Aus der Klinik für Innere Medizin IV mit Schwerpunkt
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

D I S S E R T A T I O N

Virulenzfaktoren von E.coli aus gewaschenen Kolonbiopsien von Patienten mit kolorektalen Neoplasien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Andrej Gudzuhn

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Herbert Lochs
2. Prof. Dr. Monika Krüger
3. Prof. Dr. Gerold Stanek

eingereicht am 28.Januar 2001

Datum der Promotion: 17. März 2003

Abstract

Background: Pathogenesis of non-hereditary colorectal neoplasia is poorly understood. The differences in regional incidence indicate an influence of environmental factors, as socio-economic conditions, nutrition and intestinal flora. An intracellular flora with a predominance of Escherichia coli in colon biopsies has been described in these patients.
Methods: We studied virulence factors of Escherichia coli isolated from washed colonoscopic biopsies of 43 patients with colorectal carcinoma and adenoma. 100 strains of E.coli were isolated and used for detection of a broad range of virulence genes by PCR encoding: s-fimbriae (sfa), pyelonephritis-associated pili (pap), hemolysin A (hlyA), heatstable and heatlable toxins (ST, LT, EAST), verotoxin (stx), invasionplasmidantigen (ipaH), intimin (eae), cytolethal distending toxin (cdt) and cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1). E.coli from biopsies of 55 patients with inflammatory bowel disease (IBD) and non-specific colitis, of 16 patients with irritable bowel syndrom (IBS) and from stool samples of 29 healthy individuals were isolated and examined as controls.
Results: The prevalence of virulent strains bearing at least one of the tested genes was 69% in colorectal carcinoma and 58% in colorectal adenoma, but only 25 to 39% of IBD and IBS patients and healthy individuals ($p < 0.05$). However, a typical pattern of virulence genes could not be found. Strains from 63% of carcinoma and 50% of adenoma patients were tested positive for adherence factors (pap or sfa), but only from 27% of IBD and IBS patients and 24% of healthy individuals. Cdt was found in 14% of neoplasia patients, but not in IBS or healthy persons. Hemolysin A and cnf1 being detected in 26 and 16% of neoplasia were more prevalent than in the control groups, but the difference did not reach statistical significance. ST, LT or eae were found rarely or not at all.
Conclusions: Colonic mucosa of 60% of patients with colorectal neoplasia is colonised by virulent E.coli. Virulent E.coli are significantly more prevalent in neoplasia than in patients with IBS, IBD and in healthy individuals. However these strains do not share a single pattern of known pathogenetic factors.

Keywords:
colorectal neoplasia, intestinal flora, E.coli virulence factors, polymerase chain reaction

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Pathogenese nicht-familiärer kolorektaler Neoplasien ist heute noch nicht bekannt. Die Besonderheiten der Epidemiologie der Erkrankung sprechen für die Beteiligung von Umweltfaktoren, wie sozioökonomischer Faktoren, der Ernährung oder der bakteriellen Flora des Darmes. Eine intrazelluläre, von E.coli dominierte Flora wurde in Kolonbiopsien dieser Patienten beschrieben.
Methoden: Es wurden Virulenzfaktoren von Escherichia coli untersucht, die aus gewaschenen koloskopischen Biopsien von 43 Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen isoliert worden waren. 100 Stämme wurden mittels PCR auf Gene für folgende Virulenzfaktoren untersucht: s-Fimbrien (sfa), pyelonephritis-assoziierter Pilus (pap), Hämolysin A (hlyA), hitzestabiles und -labiles Toxin (ST, LT, EAST), Intimin (eae), Verotoxin (stx), Invasionsplasmid (ipa), cytolethal distending toxin (cdt) und cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1). Für die Kontrollgruppe wurden E.coli aus Biopsien von 55 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und unspezifischer Kolitis, von 16 Patienten mit Colon irritabile (IBS) und aus Stuhlproben von 29 gesunden Probanden isoliert und untersucht.
Ergebnisse: Bei 69% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen und bei 58% der Patienten mit kolorektalen Adenomen wurde mindestens einer der Virulenzfaktoren gefunden, dagegen nur bei 25 bis 39% der IBS- und CED- Patienten sowie der gesunden Probanden ($p < 0,05$). Ein typisches Muster der Virulenzfaktoren lag dabei nicht vor. 63% der Karzinom- und 50% der Adenompatienten waren für einen der Adhärenzfaktoren pap oder sfa positiv, dagegen nur 27% der CED- und IBS-Patienten und 24% der gesunden Probanden. Cdt kam bei 14% der Neoplasiepatienten vor, aber nicht bei IBS- Patienten oder Gesunden. Hämolysin A und cnf1 waren mit 26% bzw. 16% bei Neoplasiepatienten zwar häufiger als in den Kontrollgruppen, dennoch war der Unterschied nicht signifikant. ST, LT und eae wurden selten oder gar nicht gefunden.
Schlußfolgerungen: Eine Besonderheit der Besiedlung der Kolonmukosa bei Patienten mit Neoplasien im Gegensatz zu Patienten mit CED und IBS sowie gesunden Probanden ist das signifikant häufigere Vorkommen virulenter E.coli, die heterogen im Muster ihrer Virulenzfaktoren sind.

Schlagwörter:
kolorektale Neoplasien, Darmflora, Virulenzfaktoren von E.coli, Polymerasekettenreaktion

Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Petra Schlien, Dr. Alexander Swidsinski und Prof. Herbert Lochs für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.
Desweiteren danke ich Prof. Arlette Darfeuille-Michaud, Dr. Anne-Lise Glasser und Dr. Jerome Boudeau für die freundliche und engagierte Betreuung während meines Praktikums in Clermont-Ferrand.
Ein besonderes Dankeschön an Utz-Uwe Haus für die Hilfe bei der Erstellung der elektronischen Version dieser Arbeit, für alle, die mich mit ihrer Motivation und Kritik unterstützt haben und natürlich an alle „gesunden Probanden“ für ihre Spende.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**
1.1 Bedeutung von kolorektalen Neoplasien 1
1.2 Zur Pathogenese kolorektaler Neoplasien 2
1.2.1 Allgemeine Tumorigenese 2
1.2.2 Wege zur Initiation maligner Tumoren 2
1.2.3 Aktuelle Vorstellungen zur Entstehung kolorektaler Neoplasien 4
1.2.4 Experimentelle Ansätze 7
1.3 Mukosaassoziierte Flora bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien 9
1.4 Eigene Fragestellung 9
1.4.1 Übersicht über die untersuchten Virulenzmerkmale 10

2 Material und Methoden **16**
2.1 Gewinnung der Isolate aus Biopsien 16
2.2 Gewinnung der Isolate aus den Stuhlproben 17
2.3 Durchführung der PCR 17
2.4 Patientenauswahl 19
2.5 Gesunde Probanden 20
2.6 Statistische Auswertung 20

3 Ergebnisse **21**
3.1 Patientenkollektiv und Datenmenge 21
3.2 Patientenkollektiv 21
3.3 Ergebnisse zur Häufigkeit der klassischen Kategorien pathogener E.coli 22
3.4 Die Häufigkeit weiterer Virulenzfaktoren bei Neoplasiepatienten . 23
3.4.1 Anmerkung zur Darstellung der Ergebnisse 23
3.4.2 Vergleich mit der Häufigkeit der Faktoren in Stuhlisolaten gesunder Probanden 23
3.4.3 Vergleich der Häufigkeit der Faktoren bei Neoplasiepatienten mit anderen Darmerkrankungen 26

3.4.4 Vergleich mit der Häufigkeit der Faktoren in Isolaten aus Biopsien von rezidivfreien Karzinompatienten 28
3.5 Die Verteilung von EAST-1 31
3.6 Vorkommen einzelner Genotypen 31
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse 33

4 Diskussion **34**
4.1 Kritik der Methode 34
4.1.1 Wahl der Methode PCR 34
4.1.2 Probleme der Selektion von Stämmen 35
4.2 Prävalenz virulenter E.coli bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien 35
4.2.1 Vorkommen der klassischen Kategorien pathogener E.coli 35
4.2.2 Cytolethal distending toxin 36
4.2.3 Cytotoxic necrotizing factor 1 38
4.3 Zusammenfassung der Diskussion 42

5 Zusammenfassung **43**

A Tabellen **51**
A.1 Altersverteilung der Patienten 51
A.2 Anzahl isolierter E.coli Stämme in den Patientengruppen 52
A.3 Häufigkeiten und Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen 53

B Benutzte Hilfsmittel **54**

Abbildungsverzeichnis

1.1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz: genetische Veränderungen . . . 4

3.1 Häufigkeit der Virulenzfaktoren im Vergleich zu gesunden Probanden 23
3.2 Häufigkeit der Adhärenzfaktoren im Vergleich zu gesunden Probanden 24
3.3 Häufigkeit der Toxingene im Vergleich zu gesunden Probanden . . 25
3.4 Häufigkeit der Virulenzfaktoren im Vergleich zu Patienten mit anderen Darmerkrankungen 26
3.5 Häufigkeit von Adhärenzfaktoren und Toxingenen im Vergleich zu Patienten mit anderen Darmerkrankungen 27
3.6 Häufigkeit der Virulenzfaktoren im Vergleich zu Karzinompatienten ohne neue Neoplasie 29
3.7 Häufigkeit von Adhäsionsfaktoren und Toxingenen im Vergleich zu Karzinompatienten ohne neue Neoplasie 30
3.8 Häufigkeit der Genotypen cdtB+sfa+ und cnf1+hlyA+pap+sfa+ in den untersuchten Gruppen 32

4.1 Wirkungsmechanismus des cytolethal distending toxin, cdt, in Zellkulturen 40
4.2 Wirkungsmechanismus des cytotoxic necrotizing factor 1, cnf1, in Zellkulturen 41

Tabellenverzeichnis

1.1 Risikofaktoren und assoziierte Malignome 3
1.2 Übersicht über die untersuchten Virulenzfaktoren 11

2.1 Sequenzen der Primerpaare 18
2.2 Reaktionsbedingungen der Polymerasekettenreaktion 19

3.1 Vorkommen der klassischen Kategorien von E.coli in den untersuchten Biopsien 22
3.2 Vorkommen EAST-1-positiver Isolate 31

4.1 Klassische Kategorien pathogener E.coli und ihre assoziierten klinischen Syndrome 36

A.1 Altersverteilung 51
A.2 Anzahl isolierter E.coli in den Patientengruppen und bei den gesunden Probanden 52
A.3 Ergebnisse und Signifikanz der ermittelten Unterschiede in der Häufigkeit der Virulenzfaktoren 53

B.1 Geräte 54
B.2 Materialien 55

Kapitel 1

Einleitung

Daß die Infektion des Menschen mit bestimmten Mikroorganismen zur Entstehung von Karzinomen führen kann, ist seit langer Zeit durch Beobachtungen vermutet worden, aber erst in den letzten Jahren gelang es, solche Zusammenhänge auf genetischer Ebene zu beweisen. Besonders aus dem Gebiet der Virologie stammen diese neuen Erkenntnisse. Mit dem Nachweis der Assoziation des Helicobacter pylori–Befalls mit dem MALT–Lymphom wurde zum erstenmal die kanzerogene Wirkung eines humanpathogenen Bakteriums gezeigt [36]. Damit ist die Frage aufgeworfen, ob auch andere Karzinome mit einer spezifischen bakteriellen Besiedlung erklärbar und damit durch rechtzeitige Therapie zu verhindern sind. Vor diesem Hintergrund soll diese Arbeit über „Virulenzfaktoren mukosaassoziierter E.coli bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien“ die Besonderheiten dieser Erkrankung im Hinblick auf Epidemiologie und Pathologie beleuchten, die bisherigen Erkenntnisse zur Darmbesiedlung bei diesen Patienten zusammenstellen und im Zusammenhang mit den eigenen Untersuchungen diskutieren.

1.1 Bedeutung von kolorektalen Neoplasien

Das kolorektale Karzinom, der vom Zylinderepithel von Kolon und Rektum ausgehende maligne Tumor, stellt in Westeuropa und in den USA die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Bei der deutschen Krebsmortalität steht es an 2. Stelle, bei Frauen nach dem Mammakarzinom und bei Männern nach dem Bronchialkarzinom. Es wird geschätzt, daß im Jahr 1997 24.000 Männer und 28.000 Frauen in Deutschland neu an einem solchen Karzinom erkrankt waren. Dabei sind besonders Menschen jenseits des 50. Lebensjahres betroffen [24].
Trotz der großen Bedeutung dieser Erkrankung ist – abgesehen von dem geringen Anteil familiär gehäufter Karzinome – in den meisten Fällen bis heute nicht bekannt, wie es zu ihrer Entstehung kommt.

1.2 Aktuelle Vorstellungen zur Pathogenese kolorektaler Neoplasien

1.2.1 Allgemeine Tumorigenese

Nach den aktuellen Ansichten zur Tumorigenese ist die Entwicklung eines malignen Tumors ein stufenartiger Prozeß, in dem Zellen durch einen äußeren Stimulus (virale, chemische, physikalische Noxen) zunächst einzelne, später immer mehr Mutationen in ihren Genen ansammeln, unter anderem in solchen, die den Zellzyklus steuern. Dabei handelt es sich entweder um Tumorsuppressorgene, deren Genprodukte in mutierter Form als Wachstumshemmer ausfallen, oder um Protoonkogene, deren Genprodukte in mutierter Form als Zellzyklusbeschleuniger wirken, weil sie durch die natürlichen Rückkopplungsmechanismen nicht mehr hemmbar sind. Auch Mutationen in DNA–Reparaturenzymgenen beschleunigen die Tumorigenese, da sie das Auftreten von Veränderungen in weiteren Genen fördern [43].
Mikroskopisch entwickeln diese Zellen dabei Zeichen von Zellatypie, wie verschobene Kern-Plasma-Relation, Heterochromasie und Polymorphie der Zellkerne, deutliche Nukleolen sowie atypische Mitosen. In diesem Stadium der Dysplasie wird der Prozeß unumkehrbar: auch die Entfernung des äußeren Wachstumsreizes kann die Zellteilungen nicht mehr beenden [43].
Atypische Zellen haben eine abnehmende Tendenz zur Ausdifferenzierung: sie verlieren die typischen morphologischen und funktionellen Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes (Anaplasie). Geht die Expression von funktionsfähigen Zell-Zell-Kontaktproteinen verloren, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung eines invasiven Tumors erfüllt [43].

1.2.2 Wege zur Initiation maligner Tumoren

Für die Mehrzahl der malignen Tumoren des Menschen ist nicht bekannt, welche Faktoren die Tumorentstehung auslösen, aber für einige Entitäten sind die Auslöser und prädisponierenden Faktoren nachgewiesen worden. Diese sind sehr vielfältig und umfassen neben physikalischen und chemischen Noxen, chronischen Entzündungen, Immunsuppression und eine ganze Reihe mikrobieller Erreger.

Risikofaktor	**assoziiertes Malignom**
UV–Licht induzierter Sonnenbrand der Haut	Malignes Melanom
Ethanol	Ösophaguskarzinom
Rauchen	Kleinzelliges Bronchialkarzinom, Plattenepithelkarzinom der Lunge
HIV–Infektion	Kaposi-Sarkom
Chronische Infektion bei Tuberkulose	Wundkarzinom
Chronische Entzündung der Haut bei Lichen sclerosus et atrophicans	Spinaliom
Colitis ulcerosa und Morbus Crohn	Kolorektales Karzinom
EBV	nasopharyngeales Karzinom, Non-Hodgkin-Lymphome, z.B. Burkitt-Lymphom und chronisch-myeloische Leukämie
Helicobacter pylori	MALT-Lymphom, Magenkarzinom
HPV	Zervixkarzinom, andere Plattenepithelkarzinome
HBV, HCV	hepatozelluläres Karzinom
Schistosoma sinesis	Kolorektales Karzinom

Tabelle 1.1: Risikofaktoren und assoziierte Malignome

1.2.3 Aktuelle Vorstellungen zur Entstehung kolorektaler Neoplasien

1.2.3.1 Zur Pathologie der Kolonneoplasien

Daß kolorektale Karzinome immer aus adenomatösen Schleimhautveränderungen hervorgehen, gilt heute als bewiesen. Makroskopisch fallen die Adenome meist als Polypen (gestielte oder sessile) auf. Diese adenomatösen Polypen (nicht die hyperplastischen oder hamartomatösen) müssen also als Präkanzerosen, als Läsionen mit erhöhtem Entartungsrisiko, gelten [44].
Die Größe, aber auch der makroskopische und histologische Typ des Adenoms, ist mit dem Entartungsrisiko korreliert. Sessile Adenome haben ein höheres Risiko als gestielte, villöse ein höheres Risiko als tubuläre [30].
Fearon und Vogelstein beschrieben 1990 ein Modell für die genetische Grundlage der Adenom-Karzinom-Sequenz. Sie fanden, daß sich die Mutationen der einzelnen Gene dem Stadium der Entartung zuordnen lassen [9]. Ihr Modell ist in der Abbildung 1.1 dargestellt.

