

**Aus dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische
Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
(Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)**

Leiter: Professor Dr. M. Schwab

**Messung antimikrobieller Aktivität als Marker für
chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Nathalie Adam, geb. Schelemetjewa

aus

Smeinogorsk/Russland

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Schwab

2. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Peschl

Meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

1	Einleitung	1
1.1	Fallbeispiel	1
1.2	Der Gastrointestinaltrakt	2
1.3	Die bakterielle Flora	5
1.3.1	Mikrobielle Besiedelung des gesunden Menschen	5
1.3.2	Die bakterielle Flora und der Gastrointestinaltrakt	6
1.3.3	Escherichia coli	6
1.4	Antibakterielle Peptide im Intestinaltrakt	8
1.4.1	Vorkommen und Funktion	8
1.5	Defensine	9
1.5.1	Struktur und Funktion	9
1.5.2	α -Defensine	10
1.5.3	β -Defensine	11
1.6	Weitere antimikrobielle Peptide	12
1.6.1	Cathelicidine	12
1.6.2	BPI	13
1.6.3	Elafin	14
1.6.4	SLPI	14
1.7	Das Immunsystem des Darms	15
1.7.1	Dysregulation der angeborenen Immunität	16
1.8	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	16
1.8.1	Geschichte	16
1.8.2	Klinik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa	17
1.8.3	Die Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	22
1.9	Fragestellung und Ziel der Arbeit	24

2	Material	25
2.1	Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien für die Aufarbeitung der Stuhlproben.....	25
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien für die Messung der antimikrobiellen Aktivität mittels FACS-Analyse	26
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien für den Radialdiffusionsassay	26
2.1.4	Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.5	Verwendete Lösungen	27
2.2	Biologisches Material	27
2.2.1	Stuhlproben.....	27
2.2.2	Bakterien.....	28
2.3	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel	28
2.3.1	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel für die Aufarbeitung der Proben	28
2.4	Geräte	29
2.4.1	Geräte für die Aufarbeitung der Proben	29
2.4.2	Geräte für die Messung der antimikrobiellen Aktivität mittels FACS-Gerät (Durchflusszytometrie).....	30
2.4.3	Geräte für den Radialdiffusionsassay	30
2.4.4	Geräte für den Calprotectin-Assay.....	31
2.5	Biometrische Verfahren und Statistik	32
3	Methoden	32
3.1	Sammeln und Aufarbeiten von Stuhlproben.....	32
3.1.1	Sammeln von Stuhlproben bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Kontrollpersonen)	32
3.1.2	Klinische Charakteristik vom Patientenkollektiv	33
3.1.3	Aufarbeitung der Proben	37
3.1.4	Vorbereitung der Bakterien	37

3.2	Radialdiffusionsassay	38
3.2.1	Prinzip	38
3.2.2	Durchführung	38
3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität..	42
3.3.1	Einleitung	42
3.3.2	Aufbau und Prinzip.....	42
3.3.3	Durchführung	43
3.4	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) zur in vitro Bestimmung von Calprotectin in Stuhlproben	45
3.4.1	Einleitung	45
3.4.2	Stuhlprobenextraktion	46
3.4.3	Probenvorbereitung	47
3.4.4	Testdurchführung.....	47
3.5	Bestimmung des Trockengewichts der Stuhlproben	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Analyse der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben (Radialdiffusionsassay).....	49
4.1.1	Graphische Darstellung der RDA-Ergebnisse.....	52
4.2	Analyse der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben (FACS- Assay).....	62
4.3	Trockengewichtsanalyse der Stuhlproben von Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten, sowie Kontrollpersonen.	75
4.4	Analyse von Calprotectin in Stuhlproben (ELISA).....	76
4.5	Allgemeine statistische Ergebnisse (Daten).....	78
4.5.1	Morbus Crohn-Patienten.....	78
4.5.2	Colitis ulcerosa Patienten	81
5	Diskussion.....	85
5.1	Radialdiffusionsassay für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben	87

5.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben	87
5.3	ELISA zur Bestimmung von Calprotectin in Stuhlproben.	88
5.4	Trockengewichtbestimmung der humanen Stuhlproben	89
5.5	Vergleich Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten und Kontrollpersonen.....	90
5.6	Schlussfolgerung.....	90
6	Zusammenfassung.....	91
7	Literaturverzeichnis	94
8	Abkürzungsverzeichnis	108
9	Abbildungsverzeichnis.....	110
10	Tabellenverzeichnis	114
11	Danksagung	115
12	Lebenslauf	117

1 Einleitung

1.1 Fallbeispiel

Eine 29-jährige Patientin stellt sich wegen akut aufgetretener Schmerzen im rechten Unterbauch und leichten subfebrilen Temperaturen vor.

Bei der körperlichen Untersuchung zeigte sich ein lokaler Druckschmerz im rechten Unterbauch, leichte Abwehrspannung, fragliche Resistenz, kein Loslassschmerz, lebhafte Darmgeräusche. Ansonsten unauffälliger körperlicher Untersuchungsbefund.

Im Labor zeigten sich folgende Ergebnisse: CRP 0,6 mg/dl, Leukozyten 14000/µl, im Differenzialblutbild vereinzelte Metamyelozyten und 30% stabkernige Neutrophile.

Die Patientin ist bereits appendektomiert. Anamnestisch ist ein Nikotinabusus bekannt. Sie raucht 1 bis 1,5 Packungen Zigaretten pro Tag. Der Stuhlgang ist drei- bis viermal pro Tag wässrig, selten mit Blutbeimengung. Eine Nachfrage beim Hausarzt bezüglich des Gewichtsverhältnisses zeigte eine Gewichtsabnahme von 5 kg in zwei Monaten.

Die Abdomensonographie zeigte im rechten Unterbauch eine Darmschlinge mit verdickter und stark aufgelockerter Wand. Leber, Milz, Pankreas, Gallenblase, Gallenwege und Nieren sind unauffällig.

Des Weiteren wurde eine Ileocoloskopie mit Biopsien durchgeführt.

Bei der Patientin zeigten sich makroskopisch Ulcerationen im terminalen Ileum, histologisch zeigten sich Epitheloidzellgranulome.

Es wurde die Diagnose eines Morbus Crohn gestellt (aus Endres 2007).

1.2 Der Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) (griech. *gaster* Magen; lat. *intestinum* Darm) wird auch als Magen-Darm-Trakt (MDT) bezeichnet, er ist ein Teil des Verdauungssystems, der von der Speiseröhre bis zum Anus reicht (Abbildung 1 (Abb. 1)).

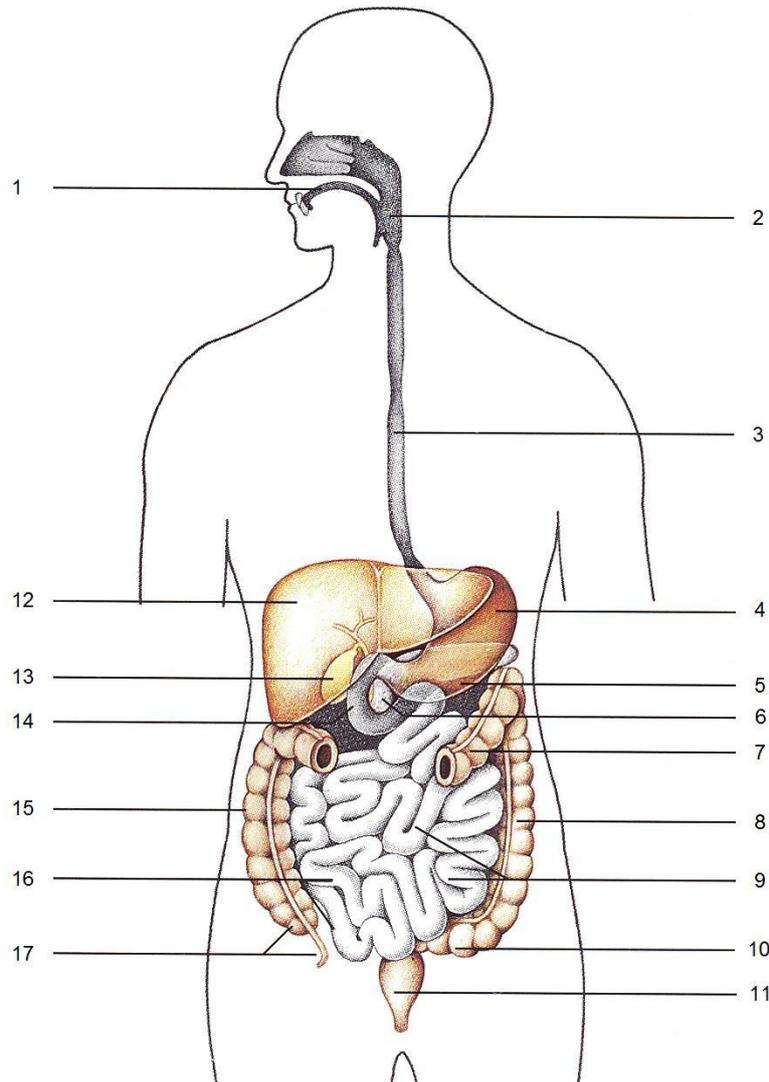


Abb. 1 Der Verdauungstrakt (aus Rohen und Yokochi, 1993): 1 Mundhöhle (*Cavum oris*), 2 Rachen (*Pharynx*), 3 Speiseröhre (*Oesophagus*), 4 Magen (*Gaster*): *Fundus gastricus*, 5 *Corpus gastricum*, 6 Bauchspeicheldrüse (*Pancreas*), 7 Dickdarm (*Colon*): *Colon transversum*, 8 *Colon descendens*, 9 Dünndarm: Leerdarm (*Jejunum*), 10 Dickdarm (*Colon sigmoideum*), 11 Enddarm (*Rectum*), 12 Leber (*Hepar*), 13 Gallenblase (*Vesica biliaris*), 14 Zwölffingerdarm (*Duodenum*), 15 *Colon ascendens*, 16 Dünndarm: Krummdarm (*Ileum*), 17 Blinddarm (*Caecum* mit *Appendix vermiformis*).

Von der Mundhöhle (lat. *cavitas oris*) beginnt die Aufnahme und mechanische Zerkleinerung der aufgenommenen Nahrung sowie ihre Umwandlung in einen halbflüssigen Brei durch das Sekret der Speicheldrüsen (Rohen et al., 2006). Dann gelangt die Nahrung portionsweise durch den Schluckakt in den Pharynx, Oesophagus und Magen. Der Magen leitet die Verdauung ein und sorgt für Aufspaltung, Durchmischung, Nahrungsspeicherung und Resorptionsvorbereitung mit langsamer Abgabe in den Darm. Der Darm ist der schlauchförmige Teil des Verdauungskanals zwischen Magenausgang und After. In der vorliegenden Arbeit geht es im Wesentlichen um diesen Teil des Verdauungssystems. Man unterscheidet den 4-5 m langen Dünndarm (*Intestinum tenue*), den ca. 1 ½ m langen Dickdarm (*intestinum crassum*) und den ca. 20 cm langen Mastdarm (*Rectum*). Der Dünndarm leitet in den 30 cm langen, bogenförmig verlaufenden Zwölffingerdarm (*Duodenum*), den Leerdarm (*Jejunum*) und den Krummdarm (*Ileum*). Die gesamte Dünndarmschleimhaut weist eine große Zahl von Schleimhauterhebungen (Krypten, Darmzotten oder *Villi intestinales*) auf, die der chemischen Aufschließung der Nahrung und der Resorption der Nahrungsstoffe dienen (aus Pschyrembel, 2002). Die Resorption wird von den Enterozyten geleistet. Der Dickdarm (*Intestinum crassum*) besteht aus dem 6-8 cm langen Blinddarm (*Caecum*) mit dem 5-8 cm langen Wurmfortsatz (*Appendix vermiformis*) sowie dem Grimmdarm (*Colon*) mit den Unterteilen *Colon ascendens*, *transversum*, *descendens* und *sigmoideum*. Die Drüsen des Dün- und Dickdarms sind von tubulärem Bau, daneben finden sich Mucus produzierende Becher-Zellen, solitäre Lymphfollikel, hormonbildende enteroendokrine Zellen und an der Basis der Krypten die Paneth-Zellen. Der Mastdarm geht an der *Columna anales* in den Analkanal (*Canalis analis*) über. *Colon* und *Rectum* schließlich haben die Funktion der Wasserresorption und der weiteren Zersetzung, Speicherung und Ausscheidung restlicher, nicht resorbierter Nahrungsbestandteile. Gleichzeitig werden hier auch zahlreiche der in den Dünndarm abgesonderten Stoffe, vor allem Wasser, wieder resorbiert (Rohen et al., 2006).

Der Gastrointestinaltrakt zeigt in seinem gesamten Verlauf einen typischen Aufbau aus verschiedenen Gewebeschichten, welche die Darmwand bilden.

Die Wand des Verdauungstraktes besteht in allen Abschnitten grundsätzlich aus vier Geweben, die in Schichten übereinander liegen (von innen nach außen): *Mucosa*, *Submucosa*, *Muscularis* und *Serosa* (Abb. 2).

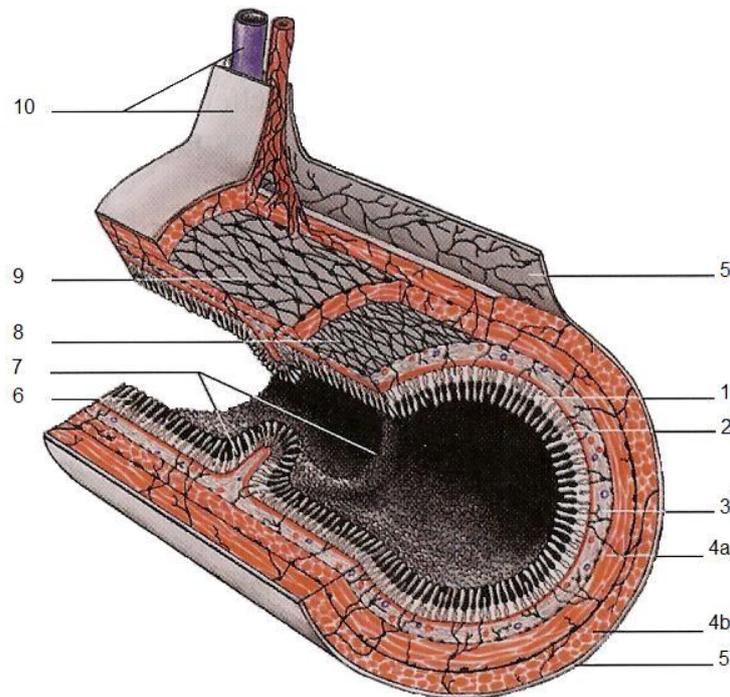


Abb. 2 Schichtenbau des Dünndarms (Pekarsky aus Rohen et al., 2006). 1 Schleimhaut (*Mucosa*), 2 Schicht glatter Muskelzellen (*Lamina muscularis mucosae*), 3 *Submucosa*, 4 Darmmuskulatur (*Tunica muscularis*), 4a Ringmuskelschicht (*Stratum circulare*), 4b Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale*), 5 Serosa (*Peritoneum*), 6 Zotten (*Villi*), 7 Kerckring-Falten (*Plicae circulares*), 8 *Plexus submucosus*, 9 *Plexus myentericus*, 10 Bauchfellfalte (*Mesenterium*) mit Gefäßen und Nerven.

Alle Darmabschnitte, vom Oesophagus bis zum Rectum, werden von einer zweischichtigen Muskulatur bedeckt. Die Muskulatur ist für die Darmbewegungen (*Peristaltik*) verantwortlich. Für Resorption und Sekretion steht die Schleimhaut (*Mucosa*) zur Verfügung. Um die Resorptionsleistung zu verbessern, vergrößern die Schleimhautfalten (Kerckring-Falten) sowie auch fingerförmige Erhebungen (Zotten oder *Villi intestinales*) die Resorptionsoberfläche in denjenigen Darmabschnitten, in denen die Resorptionsprozesse besonders stark sind (Rohen et al., 2006).

Zwischen den Zotten münden die Lieberkühn-Krypten. Am Grund dieser Krypten befinden sich die für den Dünndarm spezifischen sekretorischen Epithelzellen, so genannte Paneth'sche Körnerzellen (Paneth-Zellen) (Kübler et al., 2006; Wehkamp et al., 2005).

Zwischen der Schleimhaut und der Muscularis befindet sich eine gefäßreiche Verschiebeschicht, die *Submucosa*.

Das den Darm umhüllende Häutchen wird *Serosa* genannt. Durch die *Serosa* wird der Darm auch an den Wänden der Bauchhöhle fixiert.

Der Magen-Darm-Kanal wird vom Bauchfell (*Peritoneum*) überzogen. Das *Peritoneum* hat die Fähigkeit, durch Sekretion einer feinen Flüssigkeitsschicht die Darmabschnitte gegeneinander verschieblich zu erhalten, Flüssigkeit zu resorbieren und Fremdstoffe aus der Bauchhöhle zu entfernen (Rohen et al., 2006).

1.3 Die bakterielle Flora

1.3.1 Mikrobielle Besiedelung des gesunden Menschen

Alle Bereiche des menschlichen Körpers, die in direktem Kontakt zur Außenwelt stehen, sind mit Mikroorganismen besiedelt. Die Besiedelung erfolgt normalerweise während der Geburt und durch Kontakt mit der Umwelt. Diese Mikroorganismen werden als kommensal oder physiologisch bezeichnet und bilden die Standortflora. Sie sind so zahlreich, dass sie die Menge der körpereigenen Zellen zumindest um das zehnfache übertreffen (Köhler et al., 2001). An ihrem natürlichen Standort ist die physiologische Flora apathogen. Pathogene (schädigende) Keime können vorübergehend oder auch dauernd Bestandteil der Flora werden, ohne dass Krankheitserscheinungen auftreten müssen. Sie können Infektionen verursachen, wenn sie in normalerweise keimfreie Körperbereiche gelangen oder eine Abwehrschwäche des Organismus vorliegt.

1.3.2 Die bakterielle Flora und der Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt, als die Grenzfläche zur Außenwelt, ist mit einer Vielzahl von pathogenen und kommensalen Mikroorganismen kolonisiert (Turnbaugh et al., 2007; Gill et al., 2006).

Keime der Mundhöhlenflora, Nahrungsmittelbestandteile sowie mit der Nahrung aufgenommene Mikroorganismen werden über die Speiseröhre in den Magen transportiert. Dort schützt die von der Magenschleimhaut sezernierte Salzsäure die Schleimhaut vor mit der Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen (Rohen et al., 2006). Diese werden durch die Senkung des pH-Wertes und Sauerstoffpartialdrucks inaktiviert und abgetötet (Köhler et al., 2001). Je nach pH-Wert sind die Keimzahlen dort sehr gering, können jedoch nach der Nahrungsaufnahme kurzfristig sehr hoch werden.

Der Dickdarm, mit seiner immensen mikrobiellen Besiedelung, enthält 10^{11} bis 10^{12} Bakterien pro ml Chymus (Müller et al., 2005). Er wird als größtes Keimreservoir bezeichnet (Köhler et al., 2001).

Der Dünndarm hat auch optimale Bedingungen für das Bakterienwachstum, obwohl er im gesunden Zustand eine sehr geringe bakterielle Besiedelung aufweist. Einer der Gründe dafür sind chemische Schutzmechanismen der Dünndarmmucosa, welche als endogene Antibiotika bezeichnet und in der Folge in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden.

Zur physiologischen Bakterienflora des Darmes gehören unter anderem *Escherichia* (Hahn et al, 1999).

1.3.3 *Escherichia coli*

Erste Besiedlungskeime des Säuglingsdarms sind *Escherichia coli* (*E. coli*). Sie wurden 1885 vom deutschen Pädiater Theodor Escherich aus dem Stuhl von Kleinkindern isoliert (aus Hahn et al., 1999). Es handelt sich um gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien von 2-4 µm Länge und 0,5-1,5 µm Dicke (Köhler et al., 2001), Abb. 3.



Abb. 3 *E. coli* in der Gramfärbung (Quelle der Abb.: http://de.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli).

Sie gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*, die aufgrund besonderer Virulenzfaktoren als obligat pathogen gelten. Allerdings stellen die Enterobakterien mit zirka (ca.) 1% eine Minderheit der gesamten Darmflora dar. Es gibt auch Stämme, die ubiquitär vorkommen und als fakultativ pathogen angesehen werden, wenn sie aus dem Darm in andere Körperregionen verschleppt werden oder von außen dorthin gelangen. Diese fakultativ pathogenen Stämme sind Bestandteil der physiologischen Darmflora (aus Hahn et al., 1999). Einige Stämme von *E. coli* sind für den Menschen darmpathogen, da sie Mechanismen besitzen, die dem Körper schaden können. Durch fäkale Ausscheidungen gelangen sie in die Umwelt. Nach Aufnahme von enteropathogenen Erregern (Infektionsdosis ca. 10^5 Bakterien) kann es nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bis 6 Tagen zu einer akuten Diarrhoe mit breiigen oder profus wässrigen Stühlen, Erbrechen und subfebrilen Temperaturen kommen (Köhler et al., 2001).

Durch fakultativ pathogene *E. coli* verursachte Infektionen verlaufen häufig in der Nachbarschaft des Darmes: Peritonitis, Cholangitis, Appendizitis, Cholezystitis, Harnwegsinfektionen sowie eitrige Wundinfektionen (aus Hahn et al., 1999). Die Erreger können auch nach diagnostischen oder chirurgischen Eingriffen beziehungsweise (bzw.) nach Traumen im Bereich des Bauchraums oder des Urogenitaltraktes in die Blutbahn gelangen. Neugeborene können sich beim Durchtritt durch den Geburtskanal mit *E. coli* infizieren und eine Sepsis sowie eine Meningitis entwickeln (aus Hahn et al., 1999).

Aufgrund ihrer Pathomechanismen werden die *E. coli*-Stämme fünf Gruppen zugeordnet: enteropathogene, enteroaggregative, enteroinvasive, enterotoxinogene und enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme.

Nach Ergebnissen der Cornell University USA wurde ein neuartiger Stamm von *E. coli*-Bakterien beschrieben, der eng mit Morbus Crohn verbunden sein soll. Dieser Stamm enthält Gene, die enteropathogenen Bakterien der Beulenpest, der Cholera oder Salmonellosen ähnlich seien. Die Ergebnisse der Studie lassen die Möglichkeit annehmen, dass der neuartige *E. coli*-Stamm ein fakultativ pathogener Krankheitserreger ist, der bei empfindlichen Personen mit chronischer intestinaler Entzündung verursachend zusammenhängen kann. (Weblinks: <http://www.ebiologynews.com/2566.html>).

1.4 Antibakterielle Peptide im Intestinaltrakt

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind kationische Oligo- oder Polypeptide, die eine antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum von pathogenen Mikroorganismen aufweisen. AMPs sind ein zentraler Bestandteil der unspezifischen Abwehr des Menschen. Sie werden als „chemische Barriere“ bezeichnet und bestehen aus Defensinen und anderen AMPs (Cathelicidine, BPI, Elafin, SLPI u.a.), die als endogene Antibiotika die extra- und intrazelluläre Zerstörung von aggressiven Mikroben übernehmen (Harder, Gläser and Schröder, 2007).

1.4.1 Vorkommen und Funktion

Erstmalig wurden antimikrobielle Peptide durch Boman und Steiner, 1981 in Studien des Immunsystems der Motte *Hyalophora cecropia* beschrieben.

Bisher sind mehr als 800 antimikrobielle Peptide nachgewiesen worden (Gallo & Nizet, 2003). Die extrem weite Verbreitung einer immensen Vielfalt von antimikrobiellen Peptiden im gesamten Tier- und Pflanzenreich lässt auf ihre fundamental wichtige Rolle in der erfolgreichen Evolution überlebensfähiger Organismen schließen (Bevins, 2003; Zasloff, 2002).

Bislang gibt es keinen bekannten eukaryotischen Organismus, der ohne ein Arsenal an antimikrobiellen Peptiden überlebt (Wehkamp et al., 2007; Wehkamp et al., 2005; Kübler et al., 2006; Boman, 1995). Die antimikrobiellen Peptide gehören zu den ältesten und wirksamsten Substanzen der antimikrobiellen Abwehr (Peschel et al., 2006). Sie haben ein breites antimikrobielles Wirkungsspektrum und teilweise reichen mikromolare Konzentrationen aus, um Mikroorganismen effektiv abzutöten (Joly et al., 2004; Bevins, 2003). Die Entwicklung von antimikrobiellen Peptiden und Bakterien fand zeitgleich statt. Trotzdem konnten Bakterien keine effektiven Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide entwickeln. Es gibt allerdings bakterielle Mechanismen um die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden zu vermindern (zusammengefasst in Peschel et al., 2006). AMPs kommen in zahlreichen Organen und Organsystemen vor: in der Lunge, auf der Haut, auf Epithelien des Auges, des Urogenitaltraktes und des Gastrointestinaltraktes (Müller et al., 2005; Fellermann et al., 2001). In der großen und weiterhin wachsenden Gruppe der bekannten antimikrobiellen Peptide bilden die Defensine eine Familie.

1.5 Defensine

1.5.1 Struktur und Funktion

Defensine sind kleine, argininreiche, kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3-5 kDa und mit antimikrobieller Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien, einige umhüllte Viren, Pilze und Protozoen (Liévin-Le Moal, Servin, 2006; Schmid et al., 2006; Kübler et al., 2006; Ericksen et al., 2005; Wehkamp et al., 2005; Bevins et al., 1999; Ganz, Weiss, 1997; Lehrer et al., 1993). Sie weisen eine typische Tertiär-Struktur auf mit drei antiparallelen β -Faltblättern (Wehkamp et al., 2005; Ganz, 2003). Weiterhin kommen in Defensinen drei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen ihren Cysteinresten vor (Wehkamp et al., 2005; Lehrer et al., 2004; Ganz, 2003; Schröder, 1999).

In ihrer Primärsequenz sind sechs Cysteine enthalten, die an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt sind (De Smet et Contreras, 2005; Selsted et al., 1985). Die Lokalisation der Cysteine innerhalb der Aminosäuresequenz und der Abstand der Disulfidbrücken voneinander variiert innerhalb der Defensine. Je nach relativer Position von Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Cysteinresten wird zwischen α - und β -Defensinen unterschieden (Nguyen et al., 2003; Ganz, 2003; Ganz et al., 1995). Bei α -Defensinen liegen die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 1-6, 2-4 und 3-5, während die β -Defensine das Bindungsmuster 1-5, 2-4 und 3-6 haben (Wehkamp et al., 2005, Ganz et al., 2003). Obwohl sich ihre Cystein-Kopplungen unterscheiden, ist die dreidimensionale Struktur der α -Defensine und β -Defensine ähnlich (Abb. 4 und 5) (Wehkamp et al., 2005, Zimmermann G.R. et al., 1995).

1.5.2 α -Defensine

Proteine der α -Defensin-Gruppe bestehen aus 29-35 Aminosäuren (Wehkamp et al., 2005). Beim Menschen wurden sechs α -Defensine gefunden (Harder, Gläser and Schröder, 2007). Vier α -Defensine wurde in azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten identifiziert und als „human neutrophil peptides“ (HNP) 1-4 bezeichnet (De Smet et Contreras 2005; Ganz, 2003; Lehrer et al. 1993).

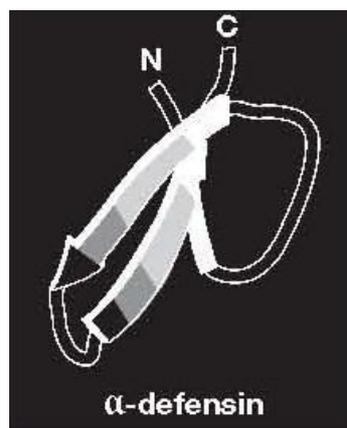


Abb. 4 Humanes α -Defensin (aus Wehkamp et al., 2005) bildet eine Struktur aus einer N-terminalen α -Helix und einem β -Faltblatt. Die Struktur wird durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert (Ganz, 2003).

HNP-1-3 finden sich in Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten (Agerberth et al., 2000). Außerdem wurden noch zwei weitere humane α -Defensine „human defensins“ HD5 und HD6 identifiziert. Sie werden am ausgeprägtesten in zytoplasmatischen Granula der Paneth-Zellen der Dünndarmmucosa exprimiert (Wehkamp et al., 2007; Schmid et al., 2006; Kübler et al., 2006; Wehkamp et al., 2005; Jones et Bevins, 1993 und 1992). Während Paneth-Zellen vorwiegend im Ileum lokalisiert sind, werden α -Defensine in überreichlichem Maß im Ileum, in kleineren Mengen aber auch im Duodenum und Jejunum exprimiert (Wehkamp et al., 2005). Unter physiologischen Bedingungen sind sie in anderen Regionen des gastrointestinalen Traktes nicht nachweisbar (Müller et al., 2005). Ihre Funktion in der Darmmukosa besteht in der Regulierung von Entzündungen und Immunabwehr (Mothes et al., 2008).

1.5.3 β -Defensine

Die β -Defensine sind zwischen 34 und 47 Aminosäuren lang (Wehkamp et al., 2005) und werden epithelial im Dickdarm gebildet und freigesetzt. Bislang wurden 6 β -Defensine 1-6 identifiziert („human- beta- defensins“ (hBD)) (Liévin-Le Moal und Servin, 2006).

