

4. Interdisziplinäres Symposium

DARMFLORA IN SYMBIOSE UND PATHOGENITÄT

Mikrobiologische Grundlagen und klinische Anwendung
von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917

Berlin, 10.–11. November 2000

Zu Ehren von Alfred Nissle

Tagungspräsidenten: Prof. Dr. J. Hacker (Würzburg)
Prof. Dr. W. Kruis (Köln)

Veranstalter: Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V. · 58089 Hagen

Symposiumsband zum 4. Interdisziplinären Symposium

DARMFLORE IN SYMBIOSE UND PATHOGENITÄT

Berlin, 10.–11. November 2000

Veranstalter des Symposiums und Herausgeber dieses Bandes:

Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V.

Internationale Vereinigung zur Förderung
der mikroökologischen Forschung
und mikrobiologischen Therapie e.V.

Brüninghausstraße 16
58089 Hagen
Telefon +49(0)23 31 - 93 95 95
Telefax +49(0)23 31 - 93 95 99
E-Mail: office@a-nissle-ges.de

Redaktion:

Die Beiträge dieses Kongressberichtes wurden von Herrn Dr. med. Lothar Schulze redaktionell bearbeitet. Sie beruhen auf den Manuskripten bzw. Vorträgen des Symposiums. Für die Inhalte zeichnen die jeweiligen Autoren verantwortlich.

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung sowie der Übersetzung in andere Sprachen vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Fotokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung reproduziert werden.

© 2001 Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V. · 58089 Hagen

ISBN 3-00-008559-9

Vorwort

Das vierte interdisziplinäre Symposium „Darmflora in Symbiose und Pathogenität“ fand zu Ehren von Alfred Nissle statt. Der vorliegende Kongressbericht enthält die wissenschaftlichen Vorträge der beiden Tage sowie den Festvortrag von Herrn Prof. Rietschel.



Prof. Dr. Dr. D. Loew

Das Wissen um die Darmflora, ihre Zusammensetzung, die Funktion und Bedeutung für den Menschen hat in den vergangenen Jahren deutlich zugenommen. Das gestiegene wissenschaftliche Interesse zeigt sich auch an der Zahl der einschlägigen Publikationen. Leider wird dieses Wissen derzeit in der Lehre sowie in der beruflichen Weiterbildung oft nur unvollständig der nachwachsenden Generation vermittelt. Vorlesungen und Examina über die Wirkung von Antibiotika sind fester Bestandteil des Medizinstudiums. Die physiologische Bedeutung der intestinalen Mikroflora oder die Möglichkeiten einer Therapie mit probiotischen Arzneimitteln sind hingegen vielen Ärzten unbekannt. Der vorliegende Band kann hier eine Wissenslücke schließen.

Der Wirkstoff von Mutaflor® – *E. coli* Stamm Nissle 1917 – wurde von Alfred Nissle isoliert und ist seit über 80 Jahren im therapeutischen Gebrauch. Dieser Bakterienstamm erlebt seit einigen Jahren eine regelrechte Renaissance. Ursachen dafür sind zum einen neueste Forschungsergebnisse über die spezifischen Eigenschaften von *E. coli* Stamm Nissle 1917, zum anderen die Suche nach nebenwirkungsfreien Alternativen zur Therapie chronisch entzündlicher und chronisch funktioneller Darm-erkrankungen.

Im Kongressbericht wird der aktuelle Erkenntnisstand zur Bedeutung der Darmflora in Symbiose und Pathogenität dargestellt. Den Autoren sei für die Bereitstellung der Manuskripte und die Hilfe bei der Erstellung dieses umfangreichen Werkes gedankt.

Prof. Dr. Dr. D. Loew

Vorsitzender der Alfred-Nissle-Gesellschaft



Prof. Dr. J. Hacker



Prof. Dr. W. Kruis

Einführung

Noch vor einigen Jahren bestand in der akademischen Medizin relativ wenig Interesse an der menschlichen Darmflora. Inzwischen hat sich ein Wandel vollzogen. Die Darmflora als das zuvor „vergessene Organ“ wurde wieder entdeckt und die Zahl neuer Publikationen zu diesem Thema ist beeindruckend. Gründe dafür sind die Verfügbarkeit moderner wissenschaftlicher Methoden, die Zunahme der Detailkenntnisse und der interdisziplinäre Gedankenaustausch.

Über die Darmflora ist durch den Einsatz moderner molekularbiologischer Techniken heute sehr viel mehr bekannt als noch vor wenigen Jahren. Der vorliegende Kongressbericht soll helfen, Antworten auf medizinische Fragestellungen zu geben und diese Erkenntnisse in die klinische Praxis zu übertragen.

Im Mittelpunkt stehen zunächst Fragen der Interaktion von pathogenen und kommensalen Keimen der Darmflora, ihre Pathogenitäts- und Fitnessfaktoren sowie die besonderen Eigenschaften des von Alfred Nissle 1917 isolierten *E.-coli*-Stammes. Hier liegen inzwischen neue Erkenntnisse zur Struktur und Pathophysiologie des Endotoxins sowie dem Vorkommen antagonistischer Moleküle und verschiedener Eisentransportsysteme vor. Werden lebensfähige Bakterien als Wirkstoffe von Arzneimitteln eingesetzt, sind definierte Standards einzuhalten, um die biologische Sicherheit zu gewährleisten. Auch hierzu finden sich in der vorliegenden Publikation Beiträge.

Die Erforschung der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist Gegenstand intensiver Bemühungen. Neben der Untersuchung immunologischer Faktoren wird die Rolle der Darmflora für die Auslösung und Unterhaltung der Entzündung untersucht. Die Molekularbiologie kann hier wertvolle Beiträge leisten und

z.B. helfen, zwischen spezifischen Wirtsantworten bei verschiedenen Krankheitsentitäten zu unterscheiden. Für die Beurteilung der Wirksamkeit von Medikamenten haben heute in erster Linie kontrollierte Studien Bedeutung, wie sie inzwischen auch für das probiotische Bakterium *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) vorliegen. Die klinische Bedeutung dieses probiotischen Arzneimittels, z.B. für die Remissionserhaltung bei Patienten mit Colitis ulcerosa, wird erläutert. Andere Indikationen wie das Reizdarmsyndrom, die pseudomembranöse Kolitis, die Halitosis und die Pouchitis werden vorgestellt und diskutiert.

Ganz besonders möchten wir auf den Festvortrag „Unsterbliche Musik und todbringende Keime“ hinweisen, der sicher nicht nur Musikliebhaber fesseln wird.

Wir hoffen, mit diesem Kongressbericht zum weiteren Verständnis der Mikroökologie des Darmes sowie der Anwendung probiotischer Arzneimittel beitragen zu können.

Prof. Dr. J. Hacker

Prof. Dr. W. Kruis

Tagungspräsidenten

Inhaltsverzeichnis

Vorwort D. Loew	3
Einführung J. Hacker / W. Kruis	4 – 5
Zum aktuellen Anlass	
(Vorsitzende: J. Bockemühl, M. Kist)	
Leben und Werk von Alfred Nissle	
D. Loew	11 – 19
Mikrobiologie / Molekularbiologie	
(Vorsitzende: U.B. Göbel, E. Straube)	
Das gläserne Bakterium: Mikrobielle Genomanalyse	
G. Blum-Oehler	23 – 31
Bakterielle Invasion in eukaryontische Zellen	
T.A. Ölschläger	33 – 39
Struktur und pathophysiologische Wirkung des Endotoxins	
U. Zähringer	41 – 53
Probiotika in der Entwicklung von Lebendvakzinvektoren	
M.A. Schmidt	55 – 62
Darmökologie	
(Vorsitzende: H. Hahn, B. Wiedemann)	
Antagonistische Prinzipien und Eisentransportsysteme von <i>E. coli</i>: Bedeutung für Ökologie und Pathogenität	
J. Heesemann	65 – 72
Wie Bakterien kommunizieren: Quorum sensing und Crosstalk in bakteriellen Lebensgemeinschaften	
J. Hacker	73 – 81
Das darmassoziierte Immunsystem: Grundlagen und Bedeutung für Wirt-Erreger-Interaktion	
I.B. Autenrieth	83 – 90
Ökologie der Antibiotikaresistenz	
G. Werner	91 – 97

Klinische Bedeutung von *Escherichia coli* Teil I:

(Vorsitzende: J. Emmrich, E.G. Hahn)

Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	
J. Schölmerich	101 – 112
Die Expression humaner Defensine bei CED	
E.F. Stange	113 – 118
Extraintestinale Manifestationen bei CED	
S. Schreiber	119 – 129
Klinische Bedeutung von <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917 in der Therapie der Colitis ulcerosa und des Morbus Crohn	
W. Kruis	131 – 139
Der Pouch als Entzündungsmodell	
M. Zeitz	141 – 150

Klinische Bedeutung von *Escherichia coli* Teil II:

(Vorsitzende: H. Bosseckert, W. Londong)

Sicherheit mikrobieller Arzneimittel	
H. Tschäpe	153 – 162
Reizdarmsyndrom: Ein postinfektiöses Ereignis?	
H. Lochs	163 – 170
Pathophysiologie und Therapie funktioneller Störungen des unteren Intestinaltraktes	
S. Müller-Lissner	171 – 180
Diarrhoe bei erregerinduzierter Kolitis – Ansatzpunkte einer antagonistischen mikrobiellen Therapie	
K.J. Goerg	181 – 189
Erfolgreiche Behandlung von Halitosis mit Mutaflor®	
J. Henker	191 – 196
Offene Pilotstudie zur Wirkung von Mutaflor® bei symptomatischer Kolondivertikulose	
P. Frič	197 – 201

Festvortrag

Unsterbliche Musik und todbringende Keime – lebensbedrohliche Infektionskrankheiten berühmter Komponisten (mit Musikbeispielen)	
E.T. Rietschel	203 – 217
Stammcharakteristik <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917	218 – 221
Adressen der Vorsitzenden und Referenten	222 – 223
Das Symposium im Bild.	224 – 229

Zum aktuellen Anlass

Vorsitzende:



Prof. Dr. M. Kist



Prof. Dr. J. Bockemühl

Leben und Werk von Alfred Nissle

D. Loew

Leben und Werk von Alfred Nissle

D. Loew



Prof. Dr. Dr. D. Loew

Einleitung

Persönlichkeiten werden selten geboren, sie reifen meist zu Lebzeiten heran oder finden, oft als Außenseiter, erst posthum Anerkennung. Zu welcher Kategorie Alfred Nissle gehört, bleibt der medizinhistorischen Beurteilung vorbehalten.

Dennoch erscheint zu Beginn des 4. Interdisziplinären Symposiums „Darmflora in Symbiose und Pathogenität“ ein Rückblick auf das Leben und wissenschaftliche Werk von A. Nissle angebracht, der vor 126 Jahren in Berlin geboren wurde und vor 35 Jahren in Freiburg im Breisgau starb. Meine Ausführungen stützen sich hauptsächlich auf Unterlagen des Universitätsarchivs der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (1), des Bundesarchivs in Koblenz sowie auf ein Interview des Südwestfunks mit A. Nissle anlässlich seines 90. Geburtstages (3). Außerdem wurden zeitgenössische Publikationen von A. Nissle gesichtet.

Schule und Studium

Am 30.12.1874 wurde Alfred August Julius Nissle als Sohn des Essigfabrikanten Julius Nissle in Köpenick, Kreis Teltow (heute Berlin), geboren. Dort besuchte er bis 1885 die Mittelschule und wechselte dann auf das humanistische Gymnasium in Prenzlau, wo er bis 1892 blieb, um anschließend in Görlitz 1893 die Reifeprüfung abzulegen.

Angeregt von seinem Onkel, der in Nissles Elternhaus eine Arztpraxis betrieb, begann er noch im gleichen Jahr das Medizinstudium in Berlin. Nach dem Physikum 1895 studierte Nissle hier noch 2 klinische Semester. In einem Aufsatz schrieb er 1896 (4): „Es war ein Genuß, in Berlin Medizin zu studieren, und die theoretische Ausbildung, wie ich sie dort erhielt, lag in den denkbar besten Händen; sie war gründlich“. Zu seinen damaligen Lehrern gehörten Emil Fischer (Anorganische und Organische Chemie), Emile Du Bois-Reymond (Physiologie), Wilhelm Waldeyer (Anatomie) und Rudolf Virchow (Pathologische Anatomie). Zusätzlich besuchte Nissle Spezialkollege über Polarisation und Interferenz sowie über die Abstammungslehre von Charles Darwin.

Zur Fortsetzung des Studiums wechselte Alfred Nissle dann nach Freiburg, wo er 1898 sein Medizinstudium mit dem Staatsexamen beendete. Er promovierte 1899 mit dem Thema „Die Erkrankungen der Keilbeinhöhle.“

Anlässlich eines Interviews mit dem Südwestfunk im Jahr 1964 äußerte Nissle sich zur damaligen Zeit (3):

„Man konnte in der Kaiserstraße ruhig auf dem Straßendamm spazieren gehen. Es gab noch keine Straßenbahnen, sondern nur Droschken. Ich erinnere mich, daß man bei unseren Wanderungen im Schwarzwald für ein sehr gutes Mittagessen 50 Pfennig bezahlte. Der neue Wein kostete 15 und wenn einer 20 ausgab für ein Viertel, dann galt das schon als Protz.“

Wissenschaftliche Laufbahn

Nach dem Medizinstudium leistete Nissle von 1899 bis 1900 den Militärdienst beim Augusta-Grenadier-Regiment in Berlin und verließ die Armee als Stabsarzt der Reserve.

Von 1901 bis 1902 war er am Physiologischen Institut in Berlin unter Theodor Wilhelm Engelmann tätig und wollte zunächst Physiologe werden. Er schrieb später dazu: „Nach kurzer Zeit befriedigte mich das der reinen Theorie dienende Arbeiten auf diesem Gebiet doch nicht mehr ganz: die ärztliche Seite meiner Einstellung zur medizinischen Wissenschaft setzte sich stärker durch, ich wollte versuchen, dem Kranken und dem Gefährdeten unmittelbare Hilfsdienste zu leisten“ (5).

Nissle wechselte an das Hygiene-Institut in Berlin und arbeitete bis März 1906 als Assistent unter Max Rubner. In diese Zeit fällt Nissles erste Heirat mit Margarete geb. Giesler, die 1948 starb.

Von 1906 bis 1911 war er Assistent unter Max von Gruber am Institut für Hygiene in München, dem heutigen Pettenkoffer-Institut und wechselte dann mit Martin Hahn an das Königsberger Hygiene-Institut. Hier habilitierte sich Nissle am 22.2.1912 im Fach Hygiene mit einer Arbeit über die Behandlung von Trypanosomen-Infektionen und wurde Privatdozent. Im gleichen Jahr folgte er wiederum Martin Hahn, der einen Ruf nach Freiburg im Breisgau erhalten hatte. Nissle wurde erster Assistent am Institut für Hygiene und erhielt nach der Probevorlesung am 23.5.1912 mit dem Titel „Über die Bekämpfung des Abdominaltyphus“ die *Venia legendi* für das Fach Hygiene.

Leitung des Badischen Medizinaluntersuchungsamtes

Im Jahre 1915 übernahm Nissle die Leitung des „Badischen Medizinaluntersuchungsamtes für ansteckende Krankheiten“ in Freiburg, das dem Hygiene-Institut der Universität angegliedert war. Als Abteilungsleiter unterstand er der Aufsicht der jeweiligen Ordinarien für Hygiene (Martin Hahn 1912-1922, Paul Uhlenhuth 1913-1935, Hermann Dold 1935-1954) und dem Verwaltungsbereich des Innenministeriums.

Gefördert und unterstützt wurde Nissle vor allem durch P. Uhlenhuth, der u. a. erklärte „... dass Prof. Nissle eine ganz hervorragende Persönlichkeit ist, der auch durch weitgehende praktische Erfahrung und Sachkenntnis das Untersuchungsamt auf eine allgemein anerkannte Höhe gebracht hat und dessen Name als Lehrer überall mit besonderer Achtung genannt wird“ (6).

Am 8.8.1917 erhielt Nissle den Titel eines außerordentlichen Professors aufgrund „bedeutender Leistungen“ auf dem Gebiet der Hygiene. Vom 1.10.1922 bis 1.4.1923 leitete er kommissarisch das Institut für Hygiene und erhielt am 14.12.1934 den Titel eines ordentlichen Honorarprofessors.

Ab 1937 kam es zu Auseinandersetzungen zwischen Dold und Nissle über eine neu zu besetzende Assistentenstelle am Medizinaluntersuchungsamt und im Rahmen einer stärkeren Aufsichtspflicht schließlich zur Kündigung wegen „direkten Ungehorsams“, da Nissle sich weigerte, Aussagen über Privateinnahmen aus Untersuchungen im Medizinaluntersuchungsamt zu machen sowie „unsauberer und undurchsichtiger Buch- und Kassenführung“. Eine Abtrennung des Medizinaluntersuchungsamtes vom Institut für Hygiene wurde abgelehnt. Mit den Vorwürfen zusätzlicher Belastung und Gefährdung des Personals bei den Dysbakterieuntersuchungen, der Ausübung privater Nebentätigkeiten wie der Gewinnung und Abgabe von Kolistämmen an die Fa. Handelsgesellschaft Deutscher Apotheker (Hageda) für das Präparat Mutaflor® nahmen die Spannungen zwischen Dold und Nissle zu.

Gründung eines Privatinstitutes

Mehrere einflussreiche Persönlichkeiten halfen Nissle, sowohl seine Forschungen als auch die Mutaflor®-Herstellung fortzuführen. Dazu gehörten u. a. der Leiter der Hochschulkommission, Prof. Wirz, und Hitlers Leibarzt Prof. Morell, der ein begeisterter Mutaflor®-Verordner war. Am 5.12.1938 eröffnete Nissle in einer vom Nationalsozialistischen Deutschen Ärztebund angekauften Villa in der Fürstenbergstraße 15 in Freiburg sein neues Institut. Die Betriebskosten deckte Nissle aus Einnahmen des Instituts ab, die Kosten für die Mutaflor®-Forschung wurden aus privatem Vermögen finanziert. Fast das gesamte Personal bestand aus ehemaligen Mitarbeitern des Medizinaluntersuchungsamtes, verstärkt durch Volontäre und Doktoranden. Die technische Assistentin Erna Müller wurde 1951 Nissles zweite Ehefrau.

Nach dem Zusammenbruch des NS-Regimes wurde Nissle am 26.9.1945 seines Amtes als Forschungsleiter durch die Militärregierung enthoben und aus dem Personalverzeichnis der Universität gestrichen (1). Er strebte ein Revisionsverfahren an, in dem er als politisch nicht betroffen eingestuft wurde (10), da er kein Mitglied der NSDAP war. Die Fakultät unterstützte Nissles Antrag auf Wiederaufnahme in den Lehrkörper der Universität nicht, weshalb er erst 1952 nach einem Widerspruch erneut ordentlicher Honorarprofessor der Albert-Ludwigs-Universität wurde.



Abb. 1:
Prof. Dr. med. Alfred Nissle
* 30.12.1874 in Berlin
† 25.11.1965 in Freiburg

Nissle arbeitete nach 1945 in seinem eigenen Forschungslaboratorium weiter, zunächst in der Stefan-Meier-Straße 26, später in der Haslacher Straße 21 und zuletzt in der Erwinstraße 90. In Anerkennung seiner Dysbakterieforschung erhielt Nissle am 17.3.1956 vom Zentralverband der Ärzte für Naturheilverfahren in Bad Pyrmont die Hufeland-Medaille.

Alfred Nissle starb am 25.11.1965 90jährig in Freiburg. Sein bakteriologisches Forschungsinstitut wurde von seiner Ehefrau weitergeführt und nach deren Tod im Frühsommer 1970 aufgelöst.

Die Beeinflussung der pathologischen Darmflora als Therapieprinzip

Nachdem bis Mitte der 80er Jahre des 19. Jahrhunderts der Darmflora keinerlei Bedeutung für den menschlichen Organismus zugeschrieben wurde, wuchs gegen Ende des 19. Jahrhunderts das wissenschaftliche Interesse an den Darmbakterien. Rasch entwickelten sich zwei zum Teil unversöhnliche Auffassungen. Darmbakterien wurden entweder als harmlose Saprophyten angesehen oder als Ursache von Krankheiten identifiziert, wie z.B. Escherich durch Untersuchungen des Keimgehaltes von Neugeborenen und Säuglingen mit Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes herausfand. Metchnikov behauptete sogar, „daß eine gewisse Anzahl von Mikroben der intestinalen Flora die Gesundheit schädigen könne, entweder indem sie sich durch den ganzen Organismus verbreiten, oder indem sie ihn durch ihre Ausscheidung vergiften“. Störungen der Stoffwechsel-, Verdauungs-, Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktion wurden als Ursache vieler Erkrankungen angesehen. Es tauchte der Begriff der „gastrointestinalen Autointoxikation“ auf. Zu der von Charles Jacques Bouchard aufgestellten These schreibt Friedrich Müller (9):

„Und wenn auch er und seine Schüler als Apostel einer neuen Lehre die Bedeutung der Autointoxikation vielfach überschätzen, so haben wir doch allen Grund, uns auch in Deutschland mit dieser modernen Bewegung zu beschäftigen“.

Vor diesem Hintergrund ist das wissenschaftliche Interesse von Nissle zu sehen, der seit 1912 den Antagonismus von Kolibakterien gegen pathogene Darmkeime untersuchte.

Antagonismus von Kolibakterien gegen pathogene Darmkeime

Am 20.6.1916 sprach Nissle in der Freiburger Medizinischen Gesellschaft zum Thema „Über die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora“. Der Vortrag wurde in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift am 28.9.1916 abgedruckt (10). Bei der Herstellung von Plattenkulturen für bakteriologische Kurse mit einem Gemisch menschlicher Stuhlproben und Kulturen von Typhuserregern, stellte Nissle unterschiedliches Wachstum fest.

„In einzelnen Fällen treten die Koli- und in anderen die Typhuskolonien weit oder sogar ganz zurück“ (10). In weiterführenden Untersuchungen fand er heraus, dass Typhusbakterien durch manche Kolibakterien, aber diese Koli- nicht durch Typhusbakterien gehemmt werden. Durch Auszählung und Umrechnung des Verhältnisses von Koli- und Typhusbakterien-Kolonien entwickelte Nissle zur Bemessung der antagonistischen Kraft eines Kolistammes den sogenannten antagonistischen Index (10):

„Ist der antagonistische Index für den Stamm X = 100:500 und der von Y = 100:20, so ist das Verhältnis ihrer antagonistischen Kraft 1:25“.

Bei der Überprüfung des Antagonismus einiger Kolibakterien gegenüber *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae* und *Proteus* zeigte sich zwar eine grundsätzliche Übereinstimmung, aber auch ein antagonistisches Verhalten der Kolistämme untereinander. Deshalb nahm Nissle eine Einteilung in starke und schwache Kolistämme vor. Er fand bei Patienten mit gastrointestinalen Infekten ein Überwiegen „schwacher“ Stämme, hingegen bei gesunden Personen gehäuft „starke“ Stämme. Bei seiner Suche nach solchen starken Stämmen machte Nissle im Freiburger Verwundeten-Lazarett 2 Patienten ausfindig, die „niemals Neigung zu Darmerkrankungen gezeigt hatten und speziell auch dann nicht an infektiösen Erkrankungen litten, als ein größerer Teil ihrer Umgebung daran erkrankte und sie infolge des engen Zusammenlebens mit bereits Erkrankten der Gelegenheit zur Infektion in reichlichstem Maß ausgesetzt waren. Wenn daher bei diesen beiden die bisher höchsten Indexwerte (100:10 und 100:3) beobachtet wurden, so darf bei der Beurteilung der Ergebnisse der Zufall ausgeschlossen werden“ (1).

Diese im März und September 1915 isolierten Stämme behielten auch unter Laborbedingungen ihren antagonistischen Index bei. Nach Selbstversuchen zur Verträglichkeit von eigens hergestellten Kapseln mit Kolibakterien, behandelte Nissle mit

Unterstützung der Professoren Ernst Roos und Kurt Ziegler Patienten mit Obstipation, Diarrhoe, Paratyphus B und Flexner-Ruhr sowie Salmonellen-Dauerausscheider. Nissle überzeugte sich von der klinischen Wirksamkeit und sah das Behandlungsprinzip trotz der geringen Fallzahlen als bestätigt an.

Im Weiteren bemühte er sich um eine einfachere und schnellere Diagnostik des Koli-antagonismus und entwickelte eine serologische Differenzierung zwischen hoch- und minderwertigen Bakterien. Starke Kolistämme agglutinierten bis zu einem Titer von 1:50 000, während schwache keinen Effekt zeigten.

In der Folgezeit dehnte Nissle seine Therapieversuche auf nichtinfektiöse Darmerkrankungen einschließlich Colitis ulcerosa aus. Auch hier entdeckte er „antagonistisch minderwertige“ Koli-keime und schlussfolgerte, dass die bisher als funktionell bezeichneten Darmerkrankungen und Verdauungsstörungen ätiologisch in „einfache bzw. infektiöse Dysbakterie des Darms“ einzuteilen sind. Unter Dysbakterie des Dickdarms verstand Nissle „jede deutlich erkennbare Abweichung der Flora dieses Darmabschnittes von der Norm“ (11).

Mutaflor® – vom Bakterium zum geschützten Warenzeichen

Die Entwicklung von Mutaflor® beruht auf der Gewinnung des Kolistammes eines Pionierunteroffiziers, der im Balkankrieg in der Dobrudscha im Gegensatz zu all seinen Kameraden von einer Darmerkrankung verschont geblieben war. Dieser Kolistamm erwies sich als besonders hochwertig. Seine Verabreichung erfolgte damals in Hartgelatine-Kapseln, die mit dem Belag frisch hergestellter Agarplatten, schwachem Milchzuckeragar und Weißbrotkrume gefüllt waren. Bereits Ende 1916 meldete Nissle Mutaflor® als geschütztes Warenzeichen an, das am 1.3.1917 als solches beim Reichspatentamt eingetragen wurde. 1917 übernahm die Fa. G. Pohl in Schönbaum/Danzig die Herstellung und den Vertrieb der Bakterien-haltigen Kapseln unter dem Namen Mutaflor®. Nissle bemühte sich dabei um die Sicherstellung einer gleichbleibenden Qualität durch Lieferung der Starterkultur für jede Produktionscharge. Im Jahr 1932 erfolgte der Wechsel von der inzwischen als Vereinigte Gelatine-Kapselfabrik Pohl & Lehmann, Marienburg/Westpreußen firmierenden Vorgängerfirma zur Fa. Hageda AG in Berlin. Ab 1947 wurde das Präparat von deren Filiale in Hannover hergestellt und 1970, nach dem Tod von Ehefrau Erna Nissle, einschließlich aller Rechte an dem *E.-coli*-Stamm an die Fa. Ardeypharm GmbH in Herdecke verkauft.

In der damaligen Zeit prüften verschiedene Ärzte die Mutaflor®-Anwendung bei Infektionen mit Salmonellen und Shigellen mit unterschiedlichem Erfolg. Vielversprechend waren die Ergebnisse bei Patienten mit akuten Enteritiden, Colitis ulcerosa, nichtinfektiösen Darmerkrankungen und atonischen bzw. spastischen Formen der chronischen Obstipation. Im Gegensatz zum unbefriedigenden Einsatz bei einigen Kindern mit fortgeschrittener, wohl schon inkurabler Säuglingsenteritis, war Mutaflor® bei chronisch kränkelnden, infektanfälligen, blutarmen Kindern der Kinderheilstätte

„Schloß Friedensweiler“ im Schwarzwald äußerst erfolgreich. Hierzu schreibt Nissle (12):

„Ich habe gefunden, dass die Dysbakterie des Darmes eine der Hauptursachen für das schlechte Entwickeln und das Kränkeln, für die Infektionsanfälligkeit des europäischen Stadtkindes ist“.

Dysbakterie und Krebs

Intensiv befasste sich Nissle mit dem möglichen Zusammenhang von Dysbakterie und Krebs. In den Faeces Krebskranker stellte er regelmäßig eine Dysbakterie fest und erklärte:

„Aus dem Zusammenhang von Bakterien mit Darmsekreten und Nahrungsschlacken, die ihnen als Nährboden dienen, mag neben dem von Becher nachgewiesenen Phenol und Kresol noch ein ganzes Gemisch komplizierter, chemisch schwer faßbarer Verbindungen hervorgehen, und ich bin zu der Vorstellung gelangt, daß sich unter ihnen auch kanzerogene Stoffe, vielleicht Teerderivate, befinden, die ebenfalls in die Blutbahn übergehen und durch jahre- und sogar jahrzehntelange Reizung geeignete Zellarten im Sinne der Umwandlung zu einem Malignom verändern“ (13).

Auch hier wurde Nissle durch Fallberichte verschiedener Autoren unterstützt, die mit Erfolg das Kolipräparat bei Krebs eingesetzt haben. Weitere Anwendungsgebiete von Mutaflor® wie verschiedene internistische, gynäkologische und neurologische Erkrankungen sowie der rheumatische Formenkreis führten zur Begründung eines „intestinalen Stigmas“.

Anlässlich seines 90. Geburtstages fasste Nissle die Grundlagen seiner Forschung und des neuen Heilprinzips wie folgt zusammen:

„Ich habe ein neues Heilprinzip entdeckt und da habe ich große Freude dran, weil es in recht vielen Fällen als einziges zum Ziel führt. Man hat auf die Dickdarmflora vorher viel zu wenig geachtet und hat nicht verstanden, dass diese Dickdarmflora oft das einzig entscheidende für die Gesundheit des Betreffenden ist. Es entstand die Entdeckung aus zufälligen Beobachtungen, an denen aber andere vorbei gegangen sind. Und ich habe das nun zum Gegenstand der Forschung gemacht und habe dann gefunden, dass außerordentlich viel eben von der Beschaffenheit der eigenen Koli-bakterien abhängt. Und so entstand das Kolipräparat, das ich geschaffen habe“ (3).

Die Aktualität des wissenschaftlichen Grundgedankens von Nissle

Für eine abschließende Würdigung der wissenschaftlichen Arbeiten von Nissle ist es noch zu früh. Das Aufstellen von Hypothesen, ihre wissenschaftliche Bestätigung und der klinische Wirksamkeitsnachweis bedürfen der Jahrzehnte. Zwar sind seit der Einführung von Mutaflor® im Jahre 1917 Jahrzehnte vergangen, doch wurden die wichtigen Ansätze von Nissle nur von wenigen Forschern aufgegriffen. Vor allem aber die beginnende Ära der Sulfonamide und Antibiotika führte zu einer Vernach-

lässigung der Forschung auf dem Gebiet der Darmflora. Nissle war in diesem Sinn ein Einzelkämpfer, der sich mit dem Koli-Antagonismus auseinandersetzte, Verfahren zur Klassifizierung der Kolibakterien wie den antagonistischen Index entwickelte, sich in Selbstversuchen von der Verträglichkeit ausgesucht hochwertiger Kolistämme überzeigte und sie therapeutisch bei spezifischen Darminfektionen und bei funktionellen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einsetzte.

Die wissenschaftliche Bedeutung der von Nissle entwickelten Erkenntnisse würdigte Hentges 1983: „Nissle (1916) war der erste, der vermutete, daß die intestinale Flora einen Schutz gegen Infektionen bieten könnte. Nachfolgende Berichte beschrieben dann die antagonistische Interaktion zwischen coliformen Organismen (Gratia 1925) und der Produktion von Colicinen durch einige intestinale Bakterien die in die Vermehrung anderer Bakterien eingreifen (Fredericq und Levine, 1947). Weitere direkte Nachweise für eine protektive Rolle der intestinalen Flora erbrachte Freter (1955 und 1956)...“ (2).

Nissle prägte den Begriff Dysbakterie, der jedoch von vielen Bakteriologen abgelehnt wurde. Seeliger erklärte hierzu: „Die mannigfaltigen Erscheinungen, denen der Bakteriologe in seiner täglichen Arbeit bei der Untersuchung menschlicher Stühle begegnet, lassen sich nicht in einem Sammelbegriff zusammenfassen, heiße er nun Dysbakterie oder anders, da die Ursachen ebenso komplex sind wie die vieldeutigen bakteriologischen Befunde... Der vieldeutige Dysbakterie-Begriff ist daher entbehrlich und durch exakte Erregerdiagnosen zu ersetzen“ (14). Einige andere Bakteriologen plädierten für die Beibehaltung, aber Aktualisierung des Begriffs Dysbakterie, darunter Hoffmann (15).

Zurückgezogen in sein Privatinstitut in der Erwinstraße in Freiburg arbeitete Nissle bis zu seinem Lebensende. Wenn man sich nun in den letzten Jahren wieder verstärkt mit der Darmflora und dem Bakterium *E. coli* Nissle 1917 befasst, bedeutet dies auch eine nachträgliche Anerkennung der wissenschaftlichen Leistung und des Lebenswerkes von Nissle.

Zu seiner Forschung befragt, bemerkte Nissle 1964 (3):

„Ich bin dabei, wieder eine Arbeit zusammen zu schreiben über Grundlagen des Ganzen; Grundlagen für die Pathogenese, also für die Entstehung der Krankheiten und für die Therapie, die für einen Teil der Krankheiten zutrifft. Und das war meine Hauptforschung, auch schon in früheren Jahren. Da habe ich auf anderem Gebiet gearbeitet, aber in dem Punkt, da treffen sich diese Absichten mit den jetzigen noch. Ich fühle mich noch vollständig im Stande, solche Arbeiten zu schreiben. Ich bin natürlich nicht mehr derselbe wie vor 40 Jahren, aber bis auf die Schwerhörigkeit fühle ich mich noch vollkommen gesund. Und, eins möchte ich noch bemerken, ich schlucke selbst seit fast 30 Jahren mein eigenes Präparat Mutaflor®, um mich auf der Höhe zu halten. Und es scheint so, als ob mir das gelungen ist. Ich halte es für meine Pflicht, zu arbeiten, solange ich irgend kann“.

Auch wenn Nissle mit seiner bakteriologischen Forschung auf Arbeiten und Erfahrungen anderer Wissenschaftler und Ärzte zurückgreift, gebührt ihm dennoch die Anerkennung für die ausführliche und grundlagenmäßige Erarbeitung und Begründung der Therapie mit lebensfähigen Koli-Keimen. Aufgrund neuer ätiopathogenetischer Erkenntnisse zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie extraintestinalen darmassoziierten Manifestationen und bei kritischer Betrachtung der Vor- und Nachteile der Antibiotika-Therapie gewinnt derzeit die Rückbesinnung auf seinerzeitige Behandlungsansätze erneut an Bedeutung.

Prof. Dr. Dr. D. Loew

Vorsitzender der Alfred-Nissle-Gesellschaft
Brüninghausstraße 16
58089 Hagen

Literatur

1. Dienerakte Nissle, Universitätsarchiv der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
2. Hentges DJ. Role of the Intestinal Microflora in Host Defense against Infection. In: Hentges DJ (ed.) Human Intestinal Microflora in Health and Disease, Academic Press, New York, 1983, 311-331.
3. Interview mit dem Südwestfunk anlässlich des 90. Geburtstags von A. Nissle. 13.12.1964.
4. Nissle A. Erinnerungen aus meiner Berliner Studienzeit 1893-1896. Med. Welt 1961, 51, 2711-2713.
5. Nissle A. Die Dysbakterie als Grundlage eines natürlichen Heilprinzips. Zentralbl. für Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. I. Abt., 1957, 170, 286.
6. Uhlenhuth P. Brief an den Minister des Inneren, 3.12.1928. Generallandesarchiv Karlsruhe 235-7621. zit. 2.
7. Urteil des Untersuchungsausschusses für politische Säuberung, AZ 2/I Nr. 29580, bestätigt durch Militärregierung am 12.10.1948, Dienerakte Nissle, Universitätsarchiv der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
8. Dekan Sarre an Nissle, 17.10.1949, Dienerakte Nissle, Universitätsarchiv der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
9. Müller F. Autointoxikationen intestinalen Ursprungs. Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin 1898, 16, 149-175.
10. Nissle A. Über die Grundlage einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora. Deutsche med. Wschr. 1916, 42, 1181-1184.
11. Nissle A. Das Problem der Dysbakterie des Dickdarms und ihrer Behandlung. Klin. Wschr. 1932, 11, 1456-1459.
12. Nissle A. Die Sanierung der Dickdarmflora als prophylaktische Maßnahme. Med. Welt 1957, 12, 82-85.
13. Nissle A. Über die Bedeutung der Dysbakterie des Kolons für die Pathogenese des Krebses. Münch. Med. Wschr. 1953, 95, 317-319.
14. Seeliger H. Das Dysbakterieproblem vom Standpunkt des Mikrobiologen. Zentralbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg., I. Abt., Originale 170, 1957, 310
15. Hoffmann K. Bakterielle Besiedlung des menschlichen Darms. Theoretische und Klinische Medizin in Einzeldarstellungen, Bd. 32, Dr. A. Hühig Verlag, Heidelberg, 1966
16. Nissle A. Zur Klärung der Beziehungen zwischen Krankheitsursache, Symptomen und rationeller Therapie. Med. Welt 1966, 17, 1290-1294.

Mikrobiologie / Molekularbiologie

Vorsitzende:



Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel



Prof. Dr. E. Straube

Das gläserne Bakterium: Mikrobielle Genomanalyse

G. Blum-Oehler

Bakterielle Invasion in eukaryontische Zellen

T. A. Ölschläger

Struktur und pathophysiologische Wirkung des Endotoxins

U. Zähringer

Probiotika in der Entwicklung von Lebendvakzinvektoren

M.A. Schmidt

Das gläserne Bakterium: Mikrobielle Genomanalyse

G. Blum-Oehler, L. Grozdanov, U. Dobrindt,
F. Agerer, G. Nagy, K. Piechaczek, T. Hartsch,
G. Gottschalk, J. Hacker



Dr. G. Blum-Oehler

Abstract

Im letzten Jahrzehnt gelang die vollständige Genom-Sequenzierung von mehreren Eukaryonten und Prokaryonten. Damit eröffnen sich auch in der Medizin neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten.

Mittlerweile sind mehr als 30 verschiedene mikrobielle Genome vollständig sequenziert worden. Darunter befinden sich sowohl apathogene Bakterienstämme wie z.B. *Escherichia coli* K-12 Stamm MG 1655 (1) als auch human- und pflanzenpathogene Bakterienstämme. Bei einigen Spezies wurden bereits die DNA-Sequenzen mehrerer Stämme entschlüsselt. Der Vergleich der jeweiligen Genomsequenzen kann Unterschiede in der genetischen Organisation aufzeigen und Hinweise auf die phylogenetische Entwicklung von Bakterienstämmen geben. Neben der vergleichenden Genomanalyse spielt die weitere funktionelle Genomanalyse eine wichtige Rolle. Dies ermöglicht die Untersuchung der komplexen Abläufe im Rahmen der Genexpression sowie der Vielfältigkeit der exprimierten Genprodukte.

Beispielhaft soll hier die vergleichende Genomanalyse an dem probiotischen *E. coli*-Stamm Nissle 1917 (DSM 6601) und *E. coli* K-12 Stamm MG 1655 aufgezeigt werden. Der Stamm DSM 6601 ist ein apathogener Vertreter der O6-Stämme und verfügt über verschiedene Faktoren wie z.B. Fimbrienadhäsine und Eisenaufnahmesysteme (2), die die Etablierung und das Überleben im Wirtsorganismus ermöglichen. Die vergleichende Genomanalyse soll diese Faktoren näher charakterisieren sowie die Einordnung der entsprechenden Gencluster in eine physikalische Genkarte ermöglichen.

Fortschritte der Genomsequenzierung

In den letzten 10 Jahren sind zahlreiche Genome von Eukaryonten und Prokaryonten vollständig sequenziert worden. Es wird geschätzt, dass in den nächsten zwei bis vier Jahren noch etwa 100 weitere Genome von Pro- und Eukaryonten entschlüsselt sein werden (5). Man erhofft sich von diesen Analysen eine verbesserte Diagnose und Therapie von Krankheiten sowie Hilfe bei der Entwicklung von Impfstoffen und die Erforschung neuer mikrobieller Energiequellen. Mikroben enthalten eine Fülle genetischer Information. Der Mensch hat diese Ressourcen bereits in vielfältiger Weise für medizinische, landwirtschaftliche und ökologische Zwecke ausgebeutet, um seine Lebensqualität zu verbessern. Darüber hinaus bietet die Sequenzanalyse mikrobieller Genome die Möglichkeit, mehr über evolutionäre Prozesse und somit über die Entwicklung von unterschiedlichen Genomstrukturen zu erfahren.

Im Jahre 1995 wurde von der Arbeitsgruppe um Craig Venter („The Institute for Genomic Research“, TIGR) in der Zeitschrift „Science“ die erste komplette DNA-Sequenz eines freilebenden Bakteriums, *Haemophilus influenzae*, publiziert (3). Diesem Ereignis gingen zahlreiche wichtige technologische Entwicklungen voraus (Tab. 1).

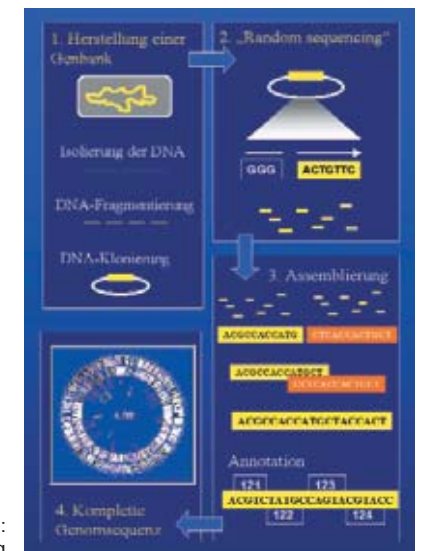
Wichtige Meilensteine auf dem Weg zur Genomanalyse

1953	Aufklärung der DNA-Struktur durch Crick und Watson
1968	Aufreinigung des ersten Restriktionsenzym
1974	Einführung des Southern Blots
1977	Gilbert und Sanger beschreiben die DNA-Sequenzierung
1984	Einführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese
1986	Einführung der Sequenzierung mit Fluoreszenzfarbstoffen
1987	Erste physikalische Genomkarte von <i>E. coli</i> Beschreibung der YACs („Yeast artificial chromosomes“)
1988	Beschreibung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
1992	Beschreibung der BACs („bacterial artificial chromosomes“)
1994	Beschreibung der PACs („P1 artificial chromosomes“)
1995	Erste bakterielle Genomsequenz (<i>H. influenzae</i>) veröffentlicht
1996	<i>S. cerevisiae</i> – Genomsequenz veröffentlicht <i>M. jannaschii</i> (Archäebakterium) – Genomsequenz veröffentlicht
1997	<i>E. coli</i> - Genomsequenz veröffentlicht
1998	<i>C. elegans</i> – Genomsequenz veröffentlicht
2000	<i>Drosophila melanogaster</i> – Genomsequenz veröffentlicht

Tab. 1

Klonierungstechniken und Sequenzierungsstrategien

Eine wichtige Voraussetzung war die Etablierung geeigneter Klonierungstechniken und Sequenzierungsstrategien. Dabei wurden zwei für die Genomsequenzierung essentielle Klonierungstechniken entwickelt. Dazu gehören zum einen die Konstruktion von geordneten Genbanken, bei denen definierte Teilbereiche eines Genoms kloniert, katalogisiert und anschließend systematisch sequenziert werden. Zum anderen wurden sogenannte „Shotgun“-Genbanken etabliert, in denen zufallsmäßige, sich überlappende DNA-Fragmente kloniert und sequenziert werden können. Bei der letztgenannten Methode wird eine etwa 8-fache Abdeckung bei der Kompletsequenzierung erreicht, so dass sich eine genügend hohe Datensicherheit ergibt (Abb. 1).

Abb. 1:
Das Prinzip der „Shotgun“-Sequenzierung

Mittlerweile wurde der genetische Code von mehr als 30 verschiedenen mikrobiellen Genomen publiziert. Darunter befinden sich sowohl apathogene Bakterienstämme wie z. B. *Escherichia coli* K-12 Stamm MG1655 (1) als auch human- und pflanzenpathogene Bakterienstämme. Bei einigen Spezies wurden bereits die DNA-Sequenzen mehrerer Stämme entschlüsselt (Tab. 2). Zur Zeit sind etwa 90 weitere Projekte in verschiedenen Institutionen in Arbeit (6).

Funktionelle Genomanalyse

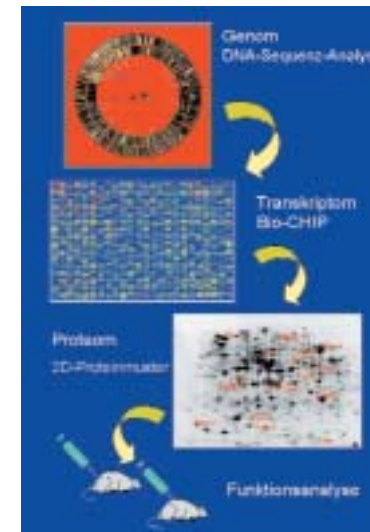
Die meisten bei einer Genomsequenzierung anfallenden Daten werden anschließend in öffentlichen Datenbanken gespeichert und sind durch das Internet verfügbar. Die Entschlüsselung eines kompletten Genoms stellt jedoch erst den Ausgangspunkt für weitere Analysen dar. Man schätzt, dass nur etwa der Hälfte der vorausgesagten offenen Leserahmen (ORF's, open reading frames) in einem Genom eine biologische Funktion zugeordnet werden kann (4). Der Vergleich der jeweiligen Genomsequenzen

Komplett sequenzierte Genome (Stand 10/00)

Spezies	Genomgröße (Mbp)	Publikation
Haemophilus influenzae Rd	1,83	7 / 1995
Mycoplasma genitalium	0,58	10 / 1995
Mycoplasma pneumoniae	0,82	11 / 1996
Aquifex aeolicus	1,55	7 / 1997
Synechocystis PCC6803	3,57	3 / 1997
Helicobacter pylori 26695	1,67	8 / 1997
Bacillus subtilis	4,21	11 / 1997
Borrelia burgdorferi	0,91	12 / 1997
Treponema pallidum	1,14	3 / 1998
Chlamydia trachomatis	1,04	5 / 1998
Mycobacterium tuberculosis	4,41	6 / 1998
Escherichia coli K-12	4,64	10 / 1998
Rickettsia prowazekii	1,11	11 / 1998
Chlamydia pneumoniae	1,23	12 / 1998
Helicobacter pylori J99	1,64	1 / 1999
Thermotoga maritima	1,86	6 / 1999
Deinococcus radiodurans	2,65	11 / 1999
	0,41	11 / 1999
Ureaplasma urealyticum	0,7	1 / 2000
Campylobacter jejuni	1,64	2 / 2000
Neisseria meningitidis MC58	2,27	2 / 2000
Chlamydia muridarum	1,07	3 / 2000
Chlamydia pneumoniae AR39	1,23	3 / 2000
Neisseria meningitidis Z2491	2,18	3 / 2000
Pseudomonas aeruginosa	6,26	5 / 2000
Vibrio cholerae	2,96	6 / 2000
	1,07	6 / 2000
Xylella fastidiosa	2,68	6 / 2000
Chlamydia pneumoniae	1,23	7 / 2000
Bacillus halodurans	4,20	8 / 2000
Buchnera sp. APS	0,64	9 / 2000

Tab. 2

untereinander kann Unterschiede in der genetischen Organisation aufzeigen und Hinweise auf die phylogenetische Entwicklung von Bakterienstämmen geben. Neben der vergleichenden Genomanalyse spielt die funktionelle Genomanalyse eine wichtige Rolle. Dazu sind Untersuchungen wie die Transkriptom- und Proteomanalyse nötig. Dies ermöglicht einen Einblick in die komplexen Abläufe im Rahmen der Genexpression sowie in die Funktion der exprimierten Genprodukte (Abb. 2).

Abb. 2:
Genom-DNA-Sequenz-
und Funktionsanalyse**Integration von Fremd-DNA – „Flexible Genpools“**

Bei der Analyse der Sequenzdaten zeigt sich, dass bakterielle Genome häufig aus einem Kerngenom mit einem relativ homogenen G- und C-Gehalt bestehen und zusätzliche DNA-Sequenzen besitzen, die möglicherweise über horizontalen Gentransfer in das Genom integriert wurden (Abb. 3). Hierbei könnte die Integration von

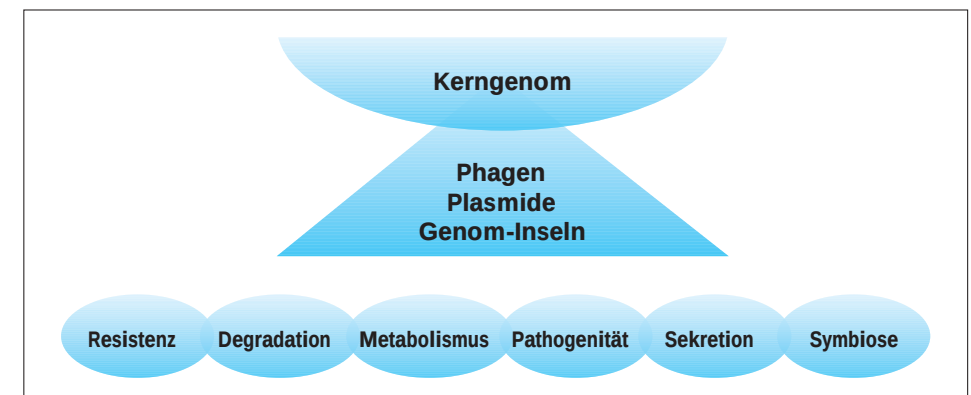


Abb. 3: Genomstruktur von Prokaryonten

Fremd-DNA über Plasmide, Bakteriophagen oder auch sogenannte Genominseln („genomic islands“), die für verschiedene Funktionen wie metabolische Leistungen, Sekretionssysteme, Symbiosefaktoren oder Resistenzen kodieren können, wesentlich zur Ausbildung eines flexiblen Genpools beitragen. Viele dieser Genominseln sind für die Fitness der Mikroben von Bedeutung. Unter bestimmten Selektionsbedingungen, die unabhängig von pathogenetischen Prozessen ablaufen können, werden diese Inseln dann einen Vorteil bringen und evolutionsbiologische Bedeutung erlangen.

Genomsequenzierung der Spezies *Escherichia coli*

Betrachtet man die Spezies *Escherichia coli*, die apathogene und pathogene Varianten umfasst, so könnten die zuvor beschriebenen Prozesse wesentlich zur Entwicklung dieser einzelnen Varianten beigetragen haben. Eine wichtige Voraussetzung für diesbezügliche Analysen stellt die Veröffentlichung der Komplettssequenz des apathogenen *Escherichia coli* K-12-Stammes MG 1655 im Jahre 1997 dar (1). Frederick Blattner und seine Mitarbeiter hatten 15 Jahre lang an dieser DNA-Sequenz gearbeitet und konnten diese Arbeiten im Jahre 1997 abschließen. Das Genom dieses *E. coli*-Stammes umfasst 4.639.221 Megabasenpaare, welche für 4288 Gene kodieren. 38 % dieser Gene konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Insgesamt können etwa 1900 verschiedene Proteine von einer *E. coli* K-12-Zelle produziert werden. Die Komplettssequenz des Stammes MG 1655 stellt eine wichtige Grundlage für die Analyse weiterer *E. coli*-Genome dar.

Vergleichende Genomanalyse:

***E. coli* Stamm DSM 6601 (Nissle 1917) und *E. coli* K-12-Stamm MG 1655**

Beispielhaft soll hier die vergleichende Genomanalyse an dem probiotischen *E. coli*-Stamm DSM 6601 und *E. coli* K-12-Stamm MG1655 aufgezeigt werden. Der Stamm DSM 6601 ist ein apathogener Vertreter der O6-Stämme und verfügt über verschiedene Faktoren, die die Etablierung und das Überleben im Wirtsorganismus ermöglichen. Dazu gehören u.a. drei unterschiedliche Fimbrienadhäsine und fünf Eisenaufnahmesysteme (2) (Abb. 4). Darüber hinaus weist dieser Stamm eine ungewöhnliche

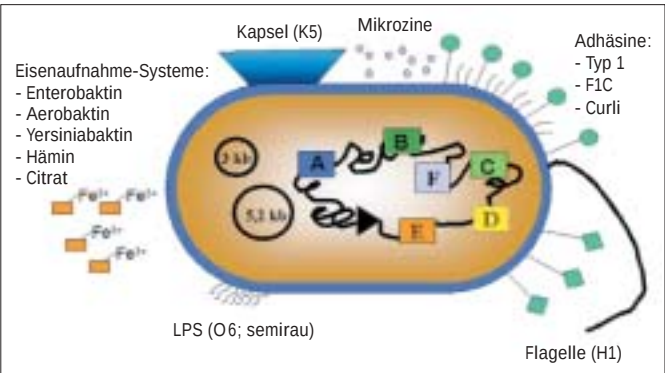


Abb. 4:
Darstellung einer
typischen Bakterienzelle
des *E. coli*-Stammes
DSM 6601

Lipopolysaccharidstruktur auf, die zu einem semirauen Phänotyp führt. Der Stamm DSM 6601 kann auch Mikrozyme produzieren, die einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen bieten.

Mit Hilfe der vergleichenden Genomanalyse wurden diese Faktoren näher charakterisiert. Darüber hinaus sollte die Einordnung der entsprechenden Gencluster in eine physikalische Genkarte möglich sein. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zunächst ein Vergleich der translatierbaren ORF's zwischen dem *E. coli* K-12-Stamm MG1655 und dem Stamm DSM 6601 mit Hilfe der Makroarray-Technik durchgeführt.

Vergleich der translatierbaren ORF's mittels Makroarray-Technik

Die verwendeten Makroarrays enthalten alle translatierbaren ORF's, die man im Genom des Stammes MG 1655 identifizieren konnte. Es zeigte sich, dass insgesamt 418 ORF's, die im Stamm MG1655 anwesend sind, im Genom des Stammes DSM 6601 nicht zu finden sind (Tab. 3). Hierzu zählen u. a. zahlreiche hypothetische ORF's sowie Phagen-, Transposon- oder Plasmid-assoziierte ORF's. Darüber hinaus wurde das Proteom des Stammes DSM 6601 untersucht. Weitere Analysen werden zeigen, ob sich die durch die Makroarray-Analyse erzielten Ergebnisse durch die Proteomanalyse verifizieren lassen.

ORF-Kategorie	Anzahl der in DSM 6601 nicht vorhandenen ORF's
Hypothetisch, nicht klassifizierbar, unbekannt	229
Phagen-, Transposon- oder Plasmid-assoziiert	32
Putative regulatorische Proteine	22
DNA-Replikation, Rekombination, Modifikation	6
Zellstruktur	16
Putative Enzyme	21
Andere	92

Tab. 3: Genomvergleich zwischen den *E. coli*-Stämmen MG1655 und DSM 6601 mittels DNA-Makroarrays

tRNA-Screening

Des Weiteren wurde ein sogenanntes tRNA-Screening etabliert, welches die Identifizierung möglicher zusätzlicher genetischer Information erlaubt, die im *E. coli* K-12-Stamm MG1655 nicht vorhanden ist. tRNA-Gene weisen eine sehr hohe Stabilität auf, da sie für das Überleben einer Bakterienzelle von essentieller Bedeutung sind. Aufgrund dieser Stabilität werden tRNA-Gene sehr häufig als Integrationsort für mobile genetische Elemente wie z.B. Plasmide oder Bakteriophagen verwendet. Sie dienen jedoch auch als Integrationsort für genomische Inseln.

Das tRNA-Screening wird mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotidprimer binden jeweils „up“- und „downstream“ des betreffenden tRNA-Gens, so dass nur dann ein PCR-Produkt entstehen kann, wenn keine Fremd-DNA in dem tRNA-Locus vorliegt. Etwa 30 der insgesamt über 80 in *E. coli* vorkommenden tRNA-Gene, die bereits als potentielle Integrationsorte in der Literatur beschrieben sind, wurden in diese Analyse einbezogen. Es zeigte sich, dass ungefähr ein Drittel der untersuchten tRNA-Gene des Stammes DSM 6601 als Integrationsort für Fremd-DNA in Betracht gezogen werden kann, da hier keine PCR-Produkte nachgewiesen wurden.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen ist geplant, aus einer Cosmidgenbank des Stammes DSM6601 Cosmidklone zu isolieren, die die betreffenden DNA-Bereiche enthalten und einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen werden können. Aus dieser Cosmidgenbank wurden bereits Cosmidklone identifiziert, die kodierende Bereiche der schon bekannten Faktoren des Stammes DSM6601 enthalten. Diese Cosmidklone wurden kartiert und zum Teil einer Sequenzanalyse unterzogen.

Genomkarte von *E. coli* Stamm DSM 6601 (Nissle 1917)

Die Abb. 5 zeigt eine Genomkarte des Stammes DSM 6601, die aufgrund dieser Daten erstellt werden konnte. Die Adhäsingencluster sind bei 23 min (*csg*, Curli-Fimbrien) bzw. 98 min (*fim*, Typ 1-Fimbrien) lokalisiert. Das *foc*-Gencluster, welches für die F1C-Fimbrien kodiert, befindet sich möglicherweise bei 5,6 min. Die für Eisenaufnahme-Systeme kodierenden Gene sind gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt. Die Enterobaktin-Determinante (*ent*) kartiert bei 13 min, das Yersiniabaktin-Gencluster (*ybt*) bei 44 min und das Hämingen *chuA* bei 78 min. Die genaue Position des Aerobaktin-Genclusters konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Interessanterweise sind einige der kartierten Gene auch mit tRNA-Genen assoziiert. Hierzu

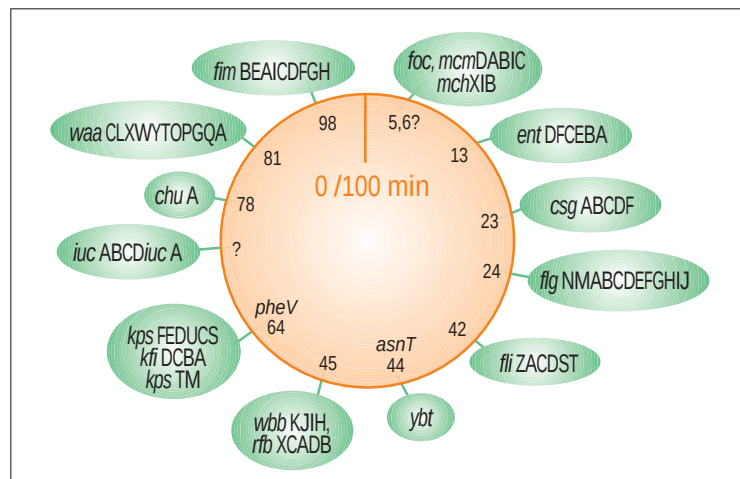


Abb. 5:
Genomkarte
E. coli Stamm
DSM 6601

zählen die *ybt*-Determinante (*asnT*) und die für die Kapselbiosynthese kodierenden *kps*- und *kfi*-Gene (*pheV*). Darüber hinaus liegen die Mikrozingene in enger Nachbarschaft zu den *foc*-Genen.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vergleichende Genomanalyse bereits einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der funktionellen Eigenschaften des probiotischen Stammes DSM6601 leisten konnte. Insgesamt wurden mittlerweile etwa 80 Kilobasen des DSM6601-Genoms entschlüsselt, 32 der identifizierten ORF's konnte eine Funktion zugeordnet werden, 13 ORF's haben bisher unbekannte Funktionen.

Dr. rer. nat. G. Blum-Oehler

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Verwendete Abkürzungen:

<i>foc</i>	– Gene für F1C-Fimbrien
<i>mcm, mch</i>	– Gene für Mikrozin
<i>ent</i>	– Gene für Enterobaktin
<i>csg</i>	– Gene für Curlifimbrien
<i>flg, fli</i>	– Gene für Flagellenantigen
<i>ybt</i>	– Gene für Yersiniabaktin
<i>waa, wbb, rfb</i>	– Gene für Lipopolysaccharidsynthese
<i>kps, kfi</i>	– Gene für Kapselsynthese
<i>iuc</i>	– Gene für Aerobaktin
<i>chuA</i>	– Gen für Häminrezeptor
<i>fim</i>	– Gene für Typ 1-Fimbrien
<i>asnT</i>	– Asparagin-tRNA
<i>pheV</i>	– Phenylalanin-tRNA

Literatur

1. Blattner FR, Plunkett GIII, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997, 277:1453-1474.
2. Blum G, Marre R, Hacker J. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* 1995, 23:234-236.
3. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995, 269:496-512.
4. Fraser CM, Eisen JA, Salzberg SL. Microbial genome sequencing. *Nature* 2000, 406:799-803.
5. Fraser CM, Dujon B. The genomics of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology* 2000, 3:443-444.
6. National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Bethesda, MD 20894, USA.

Bakterielle Invasion in eukaryontische Zellen

T. A. Ölschläger, A. Altenhöfer, C. Albert,
H. Merkert, J. Hacker



Dr. T. A. Ölschläger

Abstract

Ein wichtiger Virulenzfaktor vieler pathogener Bakterien ist die Fähigkeit, in Wirtszellen einzudringen und intrazellulär überleben zu können. Diese Eigenschaft wird als Invasivität bezeichnet. Wie erwartet besitzt der probiotische *E. coli*-Stamm Nissle 1917 (DSM 6601) diese Eigenschaft nicht. Erstaunlicherweise wird DSM 6601 aber auch nach Transformation mit einem Plasmid nicht invasiv, das nicht invasiven *E. coli* K-12 Stämmen Invasivität vermittelt. Als möglichen antagonistischen Effekt auf pathogene Darmbakterien prüften wir auch die Fähigkeit des Stammes DSM 6601, die Invasivität von *Salmonella*-Stämmen zu inhibieren. Dies geschah mittels des sogenannten Gentamycinschutz-Assays. Tatsächlich inhibiert der DSM 6601-Stamm die Invasionseffizienz von *Salmonella* in die humane embryonale Epithelzelllinie des Intestins INT 407 um ca. 80 % im Vergleich zur Invasionseffizienz von *Salmonella* in Abwesenheit von DSM 6601. Dies konnte sowohl für ein klinisches *Salmonella enterica* sv. Typhimurium-Isolat als auch für den abgeschwächt virulenten *Salmonella enterica* sv. Typhimurium Stamm LT2 gezeigt werden. Vermutlich ist dieser inhibitorische Effekt aber nicht einfach das Resultat der Abtötung der Salmonellen durch eines der von DSM 6601 produzierten Mikroazine. Denn weder DSM 6601 noch ein *E. coli* K-12 Cosmidklon, der u. a. Mikrozin(e) produziert, verursachen einen Lysehof in einem Salmonellarasen. Beide genannten Stämme lysieren jedoch den *E. coli* K-12 Stamm DH5 α . Ein direkter Kontakt zwischen DSM 6601 und den Epithelzellen (INT 407) oder *Salmonella* ist aber nicht notwendig, um eine Inhibition der Invasivität von *Salmonella* zu erreichen. Dies wurde in Experimenten gezeigt, in denen sich DSM 6601 in einem Kompartiment über dem mit *Salmonella* infizierten INT 407 Epithelzellrasen befand, das von dem *Salmonella*-haltigen Medium über dem Epithelzellrasen durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,4 μ m getrennt war.

Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass die hier gezeigte antiinvasive Eigenschaft des Stammes DSM 6601 einen Teil seiner probiotischen Potenz repräsentiert.

Einleitung

Sowohl die Vermehrung von *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* (im folgenden als *S. typhimurium* bezeichnet) als auch die Kolonisierung gnotobiotischer Ferkel kann durch *E. coli* Stamm DSM 6601 inhibiert werden (1,2). Es wurden daher Studien zur Aufklärung der molekularen Mechanismen geplant, die die Grundlage dieses protektiven Effekts von DSM 6601 gegen eine *Salmonella*-Infektion bilden. Ein wichtiger Virulenzfaktor von Salmonellen ist die Fähigkeit, in Enterozyten des Wirtsorganismus einzudringen (Abb. 1). Diese Fähigkeit wird als Invasivität oder Invasionsfähigkeit bezeichnet. Die Invasion von Enterozyten repräsentiert eine frühe Stufe der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt während der *Salmonella*-Infektion und ist essentiell für eine erfolgreiche Infektion. Es scheint daher möglich, dass DSM 6601 eine *Salmonella*-Infektion dadurch zu unterdrücken vermag, indem dieser probiotische *E. coli*-Stamm u.a. die Invasion der Enterozyten durch *Salmonella* verhindert.

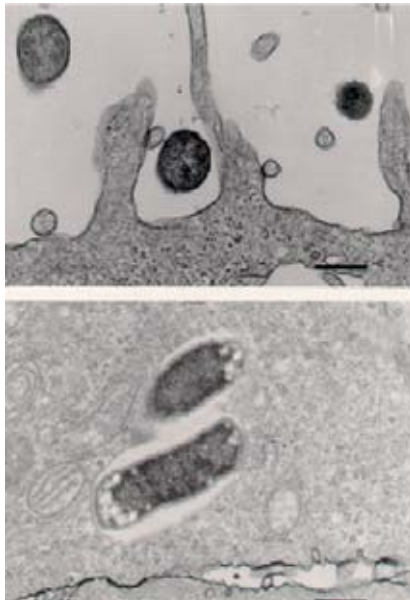


Abb. 1:
Transmissionselektronenmikroskopie:
Bakterien während der Internalisierung und intrazellulär.

E. coli DSM 6601 (Stamm Nissle 1917) und Invasivität

Zunächst wurde geprüft, ob der *E. coli*-Stamm DSM 6601 möglicherweise für humane transformierte Epithelzellen selbst invasiv ist. Als Invasions-negative Kontrolle dienten verschiedene *E. coli* K-12 Stämme. Als positive Kontrollen wurden das klinische *S. typhimurium*-Isolat C17 und der attenuierte *S. typhimurium*-Stamm LT2 gewählt. Die ausgewählten humanen Epithelzelllinien stammen aus der Harnblase (T24) bzw. dem embryonalen Intestinum (INT 407).

Die Invasionseffizienzen wurden mittels des klassischen „Gentamycin-Schutzassays“ ermittelt (3). Dazu wurden die Epithelzellen in „24 Well“-Platten bis zur Ausbildung geschlossener einschichtiger Zellrasen kultiviert. Diese konfluenten Epithelzellmonolayer wurden dann mit ca. 30 Bakterien pro Epithelzelle infiziert. Während einer sich anschließenden dreistündigen Inkubationsphase hatten die Bakterien Gelegenheit, die Wirtszellen zu invadieren. Eine zweite einstündige Inkubationsphase in Gegenwart von 100 µg/ml Gentamycin diente als Differenzierungsschritt für die Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulär lokalisierten Bakterien. Diese Differenzierung beruht auf der Tatsache, dass Aminoglykosid-Antibiotika wie Gentamycin intrazellulär lokalisierte Bakterien nicht abtöten, sondern nur die extrazellulär lokalisierten. Nach diesem Differenzierungsschritt wird die Zahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Dazu wird der Epithelzellrasen zunächst mit einem Detergenz in geeigneter Verdünnung lysiert. Anschließend werden definierte Verdünnungen des Lysats auf Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht kann die Anzahl der Kolonien bestimmt werden. Unter Einbeziehung der Verdünnungsstufe kann berechnet werden, welcher Prozentsatz des Inokulums die Gentamycinbehandlung überlebt hat und damit intrazellulär lokalisiert war.

Der Einsatz von *E. coli* Stamm DSM 6601 in diesem Gentamycin-Schutzassay ergab, dass dieser Stamm für beide verwendeten humanen Epithelzelllinien nicht invasiv ist. Die mit DSM 6601 erhaltenen Invasionseffizienzen sind Hintergrundwerte, die auch mit den nicht-invasiven *E. coli* K-12-Stämmen erreicht wurden. Im Gegensatz dazu konnten 40 bis 50 % des Inokulums von *S. typhimurium* Stamm C17 und 10 bis 20 % des *S. typhimurium* Stammes LT2 intrazellulär lokalisiert werden (Abb. 2).

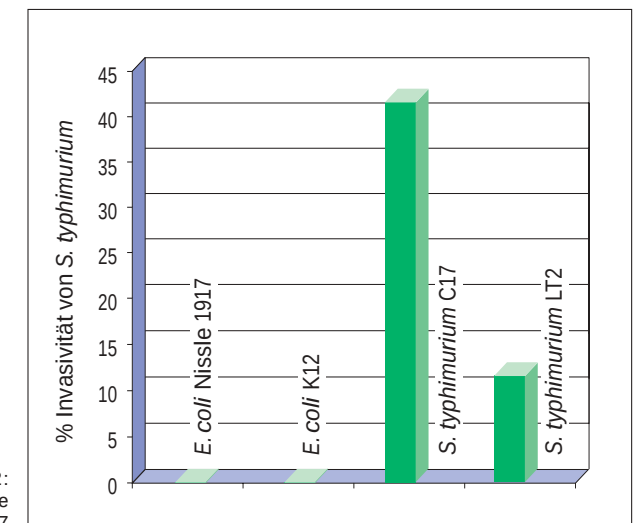


Abb. 2:
Invasionseffizienzen in humane
intestinale Epithelzellen INT 407

Effekt von *E. coli* DSM 6601 (Stamm Nissle 1917) auf die Invasivität von *Salmonella*

In einer zweiten Serie von Invasionsexperimenten sollte geprüft werden, ob der *E. coli*-Stamm DSM 6601 die Invasivität von *Salmonella* in die Zelllinie INT407 zu beeinflussen vermag. Dazu wurden erneut Gentamycin-Schutzassays durchgeführt, jeweils parallel mit DSM 6601, *S. typhimurium* C17 und *S. typhimurium* LT2.

Simultan wurden weitere Gentamycin-Schutzassays durchgeführt, in denen einschichtige Epithelzellrasen gleichzeitig mit je einem *Salmonella*-Stamm und einem *E. coli*-K-12-Stamm bzw. einem *Salmonella*-Stamm und dem *E. coli*-Stamm DSM 6601 infiziert wurden. Die experimentell bestimmten Invasionseffizienzen bei den Mischinfektionen wurden untereinander und mit jenen der Monoinfektionen verglichen. Bei Mischinfektionen von *E. coli*-K-12 Stämmen und *Salmonella* fand sich kein Effekt auf die Invasionseffizienz von *Salmonella*. Hingegen war jedoch in Gegenwart des *E. coli*-Stammes DSM 6601 die Invasionseffizienz sowohl von *S. typhimurium* C17 als auch von LT2 um ca. 70 bis 80 % reduziert im Vergleich zu den Mischinfektionen mit *Salmonella* und *E. coli*-K-12-Stämmen (Abb. 3). Damit konnte eine inhibitorische Wirkung von *E. coli* Stamm DSM 6601 auf die Invasivität von *S. typhimurium* in vitro demonstriert werden.