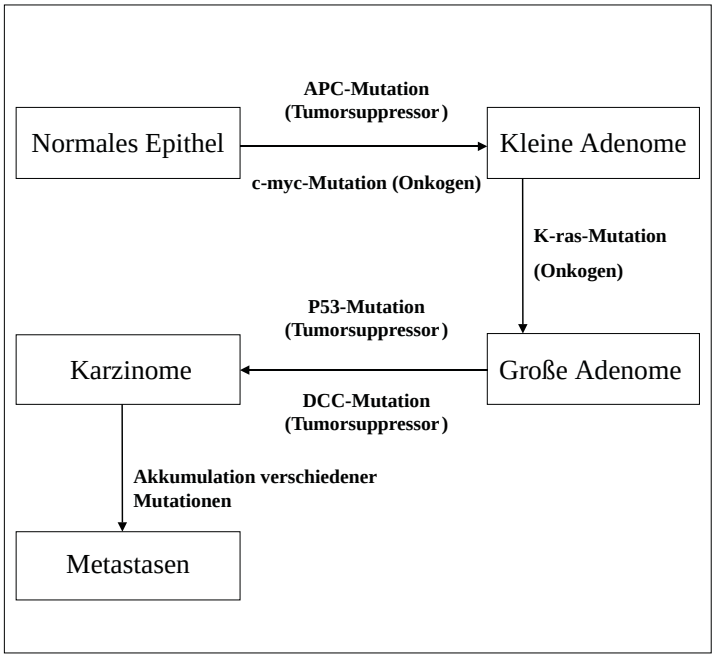


Abbildung 1.1: Die Adenom-Karzinom-Sequenz: genetische Veränderungen, nach Fearon und Vogelstein [9]

1.2.3.2 Vorerkrankungen und genetische Prädispositionen des kolorektalen Karzinoms

Obwohl für den größten Teil der kolorektalen Karzinome nicht bekannt ist, wie sie induziert werden, gibt es einige Risikofaktoren, die besonders eng mit der Karzinomentstehung korrelieren und als auslösende Faktoren anerkannt sind. Dazu gehören:

Genetische Prädisposition. Es ist bekannt, daß bei einigen Karzinompatienten eine familiäre Häufung besteht. Der Anteil dieser Patienten wird auf 2-5% aller Patienten mit kolorektalen Karzinomen geschätzt [44]. Die Karzinome können dabei im Rahmen einer Polyposis auftreten (wie zum Beispiel bei der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP)) oder erblichen Syndromen (wie dem Gardener-Syndrom). In anderen Familien sind kolorektale Karzinome ohne vorausgehende Polyposis gehäuft vorhanden (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC). Bei diesen Patienten kommen häufig gleichzeitig Endometriumskarzinome, seltener Tumoren des urogenitalen und hepatobiliären Systems vor. Für HNPCC werden vererbte Defekte in Genen für DNA-Reparaturenzyme verantwortlich gemacht [1].

Vorerkrankungen. Sowohl bei Patienten mit **Colitis ulcerosa** als auch mit **M.Crohn** besteht ein erhöhtes Risiko, kolorektale Adenome und Karzinome zu entwickeln [7, 13, 27]. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa ist das Risiko, ein Karzinom zu entwickeln, nach 20 Jahren 30 mal höher als in der Normalbevölkerung [26]. Deshalb sind präventive Koloskopien regelmäßig ab dem 10.Jahr nach Diagnosestellung angezeigt. Für M.Crohn-Patienten schwanken die Angaben zum Entartungsrisiko aufgrund der geringen Zahl publizierter Fälle.
Desweiteren erhöhen auch eine **Infektion mit Schistosoma sinesis** und **chirurgische Uretereinleitung in das Kolon** das Risiko für ein kolorektales Karzinom [50].

Für die meisten Patienten ist die Karzinomentwicklung aber mit der genetischen Prädisposition und den Vorerkrankungen allein nicht erklärbar. Vielmehr gibt es deutliche epidemiologische Hinweise auf die Beteiligung von Umweltfaktoren.

1.2.3.3 Besonderheiten der Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms, weitere Risikofaktoren und Prävention

Epidemiologie. Die Häufigkeit des kolorektalen Karzinoms zeigt deutliche Unterschiede in der globalen und in der sozioökonomischen Verteilung: Gebiete hoher Inzidenz sind die Industrieländer Westeuropas und die USA. Andererseits sind

die Länder Afrikas weniger betroffen. Zunächst gibt es auch innerhalb der Länder mit hoher Inzidenz deutliche Unterschiede in der Verteilung des Karzinoms: so erkrankt in diesen Ländern die Stadt- häufiger als die Landbevölkerung, und die Patienten kommen überdurchschnittlich häufig aus den wohlhabenderen Schichten [30, 12].
Zweitens haben Wandererstudien gezeigt, daß Einwanderer in Gebiete mit anderer Inzidenz als in ihrer Heimat innerhalb kurzer Zeit das höhere oder niedrigere Risiko des Einwanderungslandes annehmen [12]. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Risikofaktoren für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen in erster Linie Umweltfaktoren sind, die vor dem genetischen Hintergrund wirken. Im allgemeinen kommen die Besonderheiten der Lebensumstände (z.B. Schadstoffexposition), Lebensgewohnheiten (Ernährung, Rauchgewohnheiten) und gesellschaftliche Umstände (z.B. sozialer Streß, Qualität der medizinischen Versorgung, Möglichkeiten der Früherkennung) als Umweltfaktoren in Betracht.
Es muß auch berücksichtigt werden, daß andere, gleich verteilte Erkrankungen die Entstehung der Karzinome beschleunigen könnten.

Weitere Risikofaktoren. Die Bedeutung der *Ernährung* für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist sehr umfassend untersucht worden. Zwar zeigen statistische Untersuchungen seit Jahren durchaus widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf einzelne Bestandteile der Nahrung, doch ist die direkte Korrelation mit dem pro-Kopf-Konsum von Energie, tierischen Fetten und Eiweißen und andererseits die inverse Korrelation mit dem Anteil pflanzlicher Nahrungsbestandteile gut nachgewiesen [44, 30, 12]. Über den direkten Zusammenhang dieser Befunde mit der Karzinomentstehung gibt es verschiedene Hypothesen (siehe unten).

Statistische Untersuchungen zeigen eine direkte Korrelation des Risikos mit einer *Hypercholesterinämie* und einer Prädisposition zur *koronaren Herzkrankheit* [30].

Das *Rauchen* ist ein fraglicher Risikofaktor [30].

Es wird geschätzt, daß 30% der Menschen im mittleren und höheren Lebensalter *adenomatöse Polypen* tragen. Die Wahrscheinlichkeit, daß diese entarten, hängt von der Art und Größe der Läsionen ab: bei einer Größe zwischen 1,5 und 2,5 cm wird das Entartungsrisiko auf 2-10% geschätzt. Die Abtragung dieser Polypen ist deshalb wichtig, ebenso weitere Koloskopien, denn zwischen 30 und 50% dieser Patienten entwickeln mit der Zeit wieder Adenome [30].

Prävention Aufgrund empirischer Erfahrungen sind einzelne Stoffe bekannt, deren risikosenkende Wirkung sich in Studien nachweisen ließ. Von der *Acetylsalicylsäure* ist beschrieben, daß sie bei langzeitiger und regelmäßiger Einnahme

eine Senkung des Karzinomrisikos bewirkt [30]. Auch dieser Wirkmechanismus ist nicht bekannt.

Eine risikosenkende Wirkung hat Studien zufolge die *Östrogensubstitution* bei Frauen in der Postmenopause [30]. Wieder ist der Schutzmechanismus nicht bekannt, doch könnte so die Abnahme der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms bei Frauen in den letzten Jahren erklärt werden.

Körperliche Aktivität senkt das Risiko [12].

Keinen Einfluß auf das Erkrankungsrisiko scheint die Einnahme antioxidativer Vitamine (Vitamin C, Vitamin E und β-Carotin) zu haben [30, 12].

1.2.4 Experimentelle Ansätze

Die Ergebnisse der epidemiologischen Forschung zur Bedeutung der Umwelteinflüsse und der Ernährung bei der Entstehung kolorektaler Karzinome spiegeln sich in den experimentellen Ansätzen wieder, die der Frage nachgehen, wie diese Zusammenhänge im Detail erklärt werden könnten.
Die wesentlichsten Ansätze sind im Prinzip zwei verschiedenen Richtungen zuzuordnen: zum einen sind es Versuche, einen spezifischen Erreger als Auslöser der Karzinomentwicklung zu entdecken (nach dem Modell der Assoziation des MALT-Lymphoms des Magens mit einer Helicobacter pylori Infektion), andererseits Versuche, die Bedeutung von fakultativen Pathogenen unter der Standortflora des Darms und deren Interaktion mit den Epithelzellen zu erforschen. Die zweite Richtung von Ansätzen könnte eher die Ernährungsgewohnheiten mit einbeziehen.

Erster Ansatz

Folgende Erreger sind in den letzten Jahren diskutiert worden:

- Gruppe D - Streptokokken (z.B. S. bovis) [33, 41]
- Helicobacter pylori [31]
- Humane Papillomviren [23, 48]
- Inoue-Melnick-Virus (IMV) [18, 19]

Gruppe D-Streptokokken kamen aufgrund der klinischen Erfahrung in die Diskussion, daß S.bovis- Endokarditiden und -Bakteriämien oft mit kolorektalen Karzinomen assoziiert sind.
Aber für keinen der Erreger wurde ein überzeugender Zusammenhang hergestellt. Weder lag eine häufigere Besiedlung als in Kontrollgruppen, noch ein Hinweis auf kanzerogene Wirkung am Kolon vor.

Zweiter Ansatz

Schon seit längerem hat man versucht, die Bedeutung der Darmflora für die Entstehung kolorektaler Karzinome zu evaluieren. Diese Ansätze waren deshalb attraktiv, weil es so möglich wäre zu beschreiben, warum die Ernährung eine Schlüsselrolle unter den Risikofaktoren dieser Erkrankung spielt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß aus einer an tierischen Fetten und Eiweißen reichen Nahrung sowie aus einer typischen Zusammensetzung der Gallensäuren nach der Umsetzung durch die Standortflora des Darmes karzinogene Stoffwechselprodukte gebildet werden. Längere Verweildauer des Darminhaltes bei ballaststoffarmer Ernährung sowie die gleichzeitige starke Vermehrung der Darmbakterien sollen die Entstehung dieser Metabolite beschleunigen und die Kontaktzeit mit dem Epithel verlängern [28]. Ein Tiermodell zeigt, daß dieser Weg der Karzinomentstehung prinzipiell möglich ist: werden Mäuse mit Cycadnüssen gefüttert, entwickeln sie kolorektale Dysplasien, allerdings nicht, wenn sie vorher antibiotisch behandelt wurden. Es ließ sich eine karzinogene Substanz, das Cycasin, nachweisen, die erst durch den Umsatz der Nuß durch die Darmflora entsteht [28].
In den Untersuchungen beim Menschen wurden dabei allerdings meist aus dem Stuhl gewonnene Bakterien isoliert und mit der Flora der verschiedenen Darmabschnitte gleichgesetzt, obwohl bis heute nicht bekannt ist, wie stark sich die Flora der verschiedenen Darmabschnitte in der Zahl und Zusammensetzung der Spezies unterscheidet. Auch über die Reproduzierbarkeit der Daten zur Besiedlung existieren unterschiedliche Angaben - einige Autoren berichten von starken Tagesschwankungen, andere bestreiten dies.

1.3 Mukosaassoziierte Flora bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien

Ein Verfahren, das erlaubt, Schlüsse über die Flora eines bestimmten Darmabschnittes zu ziehen, ist die von Swidsinski 1998 beschriebene Methode zur Darstellung der epithelnahen Mikroflora aus koloskopisch gewonnenen Zangenbiopsien [51]. Das Material wird dabei in mehreren Waschschritten von oberflächlich anhaftendem Stuhl und Keimen befreit und die Flora entweder durch Kultur nach einer hypotonen Lyse des Materials oder durch quantitative PCR nach DNA- Extraktion dargestellt. Zur Vorhersage der Lokalisation dieser Flora wird der Gentamycinprotectionassay verwendet. Bei diesem Verfahren wird durch die Zugabe des Antibiotikums die extrazelluläre Flora abgetötet. Nach der hypotonen Lyse des Materials wachsende Bakterien werden als intrazellulär lokalisiert betrachtet. Durch dieses Vorgehen kann die fäkale, intraluminale Flora reduziert werden, und es werden die Keime isoliert, die den engsten Kontakt zur Mukosa haben. Andererseits erlauben die Kombination von Kultur und quantitativer PCR mit Sequenzierung einen Überblick über unter diesen Bedingungen nicht kultivierbare Bakterien.
Der Autor kommt zu folgenden Ergebnissen [51]:

1. Bei 90 und 93% der Patienten mit Adenomen und Karzinomen sind mehr als 1000 Keime/μl in den Biopsien nachweisbar, dagegen nur bei 3% der asymptomatischen Kontrollpatienten.

2. Die Analyse der 16S rRNA - Gensequenzen ergab, daß bei 76% der Adenom- und 87% der Karzinompatienten E.coli vorherrschte.

3. Ein Teil der so gewonnenen Flora ist intrazellulär lokalisiert, denn 28% der Biopsien von Adenom- und 56% der Biopsien von Karzinompatienten zeigen einen positiven Gentamycinprotectionassay.

1.4 Eigene Fragestellung

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist heute noch nicht bekannt. Zwar existieren Theorien, die Besonderheiten dieser Krankheit im Hinblick auf die Epidemiologie, die Klinik und empirische Präventionsmöglichkeiten zu erklären, doch ist kein Beweis für ein Agens erbracht, das den Kreislauf von Proliferation und Mutation, der zur Karzinomentstehung führt, auslöst.
Nach dem Nachweis einer mukosaassoziierten, zum Teil intrazellulär lokalisierten Darmflora mit E.coli als konstantem Bestandteil, stellte sich die Frage nach

einem Zusammenhang zwischen der Besiedlung mit diesen Bakterien und der Pathogenese der Neoplasien.
Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei den beschriebenen mukosaassoziierten E.coli um eine besondere Lokalisation der normalen intraluminalen Flora handelt oder ob eine Besiedlung mit virulenten Bakterien, also mit enterotoxischen (ETEC), enteropathogenen (EPEC), enterohämorrhagischen (EHEC) und enteroinvasiven E.coli (EIEC) oder mit anderen Virulenzmerkmalen, vorlag.
Zu diesem Zweck wurden E.coli–Stämme aus Kolonbiopsien von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen isoliert und auf ein Spektrum bekannter Virulenzmerkmale untersucht.
In der Vorstellung, daß vergleichbare Stämme von E.coli aus Biopsien Gesunder nicht verfügbar sind (da bei Gesunden die mukosaassoziierte Flora nicht existiert), wurden zur Einschätzung der Häufigkeit der verschiedenen Virulenzmerkmale in der Normalpopulation E.coli aus Stuhlproben gesunder Probanden isoliert und durch die PCR auf Virulenzmerkmale getestet. Ebenso wurde mit Stämmen verfahren, die nach denselben Prinzipien (Koloniemorphologie, Hämolyseeigenschaften) aus gewaschenen Biopsien von Patienten mit kolorektalen Neoplasien, sowie chronisch- entzündlichen und funktionellen Darmerkrankungen isoliert worden waren. Die Häufigkeiten virulenter Stämme konnten dadurch sowohl zwischen den Patientengruppen, als auch mit der fäkalen Flora verglichen werden.
In einem zweiten Schritt der Auswertung wurden die Häufigkeiten virulenter Stämme in bezug auf die Krankheitsgeschichte der Patienten mit kolorektalen Neoplasien ausgewertet, um zu analysieren, ob Unterschiede zwischen Patienten, die aktuell an einem Adenom oder Karzinom leiden und solchen, die mindestens ein Jahr lang rezidivfrei waren, bestehen.