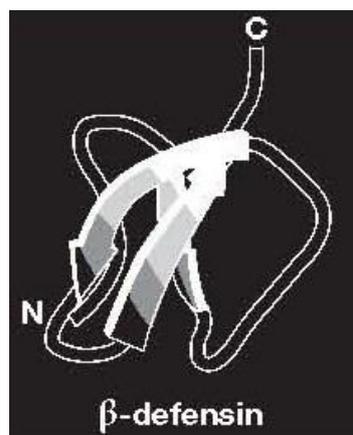


Abb. 5 Humanes β -Defensin (aus Wehkamp et al., 2005).

Das zuerst beschriebene humane β -Defensin-1 (hBD-1) wurde im Plasma von Patienten mit fortgeschrittenen, entzündlichen Nierenerkrankungen entdeckt (Bensch et al., 1995). Anschließend konnte die Expression von hBD-1 auch in Epithelien der Haut nachgewiesen werden (Schröder, 1999). In von Psoriasis betroffenen Hautläsionen wurde ein weiteres humanes β -Defensin (hBD-2) entdeckt (Harder et al., 1997). Kurz darauf wurde die Expression von hBD-2 im Respirationstrakt beschrieben (Bals et al., 1998). Ein weiteres β -Defensin, hBD-3, wurde in Keratinozyten psoriatischer Hautläsionen entwickelt (Harder et al., 1997). Die β -Defensine sind in vielen weiteren Organen, einschließlich des Gastrointestinaltrakts entdeckt worden (Wehkamp et al., 2007; Wehkamp et al., 2005; O'Neil et al., 1999; Bals et al., 1998). Das menschliche β -Defensin hBD-2 wird unter normalen Bedingungen nicht exprimiert (Wehkamp et al., 2005). Seine Expression wird durch Entzündungen hervorgerufen, beispielsweise durch Colitis ulcerosa des Dickdarms (Wehkamp et al., 2005). Im Gastrointestinaltrakt wird hBD-1 in geringer Menge konstitutiv und hBD-2 in besonderem Maße in entzündeten Geweben exprimiert (O'Neil et al., 1999; O'Neil et al., 2000). Das β -Defensin hBD-2 wirkt bakterizid gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* und *Candida albicans* und wirkt bakterienhemmend gegen Gram-positive Bakterien *Staphylococcus aureus* (Wehkamp et al., 2005, Harder et al., 2000; Harder et al., 1997).

1.6 Weitere antimikrobielle Peptide

Neben den Defensinen sind noch weitere humane antimikrobielle Peptide bekannt.

1.6.1 Cathelicidine

Cathelicidine sind antimikrobiell wirksame Proteine, die an der Epitheloberfläche und in Neutrophilen gebildet werden. Sie gehören zur Klasse der kationischen antimikrobiellen Peptide (CAMP, „cationic antimicrobial

peptides“), die erstmals in Kaninchen und später auch in Menschen nachgewiesen worden sind. Im Menschen wurde bisher nur ein Cathelizidin nachgewiesen, das antimikrobielle Peptid LL-37. Es ist benannt nach seiner Sequenz von 37 Aminosäuren und zwei Leucinen zu Beginn. Sein Vorläuferprotein ist das „human cationic antimicrobial peptide 18“ (hCAP-18). Die aktiven Peptide sind weniger als 100 Aminosäuren lang und werden als Pre-Proteine synthetisiert. Nach Abspaltung des Signalpeptids innerhalb der neutrophilen Granulozyten werden sie in der inaktiven Proform gespeichert. Die biologisch aktive Domäne der Cathelicidine befindet sich am C-Terminus des Proteins. Der antimikrobielle C-Terminus von hCAP18, LL-37, zeigt eine sehr starke schädigende Wirkung auf unterschiedliche Krankheitserreger, zu denen gram-negative und gram-positive Bakterien zu zählen sind. Bei Entzündung oder Infektion wird das AMP LL-37 vermehrt exprimiert, z. B. in Neutrophilen, Monozyten, T- und B-Lymphozyten, sowie in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und an die Umgebung abgegeben (Hase et al., 2002; Hase et al. 2003; Kim et al., 2003; Schaller-Bals et al., 2002; Sorensen et al., 2001; Liénvin-Le Moal und Servin, 2006).

1.6.2 BPI

Ein weiteres kationisches antimikrobielles Peptid ist BPI (bactericidal/permeability-increasing protein). Die 55-60 kDa große, hydrophobe Protein sind eine Komponenten der angeborenen Immunabwehr, die über verschiedene Mechanismen gegen gram-negative Bakterien wirkt ((Weiss et al., 1978 ; Canny et al. 2006)). BPI stammt aus den Granula neutrophiler Granulozyten (Elsbach und Weiss 1993; Weiss 2003). Im Serum Gesunder ist es nur in geringen Mengen von weniger als 1 ng/ml nachweisbar. Bei Entzündungen und Infektionen steigt es auf rund 8 ng/ml an und erreicht am eigentlichen Infektionsherd weit höhere Konzentrationen (Opal et. Al., 1994). Die Funktion von BPI beinhaltet die Bakterizidität durch Schädigung der Bakterienmembran, die Neutralisation des bakteriellen Endotoxins LPS (Lipopolysaccharide) sowie die Opsonierung der Bakterien, um ihre

Phagozytose zu forcieren. (Gazzano-Santoro et al., 1992; Canny et al. 2006). BPI weist eine N-terminale Region auf, die sowohl hohe Affinität zum Lipid- A-Teil des LPS aufweist und für die Neutralisation des Endotoxins verantwortlich ist als auch die antimikrobielle Aktivität vermittelt (Scott et al., 2000; Canny et al., 2006).

1.6.3 Elafin

Elafin, auch als „skin-derived antileukoprotease“ (SKALP) bekannt, ist ein lösliches, endogenes Protein, das vom menschlichen Körper produziert wird. Elafin ist ein niedermolekularer Proteinase-Inhibitor mit breitem antimikrobiellen Spektrum (Bingle et al., 2001). Er wirkt in verschiedenen Organen (z.B. Darm) entzündungshemmend durch Neutralisation aggressiver Proteasen. Elafin weist antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Pilze und gegen HIV auf (Schalkwijk, 1999; Simpson, et al 1999). Er gehört zur Trappin-Familie. Sein Proteinvorläufer ist „transglutaminase substrate and weigh acid protein (WAP) motif-containing protein“ Trappin-2. Elafin und Trappin-2 sind spezifische endogene Inhibitoren der Serinproteasen „human neutrophil elastase“ (HNE) und Proteinase 3 (Bingle et al., 2001; Zani et al., 2004). Diese Funktion lässt Elafin und Trappin-2 eine wichtige Rolle in der Regulation der Stärke von Immunantworten spielen.

1.6.4 SLPI

Zu den bislang identifizierten Protease-Inhibitoren gehört der SLPI (secretory leukocyte proteinase inhibitor), ein eukaryotisches Protein, das eine Inhibitionswirkung auf Serin-Proteasen, insbesondere Leukocyten-Elastase, Trypsin und Cathepsin G ausübt und darüber hinaus antivirale, antimykotische und antibakterielle Aktivität besitzt. Auch als Antileukoprotease (ALP) bezeichnet, ist SLPI ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 12 kDa, es wird vor allem von den Zellen der Bronchialschleimhaut, von den serösen Zellen der submucösen Tracheal- und Bronchialdrüsen und von den nicht zilientragenden Zellen des Bronchien- und Bronchiolen-Epithels produziert und

sezerniert (Vogelmeier et al., 1991). Ein Fragment von SLPI ist ein Proteinteil, der weniger als 132 Aminosäuren aufweist, in dem die beiden Hauptdomänen, der Carboxy-terminale Bereich, der die Antiproteinase-Aktivität aufweist, und der Amino-terminale Bereich, der die antimikrobielle Wirkung ausübt, enthalten sind. Aus dem Speichel stammendes SLPI im Magen und Duodenum wird schnell abgebaut und spielt demzufolge für inflammatorische Erkrankungen im Darm-Trakt keine Rolle (Nyström et al., 1997). Nur durch die gezielte Zuführung von SLPI in die betroffenen Organe ist es somit möglich, das Gleichgewicht zwischen dem Protease-Inhibitor und inflammatorischen Proteasen in Darmepithelzellen von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten wiederherzustellen.

1.7 Das Immunsystem des Darms

Mit der Nahrung gelangen immer auch Fremdstoffe und Keime in den Darmtrakt, die entweder abgetötet oder abgewehrt werden müssen. Um den Befall durch Mikroorganismen auf ein verträgliches Maß zu beschränken, hat der menschliche Organismus ein breites Spektrum von Abwehrmechanismen entwickelt. Hierbei lassen sich Mechanismen der angeborenen Resistenz von solchen der adaptiven Immunität unterscheiden (Fleischner et al., 2001). Die adaptive Immunität setzt erst mit einer Latenz von 4-5 Tagen ein. Sie ist spezifisch für die Antigene, Moleküle, die diese Immunantwort auslösen. Die Träger der adaptiven Immunreaktion sind die B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten erhalten ihre immunologische Kompetenz im Knochenmark, die T-Lymphozyten reifen im Thymus (Fleischner et al., 2001). Eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität des Dünndarms haben die Paneth-Zellen (Wehkamp et al., 2005; Bevins, 2004), Drüsenzellen mit apikaler, azidophiler Körnelung, die am Grund der Lieberkühn-Krypten des Dünndarms lokalisiert sind. Ihr Sekret bildet in großen Mengen antimikrobielle Peptide: Lysozym, α -Defensine, Phospholipase A2 und α 1-Antitrypsin (Wehkamp et al., 2006, Müller et al., 2005).

1.7.1 Dysregulation der angeborenen Immunität

Die Integrität der mukosalen Barriere wird durch eine Vielzahl von Mechanismen aufrechterhalten. Hier spielen Defensine eine wesentliche Rolle (Stange et al., 2004). Sie gehören dem angeborenen Immunsystem an (Ganz, 2003). Durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften, bieten die Defensine einen Schutz vor Infektionen. Sie werden nach einem inflammatorischen Schub exprimiert und wirken antibakteriell. Es wird immer klarer, dass in der Auslösung der intestinalen Entzündung nicht eine Dysregulation auf der Ebene von T-Lymphozyten, sondern eher eine gestörte Integration des intestinalen Immunsystems und ein Barrieredefekt der angeborenen Immunität besteht. Dabei spielt auch eine reduzierte Expression von Defensinen eine wichtige Rolle (aus Stange et al., 2004).

1.8 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind schubweise verlaufende chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) unklarer Ätiologie (Stange et al., 2004).

1.8.1 Geschichte

Schon in früheren Jahrhunderten wurden Symptome und Befunde von Patienten beschrieben, die mit Wahrscheinlichkeit an einer Colitis ulcerosa oder einem Morbus Crohn erkrankt waren. Erste Berichte über einen Patienten mit Colitis ulcerosa gehen auf das Jahr 1793 zurück. Der Begriff der „ulcerativen Colitis“ von Wilks stammt aus dem Jahr 1859. Im Jahr 1893 wurde erstmalig zur Behandlung einer Colitis ulcerosa ein Ileostoma angelegt und die Assoziation einer Colitis ulcerosa mit einem colorektalen Carcinom 1907 durch Lokart-Mummary erstmalig beschrieben (Sturm, Wiedenmann aus Lehnert et Werdan, 2006).

Der Begriff Morbus Crohn geht auf den amerikanischen Gastroenterologen B. B. Crohn zurück. Er und seine Mitarbeiter haben im Jahr 1932 erstmalig einen Patienten mit einer Ileitis terminalis mit Fistelbildung beschrieben und als einheitliches Krankheitsbild einer regionalen Ileitis bezeichnet. Ein Jahr später wurde von Colp über Patienten mit einer über das terminale Ileum hinausgehenden Krankheitsmanifestation berichtet (Sturm, Wiedenmann aus Lehnert et Werdan, 2006). Heute wird die Bezeichnung nach dem eigentlichen Entdecker „Morbus Crohn“ für Manifestationen in allen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes benutzt (Berdel et al., 2004).

1.8.2 Klinik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa

Der Morbus Crohn (MC) (Synonyma: Ileitis terminalis, Enteritis regionalis) ist eine unspezifische, granulomatöse Entzündung aller Darmwandschichten, die alle Abschnitte des Verdauungstraktes befallen kann (Abb. 6). Der Altersgipfel für die erstmalige Manifestation liegt bei 15-34 Jahren (Stange et al., 2004). Mit zunehmendem Alter des Patienten lässt die Krankheitsaktivität langsam nach (Stange et al., 2004). Beide Geschlechter sind etwa gleich häufig betroffen (Kaufmann et al., 1977). Das klinische Bild ist sehr variabel und ebenfalls vor allem von abdominellen Schmerzen und Diarrhoe geprägt. Die Durchfälle bei Morbus Crohn sind mehr breiig als wässrig (Ferlinz et al., 1999). Die Schmerzen sind häufig im rechten Unterbauch lokalisiert und kolikartig, bei starkem Befall der terminalen Ileumschlinge ist eine druckschmerzhaft Resistenz tastbar (Herold et al., 2003; Kaufmann et al., 1977). Die Symptome des Morbus Crohn können entweder langsam beginnen oder akut mit Fieber, Krämpfen und Leukozytose einsetzen. In diesem Fall ist die Unterscheidung von einer akuten Appendizitis sehr schwierig. Es können aber auch subileus- oder ileusartige Zustandsbilder am Beginn der Erkrankung im Vordergrund stehen (Wetermann). Die häufigsten extraintestinalen Manifestationen sind monoartikuläre Arthritiden, die sich meist an den großen Gelenken zeigen (Farmer et al., 1975). Weitere intestinale und extraintestinale Symptome sowie verschiedene mögliche Komplikationen können auch hier in unterschiedlichem

Ausprägungsgrad auftreten. Bei über 40% der Morbus-Crohn-Patienten kommt es zu einer Entwicklung von Fissuren, Fisteln oder Abszessen (Lehnert, Werdan, 2006). Das ist die häufigste Komplikation des Morbus Crohn. Die typische anale Manifestation des Morbus Crohn sind Fissuren, die die Defäkation sehr schmerzhaft behindern. Blutbeimengungen im Stuhl treten beim Morbus Crohn selten auf, nur bei 1-2% der Patienten kommt es zu stärkeren perianalen Blutabgängen. Bei 30% der Morbus-Crohn-Patienten treten Stenosen und Strikturen auf. Die häufigste Lokalisation ist die Ileozökalregion (Lehnert, Werdan, 2006).

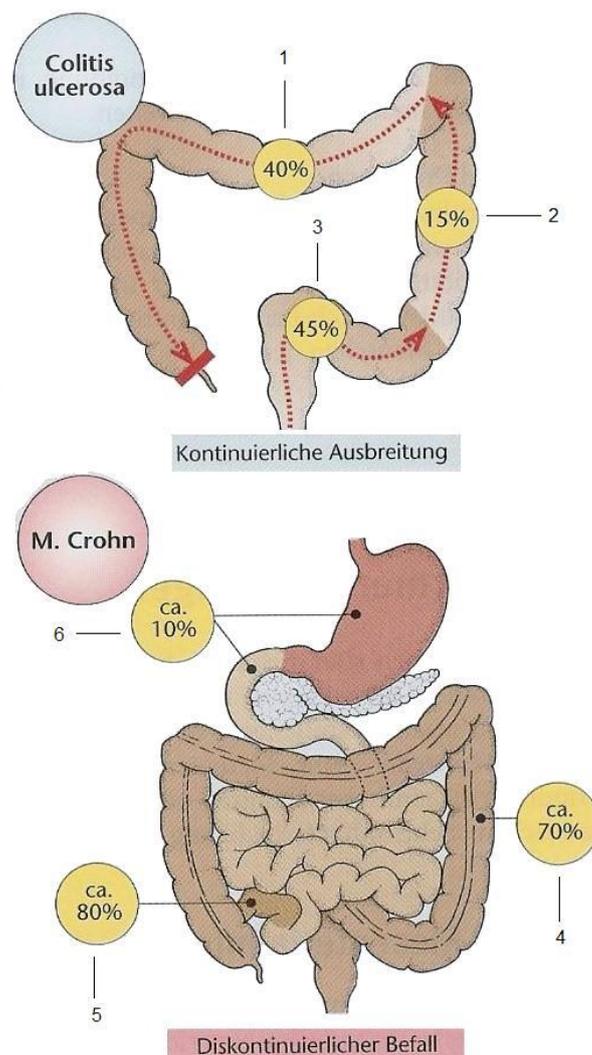


Abb. 6 Lokalisationen von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Adler, Lübeck aus Renz-Polster, Krautzig, 2008). 1 *Rectum* und gesamtes *Colon*, 2 *Rectum* und *Colon ascendens*, 3 nur *Rectum*, 4 *Colon* (isolierter Befall des *Colon* in 35%), 5 *Terminales Ileum* (isolierter Befall des Dünndarms in 35%), 6 Mund, Magen und Zwölffingerdarm.

Bei der Colitis ulcerosa (CU) (Synonym: ulcerative Colitis) handelt es sich um eine chronische, auf die Schleimhaut beschränkte Entzündung des Dickdarms (Abb. 7).

Je nach Ausdehnung unterscheidet man zwischen Proktitis, Proktosigmoiditis, Linksseitencolitis oder Pancolitis (Stange et al., 2004). Betroffen sind vor allem Patienten zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr, Frauen etwas häufiger als Männer, meist beginnt die Erkrankung im Jugendalter (Siegenthaler, 2005). Das Alter der Erstdiagnose liegt vorwiegend in der dritten bis vierten Lebensdekade (Stange et al., 2004). Im Verlaufe der Erkrankung kann sich die Entzündung vom Rektum kontinuierlich weiter entlang des Colons nach proximal ausbreiten und damit klinisch in der Regel auch an Ausprägung zunehmen (Stange et al., 2004). Leitsymptom der CU ist die blutig-schleimige Diarrhoe. Je ausgeprägter der Befall, desto profuser die Durchfälle (Kaufmann et al., 1977).

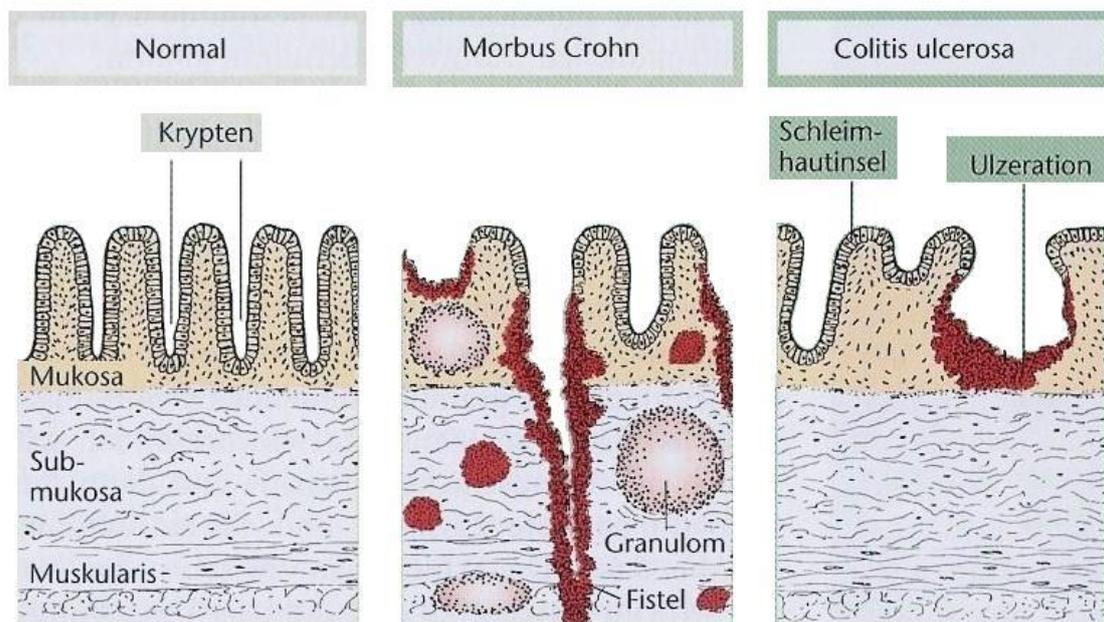


Abb. 7 Histologie von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn im Vergleich (Schäffler, Schmidt: Mensch, Körper, Krankheit, Gustav Fischer Verlag, 1995, aus Renz-Polster und Krautzig, 2008). Bei der Colitis ulcerosa sind die Ulcerationen auf *Mucosa* und *Submucosa* begrenzt. Beim Morbus Crohn erreichen sie auch tiefe Wandschichten und führen zur Granulom- und Fistelbildung.

Des Weiteren treten typischerweise krampfartige abdominelle Schmerzen, Tenesmen und darüber hinaus in unterschiedlicher Ausprägung extraintestinale Symptome wie schweres Krankheitsgefühl, Gewichtsverlust, Fieber, Anämie, Arthralgien sowie Haut- und Augenbeteiligungen auf. Für beide Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung typisch ist ihr schubweiser Verlauf: Der einzelne Schub kann wenige Wochen bis Monate dauern (Stange et al., 2004). Die Dauer der Remissionsphasen variiert von einigen Monaten bis zu viele Jahre. Bei schweren Verlaufsformen, besonders beim chronisch-aktiven Verlauf, können die einzelnen Schübe auch ineinander übergehen (Stange, 2004).

Die Abgrenzung des Morbus Crohn gegenüber der Colitis ulcerosa kann in einigen Fällen sehr schwer sein. Der wichtigste klinische Unterschied zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist in der Differenzialtabelle 1 angezeigt.

Tab. 1: Differenzialtabelle Morbus Crohn – Colitis ulcerosa (Unterscheidungsmerkmale) (Herold et al., 2003; Müller et al., 2003; Braun, et al., 1999)

	Colitis ulcerosa	M. Crohn
Lokalisation	Rektum immer befallen, Colon oft, selten Ileum (Ausnahme: "Backwash-ileitis" des terminalen Ileum)	Segmentaler Befall, es kann jede Stelle des GIT betroffen sein von Mundhöhe bis Analkanal. Meist terminales Ileum und proximales Colon
Ausbreitung	Kontinuierlich, von distal (beginnt im Rektum) nach proximal	Diskontinuierlich von proximal (terminales Ileum) nach distal (Colon)
Prädisp. Alter	30.-40. Lj. und des 60. Lj. Familiäre Häufung.	15.-29. Lj. und um das 60. Lj. Familiäre Häufung.

	Colitis ulcerosa	M. Crohn
Verlauf	Chronisch-rezidivierender oder chronisch-kontinuierlicher Verlauf. Akuter Schub/Remission. Geringe Rezidivrate. Erkrankung kann durch Colektomie geheilt werden	Allmählicher Beginn, phasischer Verlauf: akuter Schub / chronischer Verlauf / chronisch-aktiver Verlauf. Hohe Rezidivrate. Ausheilung sehr selten. Häufig operative Maßnahmen notwendig.
Typische Komplikationen	Toxisches Megacolon, Blutungen, carcinomatöse Entartung	Fisteln, Fissuren, Strikturen, Abszesse, Stenosen,
Labor	Anämie, Leukozytose, Abfall von Prothrombin, Albumin und Elektrolyten. BSG und CRP erhöht.	BSG und CRP erhöht, Leukozyten vermehrt, eventuell (evtl.) leichte Anämie.
Röntgen	Gezähnelte Wanddefekte, später „Pseudopolyposi“, Endstadium: starres, glattes Rohr („Fahrradschlauch“)	Lymphoide Hyperplasie (Seth et al., 1985), Noduläre Kontrastmittel-Aussparungen, „Pflastersteinrelief“, fadenförmige, segmentale Stenosen, Fisteln, Fissuren
Endoskopie	Diffuse Rötung, Kontaktblutung, unsharp begrenzte Ulcerationen, Pseudopolypen	Aphthöse Läsionen, scharf begrenzte landkartenartige Ulcerationen, Stenosen, Fisteln, Pflastersteinrelief
Histologie	Mucosa, Submucosa: Kryptenabszesse, Becherzellverlust, im Spätstadium Schleimhautatrophie und Epitheldysplasien	Transmurale Entzündung. Gesamte Darmwand und mesenteriale Lymphknoten: Epitheloidzellgranulome (40%); Fisteln, im Spätstadium: Fibrose

1.8.3 Die Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind trotz intensiver Forschung und umfangreichem Wissenszuwachs in den vergangenen Jahren nach wie vor ungeklärt (Kübler et al., 2006; Schmid et al., 2006; Miller, Ehms, 1981). Beim Morbus Crohn spricht man von einer „multifaktoriellen Genese auf der Basis einer genetischen Disposition“, bei der Colitis ulcerosa von einer „enterokolischen Imbalance“ (Ottenjann, aus Beilage zu Der Internist Heft 3, 1989) Abb. 8.

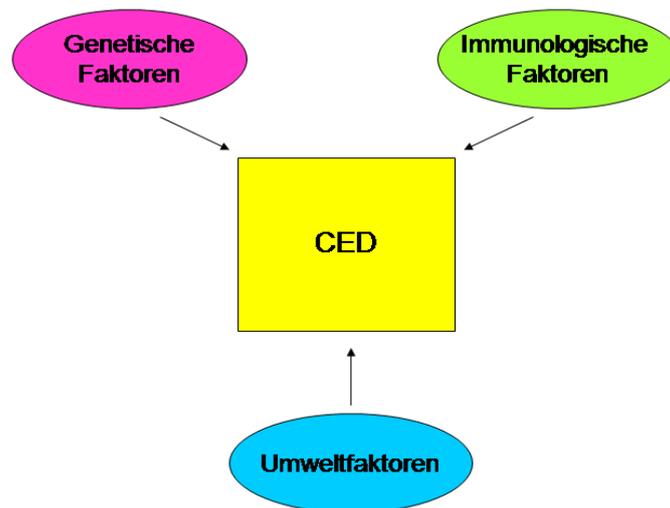


Abb. 8 Modell zur Ätiopathogenese des Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Diese Modell nimmt eine bei genetisch anfälligen Personen stattfindende, durch Umweltfaktoren ausgelöste Entgleisung des Immunsystems an.

Epidemiologische Studien, welche eine familiäre Häufung (Meucci et al., 1992; Orholm et al., 1991) sowie eine erhöhte Konkordanzrate bei homozygoten Zwillingen (Halfvarson et al., 2003; Orholm et al., 2000) nachwiesen, liefern eindeutige Hinweise auf genetische Einflüsse in der Krankheitsentstehung.

Eine positive Familienanamnese findet sich in 10% der Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Das Risiko für Kinder von Erkrankten, später auch eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln, ist etwa 50-fach erhöht (Stange et al., 2004). Die Konkordanz in monozygoten Zwillingen liegt beim Morbus Crohn bei 70%, bei der Colitis ulcerosa nur bei 20%.

Bei dizygoten Zwillingen beträgt die Konkordanz beim Morbus Crohn nur 4% (aus Lehnert, Werdan, 2006). Das Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades von Colitis ulcerosa-Patienten ist 10-fach erhöht, das familiäre Erkrankungsrisiko beim Morbus Crohn ist noch höher (aus Renz-Polster et al., 2001). Darüber hinaus ist der genetische Einfluss bei Morbus Crohn-Patienten stärker als bei Colitis ulcerosa-Patienten (Halme et al., 2006). Die genetische Risikokomponente für das Auftreten der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist polygen (Stange et al., 2004; Cobrin, Abreu, 2005). Als erstes Krankheitsgen für den Morbus Crohn wurde das NOD2 (CARD15) Gen identifiziert (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001; Stange et al., 2004). Drei kodierende Sequenzvarianten in diesem Gen vermitteln ein ausgeprägtes Risiko für den Morbus Crohn (Stange et al., 2004). Ein Drittel der Morbus Crohn-Patienten tragen eine Mutation im NOD2-Gen, das mit dem klinischen Bild eines Ileumcrons assoziiert (Grimm, Pavli, 2004; Wehkamp et al., 2005). Jedoch steht fest, dass es bei den genetisch prädisponierten Personen durch eine Reihe von zivilisationsbedingten Umweltfaktoren zur Krankheitsmanifestation kommt (Lehnert, Werdan, 2006; Stange et al., 2004). Auch verschiedene Faktoren wie Rauchen (Bernstein et al., 2006; Birrenbach, Bökker, 2004; Karban, Eliakim, 2007) (Raucher haben ein 2-fach erhöhtes Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken (aus Lehnert, Werdan, 2006)) und hygienische Bedingungen in der Kindheit (Gent et al., 1994) gelten als Einflussfaktoren für das Auftreten chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Als „psychosomatische Korrelation“ bezeichnet man das Einwirken seelischer Traumatisierungen auf den körperlichen Zustand. Diese können einen Schub einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung auslösen, wenn die entsprechende organische Krankheitsdisposition gegeben ist (Freyberger aus Beilage zu Der Internist Heft 3, 1989).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielen Defekte im Immunsystem des Gastrointestinaltrakts. Das darmassoziierte Immunsystem muss physiologischerweise eine Toleranz gegenüber der Darmflora aufrechterhalten. Voraussetzung hierzu ist eine

intakte Schleimhautbarriere (aus Renz-Polster, Krautzig, 2008). Die Auslösung der Erkrankung geht von einem primären Defekt in der intestinalen Mucosabarriere aus und stellt die Rolle der Interaktion der normalen luminalen Darmflora und der intestinalen Mukosa in den Vordergrund (Wehkamp, 2006). Es besteht ein primärer lokaler Defekt in der Expression körpereigener antimikrobieller Peptide, insbesondere der Defensine, darüber hinaus ein verminderter Schutz der Darmschleimhaut vor adhären und invasiven Bakterien der luminalen Flora, was zur Folge hat, dass intestinale Bakterien in genetisch prädisponierten Individuen die Entzündung auslösen (Fellermann et al., 2003; Wehkamp, Stange, 2006).

