehnt ist jedoch bekannt, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *Helicobacter pylori* besiedelt ist [120]. Es wird derzeit diskutiert, ob diese Besiedlung einen ausschließlich krankhaften Status darstellt. Die Pathogenität dieses Keims hängt von Virulenzfaktoren ab, deren Gene auf einer Pathogenitätsinsel lokalisiert sind. Anscheinend sind nur Stämme, die diese Virulenzfaktoren haben, pathogen.

Der proximale Dünndarm ist vorwiegend mit Lactobazillen und Streptokokken besiedelt, wobei aufgrund des niedrigen pH-Wertes und hoher peristaltischer Aktivität die Konzentration bei  $10^3$  bis  $10^4$  Keimen pro Milliliter liegt. Im distalen Dünndarm findet man  $10^8$  bis  $10^9$  Bakterien pro Milliliter, neben Laktobazillen und Streptokokken sind hier insbesondere *Enterobacteriaceae* wie *Escherichia coli* angesiedelt.

Im Dickdarm findet man dagegen eine um 3 bis 4 Größenordnungen höhere Konzentration, nämlich  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  Bakterien pro Gramm Darminhalt. Man schätzt, dass ungefähr 400 verschiedene bakterielle Spezies im Dickdarm residieren, wobei die Zahl möglicherweise deutlich unterschätzt wird, da nicht genau zu sagen ist, wie viele Spezies nicht kultivierbar sind. Ansässig sind im Kolon vor allem obligate Anaerobier wie *Bacteroides*, *Eubakterium*, *Bifidobakterium*, oder *Clostridien*. Diese machen 99 % der Gesamtpopulation aus. Außerdem gehören fakultative Anaerobier mit einer ungefähren Konzentration von  $10^8$  Keimen pro Gramm Darminhalt zur residenten Flora. Hierbei handelt es sich vorwiegend um *Escherichia coli*.

Die Flora innerhalb eines Darmsegments ist vom Darmlumen hin zur Glykokalyx der Epithelzellen wahrscheinlich sehr unterschiedlich aufgebaut, da sich einerseits die Milieubedingungen und andererseits die Keime in ihrer Fähigkeit zur Adhärenz unterscheiden [167]. Deshalb spiegelt die Zusammensetzung einer Stuhlprobe nicht zwingend die Epithel-assoziierte Flora wieder.

#### 1.1.7.1 Extraintestinal pathogene *E. coli*

Stämme der Spezies *Escherichia coli* stellen 0,01 - 0,1 % der residenten Flora des Darmtraktes. Als Erstbesiedler des menschlichen Darmes schaffen sie anaerobe Bedingungen, die zur Kolonialisierung durch anaerobe Mikroorganismen führen. *E. coli*, die zur permanenten Flora des Gastrointestinaltraktes gehören, werden als kommensale Keime bezeichnet. Demgegenüber unterscheidet man pathogene *E. coli*, die bei Anwesenheit meist zu einer Erkrankung führen.

Stämme der residenten Flora, die die Fähigkeit besitzen, außerhalb des Gastrointestinaltraktes Infektionen zu verursachen, wurden in eine neue Gruppe – ExPEC, für "extraintestinal pathogenic *E. coli*" – eingeordnet [138]. Verschiedene extraintestinale Infektionen werden durch diese Stämme verursacht, wobei die am häufigsten auftretenden Erkrankungen Harnwegsinfektionen sind. Außerdem sind *E. coli* häufig Ursache von Bakteriämie und Sepsis. Neonatale Meningitis und Sepsis, welche oft zu schwerwiegenden Folgekrankheiten führen, werden ebenfalls hauptsächlich durch ExPEC-Stämme hervorgerufen [104]. Prominent sind ExPEC auch in intraabdominalen Infektionen sowie bei nosokomialer Pneumonie, seltener findet man sie bei Knochenhautentzündungen, Zellulitis und Wundentzündungen.

Die für die meisten extraintestinalen Infektionen verantwortlichen ExPEC-Stämme sind von normalen kommensalen *E. coli* so verschieden wie intestinal pathogene Stämme. Unterschiede zeigten sich bei phylogenetischer Einordnung der Stämme, wo im Gegensatz zu kommensalen apathogenen und intestinal pathogenen Spezies ExPEC-Stämme den Klassen B2 und seltener D zugeordnet wurden. Die weitere Eingrenzung klinisch häufig anzutreffender Klone erfolgt über charakteristische O:K:H-Serotypen [77]. ExPEC besitzen eine Reihe extraintestinaler Virulenzfaktoren (VF), die es ihnen ermöglichen, mukosale Oberflächen zu kolonialisieren, Immunmechanismen des Wirtes zu umgehen, Zugang zu essentiellen Nährstoffen wie z.B. Eisen zu erhalten, den Wirt zu invadieren oder zu schädigen und Entzündungen hervorzurufen [84]. Charakteristische Virulenzfaktoren von ExPEC sind verschiedene Adhäsine, Polysaccharidhüllen (Lipopolysaccharide und Kapseln), Toxine, Siderophore, Proteasen, Invasine und Serumresistenz vermittelnde Proteine. Viele dieser Faktoren sind auf sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI - "pathogenicity island") kodiert [15, 63]. Pathogenitätsinseln sind Blöcke zusammenhängender Virulenzfaktoren, die bei kommensalen Stämmen nicht anzutreffen sind. Der Guanin + Cytosin-Gehalt dieser Pathogenitätsinseln unterscheidet sich deutlich von normaler *E. coli*-DNA. Des Weiteren enthalten diese Abschnitte Mobilitätselemente wie z.B. Insertionssequenzen und sind im Genom an tRNA Loci eingefügt, was für einen Phage-medierten Horizontaltransfer spricht. Im Gegensatz zu intestinal pathogenen *E. coli* sind ExPEC nach heutigem Wissensstand nicht in der Lage, gastrointestinale Erkrankungen beim Menschen auszulösen. Sie sind fähig, den menschlichen Intestinaltrakt asymptomatisch für längere Zeit zu kolonialisieren und können dabei unter bestimmten Umständen sogar effektiver als normale kommensale Stämme sein [184]. Studien zeigten, dass ExPEC den dominanten Anteil fäkaler *E. coli*-Isolate in 20 % der gesunden Probanden darstellten [84, 81].

Obwohl ExPEC für ihr Virulenzverhalten bekannt sind, assoziieren sie doch vornehmlich in kommensaler Art und Weise mit dem Wirt und verursachen Infektionen nur, wenn sie den Intestinaltrakt verlassen und in normalerweise sterile Kompartimente des Körpers vordringen können.

### 1.1.8 *E. coli*- $\alpha$ -Hämolyisin

Zytolysine – das sind Toxine mit lytischer Wirkung auf eukaryontische Zellen – stellen wichtige Virulenzfaktoren von pathogenen Bakterien dar. Bei den meisten dieser Toxine handelt es sich um porenbildende Proteine. Eines der bekanntesten bakteriellen Zytolysine ist das  $\alpha$ -Hämolyisin (HlyA) von *Escherichia coli*, welches oft von extraintestinal pathogenen, vor allem von harnwegspathogenen *E. coli*-Stämmen gebildet wird [107, 106]. Es gehört zur großen Familie der bei gramnegativen bakteriellen Krankheitserregern weit verbreiteten RTX-Toxine ("repeats in toxin") [178] und ist in der Lage, verschiedene Animalzelltypen zu lysieren [37]. Ein Rezeptor auf Zielzellen konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Es wurde beobachtet, dass Glykophorin auf Erythrozyten die Affinität des Toxins maßgeblich erhöht [1]. Das mehrheitlich akzeptierte Modell beinhaltet eine lipophile Einlagerung des Toxins nach Konformationsänderung durch Kalziumbindung, wodurch es zu einer Pore in der Zellmembran und Integritätsverlust der Zelle kommt. Die erwähnten Repeats bestehen aus Glycin- und Aspartat-reichen Sequenzwiederholungen, die ein Kalziumbindungsmotiv darstellen. Zur Ausprägung von Aktivität binden RTX-Toxine Kalzium an diese Repeats.

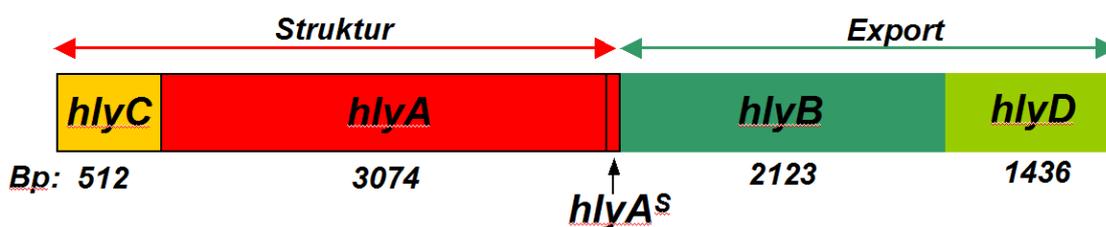


Abb. 2: **Operon für Sekretion und Synthese von  $\alpha$ -Hämolyisin** (adaptiert aus [106]).

Die extrazelluläre Sekretion des reifen  $\alpha$ -Hämolyisins erfolgt mit Hilfe eines spezifischen Transportapparats, der aus zwei integralen Proteinen der

Zytoplasmamembran, HlyB und HlyD, sowie dem in der äußeren Membran verankerten TolC zusammengesetzt ist. Der Export wird durch Bindung von HlyB an die C-terminale Signalsequenz des HlyA initialisiert [106]. Abgesehen vom Gen für TolC (*tolC*), das in allen gramnegativen Bakterien vorhanden ist, befinden sich vier der für eine funktionelle Expression notwendigen Gene auf einem Operon (*hlyCABD*-Operon; Abb. 2), das genomisch auf einer Pathogenitätsinsel (PAI) lokalisiert oder Plasmid-kodiert ist [101]. Das  $\alpha$ -Hämolysin wird in *E. coli* zunächst in Form eines inaktiven Protoxins (proHlyA) von 110 kDa synthetisiert und noch vor seiner Sekretion aus der Bakterienzelle durch Fettsäureacylierung an zwei Lysinresten aktiviert. Diese Acylierung ist maßgeblich für effiziente Bindung an Membranen im Lipidbilayermodell [68]. Die Aktivierung durch Acylierung ist vom zytoplasmatischen Protein HlyC abhängig, das mit proHlyA koexprimiert wird.

#### 1.1.8.1 Pathophysiologische Relevanz von *E. coli*- $\alpha$ -Hämolysin

Erste Hinweise auf Hämolysin als Virulenzfaktor erbrachte Welch et al. 1981: Ein rekombinant erzeugter *hlyA*-positiver *E. coli*-Stamm zeigte erhöhte Mortalität im Vergleich zum Kontrollstamm in einem intra-abdominalen Ratten-Sepsismodell [177]. Spätere Tierversuche unterstützten diese Beobachtungen: Niedrige Dosen HlyA in einem konstant perfundierten Kaninchen-Ileum-Loop-Modell verursachten eine erhöhte Hämoglobinkonzentration, Vasokonstriktion erfolgte und es bildeten sich Ödeme [117]. Hämolytische *E. coli*-Stämme verursachten signifikant stärkere Peritonitis nach intraperitonealer Injektion in Ratten [116].

Eine Reihe epidemiologischer Studien zeigt eine starke Assoziation Hämolysin-produzierender *E. coli*-Stämme mit extraintestinalen Infektionen, wobei neben neonataler Meningitis [93] Harnwegsinfekte vorherrschend sind [60, 48]. Hämolytische *E. coli*-Stämme können ebenfalls aus der Flora gesunder Probanden isoliert werden [135, 171]. Die Wirkung von *E. coli*- $\alpha$ -Hämolysin auf Zellen ist zeit- und konzentrationsabhängig. Während hohe Hämolysinkonzentrationen zu Nekrose führen, induzieren sublytische Konzentrationen des Toxins in verschiedenen eukaryontischen Zellen eine Veränderung der normalen Funktionen, wie z.B. Kalziumoszillationen [172], Zytokinausschüttung in epithelialen Zellen [157] und apoptotische Veränderungen [69]. Die Lyse von Erythrozythen bietet für das Bakterium im Körper außerdem eine Möglichkeit an Eisen zu gelangen und damit sein Wachstum zu begünstigen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass hämolysierende im Vergleich zu Hämolysin-defizienten

Stämmen zur Histaminausschüttung bei Rattenmastzellen führten und bei humanen Granulozyten Leukotriene freisetzten [65]. Gleichmaßen induzierten diese Stämme Kalziuminflux in Granulozyten, wobei Proteinkinase C-Aktivierung durch GTPase-Aktivität nachgewiesen wurde [91]. Diese Daten verdeutlichen das immunmodulatorische Potenzial HlyA-exprimierender Stämme. Bei humanen Endothelzellen bewirkte die Stimulation mit HlyA die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid, "platelet activating factor" (PAF), Prostaglandin I<sub>2</sub>, Diacylglycerol und Insositolphosphaten [62]. Humane Monozyten wurden durch HlyA zur IL-1 $\beta$ -Sekretion stimuliert, TNF $\alpha$  und IL-1 wurden nicht sezerniert [69, 70]. IL-6 und LPS (CD14) Rezeptorshedding wurde durch HlyA an humanen Monozyten und Rezeptor-transfizierten Zellen nachvollzogen, wobei der IL-6 Rezeptor in Lösung seinen Liganden band und bei IL-6 Rezeptor-defizienten Zellen ein spezifisches Signal vermittelte [176]. Dies würde in-vivo die schädigenden Effekte des Hämolytins noch verstärken.

## 1.2 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die qualitative und quantitative Untersuchung des Translokationsverhaltens intestinal apathogener *Escherichia coli*-Isolate über die epitheliale Barriere des Darms. Hierzu wurden verschiedene, mehrheitlich intestinale, epitheliale Zelllinien als Modellsysteme einer epithelialen Barriere eingesetzt.

Weiterführend wurde die Rolle proinflammatorischer Zytokine auf den Translokationsprozess am Zellkulturmodell untersucht und dadurch das Verhalten des Darmepithels bezüglich der untersuchten Isolate unter entzündlichen Bedingungen simuliert.

Ein nächstes Ziel war die fluoreszenzoptische Darstellung des Translokationsprozesses, wobei beabsichtigt war, den genauen Weg des Übertritts und einer möglichen Barriestörung des Epithels zu zeigen und zu charakterisieren. Interessant war hier die Frage, ob es sich um einen trans- oder parazellulären Durchtritt handelt. Dies wurde an Zellkulturen und an nativen Epithelien des Rattenkolons durchgeführt. Im Zuge der Abklärung des Durchtrittsweges wurde die Invasionsfähigkeit des translozierenden Stammes untersucht.

Die Identifizierung und Charakterisierung der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren, die am Prozess der Translokation beteiligt sind, sollte durch Korrelation funktioneller Daten aus Zellkulturversuchen und proteinbiochemischen Methoden erreicht werden.

Ein weiteres Anliegen bestand in der Übertragung des Systems in die ex-vivo-Situation, um eine mögliche pathophysiologische Relevanz der beobachteten Effekte zu validieren.