1.4.1 Übersicht über die untersuchten Virulenzmerkmale

Aus der großen Menge der Virulenzfaktoren, die bei E.coli bekannt sind, wurden solche Toxine und Adhäsionsfaktoren untersucht, die in Bezug auf die Fragestellung interessant erschienen. Dabei wurden sowohl Faktoren berücksichtigt, die definitionsgemäß bei den klassischen Kategorien pathogener E.coli (EHEC, ETEC, EIEC, EPEC) vorkommen, als auch solche, die außerhalb dieser Kategorien bei verschiedenen Krankheiten (Harnwegsinfektionen, Bakteriämien) bei Mensch und Tier gefunden wurden und deren Pathogenitätsmechanismus meist nur in der Zellkultur und selten in vivo nachgewiesen wurde. Insbesondere interessant waren in dieser zweiten Gruppe Faktoren, für die eine Interaktion mit dem Zellzyklus humaner intestinaler Zellen in vitro beschrieben worden war. Eine Übersicht über die untersuchten Faktoren ist in Tabelle 1.2 gegeben.

Virulenzfaktor	Funktion	assoziierte Klinik
eae	Adhäsion	Säuglingsenterokolitis (EPEC) [32]
stx	Toxin	hämorrhagische Kolitis (EHEC) [22]
st	Toxin	Reisedurchfall (ETEC) [32]
lt	Toxin	Reisedurchfall (ETEC) [32]
ipaH	Invasion	Diarrhoe (EIEC) [5]
Pap	Adhäsionspilus	urogenitale Infektionen, Bakteriämie [3]
Sfa	Fimbrie	urogenitale Infektionen, Bakteriämie [3]
HlyA	Toxin	urogenitale Infektionen, Bakteriämie [15]
Cdt	Toxin	unbekannt [39]
East	Toxin	Diarrhoe [52]
Cnf	Toxin	urogenitale Infektionen, Bakteriämie [15]

Tabelle 1.2: Übersicht über die untersuchten Virulenzfaktoren

1.4.1.1 EPEC-, ETEC-, EHEC- und EIEC-definierende Gene

EHEC. EHEC–Stämme sind für das hämolytisch–urämische Syndrom verantwortlich. Das für EHEC typische eae-Gen ist Teil des chromosomalen LEE-Locus (locus of enterocyte effacement) und damit Voraussetzung für die Interaktion von EHEC mit Epithelzellen [32]. Sogenannte A/E-Läsionen (attaching and effacing lesions) definieren sowohl EHEC als auch EPEC in vivo und in vitro. Durch Gentransfer dieses LEE-Locus auf den Laborstamm K12 überträgt sich auch die Fähigkeit, solche Läsionen zu bilden [32].
EHEC–Stämme sind durch die Expression des Shigatoxins (stx) gekennzeichnet [22].
Für die Diagnose der EHEC kommt weiterhin die Bestimmung des O157 H7–Antigens in Frage, da es ein häufig in EHEC–Stämmen gefundenes Oberflächenantigen ist [32].

EPEC. EPEC–Stämme verursachen Durchfälle vor allem bei Kindern bis 2 Jahren, selten auch bei Erwachsenen [46, 32]. Zur Infektion Erwachsener sind wesentlich höhere Inokulationsdosen nötig. Die Durchfälle treten häufig epidemisch in Kindertageseinrichtungen oder pädiatrischen Stationen auf.
EPEC–Stämme besitzen wie EHEC das eae-Gen als Teil des LEE-Locus. Sie werden in typische EPEC (mit Plasmid für den enteroaggregativen Faktor (EAF)) und atypische EPEC (ohne dieses Plasmid) unterteilt. Atypische Stämme zeigen qualitativ die gleichen Läsionen, sind aber klinisch weniger virulent [32].
Obwohl enteropathogene E.coli (EPEC) als obligat pathogene Bakterien gelten, können sie selten auch bei klinisch Gesunden gefunden werden [46].
Auch bei EPEC kommen einige Lipopolysaccharidvarianten häufiger vor als andere (O55, O86, O111, O127, O142), doch ist diese Zuordnung nicht eindeutig, denn die einzelnen Vertreter dieser Serotypen verhalten sich sehr verschieden hinsichtlich ihrer Virulenz. Die Bestimmung der genetischen Determinanten beider Pathotypen ist bedeutend zuverlässiger und wird deshalb heute bevorzugt.

ETEC. E.coli dieses Pathotyps sind die einzigen obligaten Pathogene, die allein durch ihre Exotoxine auf das Epithel von Dick- und Dünndarm wirken. Verantwortlich sind hitzestabiles und hitzelabiles Toxin (ST-I und LT-I), die in G-Protein-vermittelte Signalketten der Kolonozyten eingreifen und so zu Funktionsstörungen der Zellen führen. Einer der postulierten Mechanismen ist die cAMP-vermittelte Aktivierung von apikalen Chlorid-Kanälen, die einen Elektrolyt- und nachfolgenden Wasserverlust der Mukosa bewirkt und so Diarrhoe verursacht.

EIEC. Diese obligat pathogenen E.coli sind Ursache einer hämorrhagischen Enterokolitis. Sie besitzen ein Invasionsplasmid, das ihre Virulenz vermittelt. Die verschiedenen Genen auf diesem Plasmid kodieren für Proteine (invasionsplasmid–assoziierte Antigene = ipa), die für die Pathogenese verantwortlich sind: Invasivität, Lyse der Phagolysosomen, Induktion von Apoptose in Makrophagen und andere [5].

1.4.1.2 Cytolethal distending toxin (cdt)

Das cytolethal distending toxin (cdt, letales aufblähendes Zytotoxin) wurde 1987 von Johnson und Lior erstmals beschrieben [21]. Sie fanden einen durch Überstand von E.coli-Kulturen ausgelösten typischen, bis dahin unbekannten zytopathischen Effekt in verschiedenen Zellkulturlinien (CHO, Hep-2, HeLa, Vero), der zu einem Aufblähen und zum Tod der Zellen führte. Weitere Untersuchungen zeigten, daß dabei der Zellzyklus in der G_2-Phase angehalten wird, so daß der Eintritt in die Mitose nicht erfolgt. Wahrscheinlich liegt das auslösende Ereignis

in der S-Phase, doch ist der molekulare Mechanismus der Toxinwirkung nicht bekannt [42, 8] (siehe Abbildung 4.1).
Später wurde das Toxin bei weiteren zum Teil obligat pathogenen, gramnegativen Stäbchen nachgewiesen: so tragen Campylobacter jejuni, Campylobacter coli und Campylobacter fetum, sowie Haemophilus ducreyi spp. und Actinomyces actinomycetemcomitantes dieses Gen, außerdem pathogene Shigellen und andere [34, 35, 37, 39]. Für E.coli ist die Prävalenz dieses Gens viel geringer: in 1 bis 3% der Stämme kommt es vor und ist nicht mit Sero- oder Pathotypen assoziiert [39].
Die Sequenzen des cdt-Genkomplexes sind zwischen den Spezies nicht konstant. Es handelt sich um einen Komplex aus 3 hintereinanderliegenden Genen (cdt A, B und C). Selbst bei 2 weiteren Sequenzen, die aus E.coli bekannt sind, bestehen Differenzen. Dabei ist der mittlere Genabschnitt (cdt B) sowohl zwischen als auch innerhalb der Spezies am konstantesten [42, 38, 47].
Für cdt–produzierende E.coli ist weder bei Tieren noch beim Menschen eine assoziierte Krankheit bekannt. Cdt kann zwar in EPEC–Stämmen von Kindern mit Durchfällen auftreten, doch trägt es dort wahrscheinlich nicht zur Pathogenese bei [46]. Die Einstufung von cdt als Pathogenitätsfaktor stützt sich auf den zytopathischen Effekt in der Zellkultur, sowie auf ein Mausmodell, bei dem keimfrei aufgezogene Mäuse durch die Einbringung von kloniertem cdt an Durchfall erkrankten. Die Histologie verschiedener Darmabschnitte zeigte Gewebsnekrosen und reparative Hyperplasie allein im Dickdarm, während der Dünndarm nicht betroffen war [35].

1.4.1.3 Escherichia coli Hämolysin (hlyA)

Die Eigenschaft von Erregern, auf Blutagarplatten Hämolysehöfe zu bilden, ist unter pathogenen Bakterien weit verbreitet (z.B. alpha-Toxin bei Staphylokokken, Streptolysin bei Streptokokken und hlyA bei gramnegativen Bakterien) [2]. Sie beruht auf der Bildung von Exotoxinen, die durch die Bildung von Poren in Zellmembranen zum Zelluntergang führen können. Auch das Listeriolysin, das für den Escape- Mechanismus von Listeria monocytogenes aus den Phagolysosomen entscheidend ist, gehört zu dieser Gruppe [40]. Das Escherichia coli Hämolysin (hlyA) gehört aufgrund einer repetitiven Sequenz seiner Aminosäuren zu den RTX (repeats in toxin) - Hämolysinen. In anderen gramnegativen Spezies ist es auch verbreitet, so in Proteus, Bordetella, Morganella, Pasteurella und Actinobacillus spp. [53].
Über den molekularen Wirkmechanismus ist wenig bekannt: das Toxin greift außer Erythrozyten auch kernhaltige Zellen an, bildet in einem kalziumabhängigen Schritt Membranporen und bewirkt so die Verschiebung extra- und intrazellulärer Ionen, einschließlich des Kalziumeinstroms [2]. Verschiedene sekundäre Effekte

der Toxinwirkung werden diskutiert, so die Aktivierung der Entzündungskaskade durch Arachidonsäurederivate, einschließlich der Gerinnungsaktivierung, der Steigerung der Endothelpermeabilität und der Freisetzung diverser Substanzen aus Granulozyten. Außerdem soll die Zytotoxizität eine lokale Immunsuppression bewirken [2].
Hämolysin A–produzierende E.coli kommen im Stuhl Gesunder vor, sind aber sehr häufig bei Harnwegsinfektionen und E.coli-Sepsis [14].

1.4.1.4 Cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1)

Cnf1 zeigt in Zellkulturen einen typischen zytopathischen Effekt [6]. Cnf1-positive Stämme können von Mensch und Tier isoliert werden. Mit großer Häufigkeit wird es in uropathogenen Stämmen und unter Bakteriämiekeimen gefunden [15].

CNF1 induziert über die Aktivierung des G-Proteins Rho die Bildung von Aktin Streßfasern (actin stress fibers), vermindert die Transmigrationsfähigkeit von polymorphkernigen Zellen durch intestinale Zellkulturen und führt zur Auslöschung der Mikrovilli. Obwohl diese Effekte in Zellkulturen sehr gut untersucht sind, ist nicht bekannt, ob sie in vivo auftreten und wie sie für die Pathogenese von Harnwegsinfekten und Translokation aus dem Darm bedeutsam sind [16].

Unabhängig von der Art der Isolation tritt cnf1 eng assoziiert mit Hämolysin A auf: cnf1+ Stämme sind praktisch immer auch hämolysierend, während hämolysierende Stämme umgekehrt in 60–70% der Fälle cnf1 tragen [15]. Es existieren Hinweise darauf, daß dieses Toxin von den E.coli Zellen über einen Typ III-Sekretionsmechanismus sezerniert werden könnte: das bedeutet, ein Kontakt von E.coli zu einer eukaryonten Zelle ist notwendig, damit das Toxin freigesetzt wird [16]. Auch ein regulatorischer Einfluß des durch cnf1 aktivierbaren Rho–Proteins auf den Zellzyklus wurde beschrieben [11]. Einige Autoren sehen die Funktion von cnf hauptsächlich in der vermehrten DNA-Synthese, andere darin, daß Apoptose verhindert wird [10]. Ein weiterer beschriebener Effekt des Toxins in der Zellkultur ist die unspezifische Phagozytose, z.B. von Latex-Partikeln und apathogenen Bakterien, die durch das Toxin induziert werden kann [10].

1.4.1.5 Pyelonephritis-assoziierter Pilus und s-Fimbrien-Antigen (pap, sfa)

Adhäsionsfaktoren, wie Pyelonephritis-assoziierter Pilus und s-Fimbrien-Antigen (pap, sfa) sind Merkmale von E.coli-Stämmen, die mit Harnwegsinfektionen und Bakteriämien assoziiert sind. Es wird eine Beteiligung an der Pathogenese dieser Erkrankungen vermutet, obwohl die Zielproteine der Faktoren nicht bekannt sind. 75% der Stämme, die von Pyelonephritispatienten isoliert werden, expri-

mieren den pap-Pilus. Das sfa-Antigen kommt bei 19% dieser Patienten vor. Eine Assoziation beider Adhäsionsfaktoren ebenfalls typisch für Isolate von Patienten mit Harnweginfekten [3]. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, daß beide Adhäsionsfaktoren häufig in solchen Stämmen vorkommen, die weitere Virulenzfaktoren tragen, zum Beispiel Hämolysin A und auch das cnf1- Toxin [29].

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Isolate aus Biopsien

Die Gewinnung von mukosaassoziierten E.coli-Stämmen aus Darmbiopsien erfolgte nach folgendem, 1998 beschriebenen Verfahren [51]: Die im Verlaufe einer Koloskopie stationärer oder ambulanter Patienten aus jeweils drei verschiedenen Darmabschnitten (terminales Ileum, Colon ascendens, Rektum) entnommenen Zangenbiopsien wurden in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen und maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur bis zur Verarbeitung gelagert. Die Biopsien wurden viermal gewaschen (vortexen für 30 Sekunden in jeweils 500 μl physiologischer Kochsalzlösung) und anschließend in 500 μl Aqua dest. 30 Minuten gevortext und so hypoton lysiert. Die Überstände der 2. und 4. Wäsche sowie der hypotonen Lyse wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:10 und 1:100) aerob (24 bis 48 Stunden) und anaerob (72 Stunden) bei 36°C im Brutschrank bebrütet. Für die aerobe Kultur wurden MacConkey-, Schaedler-, Saboraud- und Enterokokkenagar und für die anaerobe Kultur Schaedler-Agar verwendet. Anzahl und Morphologie der Kolonien (Größe, Farbe, Oberfläche, Hämolyse) wurden protokolliert. Einzelne morphologisch unterschiedliche Kolonien der aeroben und anaeroben Platten wurden durch neues Ausstreichen und Bebrüten auf ColumbiaBlutagar isoliert, die Spezies durch biochemische Tests (API-Teststreifen, Katalase) und Gramfärbung bestimmt, in ein Mikrobanksystem überführt und bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Pathogenitätsfaktoren von mukosaassoziierten E.coli wurden aus dem hypotonen Lysat der Biopsien gewonnene E.coli erneut auf ColumbiaBlutagar ausgestrichen, mit einer Öse in 500 μl Aqua dest. überführt, durch Autoklavieren (15 Minuten bei 120 °C und 1 bar) hitzelysiert und bis zur PCR bei 4° gelagert [3].

2.2 Gewinnung der Isolate aus den Stuhlproben

Die Stuhlproben gesunder Probanden wurden auf MacConkey-Agar und ColumbiaBlut-Agar ausgestrichen und die Morphologie der Kolonien protokolliert. Die Auswahl von Kolonien zur weiteren Bestimmung erfolgte nach den gleichen Kriterien wie bei den Biopsie-Platten, ebenso die biochemische Bestimmung der Spezies und die Aufbewahrung und Vorbereitung zur PCR.