1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Der Darm ist mit einer Flora aus verschiedenen Mikroorganismen besiedelt. Das Darmepithel hat eine Barrierefunktion zur Verhinderung der Invasion von Mikroorganismen. Als regelmäßiger Bestandteil der physiologischen Darmflora finden sich die fakultativ pathogenen Stämme von *E. coli*. Sie können unter bestimmten Bedingungen die Darmwand durchdringen und verschiedene Infektionen hervorrufen. Antimikrobielle Peptide spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von Entzündungen. Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems sind die Defensine, die eine antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen richten.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der antibakteriellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in Stuhlproben bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Diese Untersuchungen wurden mittels Durchflusszytometrie sowie durch einen Radialdiffusionsassay durchgeführt. Zunächst sollte die verwendete Methode auf ihre Sensitivität geprüft werden, die Präzision und die Unterschiede festgestellt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen antimikrobieller Aktivität bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen gibt.

Der nächste Schritt war, einen Unterschied der antimikrobiellen Aktivität bei festem und flüssigem Stuhl festzustellen. Des Weiteren galt es, mittels quantitativer Bestimmung von Calprotectin im Stuhl einen Entzündungsnachweis herzustellen, bzw. den Schweregrad einer Entzündung zu bewerten. Ein nächstes Ziel dieser Arbeit war es, einen Verdünnungsfaktor bei festen, breiigen und flüssigen Stühlen auszuschließen und die antimikrobielle Aktivität nach Trockengewicht-Normalisierung zu bestimmen.

2 Material

Für die Durchführung der Versuche sowie die Ermittlung und Auswertung der Ergebnisse wurden die unter Hinweis auf die Herstellerfirmen nachstehend aufgeführten Materialien eingesetzt.

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien für die Aufarbeitung der Stuhlproben

Chemikalie/Reagenz	Hersteller/Lieferant
Essigsäure, 5%	Merck, Darmstadt

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien für die Messung der antimikrobiellen Aktivität mittels FACS-Analyse

Chemikalie/Reagenz	Hersteller/Lieferant
BBL TM Schaedler Broth, Vitamin K1	Becton Dickinson; Sparks, USA
BD FACS-Flow TM	Becton Dickinson; Erembodegem-Aalst, Belgien
Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine Oxonol (DiBAC ₄ (3))	Invitrogen Eugene, Oregon, USA
Columbia-Blutagarplatten	Becton Dickinson; Sparks, USA
Luria Agar	Sigma, Steinheim, Germany
Wasser entsalzt	Millipore S.A. Molsheim France
Aqua ad iniectabilia	Delta Select GmbH Pfullingen

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien für den Radialdiffusionsassay

Chemikalie/Reagenz	Hersteller/Lieferant
Bacto TM Tryptic Soy Broth	Sparks, MD USA
Tween [®] -20	Merck, Hohenbrunn
Low EEO Agarose Type I	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller/Lieferant
Essigsäure, 100%, wasserfrei	Merck, Darmstadt

2.1.5 Verwendete Lösungen

Chemikalie/Reagenz	Hersteller/Lieferant
Färbelösung	
10 mg Coomassie Stains R-250	Merck; Darmstadt
315 ml H ₂ O	Millipore S.A. Molsheim France
135 ml Methanol	Merck, Darmstadt
75 ml Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entfärbelösung:	
44 ml H ₂ O	Millipore S.A. Molsheim France
5 ml 100% Essigsäure	Merck, Darmstadt
1 ml 99,9% Dimethyl Sulfoxide	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Stuhlproben

Biologisches Material	Herkunft
Stuhlproben von Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa und Kontrollpersonen	Klinische Abteilung Gastroenterologie und Häpatologie, AKH Wien

2.2.2 Bakterien

Biologisches Material	Herkunft
Bakterien <i>E. coli</i> K12	Invitrogen Groningen, NL

2.3 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

2.3.1 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel für die Aufarbeitung der Proben

Artikel	Hersteller/Lieferant
15 ml Centrifuge Tube CentriStar™ Cap Polypropylene Sterile	Corning Incorporated Corning, NY, Made in Mexico
50 ml Centrifuge Tube CentriStar™ Cap Polypropylene Sterile	Corning Incorporated Corning, NY, Made in Mexico
Pipetten, steril, pyrogenfrei 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated Corning NY, USA
Petrischalen	Becton Dickinson USA
Impfeschlingen 10 µl sterile	Nümbrecht Germany
Ep T.I.P.S. Reloads	Eppendorf Hamburg
Latex Einmalhandschuhe Puderfrei S, M	Rotiprotect-Latex Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe

2.4 Geräte

2.4.1 Geräte für die Aufarbeitung der Proben

Gerät	Hersteller/Lieferant
Waage	Kern GS Germany
Excellence XS105 Dual Range Analysen- Waage	Mettler-Toledo Schwitzerland
Abzug, Luft Raum DIGT	Stuttgart Germany
Überkopfmischgerät, Reax 2	Heidolf Instruments, Schwabach
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen
Vakuumzentrifuge SpeedVac SVC 200 mit Kühlfalle und Vakuumpumpe (VP 190 Two Stage)	Savant Instruments; Inc. Farmingdale, NY

2.4.2 Geräte für die Messung der antimikrobiellen Aktivität mittels FACS-Gerät (Durchflusszytometrie)

Gerät	Hersteller/Lieferant
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD-Biosciences, Heidelberg
Bio Photometer	Eppendorf Hamburg
Inkubator	Heraeus Stuttgart
Schüttler- Wasserbad CH 4103	Hat Infors AG Bottmingen
Vortexer M2 Minishaker	IKA ® Works. Inc.; Wilmington, NC, USA
Einkanalpipetten	Eppendorf Hamburg

2.4.3 Geräte für den Radialdiffusionsassay

Gerät	Hersteller/Lieferant
Abflammgerät „Fireboy plus“	Integra Bioscience
Biofuge 22 R	Heraeus sepatech, Germany
Flockeneisbereiter AF 200 Electronic	Scotsman ® Italy
Inkubator	Heraeus Stuttgart

Gerät	Hersteller/Lieferant
pH- Meter CG 840	Schott Germany
KM02 electronic	Janke & Kunkel IKA- Werk
Schüttler- Wasserbad CH 4103	Hat Infors AG Bottmingen
Spectrophotometer	Novaspec II Visible, England
Dampfsterilisator Typ 500 EV mit vollautomatischer Programmsteuerung und Thermosperre	Varioklav ®, Germany
Waage Kern GS 4100-2	Kern, Germany
Wasserbad Haake DC 10	Thermo Haake, Karlsruhe
Einkanalpipetten	Eppendorf Hamburg

2.4.4 Geräte für den Calprotectin-Assay

Gerät	Hersteller/Lieferant
Spectrophotometer Victor Wallac 1420 Multilabel Counter	Beckman Coulter™, California

2.5 Biometrische Verfahren und Statistik

Die Berechnung der Mittelwerte wurde mit dem Programm MS Excel durchgeführt. Für die statistische Analyse und das Erstellen von Graphiken wurde das Programm GraphPad Prism Version 4.03 benutzt. Dabei wurde der nicht-parametrische Signifikanztest bei nicht-normal verteilten Daten nach Mann-Whitney und bei normal verteilten Daten der Unpaired t-Test gewählt. Als Signifikanzkriterium wurde $p < 0,05$ festgelegt, wobei ein p-Wert $< 0,01$ als hoch signifikant und ein p-Wert $< 0,001$ als sehr hochsignifikant eingestuft wurde.

3 Methoden

3.1 Sammeln und Aufarbeiten von Stuhlproben

3.1.1 Sammeln von Stuhlproben bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Kontrollpersonen)

Für die Messung der antimikrobiellen Aktivität in Stuhlprobenextrakten standen uns Stuhlproben von Patienten von Professor Dr. Walter Reinisch, Universitätsklinik, Innere Medizin IV, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie, Wien, Österreich, zur Verfügung. Zur genannten Studie lag ein Votum der Ethik-Kommission der Universität Tübingen vor. Die Stuhlproben der Patienten wurden im Rahmen diagnostischer Untersuchungen zwischen Ende 2002 und 2003 in der Medizinischen Klinik in Wien gesammelt. Nach Erhalt wurden die gefrorenen Stuhlproben bei -20°C bis zur biologischen (biochemischen) Untersuchung im Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart aufbewahrt.

Die Patienten wurden in 3 Gruppen unterteilt: 33 Patienten mit MC, 17 Patienten mit CU und 50 Kontrollpersonen. Der nächste Teil der Arbeit zeigt die klinische Charakteristik der in die Studie einbezogenen Patienten.

3.1.2 Klinische Charakteristik vom Patientenkollektiv

Für einen besseren Überblick wurden die Patienten nach Geschlecht, Alter, Dauer der Erkrankung, Krankheitsverlauf, Darmbeteiligung und Stuhlkonsistenz eingeteilt. Dabei wurde ein Therapiekonzept angezeigt (Tab. 2 a, 2 b und 2 c).

Das Kollektiv umfasste 42 Männer und 58 Frauen im Alter zwischen 25 und 82 Jahren. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach festgelegten Kodierungsnummern ohne Kenntnis der Diagnose oder klinischen Daten der Patienten, diese wurden zu einem späteren Zeitpunkt entblendet. Die Diagnose eines Morbus Crohn war bei 33 Patienten gesichert. Bei 17 Patienten wurde die Diagnose einer Colitis ulcerosa festgestellt. Als gesunde Kontrolle wurden 50 Personen getestet. Die Dauer der Erkrankung betrug bei 13 Morbus Crohn-Patienten zwischen 5 und 10 Jahre, bei 15 Patienten zwischen 10 und 20 Jahren und bei 5 Patienten bestand die Erkrankung seit über 20 Jahren. Bei 8 Colitis ulcerosa-Patienten belief sich die Erkrankungsdauer auf einen Zeitraum von 5 bis 10 Jahren, bei weiteren 6 Patienten lag die Krankheitsdauer zwischen 10 und 20 Jahren und 3 Patienten waren an Colitis ulcerosa seit über 20 Jahren erkrankt. In 8 Morbus Crohn-Fällen beschränkte sich die Erkrankung auf das Ileum, in 15 Fällen auf das Ileum und Colon, in einem Fall auf das Ileum und den oberen Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt). In 6 Fällen war das Colon betroffen, in einem Fall Colon und oberer GI-Trakt und in 2 Fällen das Ileum, das Colon und der obere GI-Trakt. Je nach Ausdehnung der Entzündung bei Colitis ulcerosa hatten 11 Patienten eine Pancolitis und 6 Patienten eine Linksseitencolitis. Bei einem Patient mit linksseitiger Colitis wurde histologisch eine Pancolitis gesichert. Bei jedem Patienten wurde mindestens einmal im Krankheitsverlauf eine Biopsie gewonnen. Bei 12 Morbus Crohn-Patienten wurde ein entzündlicher Krankheitsverlauf beobachtet, bei 8 Patienten stenosierend und bei 12 Patienten fistelierend.

Bei 12 Patienten wurden perianale Fisteln diagnostiziert. 21 Patienten wurden operativ behandelt. Einige Patienten wurden konservativ behandelt und hatten eine krankheitsspezifische Medikation. Von den 33 Patienten mit Morbus Crohn erhielten 14 verschiedene Immunsuppressiva, von denen 8 Patienten nur AZA

(Azathioprin) in der Tagesdosis von 150 bis 250 mg bekamen und 4 Patienten AZA in Kombination mit anderen Mitteln: AZA und Mutaflor 1 Patient, AZA und 5-ASA 1 Patient, AZA und 5-ASA und Budesonid 1 Patient, AZA und Ciproxin 1 Patient. Ein Patient wurde nur mittels Mutaflor 100 mg täglich (tgl.) behandelt. Ein Patient erhielt CellCept (Mycophenolatmofetil) in der Dosierung 250 mg tgl. und Cortison in der Tagesdosis von 15 mg. 12 Patienten hatten Antiphlogistika 5-ASA (Mesalazin) in der Tagesdosis von 1500 bis 3000 mg, 3 Patienten wurden mit Budesonid in der Tagesdosis von 3 bis 9 mg behandelt (von diesen bekamen 2 Patienten Budesonid und 5-ASA und 1 Patient Budesonid, 5-ASA und AZA). Bei 4 Patienten wurde eine Therapie mittels 6-MP (Mercaptopurine) in der Tagesdosis von 2 bis 100 mg eingesetzt, von denen 1 Patient 6-MP und Infliximab erhielt (Dosis wurde nicht angegeben). Bei einem MC-Patient wurde eine Antibiotikatherapie mittels Ciproxin 1000 mg bestätigt. Die Daten von diesem Patienten und 3 weiteren Patienten, bei denen der Verdacht auf (V.a.) Antibiotikatherapie zur Zeit der Untersuchung bestand, wurden nicht berücksichtigt. Von 17 Colitis ulcerosa-Patienten wurden 11 Patienten mit 5-ASA behandelt in der Tagesdosis von 250 bis 4500 mg, davon erhielt 1 Patient Cortison 5 mg tgl. und 5-ASA 3000 mg tgl., 1 Patient erhielt Cortison 10 mg tgl. und 5-ASA 3000 mg tgl. und 1 Patient erhielt Cortison in der Tagesdosis von 2,5 mg in Kombination mit 5-ASA 250 mg tgl. Ein Patient wurde mit TG (Thioguanin) 20 mg tgl. in Kombination mit 5-ASA 2000 mg tgl. behandelt. Bei einem Patienten wurde eine Therapie mittels Infliximab (Dosis wurde nicht angegeben) durchgeführt. Von den 33 Morbus Crohn-Patienten hatten 14 am Tag der Stuhluntersuchung eine flüssige Stuhlkonsistenz, 14 Patienten hatten einen breiigen Stuhl und 5 Patienten hatten einen festen Stuhl. Von den 17 Colitis ulcerosa-Patienten hatten 7 einen wässrig/flüssigen Stuhl, 7 Patienten hatten einen breiigen Stuhl und 3 Patienten einen festen Stuhl. Von den 50 Kontrollpersonen hatten 5 Patienten eine flüssige Stuhlkonsistenz, eine breiige Stuhlkonsistenz hatten 11 Patienten und einen festen geformten Stuhl hatten 34 gesunde Personen.

Tabelle 2 a. Klinische Charakteristik von Morbus Crohn-Patienten

Morbus Crohn	Anzahl	Prozent
Patienten	33	
Geschlecht (w/m)	13/20	39,4/60,6
Alter (Mittelalter)	32-69 (46,2)	
Krankheitsverlauf		
entzündlich	12	36,3
stenosierend	8	24,2
fistelierend	12	36,3
nicht bestätigt	1	3,0
Darmbeteiligung (Lokalisation)		
Ileum	8	24,2
Ileum/Colon	15	45,4
Ileum/oberer GIT	1	3
Colon	6	18,2
Colon/oberer GIT	1	3
Ileum/Colon/oberer GIT	2	6
Dauer der Erkrankung		
5 bis 10 Jahre	13	39,4
10 bis 20 Jahre	15	45,4
über 20 Jahre	5	15,2
Stuhlkonsistenz		
fest	5	15,15
breiig	14	42,42
flüssig	14	42,42
Therapie		
Ciproxin	1	
Cortison	1	
Budesonid	3	
AZA	12	
5-ASA	12	
6-MP	4	
Cellcept	1	
Infliximab	1	
Mutaflor	2	
Intestinale OP	21	63,6
konservative Therapie	12	36,4

Tabelle 2b. Klinische Charakteristik von Colitis ulcerosa Patienten

Colitis ulcerosa	Anzahl	Prozent
Patienten	17	
Geschlecht (w/m)	10/7	58,8/41,2
Alter (Mittelalter)	29-82 (44,8)	
Darmbeteiligung (Lokalisation)		
Pancolitis	11	64,7
Linksseitig	6	35,3
Dauer der Entzündung		
5 bis 10 Jahre	8	47
10 bis 20 Jahre	6	35,3
über 20 Jahre	3	17,6
Stuhlkonsistenz		
fest	3	17,64
breiig	7	41,17
flüssig	7	41,17
Therapie		
Cortison	3	
Budesonid	0	
AZA	4	
5-ASA	11	
TG	1	
Infliximab	1	

Tabelle 2c. Klinische Charakteristik von Kontrollpersonen

Kontrollpersonen	Anzahl	Prozent
Patienten	50	
Geschlecht (w/m)	35/15	70/30
Alter (Mittelalter)	25-77 (48)	
Stuhlkonsistenz		
fest	34	68
breiig	11	22
flüssig	5	10

3.1.3 Aufarbeitung der Proben

Ein Gramm jeder Stuhlprobe wurde unter einem Abzug abgewogen, in ein 15 ml Gefäß überführt und in 8 ml 5%-iger Essigsäure resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mehrfach gevortext bis keine größeren Partikel mehr erkennbar waren. Danach erfolgte eine Inkubation unter einer kontinuierlichen Drehbewegung über Nacht (ü. N.) bei 4°C im Kühlraum. Am nächsten Tag wurden je 2 ml Suspension in vier 2 ml Eppendorfgefäße überführt und für 10 min. bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in neue Eppendorfgefäße pipettiert. Nach Entnahme eines Volumens von 50 µl wurde der Rest der Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die entnommene 50 µl Probe wurde in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac) ca. 2 Stunden (h) getrocknet und die Rückstände in 25 µl 0,01%-iger Essigsäure für den FACS-Assay (entspricht 1,25 mg) und in 5 µl 0,01%-iger Essigsäure für den RDA (entspricht 6,25 mg) aufgenommen. Für den Calprotectin-Assay wurden 100 mg jeder Stuhlprobe abgewogen und nach Protokoll des Herstellers verarbeitet.

3.1.4 Vorbereitung der Bakterien

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität des Stuhlextraktes wurde *Escherichia coli* (*E. coli* K12) als Vertreter der gramnegativen Keime verwendet. Die Kulturen wurden auf Columbia Blutagar und Luria-Agar bei 37°C herangezogen und nach Kultivierung über Nacht zum Animpfen verwendet.

3.2 Radialdiffusionsassay

Die antimikrobielle Aktivität der aufbereiteten Stuhlproben gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 wurde mit Hilfe des Radialdiffusionsassays bestimmt.

3.2.1 Prinzip

Der Extrakt der Stuhlproben wird in kleine Löcher eines Agarosegels, das immobilisierte Bakterien (*E. coli* K12) enthält, pipettiert. Liegen in der zu analysierenden Probe antimikrobielle Substanzen vor, so werden die Mikroorganismen im Diffusionsradius der Probe abgetötet, was nach einer Inkubation über Nacht als Hemmhof in einem dichten Bakterienrasen zu erkennen ist, dessen Radius proportional zur antimikrobiellen Aktivität ist.

3.2.2 Durchführung

a) Reagenzienvorbereitung

1x Tryptic Soy Broth (TSB)

15 g TSB-Pulver in 500 ml ddH₂O lösen

Autoklavieren 20 min 121°C, Aufbewahrung bei RT

Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,4

Phosphatpuffer (PP) 200 mM Monobasisch

13.8 g NaH₂PO₄ in 500 ml deionisiertem destilliertem Wasser lösen.

Phosphatpuffer (PP) 200 mM Dibasisch

17.8 g Na₂HPO₄ in 500 ml deionisiertem destilliertem Wasser lösen.

Mischen von 47,5 ml PP-monobasisch mit 202,5 ml PP-dibasisch, Zugabe 250 ml H₂O, Autoklavieren 20 min 121°C, Aufbewahrung bei RT

Phosphatpuffer 10 mM, pH 7,4

Verdünnen des 100 mM Phosphatpuffers 1:10 (100 ml)

Autoklavieren 20 min 121°C, Aufbewahrung bei RT

Underlay Gel (5 Gele)

0,5 g EEO-Agarose abwiegen

Zugabe 0,5 ml 1x TSB und 5 ml des 100 mM Phosphatpuffers

Auffüllen auf 50 ml mit ddH₂O

Zugabe 10 µl Tween-20

Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit 0,1N HCl

Autoklavieren in 100 ml Flaschen für 20 min 121°C, Aufbewahrung bei RT

Vor Gebrauch in Mikrowelle erhitzen, flüssig halten in 46°C Wasserbad

Overlay Agar (5 Gele)

3 g TSB-Pulver und 0,5 g EEO-Agarose abwiegen

Auffüllen auf 50 ml mit ddH₂O

Autoklavieren in 100 ml Flaschen für 20 min 121°C, Aufbewahrung bei RT

Vor Gebrauch in Mikrowelle erhitzen, flüssig halten in 46°C Wasserbad

Kurz vor Gebrauch in 10 ml-Aliquots in 50 ml Falcons geben.

b) Probenvorbereitung

Zunächst musste eine entsprechende Verdünnung der zu testenden Probe hergestellt werden. Wie in 3.1.3 beschrieben, wurde 1 g jeder Probe (insgesamt 100 Stuhlproben) unter einem Abzug abgewogen, in ein 15 ml Gefäß überführt und in 8 ml 5%-iger Essigsäure resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mehrfach gevortext. Schließlich erfolgte eine Inkubation unter einer kontinuierlichen Drehbewegung über Kopf über Nacht bei 4°C im Kühlraum.

Am nächsten Tag wurden je 2 ml Suspension in vier 2 ml Eppendorfgefäße überführt und für 10 min. bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in neue Eppendorfgefäße pipettiert. Die entnommenen 50 µl Proben wurden in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac) ca. 2 h getrocknet und die Rückstände in 5 µl 0,01%-iger Essigsäure aufgenommen.

c) Bakterienvorbereitung

Die Bakterien (*E. coli* K12) wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C auf Columbia Blutagar (bzw. Luria-Agar) angezüchtet. Am nächsten Tag konnte eine kleine Bakterienkolonie mit einem sterilen Spatel in 10 ml Tryptic Soy Broth- Medium übertragen werden und bei 37°C unter Schütteln für 18-24 h angezüchtet werden. Am Folgetag wurde ein Aliquot der stationäre-Phase Kultur (10 µl *E. coli* K12) in 10 ml frisches TSB überimpft und für 2,5 Stunden bei 37°C und Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 10 min. bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert. Ein Gefäß mit sterilerem 10 mM Phosphatpuffer wurde auf Eis gestellt. Danach wurde das Bakteriensediment mit eiskaltem sterilen 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 gewaschen und 10 min. bei 4°C und 2500 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde das Sediment in 5 ml des gleichen Puffers resuspendiert.

d) Konzentrationsbestimmung

Es erfolgte eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte der Bakterienlösung. Dazu wurden 1000 µl Bakterienlösung in eine Küvette überführt und zur Konzentrationsbestimmung die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Aus der Extinktion kann die Bakterienkonzentration anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration (CFU/ml)} = \text{OD}_{620} \times 2,5 \times 10^8$$

Benötigt werden 1×10^7 CFU.

(CFU= Colony Forming Unit-Koloniebildende Einheit).

e) Durchführung

Nach Transferieren von 10 ml des sterilen, flüssigen (46°C) Underlay Agar in ein 50 ml Reaktionsgefäß wurden 1×10^7 CFU der Bakterienlösung hinzugegeben, leicht geschüttelt und in eine quadratische Petrischale auf ebenem Untergrund gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Schale auf ein grafisches Template gegeben und 6 x 6 Löcher mit einem Gel-Puncher hineingestanzt. Danach wurden 5 µl der zu testenden Fraktionen in die Löcher pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl 0,01%-ige Essigsäure als Negativkontrolle eingesetzt. Dies stellte sicher, dass das eingesetzte Essigsäurevolumen alleine keine antibakterielle Wirkung besaß. Des Weiteren wurde das Kontrollpeptid Lysozym als Positivkontrolle mitanalysiert. Darauf wurde die geschlossene Schale im Brutschrank für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das gestanzte Underlay-Gel mit 10 ml nährstoffreichem Overlay-Agar überdeckt. Nach Erstarren des Agars wurde die Petrischale über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für die Färbung am nächsten Tag wurde in die Petrischalen auf die Kultur je 15 ml Coomassie-Lösung pipettiert und unter Schütteln bei + 4°C im Kühlraum ca. 4-5 h inkubiert. Danach erfolgte 2-3 h Entfärbung. Am nächsten Tag wurde die Messung der Durchmesser der Inhibitionszonen sowie die Randbeschreibung durchgeführt und die Messergebnisse wurden dokumentiert.

3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Zusätzlich zum RDA wurden die Stuhlprobenextrakte auf antimikrobielle Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli K12* unter Verwendung eines Durchflusszytometers untersucht.

3.3.1 Einleitung

Die Durchflusszytometrie (der Ausdruck „FACS“ **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton-Dickinson) ist eine Methode zur Identifizierung, Zählung, Sortierung, Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen oder Partikeln in biologischer Flüssigkeit. Dabei können die Zellen einer Einzellsuspension mittels spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden. Das ermöglicht eine Unterscheidung von Zellen mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften. Die Geschichte der Durchflusszytometrie geht auf Wallace H. Coulter zurück, der bereits 1949 ein Patent zur Zählung und Größenbestimmung von gelösten mikroskopischen Partikeln anmeldete und damit die Leukozytenzählung bei der Blutanalyse erleichterte (Coulter, 1956; Darzynkiewicz, 1994; Shapiro, 2003). Jetzt können mit Hilfe der Durchflusszytometrie bis zu 10000 Zellen pro Sekunde typisiert werden. Die Geräte, mit denen diese Untersuchungen durchgeführt werden, heißen Durchflusszytometer.

3.3.2 Aufbau und Prinzip

Das Durchflusszytometer besteht aus der Durchflusszelle, wo die Messung stattfindet. Die Zellsuspension wird durch diese Zelle in einen dünnen Strahl geleitet.

Der nächste Bestandteil ist die Lichtquelle: Argonlaser. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Das auftreffende Licht wird von jeder Zelle entsprechend ihrer Größe und Granularität gestreut und in Vorwärts- und

Seitwärtsstreulicht differenziert. Das Vorwärtsstreulicht wird in Richtung des ursprünglichen Strahls gemessen und hängt von der Größe einer Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark von der Granularität (der „Körnigkeit“) der Zellen ab und wird meist etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen. Gleichzeitig kann man mit dem gestreuten Licht Fluoreszenzfarben messen. Daher verwendet man Farbstoffe, die sich an bestimmte Bestandteile der Zellen binden. Denn DiBAC₄(3) ist ein lipophiles Anion, welches eine geringe Bindungsaffinität für intakte Membranen hat, so dass seine Bindung bei lebenden Bakterien auf die äußeren Bereiche der Zellmembran begrenzt ist. Kommt es durch die Einwirkung von antimikrobiellen Peptiden zu Schädigungen der Zellmembran und zum Zelltod und einer Depolarisation des Membranpotenzials, kann DiBAC₄(3) ins Zellinnere diffundieren und sich dort an lipidreiche Regionen binden. Daraufhin nimmt das durchflusszytometrisch erfassbare Fluoreszenzsignal zu und es wird eine Unterscheidung von lebenden nicht fluoreszierenden Zellen und toten fluoreszierenden Zellen innerhalb einer Bakterienpopulation möglich.

Ein weiterer Bestandteil des Durchflusszytometers ist das Filtern zur Auftrennung der Fluoreszenzsignale auf verschiedene Detektoren. Die über Filtersysteme auf Photoverstärker geleiteten Fluoreszenz- und Streulichtsignale werden dann von Detektoren erfasst, um die eingehenden Signale zu verstärken. Danach werden sie in elektronische Signale umgewandelt und abhängig von ihrer Intensität entsprechenden Kanälen zugeordnet. Es wird die Amplitude bestimmt und zur quantitativen Auswertung auf den angeschlossenen Computer übertragen. Die Messung erfolgt logarithmisch. Die gesammelten Messdaten werden für jeden Parameter einzeln in Graphiken in sogenannten Histogrammen dargestellt und können durch ein oder zwei Parameter zugleich korreliert werden.

3.3.3 Durchführung

Zur Messung wurde ein Extrakt der Stuhlproben eingesetzt. Insgesamt wurden 100 Stuhlproben von 100 Patienten untersucht.