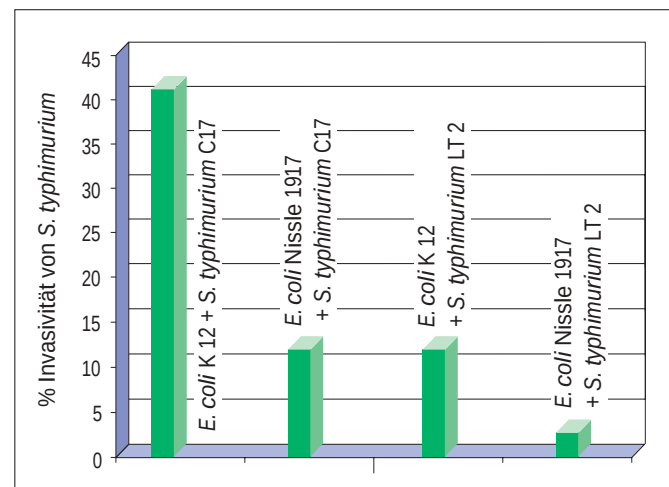


Abb. 3:
Effekt von DSM 6601
(*E. coli* Stamm Nissle 1917)
auf die Invasionseffizienz
von *Salmonella*

Charakterisierung der antiinvasiven Eigenschaften des *E. coli*-Stammes DSM 6601

Es wurde zunächst vermutet, dass die von DSM 6601 produzierten Mikroazine für die antiinvasive Aktivität verantwortlich sind. Würde *Salmonella* von diesen Mikroazinen abgetötet, würde damit auch die Invasivität der Salmonellen inhibiert.

Zur Klärung der Rolle der DSM 6601-Mikroazine bei der Inhibierung der *Salmonella*-Invasion wurde eine isogene Mikroazin-negative Mutante (H5445) des Stammes DSM 6601 im Vergleich zum Wildstamm in Mischinfektionen der INT407 Zellen in Gentamycin-Schutzassays eingesetzt. Die Mikroazin-negative Mutante H5445 inhibierte beinahe so effektiv die Invasivität von *S. typhimurium* C17 wie der Mikroazin-produzierende Wildtyp DSM 6601 (Abb. 4). Damit schieden die von DSM 6601 produzierten Mikroazine als die bestimmende antiinvasive Komponente aus.

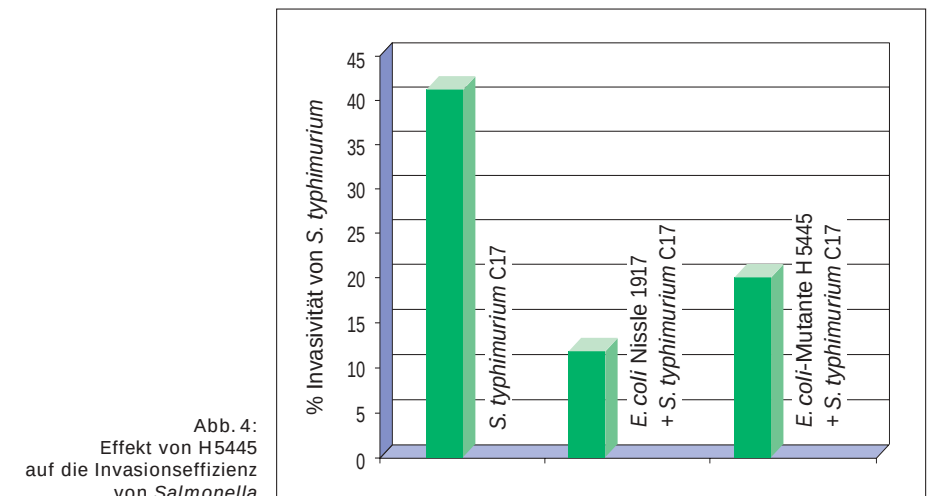


Abb. 4:
Effekt von H5445
auf die Invasionseffizienz
von *Salmonella*

Mögliche andere Hypothesen zur Rolle von *E. coli* Stamm DSM 6601 bei der Inhibierung der *Salmonella*-Invasion waren:

- das Vorhandensein einer anderen, von DSM 6601 sezernierten, bislang unbekannten Komponente,
- der direkte Kontakt zwischen DSM 6601 und den Salmonellen
- und/oder der direkte Kontakt zwischen DSM 6601 und den INT407-Zellen.

Zur Klärung dieser Hypothesen wurde ein modifizierter Gentamycin-Schutzassay genutzt. Dazu kamen sogenannte „Transwell-Units“ zum Einsatz, um einen direkten Kontakt zwischen einerseits DSM 6601 und *Salmonella* und andererseits zwischen DSM 6601 und den INT407-Zellen zu verhindern sowie gleichzeitig eine freie Diffusion für von DSM 6601 sezernierte Moleküle zu gewähren (Abb. 5). Diese Transwell-Units sind Kunststoffeinsätze, die in die Kavitäten mit den INT407-Monolayern eingebracht werden. Der Boden dieser Einsätze besteht aus einer porösen Membran. Die Poren haben einen Durchmesser von 0,4 µm. Daher ist diese Membran nicht durchlässig für die untersuchten Bakterienspezies, stellt aber keine Diffusionsbarriere für Moleküle dar.

In diese Transwell-Units wurden dann entweder der *E. coli*-Stamm DSM 6601 oder seine isogene Mikrozin-negative Mutante H5445 appliziert und der *S. typhimurium*-Stamm C17 in die Kavität mit den INT 407-Epithelzellen gegeben und damit der Gentamycin-Schutzassay gestartet. Die so erzielten Invasionsraten für *S. typhimurium*-Stamm C17 waren ähnlich niedrig wie jene der Experimente mit Mischinfektionen aus C17 und DSM 6601 bzw. C17 und H5445, in denen die Salmonellen und die Test-Stämme (DSM 6601 bzw. H5445) nicht durch eine Membran voneinander getrennt waren (Abb. 6).

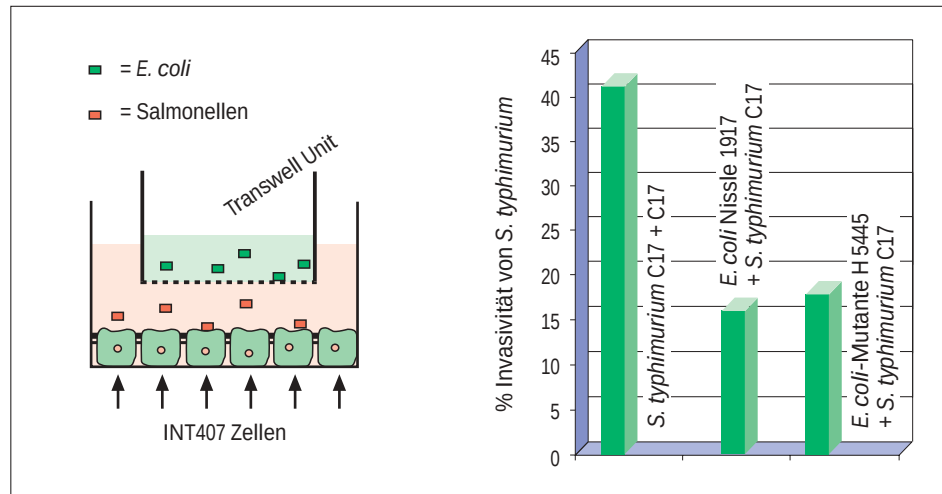


Abb. 5: Das Transwell-System

Abb. 6: Effekt von DSM 6601/ H 5445 - platziert in Transwell-Units – auf die Invasionseffizienz von *Salmonella*

Interessanterweise erfolgte jedoch keine Reduktion der Invasionseffizienz, wenn *S. typhimurium* Stamm C17 statt DSM 6601 in die Transwell-Units gegeben wurde. Dies bedeutet, dass die beobachtete Inhibierung der C17-Invasion in der Kavität mit den INT407-Zellen nicht auf der Depletion einer für die Invasion von *Salmonella* wichtigen Komponente des Zellkulturmediums beruht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe deuten vielmehr eindeutig auf eine diffusible Komponente von *E. coli* Stamm DSM 6601 als Antiinvasivum hin.

Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorgestellten Befunde aus Studien zur Invasivität von *E. coli* DSM 6601 (Stamm Nissle 1917) belegen, dass diese probiotischen Keime im in vitro-Standardassay zur Bestimmung der Invasionseffizienz von Bakterien, dem Gentamycin-Schutzassay, nicht invasiv sind. Vielmehr hat der *E. coli*-Stamm DSM 6601 inhibitorische Wirkung auf die Invasivität von *Salmonella* in vitro. Diese antiinvasive

Aktivität ist auf einen bislang unbekannten diffusiblen Faktor zurückzuführen und nicht auf direkten Kontakt mit *Salmonella* oder mit den humanen INT407-Epithelzellen. Es handelt sich bei diesem Faktor aber nicht um die von DSM 6601 produzierten Mikroazine.

Im Tiermodell (Maus) soll ebenfalls geprüft werden, ob DSM 6601 die Invasivität von *Salmonella typhimurium* zu inhibieren vermag. Dazu werden histologische Schnitte der Darmmukosa von mit *Salmonella typhimurium* infizierten Tieren untersucht und mit dem histologischen Bild von Tieren verglichen, die vor der *Salmonella*-Infektion mit DSM 6601 kolonisiert wurden. Des Weiteren ist geplant, von diesen Tiergruppen die gereinigten, mit Gentamycin behandelten und homogenisierten Darmabschnitte in Saline zu verdünnen und die intrazellulären Salmonellen mittels *Salmonella*-Indikatorplatten zu quantifizieren. Schließlich soll mit einem ähnlichen Verfahren die Anzahl der Salmonellen in den inneren Organen (Leber, Milz etc.) bestimmt werden.

Eine weitere Fragestellung ist die Untersuchung der Fähigkeit von *E. coli* Stamm DSM 6601, die Invasivität anderer invasiver Mikroorganismen wie enteroinvasiver *E. coli*, Shigellen, Listerien oder Yersinien zu inhibieren. Sollte sich die antiinvasive Wirkung von DSM 6601 auch auf andere invasive Mikroorganismen erstrecken, kann davon ausgegangen werden, dass diese Eigenschaft zur probiotischen Natur des *E. coli*-Stammes DSM 6601 gehört.

Schließlich soll die molekulare Natur der antiinvasiven DSM 6601-Komponente aufgeklärt werden, indem der *E. coli*-Stamm DSM 6601 mittels des Transposons *TnphoA* mutagenisiert und die erhaltenen Mutanten auf den Verlust der antiinvasiven Fähigkeit geprüft werden. Die so ermittelte Determinante muss dann anschließend mit den Methoden der molekularen Genetik und Biologie charakterisiert werden.

Danksagung

Wir möchten Herrn Klaus Hantke, Universität Tübingen, für die freundliche Bereitstellung des *E. coli*-Stammes H 5445 danken.

Dr. rer. nat. T. A. Ölschläger

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Literatur

- Schulze J et al. Microbial Ecology in Health and Disease, Vol 5: i-xi, 1992
- Mandel et al. Stimulation of intestinal immune cells by *E. coli* in gnotobiotic piglets, 1995, In: Advances in Mucosal Immunology [J. Mestecky et al., eds.], 463-464
- Elsinghorst EA. Measurement of invasion by gentamicin resistance. Methods Enzymol 1994; 236: 405-20

Struktur und pathophysiologische Wirkung des Endotoxins

U. Zähringer, C. Alexander, E.T. Rietschel



Priv.-Doz. Dr. U. Zähringer

Abstract

Gram-negative Bakterien tragen auf ihrer Oberfläche Lipopolysaccharide (LPS), die über die hochsensitive Erkennung durch zelluläre und humorale Mechanismen der angeborenen Immunität ein breites Spektrum an Reaktionen im Organismus des Menschen induzieren können. Zu den physiologischen Effekten von LPS zählen neben der Induktion einer Immunantwort eine gesteigerte Immunabwehr gegenüber mikrobiellen oder viralen Pathogenen und die Aktivierung anti-tumoraler Immunmechanismen. Aufgrund ihrer potentiellen pathophysiologischen Wirkungen, insbesondere bei der Induktion schwerer septischer Erkrankungen, werden LPS häufig synonym als „Endotoxine“ bezeichnet.

Alle heute bekannten Varianten von LPS setzen sich aus einer vorwiegend lipophilen Membran-Verankerungsdomäne, dem Lipoid A, und einer Kern- und daran geknüpften Polysaccharidregion zusammen, welche aus sich wiederholenden Einheiten („repeating units“) besteht. Die Lipoid A-Domäne bildet das primäre immunmodulatorisch aktive Zentrum und ist für die enterobakteriellen LPS-Formen in allen Details aufgeklärt worden. Die volle endotoxische Wirkung wird durch ein Hexaacyl-bisphosphoryl Lipoid A des *Escherichia coli*-Typs entfaltet. Das Darmbakterium *E. coli* gehört zu den Gram-negativen Bakterien und besitzt einen hohen Anteil LPS in der äußeren Membran.

Um die Bedeutung des apathogenen *E. coli*-Stammes Nissle 1917 (DSM 6601, MUTAFLOR®) hinsichtlich seiner immunstimulatorischen Eigenschaften besser verstehen zu können, haben wir die chemische Struktur des LPS aus diesem Enterobakterien-Stamm analysiert und vollständig aufgeklärt. Nach unseren Daten repräsentiert dieses LPS eine sehr hohe Strukturhomogenität und besteht aus einem biologisch hochaktiven typischen Hexaacyl-bisphosphoryl Lipoid A, einem R1-Kernoligosaccharid und nur einer einzigen Basis-Einheit der O-spezifischen Kette, die ein Pentasaccharid der serologischen *E. coli* O6-Struktur darstellt. Das LPS des Stammes Nissle 1917 weist demnach eine ungewöhnliche Semirau (S/R)-Struktur auf, welche einerseits die immunstimulatorischen, andererseits aber auch die apathogenen Eigenschaften dieses Stammes zu erklären vermag.

Die primären Zielzellen für Endotoxine im Säugerorganismus sind die professionellen Phagozyten der angeborenen Immunität. Nach aktuellen Modellvorstellungen erfolgt die hochsensitive zelluläre Erkennung der Lipoid A-Domäne von endotoxisch aktiven LPS im Wirtorganismus über die Mitwirkung des LPS-Bindungsproteins (LBP), die membran-gebundenen oder löslichen Isoformen des CD14-Antigens sowie den neu identifizierten membranständigen Komplex des *Toll-like receptors 4* (TLR4) mit dem endogenen Protein MD-2.

Die Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei LPS hat nicht nur zu einem molekularen Verständnis sowohl immunstimulatorischer als auch toxisch-septischer Prozesse beigetragen, sondern auch die Entwicklung neuer pharmakologischer und immunologischer Strategien zur Prävention und Therapie maligner und infektiöser Erkrankungen neu belebt.

Einleitung

Endotoxine sind eine Klasse von Zellwand-Komponenten Gram-negativer Bakterien, die aufgrund der generellen chemischen Struktur als Lipopolysaccharide (LPS) bezeichnet werden und zu den aktivsten heute bekannten biologischen Immunstimulatoren gehören. Lipopolysaccharide sind extrem hitzestabile amphiphile Moleküle, die sich aus einer vorwiegend hydrophoben Region – dem Lipoid A – und einer kovalent gebundenen hydrophilen Poly- oder Oligosaccharidregion zusammensetzen (Abb. 1) (1,2).

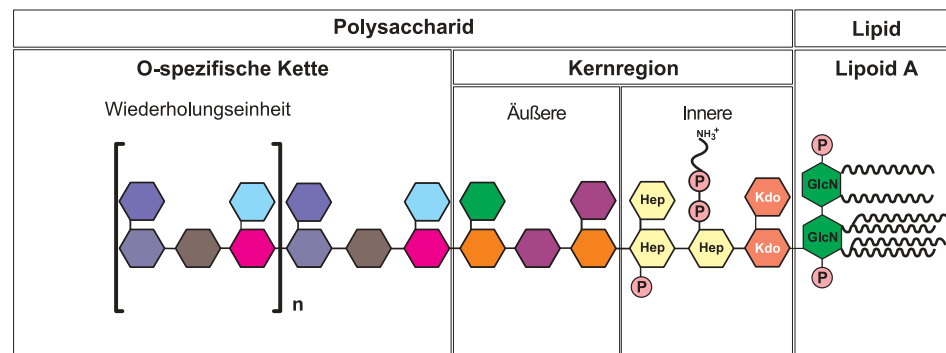


Abb. 1: Generelle Struktur der Lipopolysaccharide Gram-negativer Enterobakterien

Die Lipoid A-Domäne ist das primäre immunmodulatorische Aktivitätszentrum der Lipopolysaccharide. Gezeigt ist die vollständig protonierte Form. $n = 0$ bis 70; in S/R-Mutanten ist $n = 0$.

Kdo 3-Deoxy-D-manno-Oktulosensäure
 Hep L- oder D-Glycero-D-manno-heptose
 GlcN Glukosamin
 P Phosphat

LPS bilden eine essentielle Komponente der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien - darunter so wichtiger kommensaler oder humanpathogener Keime wie z.B. *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Salmonella enterica*.

Pathologische Wirkungen, die auf LPS als hitzestabiler Komponente bakterieller Präparate zurückgehen, sind bereits in den frühen Studien von Richard Pfeiffer beschrieben worden, einem Mitarbeiter Robert Kochs am Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. Er wählte die Bezeichnung 'Endotoxine' für die neu entdeckten bakteriellen Substanzen, um sie von den bereits charakterisierten hitzelabilen Exotoxinen von *Vibrio cholerae* zu unterscheiden (3). Eine vorwiegend durch LPS induzierte Kombination von therapeutischen immunstimulatorischen Effekten und toxischen Wirkungen wurde etwa zur gleichen Zeit von William B. Coley am Memorial Hospital in New York beobachtet. Er behandelte inoperable Sarkome beim Menschen mit Hilfe eines Gemisches hitzegetöteter Bakterien der Gram-negativen Spezies *Serratia marcescens* und Gram-positiver Streptokokken ('Coley's Toxine') (4).

LPS vieler Gram-negativer Bakterienarten konnten in den letzten zwei Jahrzehnten chemisch, physikalisch und biologisch näher charakterisiert werden (1,2,5,6). Hierbei zeigte sich, dass nur definierte Formen von LPS bei Menschen oder Versuchstieren toxisch (agonistisch) aktiv sind.

Die klassische Endotoxin-Wirkung agonistischer LPS-Präparate wird primär indirekt hervorgerufen, d.h. durch die Induktion einer extremen, pathologischen, dysregulierten Immunreaktion des Wirtsorganismus. Im Einklang mit den erwähnten klassischen Studien wurde die generell ambivalente Natur der Wirkungen von agonistischem LPS bestätigt. Abhängig von der Dosis, der Applikationsart und der individuellen, zum Teil genetisch determinierten Empfindlichkeit des Wirtsorganismus können agonistische LPS-Formen in erwünschter Weise eine Steigerung der Immunabwehr gegenüber mikrobiellen oder viralen Infektionen sowie auch malignen Erkrankungen bewirken. Ebenso sind ernste pathologische Reaktionen bis hin zu schweren septischen Erkrankungen möglich.

Die phylogenetisch stark konservierte Lipoid A-Domäne wurde als das primäre immunstimulatorische Aktivitätszentrum der Lipopolysaccharide identifiziert. Diese Domäne wird spezifisch durch humorale und zelluläre Komponenten der angeborenen oder natürlichen Immunität einer Vielzahl eukaryontischer Organismen erkannt. Unter immunologischem Aspekt fungieren die Lipoid A-Domänen agonistischer LPS als 'Pathogen-assoziierte Molekulare Muster' (PAMPs), die dem Wirtsorganismus die Infektion durch Gram-negative Bakterien signalisieren (7).

Im Laufe der zurückliegenden Dekade konnten zentrale Komponenten des Signalsystems der Phagozyten aus Säugern identifiziert werden, das die Erkennung der Lipoid A-Region endotoxisch aktiver LPS-Formen vermittelt.

Nach aktuellen Modellvorstellungen wird die proinflammatorische Aktivierung der Phagozyten durch Endotoxine über das sequentielle Zusammenwirken verschiedener Komponenten initiiert. Dazu gehören:

- das extrazelluläre LPS-Bindungsprotein (LBP),
- membran-gebundene oder lösliche Isoformen des CD14-Antigens (mCD14 oder sCD14) und
- Komplexe des *Toll-like receptor* 4 (TLR4) mit dem akzessorischen Protein MD-2 auf der Zelloberfläche.

Die Aktivierung erfolgt über intrazelluläre Signaltransduktionswege, deren primäre Komponenten den Signalsystemen der Zytokine IL-1 und IL-18 analog sind (8,9). Neuerdings wird auch die Beteiligung von Ionenkanälen bei der Signaltransduktion diskutiert (10).

Chemische Struktur und immunreaktive Determinanten der Lipopolysaccharide

Alle heute bekannten bakteriellen LPS-Formen sind in ihrer Grundarchitektur vergleichbar. Sie bestehen aus einer Lipidkomponente, dem Lipoid A, und einem kovalent an diese Membranverankerungsstruktur gebundenen Polysaccharid- oder Oligosaccharidanteil. Insbesondere wegen der großen strukturellen Variabilität in der Polysaccharidregion, aber auch aufgrund spezifischer Unterschiede in den Feinstrukturen der Lipoid A-Domänen existiert eine enorme Vielfalt an natürlichen Strukturvarianten innerhalb dieser Substanzklasse (1,2,5,6). In einer Reihe klassischer Studien wurden zunächst die endotoxisch hochaktiven LPS-Formen der Enterobakterien *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* aufgeklärt (Abb. 1). Die Polysaccharidregion des LPS dieser und vieler nachfolgend charakterisierter Bakterien setzt sich aus der terminalen O-spezifischen Kette – einer Substruktur aus bis zu 70 sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten von meist 2–8 Monomeren – und der an das Lipoid A gebundenen Kernregion zusammen.

O-spezifische Kette

Charakteristisch für die O-spezifische Kette ist eine extrem hohe Strukturvariabilität, die die Basis für die serologische Klassifizierung individueller Bakterienstämme nach den O-antigenen Determinanten bildet. Mutanten der Enterobakterien und anderer Gram-negativer Bakterien, die aufgrund genetischer Defekte keine O-spezifischen Ketten in den Lipopolysacchariden ausbilden, werden wegen der Morphologie der bakteriellen Kolonien als Rau (rough; R)-Mutanten und ihr LPS als R-Form-LPS bezeichnet. Lipopolysaccharide mit einer O-Kette werden allgemein als S (smooth, glatt)-Form-LPS klassifiziert (1,2). Zudem wurden auch aus Wildtyp-Bakterien mit vorwiegend mucosaler Existenz wie beispielsweise *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* oder *Bordetella pertussis* spezifische LPS-Formen isoliert, die keine O-Kette enthalten und häufig wirtsähnliche terminale Oligosaccharid-Strukturen aufweisen (11,12).

Kernoligosaccharid-Region

In der Kernoligosaccharid-Region kann bei den LPS-Formen der Enterobakterien und auch bei vielen anderen Bakterienspezies eine äußere Kernregion und eine Lipoid A-proximale innere Kernregion unterschieden werden. Die äußere Kernregion besteht vorwiegend aus Hexosen (Tab.1).

D-Glukose (Glc)	N-Acetylglukosamin (GlcNAc)
D-Galaktose (Gal)	N-Acetylgalaktosamin (GalNAc)
D-Glukosamin (GlcN)	

Tab. 1: Typische Hexosen der äußeren Kernregion

Innerhalb der Poly- oder Oligosacchariddomäne zeigt die innere Kernregion die geringste Strukturvariabilität und enthält bei den meisten Gram-negativen Bakterien die charakteristischen Monosaccharid-Einheiten 3-Desoxy-D-manno-okt-2-ulosonsäure („2-Keto-3-desoxyoktulosonsäure“; Kdo) und L- oder D-Glycero-D-manno-heptose.

Lipoid A-Domäne

Die Lipoid A-Domäne der Lipopolysaccharide besteht aus einem zentralen β (1'→6)-verknüpften Lipoid A-Rückgrat von D-Glucosamin (D-GlcN) oder D-2,3-Diaminoglucose (D-GlcN3N) in homo- oder heterodimerer Kombination. Diese zentrale Struktur ist in der Mehrzahl der heute aufgeklärten Strukturen jeweils in den Positionen 1 und 4' monophosphoryliert und trägt in den Positionen 2 und 3 sowie 2' und 3' charakteristische Acyl- oder Acyloxyacyl-Gruppen mit einem sehr hohen Anteil an (R)-3-Hydroxyacyl-Resten (5).

Die klassische hexaacylierte Struktur des Lipoid A der Enterobakterien mit einem asymmetrischen Acylierungsmuster von vier 'primären', d.h. direkt an das Disaccharid-Rückgrat gebundenen (R)-3-Hydroxymyristinsäure-Resten sowie einer weiteren (R)-3-Hydroxymyristyl-Einheit und einer (R)-3-Hydroxylauryl-Gruppe in 'sekundärer' Verknüpfung repräsentiert eine beim Menschen und in Versuchstieren immunstimulatorisch oder endotoxisch maximal aktive Form des Lipoid A.

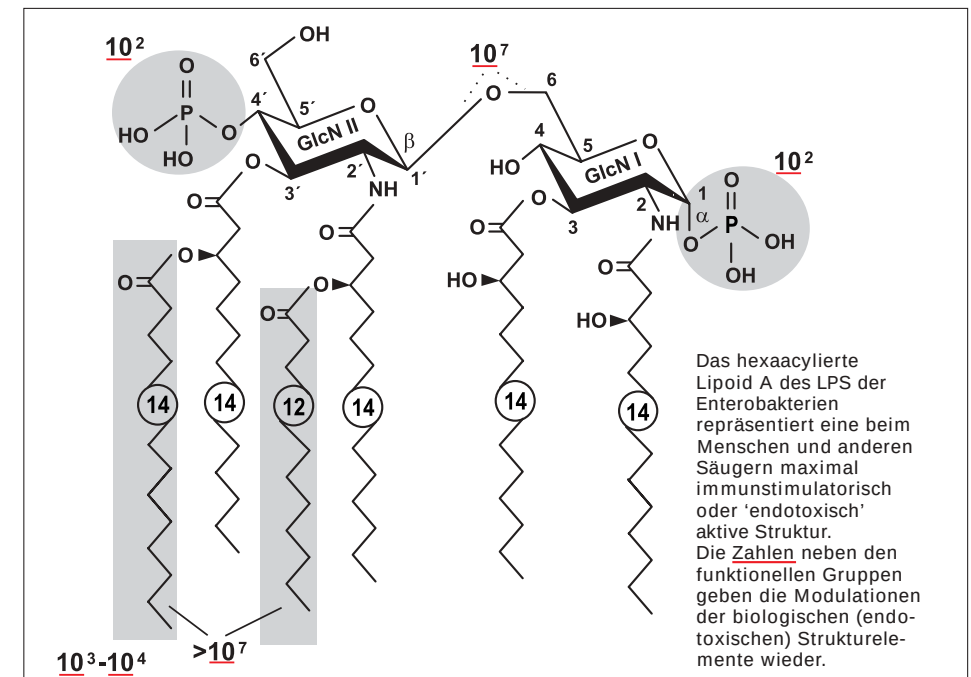


Abb. 2: Chemische Struktur des enterobakteriellen Lipoid A

Neben der intakten $\beta(1' \rightarrow 6)$ -verknüpften Disaccharidstruktur und dem Vorliegen der Phosphat-Gruppen in den Positionen 1 und 4' sind insbesondere die beiden 'sekundären' Acyl-Reste zentrale Determinanten für die proinflammatorische Aktivierung humaner Monozyten durch Lipoid A oder entsprechende komplette LPS-Strukturen (Abb. 2) (1,2,13). Das haben vergleichende Studien an chemisch synthetisierten Partialstrukturen, enzymatischen Deacylierungsprodukten und entsprechenden Intermediaten der Biosynthese des enterobakteriellen Lipoid A ergeben. Neben den maximal oder partiell endotoxisch wirksamen Lipoid A-Formen sind heute einige native oder chemisch synthetisierte Varianten bekannt, die endotoxisch inaktiv sind und zugleich die Aktivitäten agonistischer Lipoid A- oder LPS-Formen kompetitiv hemmen können (14).

Die klassische Form eines Endotoxin-Antagonisten in der Aktivierung humaner Zellen ist die Tetraacyl-Partialstruktur des Lipoid A aus *E. coli*. Sie wird auch als Verbindung 406, als Biosynthesestufe Ia oder als Lipid IV_A bezeichnet und unterscheidet sich im Fehlen der beiden 'sekundären' Acylreste von der endotoxisch hochaktiven Struktur des intakten Lipoid A.

Zentrale Wirkungen agonistischer LPS-Formen im Säugerorganismus

Agonistische LPS-Formen induzieren im Wirtsorganismus ein weites Spektrum biologischer Effekte. Die primären Zielzellen für LPS beim Menschen und bei Versuchstieren sind die professionellen Phagozyten der angeborenen Immunität, insbesondere periphere Monozyten und Gewebsmakrophagen. Diese exprimieren konstitutiv die membrangebundene Form des CD14-Antigens (mCD14) sowie den stabilen Komplex des Toll-like-receptor 4 (TLR4) mit dem MD-2-Protein.

Durch adoptiven Transfer LPS-normoreaktiver myeloischer Zellen in genetisch LPS-hyporesponsive Mäuse konnte die zentrale Bedeutung peripherer Monozyten in einem murinen Modell der Endotoxin-induzierten lethalen Sepsis *in vivo* belegt werden (15).

Beim Menschen reagieren insbesondere mononukleäre Zellen mit extremer Empfindlichkeit auf endotoxisch aktive LPS-Präparate. So liegen die Schwellenwerte für die Aktivierung humaner Monozyten durch enterobakterielles S-Form-LPS in Vollblut *ex vivo* oder in serumhaltigen Zellkulturen bei 1–10 pg/ml, d.h. in der Größenordnung von 1 fmol/ml.

Durch Interferon γ (IFN γ) wird eine Hypersensitivierung dieser primären Sensorzellen für LPS bewirkt. Die Aktivierung mononukleärer Zellen durch Endotoxine führt zur Sekretion eines weiten Spektrums endogener Mediatoren. Dazu gehören:

- proinflammatorische Zytokine wie
 - Tumornekrosefaktor α (TNF α),
 - Migrationsinhibitionsfaktor (MIF),
 - Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 und IL-18,
- koloniestimulierende Faktoren M-CSF, G-CSF und GM-CSF,

- Plättchenaktivierungsfaktor (PAF),
- Arachidonsäure-Metaboliten wie Prostaglandin E₂, Thromboxan A₂ oder Leukotriene sowie
- reduzierte Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen (O₂⁻), Hydroxyl-Radikale (OH $\cdot$) oder Stickstoffmonoxid (NO) (Abb. 3) (1,2).

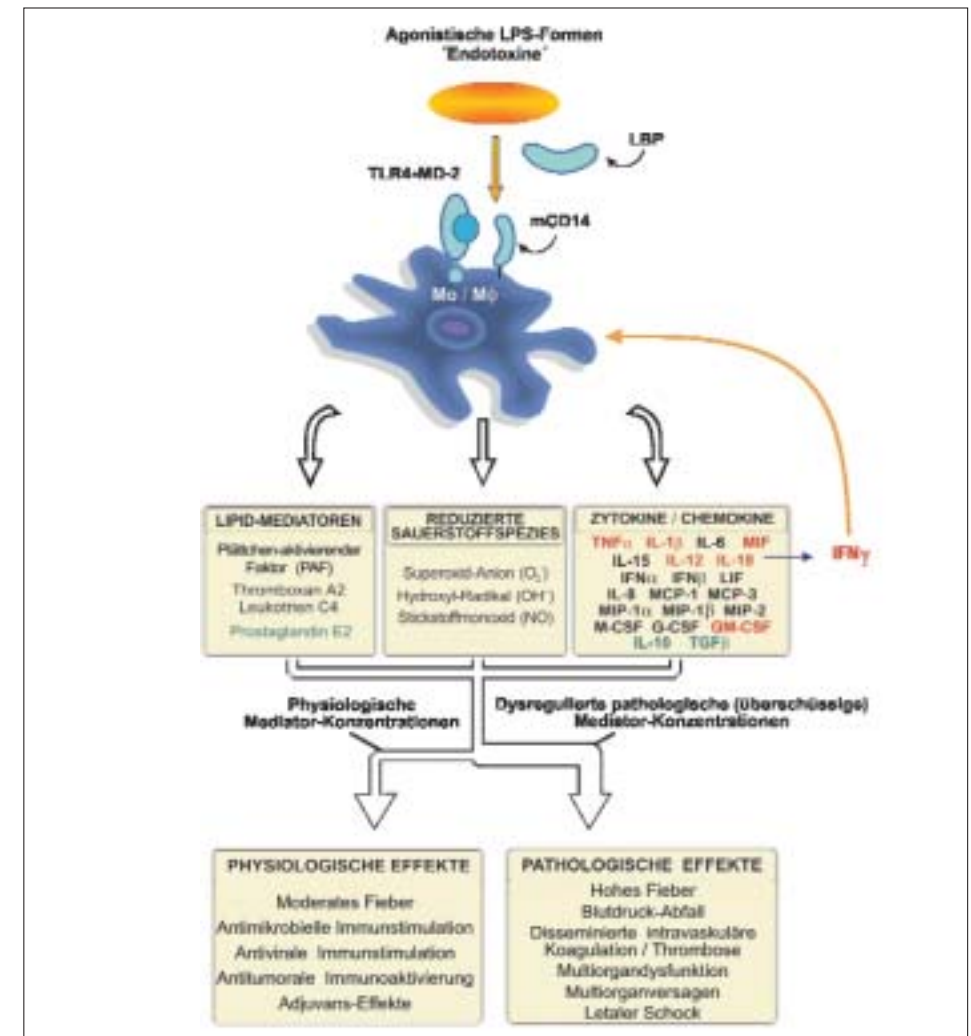


Abb. 3: Makrophagen-vermittelte Aktivierung der angeborenen Immunität durch agonistische LPS-Formen

Die Aktivierung myeloischer Zellen durch Endotoxine führt über das schematisch angedeutete Spektrum von immunaktiven endogenen Mediatoren in regulierter Weise zu physiologischen Formen der Immunstimulation, kann aber bei dysregulierter und extremer Freisetzung dieser Mediatoren auch fatale pathologische Effekte induzieren. Autokrin aktive Mediatoren mit positiven oder negativen Regulationswirkungen hinsichtlich der Endotoxin-Reaktivität der myeloischen Zellen sind rot bzw. grün hervorgehoben.

Darüber hinaus bewirken agonistische LPS-Formen im Rahmen der angeborenen Immunität eine direkte, d.h. Antikörper-unabhängige Aktivierung der klassischen wie auch der alternativen Komplementkaskade unter Freisetzung der Anaphylatoxine C5a und C3a. Die bei der durch Endotoxine induzierten Aktivierung der angeborenen Immunität primär freigesetzten endogenen Mediatoren stimulieren in der Regel über parakrine und autokrine Mechanismen ein ausgedehntes Netzwerk an Sekundärreaktionen:

- Stimulation der Sekretion von Akutphase-Proteinen durch die Hepatozyten,
- Aktivierung von Lymphozyten, Basophilen, Mastzellen, Eosinophilen, Thrombozyten und anderer Zellen,
- gesteigerte hämatopoetische Aktivität des Knochenmarks und erhöhte Blutgerinnungsaktivität.

Die pleiotropen Effekte von LPS umfassen auch neuroendokrine Wirkungen. Diese führen zu einer Aktivierung des zentralen Nervensystems und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse mit der vermehrten Freisetzung von Hormonen und Neuropeptiden wie beispielsweise Glukokortikoiden, Katecholaminen oder Endorphinen. Zu den klassischen Effekten endotoxisch aktiver LPS-Formen gehört die Induktion von Fieber, an der nach heutigen Erkenntnissen primär die Zytokine IL-1 β und IL-6, aber auch Prostaglandin E2 und durch diese Mediatoren aktivierte neuronale Reaktionswege beteiligt sind. Das Ausmaß und der Verlauf der durch bioaktives LPS initiierten endogenen Reaktionen im Wirtsorganismus werden über eine Reihe von negativen und positiven Kontrollmechanismen reguliert (2).

Chemische Struktur und immunstimulatorische Effekte des LPS von *E. coli* Stamm Nissle 1917 (DSM 6601, MUTAFLO[®])

Um die immunstimulatorischen und die apathogenen Eigenschaften des *E. coli*-Stammes Nissle 1917 (DSM 6601, MUTAFLO[®]) besser verstehen zu können, haben wir die chemische Struktur des LPS dieses Enterobakterien-Stammes analysiert und vollständig charakterisiert (Abb. 4).

Die Lipoid A-Domäne des Nissle-LPS entspricht in der Struktur der Hexa-acyl-bisphosphoryl-Form des *E. coli*-Typs (Verbindung 506), während die Kernregion weitgehend mit der früher identifizierten *E. coli* R1-Struktur übereinstimmt. Strukturelle Besonderheiten bestehen darin, dass

- a) die erste Wiederholeinheit der O-spezifischen Kette im Nissle-LPS nicht α - sondern β -glykosidisch verknüpft ist und
- b) das Phosphorylierungsmuster des Kernoligosaccharids sich von anderen bisher bekannten *E. coli* R1-Strukturen unterscheidet.

Die Phosphatreste in jeweils Position 4 der beiden Heptosen (Hep^I und Hep^{II}) sind im Stamm *E. coli* DSM 6601 unterschiedlich substituiert (6) (Abb. 4).

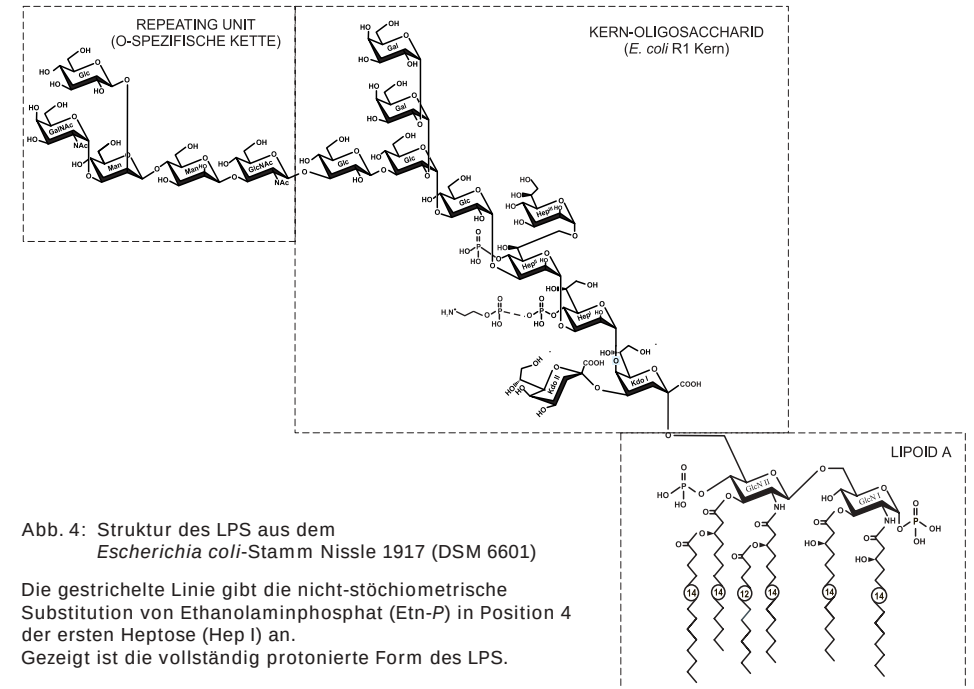


Abb. 4: Struktur des LPS aus dem *Escherichia coli*-Stamm Nissle 1917 (DSM 6601)

Die gestrichelte Linie gibt die nicht-stöchiometrische Substitution von Ethanolaminphosphat (Etn-P) in Position 4 der ersten Heptose (Hep I) an. Gezeigt ist die vollständig protonierte Form des LPS.

Die Struktur der O-spezifischen Kette von *E. coli* DSM 6601 besteht aus nur einer einzigen Basis-Einheit („repeating unit“). Somit handelt es sich um eine S/R-Mutante, eine für Humanisolate äußerst ungewöhnliche Beobachtung.

Bei S/R-Mutanten ist ein Gen, welches für das die „repeating units“ polymerisierende Enzym (Polymerase) kodiert, nicht funktionsfähig oder nicht vorhanden. Als Resultat dieses Defektes wird nur eine „repeating unit“ auf das Kernoligosaccharid übertragen. Die Struktur dieser Oligosaccharid-Einheit der O-Kette entspricht der Determinanten-Ausstattung von *E. coli* O6, wie sowohl unsere chemischen als auch serologischen Analysen zeigten.

Am Beispiel von DSM 6601 konnte für *E. coli* hier erstmals eindeutig bewiesen werden, dass der „reduzierende Zucker“ (GlcNAc) in der ersten Wiederholeinheit β - und nicht, wie in der Wiederholeinheit des Polymers, α -glykosidisch an die Kernregion gebunden ist. Die biologische Bedeutung dieses Strukturmerkmals ist jedoch bislang unbekannt.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Freisetzung von IL-1 und TNF- α in humanen Monozyten bestätigten, dass sowohl das LPS wie auch das Lipoid A die gleichen immunstimulatorischen Aktivitäten aufweisen wie vergleichbare LPS und Lipoid A-Präparate aus Wildtyp-Stämmen von *E. coli*- und *Salmonella*-Spezies. Enterobakterielle S/R-Mutanten sind allgemein keine Krankheitserreger (16).

Die für ein Humanisolat ungewöhnliche Polysaccharid-Struktur des LPS von *E. coli* DSM 6601 erklärt somit die Apathogenität dieser Keime. Die voll ausgeprägte und für *E. coli*-Bakterien typische Lipoid A-Struktur des LPS von DSM 6601 macht andererseits dessen immunstimulatorische Eigenschaften plausibel. Die chemischen Analysen des LPS des Stammes *E. coli* Nissle 1917 haben somit entscheidend zum Verständnis seiner biologischen Eigenschaften beigetragen.

Das Endotoxin-sensitive Signalsystem der Phagozyten-Aktivierung bei Säugern

Bei Säugern erfolgt die durch agonistische LPS-Formen induzierte Aktivierung der myeloischen Zellen der Zirkulation und gewebeassoziiierter Makrophagen primär über ein Signalsystem, das durch das extrazelluläre LPS-Bindungsprotein (LBP), die membranständige Form oder lösliche Isoformen des CD14-Antigens (mCD14 oder sCD14) sowie den neu identifizierten Komplex des *Toll-like receptor* 4 (TLR4) mit dem akzessorischen Protein MD-2 vermittelt wird. Dieses ist auf intrazellulärer Ebene in zentralen Protein-Komponenten wie den Adapterproteinen MyD88 und TRAF6 sowie den Serin/Threonin-Proteinkinasen der Familie IL-1-Rezeptor assoziierter Kinasen (IRAKs), den Signalsystemen der Zytokine IL-1 und IL-18 homolog (Abb. 5) (2,8,9).

Den aktuellen Modellvorstellungen zufolge vermitteln das selektiv an LPS-Aggregate, aber auch an intakte Gram-negative Bakterien bindende LBP und mCD14 oder sCD14 in der Signalaktivierung den gerichteten Transfer von disaggregiertem LPS zu TLR4*MD-2 auf der Phagozyten-Oberfläche. Über einen in den Details noch weitgehend ungeklärten Mechanismus vermittelt dann der durch Endotoxin aktivierte TLR4 oder TLR4*MD-2-Komplex eine sehr schnelle und koordinierte Stimulation intrazellulärer Signalwege. Dies sind vor allem Aktivierungskaskaden für den Transkriptionsfaktor NF- κ B und die drei zentralen Familien Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPKs), die primär die Expression einer Vielzahl von Immunreaktionsgenen induzieren (2).

Der TLR4 repräsentiert das zentrale Transmembran-Signaltransduktionsprotein in der Endotoxin-induzierten Phagozyten-Aktivierung. Evidenzen für diese essentielle Funktion des TLR4 ergaben sich vor allem durch den Nachweis der Identität des *lps*-Gens der klassischen Endotoxin-hyporesponsiven Maus-Stämme C3H/HeJ und C57BL/10ScCr mit dem murinen Gen für den TLR4, das in den LPS-hyporesponsiven Maus-Stämmen spezifische funktional inaktivierende Mutationen aufweist (17,18).

Nach aktuellen Studien sind Polymorphismen in den extrazellulären Domänen des TLR4 für die genetische Determination der individuellen Endotoxin-Sensitivität bei Mäusen und auch beim Menschen verantwortlich (19,20).

Klinische Perspektiven der physiologischen Immunstimulation durch LPS

In der Regel werden 'Endotoxine' im Zusammenhang mit der Pathogenese des septischen Schocks diskutiert. Aus heutiger Sicht erscheint es jedoch zunehmend wahrscheinlich, dass fatale Reaktionen höherer Organismen wie auch des Menschen

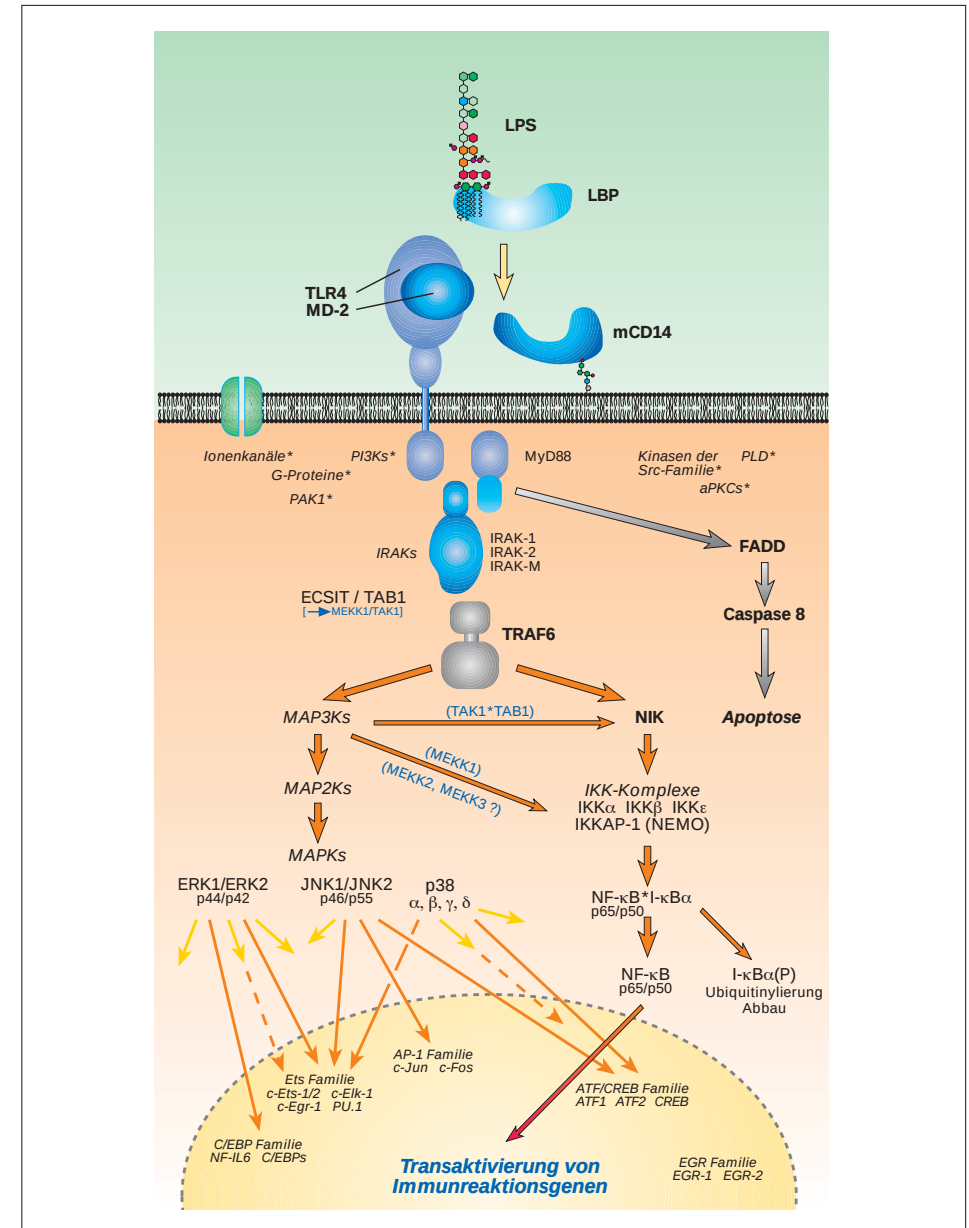


Abb. 5: Das TLR4*MD-2-vermittelte Endotoxin-Signalaktivierungssystem

Nach den aktuellen Modellvorstellungen stimulieren agonistische LPS- oder Lipoid A-Formen über die extrazellulären oder membranständigen Sensorproteine LBP, mCD14 und TLR4*MD-2 unter Mitwirkung der intrazellulären Adapterproteine MyD88 und TRAF6 sowie der Proteinkinasen der IRAK-Familie zentral die Aktivierungskaskaden für den Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie die gezeigten MAP-Kinasen (MAPKs) und induzieren auf diese Weise die Produktion endogener Mediatoren durch die Zielzellen.

auf agonistische LPS-Formen eine seltene Ausnahme darstellen und dass vielmehr eine Betrachtung dieser bakteriellen Wirkstoffe als Vitamin-artige immunstimulatorische Moleküle im Vordergrund stehen sollte.

In der Tat sprechen viele experimentelle Befunde – darunter Untersuchungen an keimfrei gehaltenen Versuchstieren – dafür, dass eine konstitutive minimale physiologische Konzentration an systemischem LPS für eine basale Stimulation des Immunsystems zur Kontrolle mikrobieller oder viraler Infektionen, aber auch maligner Entartung von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang ergab sich in einer aktuellen epidemiologischen Studie, dass höhere Konzentrationen an Endotoxinen in Hausstäuben mit einer signifikanten Reduktion des allergischen Asthmas im Kindesalter einhergehen (21).

In einer Zeit, in der die Chemotherapie von Tumoren oft nicht hinreichend wirksam ist und die Antibiotika-Resistenz pathogener Erreger weltweit ein dramatisch zunehmendes Problem darstellt, ist die Entwicklung innovativer Strategien zur Stärkung des Immunsystems besonders angezeigt. Hier könnte die Applikation geeigneter Endotoxin-Präparationen eine große klinische Bedeutung erlangen. So ist in Übereinstimmung mit den therapeutischen Effekten, die bereits William Coley bei der von ihm entwickelten Vakzin-Behandlung von Sarkom-Patienten beobachtete, heute durch zahlreiche Studien dokumentiert, dass LPS mononukleäre Phagozyten in Zellkultur zu einer selektiven Erkennung und Eliminierung verschiedenster Tumorzellen aktivieren und in Versuchstieren die Regression manifester Tumoren induzieren können (22). Auch der Prototyp einer neuen Klasse von Zytostatika (Taxol®) kann über das TLR4*MD-2-vermittelte Endotoxin-Signalsystem die antineoplastischen Aktivitäten muriner Makrophagen *in vitro* spezifisch stimulieren (23,24).

Eine entsprechende Anwendung agonistischer LPS-Präparate in der Therapie von Krebserkrankungen beim Menschen ist bei intravenöser Verabreichung bislang durch die sehr starken endotoxischen Nebenwirkungen limitiert (25). Eine intradermale Applikation stark agonistischer LPS-Formen ist jedoch einer ersten klinischen Pilotstudie zufolge auch bei sehr hoher Dosierung nur von moderaten endotoxischen Effekten begleitet und kann in Kombination mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid beim Menschen eine Regression manifester Tumoren induzieren (26). Diese intradermale LPS-Applikation gilt heute in Verbindung mit Zytostatika, Zytokinen oder anderen biologischen Immunmodulatoren als sehr aussichtsreicher Ansatz in der Entwicklung neuer onkologischer Therapieformen.

Priv.-Doz. Dr. U. Zähringer

Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie
Parkallee 22
23845 Borstel

Literatur

1. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, Zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schönbeck U, Flad H-D, Hauschildt S, Schade FU, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann R. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1996), 216: 39-81.
2. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial Lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* (2001), im Druck.
3. Rietschel E T, Westphal O. Endotoxin: Historical Perspectives. In: *Endotoxin in Health and Disease* (1999): 1-30. Hrsg.: Brade H, Opal SM, Vogel, SN, Morrison DC, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
4. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol. Ther.* (1994), 64: 529-564.
5. Zähringer U, Lindner B, Rietschel ET. Chemical structure of lipid A: recent advances in structural analysis of biologically active molecule. In: *Endotoxin in Health and Disease* (1999): 93-114, Hrsg.: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
6. Holst O. Chemical Structure of the Core Region of Lipopolysaccharides. In: *Endotoxin in Health and Disease* (1999) Chapter 8, 115-154, Hrsg.: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
7. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* (2000), 343: 338-344.
8. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol* (2000), 12: 20-26.
9. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* (2000), 406: 782-787.
10. Blunk R, Scheel O, Müller M, Brandenburg K, Seitzer U, Seydel U. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: Involvement of a K⁺-channel in transmembrane signaling. *J. Immunol.* (2001), 166: 1009-1015.
11. Preston A, Mandrell RE, Gibson BW, Apicella MA. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* (1996), 22: 139-180.
12. Moran AP, Prendergast MM, Appelmek BJ. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (1996), 16: 105-115.
13. Loppnow H, Brade H, Dürbaum I, Dinarello CA, Kusumoto S, Rietschel ET, Flad H-D. IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *J. Immunol.* (1989), 142: 3229-3238.
14. Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol. Today* (1992), 13: 271-276.
15. Freudenberg MA, Keppler D, Galanos C. Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect. Immun.* (1986), 51: 891-895.
16. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O. Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides with special reference to their lipid A component. *International Review of Biochemistry*, Vol. 14, Biochemistry of Lipids II (1977), 239-335, Goodwin TW. University Park Press, Baltimore USA.
17. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* (1998), 282: 2085-2088.
18. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* (1999), 189: 615-625.
19. Smirnova I, Poltorak A, Chan EKL, McBride C, Beutler B. Phylogenetic variation and polymorphism at the Toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biology* (2000), 1: Research 002.1-002.10 (<http://genomebiology.com>).
20. Arbour NC, Lorenz E, Schütte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* (2000), 25: 187-191.
21. Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* (2000), 355: 1680-1683.
22. Zhang M, Tracey KJ. Endotoxin and cancer. In: *Endotoxin in Health and Disease* (1999): 915-926. Hrsg.: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
23. Mantey CL, Perera PY, Salkowski CA, Vogel SN. Taxol provides a second signal for murine macrophage tumoricidal activity. *J. Immunol.* (1994), 152: 825-831.
24. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse Toll-like Receptor 4*MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* (2000), 275: 2251-2254.
25. Engelhardt R, Mackensen A, Galanos C. Phase I trial of intravenously administered endotoxin (*Salmonella abortus equi*) in cancer patients. *Cancer Res.* (1991), 51: 2524-2530.
26. Goto S, Sakai S, Kera J, Suma Y, Soma GI, Takeuchi S. Intradermal administration of lipopolysaccharide in treatment of human cancer. *Cancer. Immunol. Immunother.* (1996), 42: 255-261.

Probiotika in der Entwicklung von Lebendvakzinvektoren

M. A. Schmidt



Prof. Dr. M. A. Schmidt

Abstract

Die Mukosa der Atemwege, des Gastrointestinal- und des Urogenitaltraktes ist für die allermeisten der eindringenden pathogenen Mikroorganismen das erste Ziel und die erste Barriere zur Aufrechterhaltung der Integrität des Wirtsorganismus. Sinnvoll wäre daher die Abwehr der Erreger unmittelbar auf diesen Grenzflächen, um die Kolonisierung und eine Überwindung der Barriere zu verhindern. Trotzdem werden durch die gegenwärtig eingesetzten Vakzine nahezu ausschließlich systemische Immunantworten induziert. Die Induktion einer mukosalen Immunantwort durch die orale Applikation von Antigenen würde neben dem Schutz der Schleimhäute vor Infektionen zusätzlich eine systemische Immunantwort nach sich ziehen und so erhebliche Vorteile mit sich bringen. Die intensiven Anstrengungen zur Entwicklung von oralen Lebend-Vakzinen konzentrieren sich bisher auf attenuierte mukosale Pathogene (z.B. BCG, *Salmonella*) als mögliche Trägersysteme für oral applizierbare Antigene. Hier muss allerdings durch die Deletion von Virulenzfaktoren eine mögliche Pathogenität dieser Träger ebenso ausgeschlossen werden wie eine eventuelle Reversion zur Virulenz. Diese Schwierigkeiten ließen sich durch den Einsatz von Trägersystemen auf der Basis von kommensalen Mikroorganismen umgehen. Erste Untersuchungen unter Verwendung von Gram-positiven Kommensalen (z.B. *S. gordonii*, *Lactobacillus* spp.) verliefen positiv. Kommensale *E.-coli*-Stämme wurden bisher nur selten und probiotisch wirksame Stämme (z.B. *E. coli* Nissle 1917) noch nicht eingesetzt. Da sich gezeigt hat, dass die Immunantwort gegen sezernierte oder oberflächen-exponierte Antigene bevorzugt induziert wird, sind zur Oberflächenexposition in Gram-negativen Bakterien mehrere unterschiedliche Sekretionssysteme adaptiert worden (Typ I, III und Autotransporter). Erste Untersuchungen zur Verwendung des in unserer Arbeitsgruppe etablierten AIDA-Systems zur Präsentation von heterologen Epitopen in verschiedenen *E.-coli*-Stämmen (K-12, Nissle 1917) zeigten, dass heterologe Proteine und Peptide (LT-B, T-Zell Epitope, His₆) auch in funktioneller Form auf der Oberfläche präsentiert werden können.

Einleitung

Weltweit wird an der Entwicklung von verschiedensten Vakzinen gearbeitet. Die Einbeziehung von Probiotika ist ein neuer Weg, der bislang nur im Ansatz beschritten worden ist. Im Folgenden wird ein Überblick gegeben, wie man sich den Einsatz von Probiotika bei der Vakzineentwicklung vorstellt und welche ersten Erfahrungen dabei vorliegen (1-3).

Unter der Schlagzeile „Vaccines are the Frontiers in Medicine“ auf dem Titelblatt der Zeitschrift „Science“ machten die Herausgeber vor einigen Jahren auf die Bedeutung von Impfstoffen aufmerksam, denn immer noch sterben ca. 30 % der Weltbevölkerung in der Folge von Infektionskrankheiten. Die in diesem Zusammenhang gewählte Darstellung einer Injektionsspritze war allerdings mehr als irreführend. Die Bemühungen in der Entwicklung neuer Vakzine richten sich auf alles andere als auf injizierbare Vakzine, auch wenn alle zur Zeit zugelassenen und verwendeten Vakzine im Prinzip injizierbar sind.

Es besteht ein Bedarf an neuen Vakzinen und es stellt sich die Frage, welche Methoden und Möglichkeiten existieren, um für solche Vakzine eine Akzeptanz in der Bevölkerung zu erreichen. Impfstoffe sollten folgende Charakteristika haben:

- hoch immunogen sein,
- die richtige Art der Immunantwort am richtigen Ort des zu schützenden Organismus hervorrufen,
- gegen die richtigen Antigene wirken,
- wenig Kosten verursachen und
- für den Masseneinsatz verwendbar sein.

In den letzten Jahren hat es viele Aktivitäten in der Impfstoffentwicklung gegeben (4, 5). Die Entwicklung „mukosaler Vakzine“ nimmt dabei einen führenden Platz ein. Zur Verabreichung des jeweiligen Antigens existieren verschiedene Möglichkeiten, so z.B. in Kombination mit Lebendvektoren, essbaren Pflanzen oder synthetischen Vakzinen, die oral aufgenommen werden können.

Intensiv wird an der Stimulation der zellulären Immunantwort geforscht, zum Teil durch Vakzinierung mit dendritischen Zellen. Ebenfalls untersucht werden mukosale und transdermale Applikationswege sowie Möglichkeiten der Herstellung von DNA-Vakzinen. Geprüft wird auch der Einsatz von CpG-Sequenzmotiven (Cytosin-Phosphat-Guanosin) z.B. als Adjuvantien. Diese Bestandteile bakterieller DNA sind potente Aktivatoren des Immunsystems.

Vorteile der oralen Applikation von Vakzinen

Innerhalb des menschlichen Organismus sind die verschiedensten Oberflächen zu schützen. Dazu gehören z.B. die Haut mit ca. 2 m², die Lunge mit ca. 80 m² und der Gastrointestinaltrakt mit ca. 300 m² Oberfläche.

Da alle diese Oberflächen mikrobiell besiedelt sind, müssen sie durch ein effektives Immunsystem geschützt werden. Unter dem Begriff MALT (= Mucosa associated

lymphoid tissue) werden induktive Anteile sowie Effektor-Zellen des Immunsystems zusammengefasst, zu dem der Waldeyersche Ring mit den Tonsillen und lymphatisches Gewebe des Respirations-, des Gastrointestinal- und des Urogenitaltraktes gehören.

Bei einer oralen Gabe von Fremdanthigenen wird eine Immunantwort im Gewebe fast aller Oberflächen des MALT induziert, sogar ausstrahlend bis hin zu den Tränen-drüsen, dem Mittelohr und dem Urogenitaltrakt (4). Deswegen ist die Entwicklung von Vakzinen sinnvoll, die

- oral verabreicht werden können,
- eine relativ lange Verweildauer im Gastrointestinaltrakt haben und
- Antigene präsentieren, die das mukosale Immunsystem erkennt.

Eine solche Vakzine müsste dann eine Immunantwort auslösen, die zwar lokal am stärksten ausgeprägt wäre, aber zusätzlich auf allen sekretorischen Oberflächen zur Erregerabwehr dienen würde. Eine solche Reaktion ist deswegen zu erwarten, weil es sich beim MALT um ein zwar kompartimentiertes, aber in den verschiedenen Organen miteinander in Verbindung stehendes Immunsystem handelt.

Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes stellt die erste Barriere gegen pathogene Keime dar. Wird durch eine orale Applikation von Impfstoffen diese Barriere gestärkt und gelingt es dadurch, Keime direkt abzufangen und zu eliminieren, kann eine Infektion wirkungsvoll verhindert werden. Durch die Stimulation des MALT wird gleichzeitig eine systemische Immunantwort ausgelöst, wodurch spezifisch auch solche Infektionserreger bekämpft werden, die die mukosale Barriere überwunden haben. Bei einer systemischen Immunisierung findet sich im Gegensatz dazu nur selten auch eine mukosale Immunantwort. Weitere Vorteile der oralen Applikation eines Impfstoffs zur mukosalen Stimulation sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

einfache Applikation durch Schlucken der Präparation
keine besondere Logistik notwendig
niedrige Kosten
kein Infektionsrisiko wie z.B. bei Nadelstich

Tab. 1: Vorteile der oralen Applikation von Impfstoffen

Suche nach geeigneten Vektoren für die orale Immunisierung

Um eine Immunreaktion auszulösen, sollte ein Antigen möglichst effizient an die Oberfläche der Enterozyten bzw. der Peyerschen Plaques gelangen. Dazu gibt es die verschiedensten Möglichkeiten. Neben der Gabe „nackter“ oder „verpackter“ DNA ist der Einsatz lebender Carrier möglich. Dazu gehören z.B. attenuierte pathogene *Salmonella*- oder *Shigella*-Stämme oder kommensale Bakterien wie z.B. der *E.-coli*-Stamm Nissle 1917 oder *Streptococcus gordonii*. Verwendet werden auch Liposomen in Kombination mit z.B. der Cholera-toxin B Untereinheit, um gezielt die M-Zellen der Peyerschen Plaques zu erreichen.

Die kostengünstigste Alternative sind lebende Carrier, die gleich mehrere Vorteile aufweisen. Sie lösen schon auf der ersten Stufe der Barriere eine Immunantwort aus, führen als selbstreplizierende Carrier zu einer kontinuierlichen Antigenpräsentation und können gleichzeitig verschiedene Antigene präsentieren. Diese letzte Eigenschaft hängt davon ab, wie man den Vektor konstruiert. Eventuell ist durch die geeignete Wahl eines Stammes auch eine temporäre Kolonisierung möglich. Die Massenproduktion solcher leicht zu applizierenden Impfstoffe sollte preiswert und die Lagerung einfach sein. Mit dem Wegfall einer Kühlkette, die bei den herkömmlichen Vakzinen einen Großteil der Kosten verursacht, wird dieses Ziel erreicht.

Bisher sind erhebliche Anstrengungen unternommen worden, um mukosale Pathogene so abzuschwächen, dass sie mehr oder weniger gefahrlos für die orale Applikation eingesetzt werden können. Es existieren bislang nur relativ wenige Beispiele, in denen kommensale Mikroorganismen aus dem betreffenden Zielorgan selbst für solche Zwecke eingesetzt wurden.

Ein Vorteil attenuierter Pathogene besteht darin, dass sie wahrscheinlich immer eine mukosale Immunantwort initiieren. Auf der anderen Seite bleibt die Ungewissheit, ob wirklich sämtliche Virulenzfaktoren deletiert worden sind. Auch die Akzeptanz in der Bevölkerung ist fraglich. Nicht jeder nimmt freiwillig Salmonellen zu sich. Diese Nachteile weisen Kommensale nicht auf. Sie können den Darm sehr gut kolonisieren und müssen nicht erst attenuiert werden, da sie keine Virulenzfaktoren besitzen bzw. *per definitionem* apathogen sind. Es besteht eine hohe Akzeptanz, wie sie auch von Mutaflor® bekannt ist. Die Frage ist, ob diese Kommensale in der Lage sind, am richtigen Ort eine Immunantwort gegen die gewünschten Antigene auszulösen.

Anforderungen an ideale Lebendvektoren für die orale Immunisierung

Ideale Lebendvakzinvektoren für die orale Applikation sollten eine Reihe von Eigenschaften besitzen (siehe Tab. 2). Nebenbei kommt diesen Vektoren manchmal eine nahrungsmittelartige Bedeutung zu. Das betrifft vor allem Laktobazillen, ist aber im Zusammenhang mit der Entwicklung von probiotischen Lebendvakzinen von geringer Bedeutung.

Zugehörigkeit zur Gruppe der GRAS-Mikroorganismen (GRAS = generally recognized as safe), d.h. Fehlen jeglicher pathogener Eigenschaften
Anwendung beim Menschen ist bereits ohne Nachteile erfolgt
„Eingebauter“ Adjuvaneffekt
Als Kommensaler bzw. Probiotikum gute Kolonisierung im Darm über eine gewisse Zeitspanne
Unterdrückung intestinaler Infektionserreger
generelle Stimulation der Immunantwort
schwache Antikörperantwort gegen Vektorkomponenten

Tab. 2: Eigenschaften idealer Lebendvakzinvektoren für die orale Applikation, modifiziert nach (6)

Probiotika als Lebendvakzinvektoren

Probiotische Arzneimittel haben eine Reihe von Eigenschaften, die für ihren Einsatz in der Medizin von Bedeutung sind. So zeigen sie eine Vielzahl von Stoffwechselaktivitäten, kommunizieren sowohl untereinander als auch mit den Enterozyten, denen sie wertvolle Substrate zur Ernährung liefern. Sie verdrängen Pathogene und stimulieren die Immunzellen im Gastrointestinaltrakt, womit sie Einfluss auf den Gesamtorganismus ausüben (6).

Bislang wurden Probiotika oder Kommensale eher selten für die Entwicklung von Lebendvakzinvektoren eingesetzt (7, 8). Ein *Lactococcus lactis* Stamm wurde so verändert, dass er IL-10 sezerniert. Er führte dann im Mausmodell bei der Colitis ulcerosa durch Expression von IL-10 zur Reparatur der geschädigten Mikrovilli der Enterozyten (9). *Streptococcus gordonii* konnte so rekombiniert werden, dass er heterologe Antigene mit Hilfe der M-Proteine auf der Oberfläche exprimiert und dadurch eine Immunantwort induziert (10).

Ein Lebendvakzinvektor auf der Basis von Gram-negativen Bakterien wie z.B. *E. coli* Stamm Nissle 1917 ist wesentlich wirksamer, wenn er Antigene auf seiner Oberfläche präsentiert bzw. sie sezerniert, als wenn sie sich im Zytosol befinden (11). Um Antigene auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien präsentieren zu können, muss eine im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien viel komplexere Zellwand überwunden werden. Das bedeutet, dass der Transport für ein im Zytosol synthetisiertes Antigen bis an die Zelloberfläche wesentlich komplexer ist. Für solche Vakzine sind derzeit 4 prinzipiell unterschiedliche Transportsysteme bekannt (siehe Abb. 1).

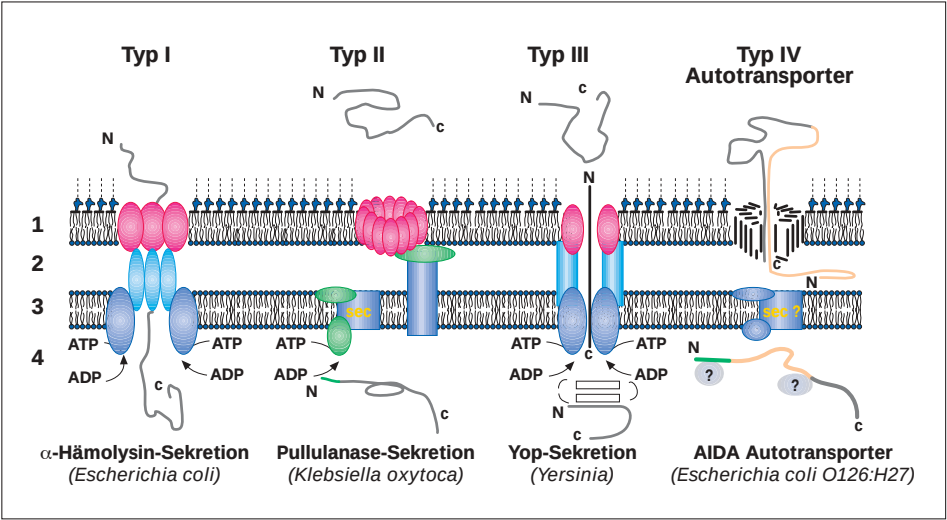


Abb. 1: Sekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien (modifiziert nach 12).
1: äußere Membran 2: Periplasma 3: innere Membran 4: Zytosol

- Typ I: Ein C-terminal lokalisiertes Transportsystem kann heterologe Antigene auf die Oberfläche verschiedener Gram-negativer Bakterien sezernieren. Die Antigene bleiben an die Membran gebunden. Bekanntester Vertreter dieses relativ komplexen Systems ist das α -Hämolysin bestimmter *E.-coli*-Stämme.
- Typ II: Sekretionsmechanismus, der zur Freisetzung des Antigens führt.
Beispiel: Pullulanase-Sekretion in *Klebsiella oxytoca*
- Typ III: Sekretionsmechanismus, der auch „molekulare Spritze“ genannt wird, weil es mit ihm möglich ist, Effektorproteine in Zielzellen zu injizieren und definierte Folgeaktionen auszulösen.
Beispiel: Yop-Sekretion von Yersinien
- Typ IV: Autotransporter-System, welches im Gegensatz zu allen anderen nur eine einzige Polypeptidkette für den Transport durch das Periplasma benötigt. Bekannt ist eine ganze Familie solcher Autotransporter-Systeme, die auf der Oberfläche ganz unterschiedliche funktionelle Proteine tragen können, z.B. Adhäsine, Proteasen oder Toxine.
Beispiel: AIDA-Protein aus *E. coli* O126:H27

Autotransporter „AIDA“

Ein spezifischer Autotransporter wurde „AIDA“ (AIDA = adhesin involved in diffuse adherence) genannt (2). Es handelt sich um ein plasmid-kodiertes Zwei-Gen-System und besteht aus einem modifizierten Enzym aus dem Zytoplasma und einem relativ großen Gen, dass für ein Prä-Pro-Protein von 1286 Aminosäuren kodiert. Dieses Protein wird beim Transport durch die Membran C-terminal prozessiert und ist der Translokator, der den „Passagier“ nach außen transportiert. Das Protein wird zunächst im Zytoplasma produziert, gelangt dann wahrscheinlich sec-abhängig in das Periplasma, inseriert an der C-terminalen Komponente, wird – vermutlich autokatalytisch – gespalten und setzt entweder den „Passagier“ frei oder – im Falle des Adhäsins – bindet ihn an der Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen.