2.3 Durchführung der PCR

Mittels Polymerasekettenreaktion wurden die Bakterienstämme auf die Existenz der in Tabelle 2.1 dargestellten Gene für Virulenzmerkmale untersucht.
Für die PCR wurde ein Mastermix aus Primern, Aqua dest., 10x PCR Puffer, Taq Polymerase und dNTPs in Einzelansätze verteilt, eine entsprechende Menge Suspension hitzelysierter Bakterien hinzugefügt und jeder Ansatz mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Bei jedem PCR-Durchgang wurden eine Negativkontrolle (identisch behandeltes Material eines bekannten negativen Stammes) und eine Positivkontrolle (identisch behandeltes Material eines bekannten positiven Stammes) mitgeführt.

Primer	**dATP, dTTP, dGTP, dCTP**	**AmpliTaq**	**Größe des einzelnen Ansatzes**	**DNA**
je 0,5 μM	je 100 μM	25 U/ml	50 μl	7 μl

Die PCR wurde für die einzelnen Gene unter den in Tabelle 2.2 angegebenen Bedingungen durchgeführt.
Nach abgeschlossener Reaktion wurde das Reaktionsgemisch in einem 1.5%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,01%) elektrophoretisch aufgetrennt, unter einer UV-Lampe betrachtet und das Ergebnis mittels einer Digitalkamera dokumentiert. Ein Bakterienstamm wurde als positiv für ein Gen bezeichnet, wenn sich nach der Elektrophorese eine Bande zeigte, die in Länge und Intensität mit dem Ansatz der Positivkontrolle vergleichbar war. Die Ergebnisse aller PCRs wurden mit MicrosoftAccess gespeichert und ausgewertet. Eine Übersicht über alle benutzten Geräte und Materialien ist in den Tabellen B.1 und B.2 im Anhang gegeben.

Gen	Primer	Primersequenzen 5′ → 3′	Amplifikat, Referenz	
eae	ECW1	TGCGGCACAACAGGCGGCGA	628bp	[55]
	ECW2	CGGTCGCCGCACCAGGATTC		
stx	MK1	TTTACGATAGACTTCTCGAC	297bp	[22]
	MK2	CACATATAAATTATTTCGCTC		
ST	ST-IB	CTTCTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC	123bp	[54]
	ST-IC	GATTACAACAAAGTTCACAGCAGT		
LT	LT-I1	TCTCTATGTGCATACGGAGC	365bp	[54]
	LT-I2	CCATACTGATTGCCGCAAT		
ipaHcore	ipaH1	GCGTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCG	627bp	[5]
	ipaH2	CTTTCAGCCGGTCAGCCACCCCTCTGAGAG		
EAST-1	east1a	TGCCATCAACACAGTATATCC	110bp	[57]
	east1b	TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC		
cdtIIIB	cdtIIIB1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466bp	[42]
	cdtIIIB2	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
hlyA	HLYA1	GTCCATTGCCGATAAGTTT	351bp	[20]
	HLYA2	AAGTAATTTTTGCCGTGTTTT		
sfa	sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410bp	[3]
	sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
pap	pap1	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328bp	[3]
	pap2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
cnf1	cnf1a	CATGCTTCTTCCTCAGTAGC	255bp	[45]
	cnf1b	GTCTAAAAGGGGGGCAGCCA		

Tabelle 2.1: Sequenzen der Primerpaare

	Denaturierung		Annealing		Polymerisation		
Gen	Temperatur in °C	Zeit in s	Temperatur in °C	Zeit in s	Temperatur in °C	Zeit in s	**Zyklen**
eae	94	60	68	90	72	90	25
mk	94	40	50	80	72	60	25
st	94	40	50	80	72	60	25
lt	94	40	55	80	72	60	25
ipaHcore	94	50	65	80	72	60	30
EAST-1	94	40	55	80	72	60	25
cdtIIIB	94	50	50	80	72	60	25
hlyA	94	40	50	80	72	60	25
cnf1	94	60	40	80	72	60	30
pap	94	50	60	80	72	60	25
sfa	94	50	60	80	72	60	25

Tabelle 2.2: Reaktionsbedingungen der Polymerasekettenreaktion

2.4 Patientenauswahl

In der PCR wurden mukosaassoziierte E.coli Stämme von 132 Patienten untersucht, bei denen verschiedene Indikationen zur Koloskopie bestanden (Abklärung von Durchfällen, Schmerzen, Blut im Stuhl, Kontrolle von bekannten Colitis- und Adenompatienten und Tumorvorsorge bei vorherigem Dickdarmkarzinom bzw. Abklärung eines Tumorverdachts). Die Patienten wurden aufgrund ihrer Anamnese, des koloskopischen und histologischen Befundes in Gruppen eingeteilt.

1. Als Karzinompatienten (n= 14) wurden solche Patienten eingeteilt, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Adenokarzinom des Dickdarms oder Rektums makroskopisch und histologisch diagnostiziert worden war.

2. Adenompatienten (n= 29) waren Patienten, bei denen aktuell ein koloskopischer Verdacht auf eine Neoplasie (z.B. Polypen) histologisch als tubulöses, villöses oder tubulovillöses Adenom klassifiziert und bestätigt wurde, bei denen vorher keine chronisch-entzündliche Darmerkrankung oder unbestimmte Kolitis vorgelegen hatte.

3. Patienten ohne neue Neoplasie (n=14), die früher an einem kolorektalen

Karzinom erkrankt waren, die bei der Kontrollkoloskopie makroskopisch und histologisch unauffällig waren. Die Indikationen zur Untersuchung waren bei diesen Patienten

- Kontrolle nach früherer Polypektomie,
- Kontrolle nach einem früher operierten kolorektalen Karzinom,
- Abklärung von klinischen Hinweisen wie Stuhlunregelmäßigkeiten, Blutauflagerungen und Gewichtsabnahme.

4. Colitispatienten (n=55), bei denen nach den anerkannten Kriterien eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) oder eine unspezifische Kolitis diagnostiziert wurde.

5. Patienten mit Colon irritabile (irritable bowel syndrom, IBS) (n=16) wurden eingeteilt, wenn seit über 3 Monaten Bauchschmerzen oder Völlegefühl bestanden und weder koloskopisch noch histologisch ein auffälliger Befund erhoben wurde. Durchfall galt als Ausschlußkriterium.

Die Struktur der Patientengruppen ergibt sich aus den Tabellen A.1 und A.2 im Anhang.

2.5 Gesunde Probanden

Es wurden Stuhlproben von 29 gesunden Probanden gesammelt, die nicht im medizinischen Bereich arbeiteten, die keine gastrointestinalen Beschwerden (Durchfall, Obstipation, Bauchschmerzen), keine Allgemeinsymptome (Fieber, Abgeschlagenheit) und keine schwerwiegenden oder beeinträchtigenden Grunderkrankungen hatten und die seit mehr als 3 Monaten keine Antibiotika eingenommen hatten.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Statistical Package for the Social Science). Es wurde der χ^2-Quadrattest und bei geringer Zellbelegung der Fisher's Exact Test verwendet. Ein p-Wert < 0.05 galt als signifikant.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv und Datenmenge

Um die Virulenzfaktoren von E.coli und ihre Häufigkeiten bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien zu erfassen, wurden aus 60 koloskopischen Biopsien von 43 Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen nach der in Abschnitt 2 beschriebenen Methode 87 E.coli- Stämme isoliert und mittels PCR auf die Existenz von Virulenzgenen untersucht. Die Daten aller Patientengruppen sind in den Tabellen A.1 und A.2 im Anhang zusammengestellt.

3.2 Patientenkollektiv

Neoplasiepatienten

- Von den 14 Patienten mit Karzinom zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten 5 gleichzeitig Adenome.
- Von den 29 Patienten mit Adenom hatten 10 rezidivierende Adenome (seit 2 bei 6 Jahren) und 4 Patienten vor 2 bis 12 Jahren ein Karzinom.
- Bei keinem bestanden vorher eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung oder eine unspezifische Kolitis.

Patienten ohne neue Neoplasie

- Von 14 Patienten waren 9 Patienten seit über einem Jahr und 7 Patienten länger als 2 Jahre ohne neue Neoplasie.

Die **Vergleichsgruppe** war wie folgt zusammengesetzt:

- 32 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (14 Patienten mit Morbus Crohn und 18 Patienten mit Colitis ulcerosa)

- 23 Patienten mit unspezifischer Kolitis
- 16 Patienten mit IBS
- 29 gesunde Probanden

1 Patient mit Colitis ulcerosa hatte seit mehreren Jahren rezidivierende Adenome.

3.3 Ergebnisse zur Häufigkeit der klassischen Kategorien pathogener E.coli

	getestete Gene	**Gesamtzahl Neoplasie-patienten**	**Anzahl Neoplasiepatienten mit mind. einem positiven Isolat (Anteil in %)**
ETEC	hitzestabiles und hitzelabiles Toxin (ST, LT)	27	0 (0)
EHEC	Intimin (eae), Shiga-like toxin (stx)	27	0 (0)
EPEC	Intimin (eae)	27	1 (4)
EIEC	Invasionsplasmid-antigen (ipaH)	27	0 (0)

Tabelle 3.1: Vorkommen der klassischen Kategorien von E.coli in den untersuchten Biopsien

Von Patienten mit Adenomen und Karzinomen wurden keine EHEC, ETEC oder EIEC isoliert. Ein Isolat eines Patienten mit Karzinom entsprach dem EPEC–Genotyp.

3.4 Die Häufigkeit weiterer Virulenzfaktoren bei Neoplasiepatienten

3.4.1 Anmerkung zur Darstellung der Ergebnisse

Bei allen folgenden Darstellungen gelten Patienten oder Probanden als positiv für einen Virulenzfaktor, wenn mindestens eines der E.coli Isolate dieses Patienten oder Probanden PCR-positiv für diesen Virulenzfaktor war. Eine Übersicht über alle Ergebnisse und deren Signifikanz wird ist in Tabelle A.3 im Anhang gegeben.

3.4.2 Vergleich mit der Häufigkeit der Faktoren in Stuhlisolaten gesunder Probanden

In den folgenden Abbildungen ist die Häufigkeit der Virulenzfaktoren bei Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen dargestellt. Durch den Vergleich mit Isolaten aus dem Stuhl gesunder Probanden sollte gezeigt werden, welche Gene auch bei Gesunden vorkommen können und mit welcher Frequenz sie dort zu finden sind.

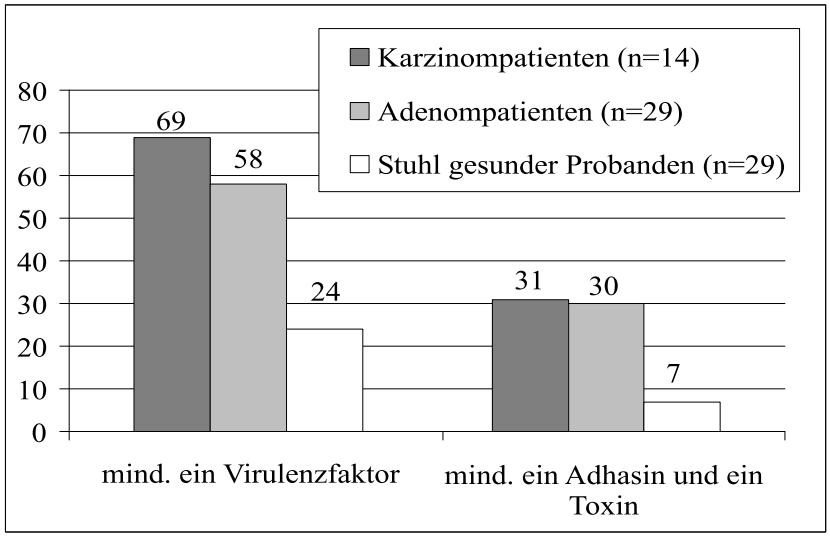


Abbildung 3.1: Häufigkeit von Virulenzfaktoren isolierter E.coli bei Patienten mit Neoplasien im Vergleich zum Stuhl gesunder Probanden in %

- 69% der Karzinom- und 58% der Adenompatienten waren positiv für eines der Merkmale. Auch im Stuhl gesunder Probanden kommen E.coli mit Virulenzmerkmalen vor: 7 der 29 Probanden waren positiv (24%). Die Häufigkeit solcher Stämme war bei Adenom- und Karzinompatienten signifikant höher.

- Nicht nur die Häufigkeit von virulenten Stämmen, sondern auch die Verteilung der Einzelfaktoren war verschieden: die virulenten Isolate von Gesunden waren von solchen Stämmen mit einzelnen Faktoren dominiert. Nur von 2 der 29 Probanden wurden Stämme mit einem Adhäsin und einem Toxin isoliert (7% der Probanden), dagegen wiesen 30 bzw. 31% der Patienten mit Adenomen und Karzinomen Stämme mit einer Kombination von Adhäsinen und Toxinen auf (Abbildung 3.1).

Die Verteilung der einzelnen Faktoren ist in den nächsten Abbildungen dargestellt.

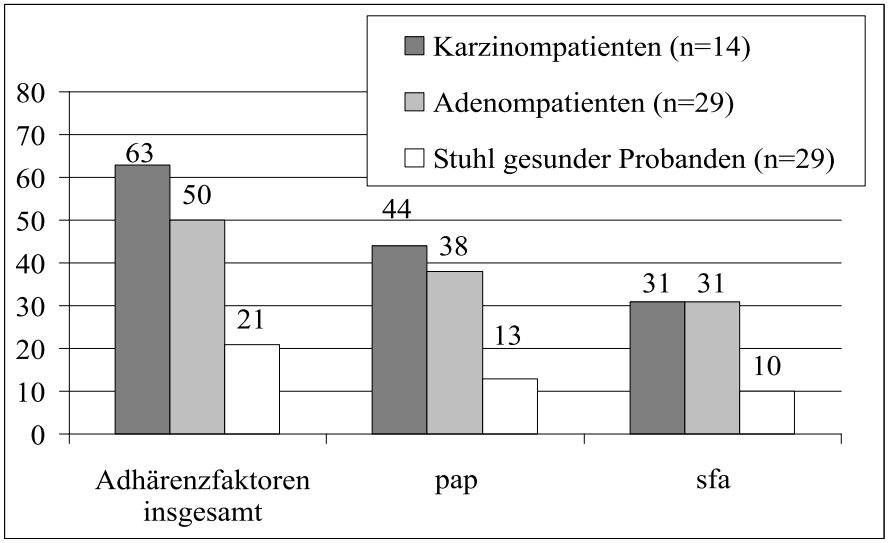


Abbildung 3.2: Häufigkeit der einzelnen Adhärenzfaktoren isolierter E.coli bei Patienten mit Neoplasien und bei gesunden Probanden in %

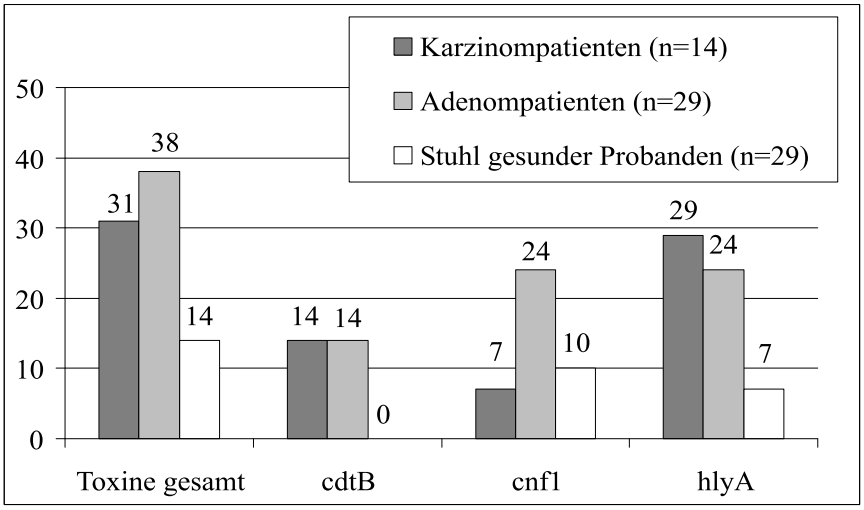


Abbildung 3.3: Häufigkeit der einzelnen Toxingene isolierter E.coli bei Patienten mit Neoplasien und bei gesunden Probanden in %

- Adhäsine und Toxine sind bei Patienten mit Neoplasien signifikant häufiger als bei Gesunden.
- Cdt kam im Stuhl Gesunder nicht vor. Alle anderen untersuchten Faktoren waren auch bei Gesunden vorhanden.
- Während in den Stuhlproben Gesunder Adhäsine und Toxine etwa gleich häufig vorkamen (jeweils zwischen 7 und 13% der Patienten waren positiv), waren bei den Adenom- und Karzinompatienten die Adhäsionsfaktoren deutlich häufiger vorhanden als die Toxine.
- Die Ergebnisse aller anderen Einzelfaktoren unterschieden sich nicht signifikant zwischen Patienten mit Adenomen und Patienten mit Karzinomen.