Um die Messwerte miteinander in Relation setzen zu können, wurde für die Messung eine entsprechende Verdünnung der zu testenden Proben hergestellt. Das maximal einzusetzende Probenvolumen diente als Bezugsgröße und sämtliche Probenvolumina der Messreihe wurden mit 0,01%-iger Essigsäure auf dieses Maximalvolumen gebracht. Dabei wurde ein maximales Probenvolumen von 5 µl als Grenze festgestellt. Bei Überschreitung dieses Maximalvolumens hätte die antibakterielle Wirkung der 0,01%-igen Essigsäure zu einer Abtötung der Bakterien geführt. Zusätzlich dienten als Negativ- bzw. Lebendkontrolle 100 µl Bakteriensuspension, der das entsprechende Volumen 0,01%-iger Essigsäure zugefügt wurde. Dies stellte sicher, dass das eingesetzte Essigsäurevolumen allein keine antibakterielle Wirkung besaß. Des Weiteren wurden Bakterienkontrolle und Positiv-Kontrollen analysiert. Konzentration der Positiv-Kontrolle: 50 µg HBD3/ml Bakteriensuspension. Die Bakterien (*E. coli* K12) wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C auf Columbia Blutagar bzw. Luria-Agar kultiviert. Am nächsten Tag konnte die Folgekultur mit einem sterilen Spatel vom Agar abgenommen werden und in mit sterilem bidestillierten Wasser 1:6 verdünnter Schädlerbouillon auf eine optische Dichte im Bereich zwischen 0,04 und 0,05 eingestellt werden. Anschließend wurden die Bakterien für 1,5 h bei 37°C auf eine optische Dichte von 0,1 (logarithmische Wachstumsphase) wachsen gelassen. Nun wurde die Bakteriensuspension 1:10 mit Schädlerbouillon (1:6 in sterilem Aqua bidestillata) verdünnt und die in Tabelle 3 (Tab. 3) aufgeführten Reaktionsansätze pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden 1,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden jedem Reaktionsansatz 1,5 µl DiBAC₄(3) (Gebrauchslösung 1:50 mit sterilem H₂O verdünnt) zugefügt, 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Sedimente in 100 µl FACS-Flow gelöst und dann in vorbereitete FACS-Röhrchen, in welchen zuvor jeweils 200 µl FACS-Flow vorgelegt worden war, überführt. Für die Durchführung der Messungen und die Auswertung der Ergebnisse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) in Verbindung mit einem Apple Macintosh OSX Version 10.4.2 verwendet.

Zur Datenerfassung wurde die Software Cell Quest genutzt.

Für jede zu untersuchende Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert für alle 3 Messungen in der Auswertung verwendet. Die durchschnittliche Messzeit lag zwischen einer und drei Minuten. Von längeren Messzeiten wurde abgesehen, um Sedimentationsphänomene zu vermeiden. Auch wurde die Probe zwischen den Einzelmessungen mit dem Vortex-Gerät gemischt.

Tab. 3: Reaktionsansätze für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Nr.	Bakt.	Probe	Probe [µl]	0.01% Essigs. [µl]	Bakt.lsg. [µl]	Schädler 1:6 [µl]
1	E.coli K12	Bakt. Kontrolle	0	0	10	90
2	E.coli K12	Negativ Kontrolle	0	5	10	85
3	E.coli K12	Positiv Kontr. (HBD3)	5	0	10	85
4	E.coli K12	Stuhlprobe 1	5	0	10	85
5	E.coli K12	Stuhlprobe 2	5	0	10	85
...	E.coli K12	...	5	0	10	85

3.4 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) zur *in vitro* Bestimmung von Calprotectin in Stuhlproben

3.4.1 Einleitung

Für den Nachweis der Entzündung der Darmschleimhaut wurde die quantitative Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14) in Stuhlproben durchgeführt.

Calprotectin ist ein Calcium-bindendes Protein. Es wird von Neutrophilen und Monozyten gebildet. Calprotectin im Stuhl ist ein Marker für gastrointestinale Erkrankungen entzündlicher und neoplastischer Genese (Tibble et al., 1999).

Erhöhte Calprotectin-Werte zeigen mit hoher Sicherheit ein Rezidiv an. Calprotectin ist damit ein idealer Verlaufsmarker bei M. Crohn und Colitis ulcerosa. Ist der Calprotectin-Spiegel im Stuhl niedrig, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine organische Erkrankung des Intestinaltrakts vor (Poullis et al., 2002, Tibble et al., 2000a, 2000b). Der Calprotectin-Test ist sehr hilfreich in der Diagnostik. Mittels des Calprotectin-Tests können Patienten mit Reizdarm ohne fassbare organische Ursache, vor allem wenn pathogene Keime nicht nachweisbar sind und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen deutlich voneinander unterschieden werden. Viele nicht notwendige und für Patienten sehr belastende Coloskopien können so vermieden werden. Eine besondere Bedeutung hat Calprotectin wegen seines nichtinvasiven Charakters auch in der Pädiatrie zur Differenzierung von funktionellen und entzündlichen Erkrankungen (Kapel et al., 2005). Werden um das 10-20-fache über dem Normbereich liegende Werte von Calprotectin nachgewiesen, sind weitere Untersuchungen zur Differentialdiagnostik (Stuhlkultur, Endoskopie usw.) notwendig. Der in der vorgelegten Arbeit beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) zur Bestimmung von Calprotectin im Stuhl wurde nach dem Protokoll von Hycult biotechnology b. v. durchgeführt.

3.4.2 Stuhlprobenextraktion

Bei den zur Analyse verwendeten humanen Proben handelte es sich um Stuhlproben. Diese wurden, wie oben beschrieben, von der Klinik für Innere Medizin IV, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Wien, Österreich zur Verfügung gestellt. Von den insgesamt 100 vorliegenden Proben hatten 82 Stuhlproben ausreichende Volumina für die Messung der Calprotectin-Konzentration.

3.4.3 Probenvorbereitung

100 mg Stuhlprobenmasse wurden in ein Eppendorf- Cup manuell eingewogen. Danach wurde jede einzelne Probe in 5 ml Extraktionspuffer suspendiert, mindestens 30 s je nach Stuhlkonsistenz gevortext und anschließend durch ein 400 µm Sieb filtriert. Anschließend wurden alle Proben auf einem Rollinkubator mindestens 20 min. geschüttelt. Danach wurden 2 ml der Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 20 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß transferiert und mit Waschpuffer 1:23,5 = 1:1200 (final) feiner verdünnt. Im Test wurden 100 µl der Verdünnung pro Vertiefung eingesetzt.

3.4.4 Testdurchführung

Der Test basiert auf der sogenannten „Sandwich“- ELISA Technik. Verdünnte Patientenproben, die auf Calprotectin zu untersuchen sind, sowie Teststandards und Kontrollen werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem anti-human Calprotectin Antikörper beschichtet. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Calprotectin aus der Probe von dem gekoppelten Antikörper gebunden. Alle Proben wurden grundsätzlich doppelt aufgetragen und aus diesen Doppelwerten der Mittelwert für die weitere Auswertung gebildet. Im zweiten Inkubationsabschnitt wird ein weiterer monoklonaler anti-human Calprotectin Antikörper (biotinyliert), Detektionsantikörper, an das Calprotectin gebunden. Danach wird das Peroxidase-Konjugat zugegeben. Zur Entfernung ungebundener Antikörper oder Antigene folgten zwischen jedem der darauf folgenden Schritte drei Waschschritte. An der Wand der Mikrotiterplatte wird folgender Komplex gebildet: Antikörper- humanes Calprotectin- Detektionsantikörper-Peroxidase Konjugat. Als Substrat wurde das Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet, das während 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lichtgeschützt von der Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird.

Anschließend wird die Enzymreaktion durch Zugabe von Stopp-Lösung abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption wird im Spektrophotometer bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Calprotectin-Gehalt direkt proportional (aus der Arbeitsanleitung Immundiagnostik 2005). Zur Quantifizierung wurden bekannte Konzentrationen eines Calprotectin-Standards mitgemessen.

3.5 Bestimmung des Trockengewichts der Stuhlproben

Es wurde 1 g jeder Stuhlprobe mit einer Feinwaage abgewogen. Danach wurden die Proben ca. 12 h in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac) getrocknet und schließlich wurde die verbleibende trockene Substanz abgewogen. Der Unterschied wurde berechnet. Die Bestimmung des Trockengewichtes wurde zur Berechnung des Verdünnungsfaktors bei flüssigem Stuhl durchgeführt, um die antimikrobielle Aktivität zu normalisieren und einen Verdünnungseffekt auszuschließen.

4 Ergebnisse

Zuerst wurde geprüft, ob in den Stuhlproben eine antimikrobielle Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 nachweisbar ist.

Um diese Aussage machen zu können, wurde der Radialdiffusionsassay gewählt.

4.1 Analyse der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben (Radialdiffusionsassay)

In Abbildung 9 wird beispielsweise ein Ergebnis des RDA dargestellt. Von links nach rechts Durchmesser einer 0,01% Essigsäure als Kontrolle (eingestanztes Loch ca. 2,5 mm im Durchmesser ohne Killing), dann Lysozym 1 µg (variiert zwischen 5,00 und 6,00 mm) und getesteten Proben (Durchmesser variiert zwischen 6,00 und 10,00 mm).

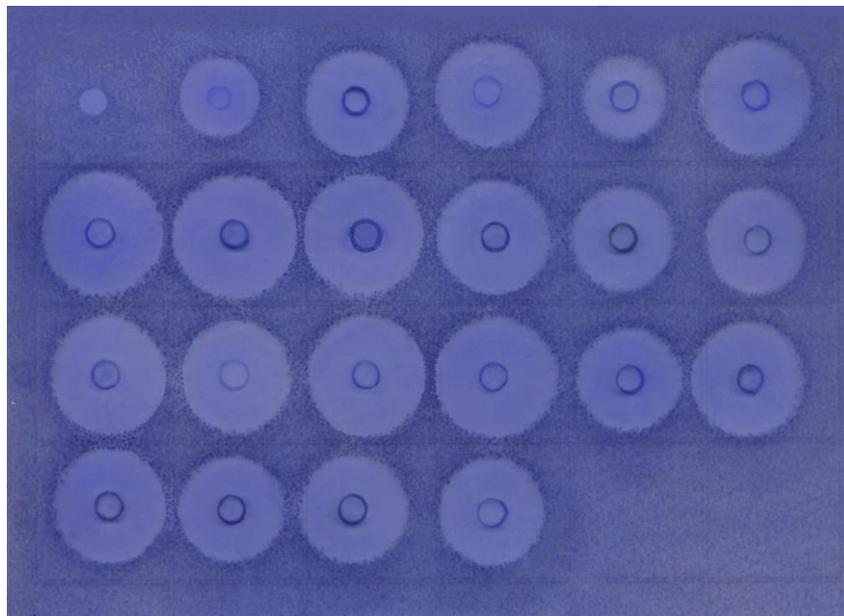


Abb. 9 Ergebnis der Radialdiffusionsassays. Gezeigt wurden Diffusionsradien der Proben, in welchen die Mikroorganismen (*E. coli* K12) abgetötet sind. Färbung: Comassie Stains R-250.

Tabelle 4 zeigt beispielhaft die Messergebnisse: Durchmesser und Randbeschreibung der zu testenden Proben.

Tab. 4: Radialdiffusionsassay. Durchmesser des Hemmhofes und Randbeschreibung

Nr.	Probe	Durchmesser in mm	Randbeschreibung	Diagnose (später entblindet)
1	Essigsäure 0,01%	2,50	scharf	
2	Lysozym 1 µg	6,00	etwas unscharf	
3	4A6	9,00	rel. scharf	CU
4	4B2	9,00	rel. scharf	CU
5	4A1	6,00	rel. scharf	CU
6	5A1	7,00	rel. scharf	Kontrolle
7	5A4	10,00	rel. scharf	Kontrolle

Zuerst wurde als Kontrolle 0,01% Essigsäure (Durchmesser des eingestanzten Loches zeigt sich unverändert und der Rand ist scharf) und Lysozym 1µg (Durchmesser des Hemmhofes 6,00 mm, der Rand ist etwas unscharf) getestet. Danach wurde den Hemmhofdurchmesser der zu testenden Stuhlproben dargestellt. Der Durchmesser des Hemmhofes variiert zwischen 6,00 und 10,00 mm, die Ränder sind relativ (rel.) scharf. Die Diagnosen des Patientenkollektivs wurden uns später zur Verfügung gestellt.

Bei 4 Patienten zeigte sich ein deutlich breiterer Radius (Abb. 10 und Tab. 5). Es wurde festgestellt, dass einer von diesen Patienten eine Therapie mittels Ciproxin (1000 mg) bekommen hat. Die Stuhlkonsistenz war bei diesem Patienten wässrig und die Farbe war gelb. Bei weiteren 3 Patienten, bei denen der Durchmesser des Hemmhofes ebenso vergrößert war, hatten die gleiche Stuhlkonsistenz und Stuhlfarbe. Es wurde vermutet, dass alle 4 Patienten eine

Antibiotikatherapie bekommen haben. Diese Daten wurden für die statistische Analyse nicht berücksichtigt.

Abbildung 10 zeigt beispielhaft ein Ergebnis des RDA bei 4 Patienten mit mutmaßlicher Antibiotikatherapie.

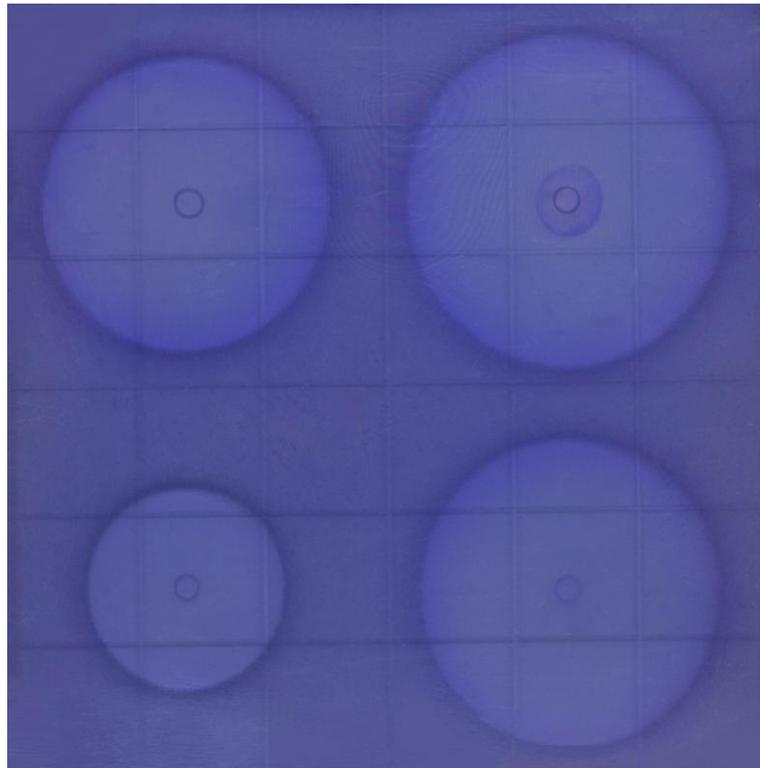


Abb. 10 Ergebnis der Radialdiffusionsassays bei mutmaßlicher Antibiotikatherapie. Dargestellt wurde bei 4 Proben ein deutlich größerer Diffusionsradius. Färbung: Comassie Stains R-250.

Der Hemmhof zeigte sich homogen, die Ränder war deutlich scharf abgegrenzt. Es wurden keine Kontaminationen festgestellt.

Auch in der Tabelle 5 wurde das Ergebnis des Hemmhofdurchmessers bei diesen 4 Patienten mit mutmaßlicher Antibiotikatherapie beispielhaft dargestellt. Der Durchmesser variiert zwischen 21,00 mm und 34,00 mm, die Ränder des Hemmhofes sind scharf abgegrenzt. Die Patientendiagnose wurden uns später bekannt gegeben.

Tab. 5: Radialdiffusionsassay. Durchmesser des Hemmhofes und Randbeschreibung bei Patienten mit mutmaßlicher Antibiotikatherapie.

Nr.	Probe	Durchmesser in mm	Randbeschreibung	Diagnose (später entblindet)
1	1D2	31,00	scharf	MC
2	2D7	34,00	scharf	MC
3	5A7	21,00	scharf	Kontrolle
4	5B10	32,00	scharf	Kontrolle

4.1.1 Graphische Darstellung der RDA-Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des RDA graphisch dargestellt. Zuerst wird die antimikrobielle Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 von Stuhlproben bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten dargestellt (Abb. 11). Für jede Patientengruppe wurde der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt. Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

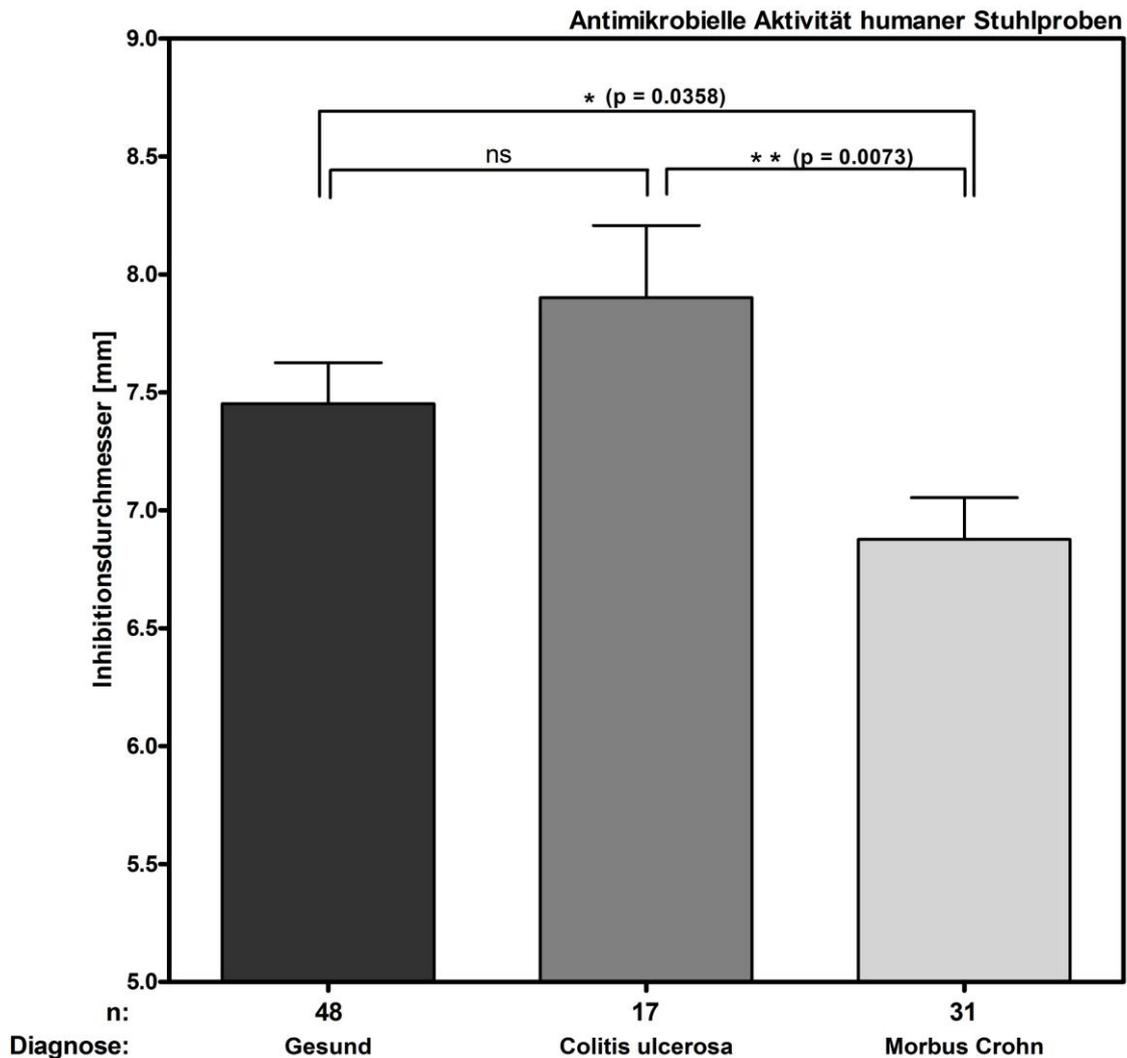


Abb. 11 Antimikrobielle Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

p=0,0358 zeigt eine statistisch signifikante Verminderung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 von Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

**** p=0,0073** zeigt eine deutlich signifikante Verminderung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 zwischen Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten.

ns: nicht signifikant. Es zeigen sich keine signifikanten Differenzen der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 zwischen gesunden Personen und Colitis ulcerosa-Patienten.

Als Kontrolle wurde 0,01% Essigsäure und 1 μ g Lysozym getestet (Abb. 12).

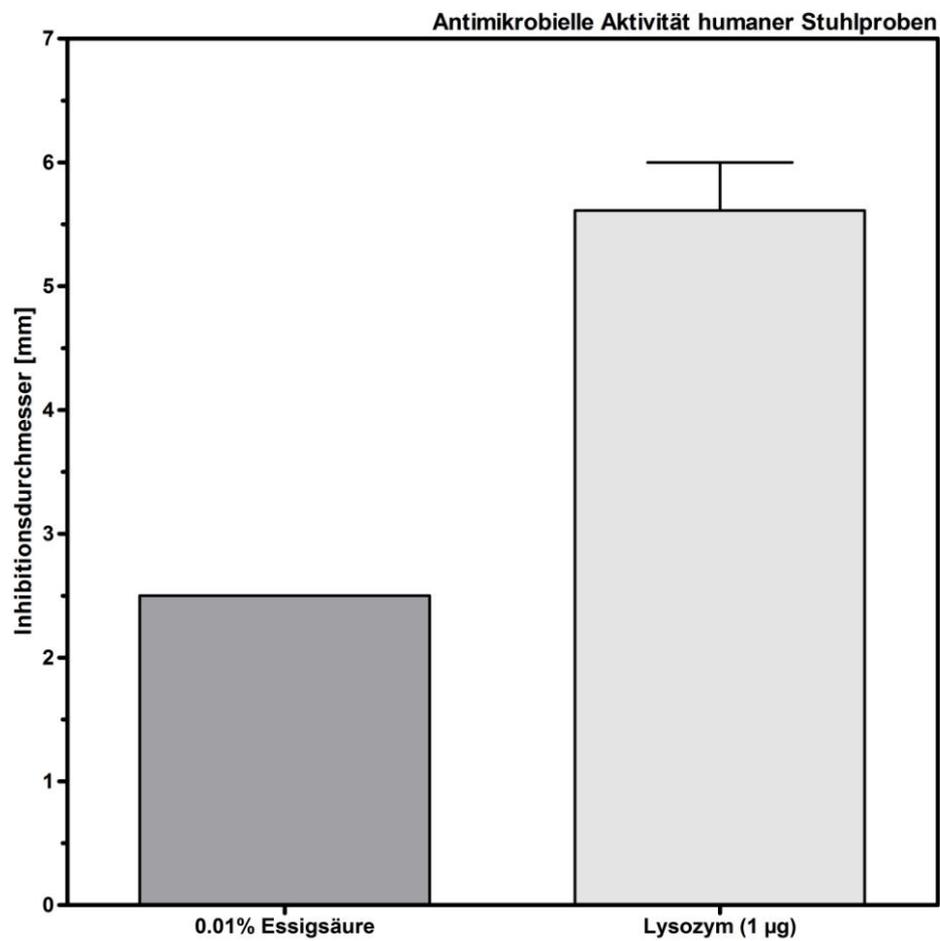


Abb. 12 Kontrolle: 0,01% Essigsäure und Lysozym 1 μ g.

Des Weiteren wurde jede Patientengruppe im Vergleich zu den verschiedenen Stuhlkonsistenzen dargestellt. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis bei den Kontrollpersonen.

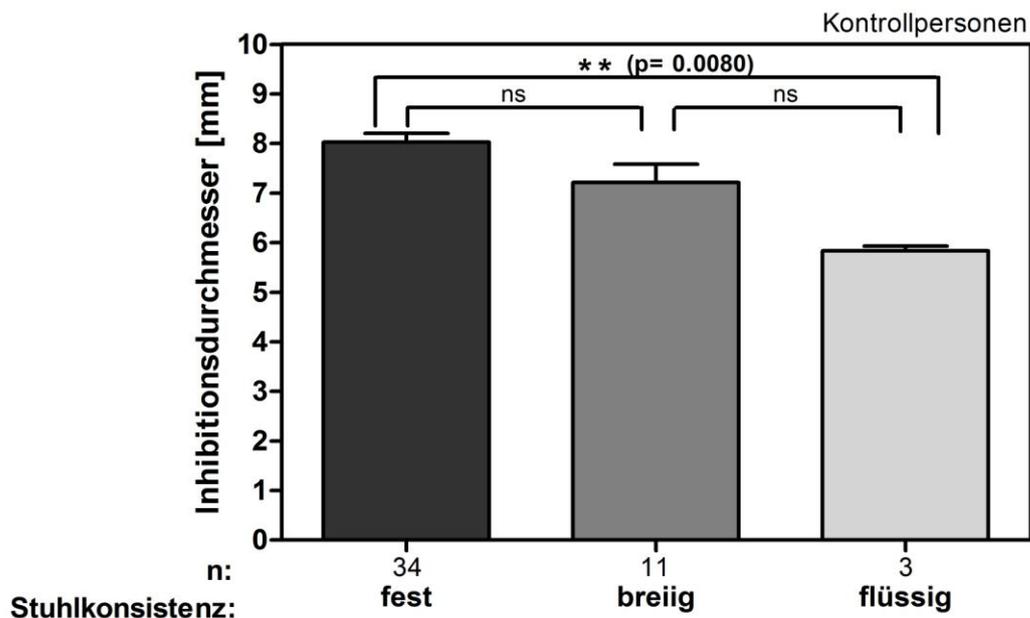


Abb. 13 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K 12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Stuhlkonsistenz bei den Kontrollpersonen.

Der quantitative Unterschied der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in Stuhlprobenextrakten zwischen den Kontrollpersonen mit festen Stuhl und Kontrollpersonen mit flüssigen Stuhl war hoch signifikant ($p=0,0080$). Zwischen den Kontrollpersonen mit fester und breiiger Stuhlkonsistenz und zwischen den Kontrollpersonen mit breiiger und flüssiger Stuhlkonsistenz besteht keine statistisch signifikante Differenz.

Da es sich im Vergleich zu den anderen Untersuchungen um eine relativ kleine Anzahl von gesunden Patienten mit einem flüssigen Stuhl handelt, wurden bei der Auswertung dieses Versuches Patienten mit breiiger und flüssiger Stuhlkonsistenz zusammen gezählt (Abb. 14).

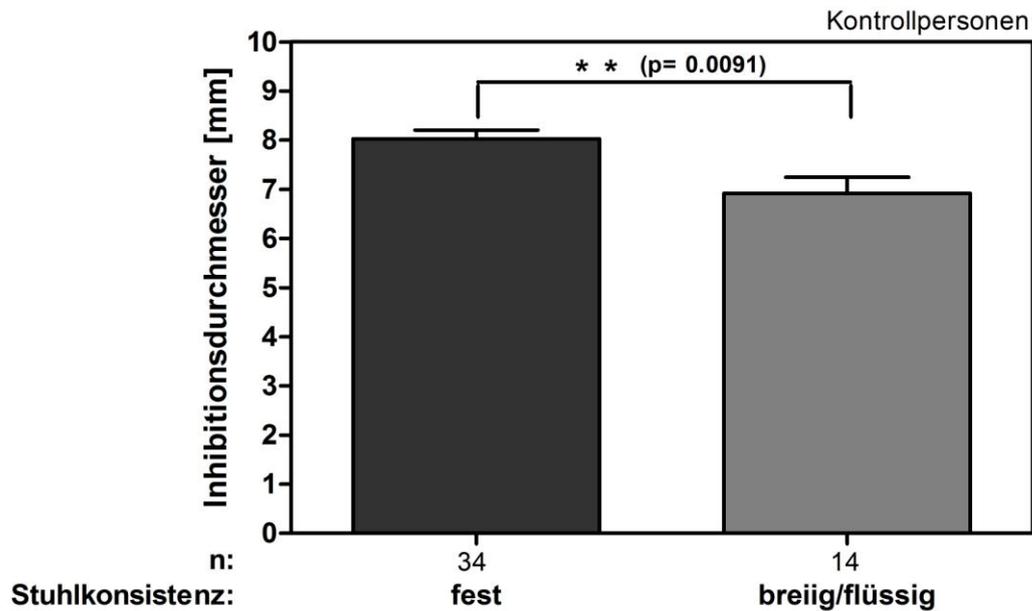


Abb. 14 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiig/flüssigen Stuhlkonsistenz bei den Kontrollpersonen.

Auch hier lässt sich eine signifikante Korrelation in den antimikrobiellen Aktivitäten zwischen den Kontrollpersonen mit fester Stuhlkonsistenz und den Kontrollpersonen mit breiig/flüssiger Stuhlkonsistenz nachweisen ($p=0,0091$).

Ebenso wurden Stuhlproben verschiedener Konsistenzen bei Morbus Crohn-Patienten getestet (Abb. 15).

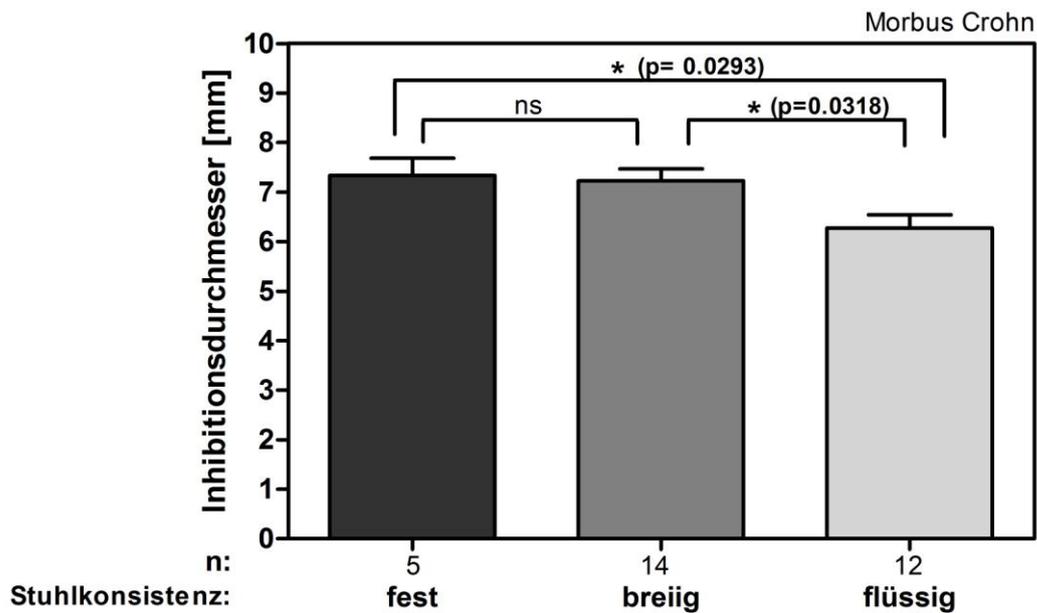


Abb. 15 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Stuhlkonsistenz bei Morbus Crohn-Patienten.