Mit der Verwendung des AIDA-Systems bestehen grundsätzlich drei unterschiedliche Möglichkeiten, heterologe Antigene an der Oberfläche Gram-negativer Bakterien wie *E. coli* Stamm Nissle 1917 zu präsentieren:

1. Präsentation ohne Spaltung, d.h., ein heterologes Protein ist mit dem Transporter kovalent verbunden
2. durch Autokatalyse wird das Antigen in das Medium abgegeben
3. Präsentation mit Spaltung und Verbleib an der Oberfläche

Beispiele für die Präsentation heterologer Antigene auf der Oberfläche von *E. coli*

Ein Proteinfsegment aus *Mycobacterium tuberculosis*, das sogenannte Mcep 84-155 (= Mycobacterium cell entry protein) (13) trägt mit dazu bei, dass *M. tuberculosis* in Zielzellen eindringen kann. Verschiedene Transportsysteme können zur Präsentation von Mcep 84-155 auf der Oberfläche von z.B. *E. coli* genutzt werden. Diese so modifizierten Bakterien können in Epithelzellen eindringen. Der elektronen-mikroskopische Nachweis erfolgte beispielhaft für HeLa-Zellen als Modell. Das bedeutet, dass auch die funktionelle Expression von Peptid- oder Proteinfsegmenten mit Hilfe solcher Systeme auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien möglich ist.

Auch immunologisch relevante Peptide können auf der Oberfläche von *E. coli* Stamm Nissle 1917 präsentiert werden. So wurden T-Zell-Epitope von *Yersinia enterocolitica* (HSP-60) entweder allein oder als Dimer bzw. Trimer auf der Oberfläche dieser Bakterien exprimiert (2). Dadurch konnten spezifische T-Zell-Klone zur Proliferation angeregt werden, was bedeutet, dass der T-Zell-Rezeptor diese T-Zell-Epitope auf den Bakterien erkennt.

Zusammenfassung

Mit Hilfe von Autotransporter-Systemen können Vektoren zur Oberflächen-Präsentation oder Sekretion protektiver Antigene konstruiert werden, die in Kombination entweder mit einem probiotischen Stamm wie *E. coli* Stamm Nissle 1917 oder mit einem avirulenten Pathogen wie *Salmonella* oder *Shigella* als Carrier zur Entwicklung von Lebendvakzinen führen können. Damit ist auch eine humane Applikation grundsätzlich möglich. Von Vorteil ist die Möglichkeit, ein oder mehrere Polypeptide (z.B. protektive Antigene) gleichzeitig applizieren zu können.

Prof. Dr. M. A. Schmidt

Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE)
Institut für Infektiologie
Westfälische Wilhelms-Universität
Von-Esmarch-Str. 56
48149 Münster

Literatur

1. Autenrieth IB, Schmidt MA. Bacterial interplay at intestinal mucosal surfaces: implications for vaccine development. Trends Microbiol 2000;8:457-464.
2. Konieczny MPJ, Suhr M, Noll A, Autenrieth IB, Schmidt MA. Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;27:321-332.
3. Rautenberg K, Cichon C, Schmidt MA. Towards targeting strategies for oral immunization-identification of marker antigens in rat M cells. Behring Inst Mitt 1997;361-375.
4. Russell MW, Martin MH, Wu HY, Hollingshead SK, Moldoveanu Z, Mestecky J. Strategies of immunization against mucosal infections. Vaccine 2000;19 Suppl 1:S122-S127.
5. Mestecky J, Michalek SM, Moldoveanu Z, Russell MW. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. Behring Inst Mitt 1997;33-43.
6. Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek 1999;76:279-292.
7. Maassen CBM, Laman JD, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FJ, van Holten-Neelen JCPA, Hoogteijlong L, Antonissen C, Leer RJ, Pouwels PH, Boersma WJA, Shaw DM. Instruments for oral-disease intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. Vaccine 1999; 17:2117-2128.
8. Zegers ND, Kluter E, van der Stap H, van Dura E, van Dalen P, Shaw M, Baillie L. Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. J Appl Microbiol 1999; 87:309-314.
9. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. Science 2000; 289:1352-1355.
10. Medaglini D, Pozzi G, King TP, Fischetti VA. Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:6868-6872.
11. Hess J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann SHE. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1458-1463.
12. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol Biol Rev 1998; 62:379-433.
13. Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, Lu S, Cohen-Gould L, Riley LW. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. Cell Microbiol 2001; 3:247-254.

Darmökologie

Vorsitzende:



Prof. Dr. H. Hahn



Prof. Dr. B. Wiedemann

Antagonistische Prinzipien und Eisentransportsysteme von *Escherichia coli*: Bedeutung für Ökologie und Pathogenität

J. Heesemann

Wie Bakterien kommunizieren: Quorum sensing und Crosstalk in bakteriellen Lebensgemeinschaften

J. Hacker

Das darmassoziierte Immunsystem: Grundlagen und Bedeutung für Wirt-Erreger-Interaktion

I. B. Autenrieth

Ökologie der Antibiotikaresistenz

G. Werner

Antagonistische Prinzipien und Eisentransportsysteme von *Escherichia coli*: Bedeutung für Ökologie und Pathogenität

J. Heesemann, S. Schubert¹



Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Abstract

Die Darmflora des Menschen stellt ein komplexes Ökosystem unterschiedlicher Mikroorganismen dar. In Koevolution mit dem Menschen haben Bakterien, aber auch Protozoen und Pilze, eine Vielzahl von Faktoren herausgebildet, um sich an diese ökologische Nische anzupassen und gegen konkurrierende Mikroorganismen durchzusetzen. Für *Escherichia coli* als einen wichtigen bakteriellen Darmbesiedler sind eine Reihe solcher „Fitnessfaktoren“ beschrieben, unter anderem die Expression antagonistisch wirksamer Moleküle und Systeme zur Sicherstellung des Eisenbedarfs. So sind einzelne *E. coli*-Stämme in der Lage, keimhemmende bzw. -abtötende Faktoren, sog. Bakteriozine oder Mikrozine, zu produzieren, gegen die die Stämme selbst unempfindlich sind. Hierbei handelt es sich in der Regel um niedermolekulare Peptide. Als Stoffwechselprodukte werden auch kurzkettige Fettsäuren von *E. coli*-Stämmen sezerniert, die antagonistische Effekte auf das Wachstum anderer säureempfindlicher Erreger bewirken. Die Eisenaufnahmekapazität stellt einen weiteren wichtigen Faktor für die „Durchsetzungsfähigkeit“ eines Bakteriums im Ökosystem Darm dar. Die Produktion kleiner Eisenionen-bindender Moleküle (Siderophore), wie Enterochelin, Aerobaktin und das von Yersinien bekannte Yersiniabaktin, das auch bei *E. coli* vorkommt, lässt solche *E.-coli*-Isolate auch unter starkem Eisenmangel wachsen. Während Enterochelin bei allen *E.-coli*-Stämmen nachweisbar ist, sind Aerobaktin und Yersiniabaktin akzessorische Systeme, die offenbar die Wachstumseigenschaften mancher *E.-coli*-Isolate zusätzlich verbessern.

E. coli Stamm DSM 6601 als Wirkstoff des Präparates Mutaflor® zeigt in vitro und in vivo gegenüber einzelnen Stämmen unterschiedlicher Bakterienspezies antagonistische Aktivität. Unter den Isolaten, die durch *E. coli* DSM 6601 gehemmt werden, sind auch Vertreter von Salmonellen und Shigellen, die als Enteritiserreger bekannt sind. Verantwortlich für die antagonistischen Aktivitäten sind offenbar o.g. Eigenschaften. So bildet *E. coli* Stamm DSM 6601 verschiedene Mikrozine, unter diesen ein in der Literatur bislang noch nicht beschriebenes Mikrozin. Des Weiteren produziert der Mutaflor®-Stamm die für die Eisenaufnahme wichtigen Siderophore Aerobaktin, Enterobaktin, das nicht näher charakterisierte Colibaktin sowie Yersiniabaktin. Die Yersiniabaktin-kodierende DNA-Region wurde in unserem Labor molekular-genetisch analysiert und ist möglicherweise auch für die ausgeprägte Kolonisierungsfähigkeit des *E. coli*-Stammes DSM 6601 mitverantwortlich. Überdies ist der Stamm in der Lage, kurzkettige Fettsäuren zu sezernieren, hauptsächlich Formiat und Acetat, aber auch Propionat und Butyrat. Diese kurzkettigen Fettsäuren scheinen nicht nur für einen Teil der antagonistischen Aktivität gegen andere Keime, sondern auch für die Eutrophie des Darmepithels von Bedeutung zu sein. Bei der Produktion der Fettsäuren ergeben sich Expressionsunterschiede zwischen anaerobem und aerobem Wachstum, was auf die sauerstoffabhängige Regulation einzelner Stoffwechselwege zurückzuführen ist. Insgesamt zeichnet sich der *E.-coli*-Stamm DSM 6601 durch Stoffwechseleigenschaften aus, die seine Fähigkeit zum Besiedeln des Intestinaltraktes unterstützen dürften, ohne ihm pathogene Merkmale zu verleihen.

¹ Der Vortrag wurde vertretungsweise von Herrn Prof. J. Hacker gehalten.

Einführung

Die Darmflora des Menschen stellt ein komplexes Ökosystem dar, in dem unterschiedliche Mikroorganismen miteinander und mit dem Wirt leben und überleben müssen. Eine Kolonisierung dieser ökologischen Nische gelingt insbesondere den Mikroorganismen, die sich am besten sowohl gegen Konkurrenten (andere Bakterien, Pilze oder Protozoen) durchsetzen als auch erfolgreich den spezifischen und unspezifischen Abwehrfaktoren des Wirtes widersetzen können. Die im darwinistischen Sinne „fittesten“ Mikroorganismen bilden erfolgreiche antagonistische Prinzipien aus, mit Hilfe derer sie konkurrierende Darmbewohner verdrängen. Dazu gehören beispielsweise die Produktion keimhemmender bzw. -abtötender Bakteriozine, Mikrozine und kurzkettiger Fettsäuren. Ein weiterer Wachstumsvorteil wird durch die bessere Versorgung mit essentiellen Faktoren wie Fe^{III} geschaffen. Für *Escherichia coli* als einen wichtigen bakteriellen Darmbesiedler sind sowohl antagonistische Prinzipien als auch verschiedene Eisenaufnahmesysteme beschrieben, die die Anpassungs- und Konkurrenzfähigkeit dieses Bakteriums in der Darmflora bewirken.

Eisenversorgungssysteme von *Escherichia coli*

Unter aeroben Bedingungen und neutralem pH-Wert liegt Eisen in Form schwerlöslicher dreiwertiger Fe^{III}-Komplexe vor. Die Konzentration freier Eisenionen liegt mit 10⁻¹⁸ mol/l deutlich unter der Grenze, die für das Wachstum von Bakterien notwendig ist. Für im menschlichen Körper befindliche Bakterien wird dieser Eisenmangel durch körpereigene Eisenbindungsproteine wie Laktoferrin an den Schleimhäuten und Transferrin im Blut zusätzlich verstärkt.

Kommensale und pathogene Keime benötigen deshalb wirkungsvolle Eisenaufnahmesysteme, um sich im Ökosystem Mensch anzusiedeln. Stämme der Gattung *Escherichia coli* besitzen mehrere Eisenaufnahmesysteme.

Enterochelin

E. coli produziert kleine, hochaffine Fe^{III}-bindende Chelatormoleküle, sogenannte Siderophore (3). Alle *E. coli*-Stämme bilden unter Eisenmangel das Katecholatsiderophor Enterochelin (Synonym: Enterobaktin). Dieses wird in das umgebende Medium abgegeben und bindet dort Fe^{III}. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt energieabhängig über einen spezifischen Membranrezeptor (FepA) und integrale Membranproteine (2). Enterochelin besitzt eine sehr starke Eisenbindungsaffinität und kann selbst wirtseigenen Eisenbindungsproteinen (Transferrin und Laktoferrin) Fe^{III} entziehen.

Aerobaktin

Das Hydroxamat-Siderophor Aerobaktin wird von einzelnen *E. coli*-Stämmen produziert, bevorzugt bei humanadaptierten und humanpathogenen Isolaten. Aerobaktin wird über den äußeren Membranrezeptor IutA aufgenommen, der gleichzeitig auch den Rezeptor für das Colicin Cloacin DF13 darstellt.

Hämin und Hämprodukte

Einige *E. coli*-Stämme sind in der Lage, das wirtseigene Eisenreservoir zu nutzen, indem sie Hämin und Hämprodukte aufnehmen und das dort gebundene Eisen verwerten (17).

Citrat-System

Über die Aufnahme von Citrat kann *E. coli* Eisenionen im Cotransport aufnehmen. Die Bedeutung dieses Transportweges für die Eisenversorgung ist noch unklar. Eisen-Citrat scheint vielmehr durch die Bindung an das Rezeptorprotein FecA eine Signaltransduktion über die Bakterienwand zu vermitteln (6).

Nutzung exogener Siderophore anderer Bakterien oder Pilze

Darüber hinaus besitzen *E. coli*-Stämme zahlreiche zusätzliche Siderophor-Transportsysteme, die der Aufnahme fremder, exogener Siderophore anderer Bakterien oder Pilze dienen. Dazu werden unter Eisenmangel verschiedene Siderophorrezeptoren in der äußeren Bakterienmembran gebildet, welche die Eisenaufnahme durch entsprechende Fe^{III}-Siderophore vermitteln (siehe Tab. 1).

Siderophor	<i>E. coli</i> Rezeptorprotein
Katecholats-gebundenes Fe ^{III}	Cir
Ferrichrom	FhuA
Fe ^{III} -Coprogen	FhuE
Ferrioxamine	FoxA

Tab. 1:
Siderophore und
ihre Rezeptoren

So kann sich *E. coli* als „Siderophor-Schmarotzer“ in entsprechenden Mischkulturen ohne größeren Biosynthesaufwand für Siderophore mit Eisen versorgen. Die Fe^{III}-Aufnahme durch die äußere Zellmembran wird durch die spezifische Affinität der Rezeptoren zu ihren jeweiligen Siderophoren vermittelt und ist an einen osmotischen Gradienten gekoppelt. Der Transport durch die innere Bakterienmembran erfolgt ATP-abhängig durch Hydrolyse des energiereichen Triphosphats an cytoplasmatischen Domänen integraler Membranproteine (ABC-Transporter). Im periplasmatischen Raum haben Bindeproteine eine unterschiedliche Affinität zu den einzelnen Siderophoren.

Fur-regulierte Gene:wichtig für Siderophor-Transportsysteme und Virulenzfaktoren

Ein spezifisches Siderophor-Sensorsystem ermöglicht über differentielle Genregulation die optimale Ausnutzung der Aufnahme von Fremdsiderophoren. Zentrale Bedeutung bei der Siderophor-Regulation kommt dem Regulatorprotein Fur zu. Dieses bildet als Apo-Repressor in Anwesenheit ausreichender Eisen-Ionen mit diesen einen Tetramerkomplex, der dann als vollständiger Repressor (Holo-repressor) die Synthese Fur-regulierter Gene unterdrückt (5).

Zu diesen Fur-regulierten Genen zählen neben den erwähnten Siderophor-Transportsystemen sowie anderen an der Eisenaufnahme beteiligten Genen auch eine Vielzahl bakterieller Virulenzfaktoren. Dazu gehören u. a. auch Toxine, die erst bei Eisenmangel produziert werden. Beispiele sind das Shiga-Toxin (STX-1) der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), das STX von *Shigella dysenteriae* und das Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae*. Eisenmangel ist typisch für menschliche Schleimhäute. Die Regulation der Toxinproduktion erfolgt auch hier über einen Fur-Fe^{III}-Komplex, der im Promoterbereich der jeweiligen Gene an die DNA bindet und deren Expression unterdrückt (10).

Eisenmangel signalisiert dem Bakterium den Eintritt in den Wirtsorganismus und ruft als bakterielle Antwort die Bildung von Eisenaufnahmesystemen und Virulenzfaktoren hervor. Diese enge Vernetzung der Regulation von Eisenaufnahme- und Virulenzgenen unterstreicht die ökologische Bedeutung der Eisenaufnahmesysteme.

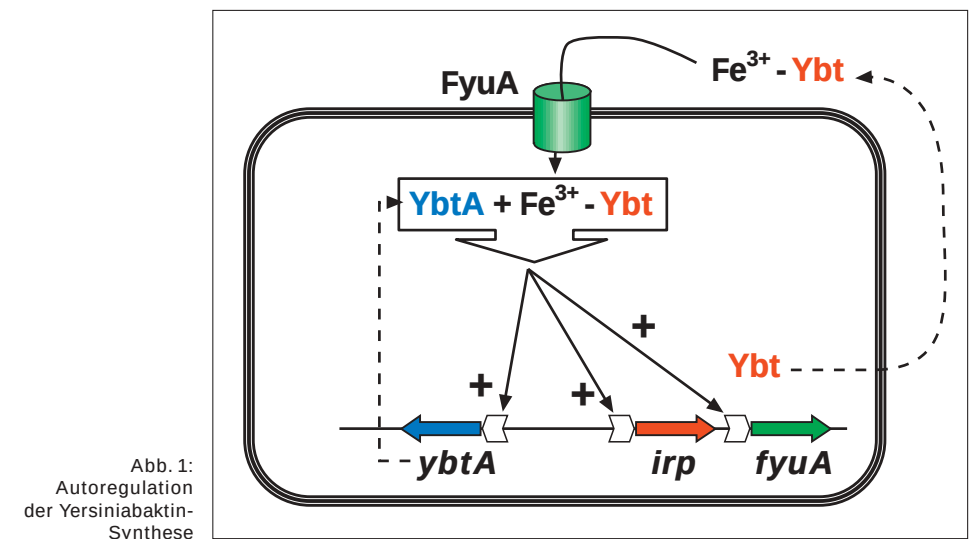
Eisenversorgungssysteme von *E. coli* Stamm DSM 6601 (Nissle 1917)

Der *E. coli*-Stamm DSM 6601 bildet gleich mehrere Eisenversorgungssysteme aus. Dazu gehören die Siderophore Enterochelin (Enterobaktin) und Aerobaktin. Letzteres wird von 30% aller apathogenen Darmbakterien gebildet, aber auch von vielen pathogenen *E. coli*-Stämmen.

Zusätzlich ist der *E. coli*-Stamm DSM 6601 unter Eisenmangelbedingungen in der Lage, das Yersiniabaktin als drittes Siderophor zu synthetisieren. Es gibt Hinweise, dass dieser Stamm ein weiteres, bisher nicht näher charakterisiertes Eisenaufnahmesystem produziert, das sogenannte Colibaktin. Möglicherweise ist aber das Colibaktin mit dem Yersiniabaktin identisch. Das Gencluster, das für das Yersiniabaktin-Siderophorsystem kodiert, ist nahezu identisch mit der aus Yersinien bekannten DNA-Region. Es lässt sich als Fitnessfaktor (DNA-Insel) auffassen und resultiert aus horizontalem Transfer auf den *E. coli*-Stamm DSM 6601, aber auch auf andere apathogene *E. coli*-Stämme (16). Die Regulation des Siderophorsystems erfolgt neben dem bekannten Fur-Protein über das YbtA-Regulatorprotein, das auf dem Yersiniabaktin-Gencluster lokalisiert ist (7). Dem YbtA fällt die Rolle des positiven Regulators zu, der die Expression des Yersiniabaktin-Systems verstärkt (Abb. 1).

Neben diesen Siderophorsystemen konnte bei *E. coli*-Stamm DSM 6601 ein Hämin/Hämoglobin-Aufnahmesystem nachgewiesen werden (ChuA). Dieses findet sich bei allen *E. coli*-Stämmen der phylogenetischen Gruppen B2 und D (4). Diese Gruppen setzen sich aus humanadaptierten, apathogenen und pathogenen Stämmen mit starker Durchsetzungsfähigkeit im Ökosystem des menschlichen Darms zusammen.

Die ausgeprägte antagonistische Wirkung von *E. coli* Stamm DSM 6601 beruht sicher auch auf den mindestens drei endogenen Siderophorsystemen und weiteren Eisenaufnahmesystemen. Im Konkurrenzkampf um Eisen im Ökosystem Darm scheint der



E. coli-Stamm DSM 6601 durch seine sehr gute Eisenaufnahme Vorteile gegenüber anderen apathogenen und pathogenen Mikroorganismen zu haben und prädestiniert ihn dazu, sich innerhalb der Darmflora durchzusetzen.

Es stellt sich aber auch die Frage, weshalb der *E. coli*-Stamm DSM 6601 neben dem hochaffinen Enterochelin-System das Yersiniabaktin-System als zweites hochaffines Siderophorsystem besitzt und welche weiteren Funktionen das Yersiniabaktin hat. Erste Untersuchungsergebnisse im Tiermodell deuten darauf hin, dass das Yersiniabaktin-System direkt an der Kolonisierungsfähigkeit des Darms beteiligt zu sein scheint (Abb. 2).

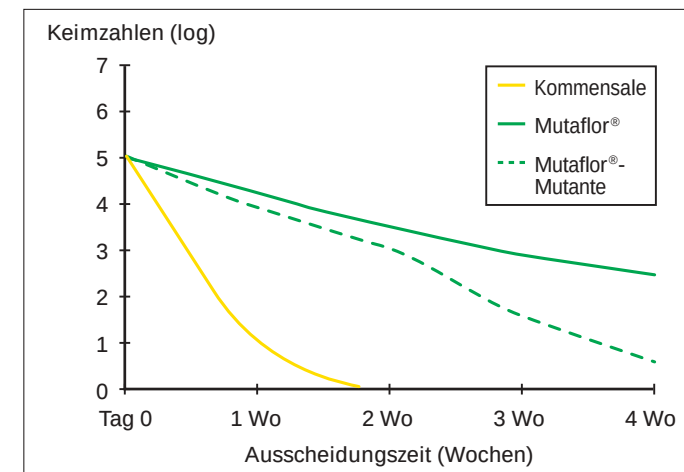


Abb. 2: Eine genetisch veränderte Mutante von *E. coli* Stamm DSM 6601, dem das Yersiniabaktin-System fehlt, kann den Mäusedarm schlechter kolonisieren als Mutaflor®. Jeweils einmalige Applikation des Testkeims.

Antagonistische Prinzipien von *Escherichia coli*

Die Durchsetzungsfähigkeit eines Bakteriums in einem Ökosystem wird neben verschiedenen Eisenversorgungssystemen durch weitere Faktoren beeinflusst. Dazu gehören Substanzen, die Vertreter der gleichen Art oder auch andere Bakterienspezies in ihrem Wachstum hemmen oder sogar abtöten können. Diese antibakteriellen Substanzen werden Bakteriozine oder, wenn es sich um kleine Moleküle handelt, Mikrozine genannt (1, 8, 9, 11-15).

Es handelt sich um Peptide, die plasmidal oder chromosomal kodiert sind. Sie werden als unreife Vorstufen synthetisiert und erhalten erst nach posttranslationaler Modifikation (Prozessierung) ihre Funktionsfähigkeit. Eine Vielzahl verschiedener Bakteriozine und Mikrozine ist bekannt. Einzelne Stämme können mehrere dieser antagonistischen Moleküle produzieren; dazu gehört auch *E. coli* Stamm DSM 6601.

Gemeinsames Merkmal der Bakteriozine und Mikrozine ist das enge Spektrum der Zielorganismen. Es sind dies oftmals Vertreter der eigenen Spezies oder eng verwandter Arten. Zielstrukturen für die Bakteriozin-/Mikrozin-Wirkung sind Proteine in der Zellwand dieser Organismen, die gleichzeitig auch Rezeptoren für Siderophore sowie Bakteriophagen darstellen. Um nicht selbst abgetötet zu werden, bilden die Bakterien gleichzeitig Immunitätsproteine, die von Genen desselben Mikrozin-/Bakteriozin-Genclusters kodiert werden. Die Resistenz oder Sensitivität gegenüber bestimmten, von anderen Mikroorganismen produzierten Bakteriozinen bzw. Mikrozinen ist für die ökologische Balance wichtig.

Antagonistische Prinzipien von *E. coli* Stamm DSM 6601 (Nissle 1917)

Für den *E. coli*-Stamm DSM 6601 konnten in vitro antagonistische Wirkungen gegenüber verschiedenen Bakterien und Pilzen nachgewiesen werden. Dazu gehören enterotoxische *E. coli* (ETEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sowie Stämme von *Salmonella enterica* Serotyp *Enteritidis* und Serotyp *Typhimurium*, aber auch Sprosspilze der Candidagruppe (Abb. 3).

Der *E. coli*-Stamm DSM 6601 ist gegenüber der Wirkung *E. coli*-abstammender Bakteriozine (Colicine) der Klassen Ia, BM, D, V, E1 und E2 resistent. Dagegen ist der Stamm sensitiv gegenüber einer Reihe weiterer Bakteriozine.

E. coli Stamm DSM 6601 produziert keines der bekannten und schon charakterisierten Colicine, sondern ein bisher noch nicht näher bestimmtes Colicin. Diese Colicinbildung wird durch Eisenmangel stimuliert, was auf eine „Stress-induzierte“ Produktion schließen lässt.

Außerdem wurde bei *E. coli* Stamm DSM 6601 ein kleines, antibakteriell wirkendes Molekül entdeckt. Diese als „Mutafloricin“ bezeichnete Substanz könnte mit der Aminosäure Valin oder einem Valin-Analogon identisch sein. Ein Beleg dafür ist die

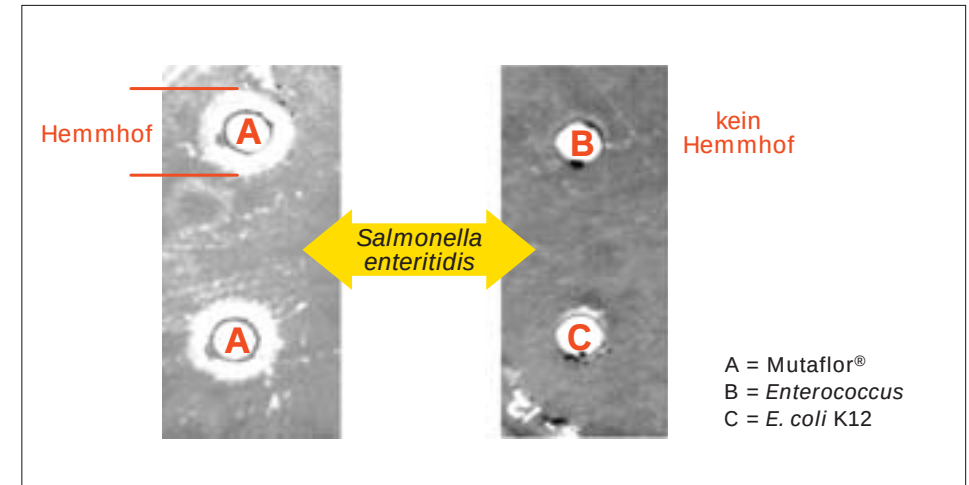


Abb. 3: Hemmhöfe um Mutaflor® als Zeichen der Wachstumshemmung von *Salmonella enterica* Serotyp *Enteritidis*.

antibakterielle Aktivität von *E. coli* K-12 nach erfolgter Klonierung mit einem DNA-Fragment des Genoms von *E. coli* Stamm DSM 6601. Auf diesem DNA-Fragment liegen Gene für die Valin-Biosynthese. Valin stellt ein kompetitives Prinzip in der Ökologie von Mikroorganismen dar, da es die Bildung dieser Aminosäure in anderen Organismen hemmen kann. Es ist wahrscheinlich, dass die antagonistische Wirkung des *E. coli*-Stammes DSM 6601 (Abb. 3) auch auf der Produktion des bislang nicht näher charakterisierten Colicins und des Mutafloricins beruht.

Von *E. coli* Stamm DSM 6601 produzierte kurzkettige Fettsäuren (u.a. Propionsäure und Buttersäure) sind nicht nur für die Eutrophie des Darmepithels von Bedeutung, sondern tragen auch zur antagonistischen Wirkung gegenüber anderen Mikroorganismen bei. Die Produktion dieser Stoffwechselprodukte unterliegt einer sauerstoffabhängigen Regulation und zeigt Unterschiede zwischen aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen. Nicht ausgeschlossen erscheint die Tatsache, dass der Stamm weitere, bislang nicht identifizierte antagonistisch wirkende Substanzen produziert.

Resümee

Escherichia coli als wichtiger Darmbesiedler des Menschen verfügt über verschiedene Faktoren, um sich im Ökosystem Darm gegenüber anderen Mikroorganismen durchzusetzen. Zu diesen wichtigen „Fitnessfaktoren“ gehören antagonistische Prinzipien (Bildung von Bakteriozinen und Mikrozinen) sowie die Ausbildung verschiedener Transportsysteme, die eine ausreichende Versorgung mit den essentiellen Fe^{III} -Ionen sicherstellen.

Der *E. coli*-Stamm DSM 6601 verfügt über mehrere Mikrozin- und Bakteriozin-Systeme sowie über unterschiedliche siderophorvermittelte Eisenaufnahmesysteme. Diese Fitness-Faktoren unterstützen die Fähigkeit des *E. coli*-Stammes DSM 6601 zum Besiedeln des Intestinaltraktes, ohne ihm pathogene Merkmale zu verleihen.

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Bakteriologie
Pettenkoferstraße 9a
80336 München

Literatur

1. Baba T, Schneewind O. Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. Trends Microbiol. 1998, 6:66-71.
2. Braun V, Winkelmann G. Microbial iron transport: structure and function of siderophores. Prog. Clin. Biochem. Med. 1987, 5:67-99.
3. Bullen JJ, Griffiths E. Iron and infection, 1987 p. 69-137. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
4. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66:4555-4558.
5. Crosa JH. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997, 61:319-336.
6. Enz S, Mahren S, Stroeher UH, Braun V. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. J. Bacteriol. 2000, 182:637-646.
7. Rakin A, Heesemann J. Yersiniabactin/pesticin receptor: a component of an iron uptake system of highly pathogenic *Yersinia*. Contrib. Microbiol. Immunol. 1995, 13:244-247.
8. Jack RW, Jung G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. Curr. Opin. Chem. Biol. 2000, 4:310-317.
9. Lazdunski CJ, Bouveret E, Rigal A, Journet L, Lloubes R, Benedetti H. Colicin import into *Escherichia coli* cells. J. Bacteriol. 1998, 180:4993-5002.
10. Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in regulation of virulence genes. Clin. Microbiol. Rev. 1993, 6:137-149.
11. Riley MA. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev. Genet. 1998, 32 :255-278.
12. Braun V, Pilsl H, Gross P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. Arch. Microbiol. 1994, 161:199-206.
13. Moreno F, San Millan JL, Hernandez-Chico C, Kolter R. Microcins. Biotechnology 1995, 28:307-321.
14. Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends Microbiol. 1999, 7:129-133.
15. Smarda J, Smajs D. Colicins-exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. Folia Microbiol. (Praha) 1998, 43:563-582.
16. Schubert S, Rakin A, Fischer D, Sorsa J, Heesemann J. Characterization of the integration site of *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 179:409-414.
17. Williams P, Griffiths E. Bacterial transferrin receptors - structure, function and contribution to virulence. Med. Microbiol. Immunol. 1992, 181:301-322.

Wie Bakterien kommunizieren: Quorum sensing und Crosstalk in bakteriellen Lebensgemeinschaften

J. Hacker¹, U. Dobrindt¹, L. Emödy²



Prof. Dr. J. Hacker

Abstract

Im Darm des Menschen und vieler Tiere leben Mikroorganismen, die mehrere hundert unterschiedliche Arten repräsentieren. Dabei kommt es zu vielfältigen Wechselwirkungen der Mikroorganismen mit Wirtszellen. Darüber hinaus haben die Mikroben, insbesondere die Bakterien, Strategien entwickelt, um auch untereinander kommunizieren zu können. Eine wichtige bakterielle Spezies der Darmflora stellt *Escherichia coli* dar. *Escherichia coli*-Bakterien sind in der Lage, über spezifische Adhäsine an Wirtszellen zu binden. Darüber hinaus produzieren sie antagonistische Wirkstoffe, wie Bakteriozine und Mikroazine, die Vertreter der gleichen Spezies oder anderer Arten im Wachstum hemmen können. Weiterhin können *Escherichia coli*-Bakterien mit anderen Mikroorganismen über die Sekretion und Verarbeitung von Homoserinlaktonen und anderen chemischen Substanzen kommunizieren. Die Bedeutung dieser Interaktionsmöglichkeit liegt darin, dass mithilfe dieser Substanzen die Bakteriendichte „gemessen“ werden kann. Dieser Vorgang wird als „Quorum sensing“ bezeichnet und führt zu spezifischen Genregulationsprozessen, für die der Terminus „Crosstalk“ gewählt wurde.

Der *Escherichia coli*-Stamm Nissle 1917 (DSM 6601) zählt zur Gruppe der apathogenen Vertreter der humanen Darmflora. Er tritt mit Wirtszellen und mit anderen Mikroorganismen in Wechselwirkung. Um an die Wirtszellen binden zu können, produziert der Stamm Typ 1- und F1C -Fimbrien. Darüber hinaus konnten wir kürzlich zeigen, dass auch die als „Curli“ bezeichneten Fimbrien von dem Stamm DSM 6601 gebildet werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen *E. coli*-Bakterien sind die Curli-Adhäsine-Gene auch bei 37 °C aktiv, was eine zusätzliche Interaktionsmöglichkeit mit dem Wirt gewährleisten könnte. Darüber hinaus ist der Stamm DSM 6601 in Kokultivierungsexperimenten kompetitiv gegenüber anderen Vertretern der Enterobacteriaceae und auch gegenüber *Candida albicans*. Hier spielen Mikroazine eine Rolle. Der Stamm trägt weiterhin die Gene, die für den Vorgang des „Quorum sensing“ verantwortlich sind. Erste genetische Analysen zeigen jedoch, dass im Gegensatz zu anderen *E.-coli*-Bakterien im 3'-Bereich des entsprechenden Quorum sensing Genes *ygaG* eine Genomstruktur vorliegt, die sich von der bei anderen *E. coli*-Stämmen gefundenen unterscheidet. Weitere Untersuchungen werden klären, ob diese genetischen Unterschiede auch zu einem spezifischen Verhalten des Stammes DSM 6601 gegenüber anderen Vertretern der Darmflora führt und ob möglicherweise die kompetitive Wirkung des Stammes mit diesen Sequenzalterationen im Zusammenhang steht. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass die einzelnen Bakterienstämme innerhalb der Darmflora Teil eines regulatorischen Netzwerkes sind, dessen Zusammenhänge wir erst jetzt zu verstehen beginnen.

¹ Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg

² Department of Medical Microbiology and Immunology, University Medical School, Pecs, Ungarn

Einführung

Mikroorganismen stellen frühe Formen des Lebens dar und haben sich im Zuge der Evolution vor über 3 Milliarden Jahren gebildet. Während eine Reihe von Bakterien und einzelligen eukaryontischen Mikroben als freilebende Organismen verschiedene Lebensräume besiedeln, sind andere Mikroben eng mit Wirtsorganismen assoziiert. Diese Assoziation kann auf kommensaler, pathogener oder symbiontischer Grundlage beruhen. Viele Mikroorganismen haben sich im Boden in der Nachbarschaft zu Pflanzenwurzeln (Rhizosphäre) angesiedelt. Andere sind an die Oberflächen von Pflanzen angepasst und können dort längere Zeit überleben. In Wasserhabitaten sind Assoziationen zwischen Mikroorganismen und Amöben (Süßwasser) sowie Schwammzellen (Salzwasser) beschrieben. Die orale Flora des Menschen umfasst über 200 bakterielle Arten, die miteinander kommunizieren können. Die menschliche Darmflora weist eine noch höhere Vielfalt auf, geschätzt werden ca. 400 verschiedene Arten.

Während die Interaktionen von Mikroorganismen und ihren Wirten seit geraumer Zeit intensiv untersucht werden, ist das Phänomen der Kommunikation von Mikroorganismen untereinander bisher nur wenig verstanden. Dabei sind zwei Termini zu unterscheiden: „Quorum sensing“ und „Crosstalk“. Während Crosstalk die Beeinflussung bestimmter Gene durch Genprodukte anderer genetischer Determinanten beschreibt, stellt Quorum sensing einen Prozess dar, bei dem die Bakteriendichte von den Mikroorganismen „gemessen“ wird. Dieser Prozess ist die Grundlage für ein An- und Abschalten bakterieller Gene in Abhängigkeit von der Bakteriendichte. Somit stellen Quorum sensing-Systeme Kommunikationsstrategien in Lebensgemeinschaften dar (1, 2, 4). Quorum sensing-Mechanismen können auch als bakterielle Konkurrenzsysteme gesehen werden, wie dies für andere mikrobielle Eigenschaften (Adhärenz, Biofilmbildung, Mikrozinproduktion, Abb. 1) bereits gezeigt wurde.

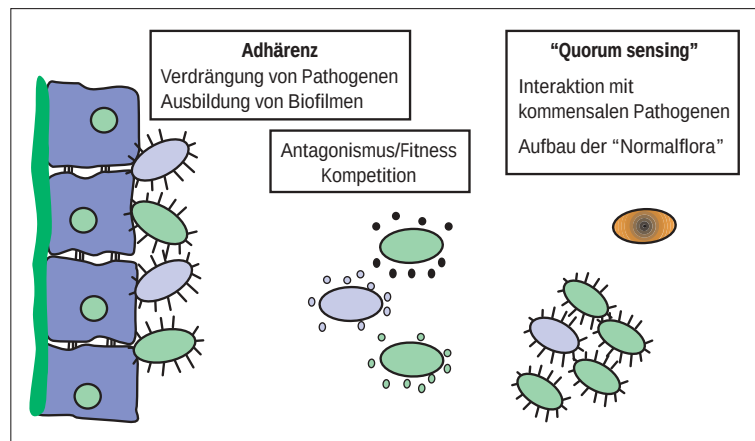


Abb. 1:
Interaktionen in
bakteriellen
Lebensgemein-
schaften, mögliche
Rolle von
Probiotika im
Lebensraum Darm

Das Beispiel *Vibrio fischeri*

Quorum sensing-Systeme wurden bei Gram-positiven und bei Gram-negativen Mikroorganismen beschrieben. Sehr gut analysiert ist das System des Bakteriums *Vibrio fischeri*. Dabei handelt es sich um ein marines Bakterium, das mit Tiefseefischen assoziiert ist und als Symbiont auf der Oberfläche dieser Fische lebt. *V. fischeri* ist in der Lage, Licht zu emittieren. Bei genügend hoher Zelldichte dieses Bakteriums kommt es zur Lichtemission, der Biolumineszenz (Abb. 2). Diese Eigenschaft scheint den Fischen den Vorteil zu verschaffen, andere Tiere anzulocken, die dann gefressen werden. Von diesem Vorgang profitieren auch die Bakterien, so dass es sich hier um eine echte symbiontische Interaktion handelt. Die genetische Determinante, die für die Lichtemission verantwortlich ist, wird als *lux*-Gencluster bezeichnet. Dabei spielen neben den Strukturgenen für das Biolumineszenz-System die Gene *luxR* und *luxI* eine Rolle. *luxR* kodiert für einen Transkriptionsaktivator, der nur dann aktiv wird, wenn ein kleines Molekül, ein sogenannter Autoinduktor, an ihn bindet.

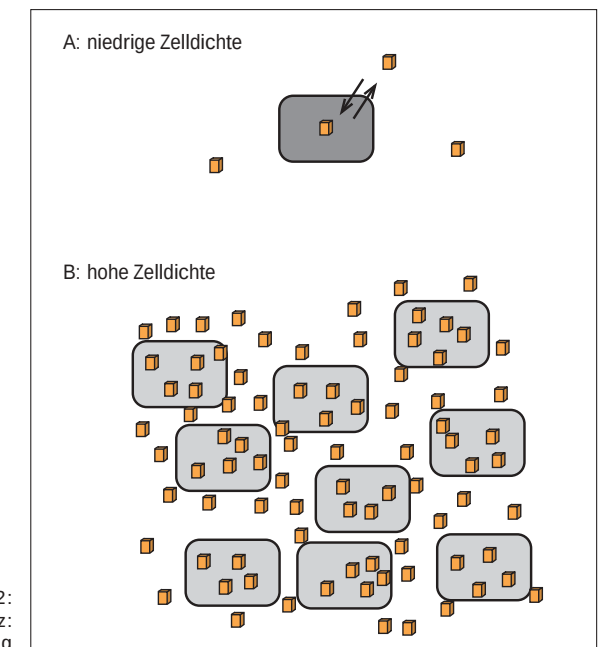


Abb. 2:
Biolumineszenz:
Das Quorum sensing

Dieser Autoinduktor besteht aus einem Homoserinlacton-Derivat, das durch das *luxI*-Genprodukt gebildet wird. Transkriptionsaktivator und Autoinduktor bilden zusammen ein aktivierendes Molekül, das die entsprechenden Strukturgene des *lux*-Genclusters zur Lichtemission anschaltet (7). Nur bei ausreichend hoher Autoinduktor-Konzentration und somit nur bei ausreichender Bakterienzeldichte kommt es zur Biolumineszenz (Abb. 3). Entsprechende Systeme, wie hier für *V. fischeri* beschrieben,

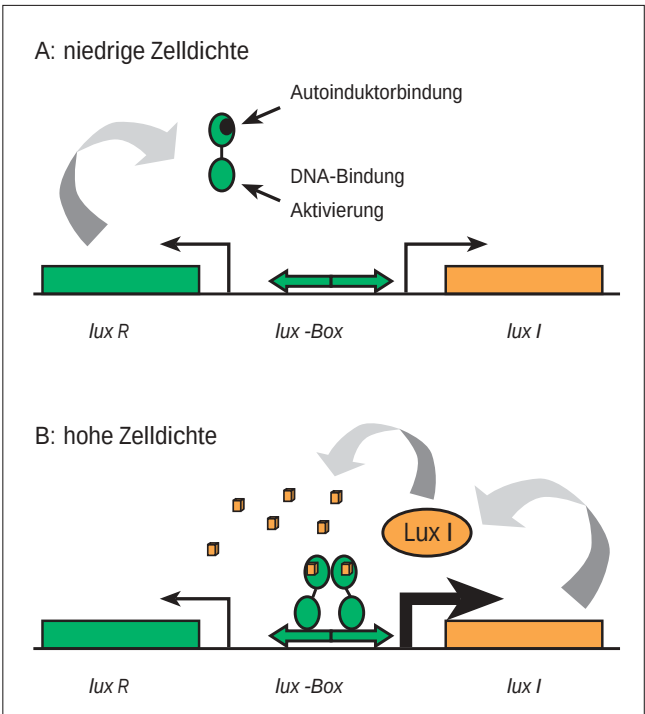


Abb. 3:
Das lux-System von
Vibrio fischeri

existieren auch in anderen bakteriellen Arten (Tab. 1). Dabei ist zu konstatieren, dass Homoserinlacton-Derivate bei vielen Gram-negativen Bakterien als Autoinduktor-Substanzen beim Quorum sensing vorkommen (5, 9). Im Gegensatz dazu werden bei Gram-positiven Mikroorganismen Peptide als Autoinduktoren verwendet.

Tab. 1:
Quorum sensing über
Acylhomoserinlactone bei
Gram-negativen Bakterien

Eigenschaften	Spezies
Biolumineszenz	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Vibrio harveyi</i>
Symbiosegene	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Virulenzfaktoren	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Escherichia coli</i> (EHEC, EPEC)
Plasmidtransfer	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Motilität (Schwärmen)	<i>Serratia liquefaciens</i>
Antibiotikasyntese	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas aureofaciens</i>
Pigmentproduktion	<i>Chromobacterium violaceum</i>
Zellteilung, Biofilm	<i>Escherichia coli</i>

Das Ökosystem Darm

Neben vielen schon erwähnten Ökosystemen stellt der Darm des Menschen und vieler Tiere den Lebensraum für eine Reihe von Mikroorganismen dar. Man schätzt, dass im menschlichen Darm Vertreter von bis zu 400 Bakterienarten miteinander leben und untereinander kommunizieren. Dabei kann es sich sowohl um anaerobe als auch um aerobe Mikroorganismen handeln. Wichtige Darmbakterien stellen dabei Spezies von *Bacteroides* und *Fusobacterium* dar. Auch Vertreter der Arten *Eubacterium elegans*, *Enterococcus faecalis* und *Candida albicans* sind im Darm oft anzutreffen. Ein weiteres, wichtiges Bakterium der Darmflora stellt *Escherichia coli* dar (Abb. 4).

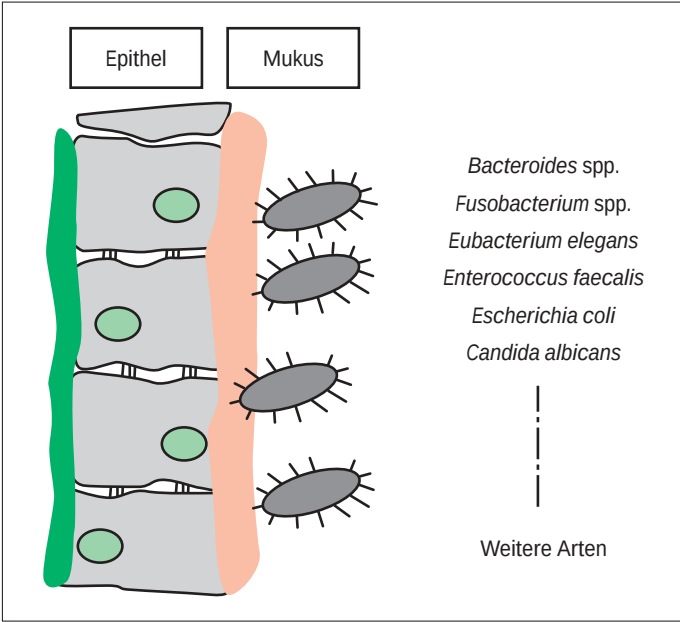


Abb. 4:
Zusammensetzung des
Ökosystems Darm

Das Darmbakterium *Escherichia coli*

E. coli ist ein normaler Darmbewohner des Menschen und vieler Tiere. Die „normalen“ *E.-coli*-Stämme sind apathogene Mikroorganismen, die im Darm mit anderen Mikroben zusammenleben können. Daneben besteht die Art *E. coli* aus unterschiedlichen Pathotypen, die Krankheiten auslösen können. Dazu gehören Darminfektionen, aber auch extraintestinale Infektionen wie Harnwegsinfektionen und Sepsis. Pathogene Vertreter sind durch die Produktion von Virulenzfaktoren ausgezeichnet. Zusätzlich bilden pathogene Bakterien auch Faktoren, die für das Überleben und die Konkurrenz von Bedeutung sind. Diese Faktoren werden als „Fitness-Faktoren“ bezeichnet. Solche „Fitness-Faktoren“ finden sich im Gegensatz dazu ebenfalls bei vielen apathogenen *E. coli*-Vertretern, die jedoch nicht in der Lage sind, Infektionen auszulösen.

Eigenschaften des *E.-coli*-Stammes DSM 6601 (Nissle 1917)

Bei dem *E. coli*-Stamm DSM 6601 handelt es sich um einen apathogenen Vertreter der mikrobiellen Darmflora, der kompetitive Eigenschaften gegenüber anderen Mikroorganismen aufweist. So konnte *in vitro* und zum Teil auch in *in vivo* gezeigt werden, dass der Stamm DSM 6601 das Wachstum von Stämmen verschiedener Bakterien-spezies, wie *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica* und *Vibrio cholerae* hemmt. Darüber hinaus wirkt der Stamm kompetitiv auf *Candida albicans*. Der *E. coli*-Stamm DSM 6601 bildet eine Reihe von antagonistischen Fitness-Faktoren aus, zu denen zwei Mikroazine zählen. Weiterhin wird die Kompetition dieses Stammes mit anderen Mikroorganismen durch mindestens fünf Eisenaufnahmesysteme unterstützt: das Enterobaktin-, das Aerobaktin-, das Yersinia-baktin- und das Citratsystem sowie durch die Fähigkeit zur Häminaufnahme. Im Gegensatz zu anderen, pathogenen *E.-coli*-Stämmen sekretiert der Stamm DSM 6601 keine Toxine und ist Antibiotika-sensitiv. Um an Darmzellen zu binden, benötigt er Adhäsine. DSM 6601 besitzt die F1C-Adhäsine, die Typ I-Fimbrien und die Curli-Adhäsine. Weiterhin bildet der Stamm ein semirauhes O6-LPS und eine K5-Kapsel aus (Abb. 5).

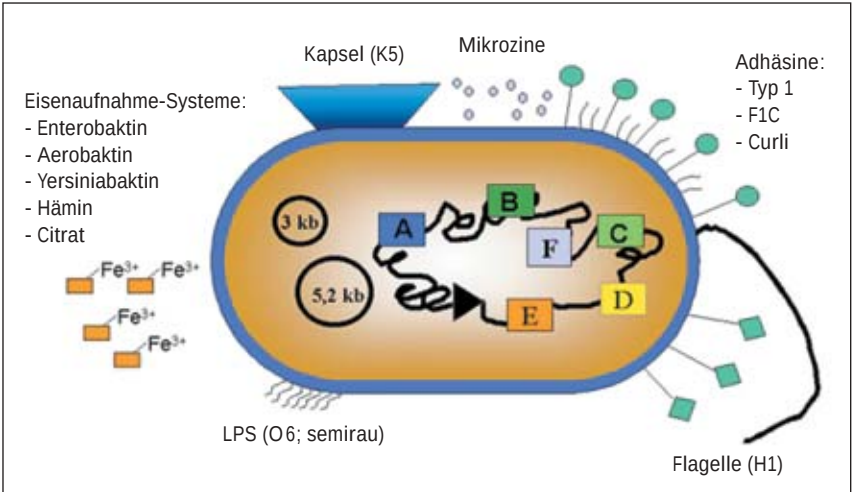


Abb. 5: Eigenschaften des *E. coli*-Stammes DSM 6601

Quorum sensing bei *Escherichia coli*

Wie andere Mikroorganismen auch, produziert *E. coli* ebenfalls einen Autoinduktor, der von dem Genprodukt YgaG gebildet wird (Abb. 6). In ersten Untersuchungen wurde bekannt, dass das *ygaG*-Gen für die Kommunikation von *E.-coli*-Stämmen untereinander Bedeutung hat. Das entsprechende Genprodukt scheint auch für die Kommunikation mit anderen bakteriellen Spezies von Bedeutung zu sein (11, 12, 13). Darüber hinaus ist bekannt, dass *E.-coli*-Stämme Biofilme ausbilden können.

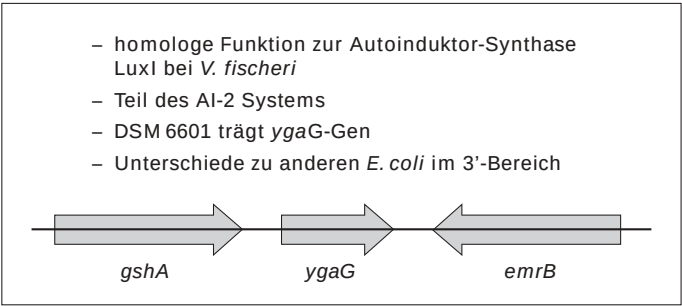


Abb. 6: Die Genstruktur des *ygaG*-Systems

Die Ausbildung von Biofilmen ist sehr häufig mit dem Quorum sensing assoziiert (3, 6, 8, 10). Auch bei *E. coli* gibt es Hinweise darauf, dass die beiden Eigenschaften Biofilmbildung und Quorum sensing gekoppelt vorliegen.

Biofilmbildung und Quorum sensing beim *E. coli*-Stamm DSM 6601 (Nissle 1917)

Die Biofilmbildung bei *E. coli* Stamm DSM 6601 ist mit der Ausbildung der Curli-Adhäsine assoziiert. Aus Untersuchungen mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen geht hervor, dass beide Eigenschaften, Biofilmbildung und Curli-Produktion, thermo-reguliert sind. Während bei 28 °C die Biofilmbildung und das Quorum sensing sehr gut ausgebildet sind, findet dies bei 37 °C kaum statt. Um auch beim Stamm DSM 6601 die Eigenschaften Biofilmbildung und Curli-Produktion zu analysieren, wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt (Tab. 2). Durch den direkten Nachweis der Curli-Adhäsine sowie durch die Untersuchung der Curli-Adhäsine-vermittelten Kongorotbindung konnte gezeigt werden, dass beim Stamm DSM 6601 im Gegensatz zu anderen *E. coli*-Stämmen eine Biofilmbildung und eine Curli-Produktion auch bei 37 °C vorkommt. Mithilfe entsprechender Mutationen wurde nachgewiesen, dass diese Eigenschaft u.a. von der Präsenz des alternativen Stationärphase-spezifischen

<i>E. coli</i> Stamm	Curli-Bildung		Biofilm-Bildung		Kongorot-Bindung	
	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C
536 UTI	+	–	+	–	+	–
MG1655 K-12	+	–	+	–	+	–
DSM 6601	++	+	+++	++	+++	++
536, <i>rpoS</i> [–]	–	–	–	–	–	–
MG1655, <i>rpoS</i> [–]	–	–	–	–	–	–
DSM 6601, <i>rpoS</i> [–]	+	(+)	+	(+)	++	+

Tab. 2: Bildung von Curli-Adhäsinen bei unterschiedlichen *Escherichia coli*-Stämmen

s-Faktors RpoS abhängt. Inwieweit diese Eigenschaft Bedeutung für die Kompetitionsfähigkeit des Stammes hat, ist noch nicht bekannt. Es könnte aber vermutet werden, dass ein Teil der kompetitiven Eigenschaften des Stammes DSM 6601 mit der Curli-Adhäsion-Bildung und der Biofilmbildung bei 37 °C zusammenhängt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Stamm DSM 6601 das „Quorum sensing-Gen“ *ygaG* trägt. Es weist genetische Veränderungen im 3' Bereich im Vergleich zu *E. coli* K-12 auf. Weitere Untersuchungen werden klären, ob diese genetischen Veränderungen Bedeutung für die biologische Wirkung des *ygaG*-Genproduktes haben.

Zusammenfassung

Die Fähigkeit von Bakterien, untereinander zu kommunizieren, ermöglicht es diesen Organismen, die Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte zu regulieren. Beim sogenannten Crosstalk wird die Expression bestimmter Gene durch Genprodukte anderer Determinanten innerhalb einer Bakterienzelle beeinflusst. Im Gegensatz dazu erfolgt beim Quorum sensing die Regulation der Genexpression bestimmter Gene durch Komponenten („Autoinduktoren“), die von anderen Bakterienzellen produziert werden. Auch das Darmbakterium *Escherichia coli* weist Komponenten eines Quorum sensing-Systems auf. Möglicherweise beruhen die kompetitiven Eigenschaften des probiotischen *E. coli*-Stammes DSM 6601 gegenüber anderen Mikroorganismen auch auf Quorum sensing-vermittelten Effekten. Für viele andere Bakterienarten wurde z.B. eine Assoziation von Quorum sensing und Biofilmbildung beschrieben. Im Fall des *E. coli*-Stammes DSM 6601 konnte gezeigt werden, dass er im Gegensatz zu anderen *E. coli*-Stämmen auch bei 37 °C Curli-Adhäsine exprimiert und einen Biofilm bildet. Dies könnte zu den kompetitiven Eigenschaften des Stammes durch eine verbesserte Kolonisierung des Darmepithels beitragen. Interessanterweise weist beim Stamm DSM 6601 das für den Quorum sensing-Autoinduktor kodierende Gen *ygaG* strukturelle Unterschiede im 3'-Bereich auf. Ob sich diese Veränderungen auf die Funktion des Quorum sensing-Systems auswirken, muss weiter untersucht werden.

Ausblick

Die Darmflora stellt eine Lebensgemeinschaft dar, bei der Mikroorganismen und eukaryontische Zellen in vielfältiger Weise interagieren. Neben der Ausbildung von Kolizinen und Mikrozininen, Eisenaufnahmesystemen und der Bildung von Adhäsinen scheinen Kommunikationsstrategien wie das Quorum sensing für die Interaktion der Mikroorganismen von Bedeutung zu sein. Durch das Einbringen probiotischer Bakterien in die Darmflora könnten pathogene Interaktionen gestoppt und die Lebensgemeinschaften in vielfältiger Weise beeinflusst werden. Zum einen könnte die Bildung von Biofilmen bzw. von adhärennten Bakterien-schichten an eukaryontischen Zelloberflächen, andererseits auch die bakterielle Signaltransduktion in eukaryontischen

Zellen verändert werden. Darüber hinaus kann es zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Darmflora kommen, indem über kompetitive Prozesse das Wachstum anderer Mikroorganismen inhibiert wird. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass durch Quorum sensing-Prozesse die Ausbildung bestimmter Eigenschaften reprimiert bzw. exprimiert werden könnten. Während viele Details in dem Zusammenspiel der unterschiedlichen Mikroorganismen der Darmflora noch nicht bekannt sind, ist die Bedeutung von probiotischen Bakterien für die Zusammensetzung der Darmflora unstrittig.

Prof. Dr. rer. nat. J. Hacker

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Literatur

1. Baca-DeLancey RR, South MM, Ding X, Rather PN. *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:4610-4614.
2. Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. J. Bacteriol. 1997, 179:4043-4045.
3. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 1998, 280:295-298.
4. Hardman AM, Stewart GS, Williams P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 1998, 74:199-210.
5. Holden I, Swift I, Williams I. New signal molecules on the quorum-sensing block. Trends Microbiol. 2000, 8:101-104.
6. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J. Bacteriol. 2000, 182:1374-1382.
7. Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan Jr JE, Greenberg EP. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:4360-4365.
8. Parsek MR, Greenberg EP. Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Methods Enzymol. 1999, 310:43-55.
9. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:8789-8793.
10. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, Kornberg A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:9636-9641.
11. Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:15196-15201.
12. Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:1639-1644.
13. Surette MG, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95:7046-7050.

Das darmassoziierte Immunsystem: Grundlagen und Bedeutung für Wirt-Erreger-Interaktion

I. B. Autenrieth



Prof. Dr. I. B. Autenrieth

Abstract

Die Oberfläche des Gastrointestinaltraktes beträgt mehr als 200 m² und wird ständig mit einer Darmflora mit insgesamt $10^{13} - 10^{14}$ Mikroorganismen konfrontiert. Unter normalen Umständen herrscht zwischen dem Wirt und der physiologischen Darmflora ein physiologisches Gleichgewicht, für dessen Aufrechterhaltung jedoch sowohl Faktoren seitens der Mikroorganismen als auch Wirtsfaktoren von großer Bedeutung sind. Interessanterweise sind im Darm auch etwa 20 % der Lymphozyten des Wirtes lokalisiert. Da sich die Lymphozytenpopulationen des Darmes in Struktur und Funktion von denen des peripheren Immunsystems in vielerlei Hinsicht unterscheiden, spricht man in diesem Zusammenhang auch vom darmassoziierten Immunsystem. Das darmassoziierte Immunsystem ist eine komplexe und hochspezialisierte Struktur, die aus verschiedenen Strukturen wie beispielsweise Lymphfollikeln, Peyer'schen Plaques, mesenterialen Lymphknoten sowie Lamina propria-Lymphozyten und der intraepithelialen Lymphozytenpopulation besteht. Struktur und Zusammensetzung dieses Immunsystems werden durch vielerlei Aktivierungs-, Migrations- und „Homing“-Prozesse sowie lokale Differenzierungsprozesse geregelt. Diesem Immunsystem kommt eine besondere Rolle bei der Entstehung der oralen Toleranz und bei der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen zu. Darüber hinaus haben viele Untersuchungen der vergangenen Jahre verdeutlicht, dass neben klassischen Immunzellpopulationen wie Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten auch die Epithelzellen des Darmes eine große Bedeutung für das angeborene Immunsystem aufweisen. Die Funktionen einzelner Komponenten des darmassoziierten Immunsystems im Hinblick auf die Interaktion mit der physiologischen Darmflora, Probiotika oder mit pathogenen Mikroorganismen wird an einzelnen Beispielen erläutert.

Einleitung

Das darmassoziierte Immunsystem stellt einen wichtigen Bestandteil der Infektabwehr gegen pathogene Keime dar und hat wesentliche Bedeutung für den gesamten menschlichen Organismus. Die Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Wirt sind äußerst vielfältig, die Bandbreite der Konsequenzen reicht vom „Training“ des darmassoziierten und damit indirekt des gesamten Immunsystems bis hin zum schweren gastrointestinalen Infekt oder zur Sepsis.

Mit mehr als 200 m² repräsentiert die Oberfläche des Gastrointestinaltraktes ca. 75 % der gesamten mukosalen Oberflächen im menschlichen Körper. Auf dieser Fläche wird das mukosa-assoziierte Immunsystem (MALT, mucosa associated lymphoid tissue) ständig mit 10¹³ – 10¹⁴ Mikroorganismen und einer Vielzahl von Substanzen (Antigenen) konfrontiert. Um schädigende Einflüsse auf den Organismus zu verhindern, ist ein effektives Abwehrsystem entstanden. Es umfasst die angeborene, antigenunspezifische und die erworbene Abwehr. Für das physiologische Gleichgewicht zwischen Wirt (Mensch) und Darmflora sind sowohl Faktoren der Mikroorganismen als auch Wirtsfaktoren von großer Bedeutung.

Mukosa-assoziiertes Immunsystem (MALT)

Das MALT besteht aus verschiedenen anatomischen Strukturen. Zum organisierten Mukosa-assoziierten Immunsystem werden die Tonsillen, die Peyer'schen Plaques und weitere Lymphfollikel zugeordnet. Die Peyer'schen Plaques bestehen meist aus mehreren Follikeln, in denen zwischen einem Keimzentrum und einer Mantelzone mit B- und T-Lymphozyten, Makrophagen bzw. dendritischen Zellen unterschieden wird. Diesen hoch differenzierten Strukturen steht das diffuse oder nicht-organisierte Immunsystem gegenüber. Es handelt sich dabei um intraepitheliale und Lamina propria-Lymphozyten sowie antigenpräsentierende dendritische Zellen.

Zwischen beiden Systemen findet eine intensive Interaktion an sogenannten „induktiven“ Orten statt. So können Mikroorganismen oder ihre antigen wirksamen Bestandteile bzw. Stoffwechselprodukte beispielsweise über M-Zellen in die Peyer'schen Plaques oder in Lymphfollikel des Dickdarms gelangen und dort eine Immunantwort induzieren. Lymphozyten, die die Lymphfollikel verlassen und in den mesenterialen Lymphknoten proliferieren, gelangen über den Ductus thoracicus in die Blutzirkulation und zurück in die Lamina propria. Dieser Vorgang wird als „Homing“ bezeichnet. Ein komplexer Prozess der Aktivierung und Differenzierung spezifischer Effektorzellen und deren Zirkulation führt an verschiedenen mukosalen Bereichen zu einer spezifischen Immunantwort, z. B. zur Sekretion von IgA durch Plasmazellen.

M-Zellen

Zu den induktiven Strukturen des MALT gehören Zellen mit charakteristischer Ultrastruktur in den Peyer'schen Plaques, die sogenannten M-Zellen („microfolded“ oder „membraneous epithelial cells“). Im Vergleich zu den umgebenden Enterozyten besitzen diese Zellen nur eine sehr dünne Glykokalix- bzw. Mukusschicht. Sie weisen wenige, kürzere, manchmal verzweigte Mikrovilli auf und finden sich selektiv in Assoziation zu Lymphfollikeln in der Lamina propria.

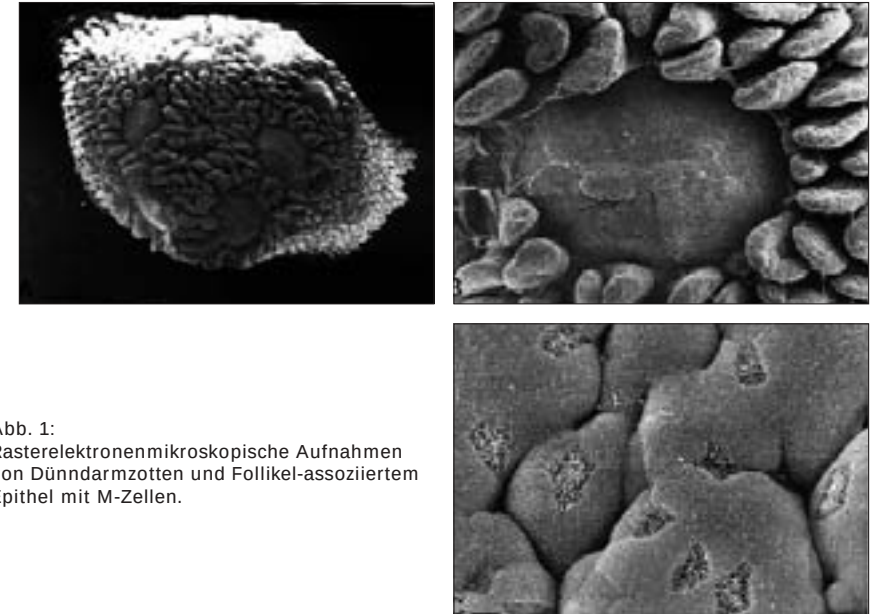


Abb. 1:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen
von Dünndarmzotten und Follikel-assoziiertem
Epithel mit M-Zellen.

Die Hauptfunktion der M-Zellen ist die Aufnahme von luminalen Antigenen und der aktive Transport in die Lymphfollikel. Untersuchungen zur Funktion in vivo sind ausgesprochen kompliziert. M-Zellen konnten bislang nicht isoliert werden. Ihre für die Nutzung und Steuerung der induktiven Mechanismen erforderlichen Oberflächenrezeptoren bzw. -marker sind variabel. M-Zell-Marker werden von verschiedenen Spezies und innerhalb einer Spezies inkonstant exprimiert. Das bedeutet, dass mit einem bestimmten Marker nur ein Teil der M-Zellen z.B. bei der Maus identifiziert werden kann. Ein solcher Marker erfasst jedoch weder alle M-Zellen dieser Maus noch jene anderer Mausstämmen.

In vitro-Induktion von M-Zellen

Wegen der aufgeführten Schwierigkeiten beschränken sich die derzeitigen Kenntnisse über die Funktion der M-Zellen auf in vitro-Untersuchungen von M-Zellen oder M-Zell-ähnlichen Zellen. Dazu wurden Klone intestinaler Epithelzellen („CaCO-2“) auf Transwell-Filtern kultiviert. Diese Zellen polarisieren nach ca. 10-14 Tagen und

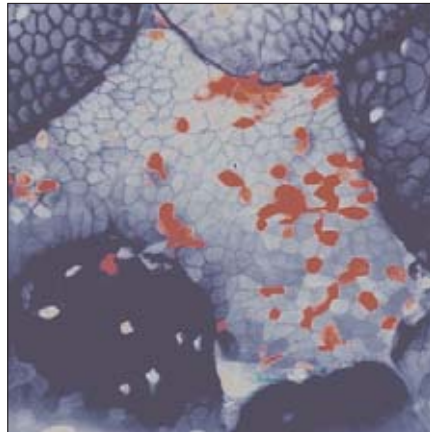


Abb. 2:
Konfokale Laserscan-Mikroskopie:
Follikelassoziiertes Darmepithel
mit M-Zellen (Maus), rot markiert (Lektin)

gleichen dann typischen Enterozyten. Nach Ko-Kultivierung mit Peyer'schen Plaque-Lymphozyten oder bestimmten B-Zell-Linien entwickeln sich daraus Zellverbände mit den Charakteristika eines follikel-assoziierten Epithels. Dazu gehören auch Zellen ohne Bürstensaum, die morphologisch und funktionell als M-Zellen identifiziert werden können. Dieses in vitro-Modell impliziert, dass die M-Zelle kein distinkter unabhängiger Zelltyp ist, sondern dass Epithelzellen eine gewisse Plastizität aufweisen und durch das Immunsystem induziert oder moduliert werden können.

β_1 -Integrine: Bedeutung für Translokation durch M-Zellen

Auf Epithelmonolayern konnte am Beispiel der Yersinien zum ersten Mal gezeigt werden, dass und wie Mikroorganismen M-Zellen translozieren. Bei den Yersinien reagiert das Invasin-Protein, ein äußeres Membran-Protein, als spezieller bakterieller Ligand mit einem spezifischen Rezeptor auf den M-Zellen. In diesem Modell wurden als Rezeptoren die β_1 -Integrine ermittelt. Die Interaktion des *Yersinia*-Invasins mit den β_1 -Integrinen der M-Zelle führt dann zur Translokation.

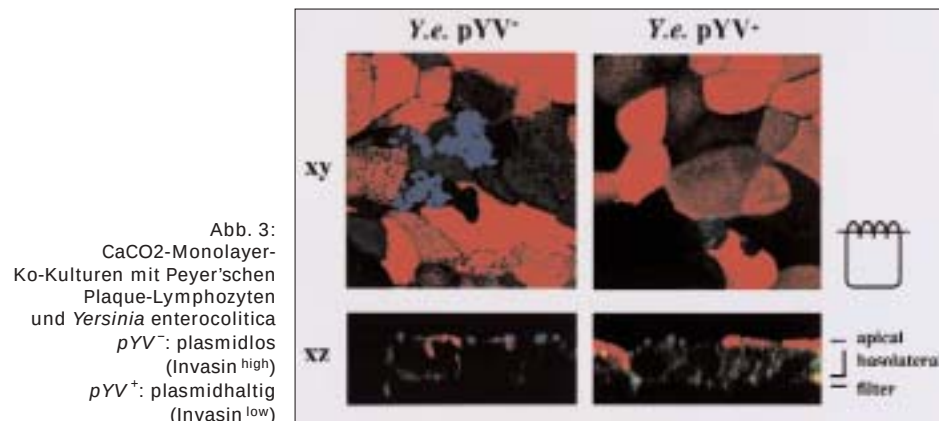


Abb. 3:
CaCO₂-Monolayer-
Ko-Kulturen mit Peyer'schen
Plaque-Lymphozyten
und *Yersinia enterocolitica*
pYV⁻: plasmidlos
(Invasin^{high})
pYV⁺: plasmidhaltig
(Invasin^{low})

Polarisierte Darmepithelzellen exprimieren keine solchen β_1 -Integrine auf der apikalen, d.h. der dem Darmlumen exponierten Seite. Die Expression dieser β_1 -Integrine ist offenbar auf M-Zellen beschränkt und konnte in vitro sowie bei der Maus nachgewiesen werden. Damit ist jetzt ein Oberflächenmolekül bekannt, das mit bakteriellen Liganden gezielt angesteuert werden kann, um Immunantworten des Darm-assoziierten Immunsystems durch Vakzine oder probiotische Arzneimittel zu stimulieren oder zu induzieren.

T-Lymphozyten in Peyer'schen Plaques

Die Lymphfollikel in den Peyer'schen Plaques enthalten verschiedene T-Zelltypen, wobei sich mehr T-Helferzellen als zytotoxische T-Zellen finden.

