

4 Diskussion

Die Interaktion mit der umgebenden Mikroflora ist von ausschlaggebender Bedeutung für die menschliche Gesundheit. Bakterien sind als Verursacher vieler Krankheiten identifiziert worden. Besonders anschaulich wird die Notwendigkeit eines fein geregelten Zusammenspiels im Gastrointestinaltrakt, da sich hier eine vergleichsweise große Keimpopulation in direkter Interaktion mit dem Wirt befindet. Als Abgrenzung zwischen Körperinnerem und -äußerem bilden Epithelien hier multifunktionale Gewebe, die einerseits vektoriellen Transport von Soluten, Wasser und Nährstoffen bewältigen und andererseits gleichzeitig eine Barriere für luminale Keime darstellen. Kommt es zu einer Störung dieser Barrierefunktion, ist die Separation des Lumens von der Mukosa, und weiterführend anderer steriler Kompartimente des Körpers, nicht mehr gewährleistet. Neben einer Beeinträchtigung des Stoffaustausches über das Epithel besteht nun die Möglichkeit des unregulierten Eintritts luminaler Antigene / Bakterien in die Mukosa, was bei Überschreiten einer kritischen Menge eine entzündliche Reaktion auslöst oder zu disseminierten Infektionen führen kann. Neben Pathogenen als Auslöser entzündlicher Darminfektionen wird für Konditionen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen angenommen, dass Bakterien der kommensalen Flora diese Entzündungen unterhalten bzw. verstärken können, wenn nicht sogar als Auslöser der Inflammation fungieren [118]. Nicht eindeutig geklärt ist, ob ein Barrieredefekt dem Krankheitsgeschehen bereits vorangeht oder, wie beschrieben [17, 24, 59, 144, 185], sekundär durch die Entzündungsreaktion verursacht wird. Daher ist es eine sehr interessante Frage, ob Vertreter der normalen Darmflora unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, die epitheliale Barriere zu überwinden.

Im Zuge dieser Fragestellung wurden in dieser Arbeit Isolate extraintestinal pathogener *E. coli* (ExPEC), die Teil der normalen intestinalen Flora sind [81], auf ihre Fähigkeit zur Translokation über die epitheliale Barriere im HT-29/B6-Zellkulturmodell getestet und potentielle Durchtrittswege optisch und elektrophysiologisch charakterisiert. Das Invasionsvermögen der Isolate wurde ebenfalls untersucht, sowie der Einfluss entzündlicher Bedingungen auf die Translokation nachgebildet. Vergleichend zum Zellkulturmodell konnte zusätzlich erstmalig eine neuartige Form der Epithelschädigung, genannt *focal leak*, im nativen Darmepithel der Ratte gezeigt werden.

4.1 Translokation apathogener *E. coli*

4.1.1 Translokationsmessung am HT-29/B6-Epithelmodell

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten HT-29/B6-Zellen haben Eigenschaften von Kolonkryptenzellen [95] und bilden somit nicht alle im Kolon vorkommenden Enterozytentypen nach, ermöglichen aber die Untersuchung epithelialer Transport- und Barriereprozesse ohne die Beeinflussung durch nichtepitheliale Strukturen auf einer reproduzierbaren Basis. Außerdem ist durch den Einsatz von Zelllinien das Risiko der Kontamination durch Fremdkeime mit entsprechender Verfälschung der Ergebnisse durch die von vornherein realisierbare Keimfreiheit der Kultur mit weit weniger Arbeitsaufwand zu erreichen. Deshalb ist ein solches Modell für quantitative Aussagen über translozierende Keime gut geeignet. Gleichzeitig ergibt sich dadurch die Möglichkeit, invadierte Bakterien zu bestimmen. Bei der transformierten Zelllinie HT-29/B6, entstanden aus HT-29-Zellen unter Glukoseentzug, handelt es sich um ein gut charakterisiertes Modell einer epithelialen Barriere. Seine funktionellen Eigenschaften, wie Mukus- und Chloridsekretion, sind gut untersucht [95]. Es konnte gezeigt werden, dass HT-29/B6 funktionelle Tight junctions ausbilden [144] und diese die parazelluläre Leitfähigkeit stark begrenzen [57], was eine Eigenschaft dichter Epithelien ist und die effektive Abdichtung des parazellulären Weges beweist. Fluxmessungen unter Verwendung von Grössenmarkern bestätigten die abdichtende Funktion der HT-29/B6-Monolayer hinsichtlich großer Moleküle (4 kDa) [17].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein intestinal apathogener Stamm eine signifikante Zellschädigung im intestinalen Epithel hervorrufen kann und damit das Potenzial zum Übertritt über die epitheliale Barriere besitzt. Es ist anzunehmen, dass durch diese Läsionen auch sekundäre Translokation luminaler Inhalte ermöglicht wird. Im Vergleich zu *E. coli* O4 waren andere getestete Stämme gleicher Klassifizierung nicht in der Lage, diesen Effekt zu erzeugen.

Im Gegensatz zu pathogenen Keimen existieren vergleichsweise wenig Studien zur Translokation kommensaler Mikroorganismen über die intestinale Barriere, abgesehen vom klassischen in-vivo Aufnahmeweg über M-Zellen [123, 94], welche man als Ort des Antigen-samplings versteht. Clark et al. zeigten, dass ein apathogener *E. coli* im Caco-2-Zellkulturmodell unter entzündlichen Bedingungen ($\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$) vermehrt transloziert und postulieren eine transzelluläre Passage dieses Keims [31]. Diese Studien werden als Beispiel eines vermehrten bakteriellen Durchtrittes unter entzündlichen Bedingungen gewertet, wobei aber der eingesetzte Stamm molekular nicht charakterisiert wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, dass dieser Stamm

bekannte Virulenzfaktoren aufweist. Versuche zur Epithelinvasion eines uropathogenen *E. coli*-Isolats wurden von Guignot et al. an polaren intestinalen Zellkulturen durchgeführt und zeigten eine CD55-abhängige Invasion und gleichzeitig eine potente Zerstörung der Zellen durch Hämolyisin [69]. Die Fähigkeit zur Invasion ist als Vorbedingung eines weiteren transzellulären Durchtritts zu sehen. Ein weiteres intestinales Zellkulturmodell ist die von Zeng et al. genutzte T84-Zelllinie, an der die Transzytose von klinischen *Enterococcus faecialis* Isolaten untersucht wurde, wobei sich je nach Isolat Unterschiede in der Effizienz des Durchtritts ergaben [186]. Eine Translokationsstudie mit *E. coli* K1-Isolaten [25], häufigen Verursachern neonataler Meningitis, an T84- und Caco-2-Zellen ist ein weiteres Beispiel für die Eignung von Zellkulturmodellen zur in-vitro-Testung bakterieller Interaktionen mit dem Darmepithel. Obwohl T84, Caco-2 und auch MDCK-Zellen ebenfalls eine funktionelle Barriere ausbilden können, eignet sich der Klon HT-29/B6 zusätzlich besonders für die Untersuchung des Einflusses entzündlicher Bedingungen auf Barriere- und Transportprozesse, da diese Zelllinie zytokinresponsiv ist [146, 56, 144]. Eine direkte Interaktion eines intestinalen Keims mit dem Epithel der Mukosa ist in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