Bei den Patienten mit einem Morbus Crohn wurde eine statistisch signifikante Differenz der antimikrobiellen Aktivität zwischen festem und flüssigem Stuhl ($p=0,0293$) und zwischen breiigem und flüssigem Stuhl ($p=0,0318$) dargestellt. Bei den Patienten mit festem und breiigem Stuhl wurden keine signifikanten Differenzen der antimikrobiellen Aktivität nachgewiesen.

In der Gruppe der Colitis ulcerosa-Patienten waren die Ergebnisse ähnlich (Abb. 16).

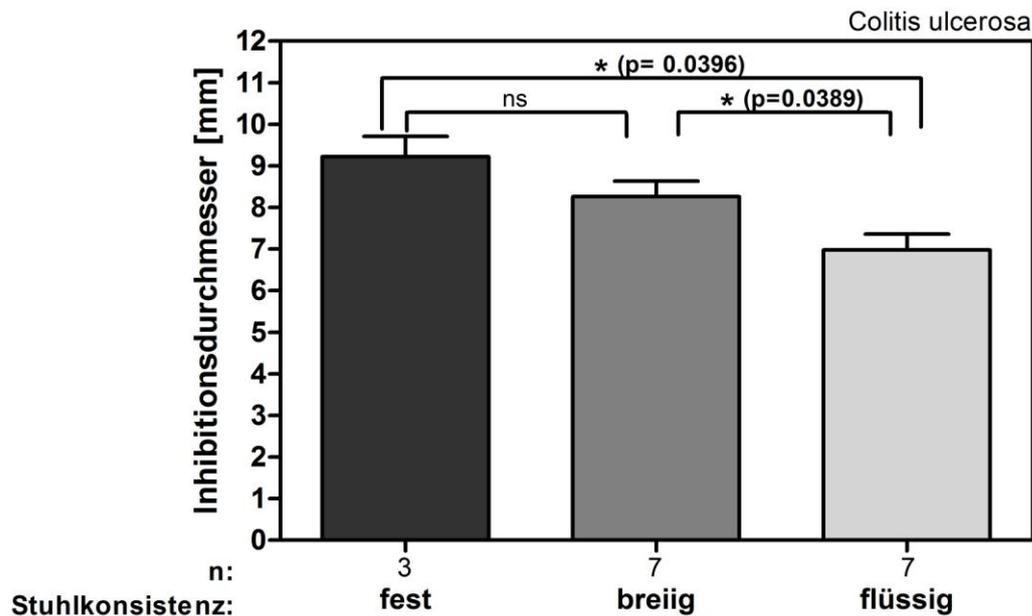


Abb. 16 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Stuhlkonsistenz bei Colitis ulcerosa-Patienten.

Es wurde eine statistisch signifikante Differenz der antimikrobiellen Aktivität zwischen festem und flüssigem Stuhl ($p=0,0396$) und zwischen breiigem und flüssigem Stuhl ($p=0,0389$) bei den Colitis ulcerosa-Patienten dargestellt. Bei den Patienten mit festem und breiigem Stuhl konnten keine signifikanten Differenzen der antimikrobiellen Aktivität festgestellt werden.

Als nächster Schritt wurden alle Patientengruppen mit fester Stuhlkonsistenz getestet (Abb. 17).

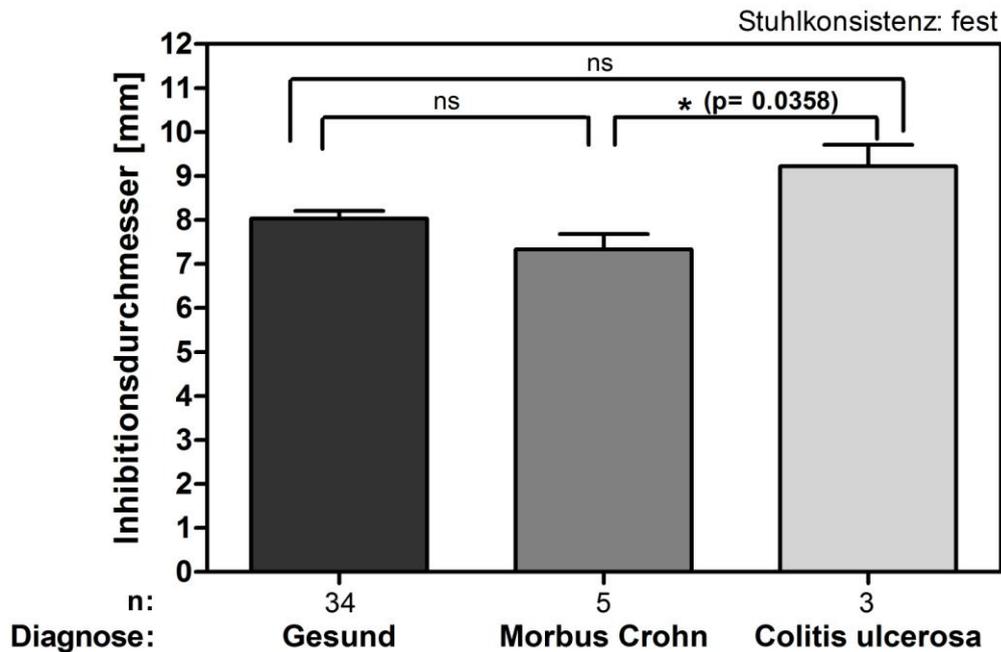


Abb. 17 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei fester Stuhlkonsistenz.

Die quantitativen Unterschiede der antimikrobiellen Aktivität der festen Stuhlkonsistenz zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten zeigten sich signifikant ($p=0,0358$). Zwischen den Morbus Crohn-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen und zwischen den Colitis ulcerosa-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen konnten keine signifikanten Differenzen der antimikrobiellen Aktivität festgestellt werden.

Gleiche Ergebnisse wurden auch bei den Patienten mit breiiger Stuhlkonsistenz festgestellt (Abb. 18).

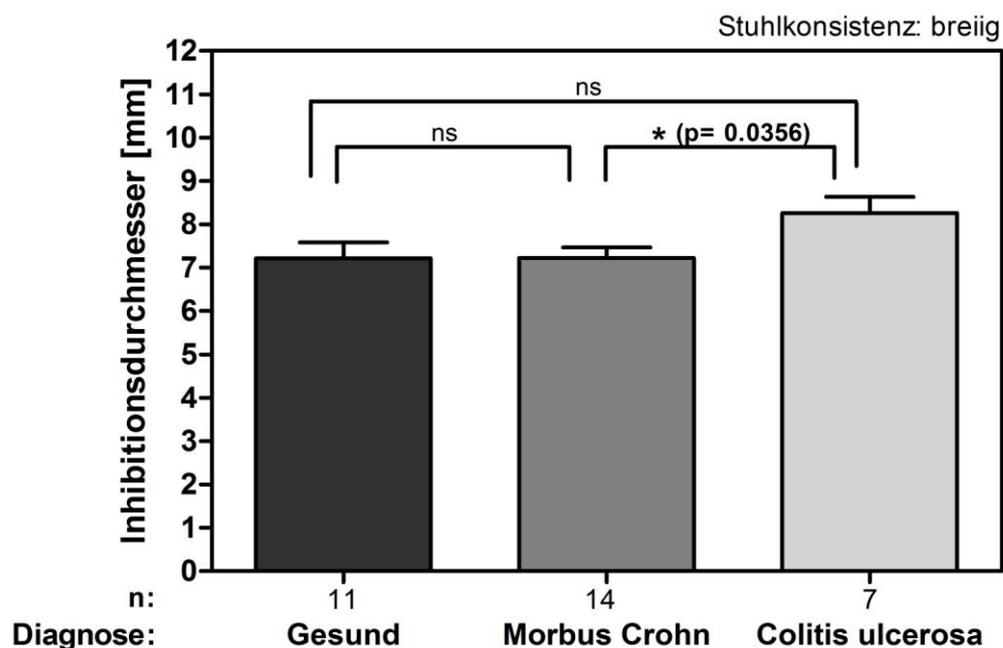


Abb. 18 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei breiiger Stuhlkonsistenz.

Auch hier zeigten sich die quantitativen Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität der breiigen Stuhlkonsistenz zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten signifikant ($p=0,0356$). Zwischen den Morbus Crohn-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen und zwischen den Colitis ulcerosa-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen konnten keine signifikanten Differenzen der antimikrobiellen Aktivität bei breiiger Stuhlkonsistenz festgestellt werden.

Die Ergebnisse des analysierten Patientenkollektivs mit einem flüssigen Stuhl wurde in Abbildung 19 dargestellt.

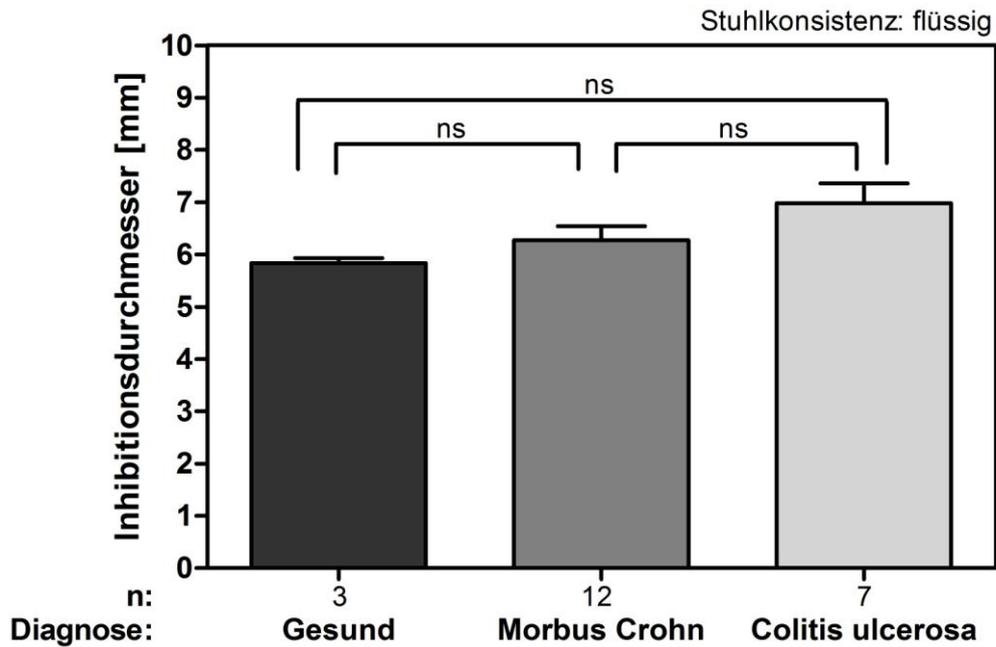


Abb. 19 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei flüssiger Stuhlkonsistenz.

Es wurden keine signifikanten Differenzen in der antimikrobiellen Aktivität zwischen allen Patientengruppen mit flüssigem Stuhl festgestellt werden.

4.2 Analyse der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben (FACS-Assay)

Um die Ergebnisse des RDAs zu bestätigen und gegebenenfalls (ggf.) zu ergänzen, wurde noch eine weitere Methode zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität, der FACS-Assay, gewählt.

Die Wirkung antimikrobieller Peptide im Stuhlprobenextrakt von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) sowie Kontrollpersonen auf den Bakterienstamm *E. coli K12* wurde mittels eines durchflusszytometrischen Assays erfasst.

Für die Messung wurde eine entsprechende Verdünnung der zu testenden Probe hergestellt. Ein maximales Probenvolumen von 5 µl wurde als Grenze festgelegt. Des Weiteren wurden Bakterienkontrolle, Negativkontrolle mit 0,01% Essigsäure und Positivkontrolle mit HBD3 analysiert.

Abbildung 20 zeigt ein exemplarisches Messergebnis. In Abbildung 20 (links) ist das für diese Messung gelegte Bakteriengate ersichtlich, nur die innerhalb dieses Gates liegenden Events gingen in die Ergebnisse der Analyse ein. Abbildung 20 (mitte) verdeutlicht die Differenzierung der Bakterienpopulation in depolarisierte fluoreszierende und in lebende, nicht, oder nur wenig fluoreszierende Bakterien. Die links des vertikalen Markers liegenden Bakterien der Population gelten als lebend, jene, die sich rechts davon befinden, als tot. Der Marker wird immer nach der Bakterienkontrolle gesetzt und bei der Auswertung der Proben nicht mehr verändert. Der Anteil der toten Bakterien sollte 1% nicht überschreiten.

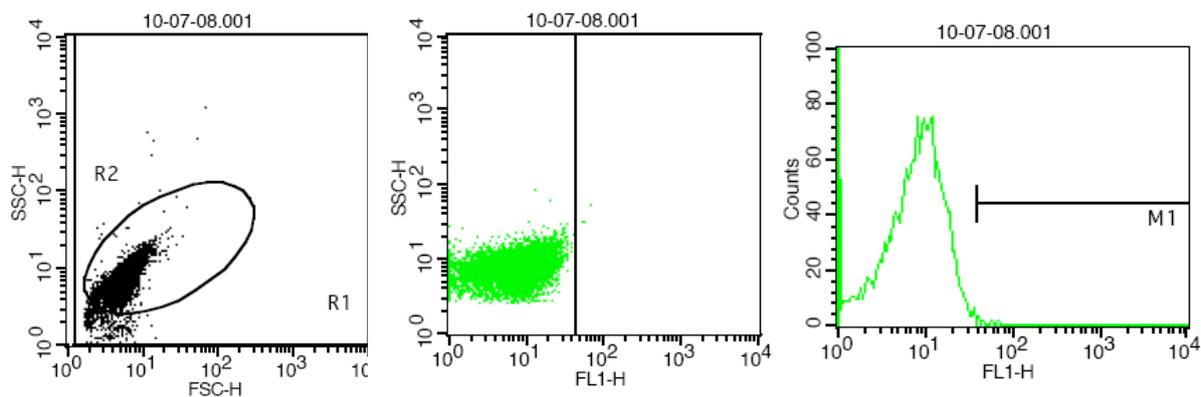


Abb. 20 Ergebnis der FACS-Assays, Bakterienkontrolle.

Bakteriengate der Bakterienpopulation *E. coli* K12 für die Messung der antimikrobiellen Aktivität der Stuhlprobenextrakte (linke Abb.). Die Bakterienpopulation wurde durch ihre Vorwärtsstreulicht- und Seitwärtsstreulichteigenschaften von Hintergrundsignalen differenziert. Differenzierung der analysierten Bakterienpopulation in lebende, nicht- oder nur wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (mittlere Abb.). Der vertikale Marker kennzeichnet die Grenze zwischen lebenden und toten Bakterien. Einteilung der analysierten Bakterienpopulation im Histogramm der analysierten Bakterienpopulation in lebende, nicht- oder nur wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (rechte Abb.).

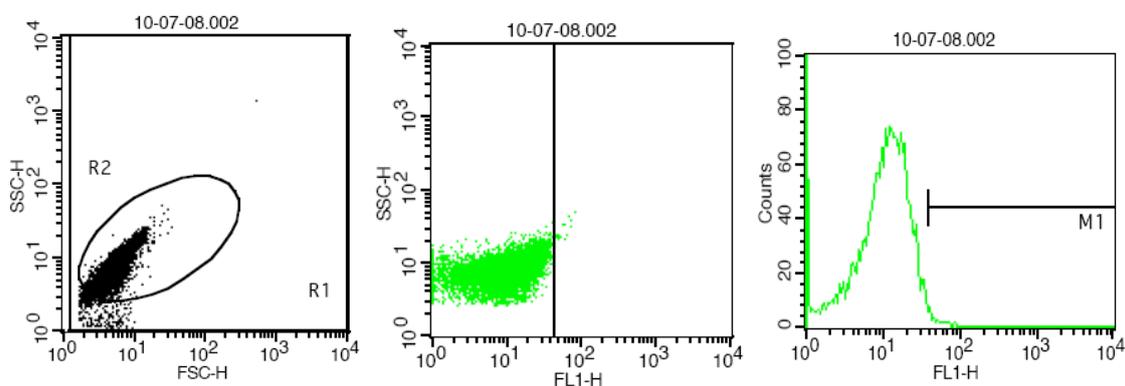


Abb. 21 Ergebnis der FACS-Assays, Negativkontrolle 0,01% Essigsäure.

Negativkontrolle (0,01% Essigsäure) für die Messung der antimikrobiellen Aktivität (linke Abb.). Differenzierung der analysierten Substanz in lebende,

nicht- oder nur wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (mittlere Abb.). Einteilung der analysierten Bakterienpopulation im Histogramm der analysierten Bakterienpopulation in lebende, nicht- oder nur wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (rechte Abb.).

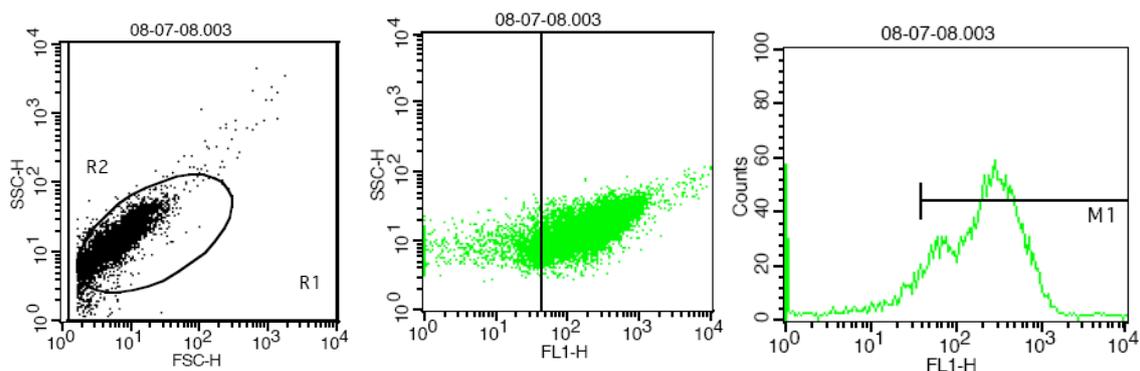


Abb. 22 Ergebnis der FACS-Assays, Positivkontrolle hBD3.

Positivkontrolle für die Messung der antimikrobiellen Aktivität (linke Abb.). Differenzierung der analysierten Substanz in lebende, nicht- oder wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (mittlere Abb.) Einteilung der analysierten Substanz im Histogramm (rechte Abb.).

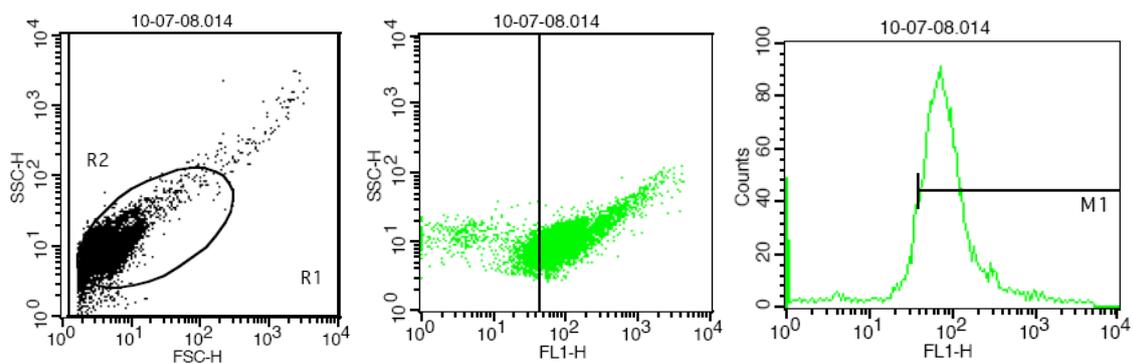


Abb. 23 Ergebnis der FACS-Assays, Humaner Stuhlprobeextrakt.

Die Bakterienpopulation wurde durch ihre Vorwärtsstreulicht- und Seitwärtsstreulichteigenschaften von Hintergrundsignalen differenziert (linke Abb.). Differenzierung der analysierten Bakterienpopulation in lebende, nicht- oder nur wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (mittlere

Abb.). Der vertikale Marker kennzeichnet die Grenze zwischen lebenden und toten Bakterien. Einteilung der analysierten Bakterienpopulation im Histogramm der analysierten Bakterienpopulation in lebende nicht oder nur wenig fluoreszierende und in tote fluoreszierende Bakterien (rechte Abb.).

Abbildung 24 zeigt die graphisch dargestellte antimikrobielle Aktivität zwischen der Bakterienkontrolle (*E. coli K12*), 0,01% Essigsäure und hBD3.

Die Analyse der einzelnen Substanzen ergab einen statistisch hoch signifikanten Unterschied für die Bakterienkontrolle und hBD3 und für die Negativkontrolle (0,01% Essigsäure) und Positivkontrolle (hBD3).

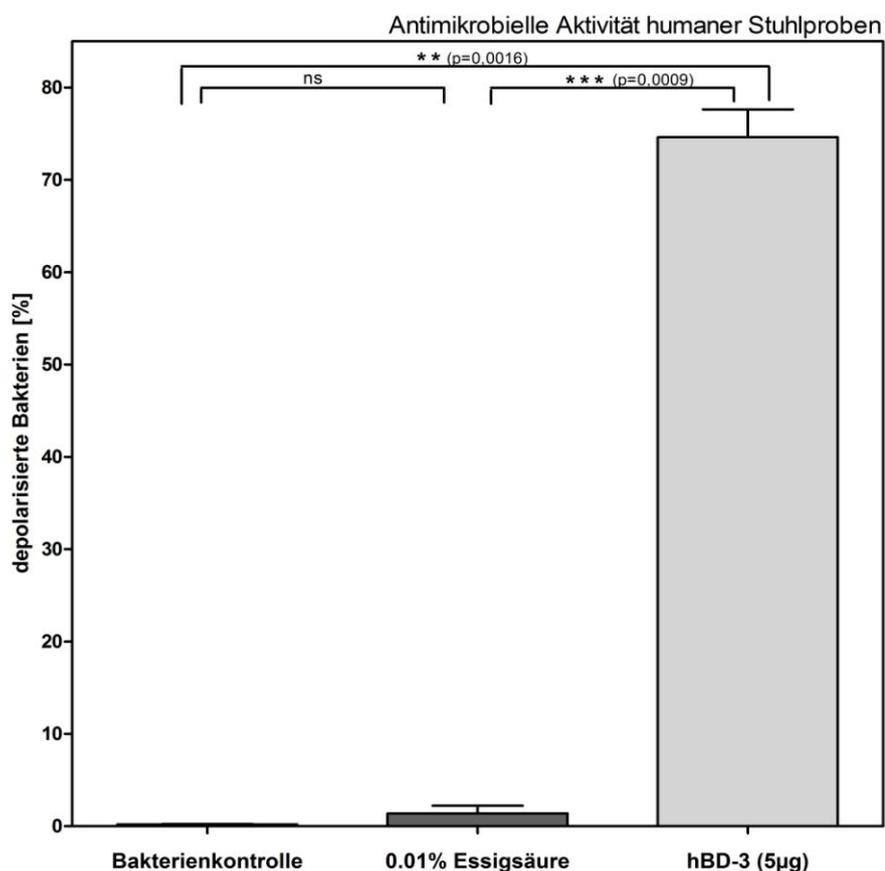


Abb. 24 Antimikrobielle Aktivitäten: Bakterienkontrolle, Negativkontrolle (0,01% Essigsäure) und Positivkontrolle (hBD-3).

Graphisch dargestellt wurde die Bakterienkontrolle *E. coli K12*, Negativkontrolle 0,01% Essigsäure und Positivkontrolle hBD-3. Bei der Bakterienkontrolle zeigte sich keine antimikrobielle Aktivität. Die höchste antimikrobielle Aktivität wurde in

hBD3 nachgewiesen. Im Vergleich zu der Positivkontrolle war die antimikrobielle Aktivität hBD3 hoch signifikant ($p=0,0016$), auch im Vergleich zu der Negativkontrolle wurde ein sehr hoch signifikanter Unterschied der antimikrobiellen Aktivität hBD3 nachgewiesen ($p=0,0009$).

In Abbildung 25 wurde graphisch dargestellt, dass Stuhlextrakte von Morbus-Crohn-Patienten eine hochsignifikante Verminderung der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* K12 aufweisen ($p < 0,001$).

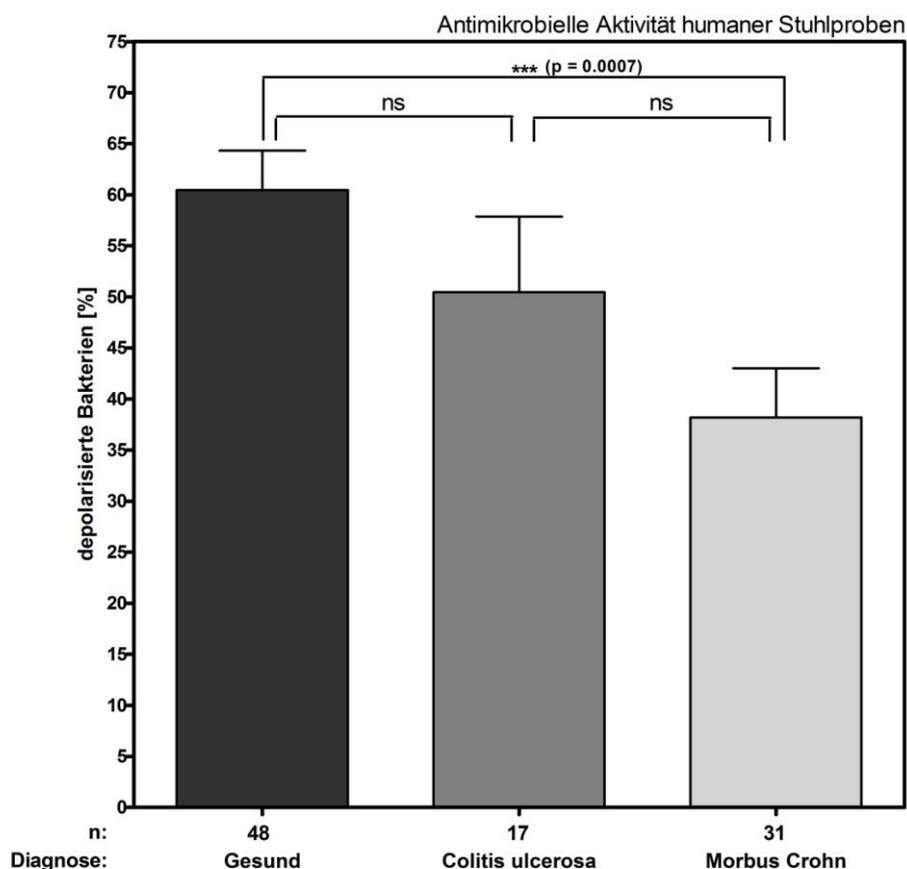


Abb. 25 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Colitis ulcerosa und Patienten mit Morbus Crohn.

Für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität wurden 48 Stuhlprobenextrakte von den gesunden Kontrollpersonen, 17 Stuhlprobenextrakte von den Colitis ulcerosa-Patienten und 31 Stuhlprobenextrakte von den Morbus Crohn-Patienten analysiert.

Graphisch wurde für jede Gruppe der Mittelwert sowie die Standardabweichung dargestellt.

***** $p=0,0007$** zeigt eine hochsignifikante Verminderung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 von Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen

ns: nicht signifikant. Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den gesunden Personen und den Colitis ulcerosa-Patienten und zwischen den Colitis-ulcerosa-Patienten und den Morbus Crohn-Patienten.

Alle Stuhlproben wurden verblindet gemessen und erst bei der Analyse entblindet und gruppiert (Abbildungen 26, 27 und 28): 34 gesunde Personen (68%) hatten einen festen Stuhl, 11 Kontrollpersonen (22%) hatten einen breiigen Stuhl und einen flüssigen Stuhl hatten nur 5 Kontrollpersonen (10%). Die zwei Flüssig-Stuhlwerte wurden wegen Verdacht auf durchgeführte Antibiotikatherapie, wie oben beschrieben, nicht berücksichtigt. Bei Morbus Crohn-Patienten hatten nur 5 (15,2%) einen festen Stuhl, breiigen Stuhl hatten 14 (42,4%) und flüssigen Stuhl ebenfalls 14 Patienten (42,4%). Auch hier wurden zwei Flüssig-Stuhlwerte wegen v.a. durchgeführte Antibiotikatherapie nicht berücksichtigt. Bei Colitis ulcerosa-Patienten hatten 3 Patienten (17,6%) einen festen Stuhl, 7 Patienten (41,2%) einen breiigen Stuhl und 7 Patienten (41,2%) einen flüssigen Stuhl.