CD4+CD8-	65 % T _{H1} -, T _{H2} - und T _{H3} -Zellen
CD4-CD8+	30 % zytotoxische T-Zellen
CD4-CD8-	5 % $\gamma\delta$ -T-Zellen

Aus Untersuchungen mit Salmonellen- und Yersinien-Modellen ist bekannt, dass sich die immunologischen Funktionen dieser in den Peyer'schen Plaques lokalisierten T-Zell-Populationen deutlich von denen anderer T-Zellen (z.B. Lymphknoten oder Milz) unterscheiden. Die genauen Abläufe der Aktivierung und Induktion von protektiven Immunantworten sind bisher noch wenig geklärt.

Als weitere akzessorische Zellen der Peyer'schen Plaques wurden zwei dendritische Zellpopulationen beschrieben, deren nähere Charakterisierung in Infektionsprozessen noch aussteht.

Intraepitheliale und Lamina propria-Lymphozyten

Unter den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) findet sich ein hoher Anteil CD8+ T-Zellen (70–90 %). Fast alle IEL exprimieren das Integrin $\alpha_E\beta_7$. Die intraepithelialen Lymphozyten wirken supprimierend und immunregulatorisch, z.B. durch die Bildung der Zytokine IFN- γ und IL-5.

Lamina propria-Lymphozyten (LPL) werden den Memory-Zellen zugerechnet. Das Verhältnis von T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen in der Lamina propria ist so ähnlich wie im Blut, jedoch weisen die LPL einen erhöhten Aktivierungszustand auf. Anhaltende Störungen des T_{H1}-/T_{H2}-Gleichgewichtes oder der Relation von Memory-Zellen und T-Helferzellen führen möglicherweise zu einer chronischen intestinalen Entzündung.

Immunologische Bedeutung von Enterozyten

Enterozyten besitzen neben ihren Funktionen in Hinblick auf Resorption und Sekretion auch immunologische Funktionen im MALT. So können sie beispielsweise durch Produktion von Zytokinen dem spezifischen Immunsystem die Präsenz von pathogenen Mikroorganismen signalisieren.

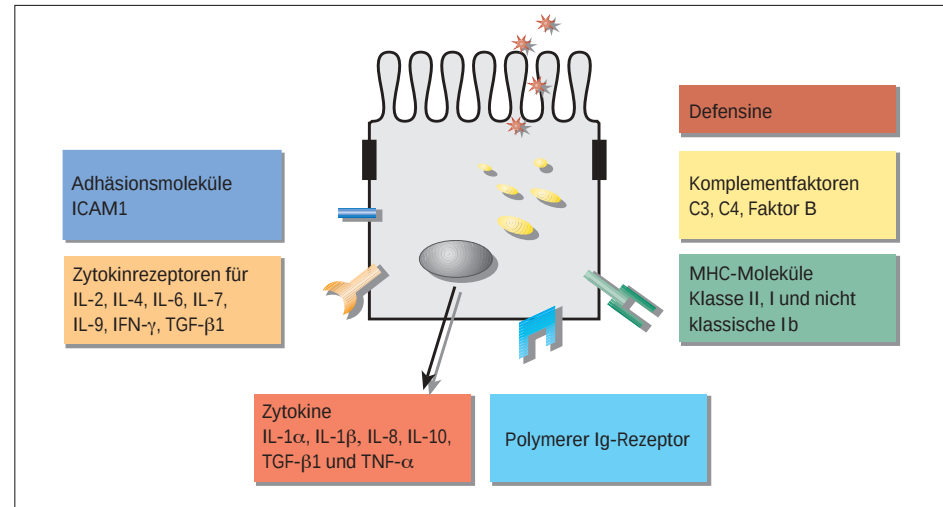


Abb. 4: Immunologische Charakteristika intestinaler Epithelzellen

Enterozyten sind auch in der Lage, Defensine zu produzieren. Sie können weiterhin bestimmte Adhäsionsmoleküle exprimieren, z.B. ICAM 1. Enterozyten verfügen neben Zytokinrezeptoren auch über einen polymeren Immunglobulinrezeptor, der den Transport von IgA und IgM auf die mukosale Oberfläche ermöglicht. Verschiedene Antigene werden von Enterozyten über nicht klassische und klassische MHC-Moleküle präsentiert. Diese antigenpräsentierenden Funktionen können vor allem durch pathogene Mikroorganismen induziert und im Sinne einer Verstärkung moduliert werden.

Experimentell ließ sich nachweisen, dass die Invasion von Yersinien und weiteren Infektionserregern nicht an der apikalen, dem Lumen zugewandten Seite der Enterozyten erfolgt. Ebenso konnte an polarisierten, mit Bürstensaum versehenen Enterozyten eine apikale Signalvermittlung ausgeschlossen werden. Eine Translokation von Mikroorganismen durch M-Zellen führt an der basolateralen Seite der Enterozyten zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Die Folge ist die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie z.B. Interleukin-8. Die Chemotaxis von Effektorzellen ermöglicht eine effiziente Immunantwort.

B-Zelldifferenzierung und sekretorisches IgA als Effortorkomponente des MALT

Antigenaktivierte IgA-spezifische B-Zellblasten verlassen die Lymphfollikel, differenzieren zu IgA-Plasmazellen und gelangen im Rahmen des „Homings“ in die Lamina propria. Ihre Sekretion von IgA ist die wichtigste Effortorkomponente des MALT, die Produktion des sekretorischen IgA's übersteigt die Menge des IgG's im Blut. Als Hauptfunktion gilt der Schutz epithelialer Oberflächen vor infektiösen

Agentien. So verhindern IgA-Moleküle die Adhäsion von pathogenen Mikroorganismen an Enterozyten ebenso wie ihre Invasion. Es gibt zusätzlich Hinweise darauf, dass durch IgA komplexierte Antigene besonders effizient von M-Zellen aufgenommen werden. Dies geschieht in M-Zellen mit apikalen IgA-Rezeptoren, weshalb IgA auch eine primär neutralisierende Wirkung hat.

Bedeutung der Darmflora für das MALT

Verschiedene Mechanismen des MALT interagieren mit Bakterien bzw. deren Bestandteilen (z. B. bakterielle DNA oder Lipopolysaccharide). Diese Interaktion führt zu einer Stimulierung des MALT und beeinflusst primär die Entwicklung der entsprechenden anatomischen Strukturen. Wenn sich keine Darmflora etablieren kann, wie es bei keimfrei aufgezogenen (sogenannten gnotobiotischen) Tieren der Fall ist, bleibt das MALT rudimentär und die Lymphozytenpopulationen können nicht reifen. Während die Interaktionen des MALT mit pathogenen Mikroorganismen eingehend untersucht wurden und größtenteils bekannt sind, trifft dies für die physiologische Darmflora nicht zu. Es wird angenommen, dass diese endogene Mikroflora beim Gesunden zu einer kontrollierten Entzündung des Darmepithels führt. Weitgehend unbekannt sind die beteiligten Effektorstrukturen innerhalb des MALT und ihre Reaktionen. Aus in vitro-Modellen ist bekannt, dass apathogene *E. coli* die apikale Seite von Enterozyten nicht invadieren können, eine Translokation durch M-Zellen ist aber wahrscheinlich.

Die Bedeutung der Darmflora für das mukosale Immunsystem wurde insbesondere an Modellen von knock-out-Mäusen untersucht. So entwickeln IL-2 defiziente Mäuse spontan eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die sich bei keimfreier Aufzucht nicht manifestiert. Die Darmflora scheint daher neben genetischen Faktoren oder einer Immundysregulation beim Wirt ein wichtiger Trigger für die Induktion inflammatorischer Erkrankungen zu sein. Diese modellhaften Vorstellungen erlauben noch keine Beschreibung, wie die Darmflora die Reifung des MALT beeinflusst und wie sie unter bestimmten Bedingungen eine pathologische Entzündung induzieren kann.

Wirkung von probiotischen Arzneimitteln auf das MALT

Die Bedeutung von probiotischen Arzneimitteln für das MALT lässt sich exemplarisch an einigen Beispielen zeigen. Klinisch bedeutsam ist die äquivalente Wirkung von *E. coli* Stamm Nissle 1917 und Mesalazin in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa (1, 2). Diese Studienergebnisse stehen im Einklang mit zahlreichen Arbeiten, die den modulierenden Einfluss von Probiotika auf die Darmflora und das MALT belegen, erkennbar z.B. durch eine verstärkte Antikörperbildung.

In vitro konnte mittels *E. coli* Stamm Nissle 1917 beispielsweise das unspezifische Immunsystem stimuliert werden (3). Bei Mäusen wurde mit dem gleichen Stamm ein Schutz vor Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* erreicht (4).

Werden Mäuse keimfrei aufgezogen und dann mit *Candida albicans* infiziert, lässt sich die Mortalität durch verschiedene probiotische Bakterienstämme verhindern oder die Sterblichkeitsrate senken. Dieser Effekt wird sowohl auf einen direkten bakteriellen Antagonismus als auch auf immunmodulierende Eigenschaften der Probiotika zurückgeführt.

Bei Neugeborenen führte die intestinale Kolonisation mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 zu höheren IgA- und IgM-Spiegeln im Serum sowie im Stuhl und erschwerte die Ansiedlung pathogener Keime signifikant im Vergleich zur Placebo-Gruppe (5, 6).

Zusammenfassung

Das Immunsystem im Gastrointestinaltrakt zeichnet sich durch morphologische und funktionelle Besonderheiten aus. Zur Interaktion und Induktion von immunologischen Eigenschaften tragen verschiedene Komponenten bei. Eine zentrale Bedeutung besitzen hierbei die M-Zellen der Peyer'schen Plaques. Über die molekularen Abläufe der Interaktion zwischen Probiotika, physiologischer Darmflora und pathogenen Mikroorganismen mit dem mukosa-assoziierten Immunsystem des Darmes ist bisher erst wenig bekannt. Weitere Untersuchungen werden helfen, den Einsatz von probiotischen Arzneimitteln in der Therapie von Darmerkrankungen zu optimieren und die Wirkmechanismen aufzuklären.

Prof. Dr. med. I. B. Autenrieth

Eberhard-Karls-Universität
Universitätsklinikum Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Elfriede-Aulhorn-Str. 6
72076 Tübingen

Literatur

1. Kruis W, Schütz E, Frič P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 853-858
2. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635-639
3. Hockertz S. Steigerung der körpereigenen Abwehr gegen Bakterien- und Pilzinfektionen bei Mäusen nach Vorbehandlung mit dem apathogenen *Escherichia coli*-Stamm Nissle 1917. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1997;47(I):793-796.
4. Hockertz S. Immunmodulierende Wirkung von abgetöteten apathogenen *Escherichia coli*, Stamm Nissle 1917, auf das Makrophagensystem. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1991;41(II):1108-1112.
5. Lodinová-Žádníková R, Tlaskalova-Hogenova H, Sonnenborn U. Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor®). *Pediatr Allergy Immunol* 1992;3:43-48.
6. Lodinová-Žádníková R, Sonnenborn U. Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol Neonate* 1997;71:224-232.

Ökologie der Antibiotikaresistenz

G. Werner, W. Witte



Dr. G. Werner

Abstract

Unterschiedliche Wege der Ausbreitung der Antibiotikaresistenz zwischen den mikrobiologischen Systemen verschiedener Makroorganismen sind vorstellbar (Nahrung, Wasser usw.). Die Ausbreitung der Resistenz kann als klonale Verbreitung resistenter Stämme oder aber durch Übertragung von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Stämmen erfolgen. Bestimmte Besiedler des Gastrointestinaltraktes wie *Escherichia coli* und *Enterococcus faecium*, der Hautflora wie *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus*, sowie aquatischer und terrestrischer Habitate wie *Pseudomonas* spp. haben diesbezüglich eine besondere Bedeutung (Reservoirfunktion).

Die Bedeutung von Fleischprodukten für die Verbreitung der Resistenz vom Tier zum Mensch ist gut dokumentiert. Sie erfolgt klonal bei Zoonoseerregern (Chinolone-resistenz bei *Campylobacter*) oder aber nicht-klonal über mobile genetische Elemente (Plasmide, Transposons). Beispiele für Letzteres sind die Ausbreitung der Glykopeptid- und der Streptograminresistenz bei Enterokokken in Europa als Folge eines Einsatzes von verwandten antibakteriellen Leistungsförderern in der Tiermast.

Andere mögliche Verbreitungswege der Antibiotikaresistenz liegen im aquatischen Milieu (Abwasser, Wasser). Eine direkte Selektion von Antibiotikaresistenzen in diesen Habitaten ist aufgrund der geringen Antibiotikakonzentrationen nicht wahrscheinlich. Bei Anaerobiern wurde aber für ausgewählte Determinanten (Tetracyclin- und Erythromycinresistenz) ein erhöhter Transfer unter subinhibitorischen Konzentrationen gezeigt. Weitere Experimente mit ausgewählten konjugativen Resistenzplasmiden in Enterokokken und Staphylokokken zeigten hingegen keine erhöhte Transferrate unter diesen Bedingungen. Für Flavophospholipol ist sogar sowohl bei Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien eine inhibierende Wirkung auf einen Plasmidtransfer bekannt. Hingegen konnte eine Ausbreitung von bereits resistenten Bakterien über Abwasser-/Gülleintrag in landwirtschaftliche Systeme (Milieu Boden-Pflanze) nachgewiesen werden. Eine Belastung pflanzlicher Nahrungsmittel mit resistenten Bakterien ist bisher wenig untersucht, vorläufige Ergebnisse deuten eher auf eine untergeordnete Rolle bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen (geringe Kontamination, wenig Resistenzen).

Einleitung

Die Resistenzentwicklung gegen Antibiotika beruht hauptsächlich auf zwei Prinzipien: dem Vorhandensein von Resistenzgenen und dem antibiotischen Selektionsdruck (1). Resistenzgene können infolge Mutation aus „house-keeping genes“ der Bakterien hervorgehen, die für Targets der Antibiotika kodieren oder für Efflux-Mechanismen. Es können aber auch zusätzliche Gene erworben werden, die für Resistenzmechanismen kodieren (2). Die Ausbreitung der Resistenz kann durch klonale Verbreitung von bestimmten resistenten Stämmen und/oder von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Stämmen erfolgen.

Resistenzgene sind bereits bei einer Reihe verschiedener Bakterienspezies verbreitet. Beispiele sind das *tetM* bei Staphylokokken, Enterokokken, Clostridien, Listerien und Enterobacteriaceae (3), die *TEM-1* β -Laktamase bei Enterobacteriaceae, *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* (4) und *aph2-acc6* bei Staphylokokken und Enterokokken (5). Es gibt bestimmte bakterielle Besiedler der Mikroflora des Menschen, die eine ausgeprägte Kapazität zum Erwerb und zur Weitergabe von Resistenzgenen besitzen. Dazu gehören *E. coli* und *E. faecium* im Intestinaltrakt (6) sowie *S. epidermidis* und *S. saprophyticus* als Vertreter der Hautflora (7). Vermutlich haben *Pseudomonas*-Spezies bei der Ausbreitung von Resistenzen die gleiche Funktion in aquatischen und terrestrischen Habitaten. Weiterhin können bei Gram-negativen Bakterien Plasmide mit einem breiten Wirtsbereich (z.B. solche der *incQ*-Gruppe) für eine weite Verbreitung der Resistenz sorgen (8).

Die Fähigkeit, Resistenzplasmide zu erwerben und damit eine Reservoirfunktion auszuüben, ist nicht gleichmäßig bei allen Stämmen der Spezies *E. coli* vorhanden (9). So zeigt *E. coli* Stamm Nissle 1917 (DSM 6601) in vitro nur eine geringe Kapazität als Rezipient. Ein Transfer von 26 Plasmiden verschiedener Inkompatibilitätsklassen (IncB-IncZ) wurde in DSM 6601 im Vergleich zum Standardrezipienten *E. coli* K12 J53 mit identischer Rate für drei Plasmide (100 %; IncOF, IncT, IncX) und mit z. T. deutlich verminderter Rate nachgewiesen (0–50 %) (10). Bemerkenswerterweise ist auch bei *E. coli*-Stämmen, die das hämolytisch-urämische Syndrom verursachen, eine Antibiotikaresistenz sehr selten.

Vor allem Krankenhäuser und die industriemäßige Tiermast sind Bereiche eines beträchtlichen antibiotischen Selektionsdruckes. Wie in Abbildung 1 gezeigt wird, sind verschiedene Wege der Ausbreitung der Resistenz zwischen diesen Bereichen vorstellbar. Die Nahrung und das Wasser spielen dabei wahrscheinlich eine wesentliche Rolle. Die klonale Ausbreitung resistenter Bakterienstämme von Tieren zum Menschen ist für Zoonose-Erreger, wie z. B. *Campylobacter* oder *S. typhimurium*, gut dokumentiert. Es ist wenig wahrscheinlich, dass es für Besiedler des Intestinaltraktes wie *E. coli* und *E. faecium* universelle Rezeptoren der Darmmukosa bei verschiedenen Makroorganismen gibt. Die Übertragung von Resistenzgenen zwischen verschiedenen mikroökologischen Systemen benötigt Bakterien mit einer Reservoir-Funktion.

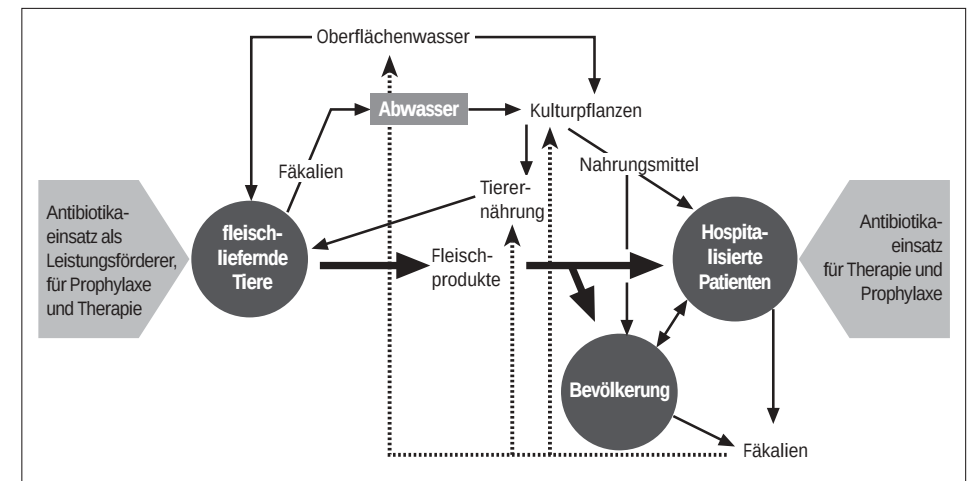


Abb. 1: Möglichkeiten der Resistenzausbreitung von Antibiotika

Übertragung von Resistenzgenen im Gastrointestinaltrakt

Schon sehr bald nach der Entdeckung der plasmidkodierten übertragbaren Antibiotikaresistenz bei Enterobacteriaceae („infektiöse Resistenz“) wurde auch der Nachweis der Übertragung in der Intestinalflora des Menschen geführt (10). Wie kürzlich gezeigt wurde, können auch konjugative Resistenzplasmide Gram-positiver Bakterien im Magen-Darm-Trakt von Säugern ausgetauscht werden (11).

Die Ausbreitung von Resistenzen über Fleischprodukte

Ogleich die Hygienestandards der Fleischproduktion in den industrialisierten Ländern recht hoch sind, kann eine bakterielle Kontamination der Fleischprodukte nicht vollständig vermieden werden. Die Bedeutung von Fleischprodukten für die Ausbreitung der Antibiotikaresistenz wurde im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Ökologie der Antibiotikaresistenz bei Enterokokken besonders deutlich.

Nachdem das Bestehen eines beträchtlichen Reservoirs der übertragbaren Glykopeptidresistenz bei *E. faecium* vom *vanA*-Typ bei Masttieren erkannt wurde (12, 13), haben nachfolgende Untersuchungen ihr Vorkommen in Fleischprodukten und wahrscheinlich daraus herrührend im Intestinaltrakt (Stuhlproben) von nichthospitalisierten Menschen in europäischen Ländern gezeigt (14, 15). In den USA wird das Glykopeptid Avoparcin nicht als Leistungsförderer eingesetzt. Dort wurden keine Glykopeptid-resistente *E. faecium* (GREF) nachgewiesen, auch nicht bei gesunden, nicht hospitalisierten Menschen (16). Das gleiche war der Fall bei einer Studie in den Niederlanden unter strikten Vegetariern (17).

E. faecium-Stämme zeigen unabhängig von ihrer ökologischen Herkunft eine Vielzahl unterschiedlicher Makrorestriktionsmuster, sie sind polyklonal. Auch Plasmide, die das *vanA*-Gencluster tragen, zeigen unterschiedliche Restriktionsmuster (13, 14).

Mittels PCR-Charakterisierung ist es möglich, unterschiedliche Varianten des *vanA*-Genclusters zu unterscheiden. Die Ausbreitung der Glycopeptidresistenz beruht sehr wahrscheinlich auf einer Verbreitung des *vanA*-Genclusters zwischen einer Vielzahl unterschiedlicher *E. faecium*-Stämme im Intestinaltrakt verschiedener Makroorganismen (18 – 21).

Die gleiche Situation wie für die Selektion der Glykopeptidresistenz im Zusammenhang mit der Verfütterung von Avoparcin wurde kurze Zeit später für die Streptograminresistenz und den Einsatz von Virginiamycin beobachtet. Virginiamycin ist ein Gemisch von Streptograminen der Gruppen A und B, dessen Weiterentwicklung das humantherapeutisch eingesetzte Quinupristin/Dalfopristin ist.

Eine Resistenz gegen Quinupristin/Dalfopristin bedarf vor allem der Resistenz gegen die A-Komponente, die auf einer Acetylierung beruht (Acetyltransferasen *vatD* und *vatE*; daneben gibt es noch unbekannte Mechanismen). Die auf *vatD* und *vatE* beruhende Resistenz wurde bei *E. faecium* vom Menschen bereits vor dem Einsatz von Quinupristin/Dalfopristin gefunden (22). Die gleichen Resistenzgene kommen bei Stämmen von Masttieren und Fleischprodukten vor (23). Wie schon bei glykopeptidresistenten *E. faecium* beobachtet, sind streptograminresistente *E. faecium* polyklonal und auch die Streptograminresistenzplasmide sind polymorph (24).

Übertragung der Antibiotikaresistenz durch Wasser

Über das massive Vorhandensein antibiotikaresistenter Enterobacteriaceae in Kläranlagen und ihrer Abflüsse wurde in mehreren Untersuchungen berichtet. Antibiotikaresistente *E. coli* wurden auch in Oberflächenwasser gefunden (Zusammenfassung bei 25). Obgleich die Darmflora das natürliche Habitat der Enterobacteriaceae ist, können sie in anderen, extrakorporalen Ökosystemen gut überleben und Resistenzplasmide übertragen (26, 27).

Weiterhin wurde in situ der Transfer von Resistenzplasmiden bei *E. faecalis* (28) nachgewiesen und die Übertragung des Resistenzplasmides RP4 mit weitem Wirtsbereich von *P. putida* auf die spezifische Mikroflora von Kläranlagen gezeigt (29). Es ist jedoch bisher weitgehend unbekannt, wie stabil Resistenzplasmide in Enterobacteriaceae unter diesen Bedingungen sind und ob eine Rückübertragung aus der spezifischen Makroflora aquatischer Ökosysteme auf *E. coli* erfolgt.

In hoch industrialisierten Ländern werden sehr wahrscheinlich Menschen keine antibiotikaresistenten Bakterien über Trink- und Badewasser aufnehmen, ein Erwerb über das Schwimmen in offenen Gewässern ist jedoch denkbar.

Abwasser und Oberflächenwasser werden für die Beregnung von Feldern verwendet und stellen einen potentiellen Übertragungsweg für Antibiotikaresistenzen dar. In einer Studie aus Deutschland wurden multiresistente coliforme Bakterien sowohl im Abwasser aus der Kläranlage eines Tierzuchtbetriebes als auch auf dem Pflanzenaufwuchs der damit beregneten Felder nachgewiesen (30).

Ergebnissen einer Studie in Finnland zufolge gibt es offenbar nur eine begrenzte Übertragung von Antibiotikaresistenzen auf den Menschen durch kontaminiertes Gemüse. Enterobacteriaceae von Feldgemüse zeigen im Vergleich zu denen vom Menschen nur selten eine Multiresistenz, Resistenz gegen Gentamicin wurde nicht gefunden (31).

Übertragung von Antibiotikaresistenzen in terrestrischen Ökosystemen

Natürliche Böden enthalten eine Vielzahl von Mikroorganismen, die bisher nur selten in vitro kultivierbar sind. Wie in anderen Ökosystemen auch, hängt die Fähigkeit zum Überleben davon ab, dass die Vermehrungsrate höher ist als die Absterberate. Für Enterobacteriaceae ist dies offenbar der Fall, sie können im Boden mit der spezifischen Flora konkurrieren (32).

Sehr wahrscheinlich liegt der evolutionäre Ursprung vieler Resistenzgene der bakteriellen Mikroflora des Menschen bei den antibiotikaproduzierenden Bodenmikroorganismen. Es gibt zunehmende Beweise dafür, dass *Pseudomonas*- und *Acinetobacter*-Spezies eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Resistenzgenen in der Rhizo- und Phytosphäre spielen (33 – 36). Es ist deshalb denkbar, dass Resistenzgene die Mikroflora des Menschen über Pflanzen und Gemüse erreichen können.

Antibiotika im Wasser und im Boden

Für Prophylaxe, Therapie und als Leistungsförderer in der Tierernährung eingesetzte antibakterielle Wirkstoffe werden letztendlich vom Makroorganismus ausgeschieden und gelangen in das Abwasser, die Kläranlagen und ihre Abläufe. Die dort gemessenen Konzentrationen liegen weit unter den minimalen Hemmkonzentrationen für Bakterien (37). Bei Anaerobiern wurde eine Stimulierung der Übertragung des Transposons 916 durch subinhibitorische Tetrazyklinkonzentrationen nachgewiesen (38).

Hingegen konnten für subinhibitorische Konzentrationen von Oxytetracyklin, von Makroliden, Glykopeptiden und Streptograminen keine Erhöhung der konjugativen Übertragung der Glykopeptidresistenz und der Streptograminresistenz bei *E. faecium* erzielt werden (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Dr. rer. nat. G. Werner

Robert Koch-Institut
Burgstr. 37
38843 Wernigerode

Literatur

1. Levy S. Balancing the drug resistance equation. Trends Microb. 2, 1994, 341-342.
2. Davies J. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance. In: Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim. 1997, 15-35.
3. Roberts M. Tetracycline resistance determinants, mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. FEMS Microbiol. Rev. 19, 1996, 1-24.
4. Bush K. The evolution of β -lactamases. In: Antibiotic resistance: origin, evolution, selection and spread. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, 1997, 152-166.
5. Witte W. Recent epidemiological aspects of antibiotic resistance in staphylococci and enterococci. Biospektrum, Sonderausgabe, 1997, 9-13.
6. Levy SB, Marshall B, Schnederberg S, Rowse D, Davis J. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1988, 1801-1806.
7. Archer G. Alteration of cutaneous staphylococcal flora as a consequence of antimicrobial prophylaxis. Rev. Infect. Dis. 13 Suppl. 10, 1983, 805-809.
8. Tietze E. Nucleotide sequence and genetic characterization of the novel *incQ* plasmid pIE1107. Plasmid 39, 1998, 165-181.
9. Tschäpe H, Böhme G. 1989. Unveröffentlichte Daten.
10. Anderson ES. Viability and transfer of a plasmid from *E. coli* K12 in the human intestine. Nature, 255, 1975, 502-504.
11. Jacobsen BL, Skou M, Hammerum AM, Jensen LB. Horizontal transfer of the *satA* gene encoding streptogramin resistance between isogenic *Enterococcus faecium* strains in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. Microbial Ecology in Health and Disease 11, 1999, 241-247.
12. Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. Microb. Drug Res. 1, 1995, 255-257.
13. Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W. *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. FEMS Microbiol. Lett. 125, 1995, 165-172.
14. Klare I, Heier H, Witte W. *Enterococcus faecium* strains with *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. Microb. Drug Res. 1, 1995, 265-272.
15. Witte W, Klare I. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside hospitals: a commentary. Microb. Drug Res. 1, 1995, 259-263.
16. Coque TM, Tomayko JF, Riche SC, Okkysen PC, Murray B. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community and animal sources in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1996, 2605-2609.
17. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Konstantje JA. VRE and meat. Lancet 349, 1997, 1258.
18. Werner G, Klare I, Witte W. Arrangement of the *vanA* gene cluster in enterococci of different ecological origin. FEMS Microbiol. Lett. 155, 1997, 55-61.
19. Simonsen O, Haaheim H, Dahl KH, Kruse H, Loveseth A, Olsvik O, Sundsfjord A. Transmission of *vanA* type vancomycin-resistant enterococci and *vanA* resistance elements between chicken and humans at avoparcin exposed farms. Microb. Drug Res. 4, 1998, 313-318.
20. Van den Braak N, Van Belkum A, Keulen J, Vlieghehart J, Verbrugh HA, Endz HP. Molecular characterization of vancomycin resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 36, 1998, 1927-1932.
21. Jensen LB, Ahrens P, Dons L, Jones R, Hammerum AM, Aarestrup FM. Molecular analysis from animals and humans. J. Clin. Microbiol. 36, 1998, 437-442.
22. Werner G, Klare I, Witte W. Association between quinupristin/dalfopristin resistance in glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* and the use of additives in animal feed. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17, 1998, 401-402.
23. Werner G, Witte W. Characterization of a new enterococcal gene, *satG*, encoding a putative acetyltransferase conferring resistance to streptogramin A compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1999, 1813-1814.
24. Werner G, Klare I, Heier H, Hinz K-H, Böhme G, Wendt M, Witte W. Quinupristin/dalfopristin-resistant enterococci of the *satA*(*vatD*) and *satG*(*vatE*) genotypes from different ecological origins in Germany (2000) Microb. Drug Resist. 6, 2000, 37-47.

25. Heier H, Tschäpe H. Über das Vorkommen von R-Plasmiden in *E. coli* und koliformen Keimen aus Wasser und Abwasser. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 12, 1984, 47-54.
26. Pickup RW, Morgan JAW, Winstanley C. In situ detection of plasmid transfer in the aquatic environment. In: Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment. C. Edwards, Ed., John Wiley & Sons, Chichester, New York, 1993, 62-82.
27. Dahlberg C, Bergström M, Hermansson M. In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1998, 2670-2675.
28. Marcinek H, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A, Gauer M. *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1998, 626-632.
29. Geisenberger O, Ammendola A, Christensen BB, Molin S, Schleifer KH, Eberl L. Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. FEMS Microbiol. Lett. 174, 1999, 9-17.
30. Feuerpfeil I, Lopez-Pila J, Schmidt R, Schneider E, Szewzyk R. Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 42, 1999, 37-50.
31. Österblad M, Pensala O, Peterzens M, Heleniuse H, Huovinen P. Antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae isolated from vegetables. J. Antimicrob. Chemother. 43, 1999, 503-509.
32. Wellington EMH, Herron PR, Cresswell N. Gene transfer in terrestrial environments and the survival of bacterial inoculants in soil. In: Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment. C. Edwards, Ed., John Wiley & Sons, Chichester, New York, 1993, 137-170.
33. Troxler J, Azelvandre P, Zala M, Defaago G, Haas D. Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1997, 213-219.
34. Sikoski J, Graupner S, Lorenz MO, Wackernagel W. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. Microbiology 144, 1998, 569-576.
35. Kidambi SP, Ripp S, Mitter RV. Evidence for phage mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1994, 496-500.
36. Williams HG, Day MJ, Fry JC, Stewart GJ. Natural transformation in river epilithion. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1996, 2994-2998.
37. Hirsch R, Ternes T, Haberer H, Kratz KL. Nachweis von Antibiotikarückständen in der aquatischen Umwelt. Jahrestagung Fachgruppe Wasserchemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Lübeck, 18.05.-20.05.1998, Tagungsband, 273-276.
38. Salyers AA, Shoemaker N. Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. Clin. Infect. Dis. 23, Suppl. 1, 1996, 36-43.

Klinische Bedeutung von *Escherichia coli* Teil 1

Vorsitzende:



Prof. Dr. J. Emmrich



Prof. Dr. E. G. Hahn

Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

J. Schölmerich

Die Expression humaner Defensine bei CED

E.F. Stange

Extraintestinale Manifestationen bei CED

S. Schreiber

Klinische Bedeutung von *E. coli* Stamm Nissle 1917 in der Therapie der Colitis ulcerosa und des Morbus Crohn

W. Kruis

Der Pouch als Entzündungsmodell

M. Zeitz

Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

J. Schölmerich



Prof. Dr. J. Schölmerich

Abstract

Die Kenntnisse bezüglich der Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa haben während der letzten Jahre drastisch zugenommen. Es wird heute allgemein akzeptiert, dass eine genetische Suszeptibilität vorhanden ist und dass zusätzliche Umweltfaktoren eine wesentliche Rolle für die Manifestation der Erkrankung spielen. Die Bedeutung der bakteriellen Flora wurde in den letzten Jahren besonders intensiv untersucht und hat auch zu Therapieansätzen geführt.

Das Vorhandensein einer genetischen Suszeptibilität wurde zunächst durch Zwillingsstudien belegt. Die Suche nach den verantwortlichen Genen führte allerdings eher zur Verwirrung. Inzwischen sind mit modernen Technologien auf allen außer 4 Chromosomen Genloci beschrieben worden. Eine Anzahl von Kandidatengenen, die im Wesentlichen der dominierenden immunologischen Hypothese der Ätiologie zuzuordnen sind, wurden vorgeschlagen. Das Bild bleibt dennoch bislang unklar und die wesentliche Erkenntnis liegt darin, dass es sich weder beim Morbus Crohn noch bei Colitis ulcerosa um einzelne Krankheitsentitäten, sondern eher um Syndrome handelt. Verschiedene neue Marker wie Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) und antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (p-ANCA) wurden benutzt, um unterschiedliche Patientengruppen zu beschreiben, die sogar unterschiedlich auf differenzielle Therapien ansprechen.

Um die Suche nach den Patientensubgruppen zu vereinfachen, wurde 1998 eine phänotypische Klassifikation des Morbus Crohn durch eine internationale Gruppe erarbeitet (Vienna Classification). Diese Klassifikation definiert Patientengruppen, die bezüglich der Lokalisation, des Krankheitsverhaltens und des Manifestationsalters differieren und unterschiedliche Entitäten repräsentieren können. Auch eine Untergruppe von Patienten aus Familien, in denen sowohl Colitis ulcerosa als auch Morbus Crohn vorkommen und solche mit zusätzlicher primär sklerosierender Cholangitis (PSC) stellen vermutlich Subpopulationen dar.

Bezüglich der Umweltfaktoren wurde die Hygienehypothese intensiv diskutiert. Eine zunehmende Zahl von Daten unterstützt diese Hypothese, die einen fördernden Einfluss einer frühkindlichen Hygiene für die spätere Manifestation eines Morbus Crohn postuliert. In diese Richtung weisen auch Untersuchungen zum Einfluss des Vorhandenseins älterer Geschwister und konjugaler Formen des Morbus Crohn.

Die Rolle der endogenen bakteriellen Flora wurde intensiv untersucht. Versuche, die Darmflora zu modulieren, beispielsweise durch Probiotika, basieren auf diesem Konzept. Alternative Hypothesen zur Krankheitsentstehung, die einen primären Defekt der Schleimhautbarriere oder gestörte Interaktionen zwischen Nervensystem und Immunzellen postulieren, gewinnen an Bedeutung.

Einleitung

Seit mehr als 100 Jahren sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) bekannt. Ebenso lang wird nach einer kausalen Therapie und Modellen zum Verständnis der Ätiologie und Pathophysiologie gesucht.

Ein Paradigma für die humanen Formen der CED stellt das Wollkopffäffchen (*Saguinus oedipus oedipus*, cotton-top tamarins, Abb 1.) dar, welches in Zentralamerika lebt (1-3). In Gefangenschaft entwickeln ca. 60 % dieser Tiere eine chronische Kolitis, die sich in 3 Typen manifestiert. Ein Typ ähnelt klinisch und histologisch der Kolitis beim Menschen. Die Erkrankung dieser Affen ist familiär akzentuiert und weist damit auf eine genetische Grundlage hin. Den Einfluss der Umwelt stellt die spezielle Situation der Gefangenschaft dar.



Abb. 1:
Wollkopffäffchen
(*Saguinus oedipus oedipus*, cotton-top tamarins)

Genetische Suszeptibilität

Aus Zwillingsuntersuchungen, dem klassischen „Instrument“ zum Nachweis genetischer Grundlagen, ist eine familiäre Häufung für den Morbus Crohn bekannt (Tab. 1). Es zeigt sich auch, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen offensichtlich polygen vererbte Erkrankungen darstellen.

Sehr viele Gene wurden angeschuldigt, unbekannt ist nach wie vor das Substrat einer genetischen Suszeptibilität. Eine mögliche Folge könnte eine erhöhte intestinale Per-

Tab. 1:
Konkordanzrate von chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen
bei Zwillingen (4)

	monozygot	dizygot
Morbus Crohn	58 %	4 %
Colitis ulcerosa	6 %	<1 %

meabilität bei Patienten mit Morbus Crohn sein, die dann als Folge zu einer ständigen verstärkten Auseinandersetzung des darmassoziierten Immunsystems mit luminalen Bestandteilen führt. Bei Verwandten dieser Patienten war dies auch dann der Fall, wenn sie klinisch gesund waren (5). Diese Untersuchungen wurden von anderen Autoren partiell bestätigt, sodass eine „Barriere-Störung“ als möglicher grundlegender Faktor gilt.

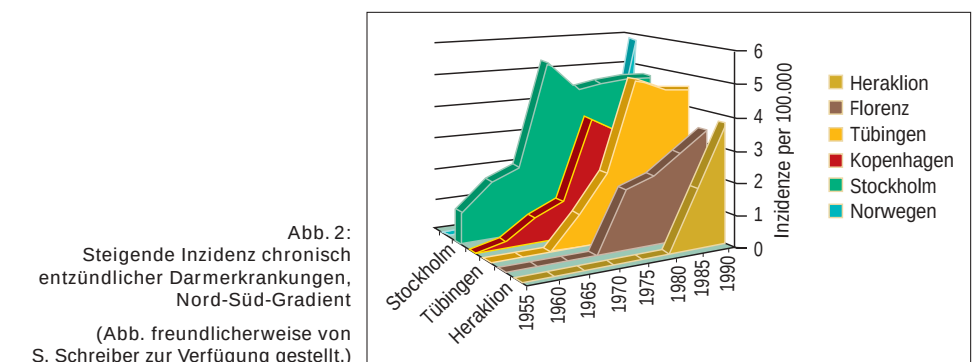
Zur Identifizierung der verantwortlichen Gene stehen grundsätzlich 2 Methoden zur Auswahl:

1. Suche nach Kandidaten-Genen, z.B. Analyse von Transplantationsantigenen, Antikörpern oder Zytokinen wie HLA, pANCA, TNF oder IL-1ra.
Bis zum Jahr 2000 hat man keine eindeutigen Kandidaten-Gene entdeckt.
2. Systematisches Screening des menschlichen Genoms.

Die Suche nach den verantwortlichen Genen führte allerdings eher zur Verwirrung. Auf allen außer 4 Chromosomen wurden Genloci entdeckt. Favoriten sind die Chromosomen 1, 3, 6, 7, 12, 16, X mit Genprodukten wie z.B. IL-1, IL-1RA, MICA, TNF, viele Zytokin-Gene, MHC, Defensine, TGF- β , NF κ B, Muzine (6-31). Einige davon waren zumindest im Hinblick auf die Region im Genom von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Teilen der Welt reproduzierbar. Eine Anzahl von Kandidatengen, die im Wesentlichen der dominierenden immunologischen Hypothese der Ätiologie zuzuordnen sind, sind vorgeschlagen worden. Das Bild bleibt dennoch bislang unklar und die wesentliche Erkenntnis liegt darin, dass es sich weder beim Morbus Crohn noch bei der Colitis ulcerosa um einzelne Krankheitsentitäten handelt, sondern eher um Syndrome.

Umweltfaktoren

Betrachtet man die steigende Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in Europa, so fällt auf, dass es in den untersuchten Ländern zunächst zu einem steilen Anstieg und dann zu einem Plateau kommt (Abb. 2). Der Anstieg der Inzidenz beim



Morbus Crohn zeigt einen zeitlichen Nord-Süd-Gradienten. Der Anstieg erfolgte in den nordeuropäischen Ländern früher. Auf mangelnde diagnostische Möglichkeiten kann dieses Phänomen nicht zurückgeführt werden, da die Endoskopie zeitgleich verfügbar war. Eine ähnliche Häufigkeitszunahme der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird derzeit in Ländern wie Malaysia, Korea und Chile beobachtet.

Diese Entwicklung lässt das Vorhandensein eines Faktors vermuten, der sich von Nord nach Süd ausbreitet und in sich zum westlichen Lebensstandard entwickelnden Ländern momentan zum Tragen kommt.

Häusliche Hygiene und Familie

Ein englische retrospektive Studie untersuchte Einflüsse häuslicher Hygiene (Tab. 2) (32). Dabei fand sich für die Menschen ein höheres Risiko, später an Morbus Crohn zu erkranken, die während der Kindheit ein Badezimmer mit heissem Wasser und/ oder eine separate Toilette hatten. Das gilt nicht für die Colitis ulcerosa. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass ein höheres Maß an frühkindlicher Hygiene für den Morbus Crohn prädestiniert. Dies passt zu den eingangs erwähnten epidemiologischen Daten. Die Art und Weise einer sogenannten „hygienischen Lebensführung“, wie sie in Deutschland seit den 50er und 60er Jahren existiert, entwickelt sich derzeit z. B. auch in Malaysia und Chile und führt dort zu einem Anstieg in der Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Relatives Risiko	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Wasserhahn (heisses Wasser)	5,0* (1,4-17,3)	1,3 (0,7-2,2)
Wasserhahn (kaltes Wasser)	1,8 (0,6-5,4)	0,9 (0,5-1,7)
Separate Toilette	3,3* (1,3-8,3)	1,3 (0,7-2,4)
Abwassersystem	2,6 (0,9-7,3)	1,2 (0,7-2,1)
Appendektomie	1,4 (0,6-3,4)	0,3* (0,1-0,6)

Tab. 2: Hygiene in der Kindheit, * signifikanter Unterschied (32)

Weitere Daten belegen den Einfluss der frühkindlichen Hygiene: Untersucht man die Geschwisterzahl und das Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, so findet man für den Morbus Crohn ein geringeres relatives Risiko, wenn es mehr ältere Geschwister in der Familie gibt, die beispielsweise aus dem Kindergarten Krankheiten mitbringen und die jüngeren Geschwister anstecken. Für die Colitis ulcerosa ist es eher umgekehrt.

Das relative Risiko bei größerer Zahl älterer Geschwister beträgt für

- Morbus Crohn: 0,32 (0,13-0,82)
- Colitis ulcerosa: 3,11 (1,22-7,94).

Wie auch aus der pädiatrischen Infektiologie bekannt, haben jüngere Geschwister dabei keinen Einfluss. So gesehen könnten frühkindliche Infektionen davor schützen, später an Morbus Crohn zu erkranken.

Es gibt auch konjugale Formen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, d.h. beide Ehepartner sind erkrankt. Von 30 betroffenen Paaren aus Frankreich und Belgien waren 17 an Morbus Crohn erkrankt, 3 hatten eine Colitis ulcerosa und 10 Mischformen (33). Dabei fanden sich:

- Symptome vor der Hochzeit bei beiden Partnern: 2
- Symptome vor der Hochzeit bei einem Partner: 6
- Symptome nach der Hochzeit bei beiden Partnern: 22

9 von 54 Kindern dieser Paare entwickelten ebenfalls eine CED. Das spricht für das Vorhandensein eines exogenen Faktors.

Medikamente

In den Regionen der Welt, in denen chronisch entzündliche Darmerkrankungen auftreten, werden bei verschiedenen Indikationen öfter nicht-steroidale Antiphlogistika eingenommen. Diese Medikamente erhöhen die Rezidivwahrscheinlichkeit bei einmal manifester Krankheit (Tab. 3).

Tab. 3: Medikamente als Risikofaktoren für Rezidive bei CED; *signifikant	nicht-steroidale Antiphlogistika	2,4 (1,2-5,0)*
	Antibiotika	2,0 (1,1-3,7)*
	Paracetamol	1,1 (0,8-1,6)
	Aspirin	0,8 (0,5-1,4)

Dies gilt ebenfalls für die Erstmanifestation. Diese Substanzen schädigen auch die intestinale Barriere. Ihr negativer Einfluss und seine Folgen stützen das gegenwärtige pathophysiologische Modell der Interaktionen zwischen der Darmflora und dem Immunsystem.

Rauchen

Auch das Rauchen ist ein bekannter Risikofaktor für den Morbus Crohn (34, 35). Rauchende Frauen mit dieser Erkrankung haben ein doppeltes Risiko, irgendwann Immunsuppressiva zu benötigen.

Zusammenfassend lässt sich bei den Umweltfaktoren festhalten, dass eine Summe mehrerer Faktoren bekannt ist, die das Risiko zur Manifestation einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung erhöhen. Deswegen wird auch von einer „Zivilisationskrankheit“ gesprochen, die in der „westlichen Welt“ vermehrt auftritt.

Der Morbus Crohn – ein Syndrom

Verschiedene Aspekte sprechen dafür, dass es sich beim Morbus Crohn nicht um eine einheitliche Entität handelt, sondern um ein Syndrom mit verschiedenen Subgruppen. Morbus Crohn-Patienten, deren Erst-OP wegen einer Perforation erfolgte, wiesen in einem hohen Anteil dieselbe Indikation für die Zweit-OP auf (Tab. 4). Bei Patienten, die primär z.B. wegen Narben und Strikturen operiert wurden, war diese OP-Indikation wesentlich seltener. Auch die Zeit bis zum zweiten Eingriff ist deutlich verschieden bei beiden Gruppen (36). Offenbar unterscheiden sich die Krankheitsverläufe bei den einzelnen Subpopulationen.

Operierte Patienten	perforiert (n = 375)	nicht perforiert (n = 395)
Zweit-OP wegen Perforation	73 %	29 % *
Jahre bis zur Reoperation	4,7	8,8 *

Tab. 4: Perforierender und nicht perforierender Morbus Crohn (36), * signifikant

Ein Beispiel, welches die klinischen Unterschiede in der Ausprägung eines Morbus Crohn zeigt, gibt Abb. 3. Abgebildet ist ein junger Mann mit einem Morbus Crohn des Mundes, der massiv geschwollene Lippen und Granulome in der Wangenschleimhaut hat. Dies ist ein völlig anderes Befallsmuster als zum Beispiel bei Patienten, die Narben und Strikturen in der Darmwand mit entsprechenden Schmerzen haben oder gar Fisteln und Perforationen aufweisen. Diese Krankheitsausprägungen können keine einheitliche Entität darstellen, auch wenn derzeit noch all diese Manifestationen als Morbus Crohn subsummiert werden.



„Ein Rheumatologe benutzt lieber die Zahnbürste seines Kollegen als dessen Klassifikation.“
(Mathies)

Abb. 3: Patient mit Morbus Crohn

Die Krankheitsverläufe des Morbus Crohn bei den einzelnen Subgruppen unterscheiden sich ebenso wie die Manifestationsform und Lokalisation (Tab. 5 und 6) (37). Zum Beispiel ist die Zahl der Operationen bei Patienten mit strikturierend-fibrosierenden Formen viel höher als bei Patienten mit inflammatorischen Formen und hängt auch von der Lokalisation ab.

Lokalisation	n	OP innerhalb von 8 Jahren [%]
Ileum und Kolon	34	29
nur Ileum	29	44
nur Kolon	20	25

Tab. 5: Subgruppen von Patienten mit Morbus Crohn und OP-Häufigkeit (37)

Manifestationsform	n	schwere Erkrankung [%]	OP innerhalb von 2 Jahren [%]	OP innerhalb von 8 Jahren [%]
strikturierend / fibrosierend	27	80	52	65
inflammatorisch	56	7,7	6	15

Tab. 6: Subgruppen von Patienten mit Morbus Crohn haben unterschiedliche Verläufe (37)

Es besteht weiterhin eine Korrelation zwischen präoperativer Ausdehnung und Rezidivausdehnung beim Morbus Crohn (38). Das bedeutet, wer einmal einen ausgedehnten Befall hatte und deswegen operiert wurde, hat ein hohes Risiko, bei einer Zweitoperation erneut ein größeres Darmsegment reseziert zu bekommen.

Die unterschiedlichen Ausprägungen des Morbus Crohn haben auch Auswirkungen auf die Therapie (Tab. 7). So können Patienten mit nicht perforierendem Morbus Crohn erfolgreicher mit 5-ASA und Antibiotika behandelt werden, um eine Rezidivoperation hinauszuschieben, Patienten mit perforierendem Morbus Crohn dagegen eher mit Steroiden und/oder Immunsuppressiva (39). Wenn es also irgendwann möglich sein sollte, Subgruppen von Morbus Crohn-Patienten zu definieren, wird das auch Konsequenzen für eine erfolgreiche Therapie haben.

	perforierend	nicht perforierend	perianal
5-ASA / Antibiotika	2,3 ± 2,2 Jahre	12,9 ± 6,8 Jahre	3,5 ± 3,3 Jahre
Steroide / Immunsuppressiva	6,4 ± 7,5 Jahre	3,8 ± 4,0 Jahre	2,9 ± 1,7 Jahre

Tab. 7: Zeit bis zur Rezidivoperation bei Subtypen des Morbus Crohn, Effekte der postoperativen Rezidivprophylaxe bei 232 Patienten (39)

Unterschiedliche Formen des Morbus Crohn lassen sich auch anhand von Zytokinen und ihren „Gegenspielern“ nachweisen (40). Werden z.B. das IL-1 β und der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1 RA) bestimmt und wird daraus der Quotient gebildet, finden sich deutliche Unterschiede zwischen perforierendem und nicht perforierendem Verlauf (Tab. 8). Das weist erneut auf eine genetische Suszeptibilität hin.

	perforierend	nicht perforierend
IL-1 β *	464 $\pm$ 154	12582 $\pm$ 4733
IL-1 RA	2194 $\pm$ 775	9715 $\pm$ 2988
IL-1 RA / IL-1	4,7	1,3

Tab. 8: Unterschiedliche Formen des Morbus Crohn (40), * bestimmt mittels quantitativer PCR für mRNA

Zytokine haben einen wesentlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Dies ergibt sich aus der erfolgreichen Therapie mittels spezifischer Antagonisten sowohl im Tierexperiment als auch bei der Verwendung in der Humanmedizin. So heilt eine chronische Dextransulfat-induzierte Kolitis nach Gabe von anti-TNF α - und anti-IFN γ -Antikörpern teilweise ab. Die Kombination ist dabei stärker wirksam als die Monotherapie (41).

Fasst man die einzelnen Befunde zusammen, so findet sich eine überschießende oder unkontrollierte Reaktion des intestinalen Immunsystems auf Bestandteile im Darmlumen, insbesondere auf Bakterien. Es folgt eine Freisetzung von Interleukinen, Chemokinen und TNF α , wodurch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zur Produktion weiterer Mediatoren angeregt werden, was letztendlich zur Zerstörung der Darmepithelzelle führt (Abb. 4). Medikamente, die nur einen dieser Schritte blockieren, sind meist wenig wirksam.

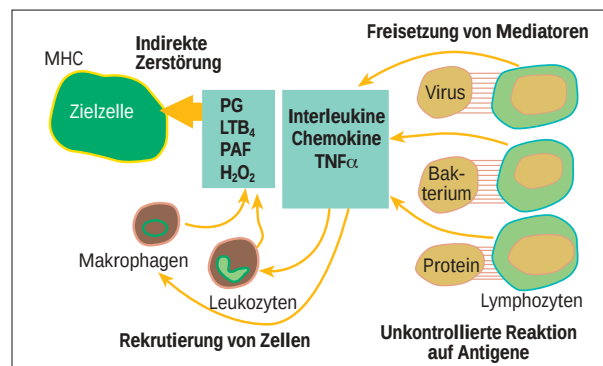


Abb. 4: Prinzipien der Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

„Wenn man aus einem Orchester ein Instrument entfernt, dann spielt es zwar nicht mehr so schön, aber es spielt noch.“

Wirksame Therapeutika zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beeinflussen meist mehrere Stufen im Entzündungsprozess, unwirksame Medikamente sind meist nicht so pluripotent.

Eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt der Transkriptionsfaktor NF κ -B (42). Eine Hemmung dieses Faktors oder seiner Aktivierung führt zu einer deutlichen Besserung des klinischen Verlaufs chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Tiermodell. Möglich ist dies zum Beispiel tierexperimentell mit dem Gift Gliotoxin, welches intraperitoneal gegeben die akute Dextransulfat-induzierte Kolitis unterdrückt und die NF κ -B-DNA-Bindungsaktivität in vivo hemmt. Dieser Effekt der Entzündungshemmung stellt sich dosisabhängig ein. Systemisch sollte NF κ -B nicht unterdrückt werden, da es auch eine physiologische Bedeutung hat. So könnte eine ubiquitäre Ausschaltung von NF κ B zu einer deutlichen Abnahme der Infektionsresistenz und der endogenen Tumorabwehr führen.

Eine Alternativhypothese zur Ätiologie der Colitis ulcerosa postuliert den primären Defekt im Cytochrom P 450-System der Leber (43). Dazu passt die Beeinflussung des Krankheitsverlaufs durch Rauchen, orale Kontrazeptiva und Umweltfaktoren. Vorstellbar wäre, dass ein durch ein defektes Cytochrom entstehender toxischer Metabolit über die Galle in den Darm gelangt. So wären Schäden im Gallengangs- und Darmepithel zu erklären, mit oder ohne bakterielle Dekonjugation. Es gibt dafür keine Beweise, aber die These hat einen logischen Ansatz.

Im Tierexperiment lassen sich intestinale Entzündungen durch Therapie mit Ursodesoxycholsäure deutlich verbessern. Dies gilt für die durch Indometacin induzierte Ileitis und für die TNB (trinitrobenzene sulphonie acid)-Kolitis (44, 45). Deutlich wird dies durch eine Abnahme der Leukozytenzahl, die Verbesserung des mikroskopischen Scores und eine Gewichtszunahme. Es zeigt weiterhin, dass nicht alle Vorgänge immunologischer Natur sind, da Gallensäuren keine Immunzellen beeinflussen. Auch der pH-Wert des Darminhaltes beeinflusst das Ausmaß der intestinalen Entzündung. Je basischer der Darminhalt ist, desto niedriger ist der makroskopische Score der Entzündung und damit die Epitheldestruktion.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich zur Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen derzeit folgender Kenntnisstand festhalten:

- Die Gensuche geht weiter.
- Es bestehen beim Morbus Crohn zahlreiche Patienten-Subpopulationen, deshalb sollte von einem Syndrom statt von einer Krankheit gesprochen werden. Bei der Colitis ulcerosa finden sich ebenfalls unterschiedliche Krankheitsverläufe.

- Die Bedeutung der Umweltfaktoren ist noch nicht endgültig geklärt, auch wenn es evident ist, dass es sich um „Zivilisationskrankheiten“ handelt.
- Die Darmflora hat eine gesicherte Bedeutung, wie aus vielen Untersuchungen bekannt ist.

Weitere Alternativen zum immunologischen Konzept müssen untersucht werden. Dazu gehören die Ursachen für die „Barriestörung“, für primäre „Transportstörungen“ und die Suche nach den verantwortlichen Genen, die gerade beginnt.

Für den Patienten ist wichtig, seine Beschwerden zu bessern, nicht, zu wissen, wie ein Medikament wirkt. Oder um mit Friedrich dem Großen zu sprechen: „Ich halte es für wichtiger, daß der Mensch gut verdaut, als daß er um die letzten Dinge weiß.“

Prof. Dr. med. J. Schölmerich

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Klinikum der Universität Regensburg
93042 Regensburg

Literatur

1. Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Stonerook MJ, Caniano DA, Mutabagani KH, Lhotak S, Sharma HM. Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). Dig Dis Sci 2000;45:385-393.
2. Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Rodriguez M, Rodriguez M, Hernandez C, Stonerook MJ, Sharma HM. Colitis and colon cancer in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus oedipus*) living wild in their natural habitat. Dig Dis Sci 1998;43:1443-1453.
3. Johnson LD, Ausman LM, Sehgal PK, King NW, Jr. A prospective study of the epidemiology of colitis and colon cancer in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). Gastroenterology 1996;110:102-115.
4. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut 1988;29:990-996.
5. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. Ann Intern Med 1986;105:883-885.
6. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide Search in Canadian Families with Inflammatory Bowel Disease Reveals Two Novel Susceptibility Loci. Am J Hum Genet 2000;66:1863-1870.
7. Rioux JD, Daly MJ, Green T, Stone V, Lander ES, Hudson TJ, Steinhart AH, Bull S, Cohen Z, Greenberg G, Griffiths A, McLeod R, Silverberg M, Williams CN, Siminovitch KA. Absence of linkage between inflammatory bowel disease and selected loci on chromosomes 3, 7, 12, and 16. Gastroenterology 1998;115:1062-1065.
8. Brant SR, Panhuysen CI, Bailey-Wilson JE, Rohal PM, Lee S, Mann J, Ravenhill G, Kirschner BS, Hanauer SB, Cho JH, Bayless TM. Linkage heterogeneity for the IBD1 locus in Crohn's disease pedigrees by disease onset and severity. Gastroenterology 2000;119:1483-1490.
9. Brant SR. Evaluation of IBD candidate genes and the case of NRAMP2. Inflamm Bowel Dis 2000;6:99-102.
10. Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, Fields CT, Rabenau K, Corradino S, Brant SR, Espinosa R, LeBeau M, Hanauer SB, Bodzin J, Bonen DK. Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. Hum Mol Genet 2000;9:1425-1432.
11. Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. Gastroenterology 1998;115:1056-1061.
12. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:7502-7507.
13. Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, Bridger S, Macpherson AJ, Stokkers P, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. Gut 2001;48:191-197.
14. Hampe J, Wienker T, Nurnberg P, Schreiber S. Mapping genes for polygenic disorders: considerations for study design in the complex trait of inflammatory bowel disease. Hum Hered 2000;50:91-101.
15. Olavesen MG, Hampe J, Mirza MM, Saiz R, Lewis CM, Bridger S, Teare D, Easton DF, Herrmann T, Scott G, Hirst J, Sanderson J, Hodgson SV, Lee J, MacPherson A, Schreiber S, Lennard-Jones JE, Curran ME, Mathew CG. Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene for association with inflammatory bowel disease. Immunogenetics 2000;51:1-7.
16. Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, Macpherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. Am J Hum Genet 1999;65:1647-1655.
17. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. Am J Hum Genet 1999;64:808-816.
18. Hampe J, Hermann B, Bridger S, Macpherson AJ, Mathew CG, Schreiber S. The interferon-gamma gene as a positional and functional candidate gene for inflammatory bowel disease. Int J Colorectal Dis 1998;13:260-263.
19. Lesage S, Zouali H, Colombel JF, Belaiche J, Cezard JP, Tysk C, Almer S, Gassull M, Binder V, Chamaillard M, Le G, I, Thomas G, Hugot JP. Genetic analyses of chromosome 12 loci in Crohn's disease. Gut 2000;47:787-791.
20. Freeman H, Roeck B, Devine D, Carter C. Prospective evaluation of neutrophil autoantibodies in 500 consecutive patients with inflammatory bowel disease. Can J Gastroenterol 1997;11:203-207.
21. Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G. Etiology of the inflammatory bowel diseases. Int J Colorectal Dis 1999;14:2-9.
22. Hugot JP, Thomas G. Genome-wide scanning in inflammatory bowel diseases. Dig Dis 1998;16:364-369.
23. Vermeire S, Satsangi J, Peeters M, Parkes M, Jewell DP, Vlietinck R, Rutgeerts P. Evidence for inflammatory bowel disease of a susceptibility locus on the x chromosome. Gastroenterology 2001;120:834-840.
24. Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. Am J Hum Genet 2000;67:1605-1610.
25. Vermeire S, Peeters M, Vlietinck R, Parkes M, Satsangi J, Jewell D, Rutgeerts P. Exclusion of linkage of Crohn's disease to previously reported regions on chromosomes 12, 7, and 3 in the Belgian population indicates genetic heterogeneity. Inflamm Bowel Dis 2000;6:165-170.
26. Satsangi J, Jewell D, Parkes M, Bell J. Genetics of inflammatory bowel disease. A personal view on progress and prospects. Dig Dis 1998;16:370-374.
27. Satsangi J, Parkes M, Jewell DP. Molecular genetics of Crohn's disease: recent advances. Eur J Surg 1998;164:887-891.
28. Kyo K, Parkes M, Takei Y, Nishimori H, Vyas P, Satsangi J, Simmons J, Nagawa H, Baba S, Jewell D, Muto T, Lathrop GM, Nakamura Y. Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3. Hum Mol Genet 1999;8:307-311.
29. Parkes M, Satsangi J, Jewell D. Contribution of the IL-2 and IL-10 genes to inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility. Clin Exp Immunol 1998;113:28-32.
30. Hamlin PJ, Komolmit P, Bransfield K, Jones PF, Smith NR, Aldersley MA, Howdle PD, Markham AF, Robinson PA. Identification of multiple candidate genes for IBD susceptibility using high-density transcript mapping in the IBD2 locus on chromosome 12q. Gastroenterology 1999;117:1029-1031.

31. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000;76:473-478.
32. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-767.
33. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001;120:816-819.
34. Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:855-862.
35. Thomas GA, Rhodes J, Green JT, Richardson C. Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J* 2000;76:273-279.
36. Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DB, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, Aufses AH, Jr. Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut* 1988;29:588-592.
37. Perri F, Annese V, Napolitano G, Caruso N, Clemente R, Villani MR, Andriulli A. Subgroups of patients with Crohn's disease have different clinical outcomes. *Inflam Bow Disease* 1996;2:1-5.
38. D'Haens GR, Gasparitis AE, Hanauer SB. Duration of recurrent ileitis after ileocolonic resection correlates with presurgical extent of Crohn's disease. *Gut* 1995;36:715-717.
39. Greenway SE, Buckmire MA, Marroquin C, Jadon L, Rolandelli RH. Clinical subtypes of Crohn's disease according to surgical outcome. *J Gastrointest Surg* 1999;3:145-151.
40. Gilberts EC, Greenstein AJ, Katsel P, Harpaz N, Greenstein RJ. Molecular evidence for two forms of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12721-12724.
41. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999;116:238-245.
42. Neurath MF, Pettersson S. Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* 1997;198:91-98.
43. Crotty B. Ulcerative colitis and xenobiotic metabolism. *Lancet* 1994;343:35-38.
44. Kullmann F, Arndt H, Gross V, Ruschoff J, Schölmerich J. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on mucosal damage in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:1205-1211.
45. Kullmann F, Gross V, Rüschhoff J, Arndt H, Benda W, Winkler vM, Schölmerich J. Effect of ursodeoxycholic acid on the inflammatory activity of indomethacin-induced intestinal inflammation in rats. *Z Gastroenterol* 1997;35:171-178.

Die Expression humaner Defensine bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

E. F. Stange, K. Fellermann, J. Wehkamp



Prof. Dr. E. F. Stange

Abstract

Bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gibt es zahlreiche Hinweise auf eine gegenüber der luminalen bakteriellen Flora gestörte Mukosabariere. Beispielsweise führt die Anlage eines Ileostoma zu einem Rückgang der Entzündung im ausgeschalteten Schenkel, während die Instillation von Lumeninhalt in dieses Dünndarmsegment eine Entzündung hervorruft. Andererseits sind Antibiotika sowohl beim akuten Schub als auch in der Remissionserhaltung therapeutisch wirksam. Die physiologische Toleranz ist gegenüber homologen Stuhlbakterien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aufgehoben.

Die Mukosaoberfläche wird durch ein unspezifisches, angeborenes antimikrobielles System verschiedener Peptide geschützt, das die epitheliale Barriere in Ergänzung zur spezifischen Immunität aufrecht erhält. Die wichtigste Familie dieser antimikrobiellen Peptide bilden die Defensine, die aus kleinen argininreichen Peptiden mit charakteristischen Disulfidbrücken zwischen Cysteinseitenketten mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3-5 kD bestehen. Defensine werden u.a. auf Haut- und Schleimhautoberflächen des menschlichen Körpers exprimiert. Sie weisen eine breite antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Pilze und bestimmte Viren auf. Reife, zum Export bestimmte Defensine entstehen durch proteolytische Spaltung der zugehörigen Vorläufermoleküle, Prepro- und Propeptide genannt. Eine wesentliche Funktion übernehmen hierbei offensichtlich Metalloproteinasen. So konnte unlängst an Matrilysin-defizienten Mäusen eine verminderte antibiotische Aktivität wie auch eine Akkumulation der Propeptide festgestellt werden. Die antibiotische Wirksamkeit der Defensine beruht offenbar auf einer Porenbildung in der bakteriellen Zellwand, welche einen Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten zur Folge hat. Diese Peptide werden anhand des Verteilungsmusters intramolekularer Disulfidbrücken eingeteilt. Defensine haben eine genomische 2-Exonstruktur gemeinsam, die phylogenetisch erhalten geblieben ist. Analoge Peptide wurden auch bei zahlreichen anderen Spezies isoliert, z.B. die Kryptidine bei Mäusen.

Obwohl eine pathophysiologische Rolle menschlicher Defensine noch nicht gesichert werden konnte, sprechen einige Aspekte für ihre wesentliche Bedeutung in der Pathogenese von Infektionen: a) die gesteigerte enterische β -Defensin-Expression beim Rind nach *Cryptosporidium parvum*-Infektion, b) die Induktion im Bronchialepithel nach Infektion sowie c) die erhöhte Infektanfälligkeit bei Inaktivierung, z.B. durch hohe Salzkonzentrationen bei Mukoviszidose. Die entzündlichen Phänomene bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen könnten durch einen Defekt im Defensinsystem zwanglos erklärt werden. Die Hypothese wäre auch mit der Aktivierung des Immunsystems durch die fäkale Flora vereinbar, die Immunaktivierung wäre dann allerdings eher als sekundäres Ereignis, d.h. dem Barriere Defekt nachgeordnet, zu betrachten. Erste Ergebnisse sprechen dafür, dass bei einer Subgruppe der M. Crohn-Patienten im Gegensatz zur Colitis ulcerosa das β -Defensin HBD2 nicht exprimiert wird.

Herkunft und Nomenklatur der Defensine

Defensine sind endogene, also körpereigene Antibiotika. Alle Körperoberflächen (Haut und Schleimhaut) produzieren Defensine. Sie sind Teil der unspezifischen Abwehr, der angeborenen Immunität. Es handelt sich um kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3000–4000 Dalton. Praktisch alle Defensine sind durch 3 verschiedene, an unterschiedlichen Stellen lokalisierte Disulfidbrücken charakterisiert und bestehen meist aus nur 35 Aminosäuren. Beim Menschen sind bislang 9 Defensine beschrieben, das zuletzt entdeckte ist das HBD-3 (HBD = Human beta defensin). Offenbar hat es ähnliche Eigenschaften wie das HBD-2 und wurde zuerst in der Haut gefunden. Defensine haben ein erstaunliches antimikrobielles Spektrum (Tab. 1).

Gram-positive Bakterien inclusive <i>Staphylococcus aureus</i>
Gram-negative Bakterien wie <i>E. coli</i> , Salmonellen, Chlamydien, <i>Treponema pallidum</i>
säurefeste Stäbchen: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
verschiedene Pilze, u. a. <i>Candida</i> -Arten
Viren wie z. B. Herpes Virus
Protozoen wie z. B. <i>Giardia lamblia</i>

Tab. 1: Antimikrobielles Spektrum von Defensinen

Interessanterweise haben die Defensine der Haut eine „Staphylokokken-Lücke“ in ihrem antimikrobiellen Spektrum und die klassische Hautinfektion wird durch genau diese Bakterien verursacht.

Die Defensine werden in die Gruppen der α- und der β-Defensine eingeteilt. Zu den α-Defensinen gehören die HNP 1–4 (HNP = Human neutrophil peptid), die durch o. g. Disulfidbrücken charakterisiert sind und die Defensine HD-5 (HD = Human defensin) und HD-6. Derzeit sind 3 β-Defensine bekannt: das HBD-1, das HBD-2 und neuerdings auch das HBD-3.

Wirkung und Bedeutung der Defensine

Der Wirkmechanismus der Defensine ist aufgeklärt. Sie lagern sich in einer Ringstruktur zusammen, die wegen ihrer positiven Ladung elektrostatisch an die Zellmembran der Bakterien bindet. Dies führt dort zu einer Porenbildung und damit zu einem Elektrolyt- und Wasserverlust mit konsekutivem (bakteriellen) Zelltod.

Defensine sind nicht nur antibiotisch wirksam, sondern auch chemotaktisch aktiv, z. B. für verschiedene Immunzellen. Sie binden außerdem an den ACTH-Rezeptor und unterdrücken damit die Kortisolbindung. Ob dies eine physiologische Bedeutung hat, ist derzeit nicht bekannt.

Die klassische Hypothese zur Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen basiert auf einer Dysregulation des spezifischen Immunsystems. Diese soll zu einer überschießenden Reaktion auf bakterielle Antigene der kommensalen Flora führen. Die von uns favorisierte Hypothese geht von einer intestinalen Barriere-störung durch einen Defekt im Defensinsystem aus, der dann sekundär zur adäquaten Immunreaktion gegen die eindringenden Bakterien führt.

Zusammenhang zwischen bakterieller Besiedelung und intestinaler Entzündung

Der Zusammenhang zwischen kommensaler intestinaler Besiedelung und der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bekannt. Typischerweise finden sich an den Orten der höchsten Keimkonzentration – im terminalen Ileum und im Kolon – die CED-Manifestationen. Dies allein ist noch kein wirklicher Beleg dafür, dass es ohne Bakterien keine Entzündung gibt. Nachweisen lässt sich ein solcher Zusammenhang, wenn eine Diversion durch ein doppelläufiges Ileostoma angelegt wird, wie dies in bestimmten Fällen getan wird. Regelmäßig heilen dann der Morbus Crohn und wohl auch die Colitis ulcerosa distal ab. Wird anschließend Darminhalt, also „Dünndarmstuhl“, distal instilliert, flammt die intestinale Entzündung erneut auf.

Das beweist die Existenz eines luminalen Agens, welches die Entzündung auslöst und wahrscheinlich durch die Darmbakterien repräsentiert wird. Eine weitere Bestätigung dafür sind die therapeutischen Erfolge in der Remissionserhaltung entzündlicher Darmerkrankungen durch die Gabe von Antibiotika oder Probiotika. Antibiotika sind nicht komplett wirksam, da sie die Darmflora nur etwa um den Faktor 10 reduzieren und den Darm nicht sterilisieren.

Bei Patienten mit Morbus Crohn findet sich eine gegen die autologe bakterielle Flora gerichtete T-Zell-Antwort. In der intestinalen Mukosa dieser Patienten wurden adhärenzte *E. coli* nachgewiesen. Dieser Befund charakterisiert die Krankheit, bedeutet aber nicht, dass diese Keime den Morbus Crohn auslösen. Andere Bakterien wie z. B. *Mykobakterium paratuberculosis* – die Erreger der Johne’schen Erkrankung – werden bei Morbus Crohn-Patienten öfter gefunden als bei Gesunden. Aber auch das heißt nicht, dass sie den Morbus Crohn auslösen.