4.1.2 *E. coli* Nissle 1917 im Translokationsmodell

Escherichia coli Nissle 1917 ist ein probiotischer Stamm, der zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa oral eingesetzt wird (Mutaflor®) und ähnlich gute Ergebnisse wie das klassisch eingesetzte Präparat Mesalazin erzielt [132, 181]. Dieses Isolat ist ein apathogener Mikroorganismus mit darüberhinaus anerkannt probiotischen Eigenschaften für die Darmgesundheit, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen nicht ausreichend geklärt sind. Im HT-29/B6-Modell zeigte *E. coli* Nissle 1917 keine Translokation, beobachtet wurde aber eine massive Adhärenz an der apikalen Seite des Epithels. Da Adhäsion eine Voraussetzung für Internalisierung, respektive Invasion ist, wird die Fähigkeit zur Adhärenz und sich dadurch ergebende Competition um Epithelbindungsstellen mit anderen Keimen als ein Faktor probiotischer Wirkung von *E. coli* Nissle diskutiert [18]. Auch nach Inkubation der Epithelzellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IL-13 ergab sich kein Durchtritt, obwohl die durch das Epithel gebildete Barriere nach Inkubation massiv geschädigt war, wie der stark abgefallene transepitheliale Widerstand zeigte. Es ist bekannt, dass der Zytokin-induzierte Widerstandsabfall in dieser Zelllinie eine erhöhte Apotoserate und Veränderungen der Tight junction widerspiegelt [56, 144] und damit eine Öffnung des parazel-

lulären Weges darstellt. Dass der probiotische Keim selbst unter diesen Bedingungen nicht in Lage ist zu translozieren, demonstriert die Effizienz der epithelialen Barriere gegenüber Mikroorganismen. Diese Beobachtung wurde in Caco-2-Zellkultur wiederholt und bestätigte das Ergebnis. Die von Clark et al. an Caco-2-Zellen beschriebene vermehrte Translokation des *E. coli* C25 [31] unter Zytokinen und metabolischem Stress zeigt im Vergleich zu den in dieser Arbeit gewonnenen Daten an *E. coli* Nissle, dass genetische Unterschiede der Keime ebenfalls die Durchtrittsfähigkeit bestimmen und inflammatorische Bedingungen im Epithel allein nicht ausreichen.

4.1.3 Translokation verschiedener ExPEC-Isolate

Die nicht zu detektierende Translokation des Probiotikums *E. coli* Nissle, selbst unter der Bedingung einer schweren Barrierestörung durch Zytokine, warf die Frage auf, ob dies ebenfalls für andere *E. coli* zutrifft. Dazu wurde eine Auswahl an *E. coli*-Patientenisolaten getestet, die mit extraintestinalen Infektionen assoziierten Serovaren angehören. Es bestand die Hypothese, dass diese Keime die Fähigkeit besitzen die Darmwand zu überwinden. Die begrenzende Struktur auf diesem Weg wird durch das Epithel der Mukosa gebildet. Die Isolate wurden auf klassische Virulenzfaktoren intestinal pathogener *E. coli* getestet, um eine entsprechend bekannte Pathogenität auszuschließen. Außer Hämolyse – ein anerkannter Marker extraintestinaler *E. coli*-Isolate [138] – wurden keine bis dato bekannten Virulenzfaktoren nachgewiesen. Somit wurden diese Stämme der Klasse der ExPEC – extraintestinal pathogene *E. coli* – zugeordnet. ExPEC residieren intestinal asymptomatisch, verursachen aber bei Erreichen normalerweise steriler Kompartimente des Körpers teils schwere Infektionszustände.

Der verwendete Stamm O6:K5 wurde aus dem Stuhl eines gesunden Probanden isoliert. Dieser Serotyp ist einerseits in der normalen Flora zu finden, andererseits bei Harnwegsinfekten und Bakteriämie [14]. *E. coli* K1, ein weiterer Stamm, wurde aufgrund der etablierten Assoziation des Kapselantigens K1 mit neonataler Meningitis ausgewählt, da hier ebenfalls das Überwinden der epithelialen wie auch der endothelialen Barriere Voraussetzung für die Erkrankung durch diesen Keim sind [87]. Translokationsexperimente wurden im gleichen Versuchsaufbau durchgeführt, doch zeigten beide Keime ebenfalls keinen Durchtritt, vergleichbar dem Probiotikum *E. coli* Nissle. Als weiterer Versuchsstamm wurde *E. coli* O4, ein Pyelonephritisisolat, ausgewählt. Dieser Serotyp ist Bestandteil der physiologischen Darmflora, man findet ihn aber ebenfalls häufig bei Harnwegsinfektionen [81, 72]. Dieser Stamm zeigte spontane Translokation über das HT-29/B6-Epithelmodell und wurde im Weiteren zur

eingehenden Charakterisierung der Route und des Mechanismus des Durchtritts sowie des Einflusses entzündlicher Bedingungen auf die Translokation benutzt. Dieses Modellergebnis zeigt, dass Subgruppen im Darm residenter und als intestinal apathogen klassifizierter *E. coli* die Potenz zur Schädigung und zum Durchtritt durch die epitheliale Barriere haben.