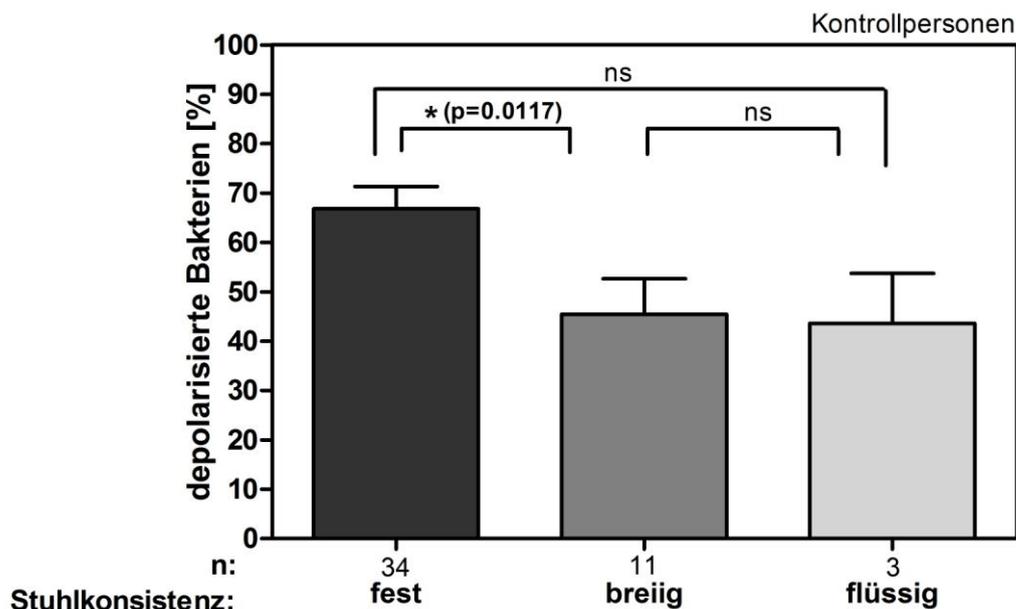


Abb. 26 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Konsistenz bei den Kontrollpersonen.

Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 bei den gesunden Kontrollpersonen mit breiigem Stuhl im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen mit festem Stuhl (**p=0,0117**).

Eine signifikante Differenz zwischen breiigem und flüssigem Stuhl sowie flüssigem und festem wurde nach dieser Methode nicht nachgewiesen.

Wegen der geringen Anzahl der gesunden Patienten mit einem flüssigen Stuhl wurden Kontrollpersonen mit einem flüssigen Stuhl und Kontrollpersonen mit einem breiigen Stuhl zusammen gezählt.

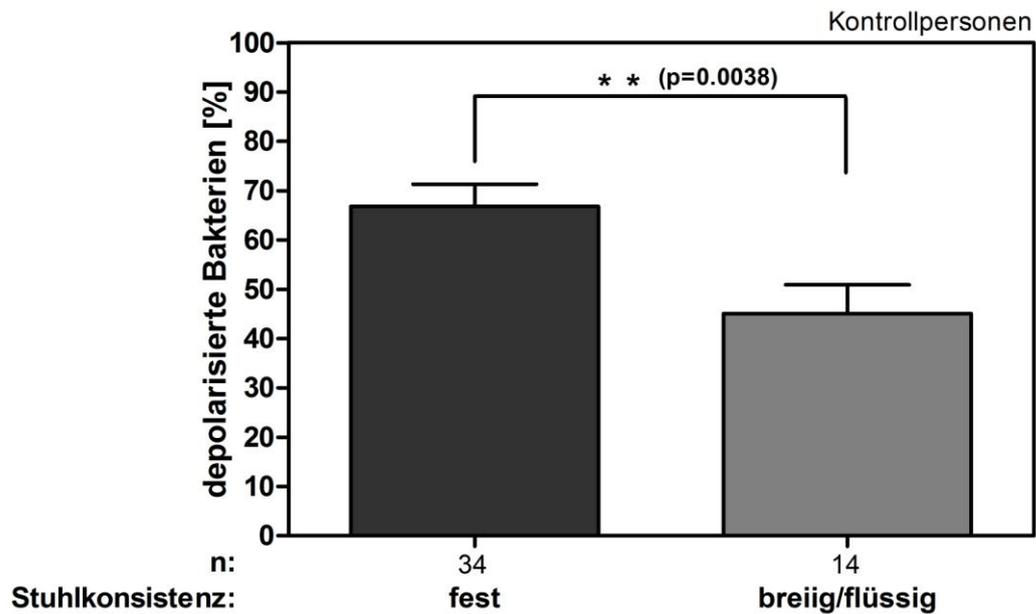


Abb. 27 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiig/flüssigen Konsistenz bei den Kontrollpersonen.

Es zeigte sich statistisch ein deutlich signifikanter Unterschied ($p=0,0038$) der antimikrobiellen Aktivität zwischen den Kontrollpersonen mit einem festen Stuhl und den Kontrollpersonen mit einem breiig/flüssigen Stuhl.

Abbildung 28 zeigt die Vergleichsergebnisse der antimikrobiellen Aktivität zwischen festem, breiigem und flüssigem Stuhl bei den Morbus Crohn-Patienten.

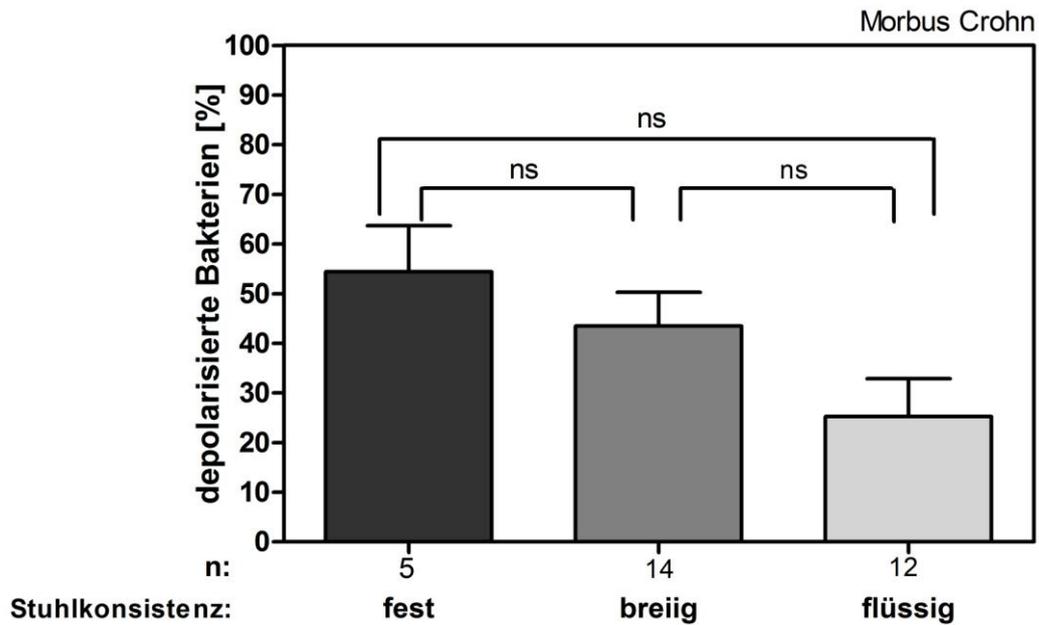


Abb. 28 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Konsistenz bei Morbus Crohn-Patienten.

Ein Vergleich der antimikrobiellen Aktivität der verschiedenen Stuhlkonsistenzen bei Morbus Crohn-Patienten konnte keine signifikante Differenz darstellen, der Trend zeigt aber deutlich sinkende Aktivität mit steigendem Flüssigkeitsanteil.

Weitere nicht signifikante Ergebnisse sind zwischen verschiedenen Stuhlkonsistenzen bei den Colitis ulcerosa-Patienten in Abb. 29 dargestellt.

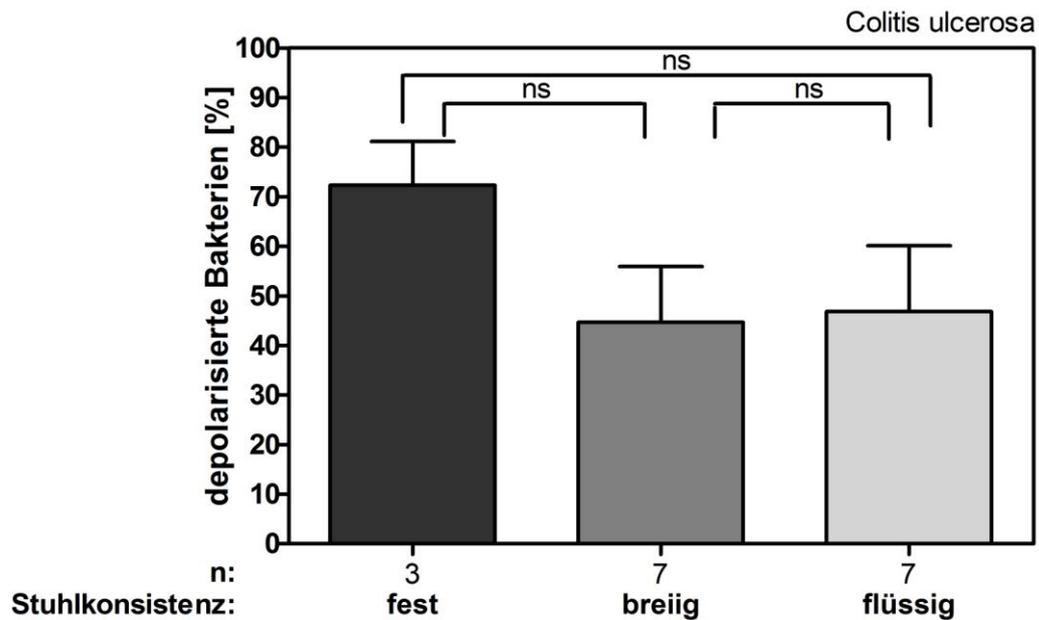


Abb. 29 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Konsistenz bei Colitis ulcerosa-Patienten.

Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede der antimikrobiellen Aktivität zwischen festem, breiigem und flüssigem Stuhl bei Colitis ulcerosa-Patienten.

Die Abbildungen 30, 31 und 32 zeigen die antimikrobielle Aktivität der nach Stuhlkonsistenz eingeteilten Stuhlproben bei den gesunden Personen, den Morbus Crohn-Patienten und den Colitis ulcerosa-Patienten.

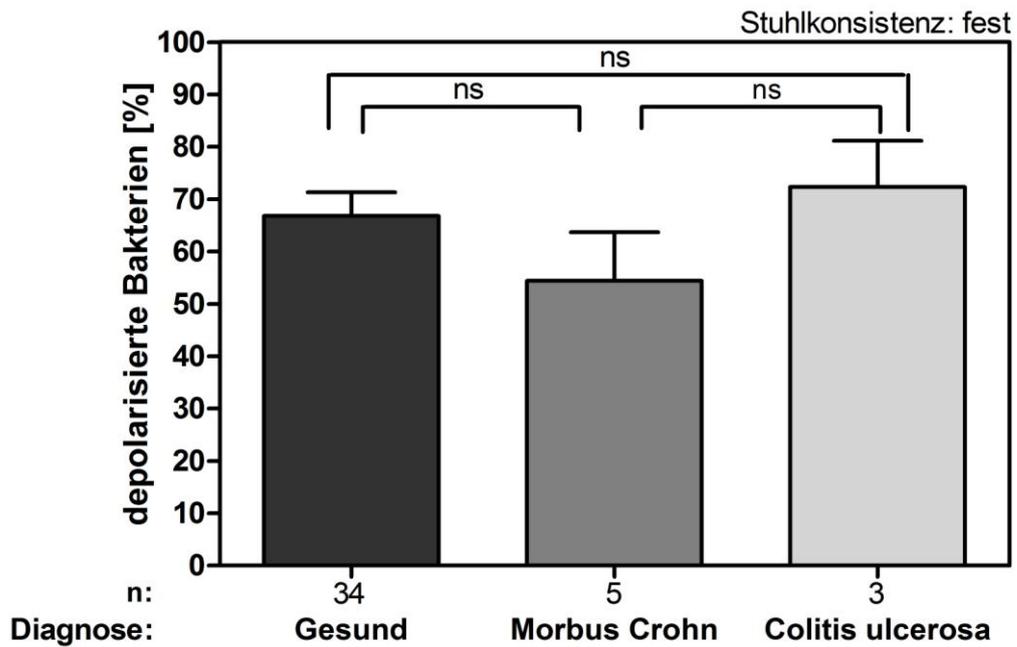


Abb. 30 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei fester Stuhlkonsistenz.

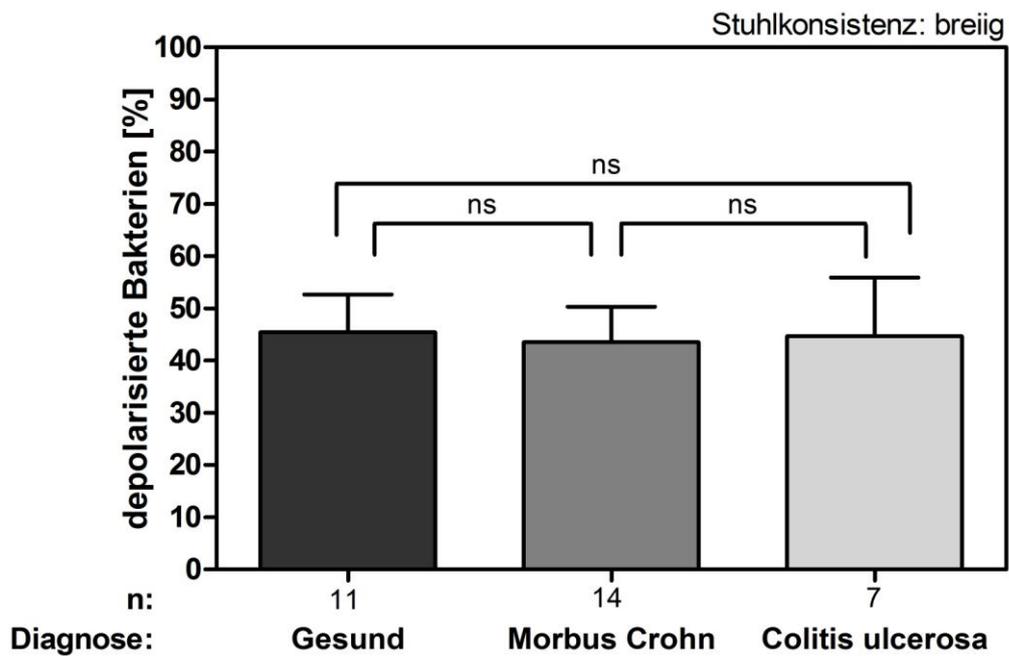


Abb. 31 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei breiiger Stuhlkonsistenz.

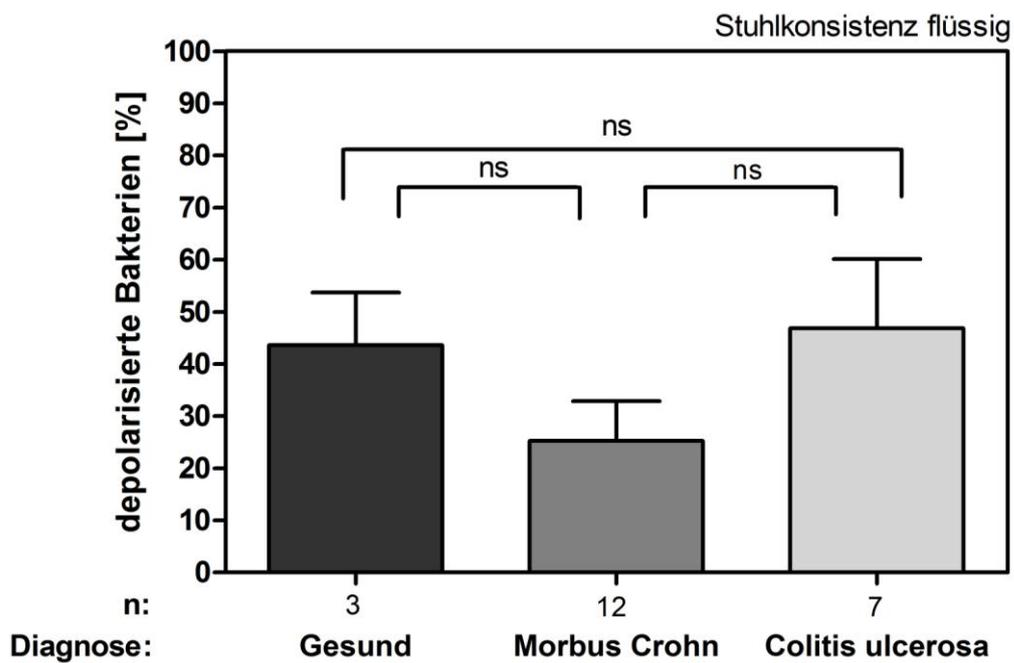


Abb. 32 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei flüssiger Stuhlkonsistenz.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität bei fester, breiiger und flüssiger Stuhlkonsistenz zwischen den gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten, den Colitis ulcerosa-Patienten festgestellt werden.

Die prozentuale Verteilung der Stuhlproben nach Konsistenz bei dem Patientenkollektiv wurde in Abb. 33 dargestellt.

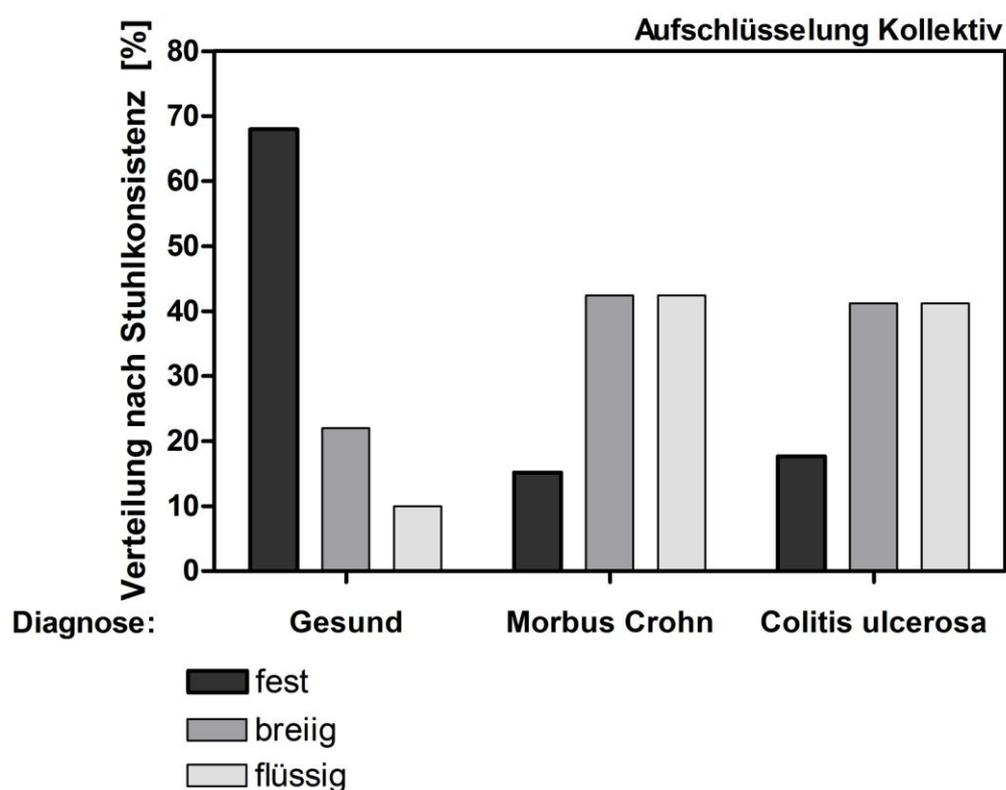


Abb. 33 Prozentuale Verteilung der Stuhlproben nach Konsistenz beim Patientenkollektiv (Kontrollpersonen, Stuhlkonsistenz fest: 68%, breiig: 22%, flüssig: 10%. Morbus Crohn-Patienten, Stuhlkonsistenz fest: 15,15%, breiig: 42,42%, flüssig: 42,42%. Colitis ulcerosa-Patienten, Stuhlkonsistenz fest: 17,64%, breiig: 41,17%, flüssig: 41,17%).

Abb. 33 zeigt eine deutliche Dominanz fester Stuhlkonsistenz bei den gesunden Personen. Im Gegensatz dazu ist bei den Morbus Crohn- und den Colitis ulcerosa-Patienten der Prozentsatz an festem Stuhl niedrig und deutlich höher der prozentuale Anteil des flüssigen Stuhls.

4.3 Trockengewichtanalyse der Stuhlproben von Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten, sowie Kontrollpersonen.

In Abbildung 34 wurde die antimikrobielle Aktivität, nach Trockengewicht umgerechnet, dargestellt. Der Effekt, der bei nicht getrockneten Stuhlproben beobachtet wurde, ist nicht mehr signifikant, der Trend aber noch zu beobachten.

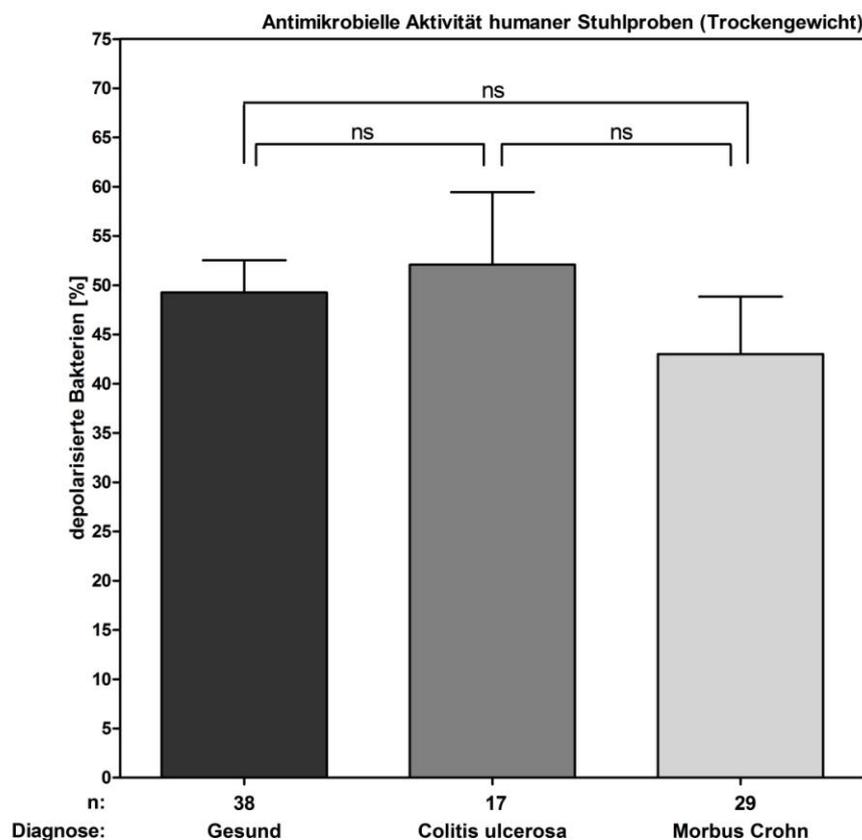


Abb. 34 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität umgerechnet auf Trockengewicht bei Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich mit Kontrollpersonen.

Die Standardabweichungen bei Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten zeigen zum Teil relativ hohe Abweichungen, bedingt dadurch, dass verschiedene Patienten extrem starke Unterschiede in der Aktivität haben. Dazu wird vermerkt, dass nur 38 Stuhlproben von 48 Kontrollpersonen und 29 Stuhlproben von 31 Morbus Crohn-Patienten ausreichende Volumina für diese Messung hatten.

4.4 Analyse von Calprotectin in Stuhlproben (ELISA)

Im Stuhl von gesunden Kontrollpersonen ist Calprotectin nur in geringen Mengen nachweisbar. Im Stuhl von Colitis ulcerosa-Patienten zeigte sich die höchste Calprotectinkonzentration (Abb. 35).

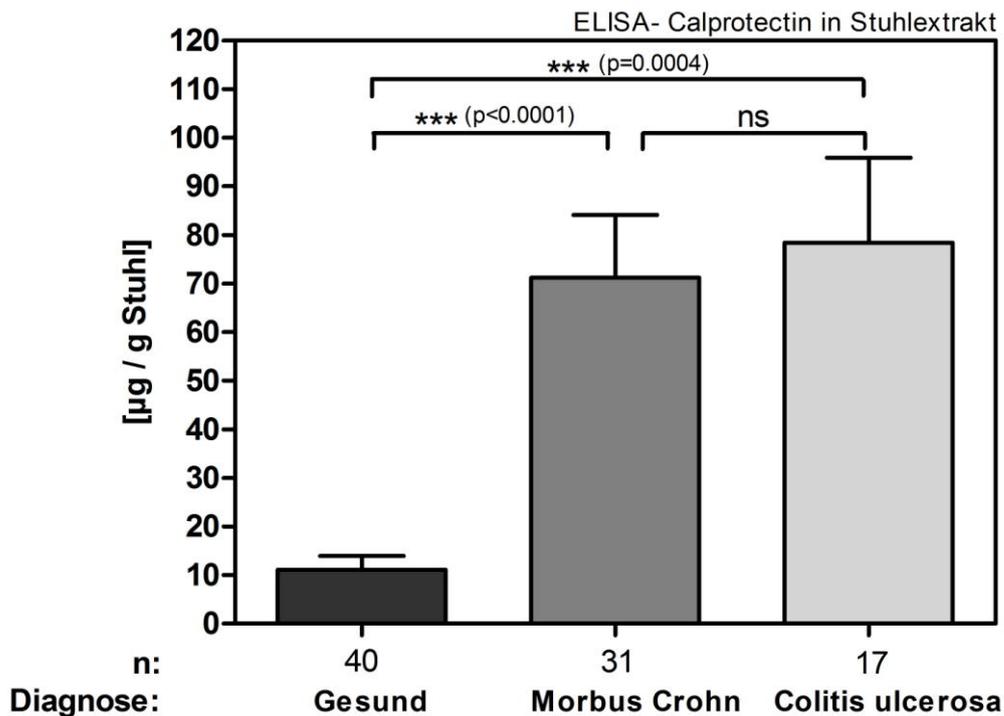


Abb. 35 Darstellung des Calprotectin in Stuhlextrakten bei MC-, CU-Patienten und Kontrollpersonen.

Bei den Colitis ulcerosa-Patienten wie bei den Morbus Crohn-Patienten zeigte sich die Calprotectin-Konzentration, als Entzündungsnachweis, hoch. Abbildung 35 zeigt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollpersonen und den Colitis ulcerosa-Patienten ($p=0,0004$) und einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollpersonen und den Morbus Crohn-Patienten ($p<0,0001$).

In Abb. 36 wurde die antimikrobielle Aktivität nach Trockengewicht-normalisierung in Abhängigkeit von der Calprotectinkonzentration dargestellt.

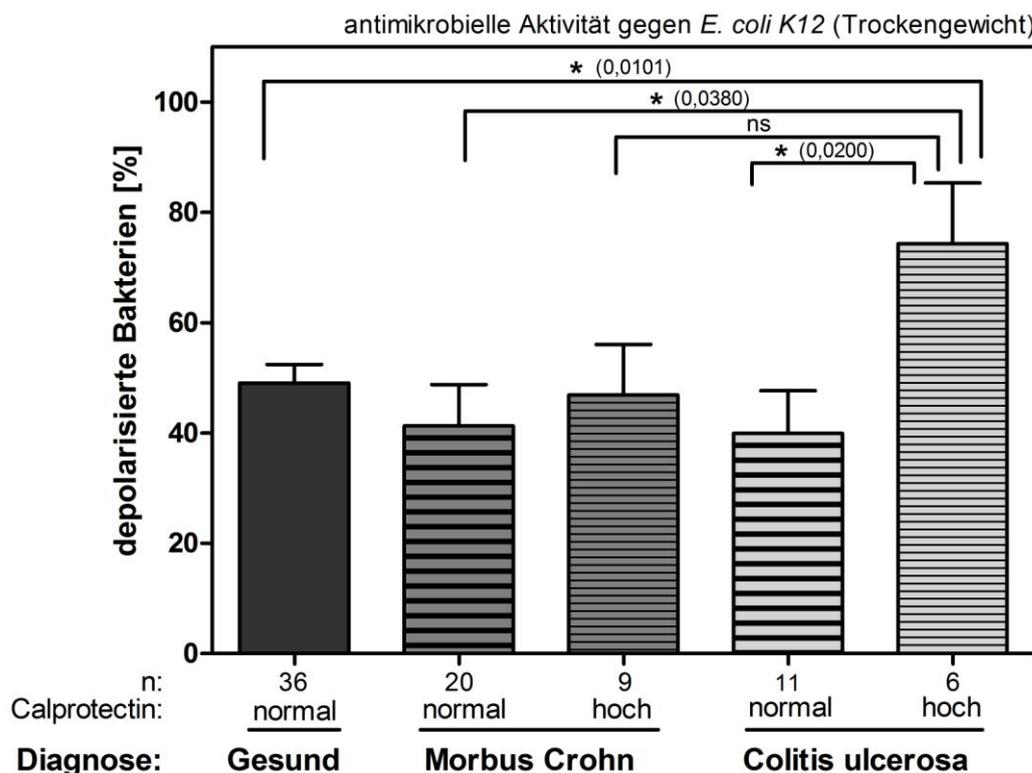


Abb. 36 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten nach Trocknung (Trockengewicht) und Verteilung nach Calprotectin-Gehalt (normal und hoch) bei Patienten mit MC und CU im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 bei den Colitis ulcerosa-Patienten mit hohem Calprotectingehalt zu den Kontrollpersonen ($p=0,0101$). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich auch zwischen den Colitis ulcerosa-Patienten mit hohem Calprotectingehalt und den Morbus Crohn-Patienten mit normalem Calprotectingehalt ($p=0,0380$). Der Vergleich der antimikrobiellen Aktivität bei den Morbus Crohn-Patienten mit hohem Calprotectingehalt und den Colitis ulcerosa-Patienten mit hohem Calprotectingehalt zeigte sich nicht signifikant. Der Vergleich der antimikrobiellen Aktivität zwischen normalem Calprotectingehalt und hohem Calprotectingehalt bei den Colitis ulcerosa-Patienten zeigte sich signifikant ($p=0,0200$).