Die Rolle der Darmflora wurde auch in Tiermodellen untersucht. Bestimmte Knockout-Mäuse bleiben dann gesund, wenn sie keimfrei aufwachsen. Anderenfalls entwickeln sie eine intestinale Entzündung, welche als Morbus Crohn-Modell dienen kann.

Neue Hypothese: Zentrale Rolle der Defensine im Entzündungsprozess bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Nach unserer Hypothese spielen Defensine eine zentrale Rolle im Entzündungsge-
schehen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es gibt dabei zwei ver-
schiedene Möglichkeiten:

1. Die bisher als Dysregulation oder überschießende, immunologi-
sche Reaktion bezeichneten Mechanismen stellen in Wirklichkeit
einen Defekt im Defensin-System dar. Dies führt zu einer perma-
nenten geringen bakteriellen Invasion in die Mukosa und sekundär
zu einer chronischen Entzündung, die durchaus adäquat sein kann.
2. Defensine werden durch luminale Bakterien oder durch Zytokine
induziert und lösen als Folge Entzündungsmechanismen aus.

Defensin-Expression bei entzündlichen Darmerkrankungen

Methodik

Insgesamt wurden 103 Patienten untersucht. Davon waren 33 Kontrollen, 34 Patienten
litten an einem Morbus Crohn und 36 an einer Colitis ulcerosa. Mittels PCR wurden
systematisch Kolon-Biopsien, vereinzelt auch Dünndarm-Biopsien, auf das Vorhan-
densein von HD-5, HD-6, HBD-1 und HBD-2 getestet. Die Biopsien wurden zusätz-
lich immunhistochemisch auf HD-5, HBD-1 und HBD-2 untersucht. Es wurden jeweils
4 Biopsien pro Patient entnommen, in der Regel 2 aus entzündeten und 2 aus nicht
entzündeten Regionen. Als Kontrollen dienten Patienten mit unspezifischer Kolitis
bzw. Divertikulitis, Karzinom oder Polypen. Die Immunhistochemie-Daten wurden
semiquantitativ ausgewertet.

Ergebnisse

HBD-1 hat praktisch jeder Mensch konstitutiv in der Schleimhaut des gesamten
Kolonepithels und nicht nur in den Paneth-Zellen. Bei Gesunden findet sich ab und zu
HD-5 im Kolon, fast nie das induzierbare Defensin HBD-2. In Paneth-Zellen des ter-
minalen Ileums wurde vereinzelt HD-5 nachgewiesen, nicht generell. Das ist eher
ein Normalbefund, der die Abwehrreaktion gegen Bakterien ohne eine Entzündung
zeigt. Bei einer massiven Entzündung findet sich auch in den Kolonkrypten HD-5.
Bei Patienten mit einer Divertikulitis sind das HD-5 und das HBD-1 hochreguliert.
Mittels PCR ließ sich HBD-2 öfter nachweisen als immunhistochemisch. Der Morbus
Crohn ist durch eine Hochregulation von HD-5 und HBD-1 charakterisiert, weniger
von HBD-2. Demgegenüber exprimieren Patienten mit Colitis ulcerosa meist HBD-2
in den Epithelzellen (Tab. 2).

	HBD-1	HBD-2	HD-5	HD-6
Polypen/Karzinom	++	(+)	+	+
Divertikulitis/unspezifische Kolitis	+++	+ / +++ (PCR)	+++	+
Morbus Crohn	+++	++	+++	+++
Colitis ulcerosa	++	+++	+++	+++

Tab. 2: Semiquantitativer Defensin-Nachweis

Legende: (+) fast nie zu finden
+ ab und zu vorhanden
++ regelhaft nachzuweisen
+++ massiv exprimiert

Das HBD-1 wird konstitutiv exprimiert und ist nicht induzierbar. Das HBD-2 wird bei
der unspezifischen Kolitis gering induziert, beim Morbus Crohn etwas stärker und
ausgeprägt bei der Colitis ulcerosa. Das HD-5 ist bei allen entzündlichen Darm-
erkrankungen erhöht, sowohl bei den unspezifischen als auch den chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen. Im Gegensatz dazu wird das HD-6 nur bei CED-
Patienten verstärkt exprimiert, nicht aber bei Patienten mit unspezifischer Kolitis
oder mit Karzinom oder Polypen.

Im Vergleich zwischen Biopsien aus entzündlich verändertem und makroskopisch
unauffälligem Gewebe fand sich paradoxerweise ein häufigerer Nachweis von HBD-1
bei CED-Patienten in der nicht entzündeten Region. Das HBD-2 ist dagegen in der
entzündeten Region öfter als im nicht entzündeten Gebiet nachweisbar und wird
offenbar NFκB-abhängig induziert. Bei der Colitis ulcerosa und bei M. Crohn findet
sich eine gewisse Induktion von HD-5 und HD-6.

Zusammenfassung

In den vorgestellten Untersuchungen ließen sich die 4 wichtigen epithelialen Defen-
sine HBD-1, HBD-2, HD-5 und HD-6 im Kolon und teilweise im Dünndarm nach-
weisen. Dabei fiel die generelle und relativ breite Nachweisbarkeit der genannten
Defensine im gesamten Kolon auf.

Es gab keinen Unterschied beim konstitutiven HBD-1 zwischen gesunden Kontrollen
und CED-Patienten. Die α-Defensine HD-5 und HD-6 sind signifikant induziert und
somit häufiger nachweisbar bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkran-
kungen. Die Induktion von HBD-2 bei Patienten mit Morbus Crohn ist nicht ver-
schieden von der unspezifischen Kolitis, während HBD-2 bei Patienten mit Colitis
ulcerosa regelhaft verstärkt induziert wird.

Schlussfolgerung

Möglicherweise kann der in epidemiologischen Studien gefundene Nord-Süd-Gradient in der Inzidenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Induktion von Defensinen während bakterieller Infektionen in der frühen Kindheit erklärt werden. Wenn solche Infektionen ausbleiben, „lernt“ der Organismus nicht, das angeborene System der Immunabwehr weiter auszubilden, z. B. durch Induktion von Defensinen. Ob die gefundene verstärkte Expression bestimmter Defensine in der Pathogenese der CED eine Rolle spielt, muss erst noch gesichert werden. Da man aus Kenntnis des menschlichen Genoms schätzt, dass mindestens 15 weitere humane Defensine existieren, deren molekulare Identifizierung noch aussteht, besteht auch die Möglichkeit eines Defektes bei diesen Peptiden. Alternativ kommt auch eine Funktionsstörung durch Mutationen bei den oben untersuchten Defensinen in Betracht.

In den letzten Jahren ist der Fokus in der Erforschung der Pathogenese der CED zu Unrecht nur auf das spezifische und nicht auf das angeborene Immunsystem gelegt worden. Viele Parameter wurden dabei in ihrer Bedeutung für den Entzündungsprozess beschrieben. Jetzt ist es an der Zeit, auch die angeborene Immunität intensiver zu betrachten und diese Forschung zu fördern.

Prof. Dr. med. E. F. Stange

Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart
Klinik für Innere Medizin I
Auerbachstr. 110
70376 Stuttgart

Literatur

1. Fellermann K, Stange E.F. Defensins – innate immunity at the epithelial frontier. *Europ. J. Gastroenterol. Hepatol.*, im Druck

Extraintestinale Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

S. Schreiber, L. Schulze



Prof. Dr. S. Schreiber

Abstract

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind durch einen aktiven immunologischen Prozess charakterisiert, der Kompartiment übergreifend systemisch nachgewiesen werden kann. Klinische Konsequenzen sind häufig Manifestationen der Grunderkrankung in anderen Organsystemen. Umgekehrt können allerdings auch autoimmunologische Prozesse, die primär extraintestinal ablaufen (rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses), sekundär den Darm betreffen.

Typische Komplikationen des M. Crohn betreffen oft die Gelenke (häufig Arthralgien in Knie- und Fußgelenken, asymmetrischer Befall), die Haut (z.B. Erythema nodosum) und die Augen (sämtliche anatomischen Kompartimente können involviert sein). Seltener betroffen sind das Pankreas, die Leber (primär sklerosierende Cholangitis) und die Lunge (bronchopulmonale Entzündung, Alveolitis, Pneumonitis). Vor kurzem sind bei Patienten mit Morbus Crohn gehäuft Läsionen in der „weißen“ Hirnmasse („white matter lesions“) durch Magnetresonanztomographie nachgewiesen worden, die als Zeichen einer Vaskulitis aufgefasst werden können, deren klinische Signifikanz jedoch unklar ist.

Bei der Colitis ulcerosa findet sich ein ähnliches extraintestinales Manifestationsspektrum wie beim Morbus Crohn. Allerdings ist hier das Auftreten des Pyoderma gangraenosum als Hautmanifestation tendenziell häufiger. Auch die primär sklerosierende Cholangitis ist bei Patienten mit Colitis ulcerosa häufig und in diesen Fällen mit einer schlechten Prognose der intestinalen Erkrankung sowie einer erhöhten Inzidenz des kolorektalen Karzinoms vergesellschaftet.

Die chronische, entzündungsbedingte Anämie wird häufig nicht als extraintestinale Manifestation erkannt, wodurch erhebliche diagnostische und therapeutische Probleme verursacht werden können.

Die Mechanismen, die zur Entstehung extraintestinaler Manifestationen führen, sind nur unvollständig charakterisiert. Häufig korreliert die Aktivität dieser Manifestationen schlecht mit der intestinalen entzündlichen Aktivität. Extraintestinale Manifestationen können die Entfernung des betroffenen intestinalen Organs (Kolektomie bei Colitis ulcerosa) überdauern.

Einleitung

Als extraintestinale Manifestation einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung wird eine mit der Krankheit assoziierte Organerkrankung außerhalb des Gastrointestinaltraktes definiert. Im Folgenden werden einige Aspekte zu denjenigen extraintestinalen Manifestationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen aufgeführt, die mit der intestinalen Flora assoziiert sind.

Das intestinale Immunsystem steht in enger Beziehung zur Darmflora. Auch Zivilisationsfaktoren, die im Lebensstil der westlichen Industriegesellschaft begründet sind, üben einen Einfluss auf die Besiedelung der intestinalen Barriere aus. Diese Barrieren sind offenbar sehr wichtig, um mukosale Oberflächen intakt zu halten und es existiert sogar ein eigenes Immunsystem (GALT, gut associated lymphoid tissue), welches mehr als 70% aller menschlichen Immunzellen umfasst. Immunologische Reaktionen in der Peripherie des menschlichen Organismus werden ganz anders als im Darm reguliert und machen quantitativ betrachtet weniger als 10% aus. Trotzdem stammen ca. 95% der wissenschaftlichen Daten über Immunologie aus der Peripherie und nicht aus der Darmmukosa, was methodische Gründe hat.

Seitens des Wirtes werden Wachstumsbedingungen für die Besiedelung der intestinalen Barriere vorgegeben. Aber auch die Darmflora kann umgekehrt die immunologische Barriere beeinflussen. Als Beispiele seien die YOB-Proteine der Yersinien genannt, die in der Lage sind, eine NFκB-induzierte Immunantwort relativ effektiv abzuschalten und das Intimin pathologischer *E. coli*, welches in Tiermodellen eine substantielle chronifizierte Entzündung induziert. Ein Merkmal chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist das vermehrte Auffinden intraepithelial lokalisierter Bakterien (1, 2). In der Mukosa finden sich häufig Elemente des systemischen Immunsystems.

Bei Gelenkmanifestationen spielt auch die Genetik eine wichtige Rolle. Es besteht eine Assoziation zwischen Arthropathie und HLA-Typ (3). Offenbar ist neben der veränderten Darmflora eine bestimmte Suszeptibilität des Wirtes für bestimmte extraintestinale Manifestationen notwendig.

Anhand einer Kasuistik soll verdeutlicht werden, wie kompliziert manchmal die Diagnose und letzten Endes auch die Therapie extraintestinaler Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sein kann. Der vorgestellte Patient wurde außer vom Hausarzt von der I. und der II. Medizinischen Klinik der Universität zu Kiel behandelt.

Kasuistik

Initiale Beschwerden

Ein 25-jähriger männlicher Patient stellte sich bei seinem Hausarzt vor und klagte über täglich 5–8 prolongierte, wässrige Diarrhöen ohne Blut sowie kolikartige Schmerzen im linken Unterbauch. Die Stuhlkulturen waren negativ, eine Sigmoidoskopie zeigte einen Normalbefund. Unter der Verdachtsdiagnose einer bakteriell verursachten Enteritis wurde eine 10-tägige Antibiose mit Ciprofloxacin 2 x 200 mg/d durchgeführt. Dies führte zu einer deutlichen Besserung mit 1–2 lockeren Stühlen pro Tag. Ein Leidensdruck bestand nicht mehr.

Ca. 3 Monate später entwickelte dieser Patient eine morgendliche „Steifigkeit“ in den Fingergrundgelenken. Er hatte zusätzlich Schmerzen in beiden Kniegelenken mit einem rechts stärker als links ausgeprägten Gelenkerguss ohne Überwärmung. Pro Tag wurden 2–3 flüssige Stühle abgesetzt. Laborchemisch fanden sich Zeichen einer chronischen Entzündung.

Laborbefunde:

Hb 9,8 g/dl	Leukozyten 11,2/nl	Thrombozyten 512/nl
CRP 54 mg/l	BSG 23/38 mm/h n.W.	
Negativ waren:		
RF, ASL, aDNAse B, ds-DNA, ENA		ANA 1:128 nukleär gesprenkelt

In der Ileokoloskopie fand sich ein solitäres, scharf abgegrenztes Ulkus im Kolon ascendens sowie eine geringfügig gerötete und unregelmäßige Schleimhaut im terminalen Ileum. Histologisch wurden Plasmazellen in einem chronischen Infiltrat nachgewiesen. Zusätzlich bestanden Aphthen in der Mundschleimhaut. Daraufhin wurde die Diagnose Morbus Crohn gestellt und stationär eine systemische Steroidtherapie durchgeführt, beginnend mit 60 mg Prednisolon in absteigender Dosierung, in Kombination mit 3 x 2 Tabletten Azulfidine®. Die Stuhlfrequenz betrug in dieser Zeit 1–2 Stühle. Die Stuhlkonsistenz war breiig, die Gelenksbeschwerden bestanden unverändert und wurden das führende Symptom des Patienten.

Anschließend kamen verschiedene Therapien zum Einsatz: Unter einer einwöchigen Therapie mit IgG 5 x 20 g, die durch den Hausarzt veranlasst wurde, kam es zu einer geringfügigen Linderung der Beschwerden.

Laborbefunde:

Hb 9,2 g/dl	Leukozyten 14,7/nl	Thrombozyten 412/nl
CRP 22 mg/l	BSG 14/27 mm/h n.W.	

Massive Befundverschlechterung nach Therapieversuch mit NSAR

Ein späterer Therapieversuch des Hausarztes mit NSAR (Diclofenac i.m.) führte zu einer massiven Befundverschlechterung. Bei diesem akuten Schub der CED kam es zu mehr als 15 blutigen Stühlen pro Tag. Koloskopisch zeigten sich multiple retikuläre, fibrinbedeckte Ulzerationen in einer massiv entzündeten, hämorrhagischen Schleimhaut. Der Zustand des schwerstkranken Patienten verschlechterte sich zusätzlich durch die Entwicklung eines toxischen Krankheitsbildes mit einer Dilatation des Kolons.

Laborbefunde:

Hb 7,4 g/dl Leukozyten 23/nl Thrombozyten 675/nl
CRP 80 mg/l BSG 65/ nicht meßbar mm/h n.W.

Nach dieser massiven Verschlechterung erfolgte eine Therapie mit täglich 4 mg/kg KG Ciclosporin A i.v. Diese brachte keine Besserung nach 48 Stunden und wurde dann u.a. wegen Zeichen einer Niereninsuffizienz sowie einer Erhöhung der Leberenzyme abgebrochen. Der Patient entwickelte eine Hämoptyse und akrale Nekrosen.

Laborbefunde:

Kreatinin 2,3 mg/dl γ-GT 412 U/l AP 932 IE/l
Harnstoff 81 mg/dl GOT 76 IE/l GPT 132 IE/l
Proteinurie 2,3 g/l Bilirubin 1,9 mg/dl
Hepatitis-Serologie negativ ANA 1:1028 positiv
AMA/SMA negativ

Daraufhin erhielt der Patient täglich 100 mg Prednisolon i.v. und wurde parenteral ernährt: Die Bilanzierung erfolgte mit mehr als 3000 ml/d. Nach einer Cyclophosphamid-Therapie kam es zu einer deutlichen Besserung.

Eine weitgehende Normalisierung des Kreatinins, der Transaminasen und der Gallengangsenzyme wurde nach einer 4-monatigen Therapie mit Prednisolon und Methotrexat erreicht.

Anhand dieser Kasuistik zeigt sich, wie ausgesprochen unübersichtlich der Krankheitsverlauf sein kann und wie sich der immunologische Symptomenkomplex auch außerhalb des Darmes äußert.

Extraintestinale Manifestationen

Die extraintestinale Symptomatik kann bereits zur initialen Präsentation des Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa gehören. Es existiert ein weites Spektrum an Beschwerden, von dem viele Organe betroffen sein können (Tab. 1).

Symptom	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn
Blutung	80 %	22 %
Diarrhoe	52 %	73 %
Bauchschmerzen	47 %	77 %
Fisteln	Nein	16 %
Gewichtsverlust	5 %	54 %
Fieber	1 %	35 %
Anämie	15 %	27 %
Arthralgie	13 %	16 %
Iridozyklitis, Uveitis	11 %	10 %

Tab. 1:
Symptomatik bei
initialer Präsentation

Beispiele extraintestinaler Manifestationen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Prospektive Studien zu ihren Inzidenzen sind kaum publiziert. Die Osteoporose scheint keine extraintestinale Manifestation der Colitis ulcerosa zu sein (4, 5). Die Myokarditis war in einer Stichprobe 2,6-fach gegenüber der Normalbevölkerung erhöht (6).

Gelenke	Arthralgien, meist große Gelenke betroffen, asymmetrischer Befall
Augen	Uveitis, Episkleritis
Haut	Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum
Leber	PSC, Autoimmunhepatitis
Pankreas	Pankreatitis mit Erhöhung der Amylase
Knochen	Osteoporose, ausgelöst durch die chronische entzündliche Reaktion und durch die Malnutrition
Blut	Anämie, oft therapierefraktär, ebenfalls durch die chronische Entzündung ausgelöst
Lunge	selten Bronchitis, Pneumonitis, Pleuritis
Herz	sehr selten Myokarditis

Tab. 2: Extraintestinale Manifestationen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Skelettmanifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Sakroiliitis

Eine der häufigen Skelettmanifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die Sakroiliitis, die sich klinisch meist relativ diskret äußert. Sie tritt bei mehr als 50 % der Patienten mit CED auf. Auch „gesunde“ Verwandte sind davon betroffen: 8,3 % der Verwandten 1. Grades und 1,9 % der Verwandten 2. Grades. Typisch sind Rückenschmerzen in der Lendenregion sowie eine Morgensteifigkeit. Eine HLA-Assoziation besteht nicht. Der radiologische Nachweis der Sakroiliitis ist schwierig. Er gelingt bei 11 % der Fälle mittels konventionellem Röntgen, bei 30 % mittels CT und bei 65 % mittels MRT. Meist liegt ein symmetrischer Befall vor. Das therapeutische Ziel besteht darin, das Fortschreiten der Erkrankung und den Übergang zur Spondylitis ankylosans zu verhindern.

Spondylitis ankylosans

Die Spondylitis ankylosans ist durch eine Versteifung der Wirbelgelenke mit Einbeziehung weiterer peripherer Gelenke gekennzeichnet. Unter den Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung findet sie sich in 3–5 %. Menschen mit HLA B 27 haben ein 200-faches Risiko, Patienten mit Morbus Crohn sogar ein 600-faches Risiko, an einer Spondylitis ankylosans zu erkranken (7). Es gibt daneben HLA-negative Formen der Erkrankung. Klassische radiologische Zeichen („Bambusstab“) führen meist erst im Spätstadium zur Diagnose. Mögliche Komplikationen sind die zusätzliche Ausbildung einer Osteoporose und die Versteifung der Wirbelsäule mit deutlicher Verminderung der Beweglichkeit.

Infektiöse Kolitis

Die aufgeführten Gelenkerkrankungen können nicht nur bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten, sondern auch bei einer infektiösen Kolitis. Als Erreger kommen zum Beispiel in Betracht:

- Yersinien – *Campylobacter* – Shigellen
- Salmonellen – Brucellen – *Clostridium difficile*.

Das „Bypass-Arthritis-Dermatitis-Syndrom“ kann nach verschiedenen chirurgischen Eingriffen im Gastrointestinaltrakt (z.B. Anlage einer „blind loop“, eines „Y-Roux“ oder nach Billroth-II-Operation) auftreten. Eine bakterielle Überwucherung in vormalig keimarme oder sterile Bereiche führt zu einer Erhöhung des Serum-IgA's gegen Stuhlflora. Es werden spezifische Immunkomplexe gegen bakterielle Peptide nachgewiesen und die Patienten entwickeln unabhängig vom auslösenden Erreger typischerweise eine Arthritis, eine Vaskulitis, eine Nephritis oder eine Dermatitis. Der Verlauf dieser infektiösen Darmerkrankungen ist meist schwer und geht häufig mit Gelenkergüssen einher. Gelenkschäden bleiben dabei zunächst aus. In diesem Stadium wird die Diagnose meist verkannt, weil das Leitsymptom Rückenschmerz (z.B. bei Sakroiliitis) entweder nicht erfragt oder als allgemeiner „Verschleiß“ gedeutet wird. Offenbar geht eine Reihe dieser infektiösen Kolitiden mit einer „Sensibilisierung“ einher und es ist deshalb bei einer Zweitinfektion mit einem wesentlich dramatischeren Verlauf zu rechnen. In systematischen Studien fanden sich bei 5 % der untersuchten Patienten nach 5 Jahren radiologische Zeichen einer Sakroiliitis.

Die Zusammenhänge zwischen Infektion und immunologischer Reaktion mit nachfolgender Gelenkaffektion wurden in vitro, in Tiermodellen und in vivo untersucht.

In vitro wurde die Bindung von HLA B27 mit bakteriellen Peptiden (Yersinien, Shigellen, Salmonellen) gezeigt, deren Relevanz noch geklärt werden muss. HLA B27 (human) transgene Mäuse sind gegen Yersinien sensitiver als das Vergleichskollektiv, wenn als Endpunkt der Exitus gewählt wird. Auch bei HLA B27/β2-Mikroglobulin transgenen Ratten kam es zur Entwicklung einer axialen Arthritis durch bakterielle Peptidoglykane.

In Gelenkergüssen und Synoviabiopsien wurden Antigene von Yersinien und Salmonellen gefunden, bei manchen Patienten bis zu 17 Jahre nach der Infektion. Außerdem gelang der Nachweis von Serum-IgA-Antikörpern gegen verschiedene Bakterien bei Patienten mit Arthritis. Ob eine erhöhte Permeabilität der Mukosa als Ursache in Betracht zu ziehen ist, muss noch geklärt werden.

Arthritis und Augenerkrankungen

Augenerkrankungen wie Uveitis oder Iridozyklitis, seltener eine Retinitis oder eine Skleritis können als extraintestinale Manifestation bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten. Geschätzt wird eine Häufigkeit von 10–15 % bei diesen Patienten, meist kombiniert mit Haut- oder Gelenkmanifestationen.

Zellbiologisch betrachtet ähneln sich die Synovia und die Uvea anatomisch und funktionell, z.B. in der Antigen-Präsentation, der Leukozytenmigration und der Ultrafiltrationskapazität. Die anterioren Strukturen (Uvea, Iris, Ziliarkörper) sind häufiger betroffen als die posterioren (Retina, Sklera). Letztere sind bevorzugt entzündet bei hochaktiver Colitis ulcerosa.

Im Verlauf kommt es häufig unabhängig von der intestinalen Entzündungsaktivität zu Rezidiven. Diese können sogar nach einer Kolektomie bei Colitis ulcerosa auftreten. Ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung kann zu einem sekundären Glaukom bei anteriorem Befall und zu einem Katarakt bei posteriorem Befall führen.

Gelenkmanifestationen sind nicht immer Ausdruck einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Vielmehr kann auch umgekehrt eine primär rheumatologische Erkrankung zu Darmmanifestationen führen. Exemplarisch werden der systemische Lupus erythematodes, der Morbus Behçet und Vaskulitiden (z.B. Panarteriitis nodosa oder Vaskulitis allergica) als Differentialdiagnosen genannt.

Systemischer Lupus erythematodes (SLE)

Der SLE ist eine genetisch prädisponierte Autoimmunerkrankung, die hauptsächlich das Gefäßbindegewebe und die Haut betrifft. Der Verlauf ist variabel, die klinischen Manifestationen sind vielfältig. Typisch sind:

- Schmetterlingserythem über Wangen und Nase
- diskoidale Hautveränderungen mit Atrophien in älteren Herden
- eine erhöhte Lichtempfindlichkeit
- meist schmerzlose orale oder nasopharyngeale Ulzerationen
- nichterosive Arthritis
- Pleuritis oder Perikarditis
- Nierenbeteiligung mit Proteinurie
- Krampfanfälle oder Psychosen
- hämolytische Anämie, Leukozyto- oder Thrombozytopenie
- hohe antinukleäre Antikörper-Titer.

Gastroenterologisch imponiert bei manchen Patienten mit SLE eine Ösophagusdysmotilität, eine Sicca-Symptomatik mit Xerostomie und in ca. 2 % der Fälle eine intestinale Vaskulitis mit Hämorrhagie, Morbus Crohn-ähnlicher Ileocolitis bis hin zur Perforation und Infarzierung. Der Verlauf des SLE ist meist schubartig, eventuell foudroyant. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei therapierten Patienten bei 90 %, die 10-Jahres-Überlebensrate sinkt auf 80 %.

Morbus Behçet

Der Morbus Behçet ist eine in Deutschland seltene entzündliche Erkrankung. Eine höhere Inzidenz besteht in der Türkei und Südostasien. In typischen Fällen findet sich eine Symptom-Trias mit oralen Aphthen, Genitalulzera und Hypopyoniritis. Es wurde außerdem eine Assoziation mit verschiedenen HLA-Mustern beschrieben. Gastroenterologische Manifestationen können eine Dysphagie oder Dyspepsie, eine Ösophagusbeteiligung, eine Enterocolitis oder eine Proktitis umfassen. In 2–5 % der Fälle wurde ein Übergang zum Morbus Crohn gefunden, dessen Abgrenzung im Einzelfall schwierig sein kann.

Vaskulitiden

Vaskulitiden weisen als morphologisches Merkmal entzündliche Veränderungen der Blutgefäße unterschiedlichen Ausmaßes auf, eine einheitliche Klassifikation existiert bisher nicht.

Bei der Vaskulitis allergica stehen oft Allgemeinsymptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Arthralgien sowie meist symmetrische, vor allem an den Unterschenkeln auftretende petechiale Einblutungen im Vordergrund. Abdominelle Schmerzen können auf eine gastrointestinale Beteiligung hinweisen.

Die Panarteriitis nodosa ist eine Vaskulitis der kleinen und mittleren Arterien und stellt in ihrer systemischen Form eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Häufig findet sich eine Nierenbeteiligung. Bei Befall abdominalen Blutgefäße kann es zu gastrointestinalen Läsionen mit Blutung kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei einer Darmentzündung mit gleichzeitig vorliegender Arthritis an Darminfektionen, rheumatische oder andere Autoimmunerkrankungen, virale Hepatitiden und an Medikamentennebenwirkungen gedacht werden muss.

Hautmanifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Zwei Hauterkrankungen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind führend: das Erythema nodosum und das Pyoderma gangraenosum.

Das Erythema nodosum kann als Begleitmanifestation verschiedener Grunderkrankungen auftreten, so auch bei einem Morbus Crohn. Es ist charakterisiert durch schmerzhafte, kutan oder subkutan gelegene Knoten, die meist an den Unterschenkelstreckseiten zu finden sind.

Das Pyoderma gangraenosum ist durch ausgeprägte Ulzerationen und eine extreme Schmerzhaftigkeit gekennzeichnet. Am häufigsten sind auch hier die Unterschenkel betroffen.

Verschiedene pathophysiologische Mechanismen werden bei der Entstehung dieser beiden Hautmanifestationen diskutiert. Dazu gehören das Auftreten von Immunkomplexen, eine Komplementaktivierung, eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen (LFA-1 und ICAM-1) oder von Endothelin (8, 9). Eine Vaskulitis könnte ebenfalls eine primäre Ursache sein. Bei der Colitis ulcerosa wurde ein 40 kDa großes Auto-Antigen als Auslöser beschrieben (10).

Weitere Hautmanifestationen bei CED können sein:

- Hyperergische Vaskulitis
- Epidermolysis bullosa acquisita
- Pyostomatitis vegetans.

Der Morbus Crohn kann aber auch spezifische extraintestinale Manifestationen mit dem klinischen Bild einer Hidradenitis suppurativa verursachen. Es finden sich dann perianal und inguinal chronische, fistulierende und abszedierende Entzündungen.

Beispiele ernährungsbedingter Hautveränderungen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind die Akrodermatitis enteropathica bei Zinkmangel, die Pellagra bei Nikotinsäure- oder Skorbut bei Vitamin C-Mangel.

Die Psoriasis als häufige primäre Hauterkrankung kann neben Arthropathien auch mit Diarrhöen als Zeichen einer Darmbeteiligung vergesellschaftet sein.

Lebererkrankungen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Leber kann ebenfalls ein Zielorgan extraintestinaler Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sein. Wichtige Krankheitsbilder sind hierbei die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und die Autoimmunhepatitis. Mittels ERCP lassen sich die Gallengänge darstellen, die bei der PSC rarefiziert, vernarbt und knollenartig aufgetrieben sind. Eine bakterielle Fehlbesiedlung kann möglicherweise vom Darm auf die Gallengänge übergreifen. Am immunologischen Geschehen sind spezifische IgG-Antikörper (evtl. ein 40 kDa Antigen?) und Immunkomplexe (reduzierte Clearance, vermehrtes biliäres Vorkommen) beteiligt. Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ist erhöht. Diskutiert wird die Beteiligung von Hitze-Schock-Protein (HSP) 60.

Bei der PSC wurde eine MHC-II-Assoziation gefunden: DR3, DR6, DR2, DRB3*0101 (DR52a) treten gehäuft auf. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer Colitis ulcerosa und einer PSC bestanden erhöhte Titer von antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA), sowohl gegenüber der zytoplasmatisch betonten Form (cANCA) als auch der perinukleär betonten Form (pANCA) (11-15). Die pathophysiologische Relevanz ist noch offen.

Zusammenfassung

Eine Standortbestimmung hinsichtlich der relativen Häufigkeit und des Schweregrades extraintestinaler Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben- und Zuweisungsstrukturen einzelner Zentren und spärlicher Literatur schwierig. Es ist möglich, dass in Zukunft Fortschritte in Diagnostik und Therapie auch die Erkennungshäufigkeit extraintestinaler Manifestationen positiv beeinflussen werden.

Ihre Behandlung ist komplex. Eine Korrelation zur Entzündungsaktivität der Grunderkrankung fehlt. Es existieren Überschneidungen zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatischen Erkrankungen und medikamenten-induzierten Komplikationen.

Prof. Dr. med. S. Schreiber

Klinikum der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Klinik für Allgemeine Innere Medizin
I. Medizinische Klinik
Schittenhelmstr. 12
24105 Kiel

Literatur

1. Brenneke V, Kßt A, Weltrich R, Lochs H, Swidsinski A, Ernst H. Colonic intraepithelial *Escherichia coli* extracted from patients with inflammatory bowel diseases (IBD) affect wound healing. *Gastrointestinal Oncology* 1999; A381.
2. Swidsinski A, Swidsinski S, Godzun A, Orthner M, Lochs H. Therapy with *E. coli* Nissle reduces concentrations of mucosa associated colonic flora in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000;118:A1138.
3. Orchard TR, Thiagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118:274-278.
4. Ljunhall S, Ljunggren Ö. Inflammatory bowel disease and osteoporosis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31:103-109
5. Jahnsen J, Falch JA, Aadland E et al. Bone mineral density is reduced in patients with Crohn's disease but not in patients with ulcerative colitis: A population based study. *Gut* 1997;40:313-31
6. Sorensen HT, Fonager KM. Myocarditis and inflammatory bowel disease. A 16 year Danish nationwide cohort study. *Dan Med Bull* 1997;44:442-4
7. Mielants H, Veys EM. HLA-B27 related arthritis and bowel inflammation. Part 1. Sulfasalazine (salazopyrin) in HLA-B27 related reactive arthritis. *J Rheumatol* 1985;12:287-93
8. Murch SH, Braegger CP, Sessa WC, MacDonald TT. High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* 1992;339:381-385.
9. Powell FC, Schroeter AL, Su WP, Perry HO. Pyoderma gangraenosum: a review of 86 patients. *Q J Med* 1985;55:173-186.
10. Halstensen TS, Das KM, Brandtzaeg P. Epithelial deposits of immunoglobulin G1 and activated complement colocalise with the M(r) 40 kD putative autoantigen in ulcerative colitis. *Gut* 1993;34:650-657.
11. Mulder AH, Horst G, Haagsma EB, Kleibeuker JH, Kallenberg CG. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver disease. *Adv Exp Med Biol* 1993;336:545-549.
12. Mulder AH, Broekroelofs J, Horst G, Limburg PC, Nelis GF, Kallenberg CG. Antineutrophil antibodies in inflammatory bowel disease recognize different antigens. *Adv Exp Med Biol* 1993;336:519-522.
13. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:202-210.
14. Seibold F, Weber P, Klein R, Berg PA, Wiedmann KH. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992;33:657-662.
15. Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P. Neutrophil autoantibodies: a genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107:532-536

Klinische Bedeutung von Mutaflor® (*E. coli* Stamm Nissle 1917) in der Therapie der Colitis ulcerosa und des Morbus Crohn

W. Kruis



Prof. Dr. W. Kruis

Abstract

Seit Alfred Nissle *Escherichia coli* Serotyp 06:K5:H1 in die Behandlung chronischer Darmerkrankungen einführte (4), erschienen zahlreiche weitere klinische Beobachtungen, die von der Wirksamkeit und Verträglichkeit dieses Therapieprinzips berichteten. Die erste, in doppelblinder Weise kontrollierte Untersuchung zur therapeutischen Effektivität von *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa) erschien 1997 (5). Die Studie beinhaltete insgesamt 118 Patienten und verglich Mutaflor® per os 2 x 100 mg/die mit Mesalazin (Salofalk®) 3 x 500 mg/die. Ziel der Studie war es, für drei Monate die mit Standardtherapie erzielte Remission zu erhalten. Die Rezidivrate war während dieser Zeit unter Mutaflor® 16 % und unter Salofalk® 11 %. Die Differenz von 5 % war statistisch nicht signifikant. Verträglichkeit und Nebenwirkungsrate waren in den beiden Therapiegruppen ähnlich.

Rembacken und Mitarbeiter bestätigten und erweiterten diese Untersuchungsergebnisse (6). Bei 116 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa wurde die Remission entweder mit Prednisolon plus Mesalazin (Asacol®) oder plus Mutaflor® induziert. Nach Erreichen der Remission wurden für 12 Monate in doppelblinder Weise die rezidivverhütenden Wirkungen von Asacol® 3 x 400 mg/die und Mutaflor® 1 x 200 mg/die verglichen. Weder die Rezidivrate noch die Zeit bis zum Eintritt eines Rezidivs unterschieden sich signifikant. Auch Sicherheit und Verträglichkeit waren in beiden Therapiegruppen ähnlich. Eine dritte Studie mit konfirmatorischem Ansatz, die ebenfalls die remissionserhaltende Wirksamkeit von Mesalazin und *E. coli* Stamm Nissle 1917 verglich, schloß 327 Patienten ein. Diese Untersuchung ist abgeschlossen, jedoch noch nicht entblindet, so dass die Ergebnisse erst in Kürze erwartet werden können. Eine Zwischenauswertung bei 268 Patienten deutet jedoch eine mögliche äquivalente Wirksamkeit von *E. coli* Nissle 1917 und Mesalazin an.

Bei Morbus Crohn gibt es bisher nur eine kontrollierte Studie mit Mutaflor® (7). Diese präliminären Ergebnisse zeigen eine überzeugende therapeutische Wirksamkeit von *E. coli* Stamm Nissle 1917 im Vergleich zu Placebo in der Effektivität, die Remission bei Morbus Crohn des Kolons zu erhalten. Weitere Studien werden derzeit durchgeführt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine zunehmende wissenschaftliche Datenbasis entsteht, die die therapeutische Wirksamkeit und Sicherheit von *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen belegt.

Einleitung

In den letzten Jahren sind viele neue Erkenntnisse über die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erforscht worden. Ein unstrittiges Modell zeigt die Abb. 1. Es findet sich demzufolge eine ständige Interaktion zwischen dem Darminhalt, der eine potentielle inflammatorische Potenz besitzt, und dem darmassoziierten Immunsystem (= GALT). Bei einer bakteriellen Translokation kann es unter bestimmten Umständen zu einer Entzündung kommen. Diese kann einen chronischen Verlauf nehmen, wenn eine gewisse genetische Suszeptibilität vorliegt und bestimmte Umweltfaktoren vorhanden sind.

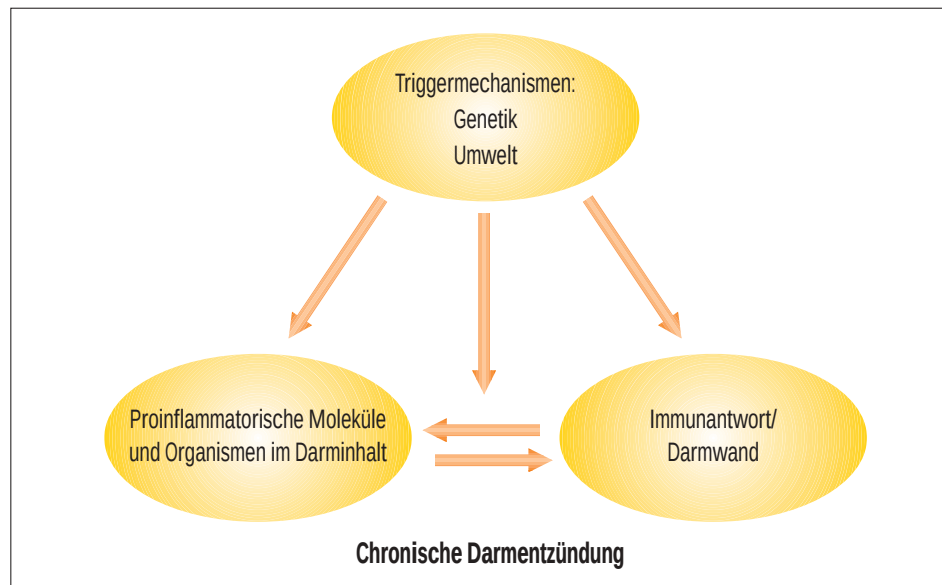


Abb. 1: Hypothese zur Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Therapeutische Möglichkeiten fehlen bislang hinsichtlich der epidemiologisch untersuchten Umweltfaktoren ebenso wie auf genetischer Ebene. Derzeit wird mit verschiedenen Methoden versucht, die Entzündungsreaktionen abzumildern bzw. aufzuheben und Manifestationsfaktoren zu eliminieren.

Besonders faszinierend ist das Spektrum der Reaktionsmöglichkeiten des menschlichen Organismus im Krankheitsgeschehen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. So sind derzeit 172 (!) Faktoren der Immunantwort bekannt (Schölmerich, persönliche Mitteilung) und entsprechend viele Überlegungen werden unternommen, wie sie beeinflusst werden können. Bei Betrachtung der Kosten-Nutzen-Relation fällt allerdings auf, wie wenig sichtbare Fortschritte der hohe Aufwand für die Patienten bislang gebracht hat.

Darmflora und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Ein vielversprechender Therapieansatz ist die Beeinflussung des Darminhaltes, speziell der Darmflora. Ihre pathogenetische Bedeutung für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde im Verlauf des Symposiums bereits mehrfach erörtert und beruht auf Untersuchungen in vitro, im Tierexperiment und in der Humanmedizin.

Wird bei Patienten mit Morbus Crohn die befallene Ileozäkalregion entfernt und zeigen sich postoperativ sowohl makroskopisch als auch histologisch keine Zeichen eines Morbus Crohns, so ist der weitere Krankheitsverlauf günstiger bei Nachbehandlung mit Antibiotika als ohne diese Prophylaxe (1). Das ergab eine doppelblinde, placebo-kontrollierte Studie, in der die Wirksamkeit von Metronidazol (20 mg/kg Körpergewicht/die) untersucht wurde. Die Therapie wurde in der ersten postoperativen Woche begonnen und über 3 Monate fortgeführt. Bei der anschließenden endoskopischen Befundkontrolle fanden sich in der Placebogruppe bei ca. 75 % und in der Verumgruppe bei 52 % der Patienten Entzündungszeichen im ehemaligen Operationsgebiet. Dies weist auf den deutlichen Einfluss des Antibiotikums auf die intestinalen Entzündungsreaktionen hin. Noch erstaunlicher ist, dass sich ein Therapieeffekt über 3 Jahre nachweisen ließ, obwohl die Behandlung nur 3 Monate andauerte. Während dieser 3 Jahre erlitten Patienten aus der Verumgruppe seltener ein Rezidiv. Die Unterschiede waren am Ende des 1. Jahres signifikant und korrelierten mit der endoskopisch gesicherten Ausprägung der Entzündungszeichen nach 3 Monaten. Offenbar reicht es für eine Verbesserung der Prognose aus, postoperativ einmal zum richtigen Zeitpunkt die Darmflora zu beeinflussen.

Wegen der Nebenwirkungsrate und den Gegenanzeigen beim Einsatz von Antibiotika, aber auch der möglichen Resistenzentwicklung sowie der Erfolgsquote wurde nach neuen therapeutischen Ansätzen gesucht. Dazu gehört auch ein radikaler Selbstversuch bei einem Patienten mit absolut therapierefraktärer Colitis ulcerosa, den Kollegen unternommen haben. Zuerst erfolgte der Versuch einer „Darmdekontamination“ mit verschiedenen Breitspektrum-Antibiotika. Anschließend wurde dem Erkrankten eine Stuhlaufschwemmung eines gesunden Spenders als Einlauf zugeführt. Das Ergebnis war eine ausgeprägte Besserung der Symptome (2). Dieses Vorgehen wirft sowohl wissenschaftliche als auch praktische Fragen auf, da es für die Routine sicher ungeeignet ist.

Probiotika – Kausale Strategien zur Beeinflussung der Darmflora

Zur Beeinflussung einzelner Faktoren der Darmflora bieten sich die sogenannten Probiotika an. Der Begriff wird mitunter missverständlich gebraucht. Im Allgemeinen versteht man unter probiotischen Arzneimitteln prophylaktisch oder therapeutisch angewandte, lebende, physiologische Mikroorganismen zur Behandlung von Erkrankungen, die mit Störungen der körpereigenen Mikroflora assoziiert sind (3).

Nissle hat mit dem durch ihn isolierten *E. coli*-Stamm schon 1918 über erste Erfolge in der mikrobiologischen Therapie der Colitis ulcerosa berichtet (4). In der Folgezeit gab es viele derartige Beobachtungen, die aber entweder als Einzelbeobachtung oder in unzulänglicher Weise publiziert wurden mit dem Ergebnis, dass die Behandlungsweise von der akademischen Medizin belächelt wurde und zur Außenseitermethode avancierte. In neuester Zeit hat sich dies gravierend geändert, da inzwischen mehrere kontrollierte, randomisierte, doppelblinde klinische Studien für den Einsatz von Mutaflor® vorliegen, die den GCP (Good Clinical Practice) -Normen entsprechen (5, 6).

Remissionserhalt durch Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 bei Colitis ulcerosa

Die erste klinische kontrollierte, randomisierte Doppelblind-Studie dazu wurde bei 120 Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission durchgeführt (5). Die Patienten erhielten entweder die Standardtherapie mit Mesalazin in der Standarddosis von 3 x 500 mg täglich oder Mutaflor® 2 x 100 mg morgens als Einmaldosis. Der Beobachtungszeitraum lag bei 12 Wochen. Als Erfolgskriterium wurde der CAI (Clinical activity index) nach Rachmilewitz gewählt. Vergleicht man den Verlauf der Erkrankung im Beobachtungszeitraum, so fand sich eine ähnliche Aktivität bei beiden Gruppen (Abb. 2).

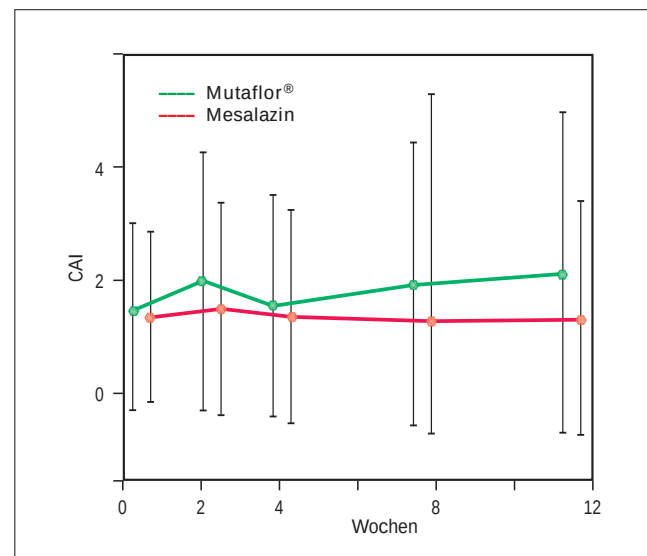


Abb. 2:
Mutaflor® versus Mesalazin
in der Remission
der Colitis ulcerosa

Für den Patienten und auch für den behandelnden Arzt ist die Frage wichtig, ob es zu einem Rezidiv kommt und wenn ja, wann dieses auftritt. Verglichen wurde deshalb die Rezidivrate: Sie lag im Beobachtungszeitraum bei 16 % in der mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 behandelten Gruppe und bei 11,3 % in der Mesalazin-Gruppe; der Unterschied war nicht signifikant.

In dieser ersten Studie zum Einsatz von Mutaflor® wurden auch die Nebenwirkungen erfasst. Bei einer mikrobiologischen Therapie stellt sich immer die Frage nach der Therapiesicherheit, insbesondere dann, wenn lebende Keime eingesetzt werden. Die Zahl der Nebenwirkungen und ihre Ausprägung war in beiden Gruppen gering. Nebenwirkungen traten bei 11 % aller Patienten auf: in der mit Mutaflor® behandelten Gruppe waren 8,6 % der Patienten betroffen und in der Mesalazin-Gruppe 13,3 %. Die meisten Nebenwirkungen waren aus medizinischer Sicht vernachlässigbar. Die gute Verträglichkeit von Mesalazin ist seit über 60 Jahren bekannt. Mutaflor® ist in dieser Studie sogar noch verträglicher gewesen und hat demzufolge ein mindestens genauso niedriges Nebenwirkungspotential.

Der Nachteil dieser ersten Studie ist die kurze Beobachtungsdauer von nur drei Monaten, heutzutage sind 6 bzw. 12 Monate Standard. Eine längere Beobachtungsdauer für die Untersuchung der remissionserhaltenden Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 war damals nicht möglich, da diese Behandlung als experimentell eingestuft wurde und die Ethikkommissionen in Anbetracht einer wirksamen, verfügbaren Therapie eine sehr kritische Haltung einnahmen.

Eine Bestätigung dieser ersten Ergebnisse brachte die zweite Studie (6). Diesmal wurde *E. coli* Stamm Nissle 1917 mit einem anderen Mesalazin verglichen, dem Asacol®, welches in Großbritannien weit verbreitet ist und eine etwas andere Galenik aufweist. Mit 116 aufgenommenen Patienten war die Zahl ähnlich groß wie in der ersten Studie. Der Unterschied liegt vor allem darin, dass schon während des akuten Krankheitsschubes mit der Studie begonnen wurde. Die Patienten erhielten als Standardmedikation Kortikosteroide in offener Weise und ausschleichender Dosierung und zusätzlich für eine Woche 3 x 80 mg Gentamycin. Sie wurden randomisiert und bekamen bis zum Erreichen der Remission entweder 2 x 200 mg Mutaflor® oder 3 x 800 mg Asacol®. Patienten, die sich bei dieser Therapie nach 12 Wochen nicht in Remission befanden, wurden von der Studie ausgeschlossen. Bei Erreichen der Remission wurde die Dosierung der Studienmedikation auf 1 x 200 mg Mutaflor® bzw. 3 x 400 mg Asacol® reduziert. Die Induktion der Remission gelang in beiden Gruppen relativ gut und beruht sicher auf der seit langem bekannten Wirkung der Kortikosteroide. Der Benefit der zusätzlichen Medikation in der Akutphase ist bei diesem Studiendesign nicht ersichtlich.

Viel interessanter ist erneut die Remissionsphase und hierbei die Frage, wieviel Rezidive nach welcher Zeit aufgetreten sind. Während der einjährigen Nachbeobachtung erlitten 67 % der mit Mutaflor® behandelten Patienten ein Rezidiv und 73 % der mit Mesalazin therapierten Patienten. Dieser Unterschied von 6 % ist nicht signifikant; es ließ sich keine Überlegenheit für das eine oder andere Präparat zeigen (Abb. 3). Die mögliche Behauptung, mit Mutaflor® wären alle leichten Fälle einer Colitis ulcerosa behandelt worden und mit Mesalazin die schweren, lässt sich durch



Abb. 3: Mutaflor® versus Mesalazin in der Remission der Colitis ulcerosa (6)

die Betrachtung der Verteilung der Schweregrade der Colitis ulcerosa in beiden Gruppen zu Beginn und während der Behandlung widerlegen (Tab. 1–4). Die Wirksamkeit der beiden Präparate kann damit für alle Ausprägungen einer Colitis ulcerosa als gleich gut eingestuft werden.

Ausprägung	Mesalazin	<i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917
mild	13 (22 %)	12 (21 %)
mittel	27 (46 %)	26 (46 %)
schwer	19 (32 %)	19 (33 %)
Gesamt	59	57

Tab. 1:
Anzahl der
randomisierten
Patienten (6)

Ausprägung	Mesalazin	<i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917
mild	9 (69 %)	8 (67 %)
mittel	24 (89 %)	21 (81 %)
schwer	11 (58 %)	10 (53 %)
Gesamt	44 (75 %)	39 (68 %)

Tab. 2:
Anzahl der Patienten,
die in Remission
kamen (6)

Tab. 3:
Anzahl der Patienten,
die nach der Remission
ein Rezidiv erlitten (6)

Ausprägung	Mesalazin	<i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917
mild	5 (56 %)	5 (62 %)
mittel	19 (79 %)	13 (62 %)
schwer	8 (73 %)	8 (80 %)
Gesamt	32 (73 %)	26 (67 %)

Tab. 4:
Anzahl der Patienten
in Remission
nach 12 Monaten (6)

Ausprägung	Mesalazin	<i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917
mild	4 (44 %)	2 (25 %)
mittel	4 (16 %)	6 (29 %)
schwer	3 (27 %)	2 (20 %)
Gesamt	11 (25 %)	10 (26 %)

Bei der Betrachtung der Verträglichkeit wurde ebenfalls das Ergebnis der ersten Studie bestätigt: beide Medikamente waren hervorragend verträglich.

Der Hauptkritikpunkt an dieser zweiten Studie ist die hohe Rezidivrate in beiden Gruppen, die weit oberhalb vergleichbarer Studien liegt. Hierfür gibt es zwei Gründe. Zum einen wurden die Patienten im akuten Schub der Erkrankung und nicht nach bereits länger bestehender Remission rekrutiert. Zum anderen wurde das Rezidiv nach eigenen, international nicht gebräuchlichen Kriterien definiert und war dadurch offenbar weiter gefasst. Ein Rezidiv lag demnach vor, wenn an einem Tag mindestens vier flüssige Stühle mit oder ohne Blut auftraten und sich in der Sigmoidoskopie mindestens eine granuläre Schleimhautzeichnung fand. Anders sind so hohe Rezidivraten für ein seit Jahrzehnten bewährtes Medikament wie das Mesalazin nicht zu erklären.

Die aktuell in der Auswertung befindliche dritte Studie* hat über 12 Monate die Wirksamkeit von Mutaflor® und Mesalazin bei 327 Patienten auf Äquivalenz geprüft. Die Dosierung betrug 1 x 200 mg Mutaflor® (morgens) bzw. 3 x 500 mg Mesalazin. Die Daten sind noch nicht entblindet, deswegen kann an dieser Stelle nur die Interimsanalyse von 268 Patienten vorgestellt werden. Bei Berücksichtigung der Datenlage ist dies schon eine sehr große Gruppe, wenngleich sie ebenfalls nicht entblindet ist. Dabei fand sich eine Gesamt-Rezidivrate von 34 %. Das entspricht den Erwartungen bei Einhaltung der üblichen therapeutischen Standards. Diese Zahl zeigt weiterhin, dass beide Medikamente offenbar gleich gut wirksam sind, wenn in dieser Studie nicht Mesalazin plötzlich doppelt so gut wirksam gewesen sein sollte wie in allen anderen vorausgegangenen Studien, was höchst unwahrscheinlich ist.

* Anmerkung der Redaktion: Die Auswertung liegt inzwischen vor, siehe Seite 139.

Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 bei Morbus Crohn

Für den Morbus Crohn des Dickdarms gibt es bislang eine publizierte Studie zum Einsatz von *E. coli* Stamm Nissle 1917 (7). Die Therapie wurde in der akuten Phase der Erkrankung (CDAI > 150) begonnen, eingeschlossen wurden 28 Patienten. Die Basismedikation bestand zu diesem Zeitpunkt aus Prednisolon in absteigender Dosierung. Zusätzlich erhielten die Patienten randomisiert Placebo oder Mutaflor®, initial 4 bzw. 20 mg/d, ab dem 25. Tag 200 mg/d. Die Nachbeobachtungsdauer ab Erreichen der Remission betrug ein Jahr. Bei den mit Mutaflor® therapierten Patienten fand sich ein deutlicher „Prednisolon-Spareffekt“ sowie mit 33,3 % eine niedrigere Rezidivrate als in der Placebo-Gruppe (63,6 %). Dieser Unterschied von ca. 30 % ist auffällig, wenngleich er durch die geringe Patientenzahl in dieser Pilotstudie keine statistische Signifikanz erreicht. Die Verträglichkeit der Therapie wurde von Patienten und Therapeuten in beiden Gruppen zu über 80 % als gut oder sehr gut eingestuft.

Zusammenfassung

Wenn man die vorliegenden Studien betrachtet, so findet sich ein einheitliches Bild einer hohen Therapiesicherheit beim Einsatz von *E. coli* Stamm Nissle 1917.

Die Behandlung des akuten Schubes eines Morbus Crohn mit Mutaflor® ist noch nicht ausreichend geprüft. Für den Erhalt der Remission beim Morbus Crohn des Dickdarms gibt es erste positive Erfahrungen. Weitere Studien laufen und werden Auskunft geben, mit welchem Therapieerfolg beim Einsatz von Mutaflor® in der Behandlung von Patienten mit Morbus Crohn zu rechnen ist.

Sehr viel besser ist die Datenlage bei der Colitis ulcerosa. Auch hier ist die Beurteilung der Wirksamkeit von Mutaflor® im akuten Schub nicht abschließend geklärt. Es hat sich aber gezeigt, dass Mutaflor zur Remissionserhaltung nicht schlechter geeignet ist als das bislang als „Goldstandard“ verwendete Mesalazin. Damit hat Mutaflor® seine Wirksamkeit in der Remissionserhaltung unter Beweis gestellt und wurde deswegen auch von der Konsensuskonferenz der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) als evidenzbasierte Methode mit dem Evidenzgrad Ib eingestuft.

Prof. Dr. med. W. Kruis

Evangelisches Krankenhaus Kalk gGmbH
Akademisches Lehrkrankenhaus
für die Universität zu Köln
Innere Abteilung
Buchforststr. 2
51103 Köln

Literatur

1. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R. Controlled trial of Metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995; 108: 1617-1621.
2. Bennet JD, Brinkman M. Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet* 1989; 164.
3. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991; 32: 439-442.
4. Nissle A. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Med. Klinik* 1918; 2: 29-33.
5. Kruis W, Schütz E, Frič P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 853-858.
6. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 635-639.
7. Malchow HA. Crohn's Disease and *Escherichia coli*. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: 653-658

Anmerkung der Redaktion:

Die Ergebnisse der dritten Studie zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa durch Mutaflor® wurden im Mai 2001 auf dem Amerikanischen Gastroenterologen-Kongress vorgestellt*. Mit einer Rezidivrate von 36,4 % unter Mutaflor® und 33,0 % unter Mesalazin erwiesen sich beide Medikamente als äquivalent wirksam (per-protocol-Analyse, p = 0,004, n = 222). In der Intention-to-treat-Gruppe (n = 327) wurden 162 Patienten mit Mutaflor® behandelt und 165 Patienten mit Mesalazin. Die Rezidivrate betrug in der worst-case-Analyse unter Mutaflor® 45,1 % und unter Mesalazin 36,4 %. Diese Werte sind mit p = 0,017 ebenfalls äquivalent. Beide Therapiestrategien erwiesen sich als nebenwirkungsarm.

Schlußfolgerung: Mutaflor® besitzt im Vergleich mit Mesalazin eine äquivalente Wirksamkeit zur Aufrechterhaltung der Remission bei der Colitis ulcerosa. Mutaflor® wird gut vertragen und ist sicher in der Anwendung.

* Kruis W, Frič P, Stolte M. The Mutaflor Study Group. Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalamine. *Gastroenterology* 2001; 120 (Suppl.):A 127.

Der Pouch als Entzündungsmodell

M. Zeitz



Prof. Dr. M. Zeitz

Abstract

Neben den operativ bzw. anatomisch bedingten Störungen nach Proktokolektomie mit Anlage einer ileoanal Pouchanastomose stellt die Pouchitis die wesentlichste Komplikation nach diesem Eingriff dar. Die Pathogenese der Pouchitis ist bisher nur unvollständig geklärt. Von Bedeutung sind Durchblutungsstörungen durch den Eingriff selbst, ein verändertes intraluminales Milieu mit einer bakteriellen Besiedlung, eine vermehrte Gallensäuredekonjugation durch die bakterielle Besiedlung sowie nutritive Störungen, wie z.B. ein Mangel an kurzkettigen Fettsäuren. Wesentlich ist die Frage, ob es sich bei der Pouchitis um ein Wiederauftreten der Grunderkrankung (Colitis ulcerosa) unter neuen Bedingungen handelt.

Die Häufigkeit des Auftretens der Pouchitis variiert stark. So wird bei Patienten, die einen Pouch wegen einer familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) erhalten haben, die Pouchitis nur extrem selten beobachtet (<5%). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wird die Pouchitis in einer Häufigkeit von 30 bis 50 % beobachtet. Die Bedeutung der Darmflora für die Entstehung der Pouchitis zeigt sich u.a. in der wirksamen Behandlung mit Metronidazol. Gleichzeitig konnte in ersten Studien die Wirksamkeit von Probiotika in der Remissionserhaltung bei chronisch rezidivierender Pouchitis nachgewiesen werden.

Bei einer Pouchitis ist das Infiltrat in der Schleimhaut durch polymorphkernige Leukozyten, Lymphozyten, IgG-positive Plasmazellen sowie Makrophagen charakterisiert. Die Zunahme CD4-positiver T-Lymphozyten führt zu einer entsprechenden Verschiebung des CD4/CD8-Quotienten im entzündeten Gewebe im Vergleich zur pouchnahen Ileumschleimhaut im intraindividuellen Vergleich. Die CD4-positiven Zellen zeigen gleichzeitig eine Zunahme von T-Zellaktivierungsmarkern wie dem IL-2-Rezeptor und es konnte eine vermehrte IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Offenbar spielen aktivierte, CD4-positive T-Lymphozyten eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Schleimhautschädigung.

Etwa 5 bis 10 % der Patienten mit Pouch entwickeln das Bild einer chronisch aktiven Pouchitis mit totaler Zottenatrophie. Damit scheint das Risiko dysplastischer Epithelveränderungen und möglicher maligner Entartung zu steigen. Die Pouchitis stellt somit ein klinisches Entzündungsmodell dar, in dem alle Schritte einer chronisch destrukturierenden Schleimhautentzündung einschließlich der möglichen malignen Transformation, wie sie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet werden, systematisch nachvollzogen werden können.

Einleitung

Der Pouch und die Pouchitis erscheinen als klinisches Modell geeignet, um wesentliche neue Erkenntnisse zur Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu finden, die möglicherweise gleichzeitig zu innovativen Therapieansätzen führen können.

Der Begriff Pouchitis umschreibt jede Form einer Entzündung, unabhängig von der Ursache. Es fehlt eine Nomenklatur, z.B. Pouchitis im engeren Sinne, idiopathische Pouchitis, primäre und sekundäre Pouchitis. Im Folgenden wird unter dem Begriff Pouchitis ausschließlich die idiopathische bzw. primäre Pouchitis gefasst. Die Verlaufsformen der Pouchitis sind ebenfalls in der Literatur nicht einheitlich definiert, wodurch insbesondere bei der Therapie kaum verwertbare Daten existieren.

Auf der Basis klinischer und experimenteller Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass die Pouchitis eine Remanifestation der chronisch entzündlichen Darmerkrankung unter neuen Bedingungen darstellt. Die Proktokolektomie bei Colitis ulcerosa führt daher nicht zu einer Heilung der Grunderkrankung.

Die restaurative Proktokolektomie mit ileoanaler Pouchanlage schafft die Bedingungen zur Entstehung der Pouchitis mit bisher nicht sicher abzuschätzender Häufigkeit und Langzeitprognose. Unbeschadet hiervon ist dieser Eingriff die Methode der Wahl bei klarer Indikation bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Der Wert dieses Eingriffs und der resultierende Benefit für die Patienten in definierten klinischen Situationen ist unbestritten.

In Deutschland wurden bislang ca. 1000 Pouch-Operationen durchgeführt, in den USA waren es ca. 4000 dieser Operationen. Die Konsensuskonferenz der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) hat festgestellt, dass zur akuten Pouchitis relativ wenig Daten zur Definition, Therapie und Prognose vorliegen (1). Besser sieht die Datenlage bei der langjährigen Nachbeobachtung aus (2-7).

Pouch-Anlage

Operationstechnisch kann man sich die Pouch-Anlage wie folgt vorstellen: Das gesamte Kolon wird einschließlich des Rektums bis zur Anokutanlinie entfernt. Anschließend wird aus dem Ileum ein Reservoir geformt, welches verschiedene Formen haben kann. Inzwischen hat sich die J-Form durchgesetzt. Die Dünndarmschleimhaut wird direkt an der Anokutanlinie anastomosiert, von der Dickdarmschleimhaut bleibt nichts erhalten. Die postoperative Situation ist blindsackähnlich. Die Dünndarmschleimhaut ist normalerweise einer geringeren bakteriellen Besiedlung ausgesetzt als die Dickdarmschleimhaut, wobei im terminalen Ileum schon mehr Keime als im proximalen Dünndarm zu finden sind. Hinzu kommt in dem neu geschaffenen Reservoir eine Stase des Darminhaltes.

Durchgeführt werden solche Operationen bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP). Interessant ist, was postoperativ im Pouch geschieht.

In der Abb. 1 wird der postoperative Befund aus endoskopischer Sicht dargestellt. Es zeigt sich eine völlig unauffällige Dünndarmschleimhaut.

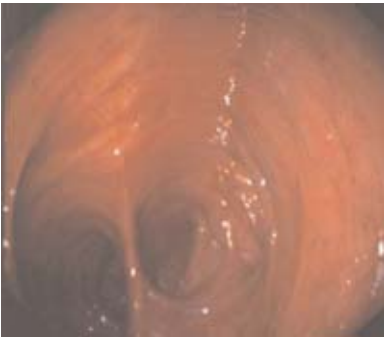


Abb. 1: Ileoanaler Pouch (IAP)

Die Ergebnisse einer solchen Operation sehen wie folgt aus (Tab. 1):

Frühkomplikationen:	
Intestinale Obstruktion	15 %
Pelvine Sepsis	5 %
Notwendigkeit der Pouch-Exzision	
ca. 5 %	
Kontinenz tagsüber	75 % (25 % „Spotting“)
Kontinenz nachts	45 % (45 % „Spotting“)

Tab. 1: Art und Häufigkeit von Komplikationen nach Pouch-Anlage, n = 1193

Mit dem Begriff „Spotting“ wird der Zustand beschrieben, dass geringe Mengen flüssigen Stuhls abgesetzt werden. In der Regel bessern sich diese Beschwerden im Laufe der Zeit. Die durchschnittliche Stuhlfrequenz ist für die Lebensqualität des Patienten wichtig. Sie liegt im Mittel bei 4,5 tagsüber und 0,5 nachts, wenn keine Komplikationen und keine Pouchitis auftreten.

Definition, Diagnostik und Häufigkeit der Pouchitis

Die Pouchitis wird definiert als Entzündung im Pouch nach Ausschluss operativer Komplikationen oder anderer sekundärer Ursachen.

Aus klinischen und prognostischen Gründen sollten unterschieden werden:

- akute Pouchitis,
- akut-rezidivierende Pouchitis,
- chronisch-atrophische Pouchitis.

Die Diagnose einer akuten Pouchitis basiert auf:

- Klinischer Symptomatik:
Stuhlfrequenz, Blutung, Fieber, laborchemische Entzündungsparameter
- Klinischer, insbesondere rektal digitaler Untersuchung
- Endoskopie:
Rötung, Ödem, Erosionen, Ulzerationen, Spontaneinblutungen, Fibrinbeläge
- Histologie:
Ulzerationen, Kryptenabszesse, Infiltration durch Granulozyten

Die akut-rezidivierende Pouchitis ist durch wiederholt auftretende akute Schübe einer Pouchitis gekennzeichnet. Die Diagnose einer chronischen Pouchitis wird gestellt bei Vorliegen einer entzündlichen Reaktion im Pouch, deren Symptomatik und endoskopisch/histologischer Befund über mehr als 3 Monate anhält und bei histologischem Nachweis einer subtotalen bzw. totalen Zottenatrophie trotz Akuttherapie.

Bei der (idiopathischen bzw. primären) Pouchitis handelt es sich um eine ätiologisch unklare Entzündung des Pouches, die unabhängig von eventuell vorhandenen chirurgischen Komplikationen auftritt. Eine international verbindliche Definition der Pouchitis und ihrer Verlaufsformen fehlt.

Das Risiko, eine akute Pouchitis zu erleiden, beträgt bei Patienten mit Colitis ulcerosa bis zum 2. Jahr etwa 30 %, um danach verlangsamt auf bis zu 50 % und mehr zu steigen (3-7). Bei ca. 5–10 % der Patienten geht die akute Pouchitis in eine chronische Form über. Bei Patienten mit familiärer Polyposis (FAP) ist die Pouchitis mit weniger als 5 % als sehr seltenes Ereignis anzusehen. Risikofaktoren für die Entwicklung einer Pouchitis sind extraintestinale Manifestationen (8), insbesondere die PSC (Primär sklerosierende Cholangitis) (9). Bezüglich der ANCA(Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper)-Positivität liegen widersprüchliche Daten vor (10-12). Auch die Rolle einer zuvor vorhandenen „back-wash“-Ileitis wird kontrovers beurteilt (13).

Der Diagnose Pouchitis gehen Untersuchungen zum Ausschluss sekundärer Pouchitisformen voraus. Für den Ausschluss chirurgischer Komplikationen sind Computertomographie (14), Kernspintomographie (15), Kontrasteinlauf (16) und Endosonographie (17) (in individueller Reihenfolge) notwendig und geeignet.

Die Parameter zur Diagnose der akuten Pouchitis werden durch den Pouchitis Disease Activity Index (PDAI) zusammengefasst (18). Seine Berechnung zur Beurteilung der Pouchitis-Aktivität ist wünschenswert.

Für die chronische Pouchitis ist bislang keine Dauer definiert. Unklar ist auch, wie eine chronische - endoskopisch oder histologisch gesicherte - Entzündung ohne klinische Symptomatik zu bewerten ist.

Endoskopischer Befund der akuten Pouchitis

In den Abb. 2 und 3 wird der endoskopische Befund einer akuten Pouchitis dargestellt. Der makroskopische Aspekt ähnelt dem der Colitis ulcerosa: es zeigt sich eine diffus veränderte granulierte Schleimhaut mit Spontanblutungen. Es gibt andererseits auch Patienten, die typische segmentale entzündliche Veränderungen haben. Zwischen umschriebenen landkartenförmigen Ulzera finden sich hierbei normale Schleimhautinseln oder aphthöse Läsionen. Dieses Bild hat eher Ähnlichkeit mit einem Morbus Crohn und kommt noch öfter vor als der Colitis ulcerosa-ähnliche Befund.



Abb. 2:
Endoskopischer Befund
einer akuten Pouchitis;
multiple aphthöse Läsionen.



Abb. 3:
Endoskopischer Befund
einer akuten Pouchitis;
multiple Ulzerationen.

Histologie der akuten Pouchitis

Validierte Kriterien zum histologischen Erscheinungsbild der Pouchitis fehlen bislang (19-24). Die Wertigkeit der Plasmazellinfiltration ist bei der Diagnose der akuten Pouchitis nicht gesichert, stellt jedoch für die Diagnose der chronischen Pouchitis einen wichtigen Befund dar. Ein klinisch relevanter Parameter ist das Ausmaß der Kryptenhyperplasie bzw. der Zottenatrophie. Er dient der Einteilung der Pouchitisformen und ihres Verlaufes (19, 20, 23-25). Auch bei einem wegen FAP angelegten Pouch tritt eine Zottenatrophie auf. Dies ist wahrscheinlich durch die blindsack-ähnliche Situation bedingt. Es entwickeln sich dann aber zusätzlich bei der akuten Pouchitis eine teilweise fast totale Zottenatrophie und eine destruiierende Entzündung mit Erosionen an der Oberfläche oder tieferen Ulzerationen.

Untersucht man die Entwicklung der Villushöhe und der Kryptenlänge im ileoanalen Pouch in unterschiedlichen klinischen Situationen, finden sich folgende Charakteristika (Abb. 4):

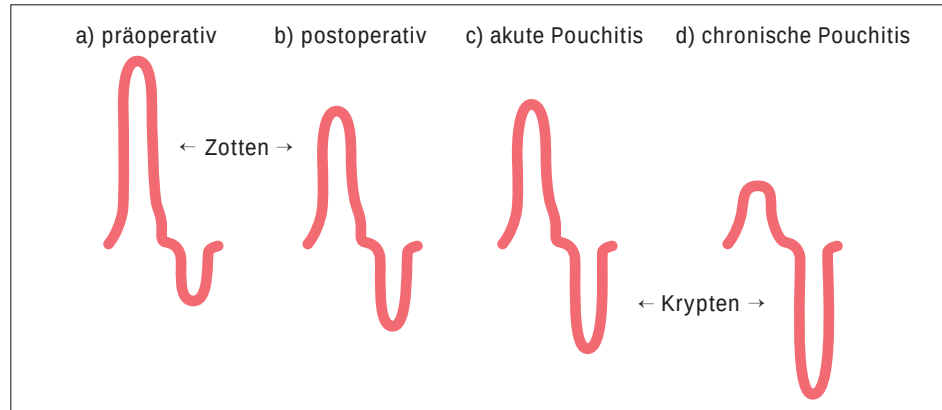


Abb. 4: Zotten-Krypten-Verhältnis

Postoperativ kommt es bei allen Patienten zu einer mäßigen Zottenatrophie und gleichzeitig zu einer Kryptenverlängerung. Bei Auftreten einer Pouchitis ist die Transformation noch ausgeprägter. Patienten mit rezidivierenden akuten Pouchitiden zeigen eine deutliche Kryptenverlängerung, die bei der chronischen Pouchitis noch ausgeprägter ist. Wenn dann noch die Zottenatrophie hinzukommt, findet sich ein Sprueartiges Bild (23). Damit lassen sich durch die systematische Beurteilung des Musters der Schleimhautschädigung die Subgruppen der Patienten mit Pouchitis unterscheiden.