3.4.3 Vergleich der Häufigkeit der Faktoren bei Neoplasiepatienten mit anderen Darmerkrankungen

In den nächsten Abbildungen sind die Häufigkeiten der Faktoren in den Biopsien der Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, unspezifischer Kolitis und Colon irritabile dargestellt.

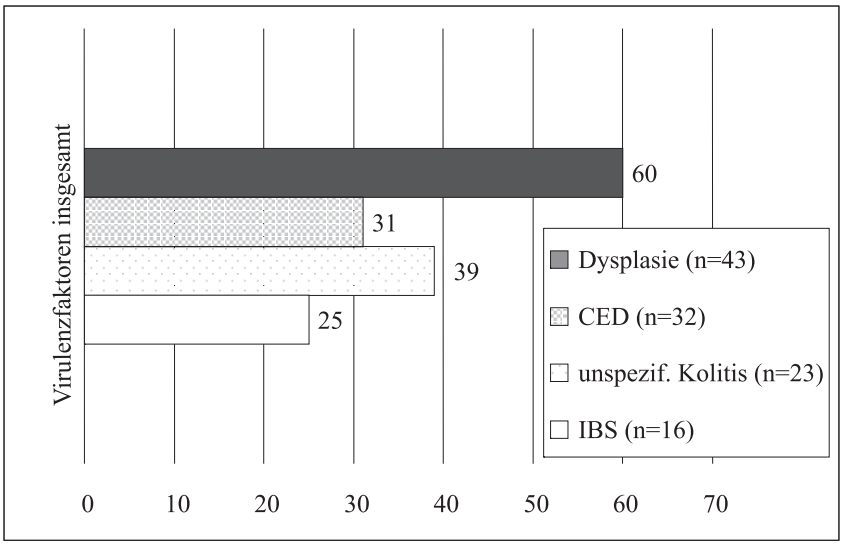
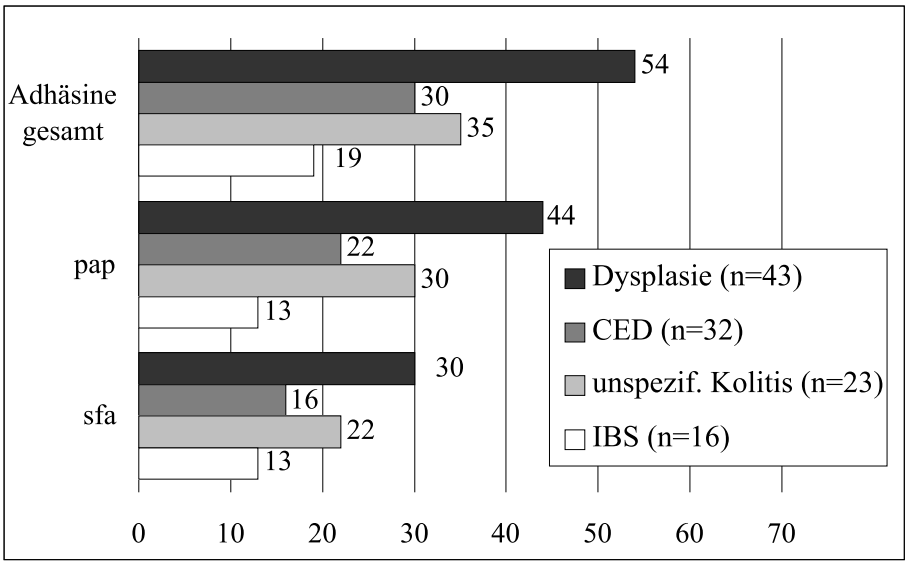
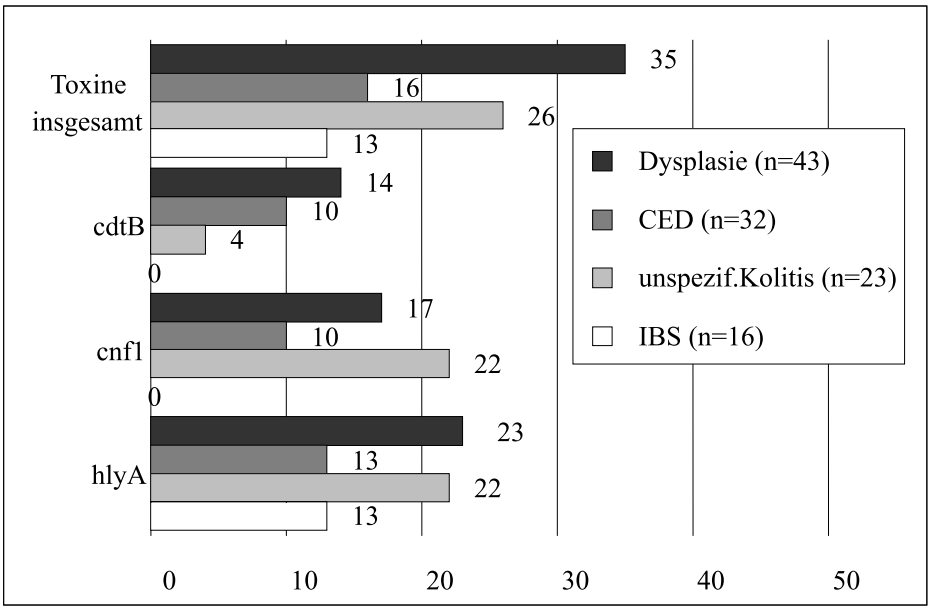


Abbildung 3.4: Häufigkeit von Virulenzfaktoren unter E.coli-Stämmen aus Biopsien von Patienten mit Neoplasien, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und IBS in %



(a) Adhärenzfaktoren



(b) Toxingene

Abbildung 3.5: Häufigkeit von Adhärenzfaktoren und Toxingenen unter E.coli-Stämmen aus Biopsien von Patienten mit Neoplasien, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und IBS in %

- Die Häufigkeit der Virulenzfaktoren ist in den einzelnen Patientengruppen deutlich verschieden.
- Neoplasiepatienten zeigen eine höhere Häufigkeit der Virulenzfaktoren als die anderen Gruppen: von 60% der Neoplasiepatienten wurden solche E.coli isoliert, dagegen nur von 25 bis 39% der Patienten in den anderen Gruppen. Sowohl Adhäsine als auch Toxine waren insgesamt häufiger vorhanden. Der Unterschied war für den Adhäsionspilus pap signifikant, aber nicht für die anderen Einzelfaktoren.
- Die Diagramme der Einzelfaktoren zeigen, daß besonders bei IBS- und CED-Patienten Häufigkeiten festgestellt werden, die dem Auftreten in den Stuhlproben entsprechen. Die Differenz der Befunde beträgt hier maximal 3%. Auch zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gab es nur geringe Unterschiede.
- Von Patienten mit unspezifischer Kolitis wurden höhere Häufigkeiten ermittelt als bei den anderen Kolitis-Formen. Für die Faktoren cnf1 und Hämolysin A erreichten diese die Häufigkeiten bei Neoplasiepatienten.
- Cdt kam wie auch cnf1 bei IBS-Patienten nicht vor. Die übrigen Faktoren waren in allen Patientengruppen vertreten.

Zusammenfassung. Sowohl bei Adenom- als auch bei Karzinompatienten treten häufiger virulente E.coli-Stämmen in gewaschenen Darmbiopsien auf als bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und IBS.

3.4.4 Vergleich mit der Häufigkeit der Faktoren in Isolaten aus Biopsien von rezidivfreien Karzinompatienten

Die Häufigkeiten virulenter E.coli bei Patienten mit Neoplasien werden mit denen verglichen, die bei Kontrolluntersuchungen aus den Biopsien von Patienten gewonnen wurden, die länger als ein Jahr nach der Operation eines Karzinoms rezidivfrei, also ohne neue Neoplasien, waren. Dieser Vergleich soll zeigen, ob der Befund bei Neoplasiepatienten veränderbar ist oder ob die Virulenzmerkmale nach der Behandlung weiterbestehen.

- Bis auf cnf1 kommen alle untersuchten Virulenzmerkmale bei Kontrollpatienten vor.
- Der Anteil von Patienten mit virulenten Stämmen beträgt 38% und ist deutlich geringer als bei Patienten mit Neoplasien (60%).

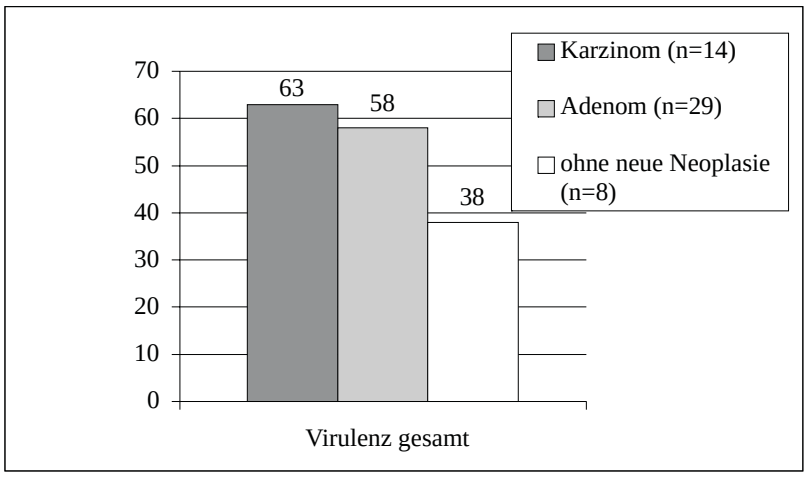
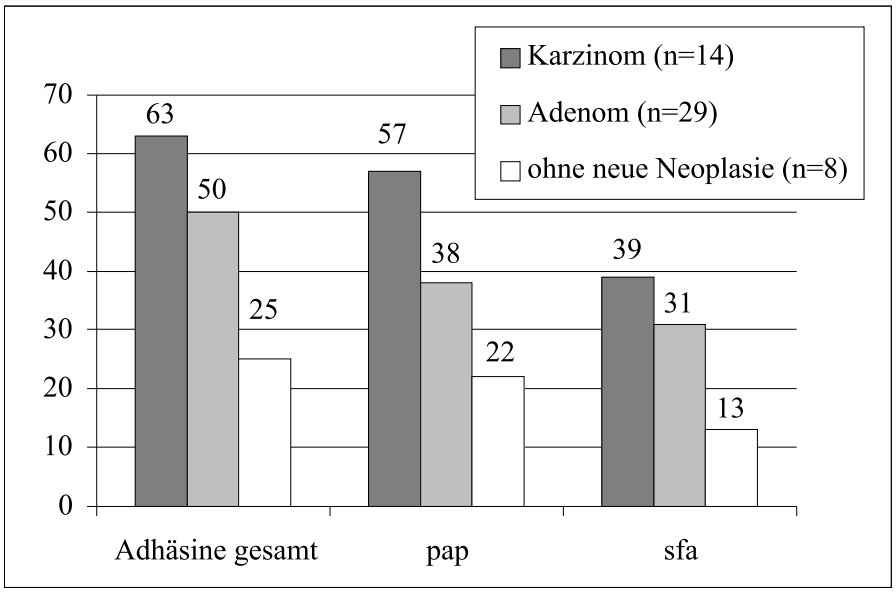
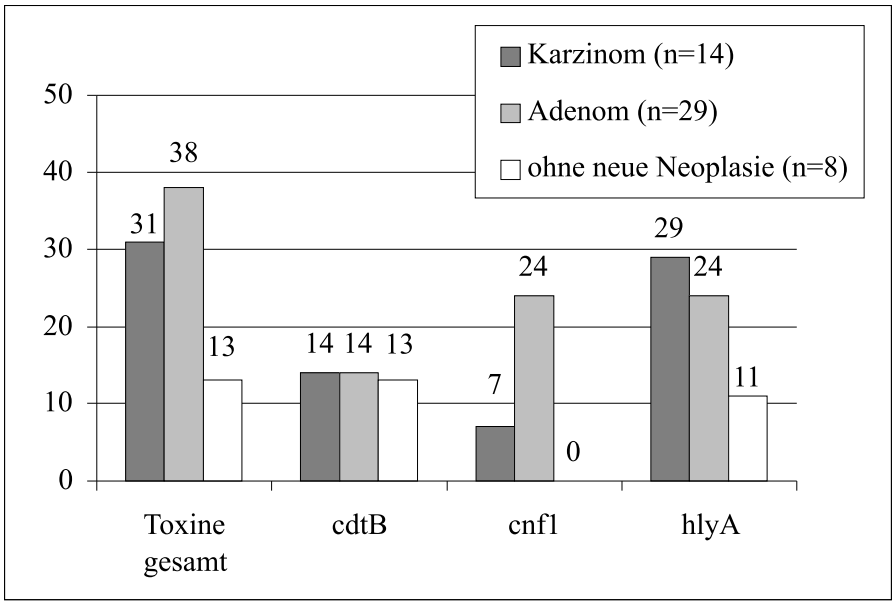


Abbildung 3.6: Vergleich der Häufigkeiten von Virulenzfaktoren unter E.coli Stämmen aus Biopsien von Karzinom-, Adenom- und Karzinompatienten, die länger als ein Jahr ohne neue Neoplasie waren, Häufigkeiten in %

- Für cdt, Hämolysin A, pap und sfa gilt: der Anteil positiver Patienten differiert um maximal 3% von dem bei CED- und IBS-Patienten bestimmten Vergleichsniveau.
- Die Unterschiede sind mit der geringen Fallzahl n=8 nicht signifikant.



(a) Adhäsionsfaktoren



(b) Toxingene

Abbildung 3.7: Vergleich der Häufigkeiten der Adhäsionsfaktoren und Toxingene unter E.coli Stämmen aus Biopsien von Karzinom-, Adenom- und Karzinompatienten, die länger als ein Jahr ohne neue Neoplasie waren, Häufigkeiten in %

3.5 Die Verteilung von EAST-1

	Anzahl EAST-1-positiver Patienten (Anteil in %)
Neoplasie (n=43)	2 (5)
CED (n=32)	2 (6)
Unspezifische Kolitis (n=23)	1 (4)
IBS (n=16)	1 (6)
Stuhlproben Gesunder (n=29)	6 (21)

Tabelle 3.2: Vorkommen EAST-1-positiver Isolate

Dieses Toxin war unter den Isolaten Gesunder mit 21% wesentlich häufiger vertreten als bei den Patienten mit verschiedenen Krankheiten des Darms (alle 5–6 %).

3.6 Vorkommen einzelner Genotypen

Es wurden keine Einzelfaktoren gefunden, die spezifisch bei Adenom- oder Karzinompatienten auftreten, wenn auch in den Häufigkeiten zwischen den Erkrankungen zum Teil signifikante Unterschiede zu finden waren. Auffällig waren 2 Genotypen (Kombinationen von Toxin- und Adhäsingenen), die häufig in der Neoplasiegruppe vorkamen:

1. **Genotyp cdt+sfa+**: Stämme, die sowohl cdtB- als auch sfa-positiv waren,
2. **Genotyp cnf1+hlyA+sfa+pap+**: Stämme, die gleichzeitig positiv für cnf1, hlyA, sfa und pap waren.

In der folgenden Abbildung ist der Anteil dargestellt, den die beiden Genotypen an der Virulenz in den Gruppen hatten.

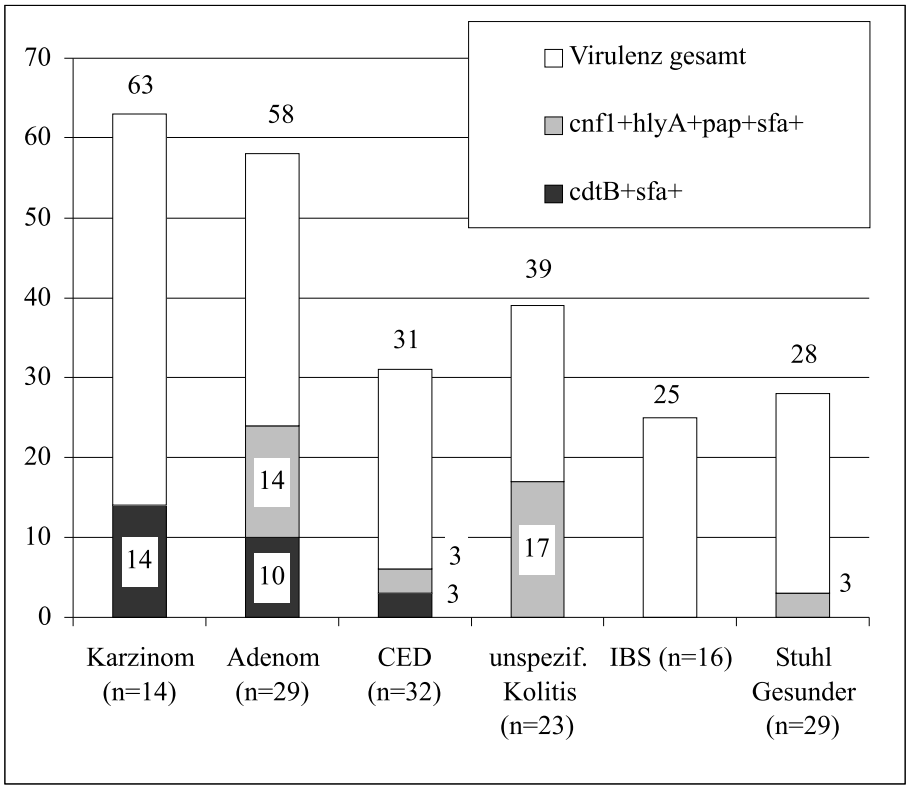


Abbildung 3.8: Häufigkeit der Genotypen cdtB+sfa+ und cnf1+hlyA+pap+sfa+ in den untersuchten Gruppen in %

- Während cnf1+hlyA+ Genotypen auch bei unspezifischer Kolitis häufig und im Stuhl vereinzelt vorhanden waren, wurden cdtB+sfa+ E.coli fast ausschließlich von Neoplasiepatienten isoliert, und zwar bei 14% der Karzinom- und 10% der Adenompatienten.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter den E.coli- Isolaten aus gewaschenen Biopsien von Patienten mit kolorektalen Neoplasien wurden keine EHEC, EIEC oder ETEC nachgewiesen. EPEC waren sehr selten (1 von 27 Patienten). Auch E.coli mit EAST-1, einem Toxin, das bei enteroaggregativen und diffus adhärierenden E.coli vorkommt, waren selten (2 von 43 Patienten).
Dagegen wurden bei 60% der Neoplasiepatienten E.coli mit Genen isoliert, die mit Sepsis, urogenitalen Infektionen und Durchfällen assoziiert sind: pap, sfa, cnf1, hlyA und cdtIIIB. Im Vergleich dazu wurden E.coli mit diesen Virulenzmerkmalen nur bei 25 bzw. 31% der Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und IBS nachgewiesen. Dieser Unterschied beruhte auf der signifikant höheren Häufigkeit sowohl von Adhäsinen als auch von Toxinen. Die Art der Biopsiebehandlung und der Isolierung der Stämme waren dabei identisch. Unter den untersuchten Virulenzfaktoren war keiner, der nur bei Patienten mit Neoplasien vorkam.
Auch im Stuhl gesunder Probanden ließen sich Virulenzfaktoren nachweisen: 28% der Probanden waren positiv für eines der Gene. Hier dominierten Stämme mit einzelnen Virulenzfaktoren, während für Neoplasiepatienten Kombinationen von Adhäsin- und Toxingenen, z.B. die Genotypen cnf+hlyA+sfa+pap+ oder cdtB+sfa+, typisch waren. Das am meisten spezifische Merkmal der Stämme von Neoplasiepatienten war der cdtB+sfa+ Genotyp. 12% der Neoplasiepatienten besaßen dieses Merkmal.
CdtIIIB-positive E.coli wurden aus den Stuhlproben nicht isoliert.
Bei 9 Patienten, die vor über einem Jahr wegen eines kolorektalen Karzinoms behandelt worden waren, war die Frequenz der Virulenzfaktoren geringer: nur bei 3 von 8 (38%) wurden virulente E.coli gefunden. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Kritik der Methode

4.1.1 Wahl der Methode PCR

Die PCR bietet im Hinblick auf die vorliegende Fragestellung den Vorteil des einfachen und sensitiven qualitativen Nachweises der genetischen Eigenschaften der Bakterien. Für den Nachweis von Virulenzeigenschaften von Bakterien besteht das grundsätzliche Problem, daß einerseits vorhandene Gene eventuell nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen exprimiert werden. Ob andererseits die Expression der Gene auch unter den natürlichen Bedingungen, unter denen die Bakterien isoliert worden waren, stattfindet, ist letztlich nur durch Nachweis in Nativpräparaten oder Toxinnachweis im Originalmaterial möglich. Durch Xia wurde eine Interaktion zwischen dem pap-Operon und den sehr verbreiteten Typ1-Fimbrien in vitro charakterisiert: die Expression des pap-Proteins inhibierte die Expression der Typ1-Fimbrien [56]. Weitere Interaktionen sind denkbar, auch die Abhängigkeit der Expression von den Umgebungsbedingungen. Die Besonderheiten des epithelnahen Milieus des Kolons sind noch nicht bestimmt worden. Die PCR zum Nachweis von Virulenzgenen kann somit die Voraussetzung für Eigenschaften des Bakteriums testen.
Unter der Bedingung, daß Stämme, die in der Elektrophorese vergleichbar starke Banden auf gleicher Höhe wie die Kontrollen zeigen, als positiv bewertet werden, ist in der Literatur eine hohe Sensitivität und Spezifität der PCR nachgewiesen worden, insbesondere, wenn die eingesetzte DNA wie hier in vergleichsweise hoher Konzentration (anders als z.B. bei der Bestimmung von viel geringeren Viruslasten im Blut) eingesetzt wurde. Daher wurde auf die anschließende Hybridisierung verzichtet. Sie brachte in vergleichbaren Untersuchungen keine weitere Verbesserung der Spezifität [3].

4.1.2 Probleme der Selektion von Stämmen

Bei der Auswahl der zu testenden E.coli–Stämme von den Primärkulturplatten wurden alle morphologisch unterschiedlichen Kolonietypen erfaßt. Das schließt nicht aus, daß Kolonien mit gleicher Morphologie unterschiedliche Gene und Virulenzmerkmale aufweisen könnten. Insofern kann die tatsächliche Frequenz virulenter Stämme größer sein als hier bestimmt. Das trifft besonders für die Adhärenzfaktoren und für cdt zu, denn hämolysierende Kolonien und damit auch die assoziierten cnf1+ Stämme sind in jedem Falle mitisoliert worden. Durch das gleiche Verfahren bei der Kultur und Isolierung der Stämme bei Patienten und gesunden Probanden ist dieser Fehler in allen Gruppen gleich stark vorhanden, und die Gruppen sind deshalb untereinander vergleichbar. Auch die Häufigkeiten von Virulenzgenen in der Literatur sind grundsätzlich nach dem Prinzip der phänotypisch-morphologischen Selektion der Stämme von jedem Individuum ermittelt worden, so daß auch hier die Vergleichbarkeit gewährleistet ist [4, 15, 32].

4.2 Prävalenz virulenter E.coli bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien

4.2.1 Vorkommen der klassischen Kategorien pathogener E.coli

E.coli-Stämme mit den Merkmalen der EHEC, EPEC, ETEC und EIEC gelten als obligate intestinale Pathogene und waren in den Isolaten nicht zu erwarten, da sie mit klinischen Symptomen und Syndromen assoziiert sind, die bei den Patienten nicht vorlagen (siehe Tabelle 4.1).
Unter 52 Isolaten von 27 Patienten mit kolorektalen Neoplasien wurden keine Stämme mit spezifischen Genen von EHEC, EIEC und ETEC gefunden. Das für EPEC typische eae-Gen wurde bei einem von 27 Patienten mit aktueller Dysplasie gefunden (4%), dagegen nicht in der Gruppe der Kolitispatienten (n=40), der IBS-Gruppe (n=14) und auch nicht im Stuhl der 29 gesunden Probanden.
Weiterhin sind eae+EAF- Stämme von Schmidt [46] im Stuhl von 2,5% gesunder Probanden (zwischen 20 und 40 Jahren) beschrieben worden. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als in einer Studie [17] das Vorkommen von eae positiven Bakterien bei 60% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen beschrieben wurde. Dabei wurde DNA aus post mortem gewonnenen, histologischen Kolonschnitten isoliert und in die PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer erfaßten sowohl das eae-Gen von E.coli als auch das von Citrobacter freundii, einem fakultativ pathogenen Keim aus der Familie der Enterobacteriaceae, sodaß das Vorkommen von EPEC-Stämmen bei diesen Patienten nicht sicher ist. Auch wurden in dieser Untersuchung keine Kontrollen Gesunder mitgeführt, die Frequenz von Citro-

	assoziierte genetische Merkmale	assoziierte Krankheitsbilder
EHEC	eae, stx	hämolytisch-urämisches Syndrom, thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
EPEC	eae	epidemischer Durchfall besonders bei Kindern
EIEC	ipaH	Dysenterie
ETEC	st, lt	Reisedurchfall

Tabelle 4.1: Klassische Kategorien pathogener E.coli und ihre assoziierten klinischen Syndrome

bacter sp. könnte ja auch normal sein. Der Befund zeigt aber, daß eventuell auch Citrobacter sp. die Kolonmukosa von Krebspatienten vermehrt besiedeln kann und daß eine Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung und den vorausgegangenen Behandlungen existieren könnte.

Zusammenfassung. 4% der Dysplasiepatienten waren mit EPEC-Stämmen besiedelt. Das entspricht der in der Literatur angegebenen Frequenz im Stuhl gesunder Erwachsener [46] und ist kein Merkmal dieser Patientengruppe.

4.2.2 Cytolethal distending toxin

Cdt positive Stämme wurden nicht bei IBS-Patienten und gesunden Probanden, sondern ausschließlich bei Patienten mit Entzündungen oder Neoplasien gefunden. Von 10 Patienten mit cdt- positiven Stämmen waren 4 Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung mit Adenom und 2 Patienten mit Karzinom, 1 Patient, der nach Resektion eines Karzinoms mehr als 1 Jahr dysplasiefrei war, je 1 Patient mit Morbus Crohn und unspezifischer Colitis, sowie 2 Patienten mit Colitis ulcerosa, davon einer mit Zustand nach mehrfacher Entfernung von Adenomen.

Die Frequenz dieser E.coli bei den Patienten übertrifft deutlich die wenigen Vergleichswerte, die bisher bekannt waren. Bouzari hatte 1992 in Bangladesch bei 215 gesunden Kindern unter 5 Jahren 2 (0,93%) mit cdt- positiven Stämmen festgestellt (durch Hybridisierung von 3 Stämmen pro Patient) [4]. Die Untersuchung

der gesunden Probanden deutet darauf hin, daß auch bei gesunden Erwachsenen allenfalls mit einer geringen Frequenz zu rechnen ist. Unter 29 gesunden Individuen war keines mit einem positiven Isolat. In derselben Studie wurden cdt- positive Stämme bei 3,1% der Kinder mit infektiöser Enteritis gefunden, und diese trugen ausschließlich genetische Marker von EPEC und EAggEC, die für Enteritis bei Kindern häufig verantwortlich sind. Cdt war hier nicht signifikant erhöht und bestimmte wahrscheinlich nicht allein die Pathogenese. Eine Assoziation mit EPEC ist in mehreren Studien untersucht worden, ist aber kein regelmäßiger Befund: CDT kommt in 2-6% der EPEC vor und in 1,5% von Stämmen unabhängig vom Patho- und Serotyp [39]. Vor diesem Hintergrund ist das Vorkommen von cdt bei 14% der Patienten mit aktuellen Dysplasien (n=43) ein besonderer Befund.

Abgesehen von der Häufung bei Kindern mit Durchfall und dem typischen zytotoxischen Zellkulturbefund, wird die Pathogenität von cdt aus Tiermodellen abgeleitet: Inokulation von Mäusen mit Bakterien oder gereinigtem Toxin führt zu starkem Durchfall bei den Tieren innerhalb von 24 Stunden. Interessanterweise zeigen diese Tiere histologisch Nekrosen und reparative Hyperplasie des Kolonepithels, während Jejunum und Ileum histologisch unauffällig bleiben. Alle bisherigen Tiermodelle gingen von einer Infektion nach dem Modell toxinproduzierender E.coli (wie ETEC) aus. Welchen Einfluß hat CDT aber, wenn es Produkt der residenten Darmflora ist?

Für den Nachweis von cdt auf genetischer Ebene wurden Primer für den konserviertesten Abschnitt des Gens (cdtB) benutzt, mit ihm lassen sich die bisher bekannten CDTI, II und III nachweisen. CDTI zeigt nur 84% Identität im Bindungsbereich der Primer und wurde deshalb zusätzlich mit einem spezifischen Primerpaar des cdtA Genabschnitts gesucht. Alle positiven Isolate waren für beide Primerpaare positiv, sodaß die gefundenen Isolate cdtI-ähnliche Sequenzen haben könnten. Obwohl die Sequenzen von cdt zwischen E.coli sehr unterschiedlich sein können, besteht doch 99% Identität zwischen cdtI von E.coli und dem cdt von Shigella dysenterii, was auf die enge Verwandtschaft und ähnliche Pathogenese der Durchfälle hinweisen könnte [34]. Dabei wäre interessant, ob sich die Sequenzen der Isolate der Dysplasiepatienten und der Kolitispatienten unterscheiden von solchen, die bei akuten Durchfällen gefunden wurden.

Die gefundene Assoziation von cdt mit dem S-Fimbrien-Antigen (sfa) ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Von 10 Patienten mit cdt-positiven Stämmen (6 Dysplasie-, 3 CED-Patienten und 1 Patient mit unspezifischer Kolitis) waren 6, bei denen cdt mit sfa assoziiert war (5 Dysplasiepatienten, 1 Patient mit Morbus Crohn).

Die Frage, inwieweit das Auftreten von cdt bei Adenom- und Karzinompatienten ursächlich mit der Erkrankung im Zusammenhang steht oder aber als Baustein in der Pathogenese auftritt, bleibt unbeantwortet, doch sind in beiden Fällen ver-

schiedene Möglichkeiten denkbar:

1. Aufgrund einer Veränderung und Vermehrung der gesamten epithelnahen Flora besiedeln adhärente E.coli vermehrt die neue ökologische Nische und bringen dabei Toxine mit, mit denen sie genetisch assoziiert sind.

2. Cdt könnte das Mikromilieu beeinflussen: falls es bei cdt-positiven Patienten in wirksamer Menge produziert wird, könnte es durch seine antiproliferative Aktivität das Epithel verändern oder auch immunsuppressiv wirken, wie es im T-Zell-Assay für das cdt von Actinobacillus actinomycetemcomitans gezeigt worden ist [49] (siehe Abbildung 4.1).

3. Cdt könnte ein Begleiter eines weiteren noch nicht identifizierten Virulenzfaktors sein.

4. Die genetische Ähnlichkeit von cdt1 von E.coli und dem cdt von Shigella spp. [35] könnte ein Hinweis auf eine intrazelluläre Wirkungsweise sein. Cdt ist für die Shigellose nicht notwendig, könnte aber die Pathogenese unterstützen.

4.2.3 Cytotoxic necrotizing factor 1

Die gefundene Prävalenz von cnf1+hlyA+ Stämmen bei gesunden Probanden stimmt gut mit der Literatur überein. Bei 2 von 29 wurden Stämme gefunden, die beide Gene trugen, bei einem weiteren ein nur cnf1-positiver Stamm (7 und 10% der Probanden). Durch Hilali wurden 70 gesunde Freiwillige untersucht und dabei bei 4 Personen cnf1 und hlyA gefunden (6%)[15]. Auch andere Studien zeigen ähnliche Prävalenzen (zum Beispiel bei Guyer:11% [14]). Die Assoziation der beiden Faktoren ist typisch, eventuell liegt eine Pathogenitätsinsel vor, in der auch Adhäsionsproteine wie pap und sfa kodiert sind [14]. Auch in unseren Isolaten finden sich bei allen cnf1- positiven Stämmen auch ein Hämolysin A-Gen und eine Hämolyse in der Kultur. Hämolysin ohne cnf1 kam bei 9 von 134 Patienten und über alle Gruppen verteilt vor. Eine ähnliche bzw. geringere Frequenz als im Stuhl wiesen Patienten mit Karzinomen (7%), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (10%) und IBS-Patienten (0%) auf. cnf1+hlyA+ Stämme waren dagegen bei Adenompatienten und Patienten mit unspezifischer Kolitis wesentlich häufiger (24 und 22%). Die Häufigkeit bei Adenompatienten ist auch deshalb von Bedeutung, weil eine Behinderung der Apoptose durch cnf1 in Zellkulturen beschrieben worden ist (siehe Abbildung 4.2).
Als Humanpathogene sind cnf+hlyA+ E.coli bisher hauptsächlich bei Harnwegsinfektionen und Bakteriämien isoliert worden. Die Prävalenz der Faktoren wird

bei diesen Erkrankungen zwischen 58 und 80% angegeben [14], also deutlich häufiger als in dieser Untersuchung. Die pathophysiologischen Modelle beider Erkrankungen gehen von einer intestinalen Quelle der Bakterien aus (aszendierender Infektionsweg bzw. Translokation durch die Darmwand).

Beide Wege erfordern das Vorhandensein der Toxine und ihrer assoziierten Adhäsine sfa und pap. Obwohl aber virulente Stämme regelmäßig im Stuhl Gesunder vorkommen, werden nicht alle Träger krank - es müssen weitere Prädispositionen vorliegen. Frauen, Diabetiker und Patienten mit transurethralem Blasenkatheter sind für Harnwegsinfektionen prädisponiert. Bakteriämien treten durch eine Translokation aus dem Darm als Folge intensivmedizinischer Komplikationen von Primärerkrankungen auf.

Translokationen sind bei Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen schon seit Jahrzehnten beobachtet worden. Hilali beschrieb das Auftreten von cnf+hlyA+ Stämmen bei 23% der Patienten mit E.coli-Sepsis und maligner Grunderkrankung [15]. Die Häufigkeit war unabhängig von der Art der Malignität (solide Tumoren, Leukämien, Lymphome) und von der Immunsuppression (gemessen an der Zahl neutrophiler Granulozyten), was dafür spricht, daß für die Überwindung der Darmbarriere Virulenzfaktoren vorteilhaft sind.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Mukosa von Patienten mit verschiedenen Darmerkrankungen unterschiedlich häufig mit diesem Pathogen besiedelt ist. Besonders bei Patienten mit Adenomen und unspezifischer Kolitis könnte so eine stärkere Voraussetzung zur Translokation durch die Darmwand bestehen. Insbesondere da die virulenten Bakterien die Mukosa direkt besiedeln und in Kontakt mit dem Epithel kommen. Mit dieser unterschiedlichen Lokalisation der Flora (epithelnah oder intraluminal) könnte erklärt werden, warum die Besiedlung mit cnf+hlyA+ Stämmen symptomlos verlaufen kann.

Alle erhobenen Befunde waren unabhängig vom Ort der Isolation der Bakterien, was dafür spricht, daß bei der Karzinomentstehung im Kolon mit einer generellen Veränderung der Besiedlung einhergeht (Virulenz, Lokalisation, Anzahl) und kein ausschließlich fokal begrenzter Prozeß ist.

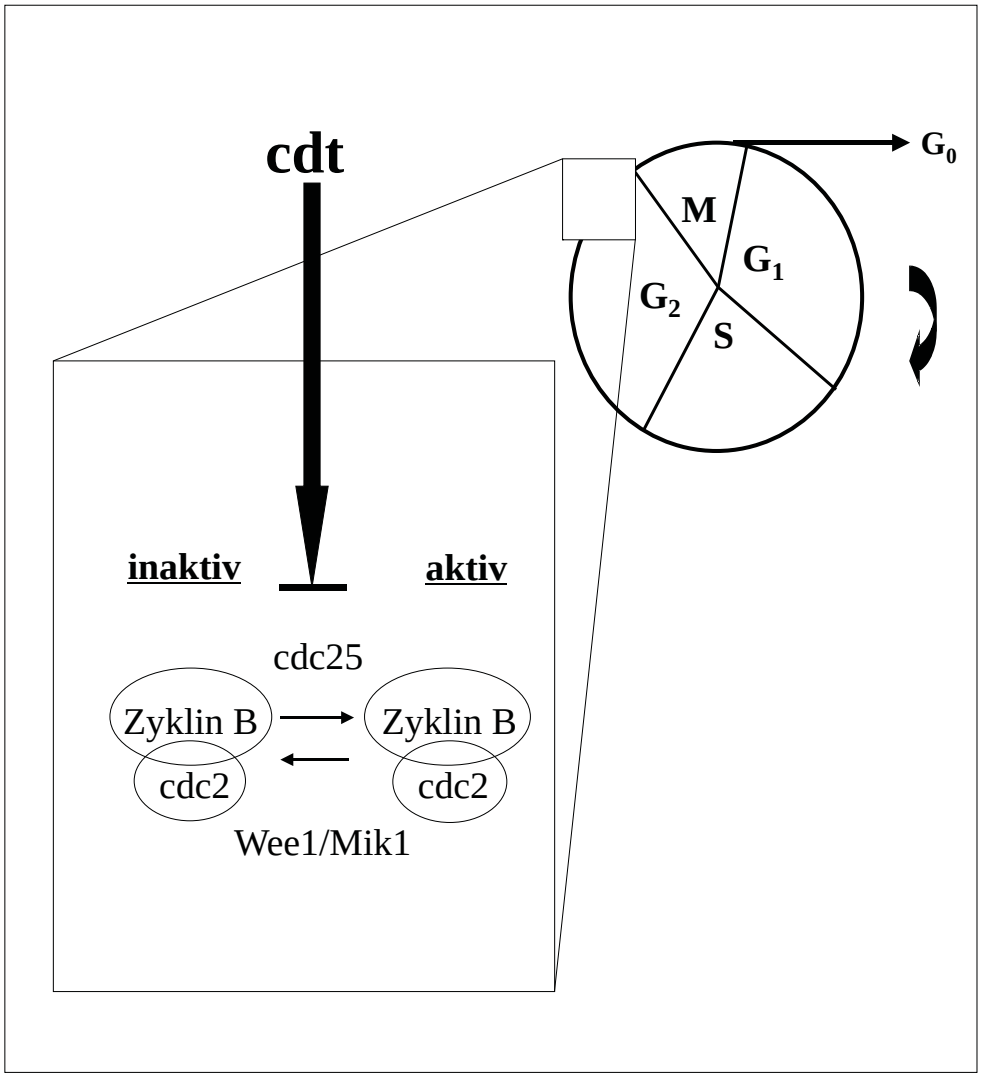


Abbildung 4.1: CDT (cytolethal distending toxin) blockiert den Zellzyklus mehrerer Zelllinien beim Übergang von der G_2-Phase zur Mitosephase. Der Komplex von Zyklin B und der zyklinabhängigen Kinase 2 (cdc2) wird nicht mehr aktiviert. Es ist nicht bekannt, ob die aktivierende zyklinabhängige Kinase 25 vermindert wirkt oder die Inaktivatoren wie die Tyrosinkinasen Wee1 oder Mik1 überwiegen und an welchen Regulatorproteienen das Toxin genau angreift. Abbildung nach Pickett [39].

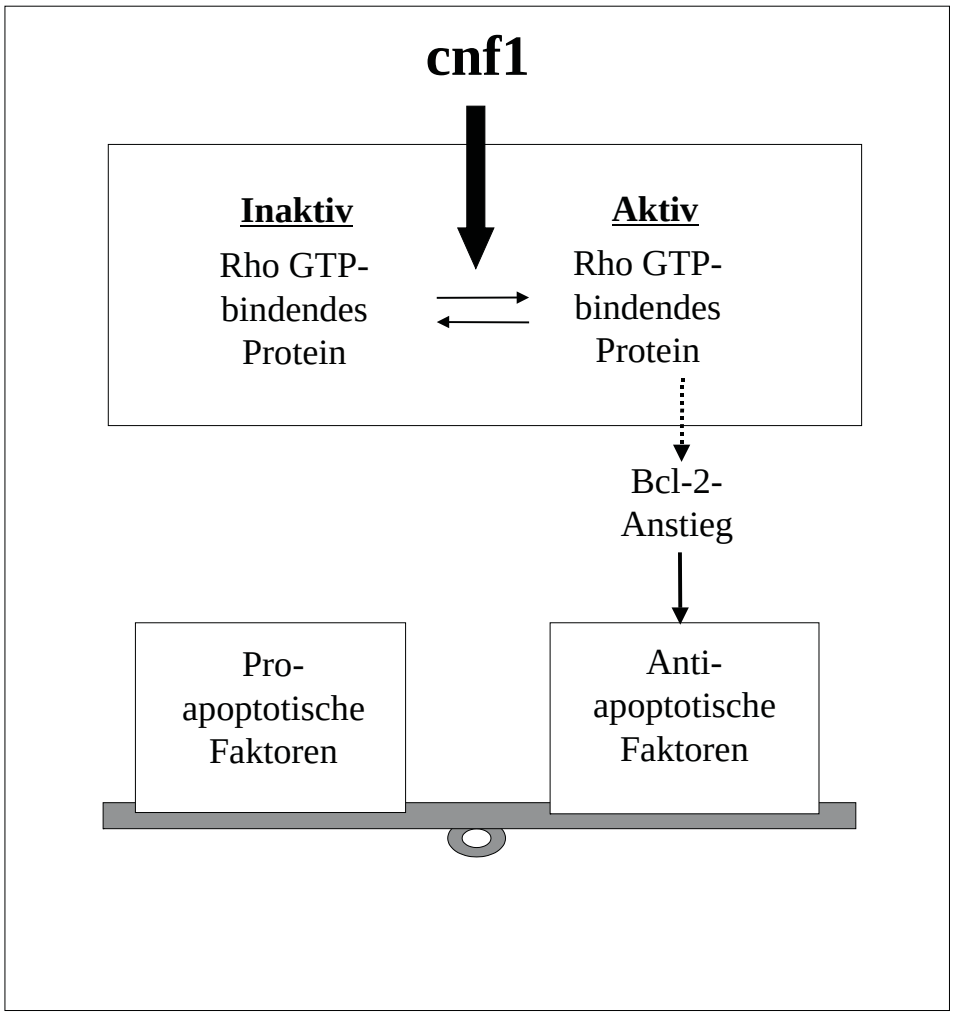


Abbildung 4.2: CNF1 (cytotoxic necrotizing factor 1) aktiviert in der HeLa-Zellkultur das Rho GTP-bindende Protein. In der Folge kommt es zu einem Anstieg antiapoptotischer Proteine und zur signifikanten Verhinderung der Apoptose nach Bestrahlung mit UVB. Abbildung nach Fiorentini, Lacerda, Hilali [11, 15, 25].

4.3 Zusammenfassung der Diskussion

Die Bedeutung der bakteriellen Darmbesiedlung bei Patienten mit Neoplasien ist noch nicht vollständig bekannt. Die heutigen Hypothesen betonen die Bedeutung der Flora bei der Umsetzung von Nahrungsstoffen oder mit der Galle sezernierten Stoffen zu Karzinogenen und erklären so den epidemiologischen Befund, daß das Risiko stark von Umweltfaktoren getragen wird.
Daß die Entstehung von Adenomen an mehreren Stellen des Dickdarms gleichzeitig stattfinden kann und mit einer hohen Rezidivrate gerechnet werden muß, unterstreicht die These, daß eine Veränderung in der gesamten Dickdarmmukosa vorliegt.
Viele Autoren haben versucht, die Besonderheiten in der Zusammensetzung der Flora und ihrer Enzyme zu bestimmen. Es wurden aber keine wegweisenden Veränderungen gefunden. Die Beschreibung einer mukosaassoziierten Flora bei Adenom- und Karzinompatienten erfolgte 1998 [51]. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß in der Besiedlung des Darms bei diesen Patienten eine generelle Veränderung vorliegt. Die Virulenzbestimmung der isolierten E.coli unterstützt diese Ergebnisse. Unabhängig vom Ort der Dysplasie isolierte Stämme zeigten signifikant häufiger Virulenzeigenschaften als Isolate aus den Vergleichsgruppen. Sowohl Adenom- als auch Karzinompatienten besitzen diese Flora und unterscheiden sich kaum in der Verteilung von Virulenzfaktoren. Es ist ein Merkmal, das für beide Erkrankungen zutrifft. Der hohe Anteil von Patienten mit adhärenten E.coli (53%) könnte die stärkere Besiedlung dieser Patienten erklären. Welche Wirkung die Anwesenheit der Adhäsine und Toxine auf die Mukosa hat, ist unklar. Daß eine Interaktion mit Zellen der Mukosa vorkommen könnte, zeigen Zellkulturen. Die Toxine cnf1 und cdt haben in vitro zytotoxische Eigenschaften und interagieren mit dem Zellzyklus (siehe Abbildungen 4.1 und 4.2).

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Ätiologie kolorektaler Dysplasien ist noch nicht bekannt, obwohl die Beteiligung von Umweltfaktoren wie der Ernährung an ihrer Entstehung durch epidemiologische Studien gut untersucht und belegt ist. Ein Einfluß der Darmflora und ihrer karzinogenen Stoffwechselprodukte wird vermutet.
Eine Besonderheit dieser Patienten besteht in der starken bakteriellen Besiedlung ihrer Kolonmukosa. Durch das Anlegen von Bakterienkulturen aus der Waschlösung mehrfach gewaschener und schließlich hypoton lysierter Kolonbiopsien, quantitative PCR mit universellen Primerpaaren und Sequenzierung wurde bei ihnen eine bakterielle Flora beschrieben, die bei gesunden Menschen nicht existiert. Dabei wurde E.coli als konstanter Bestandteil dieser Flora identifiziert.
Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Virulenzfaktoren von E.coli, die nach diesem Verfahren aus Kolonbiopsien von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen gewonnen worden waren. Es sollte untersucht werden, ob qualitativ oder quantitativ Unterschiede in der Besiedlung von Patienten mit Dysplasien und Patienten mit anderen Erkrankungen des Kolons sowie zur Stuhlflora Gesunder bestehen.
Untersucht wurden Isolate von 14 Patienten mit kolorektalen Karzinomen, 29 Patienten mit kolorektalen Adenomen, 55 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (M.Crohn, Colitis ulcerosa, unspezifische Kolitis), 16 Patienten mit Colon irritabile (IBS) und aus Stuhlproben von 29 gesunden Probanden.
Die Gewinnung der Isolate erfolgte unter den gleichen Kriterien. Die PCR wurde mit spezifischen Primerpaaren bekannter Virulenzfaktoren obligat pathogener E.coli oder solcher Virulenzfaktoren durchgeführt, die mit Erkrankungen wie Harnwegsinfekten oder Sepsis beim Menschen assoziiert sind.
Unter den Isolaten von Patienten mit kolorektalen Dysplasien wurden keine Faktoren gefunden, die enteropathogenen, enterotoxischen, enteroinvasiven oder enterohämorrhagischen E.coli zugeordnet werden. Weitere Virulenzfaktoren fakultativ pathogener E.coli waren bei Dysplasiepatienten insgesamt signifikant häufi-

ger als bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und IBS und auch als in Stuhlproben Gesunder. Der Unterschied beruhte auf einer höheren Häufigkeit der Adhäsine pap (pyelonephritis-assoziierter Pilus) und sfa (s-Fimbrienantigen) sowie der Toxine cnf1 (cytotoxic necrotizing factor 1), cdt (cytolethal distending toxin) und Hämolysin A. Bei Betrachtung der einzelnen Faktoren waren die Unterschiede nur für den Adhäsionspilus pap signifikant.
Aber auch der Anteil von Patienten mit Stämmen, die Adhäsine und Toxine gleichzeitig trugen, war bei den Neoplasiepatienten größer als in den anderen Gruppen. Im Gegensatz zu den anderen Faktoren wurde cdt (cytolethal distending toxin) im Stuhl Gesunder nicht gefunden, dagegen bei 14% der Dysplasiepatienten. Es bestanden keine Unterschiede in der Virulenz zwischen Adenom- und Karzinompatienten.
Diese Ergebnisse zeigen, daß die starke bakterielle Besiedlung der Kolonmukosa bei Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen auch mit einer höheren Häufigkeit virulenter E.coli einhergeht. Bei den meisten Patienten handelt es sich um Faktoren, die auch in der Stuhlflora Gesunder vorkommen. Die Verteilung der Faktoren spricht dafür, daß die Patienten jeweils mit verschiedenen virulenten Stämmen besiedelt sind. Ein einzelnes Pathogen konnte nicht gefunden werden.
Bei 14% dieser Patienten wurde cdt gefunden, das in der Flora Gesunder nicht vertreten war. Dieses Toxin kann, wie auch cnf1 (cytotoxic necrotizing factor 1) in vitro mit dem Zellzyklus mehrerer Zelllinien interagieren. Ob dieser Zusammenhang eine Bedeutung in der Pathogenese der Dysplasien hat, ist unklar.

Literaturverzeichnis

[1] AL-TAIE, O. et al.: *Hereditäres Non-polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC): aktuelle Übersicht zur Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie*. Med Klin, 96(9):529–38, 2001.

[2] BHAKDI, S. et al.: *Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins*. Arch Microbiol, 165:73–9, 1996.

[3] BOUGUENEC, C. LE et al.: *Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains by polymerase chain reaction*. J Clin Microb, 30(5):1189–93, 1992.

[4] BOUZARI, S. et al.: *In vitro adherence property of cytolethal distending toxin (cldt) producing EPEC strains and effect of the toxin on rabbit intestine*. Microb Pathog, 12(2):153–57, 1992.

[5] BUYSSE, J.M. et al.: *Genetic polymorphism of the ipaH multicopy anigene gene in Shigella spps. and enteroinvasive Escherichia coli*. Microb Pathog, 17:335–49, 1995.

[6] CAPRIOLI, A. et al.: *Partial purification and characterization of an Escherichia coli toxic factor that induces morphological alterations*. Infect Immun, 39:1300–06, 1983.

[7] COLLINS, R.H., JR.: *Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. A critical review*. N Engl J Med, 316:1654–58, 1987.

[8] COMAYRAS, CHRYSTEL et al.: *Escherichia coli cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation*. Infect Immun, 65(12):5088–95, 1997.

[9] FEARON, E. R. and B. VOGELSTEIN: *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 61:759–67, 1990.

[10] FIORENTINI, C. et al.: *Hinderance of apoptosis and phagocytic behaviour induced by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: two related activities in epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 241:341–46, 1997.

[11] FIORENTINI, C. et al.: *Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis*. Exp Cell Res, 242:341–50, 1998.

[12] FOOD, NUTRITION and THE PREVENTION OF CANCER: A GLOBAL PERSPECTIVE: *World Cancer Research Fund*. 1997.

[13] GREENSTEIN, A. J. et al.: *A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Cancer, 48:2742–45, 1981.

[14] GUYER, D.M. et al.: *Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic Escherichia coli CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and catheter-associated bacteriuria and from fecal samples*. Infect Immun, 66(9):4411–17, 1998.

[15] HILALI, F. et al.: *Prevalence of virulence genes and clonality in Escherichia coli strains that cause bacteremia in cancer patients*. Infect Immun, 68(7):3983–89, 2000.

[16] HOFMAN, P. et al.: *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 effaces microvilli and decreases transmigration of polymorphonuclear leukocytes in intestinal T84 epithelial cell monolayers*. Infect Immun, 66(6):2494–2500, 1998.

[17] HUBBARD, A. L.: *Direct detection of eae-positive bacteria in human and veterinary colorectal specimens by PCR*. J Clin Microb, 36:2326–30, 1998.

[18] INOUE, Y. et al.: *Direct isolation of Inoue-Melnick virus from human colorectal carcinoma tissues but not from stomach carcinoma tissues*. J Med Virol, 25(4):250–52, 1991.

[19] ITO, M. et al.: *Isolation of Inoue-Melnick virus from colorectal carcinoma tissues*. Cancer, 71(6):1960–63, 1993.

[20] JANSSEN, T. et al.: *Virulence-associated genes in avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis*. Int J Med Microbiol, 291(5):371–78, 2001.

[21] JOHNSON, W. M. and H. LIOR: *cdt*. FEMS Microbiol Lett, 43:19–23, 1987.

[22] KARCH, H. and T. MEYER: *Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, 27(12):2751–57, 1989.

[23] KOULOS, J. et al.: *Human papillomavirus detection in adenocarcinoma of the anus*. Mod Pathol, 4(1):58–61, 1991.

[24] KREBS IN DEUTSCHLAND: *Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland*. 2., aktualisierte Ausgabe, 1999.

[25] LACERDA, H.M. et al.: *Cytotoxic necrotizing factor 1 from Escherichia coli and dermonecrotic toxin from Bordetella bronchiseptica induce p21 rho-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 cells*. J Biol Chem, 272(14):9587–96, 1997.

[26] LENNARD-JONES, J.E. et al.: *Cancer in colitis: assessment of the individual risk by clinical and histological criteria*. Gastroenterology, 73:1280–89, 1977.

[27] LENNARD-JONES, J.E. et al.: *Cancer risk in ulcerative colitis: surveillance or surgery*. Br J Surg, 72S:84–86, 1985.

[28] MACKOWIAK, P. A.: *The normal microbial flora*. N Engl J Med, 307(2):83–93, 1982.

[29] MAINIL, J.G. et al.: *Presence of pap-, sfa-, and afa- related sepuences in necrotoxigenic escherichia coli isolates from cattle: evidence for new variants of the afa family*. Can J Vet Res, 61:193–99, 1997.

[30] MAYER, R.J. (HRSG.): *Harrisons Innere Medizin*. Übersetzung der 14. Auflage, Kapitel Maligne Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Seiten 677-688, McGraw-Hill, 1999.

[31] MOSS, S. et al.: *Helicobacter pylori seroprevalence and colorectal neoplasia: evidence against an association*. J Natl Cancer Inst, 87(10):762–63, 1995.

[32] NATARO, J.P. and J.B. KAPER: *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microb Rev, 11(1):142–201, 1998.

[33] NORFLEET, R. et al.: *Streptococcus bovis does not selectively colonize colorectal cancer and polyps*. J Clin Gastroenterol, 1(17):25–28, 1993.

[34] OKUDA, J. et al.: *Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (cdtA) among species of Shigella and Vibrio, and cloning and sequencing of the cdt gene from Shigella dysenteriae*. Microb Pathog, 18:167–72, 1995.

[35] OKUDA, J. et al.: *Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the cdtABC genes of Shigella dysenteriae*. Infect Immun, 65(2):428–33, 1997.

[36] PARSONNET, J. et al.: *Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma*. N Engl J Med, 330:1267–71, 1994.

[37] PICKETT, C. B. et al.: *Prevalence of cytolethal distending toxin production in Campylobacter jejuni and relatedness of Campylobacter spp. cdtB genes*. Infect Immun, 64(6):2070–78, 1996.

[38] PICKETT, C. L. et al.: *Cloning, sequencing, and expression of the Escherichia coli cytolethal distending toxin genes*. Infect Immun, 62(3):1046–51, 1994.

[39] PICKETT, C. L. et al.: *The cytolethal distending toxin family*. Trends Microbiol, 7(7):292–97, 1999.

[40] PORTNOY, D. A. et al.: *Molecular determinants of Listeria monocytogenes pathogenesis*. Infect Immun, 60:1263–67, 1992.

[41] POTTER, M. et al.: *A prospective controlled study of the association of Streptococcus bovis with colorectal carcinoma*. J Clin Pathol, 51(6):473–74, 1998.

[42] PÉRÈS, S. Y. et al.: *A new cytolethal distending toxin (CDT) from Escherichia coli producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase*. Mol Microbiol, 24(5):1095–1107, 1997.

[43] RIEDE, U.-N. UND SCHAEFER, H.-E. (HRSG.): *Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999.

[44] SAHM, S. UND CASPARY, W. (HRSG.): *Gastroenterologische Onkologie*. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbG, Stuttgart, Germany, 1998.

[45] SAULNIER, P. et al.: *Single-step polymerse chain reaction for combined gene detection and epidemiological typing in three bacterial models*. FEMS Microbiol Lett, 150:311–16, 1997.

[46] SCHMIDT, H. et al.: *Prevalence of attaching and effacing Escherichia coli in stool samples from patients and controls*. Zentralbl Bakteriol, 281:201–13, 1994.

[47] SCOTT, D.A. and J.B. KAPER: *Cloning and sequencing of the genes encoding Escherichia coli cytolethal distending toxin*. Infect Immun, 62(1):244–51, 1994.

[48] SHAH, K. et al.: *Investigaion of colon cancers for human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction*. J Surg Oncol, 51(1):5–7, 1997.

[49] SHENKER, B.J. et al.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells*. J Immun, 162:4773–80, 1999.

[50] SOLIMAN, A. S. et al.: *Contrasting molecular pathology of colorectal carcinoma in Egyptian and Western patients*. Brit J Cancer, 85(7):1037–46, 2001.

[51] SWIDSINSKI, A. et al.: *Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer*. Gastroenterology, 115:281–86, 1998.

[52] VILA, J.: *A case-control study of diarrhoea in children caused by Escherichia coli producing heat-stable enterotoxin (EAST-1)*. J Med Microbiol, 47(10):889–91, 1998.

[53] WELCH, R. A.: *Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria*. Mol Microbiol, 5:521–29, 1991.

[54] WIELER, L. H.: *Bestimmung von Virulenzfaktoren boviner Shiga-toxin-bildender Escherichia coli (STEC-) Stämme als Bewertungsgrundlage ihrer klinischen Bedeutung für Rind und Mensch*. Habilitation, Universität Giessen, 1997.

[55] WIELER, L. H. et al.: *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes*. J Clin Microbiol, 34(12):2980–84, 1996.

[56] XIA, Y. et al.: *Regulatory cross-talk between adhesin operons in Escherichia coli: inhibition of type 1 fimbriae expression by the papB protein*. EMBO J, 19(7):1450–57, 2000.

[57] YAMAMOTO, T. et al.: *The sequences of enterohemorrhagic Escherichia coli and Yersinia pestis that are homologous to the enteroaggregative E.coli*. FEBS Lett, 472:22–26, 2000.

Anhang A

Tabellen

A.1 Altersverteilung der Patienten

	Alter der Patienten und Probanden in Jahren	**durchschnittliches Alter in Jahren**	**Geschlecht**	
			weiblich	**männlich**
Karzinom (n=14)	44 . . . 88	63,2	6	8
Adenom (n=29)	48 . . . 86	62,4	16	13
ohne neue Dysplasie (n=9)	50 . . . 80	65,2	3	6
CED (n=32)	17 . . . 68	38,4	15	17
unspezifische Kolitis (n=23)	19 . . . 81	46,1	13	10
IBS (n=16)	24 . . . 75	49,6	8	8
Probanden (n=29)	19 . . . 80	36,2	13	16

Tabelle A.1: Altersverteilung

A.2 Anzahl isolierter E.coli Stämme in den Patientengruppen

	Anzahl Biopsien	**Anzahl Stuhlproben**	**Anzahl isolierter E.coli Stämme**	**isolierte E.coli Stämme pro Patient/ Proband**
Karzinom (n=14)	15	xxx	24	1,71
Adenom (n=29)	32	xxx	62	2,27
ohne neue Dysplasie (n=9)	10	xxx	12	1,33
CED (n=32)	35	xxx	43	1,34
unspezifische Kolitis (n=23)	25	xxx	33	1,43
IBS (n=16)	16	xxx	19	1,19
Probanden (n=29)	xxx	29	59	2,03

Tabelle A.2: Anzahl isolierter E.coli in den Patientengruppen und bei den gesunden Probanden

A.3 Häufigkeiten und Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen

	Toxine				Adhäsine			Virulenz-faktoren gesamt
	cdtB	**cnf1**	**hlyA**	**gesamt**	**sfa**	**pap**	**gesamt**	
Dysplasie (n=43)	6	7	10	15	13	19	23	26
p[a)]	ns	ns	ns	$p < 0.05$	ns	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Karzinompatienten über 1 Jahr ohne neue Dysplasie (n=9)	1	0	1	1	1	2	2	3
p[b)]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CED/IBS/unspez. Kolitis (n=71)	4	8	9	13	12	16	21	23
p[c)]	ns	ns	ns	$p < 0.05$	ns	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Gesunde (n=29)	0	3	2	4	4	3	7	9

Nullhypothesen a) Dieser Virulenzfaktor ist in den Biopsien von Dysplasiepatienten ebensohäufig wie im Stuhl gesunder Probanden vertreten.
b) Die Häufigkeit dieses Faktors ist in den Biopsien von Patienten mit Dysplasien und solchen, die über 1 Jahr rezidivfrei waren, gleich.
c) Die Häufigkeit dieses Faktors in Biopsien ist bei Patienten mit Dysplasien und mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder IBS gleich.
Ein p-Wert< 0.05, ermittelt mit dem χ^2-Test, gilt als signifikant

Tabelle A.3: Ergebnisse und Signifikanz der ermittelten Unterschiede in der Häufigkeit der Virulenzfaktoren zwischen Patienten mit Dysplasien, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und IBS und Stuhlproben gesunder Probanden

Anhang B

Benutzte Hilfsmittel

Geräte	Firma, Herstellungsland
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Bundesrepublik Deutschland
Thermocycler	Crocodile II, Appligene Inc., Pleasanton, CA, USA
Kodak DC40 Camera	Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA
UV-Lampe	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Bundesrepublik Deutschland
Elektrophoresekammer	Mupid-2, Cosmo Bio Co. Ltd., Tokio, Japan
Mac Conkey-, Schaedler-, Enterokokken-, Sabauraud-Agarplatten	Heipha Diagnostika, Heidelberg, Germany
Impfösen 10μl	Greiner Labortechnik GmbH, Kremsmünster, Österreich
Microbanksystem	TM Mast Diagnostica, Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfeld, Bundesrepublik Deutschland

Tabelle B.1: Geräte

Materialien	**Firma, Herstellungsland**
Isotone Natriumchlorid-lösung	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Bundesrepublik Deutschland
AnaeroGen Compact	OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom
Api-Testkits rapid ID 32A STREP, API 20 E, rapid 20 E	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Bundesrepublik Deutschland
Gramfärbungslösungen	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Amplitaq DNA Polymerase	Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc. Branchburg, New Jersey, USA
Primerpaare	MWG-BIOTECH GmbH, Ebersberg, Germany
DNTPs	GeneAmp dNTPs, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Mineral Oil for Molecular Biology	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Agarose SERVA standard EEO	SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg/New York
Ethidiumbromidlösung 1% (10mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland

Tabelle B.2: Materialien

Lebenslauf

Name:	Andrej Gudzuhn
geboren am:	23.Juli 1974
in:	Berlin
Juli 1994	Abitur am Gymnasium „Georg Friedrich Händel“ in Berlin
September 1994 bis November 1995	Zivildienst an der Charité Berlin
April 1996 bis Oktober 1996	Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Fachrichtung Physik
seit Oktober 1996	Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Fachrichtung Humanmedizin
August 1999	1. Staatsexamen
seit Oktober 1999	Mitarbeiter im molekulargenetischen Labor von Dr. Alexander Swidsinski in der Inneren Klinik IV, Schwerpunkt Endokrinologie, Hepatologie, Gastroenterologie der Charité Berlin

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt zu haben. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Andrej Gudzuhn