4.5 Allgemeine statistische Ergebnisse (Daten)

4.5.1 Morbus Crohn-Patienten

Es wurden noch weitere statistische Analysen durchgeführt.

a) Verteilung nach Geschlecht

Von 33 Patienten mit Morbus Crohn fanden sich 13 weibliche und 20 männliche Patienten (Abb. 37).

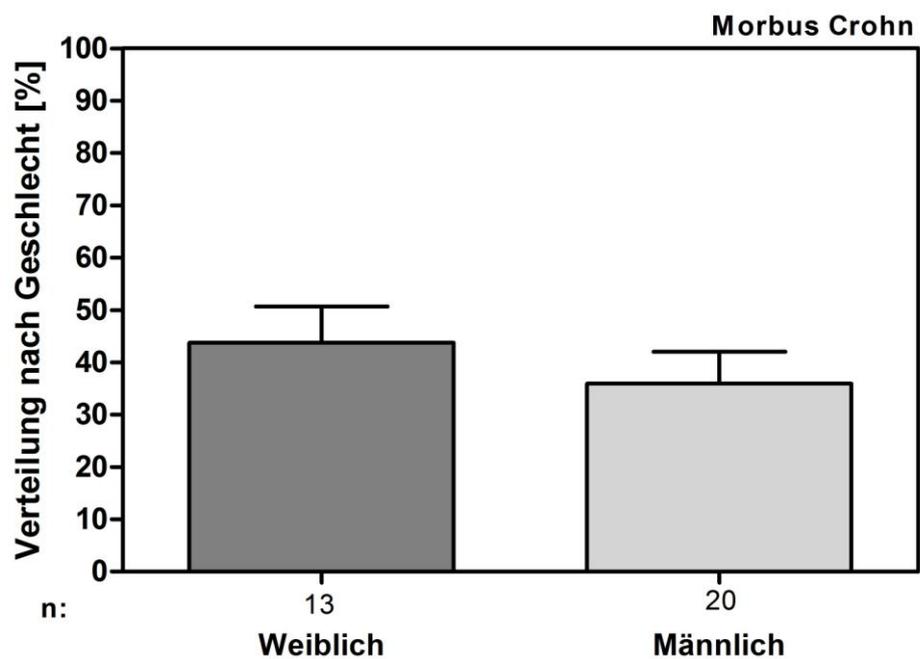


Abb. 37 Darstellung der prozentualen Verteilung nach Geschlecht (weiblich und männlich) bei MC-Patienten.

b) Verteilung nach Dauer der Erkrankung

Im untersuchten Kollektiv haben alle Morbus Crohn-Patienten eine unterschiedliche Dauer der Erkrankung. Bei 13 Patienten lag die Dauer der Erkrankung zwischen 5 und 10 Jahren, 15 Patienten waren zwischen 10 und 20 Jahre erkrankt und 5 Patienten waren über 20 Jahre erkrankt. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität zwischen diesen Gruppen festgestellt (Abb. 38).

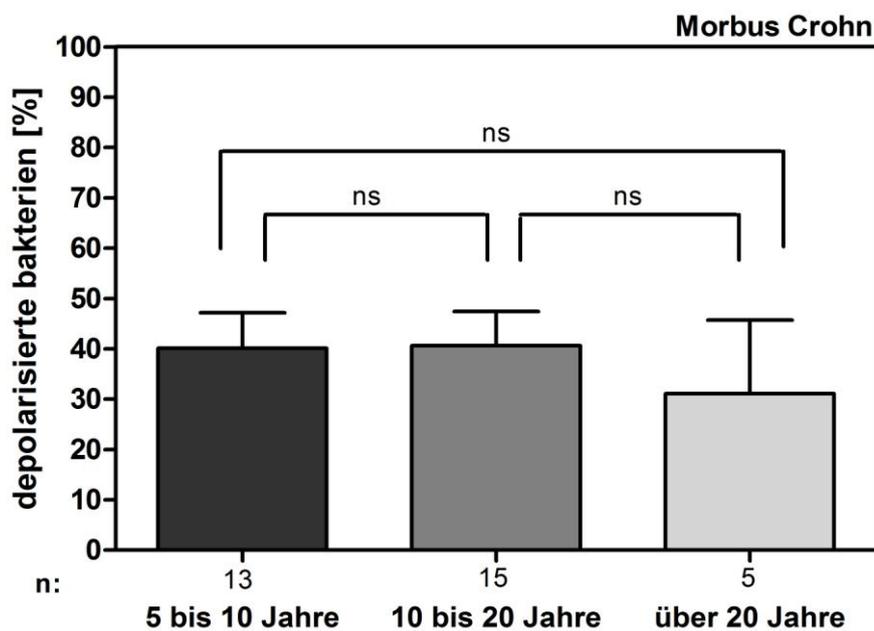


Abb. 38 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität nach Dauer der Erkrankung bei MC-Patienten.

c) Verteilung nach Krankheitsverlauf

Bei 12 Patienten wurde ein entzündlicher Krankheitsverlauf nachgewiesen, 8 Patienten haben Stenosen verschiedener Lokalisationen und 12 Patienten eine Fistelbildung. Eine Signifikanz der antimikrobiellen Aktivität zeigte sich nicht (Abb. 39).

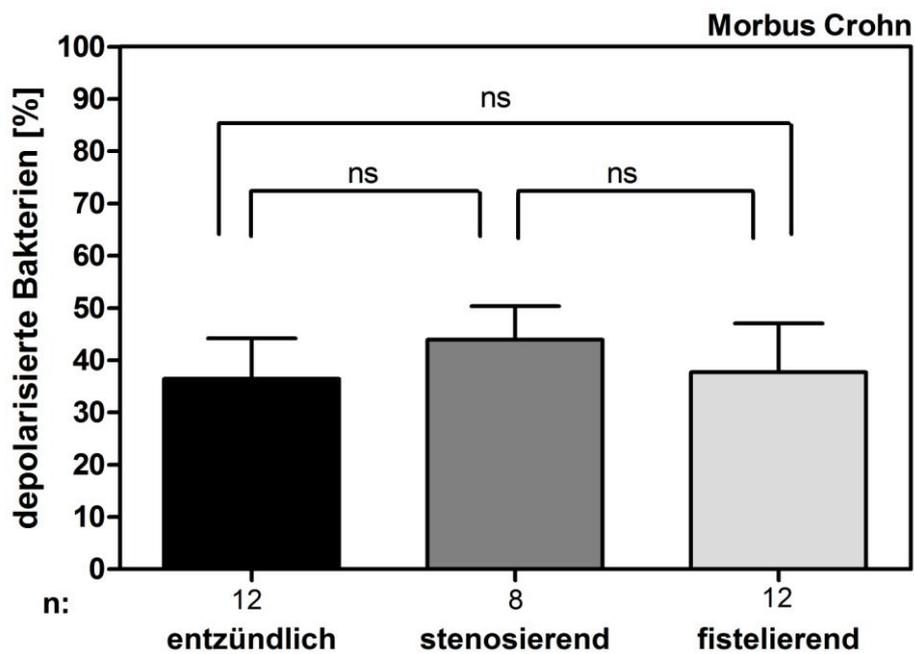


Abb. 39 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität bei Morbus Crohn-Patienten verteilt nach Krankheitsverlauf.

4.5.2 Colitis ulcerosa Patienten

a) Verteilung nach Geschlecht

Im untersuchten Colitis ulcerosa-Kollektiv (17 Personen) fanden sich 10 weibliche und 7 männliche Patienten (Abb. 40).

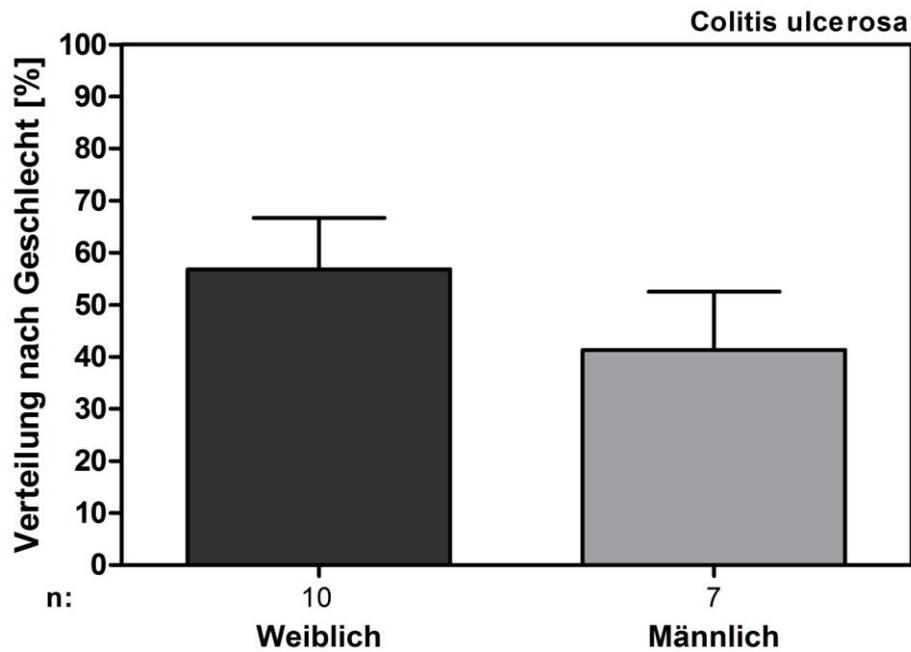


Abb. 40 Darstellung der prozentualen Verteilung nach Geschlecht (weiblich und männlich) bei CU-Patienten.

b) Verteilung nach Dauer der Erkrankung

Die Dauer der Erkrankung lag bei 8 Patienten zwischen 5 und 10 Jahren, 6 Patienten haben Colitis ulcerosa seit fast 20 Jahren und nur 3 Patienten leiden an Colitis ulcerosa schon seit längerer Zeit (über 20 Jahren). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität auch zwischen diesen Gruppen festgestellt (Abb. 41).

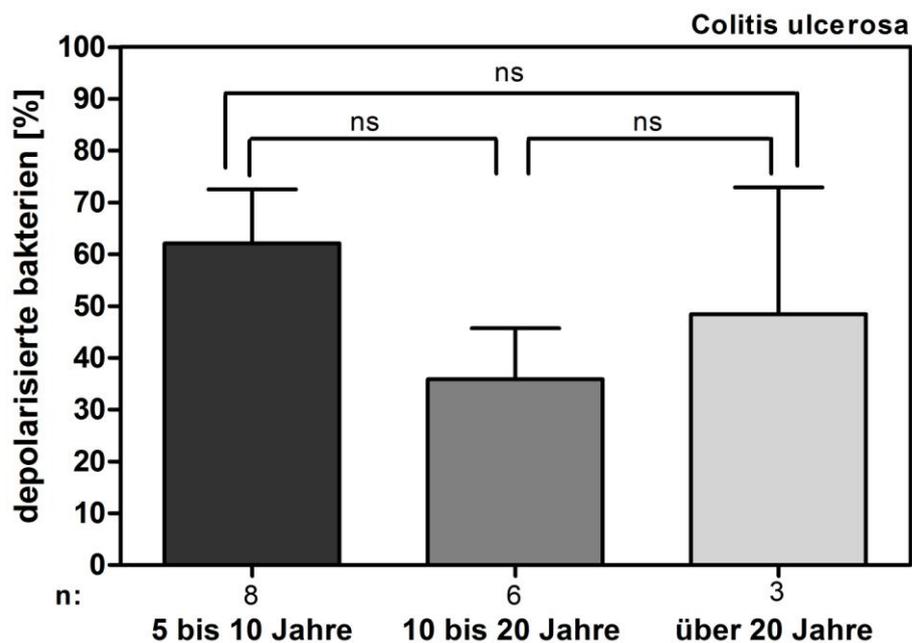


Abb. 41 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität nach Dauer der Erkrankung bei CU-Patienten.

c) Verteilung nach Lokalisation der Entzündung

Bei Betrachtung der Lokalisation der Entzündung hatten 11 Patienten Pancolitis ulcerosa (statistisch 25% der Fälle) und 6 Patienten linksseitige Colitiden (statistisch 10-20% der Fälle). Ein signifikanter Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität zwischen diesen Gruppen zeigte sich nicht (Abb. 42).

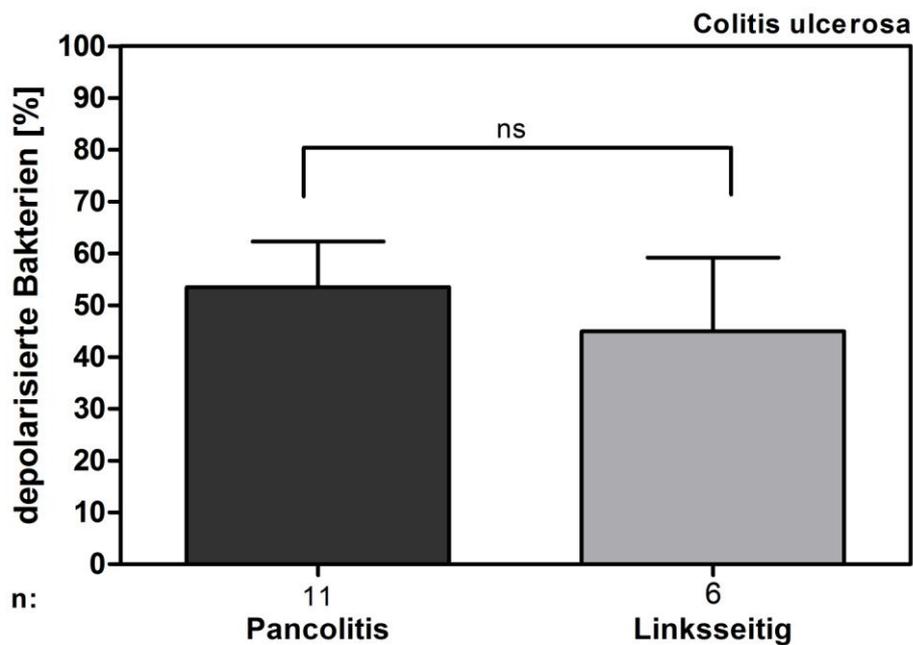


Abb. 42 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität nach Lokalisation der Entzündung bei CU-Patienten.

d) Verteilung nach Geschlecht im Vergleich zwischen gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten.

In Abbildung 43 wurde die antimikrobielle Aktivität der Stuhlproben von nach Geschlecht aufgeteilten gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten dargestellt.

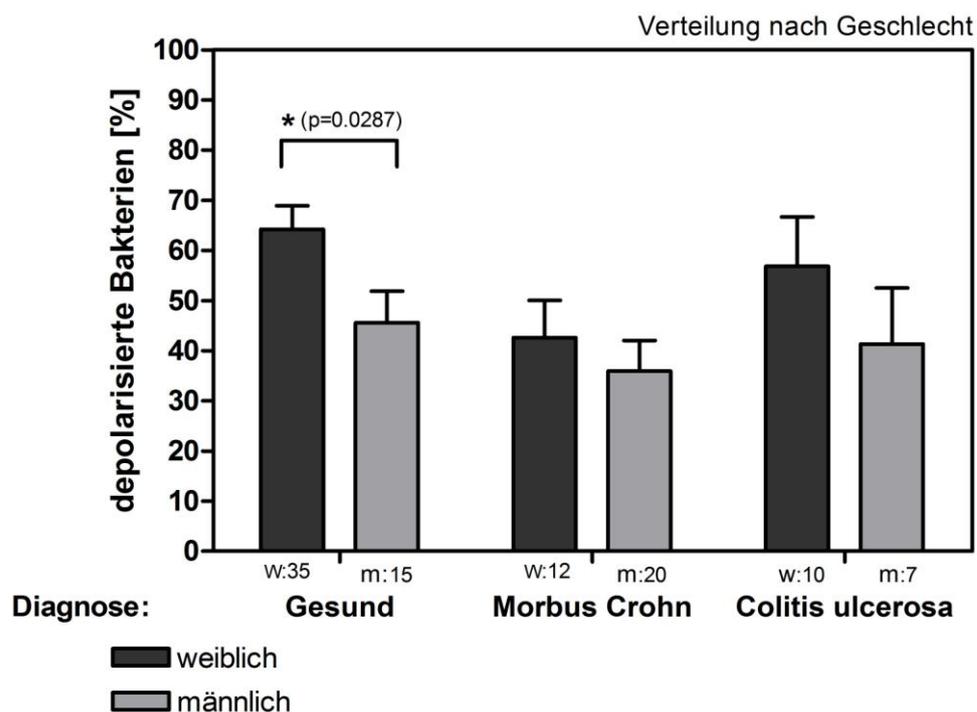


Abb. 43 Darstellung der antimikrobiellen Aktivität bei MC-, CU-Patienten und Kontrollpersonen nach Geschlecht verteilt.

Abbildung 43 zeigt, dass die antimikrobielle Aktivität bei weiblichen Patienten tendentiell höher ist als die antimikrobielle Aktivität bei männlichen Patienten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 im Vergleich zwischen den weiblichen und den männlichen gesunden Kontrollpersonen.

5 Diskussion

Über 320.000 Menschen sind in Deutschland derzeit an den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erkrankt. (Internetauftritt „Deutsche Morbus Crohn/Colitis ulcerosa Vereinigung 2009 DCCV e.V.“; Stange et al., 2003).

Die Inzidenz beider chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen liegt in Deutschland zwischen 5 und 10 pro 100000 Einwohner pro Jahr (Renz-Polster et al., 2008; Timmer et al., 1999). Beide Erkrankungen kommen weltweit vor, sind jedoch in den westlichen Industrieländern häufiger als in unterentwickelten Ländern (Renz-Polster et al., 2008).

Die Zahl der Neuerkrankungen an Morbus Crohn stieg von den 60er Jahren bis zum Beginn der 70er Jahre steil an (Beilage zu Der Internist Heft 3 März 1989). Die Inzidenz des Morbus Crohn hat sich seit 1960 in Westeuropa und den USA versechsfacht und steigt weiter an (Renz-Polster et al., 2008).

Die Lebenserwartung von Morbus Crohn-Patienten ist deutlich reduziert (Lorenz-Meyer, Brandes, 1981).

Laut Statistischem Bundesamt sind ca. 1706 Einwohner in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2004 an diesen Krankheiten verstorben (Statistisches Bundesamt, Reihe 4, 2006).

Jedoch ist die Zahl der Patienten, die mit einer chronischen Erkrankung leben können, durch den Fortschritt der Medizin heute größer als früher.

Seit der Einführung der Endoskopie durch Hirschowitz 1958 hat die endoskopische Diagnostik bei entzündlichen Darmerkrankungen einen raschen Aufstieg erfahren. Die Endoskopie des gesamten Colons mit Intubation des terminalen Ileums und Gewebeentnahme aus Dünn- und Dickdarm ist Goldstandard in der Diagnostik der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Berdel et al., 2004; Poullis et al., 2002). Allerdings sind nicht alle Darmbereiche durch die Endoskopie einsehbar. In manchen Fällen lagen die befallenen Darmabschnitte so, dass sie coloskopisch nicht mehr erreicht werden konnten. In diesen Fällen konnte auch keine Histologie gewonnen werden. In aktiven

Krankheitsphasen ist die entzündete Schleimhaut stark hyperämisch mit Kontaktblutungen nach Berührung mit dem Endoskop. Auch sind Fälle bekannt, in denen die Endoskopie wegen einer Stenose oder wegen zu starker Schmerzempfindlichkeit abgebrochen werden musste. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde, der Endoskopie überlegen, die nicht-invasive und darüber hinaus nicht so belastende Stuhl-Diagnostik durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, die antimikrobielle Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in Stuhlproben von Patienten mit Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Personen zu untersuchen. Da im Prinzip zur Darstellung der antimikrobiellen Aktivität zwei verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung stehen, nämlich der Radialdiffusionsassay und der durchflusszytometrische Assay, gibt es mehrere Studien, die den Vorteil der einen oder anderen Methode beweisen sollen. Im Folgenden sollen zunächst die angewandeten Nachweismethoden sowie die Auswertungsmethoden und daran anschließend die erzielten Ergebnisse mit Bezug auf die Literatur diskutiert werden. Diskutiert werden soll, ob eine Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität in Stuhlproben mit beiden Methoden möglich und sinnvoll ist bzw. ob eine Untersuchungsmethode zur Diagnosesicherung und Befundsicherung und später zur Ausbreitungsdiagnostik ausreicht. Wo liegen die Vorteile und Nachteile der jeweiligen Nachweismethoden?

5.1 Radialdiffusionsassay für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben

Das Hauptproblem des Radialdiffusionsassays bei der Messung des Hemmhofes einiger Proben war die Genauigkeit. Bei einzelnen Proben waren die Ränder der Killingzone etwas unscharf abgegrenzt und einige hatten einen Doppelrand. Manchmal konnten geringe Kontaminationen festgestellt werden. Nach wiederholten Versuchen konnten diese Probleme gelöst werden und im Ganzen waren die Ergebnisse unter Verwendung dieser Methode gut zu erreichen.

5.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität humaner Stuhlproben

Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit dem durchflusszytometrischen Assay. Unter Verwendung dieses Assays konnten Nuding et al. vor kurzem erstmals eine funktionell verminderte antimikrobielle Aktivität in der Colonmucosa bei Patienten mit Morbus Crohn des Colons im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachweisen (Nuding et al., 2005; Nuding et al., 2007). Eine verminderte antimikrobielle Aktivität konnte auch in Dünndarmgewebe bei Patienten mit Morbus Crohn des Ileum nachgewiesen werden (Wehkamp et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung dieses Assays eine hochsignifikante Verminderung ($p= 0,0007$) der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 in den Stuhlproben bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen.

Die Sensitivität des antimikrobiellen Assays mittels FACS ist hoch. Trotzdem gibt es bei voll ausgeprägter Vergrößerung des Durchmessers der Killingzone bei 4 Patienten mit bestätigter und vermuteter Antibiotikabehandlung im Radialdiffusionsassay keine auffällige Erhöhung der getöteten Bakterien bei den Ergebnissen der Durchflusszytometrie.

Im Gegensatz zum RDA, wo die Differenz, unabhängig von der Stuhlkonsistenz, signifikant war, ergab die durchflusszytometrische Analyse der antimikrobiellen Aktivität in den Stuhlproben bei MC-Patienten, CU-Patienten und den Kontrollpatienten eine nicht signifikante Differenz. Wie bei der Darstellung der antimikrobiellen Aktivität mittels RDA zeigte sich auch bei der FACS-Messung, dass der Trend in der antimikrobiellen Aktivität zwischen MC- und CU-Patienten eindeutig nachweisbar ist, ebenso wie zwischen gesunden Kontrollpersonen und MC-Patienten.

Diese Ergebnisse bestätigen zum großen Teil frühere Beobachtungen, dass die Durchflusszytometrie eine empfindliche Methode ist, um die antimikrobielle Aktivität nachzuweisen.

5.3 ELISA zur Bestimmung von Calprotectin in Stuhlproben.

Die Unterscheidung zwischen Patienten mit funktionellen Darmstörungen (Reizdarmsyndrom) und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen fällt häufig schwer. Es kann zu vielen, nicht notwendigen Coloskopien führen. Neuerdings steht für eine erste Abklärung die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl zur Verfügung (Poullis et al., 2002). Calprotectin ist ein antimikrobiell wirkendes, Zink- und Calciumbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 36,5 kDa (Dale et al., 1985; Brandtzaeg et al., 1995). Durch den Nachweis von erhöhten Calprotectin-Werten im Stuhl können diese beiden Patientengruppen deutlich voneinander unterschieden werden und die Entzündungen der Darmschleimhaut bestätigt werden (Poullis et al., 2002; Tibble et al. 2000).

Zu den Verfechtern der Calprotectin-Bestimmung zählen Dale, Brandtzaeg, Poullis, Tibble u.a.. Calprotectin wird als sensitiver Marker für entzündliche Prozesse des Darmtraktes verwendet. Ein weiterer Vorteil der Calprotectin-Bestimmung ist seine Stabilität. Laut Literatur ist Calprotectin im Stuhl bis zu 6 Tage stabil bleibt und auch in ungekühltem Zustand nachweisbar (Poullis et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde mittels des Calprotectin-Tests eine hochsignifikante Differenz ($p < 0,0001$) zwischen gesunden Personen und MC-Patienten und ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,0004$) zwischen Kontrollpersonen und CU-Patienten nachgewiesen. Im Vergleich mit Morbus Crohn-Patienten zeigen Colitis ulcerosa-Patienten die höchste Calprotectinkonzentration im Stuhl, sowie eine starke Ausprägung der Entzündung.

5.4 Trockengewichtbestimmung der humanen Stuhlproben

Alle Patienten hatten eine unterschiedliche Stuhlkonsistenz, die in drei Gruppen eingeordnet wurden: fest, breiig oder flüssig.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Verdünnungsfaktor als Ursache für unterschiedliche antimikrobielle Aktivität zu untersuchen.

Um einen Verdünnungsfaktor auszuschließen, wurden alle Stuhlproben in der SpeedVac getrocknet. Bei anschließender Normalisierung der antimikrobiellen Aktivität kam es bei der Durchflusszytometrie zum Signifikanzverlust. Zwischen den Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen waren die Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität in den Stuhlproben statistisch nicht signifikant. Die Ursache für den Verlust ist der Ausschluss der unterschiedlichen Wasseranteile in den Stuhlproben verschiedener Konsistenzen. Kritisch muss dazu gesagt werden, dass nicht alle Stuhlproben ausreichende Volumina für diese Messung hatten. Die vertikalen Linien zeigen zum Teil relativ hohe Abweichungen, bedingt dadurch, dass verschiedene Patienten extrem starke Unterschiede in der Aktivität haben, so dass eine hohe Signifikanz nicht besteht, der Trend jedoch deutlich erkennbar ist.

Die ELISA Messung der Calprotectinkonzentration im Stuhl zeigte eine signifikante Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität zwischen Kontrollpersonen und CU-Patienten mit hoher Calprotectinkonzentration ($p = 0,0101$), zwischen MC-Patienten mit normaler Calprotectinkonzentration und CU-Patienten mit einer hohen Calprotectinkonzentration ($p = 0,0380$) sowie zwischen CU-Patienten mit einer normalen und einer hohen Calprotectinkonzentration

($p=0,0200$). Es konnte keine signifikante Differenz zwischen MC-Patienten mit einer hohen Calprotectinkonzentration und CU-Patienten mit einer hohen Calprotectinkonzentration festgestellt werden.

5.5 Vergleich Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten und Kontrollpersonen

Insgesamt wurden bei dieser Arbeit 1064 Stuhluntersuchungen bei 100 Patienten durchgeführt, 50 von diesen waren Kontrollpersonen. Bei allen anderen Patienten war ein Morbus Crohn oder eine Colitis ulcerosa aus früheren Jahren bekannt.

Aus den vorhandenen Patientendaten kann jedoch gefolgert werden, dass alle Patienten eine unterschiedliche Dauer der Erkrankung, ein unterschiedliches klinisches Bild und ein unterschiedliches Alter hatten.

5.6 Schlussfolgerung

Ergänzend zu den bisherigen Veröffentlichungen sollte nun versucht werden, einen Nachweis der antimikrobiellen Aktivität in den Stuhlproben sowie eine statistisch gesicherte Verminderung der antimikrobiellen Aktivität in den Stuhlproben bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen zu ermitteln.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stuhlprobenextrakte antimikrobielle Aktivität besitzen. Es ist noch unklar, ob es vom Darm produzierte Stoffe sind, oder ob sie von Bakterien oder auch eventuell aus der Nahrung kommen. Da alle Proben eine Aktivität zeigen, muss es sich um einen generellen Faktor handeln.

Die Vermutung, dass antimikrobielle Aktivität in Stuhlproben nachweisbar ist, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit.

Neu ist, dass die antimikrobielle Aktivität im Stuhl detektiert werden kann.

Auch zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

Dass die antimikrobielle Aktivität bei Morbus Crohn-Patienten vermindert ist, passt zu der Hypothese, dass Morbus Crohn-Patienten einen Defekt in der antimikrobiellen Aktivität der Darmbarriere besitzen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide in der vorliegenden Arbeit gezeigten Methoden, ergänzend zueinander, eine gute Möglichkeit darstellen, antimikrobielle Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli K12* in den verwendeten Stuhlproben bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachzuweisen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei getrennte, unterschiedliche Assay-Methoden (Radialdiffusionsassay und durchflusszytometrischer Assay (FACS-Assay)) zum Nachweis der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli K12* in Stuhlproben von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen verwendet.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Ergebnisse des Radialdiffusionsassays dargestellt. Hier zeigte sich die signifikant niedrigere antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli K12* in Stuhlproben von Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Eine noch deutlicher signifikante Verminderung der antimikrobiellen Aktivität der Stuhlproben zeigte sich zwischen Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten.