Es finden sich zusätzlich immunologische Veränderungen in der Schleimhaut eines Pouches. Bei einer Pouchitis kommt es zu einer signifikanten relativen Zunahme CD4-positiver T-Lymphozyten mit einer konsekutiven Verschiebung des CD4/CD8-Quotienten im Vergleich zur pouchnahen Ileumschleimhaut im intraindividuellen Vergleich. Die CD4-positiven Zellen zeigen gleichzeitig eine Zunahme von T-Zellaktivierungsmarkern wie dem Interleukin-2-Rezeptor und korrelieren mit der Kryptentiefe (23). Die aktivierten Zellen in der Mukosa produzieren auch vermehrt proinflammatorische Zytokine. So ist bei Patienten mit Pouchitis die Interferon- γ -Produktion erhöht. Ähnliches trifft für das Interleukin1- β zu. Ein weiterer Parameter ist die Expression der Matrix-Metalloproteinasen. Diese korreliert mit dem Ausmaß der Schleimhautschädigung und der Zottenatrophie. Bei Patienten ohne Pouchitis findet sich kein Unterschied in der Expression dieser Matrix-abbauenden Enzyme zwischen Ileum und Pouch.

Auf der Basis dieser Befunde kann ein Modell postuliert werden, wie es in ähnlicher Weise für die Sprue oder die Schleimhautschädigung bei HIV und anderen Infektionen des Dünndarms diskutiert wird. Eine pathologische Reaktion auf Keime im Darmlumen

und ein regulatorischer Defekt in der Mukosa führen zu einer Aktivierung von T-Zellen, gefolgt von einer Zytokinbildung und Makrophagen-Stimulation. Diese produzieren TNF- α und Interferon γ , was einerseits zu einer direkten Epithelschädigung führen kann und andererseits mesenchymale Zellen der Mukosa anregt, Matrix-Metalloproteinasen zu bilden. Die Resultate dieser Mechanismen sind die Zottenatrophie und die Schleimhautschädigung.

Die Bedeutung der chronischen Entzündung bei der Pouchitis ist vergleichbar mit der Situation bei der Colitis ulcerosa, insbesondere der Pankolitis, und der Gefahr der Entwicklung eines Kolonkarzinoms. Dysplasien sind bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 9 Jahren bei 71 % der Patienten nachweisbar (25). In einem Fall kam es bereits 2 Jahre nach Anlage eines ileoanalen Pouches zu einem Adenokarzinom im Pouch (37). Aufgrund der Assoziation zwischen schwerer Zottenatrophie und Dysplasieentwicklung im Pouch (19, 24, 25) sollte bei jeder histologischen Begutachtung als Minimum eine semiquantitative Aussage zur Zottenhöhe erfolgen. Die Notwendigkeit von Stufenbiopsien muss prospektiv evaluiert werden, da der fokale segmentale Charakter der Entzündung von Bedeutung zu sein scheint (22).

Therapie der akuten Pouchitis

Die Datenlage zur Therapie der Pouchitis ist ungenügend. Eine Vergleichbarkeit der Studien wird zudem durch eine uneinheitliche Definition der Pouchitisformen erschwert. Insgesamt sind 4 randomisierte kontrollierte Studien zur medikamentösen Therapie der Pouchitis publiziert (26).

Zur Therapie der akuten Pouchitis bzw. eines akuten Schubes einer rezidivierenden Pouchitis werden meist Antibiotika eingesetzt. An erster Stelle stehen hierbei Metronidazol und Ciprofloxazin (27-29). Dies weist wieder darauf hin, dass die Darmflora im Pouch für die Entstehung der Pouchitis von entscheidender Bedeutung ist. Bei Unverträglichkeit von oralem Metronidazol stellt topisch angewendetes Metronidazol eine Alternative dar (30). Bei 8 von 11 Patienten, die auf eine Therapie mit Metronidazol nicht ausreichend ansprachen oder diese nicht tolerierten, war die Therapie mit Ciprofloxazin effektiv (29). Bei Versagen der Primärtherapie kann ein Antibiotikawechsel vorgenommen oder eine unspezifische antiinflammatorische Therapie versucht werden.

Remissionserhaltung

Wichtig, aber derzeit noch ungeklärt sind Fragen zur Remissionserhaltung. Die Wirksamkeit von Probiotika zur Rezidivprophylaxe wurde bisher in einer placebokontrollierten, doppelblinden Studie mit 40 Patienten gezeigt (31). Weitere Untersuchungen, auch mit *E. coli* Stamm Nissle 1917, werden den therapeutischen Wert von Probiotika für die Behandlung der Pouchitis oder die Remissionserhaltung klären. Patienten mit einem akutem Schub einer rezidivierenden bzw. einer chronisch aktiven Pouchitis wurden mit Metronidazol p.o. (32) oder einer oralen Kombinationstherapie aus Ciprofloxazin und Rifaximin (33) therapiert.

Nachsorge

Nach ileoanaler Pouchanlage sollte eine Endoskopie mit Histologie und beschreiben der Morphologie (Zottenatrophie) 3 Monate später und dann in jährlichen Intervallen in einem spezialisierten Zentrum erfolgen. Bei Patienten mit schwerer Zottenatrophie wird eine Dysplasiediagnostik (Stufenbiopsien aus dem Pouch wie bei langjähriger ausgedehnter Colitis ulcerosa) empfohlen. Eine spezielle Nachsorge sollte sich auch auf chirurgisch operative funktionelle Folgezustände beziehen.

Das wesentlichste Problem stellt die Remanifestation der Entzündung mit der eventuellen Folge einer Malignomentwicklung dar. Hierbei muss aufgrund der Datenlage bei Patienten mit noch verbliebener Rektumschleimhaut von einem noch immer bestehenden Karzinom-Risiko ausgegangen werden (34-36). Besondere Aufmerksamkeit im Rahmen der Nachsorge muss der Entwicklung von Dysplasien im Pouch von Patienten mit chronisch-atrophischer Pouchitis gelten (19, 24, 25).

Zusammenfassung

Bei dem ileoanal Pouch wird ein Teil des Dünndarms zu einem blindsackähnlichen Reservoir geformt, in welchem eine erneute bakterielle Besiedelung erfolgt. Dadurch kommt es bei allen Patienten zu einer gewissen T-Zell-Aktivierung, die zu einer Zottenatrophie und Kryptenverlängerung führt. Dies ist unabhängig von der Grunderkrankung. Offenbar muss zusätzlich ein regulatorischer Defekt vorhanden sein, wie er für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen postuliert wird. Dieser noch unbekannte Defekt führt bei den Patienten zu einer überschießenden Immunantwort. Die Folge ist eine destruierende Entzündung mit Ulzerationen. Eine Subgruppe dieser Patienten reagiert offenbar mit einer chronisch-atrophischen Pouchitis, die auch mit Dysplasien vergesellschaftet sein kann. Diese Erkrankung ist in besonderer Weise geeignet, pathogenetische Mechanismen und therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu untersuchen. Dazu gehören z.B. die Beeinflussung der Darmflora und der Einsatz immunmodulierender Substanzen. Da es sich bei der Pouchitis noch um ein schlecht charakterisiertes Krankheitsbild handelt, sollten alle Patienten mit einem Pouch in einem spezialisierten Zentrum nachuntersucht werden. Ein Nachsorgestandard kann derzeit nicht festgelegt werden. Die mangelhafte Studienlage zur medikamentösen Therapie der Pouchitis impliziert, dass entsprechende Studien geplant und dass möglichst alle Patienten in Studien eingebracht werden sollten.

Prof. Dr. med. M. Zeitz

Freie Universität Berlin
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Medizinische Klinik und Poliklinik
Medizinische Klinik I (Gastroenterologie,
Infektiologie, Rheumatologie)
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin

Literatur

1. Zeitz M. Pouchitis. Leitlinien der DGVS in: Stange EF, Riemann J, von Herbay A, Lochs H, Fleig WE, Schölmerich J, Kruis W, Porschen R, Bruch H-P, Zeitz M, Schreiber S, Moser G, Matthes H, Selbmann HK, Goebell H, Caspary WF. Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa – Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Z Gastroenterol 2001; 39: 19-20 und 59-62
2. Buhr HJ, Heuschen UA, Stern J et al. Kontinenzhaltende Operation nach Proktokolektomie. Indikation, Technik und Ergebnisse. Chirurg 1993; 64: 601-13
3. Kartheiser AH, Parc R, Penna CP et al. Ileal pouch-anal anastomosis as the first choice operation in patients with familial adenomatous polyposis: a ten-year experience. Surgery 1996; 119(6): 615-23
4. Meagher AP, Farouk R, Dozois RR et al. J ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis: complications and long-term outcome in 1310 patients. Br J Surg 1998; 85(6): 800-3
5. Hurst RD, Chung TP, Rubin M. The implications of acute pouchitis on the long-term functional results after restorative proctocolectomy. Inflamm Bowel Dis 1998; 4(4): 280-4
6. Tiainen J, Matikainen M. Health-related quality of life after ileal J-pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis: long-term results. Scand J Gastroenterol 1999; 34(6): 601-5
7. Seidel SA, Peach SE, Newman M et al. Ileoanal pouch procedures: clinical outcomes and quality-of-life assessment. Am Surg 1999; 65(1): 40-6
8. Lohmuller JL, Pemberton JH, Dozois RR et al. Pouchitis and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease after ileal pouch-anal anastomosis [see comments]. Ann Surg 1990; 211(5): 622-7; discussion 627-9
9. Penna C, Dozois R, Tremaine W et al. Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis occurs with increased frequency in patients with associated primary sclerosing cholangitis. Gut 1996; 38(2): 234-9
10. Shanahan F. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: are they important? Gastroenterology 1994; 107(2): 586-9
11. Esteve M, Mallolas J, Klaassen J, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in sera from colectomized ulcerative colitis patients and its relation to the presence of pouchitis. Gut 1996; 38(6): 894-8
12. Yasuda N, Thomas P, Ellis H et al. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis after restorative proctocolectomy do not correlate with the presence of pouchitis. Scand J Gastroenterol 1998; 33(5): 509-13
13. Schmidt CM, Lazenby AJ, Hendrickson RJ et al. Preoperative terminal ileal and colonic resection histopathology predicts risk of pouchitis in patients after ileoanal pull-through procedure. Ann Surg 1998; 227(5): 654-62; discussion 663-5
14. Thoeni RF, Fell SC, Engelstad B et al. Ileoanal pouches: comparison of CT, scintigraphy, and contrast enemas for diagnosing postsurgical complications. AJR Am J Roentgenol 1990; 154(1): 73-8
15. Libicher M, Scharf J, Wunsch A et al. MRI of pouch-related fistulas in ulcerative colitis after restorative proctocolectomy. J Comput Assist Tomogr 1998; 22(4): 664-8
16. Hsung JM, Levine MS, Rombeau JL et al. Total proctocolectomy and ileoanal pouch: the role of contrast studies for evaluating postoperative leaks. Abdom Imaging 1998; 23(4): 375-9
17. Solomon MJ, McLeod RS, O'Connor BI et al. Assessment of peripouch inflammation after ileoanal anastomosis using endoluminal ultrasonography. Dis Colon Rectum 1995; 38(2): 182-7
18. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP et al. Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: a Pouchitis Disease Activity Index. Mayo Clin Proc 1994; 69(5): 409-15
19. Sarigol S, Wyllie R, Gramlich T et al. Incidence of dysplasia in pelvic pouches in pediatric patients after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 28(4): 429-34
20. Setti Carraro P, Talbot IC, Nicholls RJ. Longterm appraisal of the histological appearances of the ileal reservoir mucosa after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. Gut 1994; 35(12): 1721-7
21. Setti Carraro PG, Talbot IC, Nicholls JR. Patterns of distribution of endoscopic and histological changes in the ileal reservoir after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. A long-term follow-up study. Int J Colorectal Dis 1998; 13(2): 103-7
22. Shepherd NA, Healey CJ, Warren BF et al. Distribution of mucosal pathology and an assessment of colonic phenotypic change in the pelvic ileal reservoir. Gut 1993; 34(1): 101-5
23. Stallmach A, Moser C, Hero-Gross R et al. Pattern of mucosal adaptation in acute and chronic pouchitis. Dis Colon Rectum 1999; 42(10): 1311-7
24. Veress B, Reinholdt FP, Lindquist K et al. Long-term histomorphological surveillance of the pelvic ileal pouch: dysplasia develops in a subgroup of patients. Gastroenterology 1995; 109(4): 1090-7

25. Gullberg K, Stahlberg D, Liljeqvist L et al. Neoplastic transformation of the pelvic pouch mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 112(5): 1487-92
26. Sandborn WJ, McLeod R, Jewell DP. Medical therapy for induction and maintenance of remission in pouchitis: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5(1): 33-9
27. Svaninger G, Nordgren S, Oresland T et al. Incidence and characteristics of pouchitis in the Kock continent ileostomy and the pelvic pouch. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28(8): 695-700
28. Rauh SM, Schoetz DJ, Roberts PL et al. Pouchitis--is it a wastebasket diagnosis? *Dis Colon Rectum* 1991; 34(8): 685-9
29. Hurst RD, Molinari M, Chung TP et al. Prospective study of the incidence, timing and treatment of pouchitis in 104 consecutive patients after restorative proctocolectomy. *Arch Surg* 1996; 131(5): 497-500; discussion 501-2
30. Nygaard K, Bergan T, Bjornekleit A et al. Topical metronidazole treatment in pouchitis. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29(5): 462-7
31. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-309
32. Madden MV, McIntyre AS, Nicholls RJ. Double-blind crossover trial of metronidazole versus placebo in chronic unremitting pouchitis. *Dig Dis Sci* 1994; 39(6): 1193-6
33. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A et al. Antibiotic combination therapy in patients with chronic, treatment-resistant pouchitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13(6): 713-8
34. Stern H, Walfisch S, Mullen B et al. Cancer in an ileoanal reservoir: a new late complication? *Gut* 1990; 31(4): 473-5
35. Sequens R. Cancer in the anal canal (transitional zone) after restorative proctocolectomy with stapled ileal pouch-anal anastomosis. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12(4): 254-5
36. Puthu D, Rajan N, Rao R et al. Carcinoma of the rectal pouch following restorative proctocolectomy. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1992; 35(3): 257-60
37. Vieth M, Grunewald M, Niemeyer C et al. Adenocarcinoma in an ileal pouch after prior proctocolectomy for carcinoma in a patient with ulcerative pancolitis. *Virchows Arch* 1998; 433(3): 281-4

Klinische Bedeutung von *Escherichia coli* Teil 2

Vorsitzende:



Prof. Dr. H. Bossekert



Prof. Dr. W. Londong

Sicherheit mikrobieller Arzneimittel

H. Tschäpe

Reizdarmsyndrom: ein postinfektiöses Ereignis?

H. Lochs

Pathophysiologie und Therapie funktioneller Störungen des unteren Intestinaltraktes

S. Müller-Lissner

Diarrhoe bei erreg器induzierter Kolitis – Ansatzpunkte einer antagonistischen mikrobiellen Therapie

K.J. Goerg

Erfolgreiche Behandlung von Halitosis mit Mutaflor®

J. Henker

Offene Pilotstudie zur Wirkung von Mutaflor® bei symptomatischer Kolondivertikulose

P. Frič

Sicherheit mikrobieller Arzneimittel

H. Tschäpe



Prof. Dr. H. Tschäpe

Abstract

Im Schatten der Chemisierung der Medizin sind biologische Arzneimittel („grüne Arzneien“) von zunehmender Bedeutung geworden. Für die Behandlung funktioneller und chronischer Darmerkrankungen (Diarrhoe, Obstipation, Meteorismus, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn etc.), zur Behandlung von Fehlernährung, zur Immunstimulation und zur Wiederherstellung einer gesunden Darmflora nach Antibiotika- oder Strahlentherapie kommen gegenwärtig verschiedene mikrobielle Arzneimittel zur Anwendung, die insbesondere als Lebendkeime, aber auch als Tot-Antigene oder Zellextrakte verabreicht werden. Obwohl solche mikrobiellen Arzneimittel oft schon seit vielen Jahrzehnten im Gebrauch sind, müssen sie sich den gegenwärtigen Sicherheitsbedenken stellen, wie dies für die Lebendimpfstoffe und für den Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen in der Lebensmittelindustrie der Fall ist. Auch eine erneute Überprüfung ihrer Wirksamkeit ist dabei einzubeziehen. Mit Hilfe umfangreicher experimenteller (molekularbiologische Analyse von Pathogenitäts-, Fitnessfaktoren etc.) und epidemiologischer Methoden (klinische Wirksamkeit, ökologische Einflüsse etc.) sind mikrobielle Arzneimittel einer diesbezüglichen Tiefenprüfung zu unterziehen, um folgende Fragen beantworten zu können:

Was sollen diese Arzneimittel bewirken? (Kolonisation und Verdrängen, Stimulierung von IgA, IgG, Bildung heilsamer Substanzen wie Vitamine etc.)

Welche Eigenschaften sollten diese Arzneimittel haben? (Fitnessfaktoren, Erkennungsmarker, Konkurrenzfaktoren, z. B. Kolizine, Mikrozine, Immuninduktion)

Welche Eigenschaften dürfen diese mikrobiellen Arzneimittel nicht haben? (Virulenzfaktoren, Resistenzfaktoren, transferable genetische Elemente wie Plasmide etc.)

Eine solche Tiefenprüfung der mikrobiellen Arzneimittel nach dem Stande der Wissenschaft und Technik heute ist wichtig, um weiter das Vertrauen in diese Arzneimittel zu steigern und sie in ihrer Anwendung zu verbreiten. Nur wenige der bisher auf dem Markt befindlichen Produkte halten aber einer solchen Anforderung stand.

Einleitung: Was sind mikrobielle Arzneimittel?

Biologische Arzneimittel stellen zunehmend eine beliebte Alternative in der Behandlung verschiedenartiger Krankheiten dar. Für den Verbraucher liegt dabei der Gedanke natürlicher, ohne Nebenwirkungen heilender Medikamente nahe und manche Sorgen und Bedenken entfallen, durch die weitere Chemisierung der Medizin Schaden zu erleiden. Auch die mikrobiellen Arzneimittel finden z. B. zur Heilung von Darmerkrankungen und Darmfunktionsstörungen eine immer größere Anwendung, besonders unter dem Gesichtspunkt der Wiederherstellung der natürlichen und gesunden residenten Besiedlungsflora.

Verschiedene Mikroorganismen (*E. coli*, Laktobazillen, Bifidobakterien, Enterokokken, *Saccharomyces* etc., vgl. Rote Liste) sind gegenwärtig als mikrobielle Arzneimittel im Einsatz. Sie werden besonders zur Behandlung funktioneller und chronischer Darmerkrankungen wie Diarrhoe, Obstipation, Meteorismus, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sowie zur Therapie von Fehlernährung, zur Immunstimulation und zur Wiederherstellung einer physiologischen Darmflora nach Antibiotika- oder Strahlentherapie angewendet. Es ist davon auszugehen, dass die Bildung eines normalen, gegenüber pathogenen Bakterien schützenden Biofilms auf der Darmschleimhaut die Hauptwirkung vieler mikrobieller Arzneimittel darstellt.

Obwohl die meisten dieser Medikamente seit mehreren Jahren registriert sowie vielfältig im Gebrauch sind (vgl. Rote Liste) und daher im Allgemeinen als sicher gelten, müssen sich alle erneut den gegenwärtigen Sicherheitsbedenken und der öffentlichen Diskussion um die Biosicherheit („Biosafety“) stellen. Diese Debatte begann mit den aufkommenden Zweifeln, ob gentechnologische Arbeiten für Bearbeiter, Anwender und im Allgemeinen für die gesamte Bevölkerung unbekannte, nicht abschätzbare Risiken bergen und wie diese durch Biosicherheitsregeln einzuschränken und zu kontrollieren sind. Diese Bedenken werden heute auf alle Lebendkeim-Applikationen erweitert, wie sie in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie z. B. bei der Anwendung von Probiotika oder der Herstellung von Lebendimpfstoffen vorkommen (27).

Ausgehend von dieser Diskussion sind berechnete Sicherheitsforderungen an die mikrobiellen Arzneimittel gestellt worden, die einer Antwort bedürfen (1, 6, 21, 28). Gegenwärtig ergeben sich daraus drei generelle Anforderungen an mikrobielle Arzneimittel.

Mikrobielle Arzneimittel müssen

- therapeutisch wirken,
- Erkennungsmarker („Stammpass“) besitzen, mit deren Hilfe die Unterscheidung von anderen autochthonen Mitgliedern der Standortflora und die Kontrolle der Stabilität möglich ist,
- „sensu strictu“ sicher sein, d. h. keine pathogenen oder virulenten Merkmale aufweisen, so dass schädliche Nebenwirkungen immer ausgeschlossen sind.

Antworten auf die hier aufgelisteten Sicherheitsforderungen sind vielfach bereits in den vorangegangenen Beiträgen dieses Symposiums gegeben und durch experimentelle Studien belegt worden. Die folgende Übersicht fasst einige der Charakteristika mikrobieller Arzneimittel am Beispiel *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) zusammen:

Wirkung	Stammtypisierung	Sicherheit
• Antagonismus gegen pathogene Keime • Immunmodulation • Milieubereitung • Sauerstoffverbrauch • Unterstützung des Kolonozyten-Stoffwechsels • Vitaminproduktion	• molekulargenetisch • serologisch • mikrobiologisch • biochemisch	Folgende Pathogenitätsfaktoren müssen fehlen • Antibiotika-Resistenz • Toxinbildung (Shiga-Toxine, hitzestabile, hitzelabile Enterotoxine, Zytotoxine wie CNF, Hämolyisinbildung) • Enteroinvasivität • Serumresistenz • Pathogene Adhäsionsmerkmale (P-, M-, S-Fimbrien, CFA I/II-Fimbrien) • transferable Plasmide • Typ-III-Sekretionssystem

Übersicht 1:
Wirkprinzipien mikrobieller Arzneimittel am Beispiel von *E. coli* Stamm Nissle 1917;
CNF-cytotoxic necrotizing factor.

Was sollen mikrobielle Arzneimittel bewirken?

In Abb. 1 sind am Beispiel *E. coli* Stamm Nissle 1917 erwünschte Wirkungsweisen mikrobieller Arzneimittel zusammengestellt, die sich auf besondere Eigenschaften und Leistungen der Mikroorganismen zurückführen lassen. Dazu gehört z. B. die Fähigkeit, pathogene oder potentiell pathogene Besiedler der Darmflora zu unterdrücken

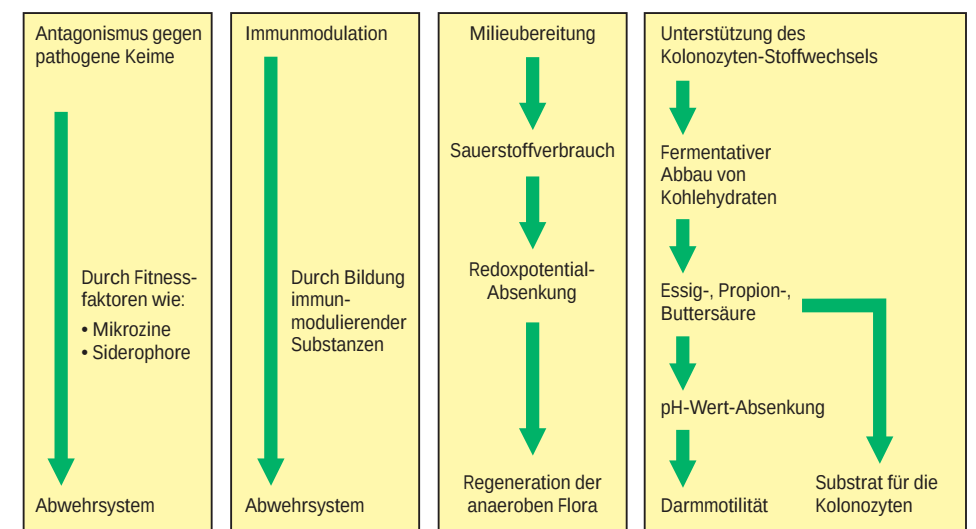


Abb. 1: Wirkprinzipien mikrobieller Arzneimittel am Beispiel *E. coli* Stamm Nissle 1917 (nach 23).

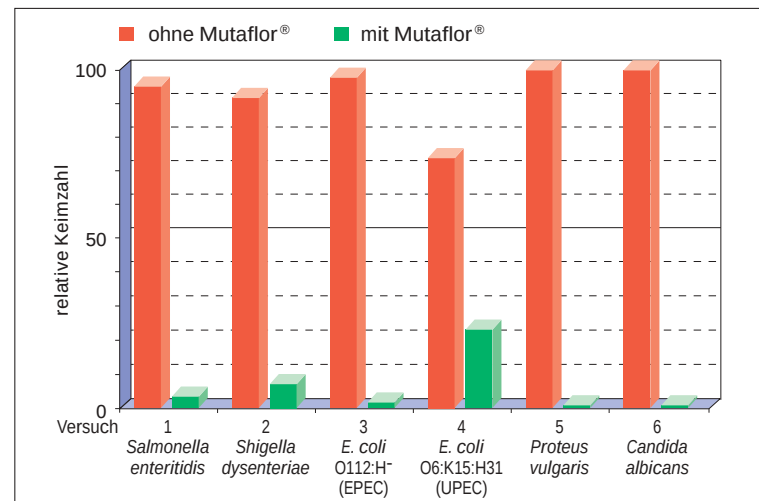


Abb. 2: Antagonismus von *E. coli* Stamm Nissle 1917 gegen verschiedene Mikroorganismen (nach 23). Mutaflor® hemmt signifikant das Wachstum pathogener Bakterien und Pilze.

oder zu verdrängen (Abb. 2) und an ihrer Stelle im Darm zu kolonisieren (Abb. 3). Solche antagonistischen Leistungen könnten durch Colizine, Mikroazine oder andere antimikrobiell wirkende Metaboliten ausgelöst werden (3). Dadurch werden pathogene Bakterien wie Salmonellen, EHEC, Shigellen etc. eliminiert oder in ihrem Wachstum behindert (Abb. 2) (23).

Sind Bakterienzellen mikrobieller Arzneimittel in der Lage, den Darm (z. B. von Neugeborenen) zu besiedeln, hemmen sie die Kolonisierung pathogener oder bedingt pathogener Bakterien (Abb. 3) (16). Dies führt auch zu einer verminderten Rate im Krankenhaus erworbener Infektionen (15, 19).

Welche positiven Eigenschaften haben mikrobielle Arzneimittel?

Besonders geeignet sind mikrobielle Arzneimittel mit einer effektiven Eisenversorgung. Die z. B. bei *E. coli* Stamm Nissle 1917 vorhandene Kaskade verschiedener Siderophore mit sehr unterschiedlicher Eisenbindungsfähigkeit begünstigt einerseits das Wachstum des Probiotikums, andererseits wird anderen, möglicherweise pathogenen Bakterien die Möglichkeit der ausreichenden Eisenversorgung genommen. Verantwortlich dafür ist die außerordentlich hohe Bindungsfähigkeit des Yersiniabaktins zum Eisen. Eisenmangel führt zur sofortigen Reduzierung der metabolischen Aktivität der betroffenen Stämme der Darmflora (7).

Verschiedene Bakterienstämme sind in der Lage, eine Reihe solcher ökologischer Verdrängungs- und Wettbewerbsfaktoren auszubilden. Dazu gehören Colizine, Mikroazine, eisenbindende Siderophore (z. B. Aerobaktin, Yersiniabaktin), Schutz- und Überlebensfaktoren (z. B. die Kapsel K5 bei *E. coli* Stamm Nissle 1917), sowie die Faktoren zur

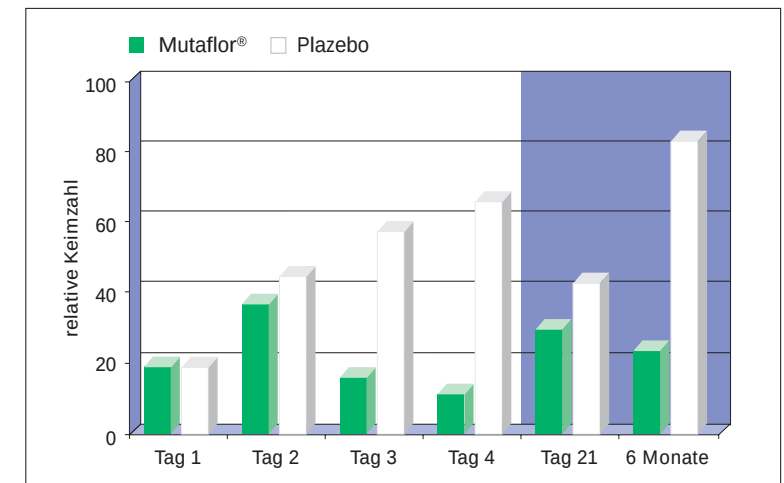


Abb. 3: Besiedlung von Neugeborenen mit pathogenen und potentiell pathogenen Bakterien (nach 16). Mutaflor® schützt vor Besiedlung mit unerwünschten Bakterien. Tag 1-5: Untersuchung während Krankenhausaufenthalt, Tag 21 und 6 Monate: Untersuchung nach Entlassung.

Unterbrechung des „quorum sensing-Netzwerks“. Diese Merkmale stellen per se keine Pathogenitätsfaktoren dar, sondern sind Fitness-Faktoren, die das Überleben sichern.

Fitness-Faktoren sind offenbar für die Wirksamkeit der mikrobiellen Arzneimittel von großer Wichtigkeit und bedingen die erfolgreiche Durchsetzung des therapeutisch eingesetzten Stammes gegenüber anderen, pathogenen Bakterienarten bzw. die Verhinderung ihrer Ansiedlung. Diese Faktoren sind jedoch selbst nicht ausreichend, systemische oder lokale Infektionen zu verursachen. Deshalb besteht eine hohe Therapiesicherheit, die auch bei immungeschwächten Patienten systemische Krankheitsbilder ausschließt.

Viele mikrobielle Arzneimittel haben eine immunmodulierende Wirkung (9, 14, 23). Bei Applikation von *E. coli* Stamm Nissle 1917 kommt es z. B. zu einem Anstieg von IgA und IgM (14). Das deutet auf eine Aktivierung des GALT hin, wobei noch offen ist, ob auch unspezifische Abwehrfaktoren wie die Defensine stimuliert werden. Eine weitere Besonderheit von *E. coli* Stamm Nissle 1917 besteht darin, immunmodulierend ohne immuntoxisch zu sein. Dies könnte durch seine semirauhe LPS-Ausrüstung bedingt sein. So besitzt dieser Stamm nur eine „repeating unit“ im O6-Antigen und ist dadurch in der Lage, Makrophagen unspezifisch zu aktivieren, ohne aber eine Entzündungsreaktion zu initiieren.

Mikrobielle Arzneimittel können auch der Ernährung oder Regeneration des Darmepithels dienen. Dies geschieht durch bakterielle Stoffwechselprodukte wie Butter-, Propion- und Essigsäure. Durch Sauerstoffverbrauch können mikrobielle Arzneimittel wie *E. coli* Stamm Nissle 1917 für eine Milieustabilisierung sorgen und so zur Verbesserung der Anaerobier-Flora beitragen (23).

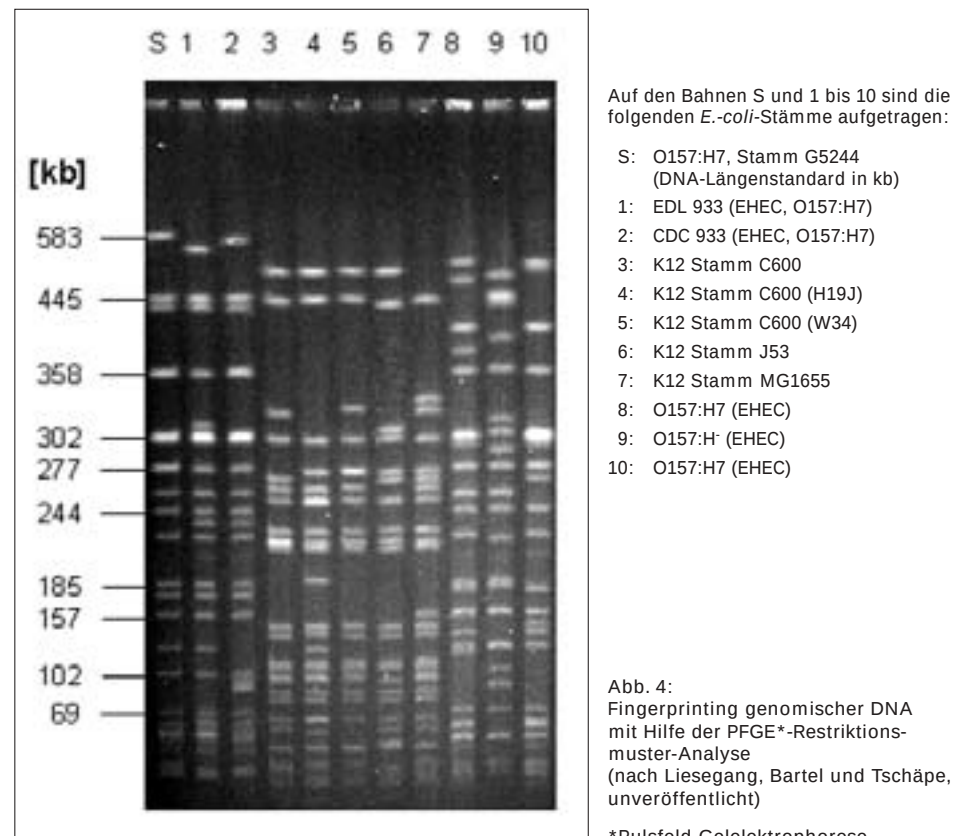
Mikrobielle Arzneimittel müssen klar definierte Stämme enthalten

Von mikrobiellen Arzneimitteln ist aus mehreren Gründen zu fordern, dass sie ausschließlich exakt definierte Keime enthalten. Neben der Frage der Therapiesicherheit sind viele Wirkungen stammspezifisch.

Definierte Bakterienstämme ermöglichen

- die Wiedererkennung und Verfolgung des mikrobiellen Arzneimittels unter verschiedenen Applikationsformen,
- die Diskriminierung von anderen Bakterien der Stuhlflora bzw. aus anderen Habitaten mittels Erkennungsmarkern,
- das Monitoring der Stabilität des Stammes in der Kultur und in vivo.

Ein sogenannter „Stammpass“ wird mit Hilfe molekulargenetischer, serologischer, mikrobiologischer und biochemischer Methoden erstellt. Von besonderer Wichtigkeit ist das genomische Fingerprinting mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE-Muster) (Abb. 4). Ein solches PFGE-Fingerprinting ist heutzutage Standard in der



Bakteriologie zur Erfassung klonaler Eigenschaften. Durch Kombination mit einem zweiten molekularen Fingerprinting werden insbesondere kleinere molekulare Veränderungen schnell erfasst. Als ein diesbezüglich gutes Merkmal hat sich die Bestimmung des P-Gen-Profiles erwiesen, das die Anzahl und die relative Lage von lambdoiden Bakteriophagen ermittelt (8). Auch die Bestimmung des Elektrotyps, d. h. die Bestimmung des LPS-Musters (Musters der repeating units des O-Antigens), des OMP-Musters (Anzahl und relative Größe der Außenmembran-Proteine) und des MLE-Musters (unterschiedliche elektrophoretische Mobilität jeweils gleicher house-keeping-Enzyme) gehören zum Stammpass. Wie eine solche Charakterisierung aussehen sollte, ist beispielhaft für den *E. coli* K12 in Übersicht 2 zusammengestellt.

Mithilfe solcher Stammpässe kann auch die Stabilität der betreffenden Arzneimittel-Stämme überwacht werden. Das betrifft vor allem mögliche genetische und phänotypische Veränderungen, die im Laufe der Produktion des Arzneimittels auftreten könnten. Solche Varianten sollten rechtzeitig zu erkennen sein, um ggf. frühestmöglich Gegenmaßnahmen zu ihrer Eliminierung vornehmen zu können.

Übersicht 2:
 Beispiel für einen
 Stammpass
 (*E. coli* K-12)
 (nach 4, 5, 11).

Stammbezeichnung:	K-12 (1922 isoliert in Stanford, USA)
Stammnummer:	z. B. C 600
Serotyp:	O _{rough} :H48, (rfb:IS5)
Elektrotyp:	OMP (Outer Membrane Protein) MLE (Multilocus Enzym Typ) LPS (Lipopolysaccharide)
Pathogenitätstyp:	PCR-negativ für die Gene und Genprodukte: <i>kps</i> (K1, K5) <i>aer</i> , <i>sfa/foc</i> , <i>pap/prf</i> , <i>cfa-1,2</i> , <i>hlyA</i> , <i>ehxA</i> , <i>cnf-1</i> , <i>eaeA</i> , Stx, Ctx, HLT, Sta, <i>est-1</i> , etc.
Plasmidmuster:	Keine Plasmide
Genotyp:	PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese)-Typ ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence)-Typ P-Gen-Profil IS 100
Genomgröße:	4,7 x 10 ⁶ bp (base pairs) über 1600 Gene identifiziert über 2500 ORFs (Open reading frame, synonym für Strukturen), identifiziert nach Sequenzierung

Weitere Abkürzungen:

IS-Insertionssequenz, P-Gen = Regulationsgen P des Phagen Lambda, *kps* = Gen für Kapselpolysaccharide, *aer* = Gen für Aerobaktin, *sfa/foc*, *pap/prf*, *cfa* = Gene für pathogene Adhäsionsfaktoren, *hlyA* = Gen für α -Hämolysin, *ehxA* = Gen für EHEC-Hämolysin, *cnf* = Gen für cytotoxischen necrotizing factor (CNF), *eaeA* = Gen für Intimin, Stx = Shigatoxin, Ctx = Cholera-Toxin, HLT = hitzelabiles Toxin, Sta = hitzestabiles Toxin, *est* = Gen für hitzestabiles Toxin von *E. coli*.

Was sollten mikrobielle Arzneimittel nicht haben?

Mikrobielle Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren wie bestimmte Toxine, Adhäsine, Invasine oder durch das Typ-III-Sekretionssystem vermittelte virulenz-assoziierte Effektorproteine sollten nicht bei mikrobiellen Arzneimitteln vorhanden sein (Tab. 1). Auch sollten solche Pathogenitätsfaktoren fehlen, die eine Serumresistenz bewirken.

Pathogene Mikroorganismen sind immer dadurch gekennzeichnet, dass sie über ein ganzes Spektrum von Virulenzfaktoren verfügen. Die einzelnen Module bestimmen erst in der Summe das Ausmaß und den Charakter der Pathogenität eines Stammes (10).

Dass einige Bakterienarten und Stämme in der Population eines Bakterienkonsortiums (z.B. im Wasser oder im Darm gesunder Probanden, Abb. 5) einzelne Pathogenitäts- und Fitnessfaktoren aufweisen, sagt nichts über deren Potenz aus, Krankheiten auszulösen. Es ist vielmehr ein typischer Befund, dass einzelne solcher Module oft auch innerhalb einer nicht-pathogenen Bakterienpopulation verbreitet sind, wobei es sich hier nicht um „gefährliche“ Stämme im Sinne einer speziellen Pathogenität handeln muss.

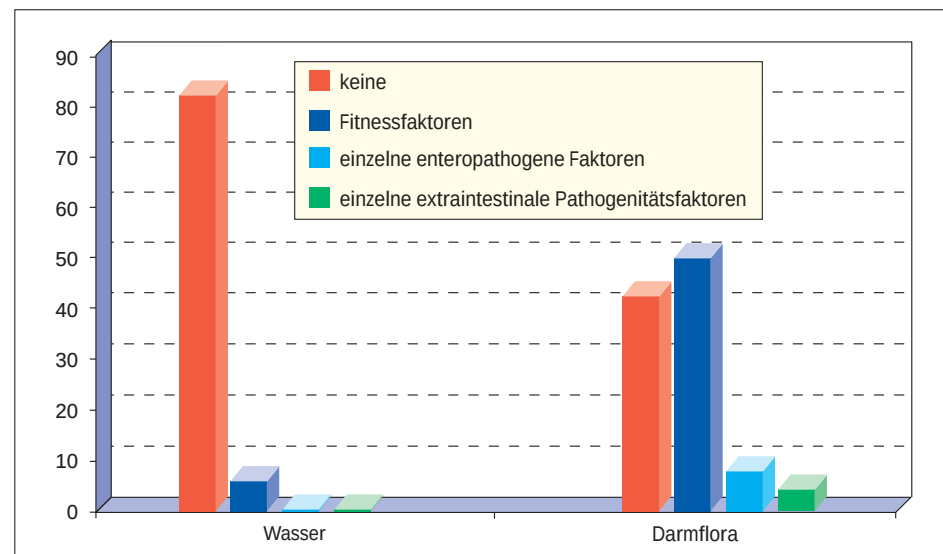


Abb. 5: Häufigkeit von Pathogenitäts- und Fitnessfaktoren

Nicht akzeptabel ist, dass als mikrobielle Arzneimittel verwendete Stämme Pathogenitätsfaktoren wie das Hämolysin besitzen, das auch schon als Einzelfaktor entzündliche Reaktionen hervorrufen kann (2, 20). Hämolysine kommen zum Beispiel bei UPEC (Uropathogene *E. coli*) oder EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*) vor.

Weiterhin sollten keine mobilen genetischen Elemente bei mikrobiellen Arzneimitteln vorhanden sein, die entweder mit Antibiotikaresistenz- oder mit Pathogenitätsfaktoren

assoziiert sind (Übersicht 3) (13, 27). Transferable Plasmide könnten durch den massenhaften Einsatz des Arzneimittels in den Genpool der Bakterienpopulation gelangen (26) und so zur unerwünschten Erhöhung der mobilen genetischen Kapazität und damit zu einer erhöhten Rekombinationsrate innerhalb der Bakterienpopulation beitragen.

Bakteriophagen

z. B. Shigatoxin-Bildung in EHEC

Plasmide

z. B. CFA-Adhäsine, Antibiotikaresistenz

Konjugative Transposons

z. B. Hämolysin von Enterococci, Antibiotikaresistenz

Transposons

z. B. St-Toxin, Antibiotikaresistenz

Pathogenitäts-Inseln

z. B. Typ-III-Sekretion von Effektoren

Insertionssequenzen

z. B. IS1, flankiert die Aerobaktin-Gene

Übersicht 3: Mobile genetische Elemente, die zum horizontalen Gentransfer von Antibiotikaresistenz und Pathogenitätsfaktoren beitragen können (nach 13, 27).

Schlussfolgerungen

Alle mikrobiellen Arzneimittel müssen sich den gegenwärtigen Sicherheitsbedenken der Öffentlichkeit stellen, auch wenn sie schon lange im therapeutischen Einsatz sind. Sie werden daher heute gemäß dem Stand der Wissenschaft und Technik erneut mit Hilfe molekulargenetischer, mikrobiologischer, biologischer und immunologischer Verfahren einer Tiefenprüfung unterzogen, um folgende Fragen zu beantworten:

Was können diese Arzneimittel bewirken?

Kolonisation und Verdrängen, Immunstimulation und -modulation, Produktion von kurzkettigen Karbonsäuren, Vitaminen etc.

Welche Eigenschaften haben diese Arzneimittel?

Gewünscht: Fitnessfaktoren, Erkennungsmarker, Stammcharakteristik.

Unerwünscht: Virulenz- und Resistenzfaktoren, autotransferable genetische Elemente.

Eine solche intensive Prüfung der mikrobiellen Arzneimittel hinsichtlich ihrer Arzneimittelsicherheit ist heute wichtiger und notwendiger denn je, um das Vertrauen in diese Alternative zur Behandlung von Krankheiten, insbesondere Darmerkrankungen, weiter zu steigern und ihre Anwendung zu verbreiten. Allerdings muss man hier deutlich festhalten, dass gegenwärtig nur eines dieser bisher auf dem Markt befindlichen mikrobiellen Arzneimittel einer solchen Anforderung und Tiefenprüfung standhalten kann, nämlich *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®).

Prof. Dr. rer. nat. H. Tschäpe

Robert Koch-Institut
Burgstr. 37
38855 Wernigerode

Literatur

1. Adams MR. Safety of industrial lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 1999;68:171-178.
2. Alouf JE, Freer JH. (eds.). The Comprehensive Sourcebook of bacterial protein toxins. 2nd ed. Academic Press, London, 1999.
3. Baquero F, Baquero MR, Moreno F. Kolizine und Mikroazine: ökologische Bedeutung. In: 3. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität. A. Nissle-Gesellschaft (Hrsg.), Hagen 1998, 23 - 27.
4. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland VD et. al. The complete genome sequence of *E. coli* K-12. Science, 1997;277:1453-1474.
5. Blum G, Schmittroth M, Hacker J. *Escherichia coli* K-12: Herkunft, Nachweiskriterien und Ausbreitung. Biospektrum 1995;4:11-16
6. Böhme G. Sicherheitsaspekte der *E. coli* Substitutionstherapie. In: 1. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität. A. Nissle-Gesellschaft, Der Internist (Beilage), 1991;31(5):21.
7. Braun V, Handtke K. Receptor mediated bacterial iron uptake. In: Transition metals in microbial metabolism. Winkelmann S, Carrano CJ (eds). Harwood Acad. Publ., Amsterdam, 1997, 81-116.
8. Datz M, Janetzki-Mittmann C, Franke S, Gunzer F, Schmidt H, Karch H. Analysis of the EHEC O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural gene. Appl. Environ. Microbiol. 1996;62:791-797.
9. de Petrino SF, de Jorrat EBB, de Budeguer MV, Perdigon G. Influence of the oral administration of different lactic acid bacteria on intestinal microflora and IgA-secreting cells in mice treated with Ampicillin. Food and Agricultural Immunology 1997;9:265-275.
10. Falkow S. The microbes's view of infection. Ann. Int. Med. 1998;129:247-248.
11. Hacker J, Ott M, Tschäpe H. Das Problem der Pathogenität von *E. coli* und seine Bedeutung für die rekombinante DNA-Technologie. BioForum 1991;14:150-157.
12. Hockertz S. Augmentation of host defence against bacterial and fungal infections of mice pretreated with the non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. Arzneimittel-Forsch/Drug Res 1997;47 (1):793-796.
13. Kaper JB, Mellies JL, Nataro JP. Pathogenicity islands and other mobile genetic elements of diarrheagenic *Escherichia coli*. In: Kaper JB, Hacker J. (eds.) Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999:33-58.
14. Lodinová-Žádníková R, Tlaskalová-Hogenová H, Sonnenborn U: Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor®). Pediatr. Allergy Immunol. 1992;3:43-48.
15. Lodinová-Žádníková R, Sonnenborn U, Tlaskalova H. Probiotics and *E. coli* infections in man. Veterinary Quarterly 1998;20:S78-S81.
16. Lodinová-Žádníková R, Sonnenborn U. Effect of Preventive Administration of a Nonpathogenic *Escherichia coli* Strain on the Colonization of the Intestine with Microbial Pathogens in Newborn Infants. Biol. Neonate 1997;71:224-232.
17. Mühlödter I, Blum G, Donohue-Rolfe A, Heier H, Ott M, Souladaki M, Tschäpe H, Wallner U, Hacker J. 1996. Detection of *E. coli* pathogenicity factors in strains isolated from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers. Res. Microbiol. 1996;147:625-635.
18. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. The Lancet 1999;354:635-639.
19. Rote Liste 2000, ECV, Aulendorf
20. Roth JA, Bolin CA, Brogden KA, Minion FC, Wannemuehler MJ (eds.): Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2nd ed., ASM press, Washington D.C., 1995.
21. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie Van Leeuwenhoek 1996;70:347-358.
22. Schröder H. Entwicklung der aeroben Darmflora bei Neugeborenen nach Kolonisierung mit dem *E. coli* Stamm Nissle 1917. Kinderarzt, 1992;21:1619-1625.
23. Sonnenborn U, Greinwald R. Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora. 2. Auflage, Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 1991.
24. Sonnenborn U, Stobernack HP, Proppert Y. Die Entwicklung der aeroben Darmflora bei Neugeborenen. Fortschr. Med. 1990;108:3-7.
25. Teubner M. Lactic acid bacteria. In: Biological fundamentals, Sahn H ed., Biotechnology Vol 1, Rehm HJ, Reed G eds., VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1993, 325-366.
26. Tschäpe H. Plasmide. Akad. Verlag Berlin, 1987.
27. Tschäpe H. Pathogenicity. Safe assessment of foods containing viable genetically modified microorganisms. ILSI Europe, GMMs Draft, 1999.
28. von Wright A, Salminen S. Probiotics: established effects and open questions. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 1999;11:1195-1198.



Prof. Dr. H. Lochs

Reizdarmsyndrom: Ein postinfektiöses Ereignis?

H. Lochs, L. Schulze

Abstract

Das Reizdarmsyndrom ist eine der häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen in der Allgemeinpraxis. Die Prävalenz liegt in Europa und Nordamerika bei ca. 15 % und schwankt je nach Land. Gekennzeichnet ist das Reizdarmsyndrom durch chronische gastrointestinale Beschwerden, wobei entweder Durchfälle im Wechsel mit Obstipation oder Schmerzen im Vordergrund stehen können. Die Pathogenese des Reizdarmsyndroms ist noch nicht vollständig geklärt. Epidemiologisch zeigt sich, dass ein Teil der Patienten ein Reizdarmsyndrom im Anschluss an eine Infektionserkrankung oder eine antibiotische Therapie entwickelt. Auf dieser Basis wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch eine Veränderung der intestinalen Flora zu einer Störung der Schmerzperzeption bzw. der Motilität im Intestinaltrakt kommt. Diese Hypothese wird durch Befunde gestützt, die eine veränderte Stuhlflora bei Patienten mit Reizdarmsyndrom mit Vermehrung von Enterobakterien und Clostridien sowie Abnahme Grampositiver Aerobier fanden. Darüber hinaus weisen erste Befunde auf eine Veränderung der mukosaassoziierten Flora bei Patienten mit Reizdarmsyndrom hin.

Sowohl die klinische Symptomatik als auch funktionelle und histologische Befunde sprechen für pathogenetische Gemeinsamkeiten zwischen Reizdarmsyndrom und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. In der Remission sind CED vom Reizdarmsyndrom oft nicht zu unterscheiden, da Beschwerden bestehen bleiben, ohne dass entsprechende morphologische Befunde erhoben werden können. Andererseits finden sich bei einem hohen Prozentsatz der Patienten mit Reizdarmsyndrom histologisch Entzündungszeichen, ähnlich wie bei CED. Der intestinalen Flora wird zunehmend eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der CED zugeschrieben. Einerseits gehen intestinale Infektionen als Auslöser der CED häufig voraus, andererseits wurde Adhärenz bzw. Invasion von Bakterien in die Mukosa bei CED nachgewiesen. Es liegt nahe, ähnliche Mechanismen in der Pathogenese des Reizdarmsyndroms zu diskutieren, wenn auch hier noch definitive Befunde dafür fehlen.

Aus oben erwähnten Zusammenhängen ergab sich auch der Therapieansatz des Reizdarmsyndroms durch Beeinflussung der Darmflora. Es wurden sowohl Antibiotika als auch Probiotika verwendet. Allerdings liegen bisher nur wenige unkontrollierte Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen vor.

Einleitung

Das Reizdarmsyndrom wird mit seinen drei Leitsymptomen Diarrhoe, Obstipation und Meteorismus nach den Rom-II-Kriterien definiert (1). Die Ätiologie der Erkrankung ist in den meisten Fällen unbekannt. Oft besteht eine Koinzidenz mit psychischen Problemen. Daneben gibt es offenbar andere Faktoren, die diese Erkrankung verursachen oder beeinflussen. In den letzten Jahren wurde die Rolle der Darmflora bzw. der Einfluss bakterieller Infekte als möglicher pathogenetischer Mechanismus untersucht.

Abdominelle Beschwerden oder Schmerzen bestehen über mindestens 12 Wochen während der letzten 12 Monate. Sie müssen nicht kontinuierlich auftreten, aber zwei oder drei der folgenden Merkmale aufweisen:

- Besserung durch die Defäkation
- Veränderung der Stuhlfrequenz
- Veränderung der Stuhlkonsistenz

ROM-II-Kriterien zur Diagnose des Reizdarmsyndroms (1)

Das enterische Nervensystem besteht aus ca. 108 Neuronen mit einer Vielzahl von Neurotransmittern. Beim Meerschweinchen wurden im Plexus myentericus mindestens 14 funktionell verschiedene Klassen von Neuronen gefunden (2). Die Aktivität und Koordination des enterischen Nervensystems wirkt sich entscheidend auf die Darmmotilität aus. Postinflammatorische motorische Störungen dieses komplexen Systems können Symptome verursachen, wie sie bei den chronisch funktionellen Darm-erkrankungen vorkommen (3, 4).

Interaktion von Bakterien und Darmepithel in vitro

Auf welche Weise Bakterien inflammatorische Reaktionen auslösen, die auch zur Ausprägung eines Reizdarmsyndroms führen könnten, wurde in verschiedenen in-vitro-Modellen untersucht. Dazu diente z.B. eine Kokultur von CaCO₂-Zellen und Leukozyten, wobei die humanen Zellen durch eine Membran voneinander getrennt waren („Transwell-System“) (5). Die CaCO₂-Zellen wurden 16 Stunden folgenden Keimen in einer Dosis von je 10⁷ CFU (colony forming units) ausgesetzt:

- *Escherichia coli*
- *Lactobacillus johnsonii*
- *Lactobacillus sakei*.

Die Zugabe von *E. coli* und *L. sakei* führte zu einer vermehrten Expression der pro-entzündlichen Zytokine TNF- α und Interleukin 1 β , die bei *L. johnsonii* und in der Kontrolle (Kulturmedium) ausblieb. Bei Abwesenheit der Leukozyten hat eine bakterielle Stimulation nicht diesen Effekt auf das Darmepithel.

Bakterien sind auch in der Lage, die Proliferation von Lymphozyten zu stimulieren. Dies wurde experimentell mittels Thymidineinbau in Lymphozyten als Proliferationsparameter nachgewiesen (6). Verantwortlich für die Proliferation der Lymphozyten scheint die Sekretion proentzündlicher Zytokine durch die Darmepithelzellen nach Zugabe von Bakterien zu sein.

Bakterien oder deren Bestandteile können die intestinale Barriere zerstören. Experimentell lässt sich dieser Nachweis z. B. an Kolonepithel führen, wenn es nach Zugabe von LPS zu einer ausgeprägten Zunahme des elektrischen Stroms kommt. Auch LPS-stimulierte Monozyten allein können eine solche Barriestörung auslösen. Ein Teil dieser Reaktionen wird von TNF- α vermittelt, wie die Blockade durch TNF- α -Antikörper zeigt.

Die Sekretion von TNF- α im Magen-Darm-Trakt oder anderen Geweben erfolgt über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B. Pathogene Bakterien fördern die Freisetzung von NF κ B und induzieren dadurch die Expression proentzündlicher Zytokine. Einige apathogene Bakterien hemmen dagegen die Abkoppelung des I κ B von NF κ B und unterdrücken auf diese Weise die Aktivierung des NF κ B (7, 8).

Tierexperimentelle Befunde

Um die Bedeutung dieser Faktoren näher zu untersuchen, wurde an neugeborenen Ratten versucht, die Auslösung eines Reizdarmsyndroms experimentell nachzuvollziehen. Die Tiere wurden entweder konventionell aufgezogen oder es wurde eine intestinale Barriestörung ausgelöst. Im Erwachsenenalter war die neuronale Aktivität im Kolon bei den Ratten erhöht, bei denen die Barriere postnatal geschwächt wurde. Diese erhöhte Aktivität ging mit einer chronischen viszerale Hypersensitivität einher, die in der unbehandelten Kontrollgruppe fehlte (9). Bei solchen vorbehandelten Ratten konnte in einem anderen Versuch außerdem ein Einfluss von Stress auf Entzündungsparameter und die Funktion des enteralen Nervensystems nachgewiesen werden (10).

Nachweis intraepithelialer Bakterien im menschlichen Darm

Mit speziellen Nachweismethoden lassen sich auch bei Menschen verschiedene Bakterien im Darmepithel bzw. im Mukus nachweisen. Bei Gesunden finden sich intraepithelial keine Bakterien, hingegen immer bei Patienten mit infektiös bedingter Diarrhoe. In eigenen Untersuchungen gelang der Nachweis intramukosaler Bakterien bei Patienten mit Reizdarmsyndrom. Dies war bei etwa 15 % der Patienten möglich, wenn der Schmerz als Symptom im Vordergrund stand, bei vorherrschender Diarrhoe bei 60 % der Patienten und bei Obstipation bei fast allen. Überwiegend wurden hierbei anaerobe Keime gefunden. Diese Zahlen weisen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen abgelaufenen intestinalen Infektionen, bakterieller Besiedlung und der Entwicklung eines Reizdarmsyndroms hin.

Epidemiologische Befunde

Außer in verschiedenen Kasuistiken wurde das postinfektiöse Auftreten eines Reizdarmsyndroms in mehreren Studien untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

Nach dem Auftreten einer Nahrungsmittelvergiftung durch *Salmonella enteritidis* in 38 Fällen wurden alle Patienten ein Jahr später nachuntersucht (11). 12 Patienten zeigten dabei Symptome eines Reizdarmsyndroms. Ein höheres Erkrankungsrisiko hatten in dieser Untersuchung zum einen Frauen, zum anderen Patienten, die während der akuten Phase erbrochen hatten oder bei denen es zu einer schweren Diarrhoe bzw. zu einem Gewichtsverlust gekommen war (Tab. 1).

	Auskurierte Patienten	Patienten mit Reizdarmsyndrom	p-Wert
Anzahl	26	12	
Geschlecht: ♂:♀	1:1,4	1:5	
mittleres Alter (Jahren)	26	40	
Erbrechen während akuter Phase	9 (35%)	10 (83%)	<0,02
Diarrhoe > öfter als 20 mal pro Tag	8 (31%)	7 (58%)	ns
schwere Diarrhoe > 7 Tage	7 (27%)	9 (75%)	<0,02
Gewichtsverlust	9 (35%)	11 (92%)	<0,01

Tab. 1: Studiendaten nach (11); ns – nicht signifikant.

Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen, wie es zur Ausbildung eines Reizdarmsyndroms nach einer solchen gastrointestinalen Infektion kommen kann, müssen noch näher untersucht werden. Folgende Modellvorstellungen wurden diskutiert (11):

- Infektbedingte gesteigerte Permeabilität des Darmepithels, Entwicklung einer Nahrungsmittelunverträglichkeit
- Erhöhte Freisetzung von Neuropeptiden, verstärkte Transmission sensorischer Impulse, „Hyperalgesie“ und „Wind-up“-Phänomen, Kontraktion der glatten Muskulatur (Gefäße, Darm)

In einer retrospektiven Untersuchung wurde per Post ein Fragebogen an 544 Personen verschickt, die sechs Monate zuvor nachweislich an einer bakteriellen Gastroenteritis erkrankt waren. Laut Auswertung der 386 Rückläufer litten 7% der Betroffenen nach dieser Zeit an einem Reizdarmsyndrom (12). Patienten mit Erbrechen im akuten Stadium hatten dafür ein geringeres Risiko (relatives Risiko: 0,5). Eine Kontrollgruppe existierte nicht. Die Fähigkeit zur Erinnerung an gastrointestinale Beschwerden, die 6-12 Monate zuvor bestanden, wurde nach der Publikation kontrovers diskutiert.

Eine weitere retrospektive Studie erfasste die Symptome bei 75 Patienten nach einer akuten Gastroenteritis. 22 Patienten hatten charakteristische Beschwerden eines

Reizdarmsyndroms, die bei 20 von ihnen bis zum vollendeten 6. Monat anhielten (13). Bestätigt wurden diese Befunde vom gleichen Autor in einer zweiten, prospektiven Untersuchung bei 94 Patienten, die ebenfalls an einer Gastroenteritis litten (14). Bei 51 Patienten lag eine positive Stuhlprobe für Bakterien der Spezies *Salmonella*, *Campylobacter* oder *Shigella* vor. 3 Monate nach der Entlassung aus der stationären Behandlung wurde bei 22 Patienten (23 %) die Diagnose Reizdarmsyndrom gestellt (Gruppe IBS⁺). 12 der betroffenen Patienten (IBS⁺) konnten über insgesamt ein Jahr beobachtet werden, 9 von ihnen blieben in dieser Zeit symptomatisch.

Zur makro- und mikroskopischen Beurteilung der Entzündung wurde bei einem Teil der Patienten eine Sigmoidoskopie mit rektaler Biopsie durchgeführt. Diese erfolgte während der akuten Erkrankungsphase sowie nach ca. 3 Monaten bei insgesamt 29 Patienten (IBS⁺ n = 10, IBS⁻ n = 19). Die Ergebnisse wurden mit den Befunden von 18 Gesunden verglichen (Tab. 2). Im akuten Zustand fanden sich makroskopische Zeichen einer Kolitis bei insgesamt 10 Patienten, die bei keinem der Gesunden nachweisbar waren. Mikroskopisch wurden bei einem Teil der Erkrankten Kryptenabszesse, Kryptitiden und polymorphkernige Leukozyten als akute Entzündungszeichen nachgewiesen. Diese waren häufiger in der IBS⁺-Gruppe als in der IBS⁻-Gruppe zu finden. Als Marker einer chronischen Entzündung wurde die Zahl mononuklearer Zellen pro definiertem Blickfeld im Mikroskop bei standardisierter Vergrößerung herangezogen. Diese so bestimmte mittlere Zellzahl nahm in der IBS⁺-Gruppe während der 3 Monate zu und war im Vergleich mit Gesunden signifikant erhöht.

	IBS ⁺ (n = 10)	IBS ⁻ (n = 19)	Gesunde (n = 18)
mittleres Alter (Jahre)	39,2	46,8	30,1
weibliche Patienten	4 (40 %) #	7 (37 %) #	14 (78 %)
Antibiotika-Therapie	8 (80 %)	13 (62 %)	–
positive Stuhlkulturen	6 (60 %)	10 (53 %)	–
Akutes Stadium			
makroskopische Kolitis	3 (30 %)	7 (37 %)	0
Biopsien mit akuten Entzündungszeichen	3 (30 %)	3 (16 %)	0
mittlere Zahl mononuklearer Zellen	98,4 (17 %) ∇	99,8 (35 %) #	79,1 (16,9 %)
3 Monate postinfektiös			
makroskopische Kolitis	0	0	–
Biopsien mit akuten Entzündungszeichen	2 (20 %)	2 (11 %)	–
mittlere Zahl mononuklearer Zellen	105,7 (23 %) *∇	83,2 (29 %)	–

Tab. 2: Studiendaten nach (14)

* p < 0,05 im Vergleich zu IBS⁻
p < 0,05 im Vergleich zu Gesunden
∇ p < 0,01 im Vergleich zu Gesunden

Neben diesen Parametern wurden eine Reihe demografischer und psychologischer Faktoren untersucht, die ebenfalls einen Einfluss auf das heterologe Krankheitsbild des Reizdarmsyndroms zu haben scheinen. Solche Einflüsse könnten dafür verantwortlich sein, dass in der IBS⁺-Gruppe eine chronische Entzündung persistiert, die in der IBS⁻-Gruppe nicht beobachtet wurde. Es wird diskutiert, dass z. B. Stress entzündliche Reaktionen verstärken oder unterhalten kann („psycho-neuro-immunologische Achse“) (14).

In einer prospektiven Kohortenstudie wurden Informationen aus einer für Forschungszwecke eingerichteten Datenbank in Großbritannien gewonnen, die die allgemeinärztliche Behandlung erfasst. Von 318 Patienten mit einer Gastroenteritis entwickelten 14 (4,4%) im Verlauf eines Jahres ein Reizdarmsyndrom, aber nur 0,3 % der Kontrollgruppe (n=584308) (Tab. 3). Dieser Unterschied ist signifikant, auch wenn mit 4,4% nur vergleichsweise wenig Patienten betroffen sind (15).

	Kontrolle (n=584 308)	Zustand nach Gastroenteritis (n = 318)
weibliche Patienten	48 %	49 %
Bakterien in der Stuhlprobe (akut)		
<i>Campylobacter</i>	–	172 (54 %)
<i>Salmonella</i>	–	119 (37 %)
andere	–	27 (9 %)
Patienten mit Reizdarmsyndrom	2027 (0,3 %)	14 (4,4 %)
relatives Risiko	1,0	11,9

Tab. 3: Charakteristika der Befunde nach (15)

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass bakterielle gastrointestinale Infektionen mit der Entwicklung eines Reizdarmsyndroms assoziiert sind. Bestimmte Erreger bzw. ihre Toxine sind möglicherweise für länger bestehende Symptome verantwortlich. Dies wird z.B. für eine durch *Campylobacter* spp. ausgelöste Enteritis vermutet (16).

Auch nach der Einnahme von Antibiotika treten gehäuft Symptome eines Reizdarmsyndroms auf (17). Hierbei muss in zukünftigen Studien die Frage geklärt werden, ob der primäre Auslöser der antibiotisch behandelte Infekt war oder die therapiebedingte Schädigung der physiologischen Darmflora. Andererseits hatte eine Antibiose mit Metronidazol auch zu einer Besserung geführt (18).

Die Symptome einer bakteriellen Überwucherung des Dünndarms ähneln denen des Reizdarmsyndroms. In einer kürzlich publizierten Studie wurde die Assoziation dieser zwei Krankheitsbilder näher untersucht. Darin erfüllten 202 Personen die Rom-I-Kriterien, 157 (78%) hatten einen positiven Atemtest und wurden daraufhin über 10 Tage antibiotisch therapiert (19). Durch einen Kontroll-Atemtest bei 47 Patienten wurde anschließend bei 25 Patienten eine komplette Eradikation festgestellt, von denen 48 % keine Symptome eines Reizdarmsyndroms mehr zeigten.

Schlussfolgerungen

Gastrointestinale Infekte können mit dem späteren Auftreten eines Reizdarmsyndroms assoziiert sein. In epidemiologischen Untersuchungen war dies in 7 %–31% der Fall. Der Einfluss solcher Infekte auf den Darm ist in mehreren Ebenen möglich. Zur Erklärung wurden verschiedene pathogenetische Modellvorstellungen entwickelt. Dazu gehören eine Induktion proentzündlicher Zytokine und die Auslösung einer Barriestörung. Diese Veränderungen können zu einer langanhaltenden veränderten Reaktivität des Darmes führen.

Es bestehen offenbar verschiedene Risikofaktoren, die zur Ausprägung eines Reizdarmsyndroms prädestinieren. Dazu gehören nach jetziger Kenntnis die Dauer der Infektion, aber auch die Zugehörigkeit zum weiblichen Geschlecht. Die Bedeutung des Symptoms „Erbrechen“ wird kontrovers diskutiert, ein spezifisches Pathogen konnte bislang nicht identifiziert werden.

Inwieweit diese hier gezeigten Zusammenhänge auch Konsequenzen für eine erfolgreiche therapeutische Intervention haben und worin die optimale Therapie besteht, muss in der Zukunft untersucht werden. Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Darmflora werden dabei von großem Nutzen sein.

Prof. Dr. med. H. Lochs
Universitätsklinikum Charité
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
Medizinische Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
Schumannstr. 20/21
10117 Berlin

Literatur

1. Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. Gut 1999;45 Suppl 2:II43-II47.
2. Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. Neuroscience 1996;75:949-967.
3. Tack J, Demedts I. Mechanism underlying post-infectious motility disorders. Dig Liver Dis 2000;32 Suppl 3:S220-S222.
4. Tack J, Vanden Berghe P. Neuropeptides and colonic motility: it's all in the little brain. Gastroenterology 2000;119:257-260.
5. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. Gut 2000;47:79-87.
6. Haller D, Blum S, Bode C, Hammes WP, Schiffrin EJ. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. Infect Immun 2000;68:752-759.
7. Gordon D. A critical difference between pathogenic and nonpathogenic bacteria. Gastroenterology 2000;119:1188.
8. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. Science 2000;289:1560-1563.
9. Al Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. Gastroenterology 2000;119:1276-1285.
10. Collins SM, McHugh K, Jacobson K, Khan I, Riddell R, Murase K, Weingarten HP. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. Gastroenterology 1996;111:1509-1515.
11. McKendrick MW, Read NW. Irritable bowel syndrome-post salmonella infection. J Infect 1994;29:1-3.
12. Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. BMJ 1997;314:779-782.
13. Gwee KA, Graham JC, McKendrick MW, Collins SM, Marshall JS, Walters SJ, Read NW. Psychometric scores and persistence of irritable bowel after infectious diarrhoea. Lancet 1996;347:150-153.
14. Gwee KA, Leong Y-L, Graham C, McKendrick MW, Collins SM, Walters SJ, Underwood JE, Read NW. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. Gut 1999;44:400-406.
15. Rodriguez LA, Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. BMJ 1999;318:565-566.
16. Camilleri M. Management of the irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2001;120:652-668.
17. Mendall MA, Kumar D. Antibiotic use, childhood affluence and irritable bowel syndrome (IBS). Eur J Gastroenterol Hepatol 1998;10:59-62.
18. Nayak AK, Karnad DR, Abraham P, Mistry FP. Metronidazole relieves symptoms in irritable bowel syndrome: the confusion with so-called 'chronic amebiasis'. Indian J Gastroenterol 1997;16:137-139.
19. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol 2000;95:3503-3506.

Pathophysiologie und Therapie funktioneller Störungen des unteren Intestinaltraktes

S. Müller-Lissner



Prof. Dr. S. Müller-Lissner

Abstract

Das **Reizdarmsyndrom** (irritables Colon, IBS) wird nach den ROM-Kriterien definiert. Es besteht oft eine veränderte Darmmotilität und/oder eine höhere Sensibilität des Darms auf Dehnungsreize. Die Ursachen liegen teils im Darm, teils im ZNS. Ballaststoffe führen neben der oft erwünschten Erhöhung des Stuhlvolumens zur Gasbildung und damit evtl. als unangenehm empfundenen Dehnung des Colons. Die bekannteste Nahrungsmittelunverträglichkeit, die zum Reizdarm mit Diarrhoe führen kann, ist die Laktoseintoleranz.

Klagt der Patient in erster Linie über zu wenig, zu viel, zu seltenen oder zu häufigen Stuhlgang, so kann bereits die Aufklärung über die physiologische Breite helfen. Bei Karzinophobie kann eine Koloskopie mit Normalbefund erfolgreich sein. Medikamentöse Behandlungsversuche richten sich nach dem Leitsymptom. Bei vorherrschender Obstipation gibt man Ballaststoffe (keine Weizenkleie). Die von Reizdarm-Patienten beklagte Diarrhoe ist häufig keine echte Diarrhoe, sondern eine als zu hoch empfundene Stuhlfrequenz oder zu dringlicher Stuhlgang. Bei echter Diarrhoe können Loperamid oder Cholestyramin versucht werden.