4.1.4 Translokation von *E. coli* O4 im Zellkulturmodell

E. coli O4 permeiert spontan den durch HT-29/B6 gebildeten Monolayer, wobei es gleichzeitig zum Abfall des transepithelialen Widerstandes kommt (Abb. 10). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zum *E. coli* C25-Translokationsmodell, in welchem eine transzelluläre Passage des *E. coli* ohne Widerstandsabfall berichtet wird [31]. Burns et al. notierten ebenfalls einen Abfall des transepithelialen Widerstands bei Transzytose eines *E. coli* K1-Stammes, diskutierten dies aber nicht weiter [25]. Eine Studie mit dem apathogenen *E. coli* HB101, der in Kombination mit Dinitrophenol (DNP), einem Hemmer der oxidativen Phosphorylierung, auf T84- und HT29-Monolayern inokuliert wurde, zeigte, dass Epithelien unter metabolischem Stress durch kommensale *E. coli* Barrieredefekte entwickeln können. Die Translokation des *E. coli* HB101 in dieser Studie ging mit einem Widerstandsabfall einher [122]. Eine Monolayer-zerstörende Wirkung eines Pyelonephritis isolates (EC7372) wurde von Guignot et al. auf Caco-2/TC7-Zellen berichtet; in dieser Studie wurde aber das Translokationspotenzial des Keims nicht untersucht [69].

Der transepitheliale Widerstand ist ein einfaches Maß für die Integrität der Barriere und wird wesentlich durch die parazelluläre Ionenleitfähigkeit des Epithels bestimmt. Diese wiederum wird durch die Dichtigkeit der Tight junction determiniert. Eine starke Abnahme von R^t ist zumeist durch eine Zunahme der parazellulären Leitfähigkeit des Epithels verursacht, jedoch kann z.B. eine sehr starke Stimulation einer transzellulären Chloridsekretion einen ähnlichen Effekt hervorrufen. Um die Ursache des beobachteten Widerstandsabfalles durch *E. coli* O4 genauer zu klären, wurde die flächige Leitfähigkeitsverteilung analysiert und ergänzend fluoreszenzoptische Methoden zur Visualisierung der epithelialen Morphologie eingesetzt. Die Verwendung bakteriendichter Filter ermöglichte die Lokalisation der Keime nach deren Durchtritt durch das Epithel, da die Keime auf Filterebene akkumulierten.

Hierbei zeigten sich bakterielle Plaques im Bereich von Läsionen in der Epithelschicht (Abb. 19), welche ohne erkennbare Regel über den Filter verteilt waren. *E. coli* O4 ist somit in der Lage, Zellen der Epithelschicht zu zerstören und sich auf diese Weise

Zutritt zum Basalkompartiment zu verschaffen, das in der in-vivo-Situation einen hochgradig immunkompetenten Raum des Körpers darstellt. Der Durchtritt erfolgt dabei nicht, oder nur in sehr kleinem Maße gleichverteilt durch die Epithelzellen, sondern es entstehen "hot spots" massiven Durchtritts der Keime, welche der in-vivo-Situation aufgrund ihrer fortschreitenden Ausdehnung die Möglichkeit unspezifischer Sekundärtranslokation weiterer Antigene eröffnen.

Diese epithelialen Öffnungen wurden als "*focal leaks*" bezeichnet. Das die Läsionen umgebende Epithel war morphologisch unverändert und die basale Leitfähigkeit dieser Regionen unterschied sich nicht von Kontrollepithel, während *focal leaks* stark erhöhte Leitfähigkeiten aufwiesen. Der mittlere Leitwert der vermessenen Läsionen lag um ein Zehnfaches über dem in diesem Epithel für Apoptosen bekannten Wert [17]. Dies zeigt, dass eine für den Durchtritt luminaler Inhalte relevante Wirkung des *E. coli O4* auf die beschriebenen fokalen Läsionen begrenzt ist.

Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten ergaben, dass zu Anfang kleine Läsionen (Einzelzellniveau) entstehen (Abb. 22), die dann progressiv größer werden, permanent leitfähig sind (Abb. 23) und somit mehr Keimen den Durchtritt ermöglichen. Es erhöht sich neben der Größe der Läsionen auch deren Anzahl (Abb. 19B) und damit die Gesamtleitfähigkeit, was zusammengenommen den Widerstandsabfall begründet.

Die Färbungen bewiesen außerdem, dass bereits durch sehr kleine Schädigungen, im Bereich 1-3 Zellen (siehe Abb. 22), Bakterien durchtreten können. Die relativ starke Streuung höherer Leitwerte für Läsionen in *E. coli O4*-inkubierten Epithelien (Abb. 26B) weist auf das Vorhandensein verschieden großer Schädigungen hin. Der progressive Verlauf der beschriebenen Barrierschädigung unterscheidet sich deutlich von dem durch Apoptosen verursachten Einzelzelldefekten, bei denen die Integrität der Barriere gegenüber Makromolekülen über den gesamten Zeitverlauf der "Entsorgung" der apoptotischen Zellen aufrechterhalten wird [17].

Für kleine, frühe *focal leaks* ergab sich, visualisiert durch Färbung der Tight junction Marker Occludin oder ZO-1, eine trichterförmige Vertiefung im Monolayer, welche eine Abflachung und Streckung umgebender Zellen in den zerstörten Bereich abbildet. Diese Beobachtung entspricht dem von Florian et al. [46] postulierten Reparaturvorgang an Einzelzelldefekten in dieser Zelllinie und kann als Versuch, die initiale Läsion zu schließen, interpretiert werden.

Ein anderes Bild zeigte sich bei E-Cadherinfärbung (Abb. 20): Vor allem bei fortgeschrittenen Läsionen war eine verstärkte E-Cadherinfärbung am Rand der Schädigung zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass dies durch den Kontaktverlust

angrenzender Zellen verursacht wird, welche nun verstärkt Proteine der Adherens junction ausbilden, um die Bildung von Zell-Zellkontakten zu forcieren. Erstaunlich ist dabei die relativ kurze Zeit – teilweise unter 4 h – nach der diese stark erhöhte E-Cadherinfärbung zu detektieren ist. Dies spricht für bereits vorhandene Proteinpools und die Bildung von Clustern an der Membran [99] (welche aber nicht färbbar sind, siehe die Läsion umgebende Zellen) oder eine massive und schnelle de-novo-Synthese.