Im zweiten Teil wurde zur Sicherung der Ergebnisse ein durchflusszytometrischer Assay durchgeführt und beide Ergebnisse miteinander verglichen. Auch unter Verwendung dieses Assays wurde eine hochsignifikante Verminderung der antimikrobiellen Gesamtaktivität in den Stuhlproben bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen.

Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Assays eine gute Korrelation und Ergänzung bei der Darstellung antimikrobieller Aktivität gegen *E. coli* in Stuhlproben bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigen.

Des Weiteren wurde durch fäkales Calprotectin die Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen. Die Untersuchung zeigte eine hohe Calprotectinkonzentration in den Stuhlproben von Morbus Crohn-Patienten. Die höchste Calprotectinkonzentration wurde in den Stuhlproben von Colitis ulcerosa-Patienten gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen gesunden Kontrollpersonen und Colitis ulcerosa-Patienten sowie zwischen gesunden Kontrollpersonen und Morbus Crohn-Patienten.

In Bezug auf das Trockengewicht wurde eine signifikante Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 bei Colitis ulcerosa-Patienten mit hohem Calprotectininhalt gegen Kontrollpersonen sowie gegen Morbus Crohn-Patienten mit normalem Calprotectininhalt festgestellt. Bei Colitis ulcerosa-Patienten ohne Entzündung (normaler Calprotectininhalt) zeigte sich eine Signifikanz zu den Colitis ulcerosa-Patienten mit Entzündung (hoher Calprotectininhalt).

Auf diese Weise kann bestätigt werden:

- 1) Die antimikrobielle Aktivität gegen den Bakterienstamm *E. coli* K12 lässt sich auch in den Stuhlproben nachweisen.
- 2) Für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität stehen Radialdiffusionsassay und durchflusszytometrischer Assay zur Verfügung.
- 3) Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung und Ergänzung von RDA und FACS-Assay bei der Darstellung antimikrobieller Aktivität gegen *E. coli* K12 in Stuhlproben bei Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollpersonen.
- 4) Die Stuhlprobenextrakte von Morbus Crohn-Patienten weisen eine deutlich signifikante Verminderung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 nach. Obwohl, nach Trockengewicht berechnet, diese Signifikanz verloren geht, der

Trend in der antimikrobiellen Aktivität zwischen Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten eindeutig nachweisbar ist, ebenso wie zwischen gesunden Kontrollpersonen und Morbus Crohn-Patienten.

5) Bei der Entzündung geht die Calprotectin-Konzentration in den Stuhlproben von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten hoch.

6) Bei ausgeschlossenenem Verdünnungsfaktor kann eine signifikante Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* K12 bei CU-Patienten mit hohem Calprotectininhalt gegen Kontrollpersonen sowie gegen MC-Patienten mit normalem Calprotectininhalt festgestellt werden.

7 Literaturverzeichnis

Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., et al., 2000, The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96: 3086-3093

Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., Wilson J.M., 1998, Human β -defensin-2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102: 874-880

Beilage zu Der Internist Chronische entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn-Colitis ulcerosa). 1989, Heft 3, 1-16

Bensch K.W., Raida, M., Mägert, H.-J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W.G., 1995, hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368: 331-335

Berdel, W.E., Böhm, M., Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K., Schmiegel, W., 2004, *Innere Medizin*. Urban & Fischer München Jena, 5. Auflage, 1214-1223

Bernstein, C.N., Rawsthorne, P., Cheang, M., et al., 2006, A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol* 101(5): 993-1002

Bevins, C.L., 2003, Antimicrobial peptides as effector molecules of the mammalian host defense. Herwald H (et): *Host Response Mechanisms in Infectious Diseases*. Contributions to Microbiology, Basel, Karger 10: 106-148

Bevins, C.L., 2004, The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 20, 572-580

Bevins, C.L., Martin-Porter, E., Ganz, T., 1999, Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 45(6): 911-915

Bingle, L., Tetley, T.D., Bingle, C., 2001, Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(1): 84-91

Birrenbach, T., Böcker, U., 2004, Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology and therapeutic implications. *Inflammatory bowel diseases*, 10(6): 848-859

Boman, H.G., 1995, Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 61-92

Boman, H.G., Steiner, H., 1981, Humoral immunity in *Cecropia pupae*. *Curr Top Microbiol Immunol* 94-95: p.75-91

Brandtzaeg, P., Gabrielsen, T.O., Dale, I., Müller, F., Steinbakk, M., Fagerhol, M.K., 1995, The leucocyte protein L1 (calprotectin): a putative nonspecific defense factor at epithelial surfaces. *Adv Exp Med Biol* 371A: 201-206

Braun, J., Dormann, A., et al., 2002, *Klinikleitfaden Innere Medizin*. Urban & Fischer Lübeck, München, Stuttgart, Jena, Ulm, 7. Auflage, 308-311

Bucher, O., Wartenberg, H., 1997, *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Verlag Hans Huber, 12. Auflage, 206-308

Canny, G.O., Cario, E., Lennatrsson, A., Gullberg, U., Brennan, C., Levy, O., Colgan, S.P., 2006, Functional and biochemical characterization of epithelial bactericidal/permeability- increasing protein (BPI). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, 557-567

Coulter, W.H., 1956, High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Nat Electron Conf Chicago*, 1034-1042

Dale, I., Brandtzaeg, P., Fagerhol, M.K., Scott, H., 1985, Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. *Am J Clin Pathol* 84: 24-34

Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A., 1994, Preface to the Second Edition. In: *Methods in Cell Biology Flow Cytometry 2nd Edition*, Academic Pres, San Diego, 630-633

De Smet, K., Contreras, R., 2005, Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27(18):1337-1347

Elsbach, P., and Weiss, J., 1993, The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunology* 187, 417-429

Endres, S., 2007, *Facharztprüfung Innere Medizin in Fällen, Fragen und Antworten*. Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage, 226-233

Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W., and Lehrer, R.I., 2005, Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 269-275

Fagerhol, M.K. et al., 2000, Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *The Lancet* 356, 1783-1784

Fellermann, K., Wehkamp, J., Herrlinger, K.R. et al., 2003, Crohn`s disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(6): 627-634

Fellermann, K. and Stange, E.F., 2001, Defensins-innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13: 771-776

Ferlinz, R. et al., 1999, *Internistische Differentialdiagnostik*. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 295-299

Gallo, R. L.; Nizet, V., 2003, Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 402-409.

Ganz, T., 2003, Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews Immunology*, 3(9): 710-720

Ganz, T., Lehrer, R.I., 1995, Defensins. *Pharmac Ther*, 66: 191-205

Ganz, T., Weiss, J., 1997, Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol*, 34: 343-354

Gazzano-Santoro, H., Parent, J.B., Grinna, L., Horwitz, A., Parsons, T., Theofan, G., Elsbach, P., Weiss, J., Conlon, P.J., 1992, High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 60(11): 4754-4761

Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H. et al., 1994, Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 343(8900): 766-767

Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E., 2006, Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359

Grimm, M.C., Pavli, P., 2004, NOD2 mutations and Crohn`s disease: are Paneth cells and their antimicrobial peptides the link? *Gut* 53(11): 1558-1560

Hahn, H., Falke, D., Kaufmann S.H.E., Ullmann, U., 1999, Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Heidelberg: Springer Medizin, 3. Auflage, 250-262

Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C. et al., 2003, Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 124(7): 1767-1773

Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U. et al., 2006, Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12(23): 3668-3672

Harder, J., Bartels, J., Christophers E., Schröder J.-M., 1997, A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636):861

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L.M. et al., 2000, Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 beta, but not IL-6, induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22(6): 714-721

Harder, J., Bartels, J., Christophers E., Schröder J.-M., 2001, Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-5713

Hase K., Eckmann L., Leopard J.D., Varki N., Kagnoff M.F., 2002, Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun* 70(2): 953-963

Hase K., Murakami M., Limura M., Cole S.P., Horibe Y., Ohtake T., Obonyo M., Gallo R.L., Eckmann L., Kagnoff M.F., 2003, Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 125 (6): 1613-1625

Herold, G. et al., 2003, *Innere Medizin. Köln*, 401-408

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O`Morain C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A, Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001, Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn`s disease. *Nature* 411: 599-603

Joly, S., Maze, C., McCray, P.B, Jr., and Guthmiller, J.M., 2004, Human β -Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganismus. *J of Clin Microbiol* p. 1024-1029

Jones, D.E., Bevins, C.L., 1993, Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of, the human bowel. *FEBS Lett* 315:187-192

Jones, D.E., Bevins, C.L., 1992, Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267: 23216-23225

Kapel, N., Roman, C., Caldari, D. et al., 2005, Fecal Tumor Necrosis Factor- α and Calprotectin as Differential Diagnostic Markers for Severe Diarrhea of Small Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41: 396-400

Karban, A., Eliakim, R., 2007, Effect of smoking on inflammatory bowel disease: Is it disease or organ specific? *World J Gastroenterol* 13(15): 2150-2152

Kaufmann, W., et al., 1977, *Internistische Differentialdiagnostik*. Schattauer Stuttgart New York, 4. Auflage, 706-708

Kim S.T., Cha H.E., Kim D.Y., Han G.C., Chung Y.-S., Lee Y.J., Hwang Y.J., Lee H.-M., 2003, Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease, *Acta otolaryngol.* 123 (1): 81-85

Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischner, B., Marre, R, Pfister, H., Pulverer, G., 2001, *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage 4-36, 238-246, 303-317

Kübler, I., Stange, E.F., Fellermann, K. et al., 2006, Defensine: Körper eigene Antibiotika als zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 131(36): 1960-1964

Lehnert, H., Werdan, K., 2006, *Innere Medizin- essentials*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 4 Auflage, 193-204

Lehrer, R.I., Bevins, C.L., 2004, Defensins and other antimicrobial peptides. In *Mucosal Immunol*, 95-110 (Eds Mestecky J et al.) New York: Academic Press

Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., Ganz, T., 1993, Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. Annual Review of Immunology, 11: 105-128

Liévin-Le Moal, V., Servin, A.L., 2006, The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganismus: mucins, antimicrobial peptides, microbiota. Clin Microbiol Rev 19, 315-337

Lorenz-Meyer, H., Brandes, W., 1981, Klinik des Morbus Crohn. Internist 22, 420-429

Meucci, G., Vecchi, M, Torgano, G. et al., 1992, Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. Gastroenterology, 103(2): 514-519

Miller, B., Ehms, H., 1981, Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Internist 22, 379-384

Mothes, H., Kaufmann, R., Settmacher, U., 2008, α -defensin increases invasiveness of colorectal carcinoma in-vitro. In Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum 2008 für experimentelle und klinische Forschung, Forumband 37, Herausgeber: Arbogast, R., Schackert, H.K., Bauer, H. Springer Medizin Verlag, 67-85

Müller, C.A., Autenrieth, I.B., Peschel, A., 2005, Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. Cell Mol Life Sci 62 (12): 1297-1307

Müller, M und Mitarbeiter, 2002/03, Chirurgie für Studium und Praxis. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 6. Auflage, 206-212

Nguyen, T.X., Cole, A.M., Lehrer, R.I., 2003, Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* 24(11): 1647-1654

Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., et al., 2005, A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 335-345

Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., and Stange, E.F., 2007, Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn`s disease of the colon. *Gut* 56: 1240-1247

Nyström M, Bergenfeldt, M., Ohlsson, K., 1997, The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from the gastrointestinal tract in man. *Scand. J Clin Lab Invest*, 57 (2): 119-125

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., Cho, J.H., 2001, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn`s disease. *Nature* 411: 603-606

O`Neil, D.A., Cole, S.P., Martin-Porter, E., Housley, M.P., Liu, L., Ganz, T., Kagnoff, M.F., 2000, Regulation of human β -Defensins by gastric epithel cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun* 68(1), 5412-5415

O`Neil, D.A., Martin Porter, E., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., Kagnoff, M.F., 1999, Expression and Regulation of the human β -Defensin hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163, 6718-6724

Opal, S.M., Palardy, J.E., Marra, M.N., Fisher, C.J., Jr., McKelligon, B.M., and Scott, R.W., 1994, Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection. *Lancet* 344, 429-431

Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T.I. et al., 2000, Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 35(10): 1075-1081

Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E. et al., 1991, Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *The New England J of Medicine*, 324(2): 84-88

Peschel, A. and Sahl H.-G., 2006, The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature*, 529-536

Poullis, A., Foster, R., Northfield, T.C., Mendall, M.A., 2002, Faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16: 675-681

Pschyrembel, W. et al., 2002, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage, 335-336, 1006, 1434

Renz-Polster, H., Krautzig, S., 2008, *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 4. Auflage, 626-636

Rochen, J.W., Yokochi, C., 1993, *Anatomie des Menschen, Photographischer Atlas der systematischen und topographischen Anatomie*, 3. Auflage, 272-302

Rochen, J.W., Lütjen-Drecoll, E., 2006, *Funktionelle Anatomie des Menschen*. 11. Auflage, 94-142

Schaller-Bals S., Schulze A., Bals R., 2002, Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 165: 992-995

Schalkwijk, J., Wiedow, O., Hirose, S., 1999, The trappin- gene family: proteins defined by an N- terminal transglutaminase substrat domain and a C-terminal four- disulfid chore. *Biochem J* 340, 569-577

Schmid, M., Kübler, I., Stange, E.F. et al., 2006, Defensinbarrieredefekte bei Morbus Crohn. *DBI Der Bayerische Internist*, 26(3): 120-126

Schröder, J.M., 1999, Antimikrobielle Peptide-Antibiotika der Zukunft? *Med Monatsschr Pharm*, 22: 270-276

Scott, M.G., Hancock, R.E., 2000, Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*, 20(5): 407-431

Selsted, M.E., Harwig, S.S.L., Ganz, T., Schilling, J.W., Lehrer, R.I., 1985, Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*, 76: 1436-1439

Seth, N., Glick, M.D. et al., 1985, Crohn`s disease of the small Intestine: Diffuse Mucosal Granularity. 313-317

Shapiro, H.M., 2003, *Practical Flow Cytometry*. 4 nd Edition, Wiley-Liss: Neu York, 73-79

Siegenthaler, W., 2005, *Differenzialdiagnose Innere Krankheiten- vom Symptom zur Diagnose*. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 19. Auflage, 823-826

Simpson, A.J., Maxwell, A.I., Govan, J.R.W., Haslett, C., Sallenave, J.M., 1999, Elafin (elastase-specific inhibitor) has antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. FEBS Lett 425, 309-313

Sorensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S. et al., 2001, Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. 97 : 3951-3959

Stange, E.F. Prof. Dr. et al., 2004, Colitis ulcerosa- Morbus Crohn. Uni-Med Verlag AG Bremen-London-Boston, 2. Auflage, 10-153

Stange, E.F., Schreiber, S., Fölsch, U.R. et al., Diagnostik und Therapie des M. Crohn. Z Gastroenterol, 41: 19-20

Statistisches Bundesamt; Gesundheitswesen: Todesursachen in Deutschland. Fachreihe 12/Reihe 4, Wiesbaden, 2006

Tibble, J.A., Sigthorsson, G., Foster, R. et al., 1999, High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. Gut 45: 362-366

Tibble, J.A., Sigthorsson, G., Bridger, S. et al., 2000 a, Surrogate markers of intestinal inflammation are predicative of relapse in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 119: 15-22

Tibble, J.A., Teahon K, Thjodleifsson, B. et al., 2000 b, A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn`s disease. Gut 47: 506-513

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R. and Gordon, J.I., 2007, The human microbiome project. Nature 449, 804-810

Vogelmeier C., Hubbard R. C., Fells G. A., Schnebli H. P., Thompson R. C., Fritz H., Crystal R. G., 1991, Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest* 87, 482-488

Wehkamp, J., 2006, Defekte Defensinbarriere bei Morbus Crohn. *Klinikerzt*, 35(10): 348-353

Wehkamp, J., Bals, R., Kreft, B., Schröder, J.-M., Stange, E.F., 2007, Klinische Relevanz der endogenen antimikrobiellen Peptide in Innerer Medizin und Dermatologie. *Dtsch Ärztebl*, 104(5): A257-262

Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Bevins, C.L., and Stange, E.F., 2005, Mechanisms of Disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2, 406-415

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., and Bevins, C.L., 2005 a, Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 102, 18129-18134

Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I., Oldenberg, H., 1978, Purification and characterisation of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphnuclear leukocytes. *J Biol Chem* 253, 2664-2672

Weiss, J., 2003, Bactericidal/permeability-increasing protein (LBP): structure, function and regulation in host defense against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 31, 785-789

Zani, M.L., Nobar, S.M., Lacour, S.A., Lemoine, S., Boudier, C., Bieth, J.G., Moreau, T., 2004, Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem*, 271(12): 2370-2378

Zasloff, M., 2002, Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870): 389-395

Zimmermann, G.R. Legault P., Selsted M.E, Pardi A., 1995, Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* 34 (41): 13663-13671

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	antimikrobielle(s) Peptide
BPI	„Bactericidal/permeability- increasing protein“
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFU	Colony Forming Unit (Koloniebildende Einheit)
CU	Colitis ulcerosa
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser mit Millipore gereinigt
DiBAC ₄ (3)	bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure) Trimethinoxonol
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	„et alii“ (und Mitarbeiter)
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorting
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
griech.	Griechisch
h	„hour“ (Stunde)
hBD	„human beta Defensin“
hBD1	„humanes β -Defensin 1“
hBD2	„humanes β -Defensin 2“
hCAP-18	„human cationic antimicrobial peptide“ Molekulargewicht 18 kD
HNP	„human neutrophil peptide“
lat.	lateinisch
kDa	Kilo Dalton (Molekulare Masse)
M	Mol, Molar

m.	männlich
MC	Morbus Crohn
MDT	Magen-Darm-Trakt
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
n	„number“ (Anzahl)
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
p	„probability“ Signifikanzniveau
pH	Wasserstoffexponent
PP	Phosphatpuffer
rel.	relativ
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute, 1/min)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SKALP	Skin-derived antileukoprotease
Tab.	Tabelle
tgl.	täglich
TMB	Tetramethylbenzidin
TSB	“Tryptic Soy Broth”
ua.	und andere
usw.	und so weiter
ü. N.	über Nacht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V.a.	Verdacht auf
WAP	“weigh acid protein”
w.	weiblich
ca.	„circa“ (zirka)

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Der Verdauungstrakt	2
Abb. 2	Schichtenbau des Dünndarms	4
Abb. 3	<i>E. coli</i> in der Gramfärbung	7
Abb. 4	Humanes α -Defensin	10
Abb. 5	Humanes β -Defensin	11
Abb. 6	Lokalisationen von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn	18
Abb. 7	Histologie von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn im Vergleich	19
Abb. 8	Modell zur Ätiopathogenese des Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	22
Abb. 9	Ergebnis der Radialdiffusionsassays	49
Abb. 10	Ergebnis der Radialdiffusionsassays bei mutmaßlicher Antibiotikatherapie	51
Abb. 11	Antimikrobielle Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	52
Abb. 12	Kontrolle: 0,01% Essigsäure und Lysozym 1 μ g	54
Abb. 13	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Stuhlkonsistenz bei den Kontrollpersonen	55
Abb. 14	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiig/flüssigen Stuhlkonsistenz bei den Kontrollpersonen	56
Abb. 15	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Stuhlkonsistenz bei Morbus Crohn-Patienten	57

Abb. 16	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 in Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Stuhlkonsistenz bei Colitis ulcerosa-Patienten	58
Abb. 17	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei fester Stuhlkonsistenz	59
Abb. 18	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei breiiger Stuhlkonsistenz	60
Abb. 19	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen den Bakterienstamm <i>E. coli</i> K12 von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei flüssiger Stuhlkonsistenz	61
Abb. 20	Ergebnis der FACS-Assays, Bakterienkontrolle	63
Abb. 21	Ergebnis der FACS-Assays, Negativkontrolle 0,01% Essigsäure	63
Abb. 22	Ergebnis der FACS-Assays, Positivkontrolle hBD3	64
Abb. 23	Ergebnis der FACS-Assays, Humaner Stuhlprobeextrakt	64
Abb. 24	Antimikrobielle Aktivitäten: Bakterienkontrolle, Negativkontrolle (0,01% Essigsäure) und Positivkontrolle (hBD-3).	65
Abb. 25	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Colitis ulcerosa und Patienten mit Morbus Crohn	66
Abb. 26	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Konsistenz bei den Kontrollpersonen	68

Abb. 27	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiig/flüssigen Konsistenz bei den Kontrollpersonen	69
Abb. 28	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Konsistenz bei Morbus Crohn-Patienten	70
Abb. 29	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten der festen, breiigen und flüssigen Konsistenz bei Colitis ulcerosa-Patienten	71
Abb. 30	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei fester Stuhlkonsistenz	72
Abb. 31	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei breiiger Stuhlkonsistenz	73
Abb. 32	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten bei gesunden Kontrollpersonen, Morbus Crohn-Patienten und Colitis ulcerosa-Patienten bei flüssiger Stuhlkonsistenz.	73
Abb. 33	Prozentuale Verteilung der Stuhlproben nach Konsistenz beim Patientenkollektiv	74
Abb. 34	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität umgerechnet auf Trockengewicht bei Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich mit Kontrollpersonen	75
Abb. 35	Darstellung des Calprotectin in Stuhlextrakten bei MC-, CU-Patienten und Kontrollpersonen	76

Abb. 36	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität von Stuhlprobenextrakten nach Trocknung (Trockengewicht) und Verteilung nach Calprotectin-Gehalt (normal und hoch) bei Patienten mit MC und CU im Vergleich zu einer Kontrollgruppe	77
Abb. 37	Darstellung der prozentualen Verteilung nach Geschlecht (weiblich und männlich) bei MC-Patienten	78
Abb. 38	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität nach Dauer der Erkrankung bei MC-Patienten.	79
Abb. 39	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität bei Morbus Crohn-Patienten verteilt nach Krankheitsverlauf	80
Abb. 40	Darstellung der prozentualen Verteilung nach Geschlecht (weiblich und männlich) bei CU-Patienten.	81
Abb. 41	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität nach Dauer der Erkrankung bei CU-Patienten	82
Abb. 42	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität nach Lokalisation der Entzündung bei CU-Patienten	83
Abb. 43	Darstellung der antimikrobiellen Aktivität bei MC-, CU-Patienten und Kontrollpersonen nach Geschlecht verteilt	84

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Differenzialtabelle Morbus Crohn – Colitis ulcerosa (Unterscheidungsmerkmale)	20
Tab. 2a	Klinische Charakteristik von Morbus Crohn-Patienten	35
Tab. 2b	Klinische Charakteristik von Colitis ulcerosa Patienten	36
Tab. 2c	Klinische Charakteristik von Kontrollpersonen	36
Tab. 3	Reaktionsansätze für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität	45
Tab. 4	Radialdiffusionsassay. Durchmesser des Hemmhofes und Randbeschreibung	50
Tab. 5	Radialdiffusionsassay. Durchmesser des Hemmhofes und Randbeschreibung bei Patienten mit mutmaßlicher Antibiotikatherapie	52

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab, Leiter des Instituts, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) durchführen zu können. Auch für seine Unterstützung und Bereitschaft, die Arbeit von Seiten der Universität Tübingen zu betreuen, bedanke ich mich sehr.

Herrn Prof. Dr. Eduard F. Stange, meinem Doktorvater, danke ich besonders herzlich für die engagierte Unterstützung, hilfreiche fachliche Diskussionen, gute Ratschläge während der experimentellen Arbeiten und für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Jan Wehkamp für die Überlassung des interessanten Themas, seine ständige Bereitschaft, rasch und unkompliziert Hilfestellung zu leisten, konstruktive Diskussionen und seinen bewundernswerten Enthusiasmus an der Forschung.

Besonders danken möchte ich Björn Schröder für seine freundliche, geduldige und kompetente Einführung in die praktischen Arbeiten im Labor, für die gute Zusammenarbeit, ansteckende Energie, zahlreiche und konstruktive Diskussionen, Hilfestellungen bei der Auswertung der Messungen und bei der Darstellung der Ergebnisse sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Bernd Borstel danke ich für die Hilfe bei EDV-Problemen.

Für die zahlreichen Hilfestellungen, die nette und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie gute kollegiale Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeitern des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institutes, insbesondere meinen Arbeitskollegen Maureen Koslowski, Dr. Sabine Nuding und den technischen Mitarbeiterinnen Kathleen Siegel und Jutta Bader.

Besonderer Dank gilt den Kooperationspartnern dieses Projektes Prof. Dr. Walter Reinisch Universitätsklinik Wien, Österreich und den Mitarbeitern für die Überlassung der Proben und spätere Bereitstellung der ausführlichen Patientendaten.

Der Robert-Bosch-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterschützung.

Ein herzlicher Dank geht an meine Mutter und meinen Mann, die mich emotional unterstützten und mir mit gutem Rat und Tat jederzeit zur Seite standen.

12 Lebenslauf

Name	Nathalie Adam
Geburtsdatum	24.03.1969
Geburtsort	Smeinogorsk/ Russland
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
25.01.1998	Übersiedlung in die BRD
Schulausbildung:	
01.09.1976-27.06.1986	Allgemeinbildende Schule, Perm
27.06.1986	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium:	
23.08.1986-26.06.1992	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Perm
26.06.1992	Abschluss: Medizinisches Staatsexamen (Diplom)
Berufstätigkeit:	
01.09.1992-30.07.1993	Assistenzärztin im Städtischen Klinischen Kinderkrankenhaus Nr. 3, Perm
30.08.1993-24.01.1998	Tätigkeit als Dozentin am Lehrstuhl für lateinische Sprache an der Medizinischen Akademie, Perm
02.08.1994-27.12.1996	Assistenzärztin im Städtischen Klinischen Kinderkrankenhaus Nr. 9, Perm
01.12.2000-30.11.2001	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I bei Prof. Dr. R. Hehrmann, Diakonie Klinikum Stuttgart (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)

- 01.12.2001-31.05.2002 Assistenzärztin in der Chirurgischen Klinik bei Priv. Doz. Dr. Ernst, Diakonie Klinikum Stuttgart (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
- 10.06.2002 Approbation
- 01.08.2002-31.07.2005 Assistenzärztin in der Chirurgischen Klinik im Krankenhaus Vaihingen/Enz, Ärztlicher Direktor Dr. Th. Klötzer
- 01.08.2005-31.07.2006 Assistenzärztin in der Urologischen Klinik, Klinikum Ludwigsburg, Ärztlicher Direktor Dr. H. Mannel
- 01.10.2006-31.12.2007 Assistenzärztin in der Vertragsarztpraxis von Fr. Dr. K. Niemeyer, FÄ f. Allgemeinmedizin, Stuttgart
- 24.10.2007 Facharztprüfung
Anerkennung als Fachärztin für
Allgemeinmedizin
- Seit 01.08.2009 Polizeiärztin beim Regierungspräsidium
Stuttgart (Landespolizeidirektion)
- Wissenschaftliche Arbeit:
11.02.2008-29.07.2010 Dissertationsarbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin am Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart und an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

Publikationen:

1995-1997 „Pharmazeutische Terminologie und Rezeptwesen bei der Ausbildung der lateinischen Sprache“ (Lehr- und methodische Anweisung für Studenten der staatlichen Medizinischen Akademie in Perm, 60 Seiten)

Fortbildungen:

1995 1-monatige Fortbildung im Fach Latein (Medizinische Terminologie und Pharmakologie) an der Universität in St. Petersburg

09.05.2001 Strahlenschutzkurs in der Röntgendiagnostik für Ärzte, Diakonie Klinikum Stuttgart

31.10.2002-03.11.2002 Ultraschallkurs „Abdominelle Sonographie“, Karl-Olga-Krankenhaus Stuttgart

22.11.2002-24.11.2002 Strahlenschutz-Spezialkurs (Röntgendiagnostik) in Tübingen „mibeg-Institut“

21.02.2003-23.02.2003 Grundkurs im Strahlenschutz in Tübingen „mibeg-Institut“

13.07.2004 Fachkunde im Strahlenschutz auf dem Anwendungsgebiet Notfalldiagnostik

11.10.2005 Reanimation Basisseminar und Training mit AED, Klinikum Ludwigsburg

13.09.2006 Notfalltraining Basismaßnahmen sowie die Durchführung der erweiterten Maßnahmen der Herz-Lungen-Wiederbelebung im Praxisteam, Stuttgart

11.10.2005-04.07.2006 Kurs Balint-Gruppe, Klinikum Ludwigsburg

05.04.2006-06.12.2006 Kurs Psychosomatische Grundkenntnisse im Rahmen der Facharztweiterbildung Prof. Dr. Hermann Ebel, Klinikum Ludwigsburg

03.04.2009-04.04.2009	Kardiologie Teil 1,2,3, Landesärztekammer Baden-Württemberg
11.09.2009	Praktisches Notfalltraining, Landesärztekammer Baden Württemberg
15.10.2009	Der allergische Notfall, Landesärztekammer Baden-Württemberg
20.03.2010	Impfkurs für Ärzte (Basisqualifikation), Landesärztekammer Baden Württemberg
Zusätzliche Qualifikationen:	
Fremdsprachen:	Russisch (fließend in Wort und Schrift), Englisch (Grundkenntnisse), Lateinisch (Medizinische Terminologie)
EDV-Kenntnisse:	Word für Windows 2003/Excel/Access, PowerPoint, Outlook Aufbaukurse von April bis Juni 2008, Stuttgart
Führerschein Klasse 3	