Die **chronische Obstipation** wird definiert als Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Kriterien: Stuhlfrequenz < 3/Woche und/oder bei > 25 % der Gelegenheiten Pressen, harter Stuhl, unvollständige Entleerung, Blockadegefühl oder digital-manuelle Entleerung. Als Ursachen kommen eine ballaststoffarme Ernährung (die meisten Obstipierten nehmen aber nicht weniger Ballaststoffe zu sich), Grunderkrankungen (Diabetiker mit autonomer Neuropathie, M. Parkinson), Medikamente (z. B. Opiate) und Funktionsstörungen des Anorektums in Frage. Die chronische Obstipation ist nur dann abklärungs- und/oder behandlungsbedürftig, wenn ein Leidensdruck besteht.

Das wichtigste ist die Aufklärung darüber, dass durch seltenen Stuhlgang keine Nachteile für die Gesundheit zu erwarten sind. Bewährt haben sich Vollkornprodukte, Backpflaumen, Weizenkleie oder *Plantago ovata*-Samenschalen.

Ein historisch älterer, bezüglich seines Wirksamkeitsnachweises aber neuer Therapieansatz ist die Modifikation der Kolonflora. Die orale Gabe des *E. coli*-Stammes Nissle 1917 ist der Gabe von Lactulose und ähnlichen Substanzen in der Wirksamkeit gleichwertig und in der Verträglichkeit überlegen. Unklar bleibt, ob primär sekretorische oder motorische Effekte erzielt werden. Als chemische Mediatoren denkbar sind Stoffwechselprodukte der Bakterien oder bakteriell erzeugte Spaltprodukte von Ballaststoffen.

Oft wird eine Selbstmedikation mit einer Vielfalt von Laxantien betrieben, häufig zu Unrecht.

Einleitung

Unter den funktionellen Störungen des unteren Intestinaltraktes nehmen die chronische Obstipation und das Reizdarmsyndrom eine besondere Stellung ein.

Das Reizdarmsyndrom kann derzeit nicht pathophysiologisch definiert werden. Vielmehr wurde mit der sogenannten Rom-II-Klassifikation eine symptomatische Einteilung vorgenommen, die sowohl für die Beurteilung des Therapieerfolges als auch für Studienzwecke Verwendung findet und hilft, mit der Symptommenvielfalt umzugehen (1).

Definition Reizdarmsyndrom: Rom-II-Kriterien

Ein Reizdarmsyndrom ist gekennzeichnet durch abdominale Beschwerden oder Schmerzen, die wenigstens 12 Wochen in den letzten 12 Monaten vorlagen und mindestens zwei der drei folgenden Eigenschaften aufweisen:

- Besserung nach der Defäkation und/oder
- Änderung der Stuhlfrequenz und/oder
- Änderung der Stuhlkonsistenz.

Die Leitsymptome des Reizdarmsyndroms sind die Diarrhoe, der Meteorismus mit krampfartigen Schmerzen und die Obstipation (1, 2).

Motilitätsstörungen

Störungen der Darmmotilität sind typisch für Patienten mit Reizdarmsyndrom (3-5). Früher wurde diese Erkrankung primär als Motilitätsstörung betrachtet. Aus topographischen Gründen erfolgt die Messung der Motilität meist im Sigma. Die Inhomogenität des Krankheitsbildes spiegelt sich auch in den Untersuchungsbefunden. Die Motilität ist bei einigen Patienten gesteigert, bei anderen vermindert oder unverändert. Hinzu kommen methodische Probleme bei der Messung und Interpretation des Motilitätsindex. Dieser wird als Fläche unter der Kontraktionskurve bestimmt und erlaubt keine Trennung zwischen stationären oder nach aboral bzw. retrograd verlaufenden Kontraktionen. Folglich kann ein so ermittelter Motilitätsindex bei ganz unterschiedlichen Bewegungsabläufen des Darminhaltes fälschlicherweise den gleichen Wert ergeben.

Mittels Dünndarmanmanometrie wurden bei Patienten mit einem Reizdarmsyndrom z.B. clusterförmige Kontraktionen im Abstand von ca. einer Minute aufgezeichnet. Bei längerer Bestandsdauer kann dies ein Hinweis auf eine intestinale Obstruktion sein. Bei anderen Reizdarmpatienten finden sich ausgeprägte Kontraktionen des Kolons mit Massenbewegungen des Darminhaltes, die ebenfalls Beschwerden auslösen.

Nahrungsmittelunverträglichkeiten

Viele Reizdarmpatienten beklagen Nahrungsmittelunverträglichkeiten. Diese Assoziation wurde nur in wenigen Studien systematisch untersucht (6-9). Nanda et al. behandelten z.B. 200 Patienten mit einer Basisdiät (Reis) über 3 Wochen (7). Bei 48 % der

Patienten (n = 91 von 189) besserten sich allein durch diese Diät die Symptome. Während des sich anschließenden schrittweisen Übergangs auf „normale“ Mischkost konnten 72 Patienten ein oder mehrere Nahrungsmittel als Auslöser ihrer Beschwerden identifizieren, als erneut die vorbestehenden Symptome auftraten. Im Vordergrund standen dabei Milchprodukte, verschiedene Getreidesorten und Zwiebeln.

Die Abgrenzung zur Laktose-Intoleranz ist von praktischer Bedeutung, auch wenn nicht alle Laktose-Malabsorber die klassischen Symptome eines Reizdarmsyndroms entwickeln (9).

Viszerale Sensibilität

Offenbar spüren Patienten mit Reizdarmsyndrom den Füllungszustand des Darmes stärker als Probanden, d.h. die viszerale Sensibilität ist erhöht (4, 10-12). Dies wurde experimentell mehrfach nachgewiesen, z.B. durch die schrittweise Dilatation des Rektums mittels eines intrarektal applizierten Ballons. Patienten mit Reizdarmsyndrom geben im Gegensatz zu gesunden Probanden schon bei einem niedrigen Füllungsvolumen (etwa ab 150 ml) Schmerzen an (10). Die somatische Sensibilität ist unverändert.

Eine wiederholte Dehnung des Sigmas kann einen Einfluss auf die Reiz- bzw. Schmerzschwelle haben. Nach einer solchen Dehnungsbehandlung war diese Schwelle nur bei Patienten mit Reizdarmsyndrom erniedrigt, nicht bei Gesunden.

Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass sich die Wahrnehmung von Reizen im Lauf der Zeit ändern kann. Mit dem Begriff „Wind-Up“ wird das Phänomen einer kurz andauernden spinalen Verstärkung wiederholter peripherer Reize beschrieben. Setzt sich diese Reizwiederholung über einen längeren Zeitraum fort, wird die Empfindlichkeit auf Dauer erhöht. Dieser Prozess wird „Sensitization“ genannt und kommt bei vielen chronischen Erkrankungen vor. Der Ausdruck „Gating“ beschreibt Möglichkeiten des zentralen Nervensystems, Reize aus der Peripherie zu beeinflussen („Schmerzerwartung“ versus „Schmerzablehnung“).

Auch die Gallensäuren beeinflussen die viszerale Sensibilität. Der experimentelle Nachweis gelang durch rektale Applikation von 500 ml Deoxycholsäure (1 mmol/l) bzw. physiologischer Kochsalzlösung und anschließender rektaler Ballondilatation bei gesunden Probanden. Die Vorbehandlung mit der Gallensäure führte dabei zu einem schon bei kleineren Füllmengen auslösaren rekto-analen-Inhibitionsreflex (RAIR) sowie einem erhöhten Stuhldrang als Zeichen der gesteigerten viszerale Sensibilität (12). Die pathogenetische Bedeutung dieses Befundes bei funktionellen Darmerkrankungen muss weiter untersucht werden. Bislang können damit einige der Beschwerden beim idiopathischen Gallensäureverlustsyndrom erklärt werden. Kontrollierte Studien zum Einsatz von Gallensalzbindern bei Patienten mit Reizdarmsyndrom fehlen bislang.

Krankheitsverhalten

Ein verändertes Krankheitsverhalten ist für Patienten mit Reizdarmsyndrom typisch. Es besteht einerseits eine Somatisierung von Problemen und andererseits erfolgen schon bei relativ geringen Beschwerden häufige Arztbesuche. Ein solches Verhalten kann durch die Erziehung mit verursacht sein, wenn die Eltern dem Kind bei banalen Störungen des Wohlbefindens große Aufmerksamkeit schenken. Es tritt auch öfter bei Patienten auf, deren Eltern selbst häufig über somatische Beschwerden klagen, oft zum Arzt gehen, durch „Kranksein“ versuchen, Konflikte zu vermeiden bzw. zu lösen oder nicht zu arbeiten. Bei manchen Patienten spielt der sekundäre Krankheitsgewinn (vermehrte Zuwendung, Arbeitsunfähigkeit, Krankenhaustagegeld) eine nicht zu unterschätzende Rolle.

Der Verlauf der Erkrankung kann durch verschiedene Stressoren beeinflusst werden, z.B. eine schwere Zweiterkrankung, Scheidung, Partnerschaftskonflikte, Arbeitsplatzverlust, Konkurs, Wohnprobleme etc.

Gastrointestinale Infektionen

Die Assoziation zwischen gastrointestinalen Infekten und der Manifestation eines Reizdarmsyndroms ist eine oft beobachtete klinische Erfahrung, die in mehreren klinischen Studien bestätigt wurde (13, 14). So zeigen Patienten, die an einer infektiös ausgelösten Diarrhoe litten, nach 6 Monaten in 25 % und nach 12 Monaten in 10 % der Fälle Symptome eines Reizdarmsyndroms (14).

Beispiele von Befunden bei Patienten mit Reizdarmsyndrom

Änderungen der Rezeptorschwelle, hervorgerufen möglicherweise durch Infektionen, Nahrungsmittelallergien, Gallensäuren, kurzkettige Karbonsäuren, Reflexe (?)
Änderungen spinaler Afferenzen (durch Schmerzerwartung und -gedächtnis)
abnorme ZNS-Funktion (z.B. Projektion einer Rektumdehnung in andere Hirnregion, Aversion gegenüber viszerale Reizen, Hypervigilanz)
verschiedene Pilze, u. a. <i>Candida</i> -Arten
psychische Auffälligkeiten (Angst, erlerntes Krankheitsverhalten, Depression)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Reizdarmsyndrom ein Produkt biologischer, psychologischer und sozialer Subsysteme ist, die auf mehreren Ebenen interagieren und die Manifestation der Erkrankung bedingen (1, 2, 15-18).

Therapie des Reizdarmsyndroms

Oberste Priorität für eine erfolgreiche Behandlung ist eine gute und stabile Arzt-Patienten-Beziehung (1, 2, 16, 17, 19). Der Patient muss sich ernst genommen fühlen und hat Anspruch auf eine ausführliche Aufklärung über das Krankheitsbild. Dabei muß klar zwischen einer organischen und einer funktionellen Störung unterschieden werden. Dies ist auch wichtig, um einem häufigen Arztwechsel sowie zu vielen technischen Untersuchungen, insbesondere Koloskopien, vorzubeugen.

Für die Praxis eignet sich das Vorgehen nach Tab. 1. Die symptomgesteuerte pharmakologische Behandlung orientiert sich am vorherrschenden Leitsymptom (1, 2, 16).

Was ist das Problem meines Patienten?
Aufklärung
Allgemeine Maßnahmen sinnvoll?
Diättempfehlungen hilfreich?
Medikamentöse Therapie erforderlich?
Psychotherapie nützlich?

Tab. 1: Behandlungsmöglichkeiten bei Patienten mit Reizdarmsyndrom

Chronische Obstipation

Die chronische Obstipation weist Überschneidungen mit dem Reizdarmsyndrom auf und umfasst eine Gruppe funktioneller Darmerkrankungen ohne einheitliche Pathophysiologie. Die Beschwerden äußern sich in einer dauerhaft schwierigen, seltenen oder inkompletten Defäkation. Von einer chronischen Obstipation ist auszugehen, wenn über 6 Monate nur 2 oder weniger Darmentleerungen pro Woche möglich sind.

Ätiologie und Pathophysiologie

Ätiologische Bedeutung haben z.B. eine ballaststoffarme Ernährung, endokrine Erkrankungen, autonome Neuropathien, organische Darmerkrankungen und/oder Medikamente. Bei Patienten mit chronischer Obstipation finden sich auch charakteristische Veränderungen der Darmflora. Typisch sind eine verringerte Gesamtkeimzahl sowie eine Abnahme von *Bifido*- und *E.-coli*-Bakterien bzw. eine Zunahme von *Bacteroides* spp. (20).

Endokrine Erkrankungen finden sich als Ursache der chronischen Obstipation eher selten. Viel häufiger ist die Gravidität der Auslöser, vor allem in der zweiten Zyklushälfte.

Bei vielen Medikamenten wird als mögliche Nebenwirkung eine Obstipation angegeben, von wirklicher praktischer Bedeutung ist diese aber nur bei einigen

wenigen (Tab. 2). Nicht immer ist es möglich, das verursachende Medikament abzusetzen.

Opiate
Aluminium- und kalziumhaltige Antazida
Anticholinergika
Tri- und tetrazyklische Antidepressiva
Antihypertensiva
Dopaminergika

Tab. 2: Medikamente, die eine Obstipation auslösen können

Patienten mit chronischer Obstipation haben typischerweise verminderte Massenbewegungen des im Kolon befindlichen Darminhaltes. Diese Bewegungen werden bei Gesunden verstärkt nach den Mahlzeiten, besonders nach dem Frühstück, beobachtet.

Bei Versagen der Basistherapie versucht man, mit funktionellen Tests die Störung näher zu beschreiben. Dazu werden die Transitzeit und die Defäkation untersucht. Für eine Transitstörung sind eine niedrige Stuhlfrequenz und das Völlegefühl sensitive, aber wenig spezifische Parameter. Ähnlich verhält es sich mit dem Gefühl der inkompletten Entleerung bei Defäkationsstörungen. Richtungsweisend ist hier die Angabe eines Obstruktionsgefühls im anorektalen Bereich oder die Tatsache, dass der Stuhl manuell ausgeräumt werden muss. Manche dieser Defäkationsstörungen sind nur chirurgisch korrigierbar. Typisch für Patienten mit chronischer Obstipation sind verlängerte Transitzeiten und niedrige Stuhlgewichte.

Therapeutische Optionen

Patienten, die an einer chronischen Obstipation leiden, haben eine lange Krankengeschichte hinter sich mit meist vielen Konsultationen. Das Ziel der Behandlung sollte sein, die Beschwerden zu lindern. Eine komplette Heilung ist bei Vorliegen bestimmter Grunderkrankungen oder einer die Obstipation verursachenden Medikation meist nicht möglich.

Zunächst stehen das Empfinden und Verhalten des Patienten im Vordergrund. Hier ist die Aufklärung des Patienten über die individuell ausgesprochen verschiedene Stuhlfrequenz wichtig, aber auch ein sog. „Toilettentraining“ kann erfolgreich sein. Dazu wird morgens postprandial ein regelmäßiger Defäkationsversuch unternommen und so der gastrokolische Reflex ausgenutzt. Die Funktion des Kolons und Anorektums wird durch die Ernährung, Medikamente und chirurgische Maßnahmen positiv beeinflusst. In der Praxis hat sich bei Patienten mit chronischer Obstipation eine probatorische Monotherapie mit Ballaststoffen über 2–4 Wochen bewährt. Dazu eignen sich 20–30 g/d Weizenkleie oder *Plantago ovata* (indische Flohsamenschalen). Mit dieser Behandlung wird bei den meisten Patienten eine Besserung oder eine Beschwerde-

freiheit erreicht, bei denen sich mittels funktioneller Tests kein objektiver Befund erheben ließ. Bei schweren Transit- oder Defäkationsstörungen ist eine medikamentöse oder chirurgische Therapie erforderlich.

Neben den Quell- und Ballaststoffen stehen eine Vielzahl weiterer Laxanzien zur Verfügung. Wegen ihrer geringen Nebenwirkungen sind sie zur Behandlung der chronischen Obstipation gut geeignet. Bewährt haben sich Macrogol oder auch Bisacodyl-haltige Präparate. Laktulose verursacht sehr häufig unangenehme Blähungen. Versucht wurde auch eine Therapie mit nichtresorbierbaren Antibiotika wie z. B. Vancomycin, die den bakteriellen Ballaststoff-Metabolismus reduzieren. Die Folge ist ein höherer osmotischer Gradient durch vermehrt vorhandene Ballaststoffe und eine Normalisierung des Stuhlgangs. Kasuistiken beschreiben auch den zum Erfolg führenden Austausch der residenten Darmflora mittels rektaler Instillation einer Stuhlaufschwemmung des Ehepartners. Für den routinemäßigen Einsatz sind solche Therapieformen aus verständlichen Gründen ungeeignet.

Interessant ist der therapeutische Ansatz, eine Modulation der Kolonflora durch die Zufuhr eines definierten Stammes wie *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) vorzunehmen. Dazu liegen Daten aus 2 kontrollierten klinischen Studien vor (23, 24).

Therapeutische Wirksamkeit von Mutaflor®

Aus präklinischen Untersuchungen an Ratten ist bekannt, dass *E. coli* Stamm Nissle 1917 eine Wirkung auf die Motilität des Kolons hat (21). Für den Menschen wurde die Wirksamkeit von Mutaflor® in der Behandlung der chronischen Obstipation sowohl gegenüber Placebo als auch Laktulose nachgewiesen.

In die Placebo-kontrollierte Studie wurden 134 Patienten aufgenommen (23). Die Dauer der Obstipation betrug $18,8 \pm 12,6$ Jahre. Der Aufnahmeuntersuchung folgte eine 7-tägige „Run-in“-Phase, in welcher alle Patienten einfach blind 1 x 4 Kapseln eines Placebos erhielten, da bekannt ist, dass chronisch Obstipierte in hohem Maße auf Placebo reagieren (Abb. 1). Die 64 Patienten, bei denen sich die Obstipation

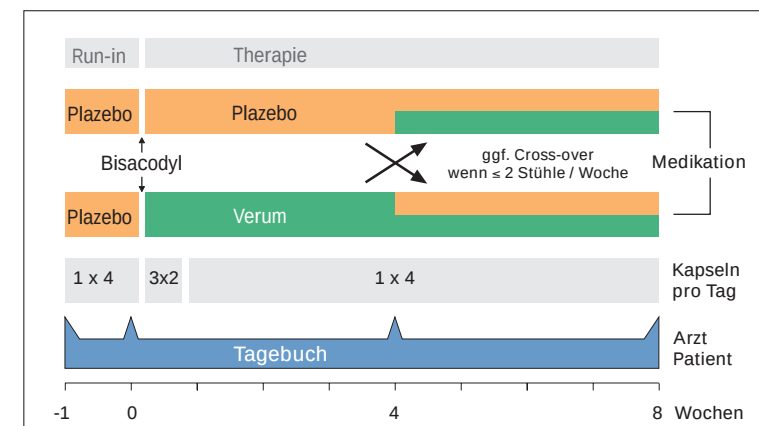


Abb. 1: Ablauf der klinischen Prüfung zur Wirksamkeit von Mutaflor® 100 mg (4 Kps. täglich) versus Placebo bei Patienten mit chronischer Obstipation (23)

durch das Placebo besserte (mindestens zwei Stühle pro Woche), wurden nicht in die Therapiephase übernommen. Die verbleibenden 70 Patienten wurden randomisiert und erhielten während der ersten zwei Tage 3 x 2 Kapseln (Verum oder Placebo), anschließend 1 x 4 Kapseln. Die Therapie erfolgte über 8 Wochen, wobei nach 4 Wochen ein Wechsel der Medikation bei den Patienten vorgenommen wurde, die maximal 2 Stühle pro Woche abgesetzt hatten. Mutaflor® erwies sich sowohl nach 4- als auch nach 8-wöchiger Therapie dem Placebo signifikant überlegen ($p < 0,001$) (Abb. 2). Auch die Patienten, die zunächst das Placebo erhalten hatten, wiesen am Ende des Beobachtungszeitraums mit einer wöchentlichen Stuhlfrequenz von $5,2 \pm 1,3$ eine deutliche Besserung auf.

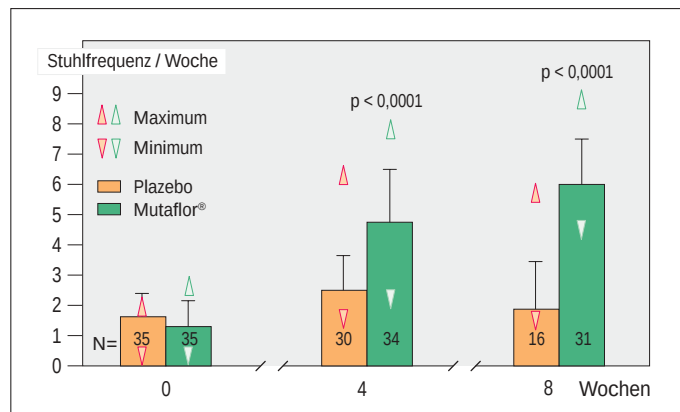
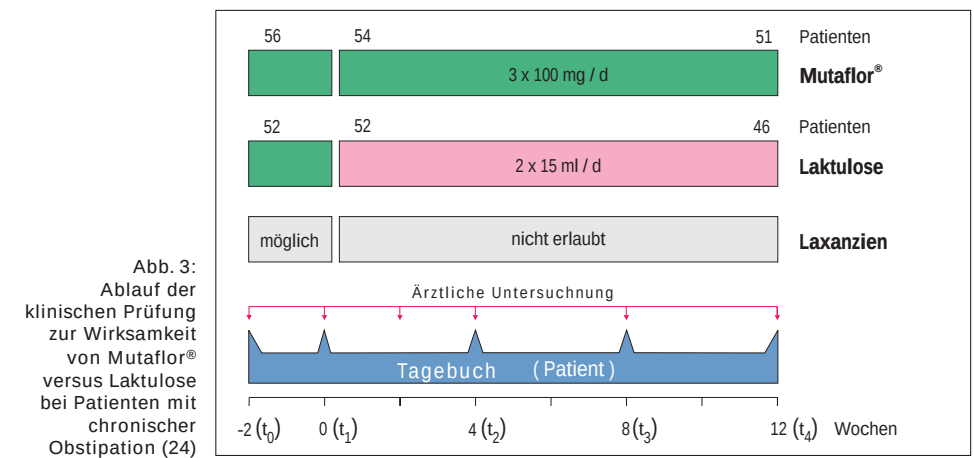


Abb. 2:
Wirksamkeit von
Mutaflor® versus Placebo
bei Patienten mit
chronischer Obstipation (23)

In einer zweiten Studie wurde bei 108 Patienten mit chronischer Obstipation die Wirksamkeit von 3 x 1 Kapsel Mutaflor® 100 mg bzw. 2 x 15 ml Laktulose-Sirup verglichen (24). Die durchschnittliche Obstipationsdauer (20,9 bzw. 19,9 Jahre) bzw. die anderen Parameter (Geschlecht, Alter, Medikamente) waren in beiden Studienpopulationen durch die Randomisierung vergleichbar. Einer zweiwöchigen Umstellungsphase, in der mit der Prüfmedikation begonnen wurde und die zuvor verwendeten Laxanzien abgesetzt bzw. nur noch bei dringendem Bedarf eingenommen werden durften, folgte eine 12-wöchige Behandlung (Abb. 3). Von den 52 Patienten aus der Laktulose-Gruppe schieden 6 aus, bei den 56 Patienten aus der Mutaflor®-Gruppe kam es zu 5 Abbrüchen.

Das Hauptzielkriterium, die wöchentliche Stuhlfrequenz, stieg in der Laktulose-Gruppe von der ersten zur letzten Untersuchung von $4,9 \pm 2,8$ auf $5,5 \pm 2$. Ein signifikant deutlicherer Anstieg der Stuhlfrequenz von $5,2 \pm 3$ auf $6,3 \pm 2,5$ zeigte sich in der Mutaflor®-Gruppe ($p < 0,026$). Die Nebenzielkriterien Konsistenz und Leichtigkeit des Stuhlgangs beeinflusste Mutaflor® durchgehend günstiger als Laktulose. Die Nebenwirkungsrate betrug am Ende der Studie 25,9 % (Laktulose) bzw. 7,8 % (Mutaflor®).



Die beiden klinischen Studien haben den Nachweis erbracht, dass die Verabreichung von *E. coli* Stamm Nissle 1917 ein effektives Therapiekonzept in der Behandlung der chronischen Obstipation darstellt. Über den Wirkmechanismus gibt es derzeit keine abschließenden Vorstellungen. Möglicherweise produzieren bestimmte Keime der Darmflora Kontraktinika, die entweder luminal oder entzündungsbedingt wirken und von *E. coli* Stamm Nissle 1917 gehemmt werden. Oder es werden sekretorische oder motorische Reize verstärkt. Stoffwechselprodukte der Bakterien wie z.B. verschiedene Karbonsäuren oder Produkte der bakteriellen Spaltung von Ballaststoffen könnten dabei von Bedeutung sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei Patienten mit chronischer Obstipation für die Wahl der verordneten oder empfohlenen Medikamente neben der Wirksamkeit auch auf die Nebenwirkungsrate zu achten ist. Die Gabe von Mutaflor® ist eine nebenwirkungsfreie Therapieoption.

Prof. Dr. med. S. Müller-Lissner

Park-Klinik Weißensee
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Charité
Abteilung für Innere Medizin
Schönstr. 80
13086 Berlin

Literatur

1. Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. Gut 1999;45 Suppl 2:II43-II47.
2. Hotz J, Enck P, Goebell H, Heymann-Mönnikes I, Holtmann G, Layer P. Konsensusbericht: Reizdarmsyndrom - Definition, Diagnosesicherung, Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten. Konsensus der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Z Gastroenterologie, 1999, 37, 685-700.
3. Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. Am J Gastroenterol 2001;96:1499-1506.
4. Van Ginkel R, Voskuil WP, Benninga MA, Taminiau JA, Boeckxstaens GE. Alterations in rectal sensitivity and motility in childhood irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2001;120:31-38.
5. Simren M, Castedal M, Svedlund J, Abrahamsson H, Björnsson E. Abnormal propagation pattern of duodenal pressure waves in the irritable bowel syndrome (IBD). Dig Dis Sci 2000;45:2151-2161.
6. Jones VA, McLaughlan P, Shorthouse M, Workman E, Hunter JO. Food intolerance: a major factor in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. Lancet 1982;2:1115-1117.
7. Nanda R, James R, Smith H, Dudley CR, Jewell DP. Food intolerance and the irritable bowel syndrome. Gut 1989;30:1099-1104.
8. Sullivan G, Blewett AE, Jenkins PL, Allison MC. Eating attitudes and the irritable bowel syndrome. Gen Hosp Psychiatry 1997;19:62-64.
9. Fernandez-Banares F, Esteve-Pardo M, de Leon R, Humbert P, Cabre E, Llovet JM, Gassull MA. Sugar malabsorption in functional bowel disease: clinical implications. Am J Gastroenterol 1993;88:2044-2050.
10. Bradette M, Delvaux M, Staumont G, Fioramonti J, Bueno L, Frexinos J. Evaluation of colonic sensory thresholds in IBS patients using a barostat. Definition of optimal conditions and comparison with healthy subjects. Dig Dis Sci 1994;39:449-457.
11. Drossman DA, Whitehead WE, Toner BB, Diamant N, Hu YJ, Bangdiwala SI, Jia H. What determines severity among patients with painful functional bowel disorders? Am J Gastroenterol 2000;95:974-980.
12. Edwards CA, Brown S, Baxter AJ, Bannister JJ, Read NW. Effect of bile acid on anorectal function in man. Gut 1989;30:383-386.
13. Gwee KA, Graham JC, McKendrick MW, Collins SM, Marshall JS, Walters SJ, Read NW. Psychometric scores and persistence of irritable bowel after infectious diarrhoea. Lancet 1996;347:150-153.
14. Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. BMJ 1997;314:779-782.
15. Robertson DA, Ray J, Diamond I, Edwards JG. Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease. Gut 1989;30:623-626.
16. Camilleri M. Management of the irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2001;120:652-668.
17. Ringel Y, Sperber AD, Drossman DA. Irritable bowel syndrome. Annu Rev Med 2001;52:319-338.
18. Camilleri M, Lee JS, Viramontes B, Bharucha AE, Tangalos EG. Insights into the pathophysiology and mechanisms of constipation, irritable bowel syndrome, and diverticulosis in older people. J Am Geriatr Soc 2000;48:1142-1150.
19. Shen B, Soffer E. The challenge of irritable bowel syndrome: creating an alliance between patient and physician. Cleve Clin J Med 2001;68:224-236.
20. Schulze J. Obstipation und Darmflora. Z Arztl Fortbild (Jena) 1992;86:121-126.
21. Voderholzer WA, Adler G, Müller-Lissner SA. Der Effekt von *E. coli* Stamm Nissle 1917 auf die Motilität des Rattencolons in vitro. Z Gastroenterol 1997;35:832-833.
22. Borody TJ, George L, Andrews P, Brandl S, Noonan S, Cole P, Hyland L, Morgan A, Maysey J, Moore-Jones D. Bowel-flora alteration: a potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome? Med J Aust 1989;150:604.
23. Möllenbrink M, Bruckschen E. Behandlung der chronischen Obstipation mit physiologischen *Escherichia coli*-Bakterien. Med Klin 1994; 89: 587-593.
24. Bruckschen E, Horosiewicz H. Chronische Obstipation. Vergleich von mikrobiologischer Therapie und Laktulose. MMW 1994; 16: 241-245.

Diarrhoe bei erregerinduzierter Kolitis – Ansatzpunkte einer antagonistischen mikrobiellen Therapie

K.J. Goerg



Priv.-Doz. Dr. K.J. Goerg

Abstract

Der bakterielle Antagonismus als therapeutisches Konzept erfährt zurzeit durch die Multiresistenzentwicklung bei vielen Bakterienspezies ein zunehmendes wissenschaftliches Interesse. Die Erkenntnisse einer solchen Therapie bei erregerinduzierten Enterocolitiden sind spärlich und beruhen im Wesentlichen auf Fallstudien. In diesem Vortrag möchten wir durch die Vorstellung eigener Fälle erregerinduzierter Kolitiden die Hypothese aufstellen, dass die Kombination von intestinaler Lavage mit nachfolgender Therapie mit lebenden *E. coli* des Stammes Nissle 1917 eine wirksame therapeutische Alternative zur spezifischen Antibiotikatherapie darstellt. Im Wesentlichen waren die Kolitiden antibiotikaassoziiert mit erheblich entzündlichen endoskopischen Veränderungen, z. B. ulzeröse Kolitiden und pseudomembranöse Kolitiden mit und ohne Nachweis von *Clostridium difficile* und Toxin. Der antagonistischen bakteriellen Therapie ging eine initiale Lavage voraus, die mit einer klinischen Besserung verbunden war. Insbesondere bei den pseudomembranösen Kolitiden konnte dies durch eine deutliche Reduktion der Leukozyten demonstriert werden. Die Lavage hat einen Spülungs- und Verdünnungseffekt auf die Konzentration pathogener Keime und ihre Stoffwechselprodukte. Die ausgeprägte antagonistische Effektivität der Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 konnten wir möglicherweise dadurch steigern, dass wir hohe Bakterien-Konzentrationen bereits während der initialen Koloskopie direkt in das Kolon applizierten. Nur bei einem Fall mit pseudomembranöser Kolitis haben wir bei Wiederauftreten von hohem Fieber zusätzlich Vancomycin verabreicht, wobei aber als Ursache für das Fieber ein mit Staphylokokken infizierter venöser Zugang durch Blutkulturen nachgewiesen werden konnte.

Die positiven Erfahrungen unserer Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 dürfen aber noch nicht als Therapieempfehlung aufgefasst werden, da mit Kasuistiken lediglich Hypothesen generiert werden können. Wir haben daher eine plazebokontrollierte, doppelblinde, randomisierte Studie mit einer Kombination von Vancomycin + *E. coli* Stamm Nissle 1917 im Vergleich zu einer Standardtherapie mit Vancomycin bei der pseudomembranösen Kolitis geplant.

Einleitung

Eine Antibiotikatherapie führt regelhaft zu einer Schädigung der autochthonen Darmflora, die je nach Art und Dauer der Behandlung verschieden stark ausgeprägt ist. Dadurch wird die physiologische Kolonisationsresistenz geschwächt und pathogene Keime finden bessere Wachstumsbedingungen. Als Folge treten bei 20–30 % der mit Antibiotika behandelten Patienten Diarrhöen auf, die meist harmlos sind und spontan sistieren. In 2–5 % der Fälle kommt es allerdings zur Ausprägung einer pseudomembranösen Kolitis (PMC). Bei der antibiotika-assoziierten Kolitis wird *Clostridium difficile* in ungefähr 20 % der Fälle nachgewiesen, bei der PMC in fast 100 %. Bei gesunden Erwachsenen ist *Clostridium difficile* dagegen in weniger als 3 % zu finden.

Bei erwachsenen Patienten ist *Clostridium difficile* der häufigste nosokomiale Erreger infektiöser Diarrhöen. Für die USA werden jährlich 2 Millionen solcher Erkrankungsfälle geschätzt. Ältere Patienten sind öfter betroffen (1-3).

Die Patienten leiden unter teilweise massiven Diarrhöen und klagen über kolikartige Schmerzen und Blähungen. Weitere typische Befunde sind Fieber, Leukozytose, Hypalbuminämie durch den enteralen Eiweißverlust, Dehydratation und Gewichtsabnahme. Auslöser dieser Symptome sind die *Clostridium difficile*-Toxine A und B, die in den Enterozyten den Zerfall von Aktinfilamenten und damit die Zerstörung des Zytoskeletts bewirken. Die Folge ist eine erhöhte parazelluläre Permeabilität und Entzündung der Lamina propria. Die Diagnose, die Ausdehnung und der Schweregrad der Erkrankung werden durch das typische Bild in der Koloskopie gesichert (Abb. 1). Hierbei finden sich fleckige Erosionen und Pseudomembranen.

Es kann zu schweren Verläufen der pseudomembranösen Kolitis kommen (4, 5). In manchen Studien wird eine Letalität bis zu 30 % angegeben.

Standardtherapie der pseudomembranösen Kolitis

Grundsätzlich sollen zunächst alle Antibiotika abgesetzt werden, die nicht der Behandlung einer unmittelbar lebensbedrohlichen Infektion dienen. Zusätzlich erfolgt eine Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution. Zur spezifischen antibiotischen Therapie der pseudomembranösen Kolitis werden Vancomycin (oral) und Metronidazol (i.v.) eingesetzt (6, 7).

Das Hauptproblem der Therapie ist die hohe Rezidivquote von 20–30 %. Dabei sind die Rezidive nicht abhängig von der Dosis des Antibiotikums und treten sowohl bei Vancomycin als auch bei Metronidazol auf. Risikofaktoren für das Auftreten eines Rezidivs einer pseudomembranösen Kolitis sind die Schwere der Erkrankung und ein höheres Lebensalter. Auch eine prolongierte Vancomycin-Therapie mit ausschleichender Dosierung konnte die Rezidivquote nicht senken. Besondere therapeutische

Probleme bestehen bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (8, 9). Diese insgesamt unbefriedigenden Resultate der spezifischen Antibiotika-Therapie begründen die Suche nach weiteren therapeutischen Optionen.

Alternativen zur Standardtherapie der pseudomembranösen Kolitis

Durch *Clostridium difficile* verursachte Kolitiden und ihre Rezidive wurden sowohl mit Bakterienmischungen (10, 11) als auch der Instillation von Stuhlaufschwemmungen durch das Koloskop direkt in das Rektum erfolgreich behandelt (12-14). Tvede setzte dazu 10 verschiedene Stämme ein, darunter Spezies der Gattung *Bacteroides*, Clostridien, *E. coli* und andere.

Auch mit einem apathogenen *Clostridium difficile*-Stamm wurde eine solche mikrobielle Therapie versucht (15).

Die Kombination einer Antibiotika-Therapie mit zusätzlicher Gabe von *Saccharomyces boulardii* war bei der Behandlung der Ersterkrankung nicht effektiver als Placebo, wohl aber bei der Therapie von Rezidiven (16, 17).

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden verschiedene infektiöse Darmerkrankungen durch orale Applikation lebender Mikroorganismen therapiert. Dabei erwies sich der bakterielle Antagonismus von *E. coli* Stamm Nissle 1917 als besonders effektiv (18). In letzter Zeit wird wieder vermehrt über den positiven Einfluss mikrobieller Arzneimittel in der Behandlung von durch *Clostridium difficile* verursachten Kolitiden berichtet (19-22).

Eine weitere therapeutische Option stellt die orthograde Darmlavage dar, deren günstige Effekte bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen seit langem bekannt sind. So wurde eine Abnahme der Endotoxinkonzentration im Plasma auf weniger als 25 % des ursprünglichen Wertes gefunden und die Endotoxine waren wesentlich kürzer im Plasma nachweisbar als bei Patienten ohne Lavage (23, 24).

Therapie der pseudomembranösen Kolitis mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®)

Kasuistik 1

Der in unserer Klinik erstmalige therapeutische Einsatz von Mutaflor® bei der Indikation pseudomembranöse Kolitis erfolgte bei einer 82-jährigen Patientin. Sie wurde wegen einer akuten Linksherzdekompensation mit Lungenödem und Stauungspneumonie antibiotisch mit Amoxicillin und Clavulansäure behandelt. Daraufhin entwickelte die Patientin wässrige Diarrhöen (mehr als 10 pro Tag) und klagte über ausgeprägte abdominelle Schmerzen und Blähungen. Der Zustand der Patientin verschlechterte

sich deutlich und die Antibiotika-Therapie wurde abgesetzt. Endoskopisch und histologisch zeigte sich das Bild einer ausgeprägten pseudomembranösen Kolitis (Abb. 1 und 2).

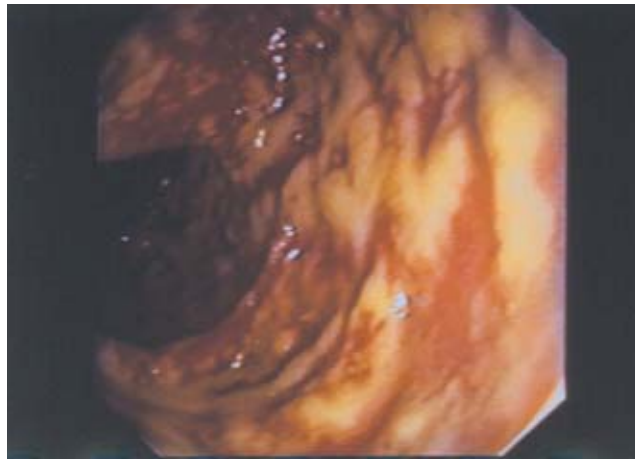


Abb. 1:
Pseudomembranöse Kolitis.
Endoskopischer Befund mit
multiplen, gelblich-weißen
Schleimhautauflagerungen,
die sich nicht abwischen oder
wegspülen lassen.

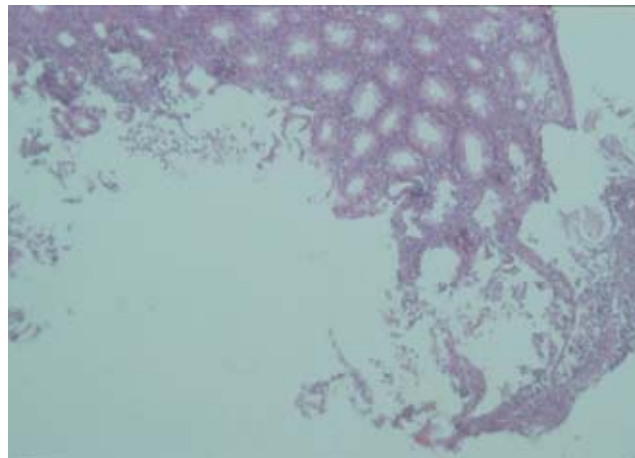


Abb. 2:
Histologie der Schleimhaut-
biopsie mit oberflächlichen
Erosionen, Fibrinbelägen und
Zelldetritus.

Da bei der Patientin im Rahmen des Volumenmangels ein funktionelles, prärenales akutes Nierenversagen mit ansteigendem Kreatinin bestand, konnte keine Therapie mit Vancomycin eingeleitet werden. Andererseits war eine deutliche Abnahme der abdominalen Schmerzen und des Meteorismus sowie der laborchemischen Entzündungsparameter nach der ersten orthograden intestinalen Lavage als Vorbereitung zur Koloskopie aufgefallen. Diese erfolgte mit einer Macrogol (= Polyethylenglykol)-haltigen gepufferten Elektrolytlösung (Klaen-Prep®, pH 7-8).

Deshalb wurde eine zweite, diesmal therapeutische intestinale Lavage durchgeführt und mit der Gabe von *E. coli* Stamm Nissle 1917 (2 x 100 mg Mutaflor® pro Tag) kombiniert. Erste Behandlungserfolge stellten sich bereits nach 5 Tagen ein, als die Patientin nur ein bis zwei teils breiige, teils geformte Stühle absetzte. Schmerzen oder Meteorismus bestanden nicht mehr. Innerhalb der folgenden Woche kam es zu einer Normalisierung der Stuhlkonsistenz. Diese Besserung ließ sich auch endoskopisch bestätigen. In einer Kontrollendoskopie 3 Wochen nach Beginn der probiotischen Therapie mit Mutaflor® zeigte sich eine weitgehend abgeheilte Schleimhaut (Abb. 3). Die Entlassung der Patientin erfolgte in der 4. Woche nach Auftreten der Diarrhöen. Der Behandlungserfolg hielt mindestens 4 Monate an, wie sich aus einer Kontrolluntersuchung ergab.

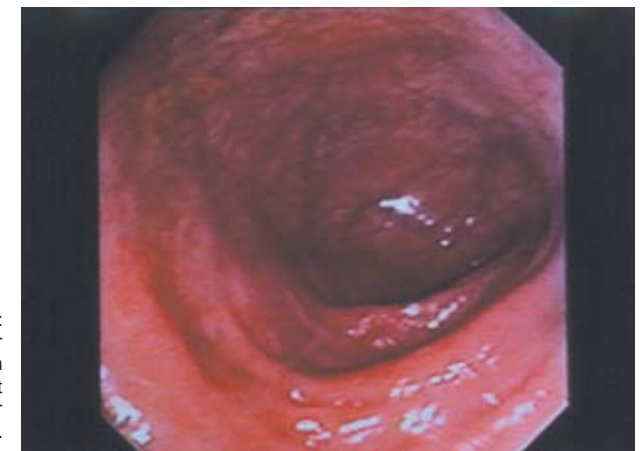


Abb. 3:
Endoskopischer Befund einer
fast vollständig abgeheilten
pseudomembranösen Kolitis mit
fleckiger Rötung und rarefizierter
Gefäßzeichnung.

Therapieerfolg bei 6 weiteren Patienten

Aufbauend auf diesen Erfahrungen stellten wir die Hypothese auf, dass die Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 in Kombination mit einer intestinalen Lavage eine wirksame Alternative zur Behandlung der erregerinduzierten Kolitis darstellt.

Deshalb wurden 6 weitere Patienten mit pseudomembranöser Kolitis in ähnlicher Weise behandelt. Dabei wurden die Therapiemodalitäten insofern verändert, als dass zusätzlich zur oralen Applikation von *E. coli* Stamm Nissle 1917 schon während der Endoskopie Mutaflor® direkt in das Kolon instilliert wurde. Dazu wurde der Inhalt von jeweils 5 Kapseln Mutaflor® 100 mg aufgelöst und unmittelbar appliziert. Bei allen behandelten Patienten besserten sich sowohl die abdominalen Schmerzen als auch die Diarrhoe bereits in den ersten Tagen. Den

klinischen Verlauf und die Normalisierung der Entzündungsparameter geben die Abbildungen 4 und 5 wieder. Alle Patienten wiesen eine ausgeprägte Besserung des klinischen Befundes auf.

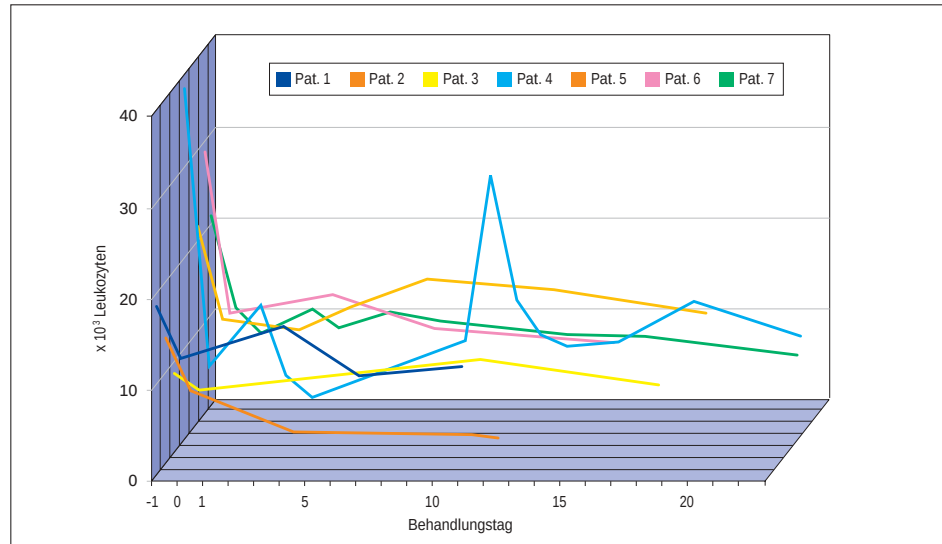


Abb. 4: Leukozyten im Blut. Vor der Lavage deutlich erhöht, danach und unter Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 rasche Abnahme. -1: Tag vor der Endoskopie, 0: Tag der Endoskopie. Der Leukozyten-Anstieg während der Therapie bei einer Patientin war auf einen infizierten zentralen Venenkatheter (Nachweis von Staphylokokken in der Blutkultur) zurückzuführen.

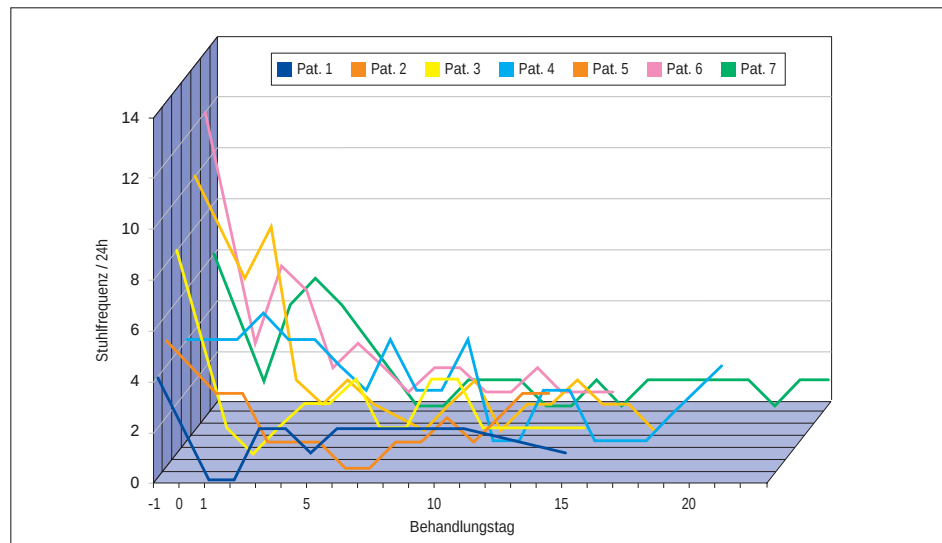


Abb. 5: Tägliche Stuhlfrequenz. Rasche Abnahme der Stuhlfrequenz nach der Lavage und unter Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917. -1: Tag vor der Endoskopie, 0: Tag der Endoskopie.

Kasuistik 2

Bei der 74-jährigen Patientin bestand eine ausgeprägte obstruktive Lungenerkrankung mit rezidivierenden bakteriellen Infektionen. Zur Therapie einer Pneumonie hatte sie Antibiotika erhalten und daraufhin Diarrhöen entwickelt. Diese wurden zunächst auf einen Infekt zurückgeführt und wiederum antibiotisch behandelt, diesmal mit Ciprofloxacin. Die ersten 2 Tage brachten eine temporäre Besserung, gefolgt von einer Befundverschlechterung mit einer deutlichen Zunahme der Stuhlfrequenz am dritten Tag. Die Patientin erhielt daraufhin eine Lavage. Bei der anschließenden Koloskopie wurden Pseudomembranen nachgewiesen und *E. coli* Stamm Nissle 1917 instilliert wie oben beschrieben. Das Ciprofloxacin sollte abgesetzt werden.

Nach anfänglicher Besserung nahm die Stuhlfrequenz erneut zu. Es stellte sich heraus, dass das Ciprofloxacin irrtümlicherweise weiterhin gegeben worden war. Die begleitende Antibiose wurde auf Vancomycin umgestellt und die Patientin konnte bald darauf geheilt entlassen werden.

2 Wochen später erfolgte wegen einer massiven Exacerbation der obstruktiven Lungenerkrankung wieder eine antibiotische Therapie (Cephalosporin), die zu einer ausgeprägten Diarrhoe mit Fieber und Leukozytose führte. Nach einem zweiten Therapiezyklus mit Lavage und nachfolgender Instillation von *E. coli* Stamm Nissle 1917 war die Patientin beschwerdefrei (Abb. 6).

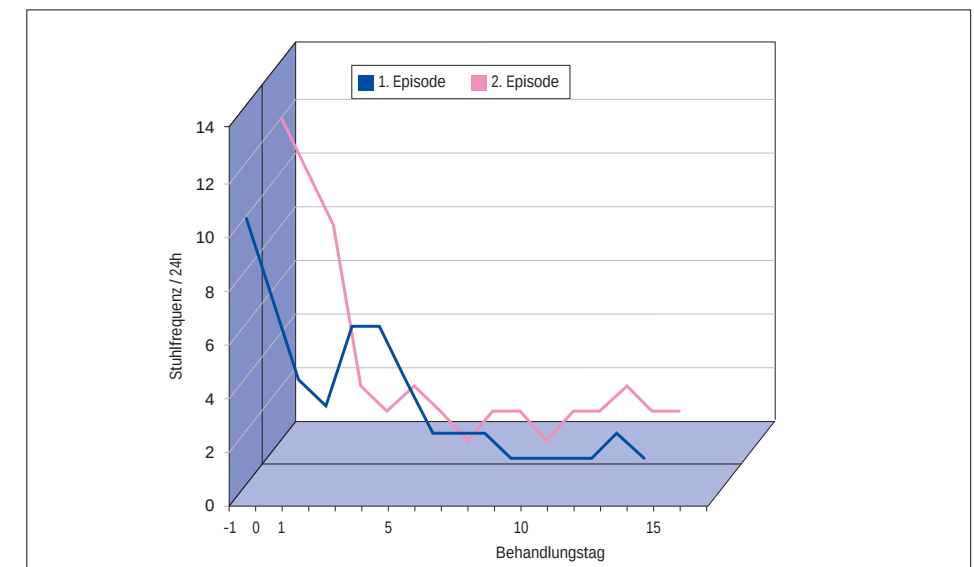


Abb. 6: Kasuistik 2. Zwei Episoden einer pseudomembranösen Kolitis. Tägliche Stuhlfrequenz.

- Episode 1 mit irrtümlich andauernder Ciprofloxacin-Medikation, am 4. Tag umgestellt auf Vancomycin und Fortführung der Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917.
- Episode 2 mit rascher Abnahme der Stuhlfrequenz nach der Lavage und unter Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917. -1: Tag vor der Endoskopie, 0: Tag der Endoskopie.

Es ist anzunehmen, dass nicht die Lavage allein den günstigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der pseudomembranösen Kolitis auslöst, sondern *E. coli* Stamm Nissle 1917. Die Lavage schafft die Voraussetzungen, damit Mutaflor® wirken kann. Werden diese vermehrungsfähigen physiologischen Darmkeime durch Antibiotika wie beispielsweise Ciprofloxacin abgetötet, kommt es zum Wirksamkeitsverlust und erneuter Diarrhoe, wie es bei dieser Patientin der Fall war. Eine Kombination von Vancomycin (oder auch Metronidazol) mit der Mutaflor®-Therapie ist möglich, weil *E. coli* gegen diese bei Infektionen durch Gram-positive Erreger eingesetzten Antibiotika resistent ist. In Tabelle 2 sind Antibiotika aufgeführt, bei denen der zeitgleiche Einsatz von Mutaflor® nicht sinnvoll ist.

Amikacin	Ceftriaxone	Nitrofuratoin
Amoxicillin / Clavulansäure	Cephalothin	Norfloxacin
Ampicillin	Chloramphenicol	Pipemidsäure
Azlocillin	Ciprofloxacin	Piperacillin
Cefaclor	Doxycyclin	Tetracyclin
Cefazolin	Gentamicin	Ticarcillin
Cefoperazon	Imipenem	Tobramycin
Cefotaxim	Latamoxef	Trimethoprim / Sulfamethoxazol
	Mezlocillin	

Tab. 2 Antibiotikaempfindlichkeit von Mutaflor® laut Herstellerangaben

Zusammenfassung

Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass die Therapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) in Kombination mit einer intestinalen Lavage bei der erregerinduzierten Kolitis wirksam ist. Inwieweit diese therapeutische Alternative zur spezifischen Antibiotikabehandlung empfohlen werden kann, muss in kontrollierten Studien und größeren Patientenkollektiven überprüft werden. Berücksichtigt man sowohl den kausalen Ansatz der Mutaflor®-Therapie als auch die zunehmende Multiresistenzentwicklung vieler Bakterienspezies, erscheint die Etablierung einer solchen Methode logisch. Ein Vorteil ist auch die Nebenwirkungsarmut der Therapie und die einfache Handhabung der direkten Instillation von *E. coli* Stamm Nissle 1917 durch das Endoskop in das Kolon unmittelbar nach der endoskopischen Diagnosestellung. Damit wird auch in den proximalen Kolonabschnitten sofort eine hohe therapeutische Keimzahl erreicht.

Priv.-Doz. Dr. med. K.J. Goerg

Zentrum für Innere Medizin
Kliniken St. Antonius/ Marienheim
Hardtstr. 46
42107 Wuppertal

Literatur

- Klingler PJ, Metzger PP, Seelig MH, Pettit PD, Knudsen JM, Alvarez SA. *Clostridium difficile* Infection: Risk Factors, Medical and Surgical Management. Dig Dis 2000;18:147-160.
- Brar HS, Surawicz CM. Pseudomembranous colitis: an update. Can J Gastroenterol 2000;14:51-56.
- Poduval RD, Kamath RP, Corpuz M, Norkus EP, Pitchumoni CS. *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant enterococcus: the new nosocomial alliance. Am J Gastroenterol 2000;95:3513-3515.
- Siemann M, Koch-Dorfler M, Rabenhorst G. *Clostridium difficile*-associated diseases. The clinical courses of 18 fatal cases. Intensive Care Med 2000;26:416-421.
- Klipfel AA, Schein M, Fahoum B, Wise L. Acute abdomen and *Clostridium difficile* colitis: still a lethal combination. Dig Surg 2000;17:160-163.
- Bergogne-Berezin E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. Int J Antimicrob Agents 2000;16:521-526.
- Gerding DN. Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Curr Top Microbiol Immunol 2000;250:127-139.
- Beloosesky Y, Grosman B, Marmelstein V, Grinblat J. Convulsions induced by metronidazole treatment for *Clostridium difficile*-associated disease in chronic renal failure. Am J Med Sci 2000;319:338-339.
- Popoola J, Swann A, Warwick G. *Clostridium difficile* in patients with renal failure - management of an outbreak using biotherapy. Nephrol Dial Transplant 2000;15:571-574.
- Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet 1990;335:110.
- Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. Lancet 1989;1:1156-1160.
- Schwan A, Sjolín S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. Scand J Infect Dis 1984;16:211-215.
- Persky SE, Brandt LJ. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. Am J Gastroenterol 2000;95:3283-3285.
- Borody TJ. "Flora Power"-- fecal bacteria cure chronic *C. difficile* diarrhea. Am J Gastroenterol 2000;95:3028-3029.
- Seal D, Borriello SP, Barclay F, Welch A, Piper M, Bonnycastle M. Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea by administration of a non-toxigenic strain. Eur J Clin Microbiol 1987;6:51-53.
- Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, Garcia RJ, Brandmarker S, Bowen K, Borjal D, Elmer GW. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. Clin Infect Dis 2000;31:1012-1017.
- McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, Bowen KE, Cox JL, Noorani Z. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. JAMA 1994;271:1913-1918.
- Nissle A. Über die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora. DMW 1916;42:1181-1184.
- Davidson GP, Butler RN. Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders. Curr Opin Pediatr 2000;12:477-481.
- McFarland LV. Re: probiotics and *C. difficile* diarrhea. Am J Gastroenterol 2000;95:2128.
- Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. Am J Gastroenterol 2000;95:S11-S13.
- Goerg KJ, Schlörner E. Probiotische Therapie einer pseudomembranösen Kolitis. DMW 1998;123:1274-1278.
- Wellmann W, Fink PC, Schmidt FW. Whole-gut irrigation as antiendotoxaemic therapy in inflammatory bowel disease. Hepatogastroenterology 1984;31:91-93.
- Liacouras CA, Piccoli DA. Whole-bowel irrigation as an adjunct to the treatment of chronic, relapsing *Clostridium difficile* colitis. J Clin Gastroenterol 1996;22:186-189.

Erfolgreiche Behandlung von Halitosis mit Mutaflor®

J. Henker



Prof. Dr. J. Henker

Abstract

Ein unangenehmer Mundgeruch kann für den Betroffenen und seine Umgebung ein erhebliches Problem darstellen. In bis zu 90 % findet sich die Ursache im Mund-Nasen-Rachenraum und es sollte dann von Foetor ex ore gesprochen werden. Bei der Halitosis handelt es sich um eine übelriechende Exhalation aus der Lunge; direkt bei Lungenprozessen oder indirekt durch Abatmung flüchtiger niedermolekularer Fettsäuren, von Ammoniak und/oder schwefelhaltigen Verbindungen. Diese können von Bakterien im Darm gebildet werden und gelangen nach Resorption über die Blutbahn in die Lunge, wo sie abgeatmet werden.

Ein 9 Jahre altes Mädchen litt seit dem 5. Lebensjahr an einem ausgeprägten Mundgeruch und war deswegen sowohl im Kindergarten als auch in der Schule sozial isoliert. Trotz umfangreicher Diagnostik konnte die Ursache zunächst nicht geklärt werden. Erst mit einer SPME-GC/MS-Atemgasanalyse (Solid-phase microextraction-Gaschromatographie/Massenspektroskopie) konnte eine intestinal bedingte Halitosis wahrscheinlich gemacht werden. Es fand sich im Vergleich zu sechs gesunden Probanden eine vermehrte Anzahl und erhöhte Konzentration niedermolekularer Ketone in der Exhalationsluft. Die Patientin wurde daraufhin über drei Monate mit täglich 2 ml Mutaflor®-Suspension (1 ml enthält 10^8 lebensfähige Bakterien *E. coli* Stamm Nissle 1917) therapiert. In einer danach erneut durchgeführten Atemgasanalyse konnten praktisch keine niedermolekularen Ketone mehr nachgewiesen werden. Die Ernährungsgewohnheiten waren in der Zeit der Mutaflor®-Behandlung unverändert.

Einleitung

Für den Betroffenen und seine Umgebung stellt ein unangenehmer Mundgeruch ein erhebliches Problem dar. Es betrifft weltweit Millionen von Menschen aller sozialen Schichten.

Terminologisch wird im deutschen Sprachraum zwischen Foetor ex ore und Halitosis unterschieden. Unter Foetor ex ore wird ein übler Mundgeruch aus Mund-Nasen-Rachenraum oder oberem Gastrointestinaltrakt verstanden. Mit der Halitosis (halitus: abnormer Atem) wird die Abatmung von Geruchsstoffen aus tiefer liegenden Organen (Gastrointestinaltrakt, Lunge) beschrieben.

Foetor ex ore

Mögliche und häufige Ursachen sind Nikotin, der Genuss von Knoblauch, Zwiebeln, Gewürzen, eine mangelhafte Mundhygiene sowie Erkrankungen des Zahnapparates (Karies, Parodontose, Zahnbeläge, schlechtsitzende Prothesen). Gram-negative Bakterien bauen abgeschilferte Epithelzellen und Nahrungsmittelbestandteile ab, als Resultat finden sich z.B. Hydrogen- und Dimethylsulfide sowie Methylmercaptane, die übel riechen. Auch allein die Austrocknung der Mundschleimhaut bei vermindertem Speichelfluß kann zu schlechtem Mundgeruch führen.

Halitosis

Bestimmte Erkrankungen der Lunge wie eitrige Bronchitiden, Bronchiektasen, Abszesse oder zerfallende Tumore können eine Halitosis verursachen.

Die Abatmung von Stoffwechselprodukten der Darmflora, insbesondere von aromatischen Substanzen wie niedermolekulare Fettsäuren, Ammoniak und flüchtige schwefelhaltige Verbindungen führt ebenfalls zu einer Halitosis.

Kasuistik

Eine 1991 geborene Patientin stellte sich mit ausgeprägtem üblen Mundgeruch vor. Die Beschwerden dauerten seit dem 5. Lebensjahr an und waren so ausgeprägt, dass sich die Mitschüler in der Klasse nicht in die Nähe des Kindes setzen wollten.

T. A., geb. 09/91, weiblich

Familienanamnese

Mutter leidet an endogenem Ekzem, beide Großmütter an Asthma bronchiale.

Eigenanamnese

Seit Kleinkindalter häufig obstruktive Bronchitiden, später typisches Asthma bronchiale.

Seit dem 5. Lebensjahr übler Mundgeruch mit sozialer Isolation im Kindergarten und in der Schule.

Diagnostik

Normalbefunde bei Zahnarzt- und HNO-Konsil

Röntgen von Thorax, Nasennebenhöhlen und Ösophagus sowie Abdomensonographie ohne pathologischen Befund.

Unauffälliger Kurvenverlauf des Wasserstoffatemtests mit Fruktose, Laktose, Laktulose und Glukose.

Laborchemisch Ferritin- und IgA-Mangel nachweisbar.

Bis auf den Ferritin- und IgA-Mangel war die Diagnostik komplett unauffällig. Es bestand sowohl bei dem Mädchen als auch bei der Familie, insbesondere bei der Mutter, ein hoher Leidensdruck.

Zur Abklärung des Mundgeruchs wurde schließlich eine SPME-GC/MS-Atemgasanalyse im Landeskriminalamt Sachsen durchgeführt und mit den Analysen von sechs gesunden erwachsenen Probanden verglichen.

Atemgasanalyse

Etwa 2 Stunden vor dem Test wurde eine Mahlzeit bestehend aus Früchten, Keksen und Schokolade eingenommen. Danach wurde eine durch Ausblasen eines mit bidestilliertem Wasser gefüllten Gassammelbehälters gewonnene 0,5 l messende Atemgasprobe an Carboxenfaser adsorbiert. Die thermische Desorption (bei + 250 °C) erfolgte durch Einbringen der Faser in den Injektor eines Gaschromatographen, in welchem die Einzelsubstanzen des Gasgemisches die Trennsäule zu unterschiedlichen Zeiten (siehe Abszisse der Abb. 1–3) verlassen und dann mit Hilfe eines Massenspektroskopes analysiert werden konnten.

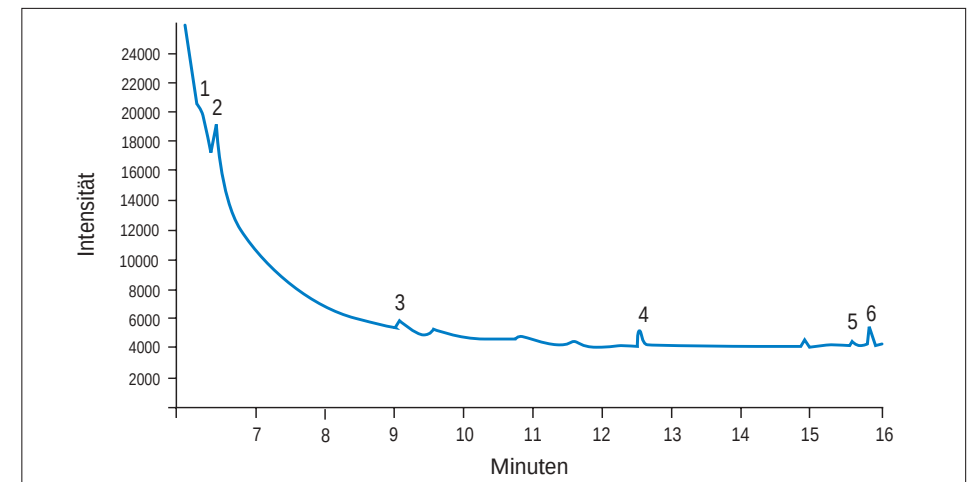


Abb. 1: Atemgasanalyse eines gesunden Probanden

1 Aceton	3 Butanol	5 alpha-Pinen
2 2-Methyl-1,3 Butadien	4 Butylacetat	6 Hexylacetat

Es zeigten sich bei allen gesunden Probanden in der Atemgasanalyse unauffällige Kurven mit einzelnen Spitzen, die diskret ausgebildet waren und einer geringen Menge der gefundenen Substanzen entsprachen (Abb. 1).

Ein ganz anderes Muster fand sich bei der Atemgasanalyse der Patientin (Abb. 2).

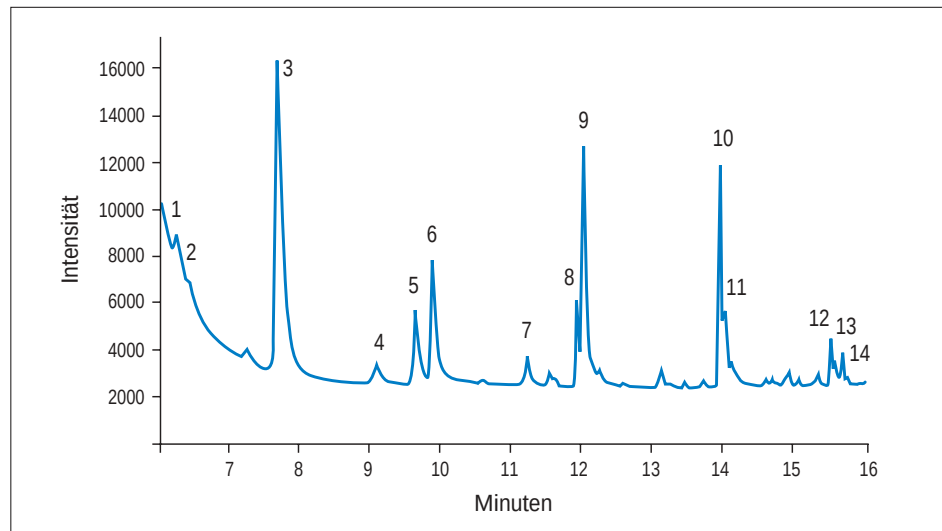


Abb. 2: Atemgasanalyse, Patientin T.A., vor der Therapie.

1 Aceton	6 3-Pentanon	11 2-Heptanon
2 2-Methyl-1,3-Butadien	7 3-Methyl-2-pentanon	12 3-Octanon
3 2-Butanon	8 3-Hexanon	13 2-Octanon
4 1-Butanol	9 2-Hexanon	14 Pentamethylheptan
5 2-Pentanon	10 3-Heptanon	

Eine Vielzahl ausgeprägter Spitzen im Kurvenverlauf entspricht einer Fülle gefundener Substanzen in auch größerer Menge. Diese Ketone sind anscheinend typische Stoffwechselprodukte der individuellen Darmflora der Patientin.

Die Patientin wurde daraufhin über 3 Monate mit Mutaflor®-Suspension (1 ml enthält 10^8 lebensfähige Bakterien *E. coli* Stamm Nissle 1917) behandelt. Schon nach wenigen Wochen berichtete die Mutter über eine deutliche Besserung. Nach 4 Wochen war der üble Mundgeruch beseitigt. Bei einer zweimalig durchgeführten Kontroll-Atemgasanalyse 3 Monate nach Therapiebeginn waren keine auf eine erhöhte Konzentration kurzkettiger Fettsäuren hinweisende Spitzen mehr nachweisbar (Abb. 3).

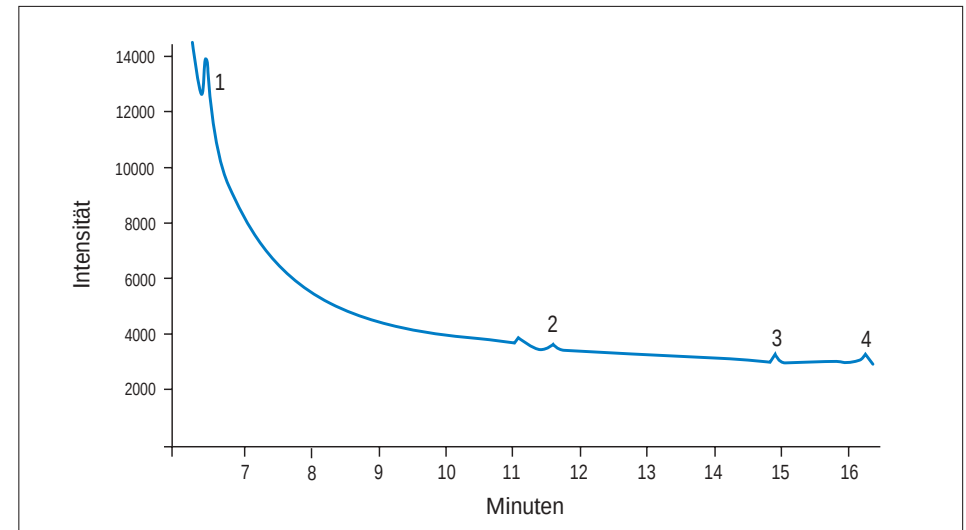


Abb. 3: Atemgasanalyse, Patientin T.A., nach dreimonatiger Therapie mit Mutaflor®.

1 2-Methyl-1,3-Butadien	3 β -Ocimen
2 Toluol	4 Limonen

Diese Atemgasanalyse ist mit denen der erwachsenen Probanden vergleichbar. Es finden sich nur diskrete Spitzen im Kurvenverlauf. Damit stimmt der klinische Befund mit dem der Atemgasanalyse überein. Während der Mutaflor®-Therapie blieb die Ernährung des Kindes unverändert.

Offenbar handelte es sich bei der Erkrankung des hier vorgestellten Kindes um eine intestinal bedingte Halitosis. Die gefundenen Ketone werden von Bakterien im Darm gebildet und gelangen nach Resorption über die Blutbahn in die Lunge, wo sie abgeatmet werden. Durch die Gabe von lebensfähigen Bakterien *E. coli* Stamm Nissle 1917 im Präparat Mutaflor® konnte offenbar die Darmflora verändert werden.

Diskussion

Bei üblem Mundgeruch muss zu allererst eine gründliche stomatologische und HNO-ärztliche Untersuchung erfolgen. Dennoch kann es im Einzelfall schwierig sein, die Ursache zu finden. Es sollte versucht werden, zwischen Halitosis und Foetor ex ore zu differenzieren. Dies gelingt am besten mit einer Atemgasanalyse. Ein solcher Aufwand ist allerdings in der täglichen Routine kaum möglich. Deshalb sollte nach Ausschluss von Ursachen im Mund- und HNO-Bereich an eine intestinale Halitosis gedacht und der Patient entsprechend beraten und behandelt werden.