Der Effekt von *E. coli* O4 auf HT-29/B6-Monolayer und der damit einhergehende Widerstandsabfall ließen sich durch Zugabe von Methyl-beta-Cyclodextrin (mbCD) vollständig hemmen. MbCD extrahiert Cholesterin aus der Zellmembran und inhibiert auf diese Weise clathrinabhängige Endozytose sowie die Ausbildung von Caveolae [136]. Dieser Aufnahmeweg eukaryonter Zellen scheint bei bakterieller Invasion von Bedeutung zu sein [152; 30]. Zuerst wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der publizierten Translokationsmodelle [31, 25, 33] die Hemmung des transzellulären Penetrationsweges beabsichtigt, weshalb mbCD eingesetzt wurde. Da eine Präinkubation mit diesem Agens zwar die Internalisierung des *E. coli* hemmte (Abb. 16), nicht aber die Bildung von Läsionen und damit den Durchtritt durch den hämolysierenden Wildtyp, ist davon auszugehen, dass es sich um eine direkte Wirkung des mbCD auf das Hämolyisin oder dessen Interaktion mit der Zellmembran handelt. Es zeigte sich anschliessend, dass sich der Effekt des *E. coli* O4 Kulturfiltrates ebenfalls durch Anwesenheit des Hemmers aufheben ließ (Abschnitt 3.1.3). Die Schädigung durch den hämolysierenden Wildtyp war nach Präinkubation mit mbCD sogar stärker ausgeprägt als bei unbehandelten Filtern (siehe R[†] in Abb. 15). Somit spielt die Internalisierung dieses Keims für den im HT-29/B6-Modell beobachteten massiven und progressiven Durchtritt keine maßgebliche Rolle. Auch als initiales Ereignis ist sie für den beobachteten *E. coli* O4-Effekt nicht Voraussetzung, da steriles Kulturfiltrat ebenfalls *focal leaks* erzeugt (siehe Diskussion 4.3). Trotzdem mag die Invasion mit nachfolgender Zellschädigung den Prozess begünstigen, ebenso ist nicht auszuschließen, dass es dennoch einen transzellulären Durchtritt in diesem Modell gibt, wenn auch in weitaus geringerem Maße als die Translokation durch *focal leaks*.

Die Schädigung der vormals konfluenten Epithelien ließ sich an anderen intestinalen Zelllinien (T84 und Caco-2), sowie an Klonen der Nierenzelllinie MDCK nachvollziehen. Obwohl in Größe und Anzahl unterschiedlich, wurden bei allen getesteten Zelllinien fokale Läsionen nach Inkubation mit *E. coli* O4-Kulturfiltrat beobachtet (Abb. 24). Diese Ergebnisse spiegeln die relativ unselektive, lytische Wirkung des α -Hämolyisins auf

eukaryontische Zellen wieder [37] und zeigen die Potenz von Hämolysinbildnern zur Barrierschädigung.

4.2 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Translokation

Die Vorstellung, dass allein durch die Passage von Bakterien oder anderer luminaler Antigene Entzündungen oder septische Komplikationen ausgelöst werden, ist vor allem durch Tiermodelle entstanden, in denen man die Notwendigkeit und Beteiligung der intestinalen Flora an inflammatorischen Manifestationen zwingend belegen konnte [179, 79]. Bakterielle Translokation kann aber auch als normales Phänomen verstanden werden, wobei der Bakterien-exponierte Gastrointestinaltrakt luminal Antigen aufgreift und sie dem Immunsystem präsentiert. Nachfolgend wird dann eine lokale, kontrollierte Immunantwort initiiert. Diesen Zustand würde man als "orale Toleranz" bezeichnen [160, 183]. Wann immer das normale Maß dieser Interaktion überschritten wird, können entzündliche bis septische Komplikationen entstehen. Eine andere Hypothese erwägt die mit einer entzündlichen Situation einhergehende Barrierschädigung als Ursache der Translokation [34, 182]. Die Frage nach dem Initialereignis von bakterieller Translokation hinsichtlich der Entzündungsbedingung kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Es wurde der Einfluss proinflammatorischer Zytokine, welche wichtige Mediatoren eines Entzündungsgeschehens im Gastrointestinaltrakt sind und Barriereveränderungen hervorrufen [23, 77, 144], auf die Translokation von *E. coli Nissle 1917* und *E. coli O4* getestet. HT-29/B6-Monolayer wurden mit proinflammatorischen Zytokinen $\text{TNF}\alpha$ und IL-13 vorinkubiert und deren barriereverändernde Wirkung anhand des Widerstandsabfalls dokumentiert. Die durchgeführten Untersuchungen zur Zytokinabhängigkeit der Translokation tragen zum Verständnis einer möglichen andauernden Überstimulation des Immunsystems bei, da durch vermehrte Antigenexposition ein *Circulus vitiosus* initiiert werden kann, der die Entzündung unterhält.

Sowohl Interleukin-13 als auch Tumornekrosefaktor- α bewirkten eine massive Zunahme der translozierten *E. coli O4* im Versuchszeitraum (Abb. 12), wohingegen *E. coli Nissle 1917* keinen Durchtritt zeigte. Das Modellepithel der HT-29/B6-Zellen war somit anfälliger für das schädigende Potential des *E. coli O4*, trotzdem war das Probiotikum *E. coli Nissle* nicht in Lage, unter diesen Bedingungen zu translozieren. Obwohl es sich bei diesem Modell um in-vitro Daten handelt, demonstrieren diese Versuche die erhöhte Anfälligkeit der epithelialen Barriere für Durchtritt bestimmter Keime unter direkter Zytokineinwirkung. Zytokinsensitivität wurde bereits in ähnlicher

Form für translozierende Keime im Zellkulturmodell beobachtet, wobei es sich in diesen Modellen um eine Erhöhung der transzellulären Passage handelte [31, 30]. Der genaue Mechanismus der Erhöhung der Suszeptibilität des HT-29/B6-Modells für den Durchtritt des *E. coli* O4 war nicht Teil dieser Arbeit; es ist aber bekannt, dass die eingesetzten Zytokine Barrieredefekte vermitteln und somit z.B. den Zugang des Hämolytins zur basolateralen Membran begünstigen, wo es deutlich stärker wirkt. Eine interessante Studie erklärte kürzlich ein ähnliches Phänomen: Die lange Zeit unklare Interaktion von Listerien mit ihrem Adhäsionsrezeptor Ecadherin, welcher basolateral an Enterozyten lokalisiert ist. Hier scheint eine initiale Diskontinuität der epithelialen Barriere die Adhäsion der Listerien und damit ihren Eintritt in die Mukosa zu ermöglichen [129]. Analog ist anzunehmen, dass Hämolytin initiale - durch Zytokine vermehrt auftretende - Diskontinuitäten in der Epithelbarriere durch seine basolateral stärkere Wirkung vergrößert. Neben einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion durch die eingesetzten Zytokine ist auch das Reparaturvermögen des epithelialen Monolayers nach Verletzungen eingeschränkt [46, 77, 144], was ebenfalls den stärkeren Durchtritt des Keims unter Zytokinen erklärt, da initiale Läsionen weniger effektiv abgedichtet werden.

4.3 Mechanismus der Translokation

Die zytotoxische Aktivität von ExPEC Kulturen gegen verschiedene Zelltypen, erzeugt durch die Produktion potenter Toxine wie α -Hämolytin, ist gut belegt [37]. Suttorp et al. zeigten, dass bereits geringe Konzentrationen an α -Hämolytin eine schädigende Wirkung auf endotheliale Zellen hatten, wobei die Leitfähigkeit und Makromolekülfluxe erhöht waren [165]. Eine Studie zeigte unter Verwendung uropathogener *E. coli* (Zystitisolat) an einer epithelialen Blasenzelllinie, dass die Produktion von α -Hämolytin ausreichend und bestimmend für die Zellzerstörung war. Da Hämolytin und CNF-1 ("cytotoxic necrotizing factor-1") meist auf einer Pathogenitätsinsel kodiert sind [40], wurden in dieser Studie zusätzlich CNF-1 negative Mutanten eingesetzt, was aber keine Änderung des Effektes und damit keinen Hinweis auf eine Beteiligung dieses Faktors an der zytolytischen Potenz der eingesetzten Stämme erbrachte [83]. Die Monolayer-zerstörende Wirkung eines uropathogenen Hämolytinbildners, isoliert aus einem Patienten mit Nierenbeckenentzündung, wurde ebenfalls an der intestinalen Zelllinie Caco-2/TC7 beschrieben [69].

Da *E. coli* O4 ein Hämolyisin-positives Isolat ist, wurde die Beteiligung dieses wichtigen Zytolysins am hier beschriebenen zerstörerischen Effekt auf das intestinale HT-29/B6-Barrieremodell mittels dreier Ansätze untersucht:

- Selektionierung und Einsatz einer Hämolyisin-defizienten Mutante des *E. coli* O4 (Abschnitt 2.6.2.1)
- Reproduktion des Effektes unter Verwendung des pSF4000- (Hämolyisinplasmid) transformierten Laborstammes *E. coli* K12 [43] (Abschnitt 3.3.1)
- Korrelation des hämolytischen Effektes auf Erythrozyten mit Widerstandsabfall im Zellkulturmodell (Abschnitt 3.3.1)

Die isogene Hämolyisin-defiziente Spontanmutante *E. coli* O4mut zeigte im HT-29/B6-Modell keine oder nur sehr geringe Translokation im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* O4 (Reduktion basaler KBE um Faktor 10^6 , Abschnitt 3.1.4) und der transepitheliale Widerstand blieb im gesamten Versuchszeitraum über dem Ausgangswert. *Focal leaks* waren auf diesen Zellfiltern nicht vorhanden und auch sonst traten keinerlei morphologische Veränderungen auf.

Die geringe Anzahl durchgetretener Keime im Vergleich zur völligen Undurchlässigkeit bezüglich der anderen in dieser Arbeit getesteten Isolate (Abschnitt 3.1.1) ist unklar und möglicherweise Ausdruck einer quantitativ geringen transzellulären Passage dieser Mutante aufgrund weiterer stammspezifischer Faktoren. Der beobachtete geringe Durchtritt der Mutante war durch Methyl- β -Cyclodextrin-Koinkubation nicht zu hemmen, was bei transzellulärer Passage zu erwarten wäre, da die Internalisierung der Keime unter dieser Bedingung deutlich reduziert war (Abschnitt 3.1.5). Da mbCD von basaler Seite, im Vergleich zu apikaler Zugabe, im Versuchszeitraum bereits einen deutlichen Widerstandsabfall verursacht (Abschnitt 3.1.4), ist anzunehmen, dass sich auf diese Weise ein möglicher keiminduzierter Zugang zur basolateralen Membran vergrößert, was wiederum die Durchtrittsrates der Keime erhöhen und einen Effekt auf eine mögliche transzelluläre Passage durch Internalisierungshemmung überlagern würde. Diese Fragestellung wurde nicht weiter beleuchtet, da für den hier beschriebenen Effekt des massiven Durchtrittes des *E. coli* O4 eine transzelluläre Passage quantitativ keine Rolle spielt.

Da bei der durchgeführten phänotypischen Selektion einer Spontanmutante nicht vollständig geklärt werden konnte, welche Teile des Genoms deletiert sind, wurde eine Hämolyisintransformante (*E. coli* K12pSF4000) generiert, wobei in einen Laborstamm *E. coli* K12 ein Hämolyisin-kodierendes Plasmid, erzeugt aus einem uropathogenen *E. coli*, eingebracht wurde [43]. Die Expression von Hämolyisin wurde mittels Western

Blots und Test lytischer Aktivität (Abschnitt 3.3.1) kontrolliert und verifiziert und das erhaltene Kulturfiltrat im Zellkulturmodell HT-29/B6 eingesetzt. Der Effekt auf den transepithelialen Widerstand war identisch dem des *E. coli* O4-Kulturfiltrates und es ergab sich die gleiche Morphologie der fokalen Läsionen (Abschnitt 3.3.1.1). Dies beweist, dass *E. coli*- α -Hämolyysin die fokalen Läsionen im Kolonepithelmodell hervorruft. Weitere Versuche ergaben (Abschnitt 3.3.1.1.1), dass die Stärke des *E. coli* O4-Effektes mit der Hämolyysinkonzentration und damit der lytischen Potenz des Kulturfiltrates korreliert. Dies erklärt, warum *E. coli* O6:K5, ebenfalls ein *hlyA*-positives Isolat, keine Translokation zeigte: Dieser Stamm bildete nicht genügend hämolytische Aktivität um eine ausreichend große Schädigung des Monolayers zu bewirken. Diese Beobachtungen verdeutlichen den Einfluss des Expressionslevels funktionellen Hämolyysins hinsichtlich einer Barrierschädigung, da geringere Schädigungen wahrscheinlich durch schnelle Reparaturprozesse kompensiert werden können. Des Weiteren zeigte sich, dass Hämolyysinpräparationen, appliziert von basaler Seite des Zellkultursystems, eine deutlich größere zellzerstörerische Potenz aufwiesen, was die Ausbildung und zunehmende Ausdehnung fokaler Läsionen erklärt. Besonders deutlich zeigte sich diese progressive Vergrößerung in Versuchen am Kolonepithel der Ratte, wo im Vergleich zur Zellkultur wenige, aber vermehrt große Läsionen entstanden und dies zugleich seltener eintrat (Abschnitt 3.2).

4.3.1 Invasionsverhalten von *E. coli* O4

Die Fähigkeit zur Invasion von Epithelzellen ist ein charakteristischer Virulenzfaktor intestinal pathogener Keime. Dies ist z.B. für *Listeria monocytogenes* [100], *Shigella flexneri* [141], *Yersinia enterocolitica* [61] oder *Campylobacter jejuni* [92] gut dokumentiert. Invasion eröffnet diesen Keimen die Möglichkeit, das bezüglich Substratangebot hochkompetitive Darmlumen zu verlassen und durch Eintritt in die Zellen a) dem Immunsystem weitgehend zu entgehen und b) ein vergleichsweise gutes Wachstumsmilieu zu erreichen. Die Keimpersistenz bei vielen Harnwegsinfektionen ist ebenfalls ein guter Hinweis auf internalisierte Keime im Urogenitaltraktepithel. Gleichzeitig ist Invasion der erste Schritt zur weiteren Dissemination des Mikroorganismus durch eine mögliche transzelluläre Passage des Mukosaepithels. Diese Möglichkeit ist für verschiedene *Escherichia coli* Stämme am Zellkulturmodell bereits nachvollzogen worden. Es konnte gezeigt werden, dass *E. coli*-Isolate des Intestinaltraktes invasionsabhängig translozieren - also eine transzelluläre Passage durch das Epithel stattfindet [31, 25, 122]. Invasionsvermögen und Mechanismen wurden ebenfalls bereits beschrieben:

Guignot et al. zeigten, dass CD55 als Internalisierungsrezeptor eines als DAEC ("diffusely adhering *E. coli*") bezeichneten Isolates fungiert und die Invasion über Caveolae vermittelt wird [68]. Generell implizieren viele Daten eine Internalisierung von Mikroorganismen über sogenannte "lipid rafts" [152]. Hierbei handelt es sich um Strukturen, die reich an Cholesterol, Caveolin-1 verschiedenen Glycolipiden und GPI-Ankerproteinen (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) sind [7]. Durch Cholesterolextraktion aus der Membran z.B. mittels Methyl- β -Cyclodextrin oder durch Komplexierung mit Fillipin kann dieser Aufnahmeweg inhibiert werden.

Die Rolle der nicht-pathogenen Darmbakterien, die vor allem bei der Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle spielen, ist bislang unklar. Es ist bekannt, dass eine Subgruppe der an Morbus Crohn erkrankten Patienten eine Mutation aufweist, die unter anderem zu einer gestörten Verarbeitung von invasiven Bakterien führt [81]. Eine in jüngerer Zeit erschienene Arbeit an einem Patientenkollektiv mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung konnte eine erhöhte Zahl intrazellulärer Bakterien in der Mukosa bestätigen [113]. Ebenfalls aus der Mukosa eines Crohnpatienten wurde von Boudeau et al. ein *E. coli*-Stamm isoliert, der starke Adhärenz- und Invasionsfähigkeit zeigte [19]. Neben Typ-1-Pili vermittelter initialer Adhäsion wurde für diesen Stamm die Beteiligung des YfgL-Proteins am Invasionprozess nachgewiesen, wobei postuliert wurde, dass das aus *Salmonella enterica* [5] bekannte YfgL-Protein am Prozess der Injektion von Invasionseffektormolekülen in die Wirtszelle beteiligt ist [137]. Swidsinki et al. isolierten invasive *E. coli*-Stämme aus Biopsaten von Patienten mit kolorektalem Karzinom und zeigten, dass in diesen Biopsaten die intrazelluläre Keimzahl deutlich erhöht war. Ob diese Invasion primär oder sekundär zur malignen Pathologie war, konnte aus den Daten nicht geschlossen werden [166]. Diese Studien verdeutlichen die klinische Relevanz des der Invasionsvermögens von Stämmen der kommensalen Flora.

Basierend auf veröffentlichten Daten zum transzellulären Durchtritt von *E. coli*-Spezies [31, 25, 122, 30], wurden Internalisierungsexperimente am HT-29/B6-Barrieremodell durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass *E. coli* O4 invasives Potenzial besitzt. Methyl- β -Cyclodextrin inhibierte diese Internalisierung, was für eine lipid-raft vermittelte Aufnahme in die Zellen spricht. Die Hemmung der Invasion wurde unter Verwendung der nichtlytischen Mutante *E. coli* O4mut herausgearbeitet, da sich methodische Schwierigkeiten durch den Hämolyseeffekt des Wildtyps ergaben (Abschnitt 3.1.5). So konnte gezeigt werden, dass eine Präinkubation mit mbCD die Internalisierung des Stammes hochsignifikant hemmte, während die Ausblutung von *focal leaks* und die damit verbundene massive Translokation des Wildtyps nur durch Präsenz von mbCD

hemmbar war (Abschnitt 3.1.3). Dies bedeutet, dass mbCD zwei unabhängige Wirkungen in diesem System entfaltet: a) Hemmung der Zellschädigung über direkte Interaktion mit dem Wirkmechanismus des Hämolytins und b) Hemmung der cholesterolabhängigen Internalisierung des Keims. Eine transzelluläre Passage des *E. coli* O4 ist damit denkbar, erreicht im Modell aber nicht das Ausmaß der durch Hämolytinswirkung verursachten massiven Translokation mit der theoretischen Möglichkeit von sekundären Durchritten luminaler Antigene. Bedenkt man die Anzahl der im Gastrointestinaltrakt vorkommenden Enterozyten ist eine mögliche, wenn auch geringe transzelluläre Passagerate verschiedener *E. coli* durchaus von Interesse. Die dazu nötige Fähigkeit zur Invasion der Enterozyten wurde für das untersuchte Isolat O4 eindeutig belegt. Eine fortführende Charakterisierung der transzellulären Passage sowie der möglichen intrazellulären Verarbeitung und Präsentation dieses Keims war nicht Bestandteil dieser Arbeit und bedürfte weiterer quantitativ aussagekräftiger Arbeiten an ex-vivo-Modellen.

4.4 *Focal leaks* im Kolonepithel der Ratte

Quantitative Translokationsmessungen wie am Zellkulturmodell sind am nativen Ratte-epithel in dieser Form nicht durchführbar, da eine Kontamination mit Darmkeimen besteht und darüberhinaus ein unkalkulierbarer Anteil der Keime bei Durchtritt durch das Epithel in der Submukosa verbleiben würde. Aus diesem Grunde wurde die aus Zellkulturversuchen bewährte Widerstandsmessung im Verlauf der Epithelinkubation mit nachfolgender Immunfluoreszenzfärbung genutzt, um den Effekt des *E. coli* O4 an einer nativen Epithelpräparation nachzuvollziehen.

Die Reproduktion des *E. coli* O4-Effektes unter Verwendung nativen Kolonepithels der Ratte (Abschnitt 3.2) zeigte eindeutig, dass *focal leaks* nicht nur in Zellkulturmodellen, sondern auch im nativen Epithel induziert werden können. Im Vergleich zur Zellkultur war der Widerstandsabfall deutlich schwächer ausgeprägt, auch trat insgesamt bei weniger Epithelien eine offensichtliche Schädigung ein. Anhand des Widerstandsabfalls unter 65% des Ausgangswertes bei Keiminoculum konnte das Auftreten fokaler Läsionen eindeutig vorhergesagt werden. Dies wurde nachfolgend durch Färbungen der entsprechenden Präparate bestätigt. Läsionen waren das Korrelat des Widerstandsabfalles (unter 65% Ausgangswert).

Zur Visualisierung der Kolonepithelien wurde eine Färbemethode ("whole mount") entwickelt (Abschnitt 2.8.2) und die unter Verwendung von Immunfluoreszenztechniken markierten Präparate mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie von mukosaler

Seite mehrkanalig abgebildet. Dadurch wurde es möglich, die epitheliale Oberfläche des gesamten in der Ussingkammer Bakterien-exponierten Präparates im Nachhinein zu beurteilen. Dies stellte sich als sehr vorteilhaft heraus, da sich teilweise nur wenige Läsionen pro Präparation fanden, diese aber aufgrund der möglichen Gesamtbeurteilung des Epithelpräparates eindeutig identifiziert werden konnten. Läsionen stellten sich dabei als Erosionen des Oberflächenepithels mit massiver bakterieller Adhärenz dar. Die beobachteten wenigen, aber recht großen (bis zu 2 mm Durchmesser) Läsionen und deren seltenes Auftreten trotz konstanter Versuchsbedingungen mit hoher lytischer Aktivität sprechen für einen kleinen Initialschaden, der dann größer wird, da die basolaterale Seite der Zellen auch im Epithel der Ratte (Vorversuche) anfälliger für α -Hämolyisin ist. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Zellkulturstudien; nur erscheint das native Epithel mukosal besser vor der Wirkung des Hämolyisins geschützt. Dadurch wurden weniger, zugleich aber größere Läsionen beobachtet, da eine genügend große Initialschädigung seltener erreicht wird. Diese vergrößert sich dann aber progressiv und führt zu den beobachteten großen Erosionen des Oberflächenepithels. Dadurch ist auch der Widerstandsabfall weniger stark als bei Zellen in Kultur ausgeprägt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass natives Epithel weit schneller Defekte repariert, als dies in Zellkultur der Fall ist. Dadurch ist ein natives Epithel in der Lage, kleine Initialdefekte effektiver zu reparieren und somit länger seine Integrität unter Toxineinwirkung zu wahren. Modellhaft wurde in unserer Arbeitsgruppe der Hämolyisineffekt nach initialer Schädigung des Oberflächenepithels nachvollzogen, wobei sich zeigte, dass definiert gesetzte Läsionen unter Hämolyisineinwirkung deutlich schlechter repariert wurden [70].

E. coli O4-inkubierte Epithelien, die keinen ausgeprägten Abfall zeigten, waren mittels der eingesetzten Färbung nicht von Kontrollepithelien (*E. coli* O4mut-inkubiert) zu unterscheiden. Es ergaben sich keine Hinweise auf veränderte Zellmorphologien außerhalb der Schädigungen, was die Fokalität des Effektes unterstreicht. Demgegenüber ergab sich bei statistischem Vergleich von Wildtyp- zu Mutanten-inkubierten Epithelien auch dann ein signifikanter Gruppenunterschied ($p < 0,02$ Abschnitt 3.2.1), wenn alle Präparate unter 65% Endwiderstand nicht einfließen. Damit ist ein widerstandsrelevanter Effekt auf barrierebildende Komponenten zu erwarten, der aber mit der verwendeten Färbung nicht aufgeklärt werden konnte. Ein kontinuierlich veränderter Kurzschlussstrom, der eine Widerstandsänderung erklären könnte, wurde nicht beobachtet. Die massive Adhärenz der Bakterien nur in Läsionen zeigte gleichzeitig, wie resistent das umgebende Epithel bezüglich der Anheftung dieses Keims ist. Mucine sind einerseits als Adhäsionsrezeptoren beschrieben [164], können aber auch Adhäsionsresis-

tenz [109] vermitteln. Es ist aber auch denkbar, dass die für Adhäsion benötigten Rezeptoren basolateral lokalisiert sind, wie dies z.B. für *Listeria* Spezies [100] beschrieben ist. Möglich ist, dass die biofilmartige bakterielle Auflage am basolateralen Zellkompartiment die Vergrößerung der Läsion durch lokale Toxinproduktion befördert, bzw. dass *E. coli* O4 sich über lokale Hämolysefreisetzung Zugang zu basolateral lokalisierten Adhäsionsrezeptoren Zugang verschafft.

Die Rolle des α -Hämolyseins im Intestinaltrakt ist nicht aufgeklärt. Während einige Autoren eine Beteiligung an Diarrhoen postulieren [32], sehen andere das Toxin als ausschließlich extraintestinal wirksamen Faktor [84]. Eine Studie postulierte eine intestinale Wirkung des *E. coli*- α -Hämolyseins anhand beobachteter Erosionen in Schnitten des Ileums von Ratten, die mit hämolysierenden *E. coli* inokuliert wurden [126]. Die in dieser Studie gezeigte Morphologie an Schnitten ist den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen fokalen Läsionen im Kolon ähnlich. Um Läsionen an Schnitten sicher von Artefakten unterscheiden zu können, sollten diese möglichst häufig und gleichverteilt auftreten, was in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen nicht der Fall war.

Möglicherweise repräsentiert die Anwesenheit Hämolyse-positiver *E. coli* kein Krankheitsgeschehen per se, sondern die Ausbildung einer Pathologie hängt von zusätzlichen Faktoren, wie z.B. inflammatorischen Bedingungen ab. Diese Studie zeigt einen, obwohl nur einen geringen Anteil der eingesetzten Epithelien betreffend, eindeutigen schädigenden Effekt des *E. coli* O4 auf intestinales Epithel. Nach aktuellem Wissen ist dies die erste Studie, die unzweifelhaft die Potenz eines Hämolysebildners als Auslöser einer intestinalen Pathologie am ex-vivo-Modell beschreibt.

4.5 Pathophysiologische Bedeutung der Studie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind aus verschiedenen pathologischen Konditionen isoliert worden, können aber ebenfalls in der kommensalen Flora des Intestinaltraktes nachgewiesen werden. Die epitheliale Barriere des Darms zu überwinden ist für diese Keime ein wichtiger Pathomechanismus, da es der entscheidende Schritt ist, um pathogene Wirkungen entfalten zu können. Im Darm entstehende *focal leaks* würden nicht nur den Durchtritt der verursachenden Hämolysebildner ermöglichen, sondern wären aufgrund der massiven Barrierestörung als Pforten der Sekundärtranslokation verschiedenster luminaler Antigene denkbar. Eine nachfolgende Aktivierung des Immunsystems würde dann zu einer entzündlichen Reaktion und bei ständiger Stimulation zu einer entzündlichen Pathologie führen. Es ist auch

denkbar, dass im bereits entzündlichen Zustand des Epithels, gekennzeichnet durch erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine, die Resistenz gegen bakterielle Toxine wie α -Hämolyisin herabgesetzt ist und es dadurch leichter zur Ausbildung fokaler Läsionen kommt. Anhand eines der eingesetzten Isolate wurde ein möglicher Mechanismus der Translokation über die intestinale Barriere beschrieben. Als aktiver Durchtrittsmechanismus eines intestinal apathogenen Keims unterscheidet sich dieser von den bisher beschriebenen intestinalen Aufnahmewegen über M-Zellen [97, 94] und dem postulierten "sampling" durch dendritische Zellen [55].

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität assoziiert und es wird diskutiert, ob dieses ein der Erkrankung vorausgehender, primärer Defekt ist [80]. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse an IL-10-defizienten Mäusen unterstützt, wobei gezeigt wurde, dass bereits vor Ausbruch einer spontanen Entzündung des Darmes eine Permeabilitätserhöhung besteht [111]. Gleichsam interessant ist die wiederholte Demonstration einer erhöhten Darmpermeabilität bei Verwandten ersten Grades von Crohnpatienten [130, 129]. Eine erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen Barriere würde zu ständig verstärkter Immunstimulation führen, wodurch letztlich ein chronisches Entzündungsgeschehen entsteht. Ob diese Reihenfolge die Richtige ist, wurde bisher nicht abschliessend geklärt. Gesichert ist, dass die bakterielle Flora maßgeblich für die Initiation dieser entzündlichen Erkrankungen ist [79]. Werden z.B. IL-2-defiziente Mäuse keimfrei gehalten, entwickeln sie im Gegensatz zu normal besiedelten Kontrolltieren keine spontane inflammatorische Darmerkrankung. Das Erscheinungsbild dieser Inflammation in Bakterienexponierten IL-2 defizienten Mäusen ist der Colitis ulcerosa des Menschen sehr ähnlich [139]. Es gilt als gesichert, dass exogene Stimuli für den Ausbruch dieser Krankheiten erforderlich sind. So treten z.B. akute oder erste Schübe bei CED häufig im Anschluss an Durchfallerkrankungen auf, die durch pathogene Keime ausgelöst wurden. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass eine aktive Veränderung der intestinalen Flora von CED Patienten durch Anwendung fäkaler Suspensionen Gesunder zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitszustandes führte [187, 188].

Prinzipiell denkbar ist, dass die Erosion des Darmepithels durch lytische Toxine den Zugang von Stimuli zum immunkompetenten Raum der Submukosa bewirkt. Ein interessantes Mausmodell einer intestinalen Entzündung benutzte dominant negatives Cadherin, um die Funktion von E-Cadherin, einem zelladhäsionsvermittelnden Protein, zu unterbinden. Dies resultierte in einer Zerstörung der Adherence junction zwischen den Zellen, wodurch die Integrität der epithelialen Schicht kompromittiert war. Chimären dieser Mäuse zeigten partielle Expression der Negativmutante, was zur Ausbildung von

entzündlichen Ulzerationen und Kryptenabszessen führte [78]. Dieses Erscheinungsbild ist mit den bei Morbus Crohn auftretenden diskontinuierlichen Läsionen vergleichbar. Dies ist ein überzeugendes Beispiel für die Auslösung lokaler Entzündungen durch einen primären Barrieredefekt.

Die durch Hämolysinbildner im Darm tatsächlich gebildete Menge und Konzentration des Toxins ist schwer abzuschätzen, zumal dessen Bildung wachstumsgekoppelt ist. Somit wird es in einer Substratlimitation, die aufgrund der Konkurrenz verschiedener Keime und der recht stetigen Keimkonzentration automatisch auftritt, zu keiner oder nur geringer Bildung des Toxins kommen. Bedingungen, in denen Substratüberschuss anliegt, könnten dagegen das exponentielle Wachstum eines Hämolysinbildners befördern und damit Toxinfreisetzung in nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell relevanter Menge zur Folge haben. Vorstellbar ist dies z.B. bei bakterieller Fehlbesiedlung des Dünndarms ("bacterial overgrowth"), einer Kondition, bei welcher die Zahl gramnegativer Keime massiv ansteigt. Es ist anzunehmen, dass vorgeschädigte Epithelien fokale Adhärenz der Keime ermöglichen, die dadurch Zugang zu nährstoffreichem Kompartiment erhalten und durch lokale Toxinproduktion die epitheliale Barriere weiter schädigen können.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen neuartigen intestinalen Pathomechanismus eines bekannten Toxins, des α -Hämolysins, das bisher ausschließlich mit extraintestinalen Manifestationen assoziiert wurde, an epithelialen Zellkulturen und nativem Epithel des Rattenkolons. Hämolytische *E. coli*, Vertreter einer Subgruppe der Spezies *Escherichia coli*, welche auch in der Darmflora gesunder Probanden vorkommen, sind somit potenziell in der Lage, eine massive Schädigung der intestinalen Epithelschicht hervorzurufen. Dies zeigt in nativem Epithel der Ratte, dass die Initiation, bzw. Aufrechterhaltung intestinaler Entzündungsprozesse potentiell aktiv von Vertretern der residenten Darmflora ausgehen kann.