Nach Ausschluss einer organisch bedingten intestinalen Stase bestehen folgende therapeutische Möglichkeiten:

- Änderung der Ernährung
- Änderung der Darmflora
(Probiotika, Prebiotika, als ultima ratio Antibiose).

Die von manchen Autoren als ultima ratio empfohlene Antibiose zur Beeinflussung der Darmflora ist dank der Probiotika und vor allem bei Kindern zur Therapie der Halitosis nicht notwendig.

Aus praktischen Gründen bietet sich bei Verdacht auf das Vorliegen einer intestinal bedingten Halitosis deshalb die probatorische Behandlung mit einem Probiotikum an, z. B. mit Mutaflor®. Diese Therapie hat bis auf die selten initial auftretenden Blähungen praktisch keine Nebenwirkungen und kann auch problemlos bei Kindern angewendet werden. Im vorgestellten Fall war eine solche Behandlung mit Mutaflor®-Suspension erfolgreich.

Prof. Dr. med. habil. J. Henker

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
Technische Universität Dresden
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Fetscherstr. 74
01307 Dresden

Offene Pilotstudie zur Wirkung von Mutaflor® bei symptomatischer Kolondivertikulose

P. Frič, M. Zavoral



Prof. MU Dr. P. Frič

Abstract

Kolondivertikel sind in der Bevölkerung entwickelter Länder mit entsprechenden Ernährungsgewohnheiten häufig zu finden. Sie korrelieren positiv mit dem Alter und einer ballaststoffarmen Nahrung. Bei über 60-jährigen besteht eine Inzidenz von ca. 50–60 %, wobei der größte Teil der Patienten asymptomatisch bleibt. Eine symptomatische oder schmerzhafte Kolondivertikulose liegt vor bei kontinuierlich oder intermittierend auftretenden Symptomen wie linksseitigen abdominalen Schmerzen mit Blähungen, exzessiver Flatulenz und Defäkationsstörungen.

In einer prospektiven Studie wurden 10 Patienten mit symptomatischer Kolondivertikulose (fünf Frauen, fünf Männer) behandelt. Dabei wurden 7 Patienten über 3 Wochen und 3 Patienten über 6 Wochen mit Mutaflor® behandelt, jeweils 100 mg Mutaflor® an Tag 1–4 und 200 mg Mutaflor® morgens ab dem 5. Tag. 7 Patienten waren daraufhin zwischen 3 und 18 Monate beschwerdefrei, Nebenwirkungen der Mutaflor®-Medikation wurden nicht beobachtet. Zwei Patienten erlitten nach 8- bzw. 30-monatiger Remission einen Rückfall und erhielten eine zweite Behandlung mit Mutaflor®. Daraufhin war einer der Patienten erneut beschwerdefrei, der andere berichtete über eine deutliche Besserung seines Gesundheitszustandes. Ein dritter Patient wurde 17 Monate nachbeobachtet und hatte wesentlich weniger Beschwerden (milde Blähungen und leichte Defäkationsstörungen) als vor der Therapie. Mutaflor® hat damit bei dieser Indikation einen deutlichen Benefit für die Patienten gebracht, der in weiteren Untersuchungen doppelblind und plazebokontrolliert verifiziert werden sollte.

Einführung

Kolondivertikel stellen einen häufigen Befund in der Bevölkerung entwickelter Länder mit entsprechenden Ernährungsgewohnheiten dar. Ihre Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter und ballaststoffarmer Ernährung. Bei über 60-jährigen besteht eine Inzidenz von ca. 50–60 %, wobei der größte Teil der Patienten asymptomatisch bleibt (1, 2, 3).

Eine symptomatische oder schmerzhaft Kolondivertikulose liegt vor bei kontinuierlich oder intermittierend auftretenden Symptomen wie linksseitigen abdominalen Schmerzen mit Blähungen, Blutungen, exzessiver Flatulenz und Defäkationsstörungen (4, 5). Bisherige therapeutische Empfehlungen bei diesem Zustand umfassen die Verabreichung einer faserreichen Diät, volumenerhöhender Stoffe („bulk additives“) und Spasmolytika. Die Rolle der Darmflora für das Auftreten der entzündlichen Komplikationen der Kolondivertikulose (z.B. akute Divertikulitis, Abszess, Fistel usw.) ist gut bekannt. Das trifft für die symptomatische Kolondivertikulose nicht zu. Aus diesem Grund haben wir die Wirkung des Probiotikums *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) in einer offenen Pilotstudie untersucht.

Material und Methode

Es wurden 10 Patienten mit symptomatischer Kolondivertikulose (fünf Frauen, fünf Männer) behandelt. Zu Beginn der Untersuchung waren die Patienten zwischen 65 und 90 Jahre alt (mittleres Alter 75,3 Jahre). Die Diagnose Kolondivertikulose bestand seit 5–22 Jahren (mittlere Dauer 10,6 Jahre). Bei acht Patienten wurde eine totale Koloskopie durchgeführt. Bei zwei dieser Patienten war eine Röntgenuntersuchung im Doppelkontrast mit Bariumsulfat vorausgegangen. Die übrigen zwei Patienten wurden ausschließlich röntgenologisch untersucht. Die Divertikel zeigten eine unterschiedliche Ausdehnung. Bei fünf Patienten waren sie bis zur linken Flexur zu finden, bei einem auch im Kolon transversum, bei einem weiteren bis zur rechten Flexur und bei 3 Patienten im gesamten Kolon. Zu Beginn der Studie lag bei allen Patienten das komplette Beschwerdebild der symptomatischen Kolondivertikulose seit mindestens 5 Jahren vor. In der Vorgeschichte fanden sich bei drei Patienten perianale Blutungen und bei vier Patienten eine akute Divertikulitis.

Die Therapie wurde mit einer einwöchigen Administration eines intestinalen Antisepetikums (Dichlorchinolinol Tabletten, 3 x 250 mg, Endiaron®, Léčiva, Prag, Tschechische Republik) und eines Adsorbens (Aktivkohle-Tabletten, 3 x 320 mg, Carbosorb®, Imuna, Michalany, Slowakische Republik) begonnen. Anschließend erhielten die Patienten den nicht-pathogenen Stamm *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor®, Ardeypharm GmbH, Herdecke, Deutschland) in einer Dosierung von einer Kapsel (100 mg mit $2,5 \times 10^{10}$ lebensfähigen Bakterien) an den Tagen 1–4 und nachfolgend zwei Kapseln. Dabei wurden 7 Patienten über 3 Wochen und 3 Patienten über 6 Wochen mit Mutaflor® behandelt. Bei erneutem Auftreten der Symptome erfolgte ein zweiter Therapiezyklus mit dem Probiotikum für 3 oder 6 Wochen.

Ergebnisse

Die Patienten wurden 3–40 Monate nach der Therapie beobachtet (Durchschnitt 12,5 Monate). Neun von zehn Patienten befanden sich für 3–30 Monate in Remission (siehe Tabelle 1). Ein Patient (VII) zeigte eine teilweise Besserung seiner Beschwerden während der 17-monatigen Nachbeobachtung. Es bestanden bei ihm weiterhin eine leichte irreguläre Defäkation und milde Blähungen.

Nr.	Sex	Alter/ Jahre	Krankheits- dauer/Jahre	Dia- gnostik	Ausdehnung	Therapie- dauer/ Wochen	Nachbe- obachtung/ Monate	Ergebnis
I	M	73	10	K	Gesamtes Kolon	3	8	R
II	W	73	8	Rö	Re. Flexur	3 2. Zyklus: 3	8 4	R, dann Rezidiv R
III	M	65	5	Rö/K	Kolon transversum	3	9	R
IV	W	90	10	K	Li. Flexur	6	18	R
V	M	68	22	Rö/K	Gesamtes Kolon	3 2. Zyklus: 6	30 10	R, dann Rezidiv B±, P±
VI	W	82	15	K	Li. Flexur	6	8	R
VII	W	73	12	K	Li. Flexur	3	17	ID±, B±
VIII	M	72	10	K	Li. Flexur	3	3	R
IX	M	70	8	K	Li. Flexur	6	4	R
X	W	78	6	Rö	Gesamtes Kolon	3	6	R

Tab. 1: Studiendaten von 10 Patienten mit symptomatischer Kolon-Divertikulose, die mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) therapiert wurden

Abkürzungen: B = Blähungen, K = Koloskopie, Rö = Röntgenuntersuchung im Doppelkontrast, ID = irreguläre Defäkation, P = abdominale Schmerzen, R = Remission, ± = leicht gebessert

Zwei Patienten (II, V) erlitten ein Rezidiv. Es trat nach 8- (II) bzw. 30- (V) monatiger Remission auf. Daraufhin erfolgte ein zweiter Therapiezyklus mit Mutaflor® über 3 (II) bzw. 6 (V) Wochen. Der eine Patient (II) blieb anschließend bis zum Ende der Beobachtungsdauer (4 Monate) beschwerdefrei, bei dem anderen besserte sich der Gesundheitszustand deutlich in den folgenden 10 Monaten; zurück blieben diskrete Schmerzen und Blähungen.

Es wurden keine unerwünschten Nebenwirkungen während der Therapie mit Mutaflor® beobachtet.

Diskussion

Nach Patel und Thompson et al. (6, 7) sind Symptome bei Personen mit Divertikeln gewöhnlich koexistent mit einem Reizdarmsyndrom. Konsequenterweise wird empfohlen, nur dieses zu therapieren. Es wird außerdem diskutiert, ob überhaupt eine medikamentöse Therapie der Divertikelkrankheit vor der Entwicklung einer Divertikulitis möglich ist.

Die Diagnose Kolondivertikulose wurde bei den Patienten in der von uns durchgeführten Studie in einem Alter gestellt, welches für das Reizdarmsyndrom untypisch ist. Reizdarm-Patienten finden sich gehäuft in der Altersgruppe der 30- bis 50-Jährigen.

Auf der anderen Seite spielen funktionelle Abnormalitäten der Kolonmuskulatur in der Entwicklung der Divertikel von Anfang an eine Rolle. Eine Hypersegmentierung, die zu einer intraluminalen Hypertension führt und die für die moderne "westliche Welt" typische ballaststoffarme Diät können primäre Ursachen der Divertikulose sein (8).

Wir sehen den Verlauf in verschiedenen Stadien: asymptomatische Divertikulose, symptomatische Divertikulose, akute Divertikulitis und Komplikationen wie Abszesse und Fisteln.

Eine Stase des Darminhaltes kann bei ausreichender Intensität für sich schon Symptome verursachen, unabhängig davon, ob der pathologische Prozess im Dünn- oder Dickdarm lokalisiert ist. Zu einer solchen Stase mit sekundären Alterationen kommt es ohne Zweifel bei Kolondivertikeln. Pathogene Keime können nicht nur die akute Divertikulitis verursachen, sondern durch ihre Metaboliten auch zu funktionellen Störungen führen. Eine logische Rationale ist deshalb der Versuch, die Mikroflora des Kolons durch Applikation eines Probiotikums zu beeinflussen.

Es liegen für eine Reihe von Anwendungen positive Erfahrungen für den Einsatz von Probiotika vor. Dazu gehören die Stabilisierung der intestinalen Barriere (9), die Stimulation des Immunsystems (10), die Förderung der Proliferation des Darmepithels (11), die Reduktion abdomineller Blähungen und Schmerzen (12) sowie die Prävention der bakteriellen Translokation (13). Das von uns verwendete Probiotikum Mutaflor® war in zwei randomisierten, doppelblinden kontrollierten Studien in der Erhaltungstherapie der Colitis ulcerosa gleich effektiv wie Mesalazin (14,15).

Die vorliegende Pilotstudie untersuchte zum ersten Mal die therapeutische Wirksamkeit von Mutaflor® zur Behandlung der symptomatischen Divertikulose. Unsere bisherige Standardtherapie mit Dichlorochinolol und Aktivkohle war seltener erfolgreich. Wenn eine klinische Besserung der Symptomatik auftrat, war diese von kürzerer Dauer als bei der Therapie mit Mutaflor®. In der Studie wurde diese routinemäßige Anfangsbehandlung durchgeführt, um ein vergleichbares Darmmilieu bei allen Patienten vor Beginn der probiotischen Therapie zu schaffen.

Die meisten Patienten berichteten bereits am Ende der ersten oder in der zweiten Woche, dass der Stuhlgang regelmäßiger geworden sei und der Stuhl eine festere Konsistenz und intensivere Farbe gehabt habe. Die größte Überraschung war die lang anhaltende Remission bei 9 von 10 Patienten. Die Probiotika-Therapie hatte auch bei den zwei Patienten, die nach einem symptomfreien Intervall ein Rezidiv erlitten, einen positiven Effekt bei der wiederholten Gabe.

Die Therapie der symptomatischen Divertikulose mit Mutaflor® sollte in einer größeren klinischen, kontrollierten Studie weiter untersucht werden.

Prof. MUDr. P. Frič DrSc

2. Medizinische Abteilung
des Zentralen Militärkrankenhauses und
Institut für medizinische Fortbildung
U Vojenské nemocnice 1200
16902 Praha 6
Tschechische Republik

Literatur

1. Painter NS, Burkitt DP. Diverticular disease of the colon: A 20th century problem. *J Clin Gastroenterol* 1975; 4: 3-21.
2. Cheskin LJJ, Lamport RD. Diverticular disease: Epidemiology and pharmacological treatment. *Drugs Aging* 1995; 6: 55-63.
3. Stollmann NH, Raskin JB. Diverticular disease of the colon. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29: 241-52.
4. Simmang CL, Shires GT III. Diverticular disease of the colon. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. *Gastrointestinal and liver disease*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998; Vol 2. 1788-98.
5. Matthews JB. Treatment of diverticular disease of the colon. In: Wolfe MM, ed. *Therapy of digestive disorders*. Philadelphia: WB Saunders; 2000, 617-28.
6. Patel DG, Thompson WG. Diverticulitis and diverticular hemorrhage. In: Brandt LJ et al., ed. *Clinical practice of gastroenterology*. Philadelphia: Current Medicine; 2000; Vol 1, 727-32.
7. Thompson WG, Patel DG, Tao H, Nair RC. Does uncomplicated diverticular disease produce symptoms? *Dig Dis Sci* 1982; 27: 605-8.
8. Painter NS. The cause of the diverticular disease of the colon: its symptoms and its complications. *J R Coll Surg Edinb* 1985; 30: 118-22.
9. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70: 347-58.
10. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995; 78: 1597-606.
11. Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A et al. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 2119-23.
12. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahme S, Jeppsson B. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1231-8.
13. Mangiante G, Canepari P, Colucci G et al. A probiotic as an antagonist of bacterial translocation in experimental pancreatitis. *Chir Ital* 1999; 51: 221-6.
14. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 635-9.
15. Kruis W, Schütz E, Frič P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 853-858.

Festvortrag

Unsterbliche Musik und todbringende Keime – Tödliche Infektionskrankheiten bedeutender Komponisten¹

E.T. Rietschel



Prof. Dr. E.T. Rietschel

Vorbemerkungen und Pest

Im Jahre 1682, also etwas mehr als drei Jahrzehnte nach Beendigung des 30-jährigen Krieges, wütete wieder einmal die Pest in Deutschland. Die Krankheit war ursprünglich im Jahre 1347 von Asien aus mit Schiffen über Genua nach Europa gekommen und hatte auf ihrem Todeszug innerhalb von nur 6 Jahren etwa 20 Millionen Menschen dahingerafft. Man stelle sich vor: Allein in Lübeck wurden etwa 95 % der Bevölkerung durch die Seuche getötet. Die Pest, der „Schwarze Tod“, herrschte seitdem in Europa, kam immer wieder in Wellen und versetzte die Menschen in Angst und Schrecken.

Die organisatorischen und sozialen Auswirkungen der Pest sind uns heute kaum noch vorstellbar. Durch den Tod von Bäckern, Metzgern und Händlern brach die Versorgung zusammen. Erbschaften wurden wirksam, konnten aber wegen Tod der Begünstigten nicht angetreten werden, zudem waren die Notare gestorben. Die Toten wurden nicht begraben, weil die Totengräber selbst verschieden waren, die Stadtverwaltung funktionierte wegen des Ablebens der Beamten nicht mehr. Kurz, Legislative, Exekutive und Jurisdiktion waren außer Kontrolle, das Gemeinwesen drohte zusammenzubrechen!

Die Seuche war ein Politikum ersten Ranges und um einem totalen Kollaps des öffentlichen Lebens vorzubeugen, waren therapeutische Maßnahmen festzulegen. Hierzu aber mussten Ursache und Wirkung der Pest aufgeklärt werden. Wer aber war hier kompetent? Natürlich die praktizierenden Ärzte, die Medizinprofessoren und andere Wissenschaftler der Universitäten. Es ist offensichtlich, dass diese von den wirklichen Ursachen der Pest, vom Pestfloh, von den Ratten, geschweige denn von *Yersinia pestis*, dem bakteriellen Erreger der Pest, nicht die geringste Ahnung hatten. Die Öffentlichkeit erwartete Hilfe, erhielt jedoch von den Universitäten keinerlei sinnvolle Antworten. So wurde die Krise der Stadt auch zum Fiasko der Wissenschaft und der Medizin.

An der Pest starben natürlich auch Künstler wie beispielsweise **Hans Holbein** und Dichter, aber interessanterweise keine Komponisten. Komponisten litten und starben an anderen Infektionskrankheiten und von diesen Meistern und ihren Erkrankungen soll hier die Rede sein.

¹ Teile dieses Beitrages sind erschienen in „FOCUS MUL“ 16, 170-175 (1999)

Syphilis

Die Pest war aus Asien nach Europa gekommen – aus Amerika kam eine andere Seuche: die Syphilis. Diese Infektionskrankheit begann wie ein zerstörerischer Sturm, wahrscheinlich mitgebracht von den spanischen Seefahrern um Kolumbus auf dem Weg zurück von Amerika in den Jahren nach 1490.

Der Syphilis fielen viele Künstler zum Opfer: Dichter, Maler, Philosophen, die Furchtbare durchlitten haben (Tab. 1).

Berühmte Persönlichkeiten, die an Syphilis litten (ohne Komponisten)		
Ernst Theodor A. Hoffmann (Schriftsteller, Dichter, Tonkünstler)	* 24.01.1776 † 25.06.1822	Königsberg Berlin
Heinrich Heine (Dichter)	* 13.12.1797 † 17.02.1856	Düsseldorf Paris
Ignaz P. Semmelweis (Gynäkologe)	* 01.07.1818 † 13.08.1865	Ofen (Buda, Budapest) Döbling (Wien)
Friedrich W. Nietzsche (Philosoph)	* 15.10.1844 † 25.08.1900	Röcken (D) Weimar
Paul Gauguin (Maler)	* 07.06.1848 † 08.05.1903	Paris Atuona, Hiva Oa (F)
Guy de Maupassant (Schriftsteller)	* 05.08.1850 † 07.07.1893	Miromesnil, Dieppe (F) Paris

Tab. 1

Auch zahlreiche Komponisten erkrankten an der Syphilis (Tab. 2). Die meisten erlebten die furchtbaren Endstadien der Syphilis mit progressiver Paralyse. Bedeutende Männer wie **Friedrich Smetana**, **Robert Schumann** und **Hugo Wolf** beendeten ihr Leben in Anstalten im Endstadium mit geistiger Umnachtung.

Auch **Franz Schubert** (Abb. 1) litt unter der Syphilis. Er war ein Leben lang von Todesängsten und Todesahnungen geplagt, die sich auch in seiner Musik niederschlugen. Man denkt dabei an viele seiner Lieder, z.B. an die „Winterreise“, den „Erlkönig“, aber auch die „Unvollendete“ und natürlich an den „Tod und das Mädchen“. Schubert infizierte sich mit *Treponema pallidum* wahrscheinlich im Jahre 1818, also 21-jährig. Im Jahre 1821/1822 bricht bei ihm die Krankheit deutlich aus und wird als Syphilis erkannt. Schubert ist zutiefst erschüttert. Es ist in dieser Zeit, dass er das Lied „Der Tod und das Mädchen“ komponiert, welches er 1824 als Streichquartett konzipiert. Der von Matthias Claudius (1740–1815) stammende Text lautet folgendermaßen:



Abb. 1: Franz Schubert

Das Mädchen Vorüber! ach, vorüber!
geh, wilder Knochenmann!
Ich bin noch jung, geh, Lieber!
und rühre mich nicht an.

Der Tod Gib deine Hand, du schön und zart Gebild!
bin Freund und komme nicht zu strafen.
Sei gutes Muts! Ich bin nicht wild,
sollst sanft in meinen Armen schlafen!

Der Inhalt und die Bedeutung des Liedes sind wohl am besten verstanden worden von Marianne Stokes, deren Bild „Der Tod und das Mädchen“ im Musée d’Orsay in Paris hängt. Der Tod ist hier eine schwarz gekleidete Frau.

Im Jahre 1827 leidet Schubert an einem erneuten Krankheitsausbruch. Am 25. März 1827 stirbt Beethoven, und Schubert ist einer der Fackelträger anlässlich der Bestattung, nicht ahnend, dass er der nächste am Währinger Friedhof sein wird. Im Oktober infiziert sich Schubert durch verdorbenes Trinkwasser und leidet unter den Symptomen von Typhus. Sein durch die chronische Syphilis-Infektion geschwächter Körper kann den Salmonellen keinen Widerstand leisten, und am 19. November 1828 um 3 Uhr nachmittags tritt der Tod ein.

Schubert hatte wohl keine Romanzen – kein einziger Liebesbrief ist überliefert. Seine Persönlichkeit, seine Herzenswärme und auch Zärtlichkeit haben nur in seinen

Komponisten, die an Syphilis litten		
Nicolai Paganini	* 27.10.1782 † 27.05.1840	Genua Genua
Gaetano D.M. Donizetti	* 29.11.1797 † 08.04.1848	Bergamo Bergamo
Franz Schubert	* 31.01.1797 † 19.11.1828	Wien Wien
Mikhail J. Glinka	* 01.06.1804 † 15.02.1857	Nowospasskoje (Smolensk) Berlin
Robert A. Schumann	* 08.06.1810 † 29.07.1856	Zwickau Endenich (Bonn)
Bedrich Smetana	* 02.03.1824 † 12.05.1884	Leitomischl (Böhmen) Prag
Hugo Wolf	* 13.03.1860 † 22.02.1903	Windischgraz (Österreich) Wien
Frederick Delius	* 29.01.1862 † 10.06.1934	Bradford (Yorkshire) Grez-sur-Loing (Dept. Seine-et-Marne)

Tab. 2

Werken ihren Niederschlag gefunden. Schubert ist also letztlich an Typhus gestorben, obwohl seine Grunderkrankung die Syphilis war.

Peter Tschaikowsky (1840–1893) starb an der Cholera, nachdem er mit *Vibrio cholerae* verseuchtes Wasser getrunken hatte – übrigens ein Jahr nach der verheerenden Cholera-Epidemie in Hamburg. *Entamoeba histolytica*, der Erreger der Amöbenruhr, hat zum frühen Tod des genialen Komponisten der „Norma“ – **Vincenzo Bellini** (1801–1835) – geführt.

Tuberkulose

Einhergehend mit der Industrialisierung des 19. Jahrhunderts entwickelte sich eine andere Infektionskrankheit zu einer wahren Volksseuche, die Tuberkulose. So waren im Jahre 1876 in Deutschland 12% aller Todesfälle der Tuberkulose zuzuschreiben. Bevor diese dramatische Entwicklung einsetzte, erlebte die Tuberkulose, ganz anders als Pest, Cholera oder gar Syphilis, eine Phase, in der sie als romantische Krankheit verklärt wurde, die vor allem junges Leben beendet. Es waren die Genies, die Künstler und Bohemiens, die mit der Schwindsucht geschlagen waren und diejenigen, die darunter litten, fühlten sich als Auserwählte, Auserlesene, Schöpferische, als Ausnahmeerscheinungen (Tab. 3).

Berühmte Persönlichkeiten, die an Tuberkulose litten (ohne Komponisten)	
Aubrey Beardsley	Molière
Amades Modigliani	George Orwell
Katherine Mansfield	Paul Ehrlich
Karl Marx	Paul Langerhans
D.H. Lawrence	Heinrich Schliemann
Franz Kafka	Vivien Leigh

Tab. 3

John Middleton Murry, der Ehemann der Schriftstellerin **Katherine Mansfield**, beschreibt den Tuberkulose-Tod seiner Frau so:

„Ich habe niemals jemanden so schön gesehen wie sie an jenem Tag und werde niemals wieder jemanden sehen, der so schön ist; es war, als hätte die einzigartige Vollkommenheit, die ihr stets eigen war, vollständig Besitz von ihr ergriffen. Um ihre eigenen Worte zu benutzen: das letzte Körnchen Ablagerung, die letzten Spuren irdischer Erniedrigung waren für immer gewichen. Doch hatte sie ihr Leben verloren, um es zu retten“.

Und Philip Sandborn vermutet eine besondere Wirkung dieser Krankheit auf die kreative Phantasie. Das leichte Fieber beflügelt die Gedanken und versorgt die Imagi-

Komponisten, die an Tuberkulose verstarben		
Hans Leo Haßler	* 26.10.1564 † 08.06.1612	Nürnberg Frankfurt a.M.
Henry Purcell	* 1659 † 21.11.1695	London London
Carl P. E. Bach	* 08.03.1714 † 14.12.1788	Weimar Hamburg
Nicolai Paganini	* 27.10.1782 † 27.05.1840	Genua Genua
Carl Maria v. Weber	* 18.11.1786 † 05.06.1826	Eutin London
Frédéric Chopin	* 22.02.1810 † 17.10.1849	Zelasowa Wola (Polen) Paris
Karol Szymanowski	* 06.10.1882 † 29.03.1937	Tymoschowka (Ukraine) Lausanne

Tab. 4

nation mit träumerischen Bildern. Ein gesteigerter Lebenshunger, der im wirklichen Leben infolge der krankheitsbedingten Hinfälligkeit des Patienten nicht gestillt werden kann, befriedigt sich statt dessen in der Welt der Phantasie, und zwar mit Vorliebe in ihren erotischen Teilen.

Zum Ruf der romantischen Krankheit haben vor allem viele Dichter und einige Maler, die unter Tuberkulose litten, beigetragen, aber auch viele Komponisten (Tab. 4). Jeder von ihnen verdiente eine genauere Beschreibung seiner Lebensgeschichte und seiner Musik. Am berühmtesten ist wohl Frédéric Chopin, am wenigsten bekannt

Hans Leo Haßler, einer der bedeutendsten deutschen Musiker in der Zeit vor Johann Sebastian Bach.



Abb. 2: Hans Leo Haßler

Haßler (Abb. 2), geboren in Nürnberg, erhielt eine musikalische Ausbildung in Italien und trat dann im Jahre 1585 in die Dienste der Fugger in Augsburg. Dort komponiert er sein berühmtestes Werk, den Lustgarten, eine Sammlung von Liedern bzw. Melodien, von denen uns eine nach einem Text von J. Crüger (1653) und im Satz von J. S. Bach besonders bekannt geworden ist („Wie soll ich dich empfangen ...“).

Auf einer Hofreise zur Wahl des Kaisers Matthias in Frankfurt a.M., wohin er den Kurfürsten von Sachsen begleitete, verstarb Leo Haßler im Jahre 1612 an Tuberkulose.

Sepsis

Wenn der menschliche Organismus durch Bakterien im Übermaß befallen wird, soweit, dass sich die Keime im Blut vermehren und hier ihre Toxine freisetzen, so sprechen wir von einer Blutvergiftung oder Sepsis. Die Sepsis ist ein Krankheitsbild, welches sich bei allen Berufszweigen findet. Sie wird oft durch eine lokale Verletzung mit nachfolgender Infektion, die in eine Bakteriämie übergeht, ausgelöst.

In Folge einer Sepsis sind über die Jahrhunderte zahlreiche bedeutende Persönlichkeiten verschieden (Tab. 5).

Berühmte Persönlichkeiten, die an bakterieller Sepsis verstarben (ohne Komponisten)		
Lucrezia Borgia (Renaissance-Fürstin)	* 18.04.1480 † 24.06.1519	Rom Ferrara
Ignaz Semmelweis (Gynäkologe)	* 01.07.1818 † 13.08.1865	Ofen (Buda, Budapest) Döbling (Wien)
Eduard Manet (Maler)	* 23.01.1832 † 30.04.1883	Paris Paris
Albert Neisser (Dermatologe)	* 22.01.1855 † 30.07.1916	Schweidnitz Wroclaw (Breslau)
Heinrich Hertz (Physiker)	* 22.02.1857 † 01.01.1894	Hamburg Bonn
Rainer Maria Rilke (Dichter)	* 04.12.1875 † 29.12.1926	Prag Val-Mont (Montreux)
Willa Cather (Schriftstellerin)	* 07.12.1876 † 24.04.1947	Winchester (Va) New York (NY)

Tab. 5

Komponisten, die an bakterieller Sepsis verstarben		
Jean Baptiste Lully	* 28.11.1632 † 22.03.1687	Florenz Paris
Gioacchino Rossini	* 29.02.1792 † 13.11.1868	Pesaro (Italien) Paris
Georges Bizet	* 25.10.1838 † 03.06.1875	Paris Bougival (Paris)
Gustav Mahler	* 07.07.1860 † 18.05.1911	Kalisch (Kališć) Wien
Alexander Skrjabin	* 25.12.1871 † 27.04.1915	Moskau Moskau
Ottorino Respighi	* 09.07.1879 † 18.04.1936	Bologna Rom
Alban Berg	* 09.02.1885 † 24.12.1935	Wien Wien

Tab. 6

So starben an einer Sepsis **Lucrezia Borgia** nach der Geburt eines Kindes, **Ignaz Semmelweis**, der Vater der aseptischen Wundversorgung, ironischerweise nach einer Fingerverletzung, **Eduard Manet** in Folge einer Beinamputation, **Albert Neisser**, der Entdecker des „Gonococcus“ nach der Entfernung eines Nierensteins, **Heinrich Hertz**, der Entdecker der Radiowellen, an einem Zahnabszess, **Rainer Maria Rilke** durch einen Stich mit einem Rosendorn und schließlich die Schriftstellerin **Willa Cather** in Folge eines Stiches mit einer Hutnadel.

Auch zahlreiche bedeutende Komponisten sind an einer bakteriellen Sepsis gestorben (Tab. 6).

Jean Baptiste Lully



Abb. 3: Jean Baptiste Lully

Die Geschichte des Todes des bedeutenden italienisch-französischen Komponisten und Dirigenten **Jean Baptiste Lully** (Abb. 3) ist schnell erzählt. Im Jahre 1687 verletzte sich Lully bei der Auf-führung des Tedeums anlässlich der Genesung des französischen Königs Ludwig XIV beim Taktstampfen vor lauter Eifer mit einem schweren Taktstab am Fuß. Es bildete sich nach kurzer Zeit ein eitriges Geschwür, die Entzün-dung verschlimmerte sich rasch und führte zu einer Gangrän, schließlich zu einer septischen Intoxikation und im selben Jahr zum Tode des Meisters.

Gioacchino Rossini

Mehr als 100 Jahre nach dem Tode Lullys wird einer der größten Opernkomponisten aller Zeiten in der Nähe von Florenz geboren, **Gioacchino Rossini** (Abb. 4). Rossini ist uns heute vor allem durch seine Oper „Der Barbier von Sevilla“ bekannt.

Die Lebensgeschichte dieses großen Tonkünstlers, die ich heute nur kurz streifen kann, ist von einer chro-nischen Gonorrhöe geprägt, die er sich bereits als 15-Jähriger zugezogen hat. Diese schleichende Erkran-kung quälte ihn bis in seine letzten Tage und bestimmt das Leben dieses geistvollen, feinsinnigen und gefühl-vollen Künstlers. Im Alter von 25 Jahren komponiert er den „Barbier von Sevilla“. Mit 39 Jahren beendet er seine kompositorische Tätigkeit – sein schöpferisches Genie war versiegt. Rossini siedelt nach Paris um, wo



Abb. 4: Gioacchino Rossini

ihm größte Anerkennung und Verehrung entgegengebracht wird. Mit 70 Jahren komponiert er dann ein Alterswerk, die „Pechés de veilles“, seine Sünden des Alters.

Im Winter 1867/68 leidet Rossini an asthmatischen Beschwerden und im Oktober 1867 wird ein Darmabszess diagnostiziert. Bei dem Versuch einer operativen Entfernung stellt man fest, dass Rossini von einem derart ausgedehnten Mastdarmkrebs befallen ist, dass sich ein weiterer chirurgischer Eingriff erübrigt. Allerdings wird die Operationswunde zum Ausgangspunkt für ein auf das Kreuzbein und die Hüfte übergehende schwere bakterielle Entzündung und Rossini leidet unter schwersten septischen Fieberepisoden. Den nahen Tod vor Augen, weigert er sich als überzeugter Freigeist bis fast zuletzt, dem herbeigerufenen päpstlichen Nuntius Chigi die Beichte abzulegen und die Sterbesakramente zu empfangen. Am 13. November 1868 stirbt Rossini in Folge einer schweren Sepsis. Gustave Doré zeichnet ihn auf dem Totenbett. Die Beisetzung gestaltet sich zu einem Großereignis, bei dem halb Paris auf den Beinen ist. Die musikalische Leitung der Trauerfeierlichkeiten oblagen übrigens **Esprit Aubert**, der mit der Brüsseler Aufführung seiner Oper „La Muette de Portici“ („Die Stumme von Portici“) im Jahre 1830 das Zeichen zum Aufstand und zur Trennung Belgien und Hollands, d.h. zur Unabhängigkeit Belgiens, gegeben hatte.

Georges Bizet

Doch zurück nach Frankreich und Paris. Hier brach im Jahre 1875 über die Kunstszene mit Urgewalt eine Oper herein, deren Musik und Geschichte einen totalen Bruch mit der herkömmlichen Oper bzw. der opera comique darstellte. Es geht dabei um die Oper „Carmen“, die bis heute weltweit am häufigsten aufgeführte Oper, wenn nicht gar das am häufigsten gespielte Musikwerk überhaupt. Der geniale Komponist dieser Oper heißt **Georges Bizet** (Abb. 5).



Abb. 5: Georges Bizet

llich geplagt, obwohl er bis zur Erschöpfung kompositorisch arbeitet, d.h. 15-16 Stunden am Tag, vor allem, um Geld zu verdienen. Es entstehen seine großen Werke wie „La jolie fille de Perth“, „Les pecheurs des perles“ und „Djamileh“.

Georges Bizet wurde am 25. Oktober 1838 in Paris geboren. Seine musikalische Begabung wurde früh erkannt und nach Aufnahme an das Pariser Conservatoire gewann er 1857, also 19-jährig, den begehrten Rom-Preis. Schon mit dieser Reise nach Rom beginnt auch die Krankheitsgeschichte Bizets, der drei Monate nach Ankunft in Rom an einer mit hohem Fieber einhergehenden Angina erkrankt. Im Juni klagt er über rheumatische Beschwerden, die wir im Rückblick als eng mit seinen fieberigen Halsentzündungen verbunden sehen. Er ist durch fieberige Rückfälle (angines extrêmement compliqués) seines Halsleidens fürchterlich

Dann unterbricht jäh der französisch-deutsche Krieg 1870/71 seine Arbeiten. Es sind unruhige Zeiten in Frankreich, denn Napoleon III, Frankreichs Kaiser, ist durch seine militärischen Misserfolge in Mexiko umstritten und insgesamt erscheint die französische Staatsmacht geschwächt. An Stärke gewinnt zu dieser Zeit jedoch ein anderes europäisches Land, Preußen, mit der Hauptstadt Berlin. Durch einen geschickten Schachzug des Preußischen Kanzlers Otto von Bismarck gezwungen, erklärt Napoleon III Preußen am 19. Juli 1870 den Krieg. Die französische Armee wird am 2. September bei Sedan jedoch vernichtend geschlagen und der preußische Kaiser Wilhelm wird am 18. Juni 1871 in Versailles zum deutschen Kaiser gekrönt. Die Revolte der Pariser Sozialisten und Kommunisten gegen das Bürgertum, welches für die Niederlage verantwortlich gemacht wird, mündet in einer Bewegung, in die berühmte „Commune“. Diese führt in eine bürgerkriegsartige, schreckliche Situation mit vielen Toten.

Georges Bizet meldet sich freiwillig zum Dienst als Nationalgardist in Paris. Er ist aber noch mehr Pazifist als Nationalist und schreibt an einen Freund: „Heute gilt es das Land zu retten! Aber danach? Und unsere armen Philosophen und unser Traum vom universellen Frieden einer kosmopolitischen Brüderlichkeit, einer humanen Gesellschaft?... Und statt dessen Tränen, Blut, zerfetztes Fleisch, zahllose Verbrechen ohne Ende! Lieber Freund, ich kann Ihnen nicht erzählen, in welche Traurigkeit mich all das stürzt. Ich bin Franzose, daran erinnere ich mich, aber wie könnte ich vergessen, daß ich Mensch bin“.

Während der Schreckensherrschaft der Commune flieht er mit seiner Frau **Genevieve Halevey**, die er am 3. Juni 1869 geheiratet hat, nach Bordeaux. Nach Paris zurückgekehrt komponiert er 12 Klavierstücke zu 4 Händen, die Jeux d'enfants. Die Schönheit, Leichtigkeit, Fröhlichkeit, Melodik und musikalische Originalität dieser Werke ist unvergleichlich. Die „Jeux d'enfants“ schreibt er wohl in Vorfreude auf seinen Sohn Jacques, der am 10. Juli 1872 geboren werden sollte.

Anfang 1873 beginnt Bizet mit der Arbeit an der Oper Carmen. Ende 1874 vollendet er die Oper, nachdem er wieder unter einer schweren Mandelentzündung zu leiden hat. Die Oper provoziert das Publikum bei der Uraufführung des Werkes in Paris am 3. März 1875. Die Heldin Carmen – durch und durch unmoralisch, der Held – dem sozialen Untergang preisgegeben, eine Geschichte ohne happy end, ohne Moral.

Die Uraufführung kann Bizet nicht miterleben, denn es hat sich unter Bizets linkem Ohr ein Abszess gebildet und die Gelenksbeschwerden flackern wieder auf. Am 27. Mai 1875 fährt Bizet mit seiner Frau nach Bougival, in die Nähe von Paris, wo die Familie ein kleines Häuschen besaß – eine Reise in den Tod. In Bougival angekommen, fühlt sich Bizet, durch die Landluft beflügelt, besser und lässt sich während eines Spazierganges – es war ein heißer Sommer – zu einem Bad in der Seine verleiten. In der folgenden Nacht wird er mit hohem Fieber bestraft und seine Gelenke schmerzen derart, dass er sich nicht mehr bewegen kann. Am Abend des 30. Mai erleidet Bizet einen schweren Herzanfall und am 3. Juni 1875 um drei Uhr morgens stirbt Georges Bizet an einer schweren Sepsis. Carmen ist inzwischen über dreißigmal aufgeführt und der Welterfolg dieser Schöpfung ist schon vorauszuahnen.

Alexander Skrjabin

Alexander Skrjabin (Abb. 6) wurde am 25. Dezember 1871 – also am Weihnachtstag – geboren. Er starb um die Osterzeit, im April 1915, und viele sehen deswegen eine Parallele des Menschen Skrjabin zu einem göttlichen Wesen, einem Messias, so wie er sich später selbst betrachtet hat. Skrjabin war fasziniert von Chopin und dieser wird zunächst zu seinem harmonischen und kompositorischen Vorbild. Er komponiert besessen und, ähnlich wie Chopin, vor allem für Klavier.



Abb. 6: Alexander Skrjabin

Die Möglichkeiten dieses Instruments reichen ihm aber in den Jahren um die Jahrhundertwende nicht mehr aus, und es drängt ihn zum Orchester. In den Jahren 1903–1904 komponiert er seine fünfte Symphonie, eher bekannt als „Prometheus“. Skrjabin erhebt sich mit dieser Symphonie zu einem der größten Neuerer und Visionär der Musik nach der Jahrhundertwende und durchbricht im Prometheus nicht nur das traditionelle Dur-Moll-Prinzip, sondern er gibt auch das herkömmliche System terzgeschichteter Akkorde auf. Statt dessen gründet er seine Musik auf einen sechstönigen Akkord, der nur aus Quarten besteht und aus denen die gesamte Prometheus-Komposition entwickelt wird. Die Quarten-Schichtung ist revolutionär neu. Dieses Klangsystem – entweder als Akkord oder als melodische Linie gespielt – wird als überirdisch, als göttlich empfunden und deshalb auch als der mystische Akkord bezeichnet. Der Prometheus-Titel hat natürlich einen tiefen besonderen Sinn. Prometheus symbolisiert, wie Nietzsche es ausdrückt, dass der Mensch „frei über das Feuer waltet und es nicht als Geschenk vom Himmel empfängt“. Es ist also der Mensch, der Schöpferisches zu leisten vermag und in seinen Tagebüchern schreibt Skrjabin: „Die Welt ist das Produkt meiner schöpferischen Tätigkeit ...“ Wenig später notiert Skrjabin: „Ich bin Gott“.

Skrjabins Idee von der Überwindung der menschlichen Abhängigkeit von Gott und der Loslösung von Gott wurde von den revolutionären Kommunisten freudig aufgenommen, und Prometheus steht im Mittelpunkt eines Festkonzertes, welches anlässlich des ersten Jahrestages der Oktoberrevolution am 6. November 1918 in Moskau stattfindet.

In der ersten Zeile der Prometheus-Partitur ist eine Stimme für Licht (Luce) aufgezeichnet. Skrjabin verbindet also Tonalität mit Lichteffekten, Farbklangen, eine Idee, die vielleicht erst heute in Diskotheken volle Entwicklung gefunden hat. Letztlich schwebt Skrjabin vor, Musik nicht nur mit Farben zu vereinen, sondern auch mit Tanzbewegungen, Geschmack, Gerüchen, Gefühl und Berührung zu einem übermenschlichen, göttlichen Kunstwerk – das er „Mysterium“ nennt. Den gewaltigen Akt der Schaffung dieses Gesamtkunstwerks kann natürlich nur ein gottgleiches Individuum leisten – eben Skrjabin.

Skrjabin muss aber zunehmend einsehen, dass er zu seinem Überwerke nur Entwürfe vorlegen kann, denn es geht ihm gesundheitlich nicht gut. Von Natur aus hypochondrisch veranlagt, hat er stets Angst vor Infektionen. Einer seiner Biographen zeichnet folgendes Bild: „Er wusch unentwegt seine Hände, oft nur deshalb, weil er jemandem die Hand gegeben hatte. Selbst im Inneren von Häusern trug er Handschuhe. Er fürchtete Bakterien, ansteckende Bazillen, alles.“ Am 21. März 1914 schreibt Skrjabin seiner Frau **Tatjana Schloetzer** aus London: „Auf diesen Brief ist Geld gefallen. Halte das Papier an den Enden! Die vierte Seite ist am meisten infiziert ...“.

Anfang April 1915 leidet Skrjabin an einem Abszess rechts an der Oberlippe. Er fiebert, gibt aber am 2. April noch einen Klavierabend in Moskau – seinen letzten. Skrjabin ist bettlägerig, seine Familie ist mit ihm, und die Moskauer Spezialisten wagen einen Einschnitt in die Lippe, der aber nicht mehr hilft: Skrjabins Blut ist schon vergiftet und am 27. April 1915 stirbt er mit 44 Jahren an einer bakteriellen Sepsis.

Alban Berg

Als Skrjabin 1915 stirbt, arbeitet in Wien ein Komponist an einer Oper, die er „Wozzeck“ nennt, die ein Schlüsselwerk für die neue Musik darstellt und die auf Georg Büchners Dramenfragment „Woyzeck“ beruht, welches die Geschichte eines gepeinigten Menschen wiedergibt – gemeint ist der große Komponist **Alban Berg** (Abb. 7).

Alban Berg wurde am 9. Februar im Jahre 1885 als Sohn eines Buchhändlers in Wien geboren. Er wächst in einer großbürgerlichen Familie mit vielen kulturellen Anregungen auf. Seine Begeisterung gilt der Musik, und im Jahre 1904 beginnt er bei Arnold Schönberg ein Studium der Harmonielehre, des Kontrapunkts und der Komposition.

Die Komponisten der zweiten Wiener Schule, also Mahler, Schönberg, von Webern und vor allem Alban Berg stehen ganz im Zeichen der strengen Konstruktion, des Durchdenkens und Durcharbeitens eines Werkes. Diese Schule sah in Komponisten wie Bach, Beethoven und Brahms das höchste kompositorische Niveau. Berg kam es auf das Durchorganisieren des kompositorischen Materials an, und in diesem Sinne ist er ganz Klassiker. Diese Form hält Berg auch bei seinem Opus 1 durch, einer Klaviersonate in h-moll. Dieses Opus 1 entstand zwischen 1907 und 1908. Bei aller Formtreue verändert und erneuert Berg aber auch, indem er als Erster Motive einführt, die schon bei ihrem ersten Auftreten für den weiteren Verlauf des Werkes bestimmend wirken.



Abb. 7: Alban Berg

Zeit seines Lebens litt Alban Berg unter einer angegriffenen Gesundheit. Am 23. Juli 1900, also 15-jährig, ereilte ihn ein erster schwerer Asthmaanfall. Berg neigte zu Entzündungen und schreibt später an seine Frau Helene: „Das geringste Wimmerl wird zum Abszess. Ich weiß mir wirklich keinen Rat und beginne über meine Gesundheit zu verzweifeln.“ Aber er trägt sein Schicksal auch mit Galgenhumor und schreibt an anderer Stelle: „Eben las ich, dass ein Asthmatiker nie zuckerkrank ist. Und da ich auch keinen Gebärmutterkrebs kriegen kann und man an Asthma nicht stirbt, so werde ich also uralt.“

Alban Berg wird durch seine 1925 in Berlin uraufgeführte Oper *Wozzek* bekannt und die Tantiemen bringen ihm so viel Geld und Unabhängigkeit ein, dass es ihm und seiner Frau Helene in den Jahren 1925 bis 1933 wirtschaftlich recht gut geht. Mit der Machtergreifung durch die Nazis jedoch ändert sich die Situation dramatisch und Bergs Musik wird als entartet eingestuft. Diese Diffamierungen leiten direkt das Katastrophenjahr 1935 ein.

Im August 1935, in den Tagen der Fertigstellung seines Violinkonzerts – seinem letzten Werk, ähnlich wie das Requiem bei Mozart – bekommt Berg einen Insektenstich auf den unteren Teil des Rückgrats, der sich schlimm entzündet. Es entwickelt sich ein Abszess, der zwar chirurgisch behandelt wird und auch scheinbar heilt. Möglicherweise sogar als Folge des Eingriffs erkrankt Berg erneut und diesmal schwer – er leidet unter einer Sepsis. Die tödliche Blutvergiftung nimmt unerbittlich ihren Lauf und am 24. Dezember 1935 verstirbt Alban Berg infolge eines septischen Multiorganversagens.

Gustav Mahler

Zu den lebendigen Vorbildern Alban Bergs in Wien gehört das Idol der damaligen gesamten musikalischen Jugend in Wien: **Gustav Mahler** (Abb. 8).



Abb. 8: Gustav Mahler

Gustav Mahler wurde am 7. Juli 1860 geboren, als eines von zwölf Kindern, von denen nur drei das Alter von 16 Jahren erreichten. Der Tod war also von Jugend an mit Mahler. Schon in jungen Jahren erntet er als Dirigent Ruhm und wird schließlich 1897 zum Chefdirigenten der Wiener Hofoper ernannt – eine Traumstelle. Ein kometenhafter Aufstieg als Dirigent, zunächst weniger als Komponist, ist ihm beschieden, und schnell wird er zu einer internationalen Berühmtheit. Stets ein Mittelpunkt des Wiener Gesellschaftslebens, lernt Mahler im Jahre 1901, 41-jährig, die um 20 Jahre jüngere, bildschöne und blühende Alma, Tochter des Landschaftsmalers Emil Jakob Schindler, kennen und heiratet sie am 9. März 1902 in Wien.

Die Ehe ist von Anfang an von Mahlers instabilem Gesundheitszustand überschattet. Auch die Urlaubsmonate sind problematisch. Mahler nutzt sie, um von früh bis spät Musik zu schreiben. 1905 komponiert er die Kindertotenlieder, nicht ahnend, dass zwei Jahre später seine geliebte ältere Tochter Maria Anna an Diphtherie sterben sollte. Alma Mahler sah in der Vertonung der Kindertotenlieder eine Herausforderung des Schicksals. Die Texte zu den Kindertotenliedern stammen von Friedrich Rückert (1788 – 1866). Dieser hatte in den Jahren 1833 und 1834 seine beiden geliebten Kinder Luise und Ernst infolge einer schweren Diphtherie verloren und beklagt diesen schrecklichen Tod mit 423 Gedichten, die erst 1872 publiziert wurden.

Nach dem schrecklichen Tod der 5-jährigen Tochter Maria Anna im Jahre 1907 klagt Alma Mahler über kardiologische Beschwerden. Ein Arzt wird gerufen, der aber nichts Besonderes feststellen kann und nur Ruhe verordnet. Mehr aus Koketterie denn wegen akuter Beschwerden bittet Mahler den Arzt, auch ihn zu untersuchen. Und dieser diagnostiziert eindeutig ein Herzleiden. Mahler trifft diese Diagnose wie ein Blitz, und im Grunde sollte er sich von dieser Nachricht nicht mehr erholen.

Im gleichen Jahr tritt Mahler nach nervenaufreibenden Auseinandersetzungen und Intrigen von seinem hohen Posten in Wien zurück und nimmt ein Engagement als Chefdirigent der Metropolitan Opera in New York an. Hier schreibt er weiter an seiner zehnten Symphonie, die er aber nie vollenden sollte. Am 20. Februar 1911 kommt es in New York zu einem schweren Fieberanfall mit Halsschmerzen und Belag, begleitet von einem Kreislaufkollaps. Mahlers Hausarzt, Dr. Fraenkel, stellt den Kontakt zu dem New Yorker Arzt Dr. Emanuel Lipman vom Mount Sinai Hospital her, der erstmals die richtige Diagnose einer Endocarditis lenta stellt, einer Entzündung der Herzklappen durch Streptokokken. Lipman teilt Mahler die Diagnose und hoffnungslose Prognose mit.

Letzte Hoffnung auf Heilung verspricht man sich von berühmten Pariser Bakteriologen wie dem Nobelpreisträger **Ilja Metchnikow** sowie **Fernand Widal**. So reist die Familie im April 1911 mit dem Schiff nach Europa, nach Paris, um Metchnikow und Widal zu konsultieren, welche aber wegen der Osterferien nicht erreichbar sind. Statt dessen konsultiert man einen am Pasteur-Institut tätigen Assistenzarzt, Dr. André Chantemesse, der eine Blutprobe nimmt. Alma Mahler schreibt über die Umstände dieser Untersuchung in ihren Memoiren: „Chantemesse, der berühmte Bakteriologe, machte nun eine Reinkultur mit Mahlers Blut – o Ärzte! Nach ein paar Tagen erschien er mit dem Mikroskop – strahlend. Sollte ein Wunder geschehen sein? Er stellte das Mikroskop auf dem Tisch ein: ‚Schauen Sie, Madame Mahler, so fabelhaft habe ich selber die Streptokokken noch nie entwickelt gesehen. Sehen Sie diese Schnüre – es sind Algen.‘ Er wollte erklären, glänzen! Aber ich konnte nichts hören. Fast bewusstlos vor Schmerzen verließ ich ihn“.

Mahler will in Wien sterben, wohin er im Orient-Express gebracht wird. Er leidet, hat starke Schmerzen, erhält schließlich Morphium und nach langem Todeskampf stirbt

Gustav Mahler 51-jährig am 18. Mai 1911 abends an einer schweren bakteriellen Sepsis. Er scheidet von dieser Welt während eines Gewitters, wie Beethoven 84 Jahre zuvor.

Arnold Schönberg hält im Jahre 1913 in Prag eine Gedenkrede auf Gustav Mahler, in deren Verlauf er auch auf die letzten Werke Mahlers zu sprechen kommt. So sagt er über Mahlers Zehnte Symphonie: „Was seine Zehnte sagen sollte, das werden wir so wenig erfahren wie bei Beethoven und Bruckner. Es scheint, die Neunte ist eine Grenze. Wer darüber hinaus will, muss fort. Es sieht aus, als ob uns in der Zehnten etwas gesagt werden könnte, was wir noch nicht wissen sollen, wofür wir noch nicht reif sind. Die eine Neunte geschrieben haben, standen dem Jenseits zu nahe. Vielleicht wären die Rätsel dieser Welt gelöst, wenn einer von denen, die sie wissen, die Zehnte schriebe. Und das soll wohl nicht so sein.“

Ottorino Respighi und Schlussbemerkungen

Im Rückblick kann festgehalten werden, dass in der Zeit der großen Seuchen wie der Pest bis zum Ende des 19. Jahrhunderts die Ärzte und Wissenschaftler keine Ahnung hatten von der Ätiopathogenese einer Infektion, geschweige denn davon, wie eine septische Erkrankung entsteht oder gar zu heilen ist.

Natürlich musste sich die klinische Wissenschaft und medizinisch-mikrobiologische Forschung erst entwickeln. Im 19. Jahrhundert war sie weit fortgeschritten, wurde aber nicht genügend popularisiert und unterstützt. Heute wird die Forschung zweifellos besser gefördert, aber sicher noch nicht in genügendem Maße. Dies könnte fatale Konsequenzen haben, denn die Infektionskrankheiten schicken sich an, zurückzukehren, wie wir in diesen Jahren lernen müssen. Neuartige Infektionskrankheiten tauchen auf und die Sepsis ist unverändert eine der häufigsten Todesursachen von Intensivpatienten. Mehr denn je bedürfen wir deshalb gleichermaßen tiefgehender wie breit gefächelter Infektionsforschung, um neue Strategien zur Prävention und Therapie zu entwickeln. Bedingt durch die Entwicklung von Resistenzen, schnelle Verbreitung von Erregern, durch Tourismus, dramatische Urbanisierung, Immunsuppression und andere Faktoren werden die Infektionskrankheiten mit Sicherheit in unsere Breiten zurückkehren. Dann müssen Grundlagenforscher und Mediziner gewappnet sein, denn eine solche Form der Hilflosigkeit von Ärzten und Wissenschaftlern gegenüber den Infektionskrankheiten wie zur Zeit der Pest, Cholera und Syphilis darf es nie wieder geben!

Es ist interessant festzustellen, dass mit dem Aufkommen der Antibiotika und dem vorläufigen Ende der Infektionskrankheiten die ernste Musik in eine kaum noch zugängliche verkünstelte Sackgasse geriet, wo noch entschieden werden konnte, ob ein Komponist ein Künstler oder ein Scharlatan war. Einer derjenigen, die schon in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts erkannten, dass sich die Musik zu einem toten Punkt hin entwickelte, war **Ottorino Respighi**, mit dem dieses Essay abgeschlossen werden soll (Abb. 9).

Ottorino Respighi wurde am 9. Juli 1879 in Bologna geboren. Im Dezember 1900 trat er ins Theaterorchester St. Petersburg ein, wo er Unterricht bei Rimski-Korsakov und Max Bruch nahm. Der grundlegende Charakter von Respighis Schaffen besteht in dem Versuch, ein Gleichgewicht zwischen Tradition und Fortschritt zu schaffen, ähnlich wie Alban Berg, aber fast immer tonal und auf ganz andere Weise. In seiner Bearbeitung des Bach'schen Chorals „Wachet auf, ruft uns die Stimme“ kommt seine meisterhafte Orchestrierungskunst und die glänzende Farbigkeit seiner Umarbeitungen besonders eindrucksvoll zur Geltung.



Abb. 9: Ottorino Respighi

In den Monaten des Jahres 1935 kreisen Respighis Gedanken um sein letztes Werk, eine Oper mit dem Titel „Lucrezia“ (nach Shakespeares „Der Raub der Lucrezia“). Er arbeitet fieberhaft und kämpft dabei gegen eine chronische, unerklärliche Müdigkeit. Diese steht wohl in Zusammenhang mit einer langsam fortschreitenden bakteriellen Infektion, die ihn gegen Ende des Jahres 1935 zunehmend quält und schwächt.

Im Januar 1936 wird schließlich die Diagnose Endocarditis lenta gestellt und man isoliert *Streptococcus viridans*-Bakterien aus seinem Blut. Die Frau Ottorino Respighis, Elsa, muss auf Anraten des Hausarztes ihren Mann belügen: sie erzählt ihm, dass er nur unter einer harmlosen *E. coli*-Infektion leide, die keine bedrohlichen Folgen habe. Im März schreibt Respighi die letzten Noten an seiner Oper Lucrezia. Doch die Todesstunde kommt unerbittlich näher. Man besorgt in den letzten Tagen Respighis noch Sulfonamide aus Berlin, denn Gerhard Domagk (1895–1964) hatte gerade die Entdeckung des „Prontosils“ veröffentlicht. Aber die Therapie schlägt nicht mehr an, vor allem wohl, weil die Sepsis schon weit vorangeschritten ist.

Am 18. April 1936 um 6 Uhr früh stirbt Respighi und mit ihm einer der Großen der Musik im septischen Schock. Es regnet, stürmt, donnert und blitzt in den Minuten seines Todeskampfes, wie bei Beethoven und Mahler. Aber als Respighi die Augen geschlossen hat, ist das schwere Gewitter vorüber und es singt eine Nachtigall.

Prof. Dr. rer. nat. E. Th. Rietschel

Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunchemie und Biochemische
Mikrobiologie
Parkallee 22
23845 Borstel

Stammcharakteristik *E. coli* Stamm Nissle 1917

(Stand: März 2001)

Herkunft:

Der *E.-coli*-Stamm Nissle 1917 wurde während des ersten Weltkriegs im Jahr 1917 durch den Freiburger Hygieniker und Bakteriologen A. Nissle aus den Fäzes eines Teilnehmers am Balkanfeldzug isoliert, der in der damals stark mit Durchfallerregern verseuchten Dobrudscha im Gegensatz zu allen seinen Kameraden vollkommen darmgesund blieb.

Stammtypisierung und biologische Eigenschaften:

Der *E.-coli*-Stamm Nissle 1917 (synonym *E. coli* DSM 6601)

- ist vom WHO-Referenzzentrum für *Escherichia coli* in Kopenhagen serologisch vollständig typisiert als Serovar O6:K5:H1.
- ist biochemisch charakterisiert aufgrund seiner stammtypischen Stoffwechselleistungen ("Bunte Reihe" z.B. Biotest GNI-ID-System bzw. BioMérieux Api20E-System).
- zeigt nach Züchtung unter standardisierten Bedingungen in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Plattengelelektrophorese ein stammspezifisches Zellproteinmuster.
- ist elektrophoretisch differenzierbar anhand seines Outer-Membrane-Protein (OMP)- und seines Lipopolysaccharid (LPS)-Profils sowie seines Alleloenzym-musters.
- ist molekulargenetisch charakterisiert durch sein stammtypisches DNA-Bandenmuster in der Pulsfeldgelelektrophorese nach Makrorestriktion seiner chromosomalen DNA mit selten schneidenden Restriktionsendonukleasen. Der Stamm ist spezifisch nachweisbar mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Verwendung stammcharakteristischer DNA-Primer-Paare.
- besitzt drei verschiedene Fimbrientypen (F1A-, F1C- und „Curli“-Fimbrien), die ein Haften am Darmepithel bzw. an der dem Darmepithel lumenseitig aufgelagerten Mucusschicht ermöglichen.
- ist auf antagonistische Aktivität in vitro und in vivo geprüft
 - a) durch Co-Kultivierung mit
 - enteropathogenen, uropathogenen – *Shigella dysenteriae*
 - und anderen *E.-coli*-Stämmen – *Yersinia enterocolitica*
 - *Proteus vulgaris* – *Vibrio cholerae*
 - *Salmonella enteritidis* – *Candida albicans*

- b) durch Diassoziationsversuche mit pathogenen Keimen (pathogene *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*) an gnotobiotischen Tieren (Ratten, Ferkel)
- c) durch Kolonisierung von Neugeborenen, wobei die Ansiedlung von unerwünschten Hospitalkeimen drastisch reduziert wird.
- bildet keimhemmende bzw. -abtötende Mikroazine, gegen die er selbst unempfindlich ist, darunter ein in der Literatur bisher nicht beschriebenes Mikrozin. Die DNA-Sequenzen der Mikrozingene wurden ermittelt.
- hemmt das Eindringen von Salmonellen und anderen invasiven Enterobakterien (Shigellen, Listerien, Yersinien, enteroinvasive *E. coli*) in humane Epithelzellen in der Zellkultur.
- besitzt zwei kleine kryptische Plasmide (Molekülmasse ca. 2,1 bzw. ca. 3,7 Megadalton), die genetisch stabil sind und nicht auf andere *E.-coli*-Stämme transferiert werden. Die DNA-Sequenzen der beiden stammtypischen Plasmide sind aufgeklärt.
- besitzt Geißeln (Serotyp H1) und ist dadurch gut beweglich. Die Begeißelung befähigt den Keim, sich im zähflüssigen Darmschleim in Richtung Darmwand (Sauerstoffquelle als chemotaktischer Reiz) zu bewegen. Gleichzeitig erlaubt seine Beweglichkeit, entgegen der durch die Darmperistaltik vorgegebenen Transportrichtung zu agieren.
- produziert mehrere für die Eisenaufnahme wichtige Siderophore: Aerobaktin, Enterobaktin, Colibaktin und Yersiniabaktin sowie ein Hämin- und ein Citrat-abhängiges Eisenakquisitionssystem.
- produziert kurzkettige Karbonsäuren; in der Hauptsache Formiat und Acetat, daneben Propionat und Butyrat.
- ist ein potenter Immunmodulator und zeigt
 - a) spezifische Wirkungen

Ausgetragene Neugeborene und Frühgeborene zeigen nach gezielter Kolonisierung mit dem *E.-coli*-Stamm Nissle 1917 eine signifikante Erhöhung der IgA- und IgM-Spiegel im Stuhlfiltrat und im Blutserum. Aus Einzeluntersuchungen ergeben sich Hinweise für eine Erhöhung von IgA auch im Speichel. Der IgG-Spiegel wird demgegenüber nicht verändert.
 - b) unspezifische Wirkungen

In-vitro-Versuche ergaben eine signifikante Steigerung der sekretorischen Leistungen von Mausmakrophagen nach Stimulierung mit *E. coli* Stamm Nissle 1917. Die Lyse von Tumorzellen sowie Leishmanien wurde durch mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 stimulierte Makrophagen gefördert. Die Phagozytoserate der Makrophagen wurde nur geringfügig erhöht.

- Bei Mäusen hemmte die orale Verabreichung von *E. coli* Stamm Nissle 1917 dosisabhängig das Angehen von i.v. gesetzten *Candida-albicans*- und *Listeria-monocytogenes*-Infektionen.
- enthält mit 35 ng Lipopolysaccharid (LPS) pro 10^6 Zellen die für die Art *Escherichia coli* übliche Menge an Endotoxin. Die molekulare Struktur des LPS aus dem *E.-coli*-Stamm Nissle 1917 ist vollständig aufgeklärt und unterscheidet sich strukturell von allen bisher beschriebenen Lipopolysacchariden aus *E. coli*. So enthält die O6-Seitenkette nur eine Repeating Unit, die regelmäßig in der Kette vorliegt, und die Core-Region zeigt bisher unbekannte Modifizierungen. Diese Besonderheiten des LPS aus *E. coli* Nissle 1917 verleihen dem Stamm immunmodulierende Eigenschaften, ohne dass er immun-toxisch wirkt.
- ist ein guter Kolonisierer sowohl im Tiermodell (gnotobiotische Ratten und Ferkel, SPF-Mäuse (SPF-specific pathogen free) und SPF-Ferkel) als auch beim Menschen.

Sicherheitsrelevante Eigenschaften:

Der *E.-coli*-Stamm Nissle 1917

- ist in verschiedenen Testsystemen auf Toxinproduktion überprüft.
Er bildet keine
 - hitzelabilen Enterotoxine (H-LT),
 - hitzestabilen Enterotoxine (H-ST),
 - Zytotoxine (Cytotoxic necrotizing factor, CNF 1),
 - Shiga-like Toxine (SLT I, SLT II)
 und verfügt auch nicht über das bei pathogenen *E. coli* für die Sezernierung dieser Toxine zuständige Typ-III-Transportsystem.
- ist in vitro wie in vivo auf Invasivität getestet. Der Stamm ist nicht invasiv.
- bildet im Gegensatz zu einigen pathogenen *E.-coli*-Biovars keine Hämolsine.
- weist keine bei Sepsis- und Meningitis-Erregern häufig vorkommende Serumresistenz auf (getestet mit Human-, Rinder- und Schweineserum).
- zeigt keine Mannose-resistente Hämagglutination und bildet keine CFA I/II-Fimbrien, die eng mit der Darmpathogenität von bestimmten *E.-coli*-Stämmen assoziiert sind.
- exprimiert keine P-, M- oder S-Fimbrien, die eng mit der Virulenz bestimmter extraintestinal pathogener *E.-coli*-Stämme assoziiert sind und besitzt keine Genloci für diese Adhärenzfaktoren.
- weist keines der für harnwegspathogene *E.-coli*-Stämme typischen Uropathogenitätsmerkmale auf.
- gehört nach seinem DNA-Profil zu einem nicht uropathogenen O6:K5-Klon.

- ist nicht resistent gegenüber gängigen, gegen Gram-negative Enterobakterien wirksame Antibiotika.
- besitzt keine großmolekularen Plasmide, von denen bekannt ist, dass sie Gene für Pathogenitätsfaktoren und Antibiotikaresistenzfaktoren tragen können.
- ist ein schlechter Rezipient für Fremd-DNA in Form von Antibiotikaresistenz-Plasmiden und anderen Plasmiden.
- ist durch die Tox-Phagen enterohämorrhagischer *E.-coli*-Stämme (EHEC) nicht transformierbar. Die phagenkodierte genetische Information zur Produktion der EHEC-typischen Shiga-like-Toxine wird nicht aufgenommen.
- ist genetisch stabil sowohl in vitro nach 100maliger sequentieller Züchtung als auch in vivo nach Implantation in den Säuglingsdarm (nachgewiesen durch vergleichende Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA des Originalstamms mit der von Re-Isolaten mittels Pulsfeldgelelektrophorese).
- zeigt in Standardverfahren zur Feststellung der akuten Toxizität bei Ratten und Mäusen keine toxischen Effekte bei oraler Verabreichung von bis zu 50 ml/kg Körpergewicht einer Suspension mit 2×10^{11} KBE/ml. Eine LD₅₀ konnte daher nicht festgelegt werden.

Aufbewahrung:

Die Stammkultur von *E. coli* Nissle 1917 wird in gefriergetrockneter Form in Ampullen bei -80°C aufbewahrt. Die Art der Aufbewahrung garantiert die Stabilität und Unveränderlichkeit der Stammkultur.

Adressen der Vorsitzenden und Referenten

Prof. Dr. med. Ingo B. Autenrieth

Eberhard-Karls-Universität
Universitätsklinikum Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Elfriede-Aulhorn-Str. 6
72076 Tübingen

Dr. rer. nat. Gabriele Blum-Oehler

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Prof. Dr. med. Jochen Bockemühl

Hygiene-Institut Hamburg
Marckmannstr. 129 a
20539 Hamburg

Prof. Dr. med. Hans Bosseckert

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Klinik für Innere Medizin I
Erlanger Allee 101
07740 Jena

Prof. Dr. med. Jörg Emmrich

Universität Rostock
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Abt. für Gastroenterologie
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Prof. MUDr. P. Frič DrSc

2. Medizinische Abteilung
des Zentralen Militärkrankenhauses und
Institut für medizinische Fortbildung
U Vojenské nemocnice 1200
16902 Praha 6
Tschechische Republik

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulf B. Göbel

Humboldt-Universität Berlin
Universitätsklinikum Charité
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Dorotheenstr. 96
10117 Berlin

Priv.-Doz. Dr. med. Karl Josef Goerg

Zentrum für Innere Medizin
Kliniken St. Antonius/ Marienheim
Hardtstr. 46
42107 Wuppertal

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Hacker

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Prof. Dr. med. Eckhard G. Hahn

Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
Medizinische Klinik I mit Poliklinik
Krankenhausstr. 12
91054 Erlangen

Prof. Dr. med. Helmut Hahn

Freie Universität Berlin
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Institut für Infektionsmedizin
Hindenburgdamm 27
12203 Berlin

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Bakteriologie
Pettenkoferstraße 9a
80336 München

Prof. Dr. med. habil. Jobst Henker

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
Technische Universität Dresden
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Fetscherstr. 74
01307 Dresden

Prof. Dr. med. Manfred Kist

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Hygiene
Hermann-Herder-Str. 11
79104 Freiburg

Prof. Dr. med. Wolfgang Kruis

Evangelisches Krankenhaus Kalk gGmbH
Akademisches Lehrkrankenhaus
für die Universität zu Köln
Innere Abteilung
Buchforststr. 2
51103 Köln

Prof. Dr. med. Herbert Lochs

Universitätsklinikum Charité
Medizinische Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin
Medizinische Klinik und Poliklinik
mit Schwerpunkt Gastroenterologie,
Hepatology und Endokrinologie
Schumannstr. 20/21
10117 Berlin

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dieter Loew

Vorsitzender der Alfred-Nissle-Gesellschaft
Brüninghausstraße 16
58089 Hagen

Prof. Dr. med. Walter Londong

Krankenhaus am Urban
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Freien Universität Berlin
II. Innere Abteilung (Gastroenterologie)
Dieffenbachstr. 1
10967 Berlin

Prof. Dr. med. Stephan Müller-Lissner

Park-Klinik Weißensee
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Charité
Abteilung für Innere Medizin
Schönstr. 80
13086 Berlin

Dr. rer. nat. Tobias A. Ölschläger

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Röntgenring 11
97070 Würzburg

Prof. Dr. rer. nat. E. Th. Rietschel

Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunchemie und Biochemische
Mikrobiologie
Parkallee 22
23845 Borstel

Prof. Dr. rer. nat. M. Alexander Schmidt

Zentrum für Molekularbiologie der
Entzündung (ZMBE)
Institut für Infektiologie
Westfälische Wilhelms-Universität
Von-Esmarch-Str. 56
48149 Münster

Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Klinikum der Universität Regensburg
93042 Regensburg

Prof. Dr. med. Stefan Schreiber

Klinikum der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
Klinik für Allgemeine Innere Medizin
I. Medizinische Klinik
Schittenhelmstr. 12
24105 Kiel

Prof. Dr. med. Eduard F. Stange

Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart
Klinik für Innere Medizin I
Auerbachstr. 110
70376 Stuttgart

Prof. Dr. med. Eberhard Straube

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Sammelweisstr. 4
07740 Jena

Prof. Dr. rer. nat. Helmut Tschäpe

Robert Koch-Institut
Burgstr. 37
38855 Wernigerode

Dr. rer. nat. Guido Werner

Robert Koch-Institut
Burgstr. 37
38843 Wernigerode

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Wiedemann

Rheinische Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Immunologie
Pharmazeutische Mikrobiologie
Meckenheimer Allee 168
53115 Bonn

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ulrich Zähringer

Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunchemie und Biochemische
Mikrobiologie
Parkallee 22
23845 Borstel

Prof. Dr. med. Martin Zeitz

Freie Universität Berlin
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Medizinische Klinik und Poliklinik
Medizinische Klinik I (Gastroenterologie,
Infektiologie, Rheumatologie)
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin