

Untersuchungen über den Einfluß Enterohämorrhagischer Escherichia coli auf humane Endothelzellen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christian Bayer

aus Heidelberg

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Leiter Prof. Dr. W. Seeger

Betreuer: Dr. F. Rose

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Gutachter: Prof. Dr. A. Sziegoleit

Tag der Disputation: 15.10.2002

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1. | VORWORT | 9 |
| 2. | EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG | 10 |
| 2.1. | Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Endothelzelle | 10 |
| 2.1.1. | Endotheliale Signaltransduktionswege im Rahmen einer inflammatorischen Zellaktivierung | 11 |
| 2.1.2. | Freisetzung inflammatorischer Lipidmediatoren aus aktivierten humanen Endothelzellen – Die Rolle der Cyclooxygenase-Produkte Prostazyklin und Thromboxan | 13 |
| 2.2. | Die Art der Escherichia coli | 15 |
| 2.2.1. | Serologische Einteilung der Escherichia coli Stämme | 16 |
| 2.2.2. | Einteilung der humanpathogenen Escherichia coli | 16 |
| | – Allgemein | |
| | – Uropathogene Escherichia coli | |
| | – Enteropathogene Escherichia coli | |
| 2.3. | Charakteristika der EHEC-Infektion | 19 |
| 2.3.1. | Klinische und epidemiologische Aspekte der EHEC-Infektion | 19 |
| 2.3.2. | Bekannte und postulierte Pathogenitätsfaktoren der EHEC | 21 |
| 2.3.3. | Pathogenetisches Modell des HUS – systemische Begleitreaktionen der EHEC-Infektion | 23 |
| 2.3.4. | Die Rolle des Endothels bei Entstehung der thrombotischen Mikroangiopathie (TMA) | 24 |
| 2.4. | Fragestellung | 27 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 3.1. | Inkubationsmedien und Zellkulturmaterialien | 29 |
| 3.2. | Pharmaka und Agentien | 31 |
| 3.3. | Geräte | 32 |
| 3.4. | Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) | 32 |
| 3.4.1. | Isolation der Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen | 32 |
| 3.4.2. | „Splitten“ der Endothelzellen | 33 |
| 3.4.3. | Identifizierung und Charakterisierung der Endothelzellen | 34 |
| 3.5. | In den Experimenten eingesetzte Bakterienstämme | 34 |
| 3.5.1. | Herkunft der verwendeten Bakterienstämme | 34 |
| 3.5.2. | Kulturmedien und Materialien | 35 |
| 3.5.3. | Wachstumsbedingungen und Gewinnung der sterilfiltrierten EHEC- Kulturüberstände | 35 |
| 3.6. | Weiterführende Behandlung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände zur Charakterisierung des neuen Endothelzellstimulans | 36 |
| 3.6.1. | Ultrafiltration der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände zur Trennung bei 3000Da Molekulargewicht | 36 |
| 3.6.2. | Hitzebehandlung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände bei 56°C | 36 |
| 3.6.3. | Auftrennung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände mittels der von Bligh und Dyer beschriebenen Lipidextraktion | 36 |
| 3.6.4. | Inkubation der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände mit dem proteolytischen Enzym Proteinase k | 37 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 3.7. | Messung der Inositolphosphate | 37 |
| 3.7.1. | Versuchsablauf und Extraktion der Inositolphosphate | 37 |
| 3.7.2. | Anionenaustauschchromatographie | 38 |
| 3.8. | Versuchsabläufe der kommerziellen Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) | 40 |
| 3.8.1. | Gewinnung der Proben aus HUVEC-Zellkulturüberständen | 40 |
| 3.8.2. | Versuchsablauf des 6-keto-Prostaglandin F _{1α} Assay Systems | 40 |
| 3.8.3. | Versuchsablauf des Thromboxan B ₂ Assay Systems | 41 |
| 3.9. | Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse | 41 |
| 4. | ERGEBNISSE | 42 |
| 4.1. | Übersicht der dargestellten Ergebnisse | 42 |
| 4.2. | Aktivierung endothelialer Signaltransduktionswege durch sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstand (413/89-1) | 43 |
| 4.2.1. | Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC durch sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstand (413/89-1) – Zeit- und Dosisabhängigkeit | 43 |
| 4.2.2. | Freisetzung vasoaktiver Mediatoren aus Endothelzellen durch Inkubation mit sterilfiltriertem EHEC-Kulturüberstand (413/89-1) – Prostazyklin und Thromboxan | 47 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.3. | Charakterisierung eines neuen Endothelzellstimulans im steril- | |
| | filtrierten Kulturüberstand des EHEC- Stammes 413/89-1 | 52 |
| 4.3.1. | Gegenüberstellung: Endothelzellaktivierung durch Bakterien versus Endothelzellaktivierung durch sterilfiltrierten Kulturüberstand | 52 |
| 4.3.2. | Auftrennung des sterilfiltrierten Kulturüberstandes (413/89-1) durch verschiedene Verfahren – Einfluß auf den Inositolphosphat- metabolismus in Endothelzellen | 55 |
| 4.3.2.1. | Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC bei Stimulation mit ultrafiltrierten EHEC-Kulturüberständen | 55 |
| 4.3.2.2. | Einfluß von Hitzebehandlung auf die endothelstimulierende Potenz der sterilfiltrierten Kulturüberstände | 55 |
| 4.3.2.3. | Endothelzellaktivierung nach Lipidextraktion der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände nach <i>Bligh</i> und <i>Dyer</i> | 57 |
| 4.3.2.4. | Effekt der Proteinase k-Inkubation der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände auf die Endothelzellstimulation | 57 |
| 4.4. | Pharmakologische Interventionsversuche zur Hemmung der endothelialen | |
| | Stimulierbarkeit durch sterilfiltrierte EHEC-Kulturüberstände (413/89-1) | 60 |
| 4.4.1. | Hemmung des Inositolphosphatmetabolismus durch den Histamin-1-(H-1) Rezeptorantagonist Pylilamin | 60 |
| 4.4.2. | Hemmbarkeit der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus HUVEC durch den H-1-Rezeptorantagonisten Pylilamin | 62 |
| 4.4.3. | Verminderte Stimulierbarkeit der HUVEC durch Histamin nach Vor- inkubation mit dem sterilfiltrierten Kulturüberstand des EHEC- Stammes 413/89-1 | 62 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 5. | DISKUSSION | 65 |
| 5.1. | Die Rolle des Endothels bei EHEC-Infektionen und beim HUS | 65 |
| 5.2. | Abgrenzung des neuen Endothelzellstimulans des Stammes 413/89-1 gegenüber bekannten Virulenzfaktoren und stoffliche Charakterisierung | 67 |
| 5.3. | Postulierte Rolle des neuen Endothelzellstimulans und Einordnung in das pathogenetische Modell der EHEC-Infektionen und ihrer Komplikationen | 71 |
| 5.4. | Ausblick | 74 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 75 |
| 7. | LITERATURVERZEICHNIS | 78 |
| 8. | EIGENE PUBLIKATIONEN | 85 |
| 9. | LEBENS LAUF | 86 |
| 10. | DANKSAGUNG | 87 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- Da Dalton, z.B. in kDa
- DAG Diacylglycerol
- D+HUS Diarrhoe-positives Hämolytisch Urämisches Syndrom
- EA_gEC Enteroaggregative Escherichia coli
- EHEC Enterohämorrhagische Escherichia coli
- EIEC Enteroinvasive Escherichia coli
- ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
- EPEC Enteropathogene Escherichia coli
- ETEC Enterotoxische Escherichia coli
- FCS fetales Kälberserum
- Gb3 Globotriaosylceramid
- GTP, GDP Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
- HC Hämorrhagische Colitis
- HlyA Escherichia coli Hämolysin
- HPLC high performance liquid chromatography,
(Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
- HUS Hämolytisch Urämisches Syndrom
- HUVEC human umbilical vein endothelial cells
- InsP₃ Inositol 1,4,5-triphosphat
- LPS Lipopolysaccharide
- M mol/l, z.B. in M, mM, µM oder nM
- PAF Plättchen-aktivierender Faktor
- PGI₂ Prostazyklin
- PMN polymorphkernige Neutrophile
- PtdIns Phosphatidylinositol
- SLT Shiga-like Toxin
- TMA thrombotische Mikroangiopathie
- TXA₂ Thromboxan

1. VORWORT

Die vorliegende Dissertation untersucht den Einfluß von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) auf das Signaltransduktionsverhalten und die sekundären Zellreaktionen humaner Endothelzellen (HUVEC). Seit ihrer Identifikation als humanpathogene Keime 1982 haben sich die EHEC zu bedeutsamen Krankheitserregern entwickelt. EHEC-Infektionskrankheiten wie die Hämorrhagische Colitis (HC), aber vor allem deren Komplikationen wie das Hämolytisch Urämisches Syndrom (HUS) bereiten therapeutische Probleme. Die Schädigung der Endothelzelle steht im Mittelpunkt der Pathogenese dieser Erkrankungen, dabei sind sowohl sezernierte Pathogenitätsfaktoren der EHEC als auch die starke inflammatorische Reaktion des menschlichen Organismus ursächlich beteiligt.

Da es sich weder bei der HC noch beim HUS um Bakteriämien handelt, wurden in den Versuchen vorwiegend EHEC-Kulturüberstände eingesetzt. Die dabei beobachtete Endothelzellaktivierung ist somit auf gelöste, aktiv sezernierte Substanzen zurückzuführen. Desweiteren wurde der stoffliche Charakter des endothelstimulierenden Agens in den Überständen der EHEC-Kulturen definiert und bekannte sezernierte Pathogenitätsfaktoren als Ursache der beobachteten Endothelzellreaktionen ausgeschlossen.

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von Januar 1997 bis Mai 1998 im Labor von Prof. Dr. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin, Bereich Klinische Forschergruppe "Respiratorische Insuffizienz", unter der Betreuung von Dr. F. Rose durchgeführt. Die für die Versuche notwendigen Bakterienstämme wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. T. Chakraborty, Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt.

2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

2.1. Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Endothelzelle

Endothelzellen kleiden die Innenseite der Blutgefäße aus und bedecken beim Menschen eine Fläche von mehr als 5000 m². Aufgrund ihrer strategischen Position und des Kontaktes mit dem fließenden Blut interagieren Endothelzellen mit den verschiedensten biologischen Systemen und Zellen. Sie sind bei der Vermittlung und Modulation von Gerinnungsvorgängen, der Regulierung des Blutdrucks, bei inflammatorischen und immunologischen Prozessen sowie bei der Aufrechterhaltung einer Schrankenfunktion gegenüber dem Interstitium von großer Bedeutung und können daher in ihrer Gesamtheit als eigenständiges Organ betrachtet werden (1, 2).

Das Endothel besitzt pro- und antikoagulatorische Eigenschaften. Es synthetisiert verschiedene Faktoren (Protein S, Faktor V, Gewebefaktor, Plasminogen-Aktivator, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor), die in die Gerinnungskaskade eingreifen und reguliert zusätzlich die Plättchen-Aktivierung und -Adhärenz durch die Produktion von NO und die Lipidmediatoren Prostazyklin (PGI₂), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und Thromboxan (TXA₂) (1).

Der endotheliale Einfluß auf die Vasomotorik wird unter anderem durch endotheliale vasodilatative (NO, EDHF, PGI₂, PGE₂) und vasokonstriktive Mediatoren (Endothelin, Angiotensin II, Thromboxan, Sauerstoffradikale) gesteuert (1, 2).

Während eines Entzündungsgeschehens ist das Endothel Syntheseort verschiedener inflammatorischer Mediatoren und steuert über die Expression von Adhäsionsmolekülen die Migration von entzündungskompetenten Zellen in den Entzündungsfokus.

Im Verlauf einer Sepsis führen mikrozirkulatorische Dysfunktionen zu Permeabilitätsstörungen und zu Fehlsteuerungen des totalen peripheren Gefäßwiderstandes (60, 61).

Basis einer ungestörten Funktion der beiden Organsysteme Endothel und Blut ist ein Gleichgewicht an pro- und antiinflammatorischen Komponenten, vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Mediatoren sowie koagulatorischer und fibrinolytischer Aktivität. Jede Störung dieser empfindlichen Gleichgewichte kann entscheidende zirkulatorische und damit lebensbedrohliche Folgen haben.

2.1.1. Endotheliale Signaltransduktionswege im Rahmen inflammatorischer Zellaktivierung

Die Aktivierung der Endothelzelle erfolgt über die Bindung verschiedener Entzündungsmediatoren an spezifische Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche. Durch die Zellmembran wird das Signal mit Hilfe von GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) in das Zellinnere übertragen (62, 63). G-Proteine bestehen je aus einer α -, β - und γ -Untereinheit und können ein Signal entweder weiterleiten (stimulierender G_s -Typ) oder hemmen (inhibitorischer G_i -Typ). Die für das jeweilige G-Protein spezifische α -Untereinheit, die im inaktiven Zustand an GDP gebunden ist, besitzt eine eigene GTPase-Aktivität (4). Bindet ein Signalmolekül auf der Zelloberfläche an den Rezeptor, kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit, wodurch sich diese vom $\beta\gamma$ -Komplex löst und ein nachgeschaltetes Effektorenzym aktiviert. Nach diesem Vorgang hydrolysiert die α -Untereinheit GTP zu GDP und reassoziert mit dem $\beta\gamma$ -Komplex, wodurch die Signalkaskade über den Rezeptor beendet ist (4, 5).

Die phosphoinositolspezifische Phospholipase C ist eines der durch G-Proteine aktivierten Enzyme. Sie gewährleistet die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PtdIns-4,5 P₂), was zur konsekutiven Bildung der zyttoplasmatischen second messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (Ins-1,4,5 P₃, InsP₃) führt (Abbildung 1) (6).

InsP₃ verursacht einen raschen Ca²⁺-Anstieg durch Bindung an ein Rezeptorprotein auf der zyttoplasmatischen Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (64). Eine langsame, protrahierte Anhebung des Ca²⁺-Spiegels wird dagegen teils von extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen bestimmt, teils durch einen transmembranösen Influx über Ca²⁺-Kanäle oder Carrierproteine unterhalten (11). Die Ca²⁺-Ionen beeinflussen entweder direkt oder nach Bindung an Calmodulin eine Vielzahl zellulärer Effektorsysteme (NO-Synthase, Phospholipase A₂, Lipoxy- und Cyclooxygenase) (14, 32).

DAG besitzt zwei potentielle Signalfunktionen: Einerseits kann die durch die DAG-Lipase abgespaltene Arachidonsäure in Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Produkte überführt werden. Andererseits aktiviert DAG eine spezifische Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits zahlreiche Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in der Zielzelle aktivieren kann (10, 65).

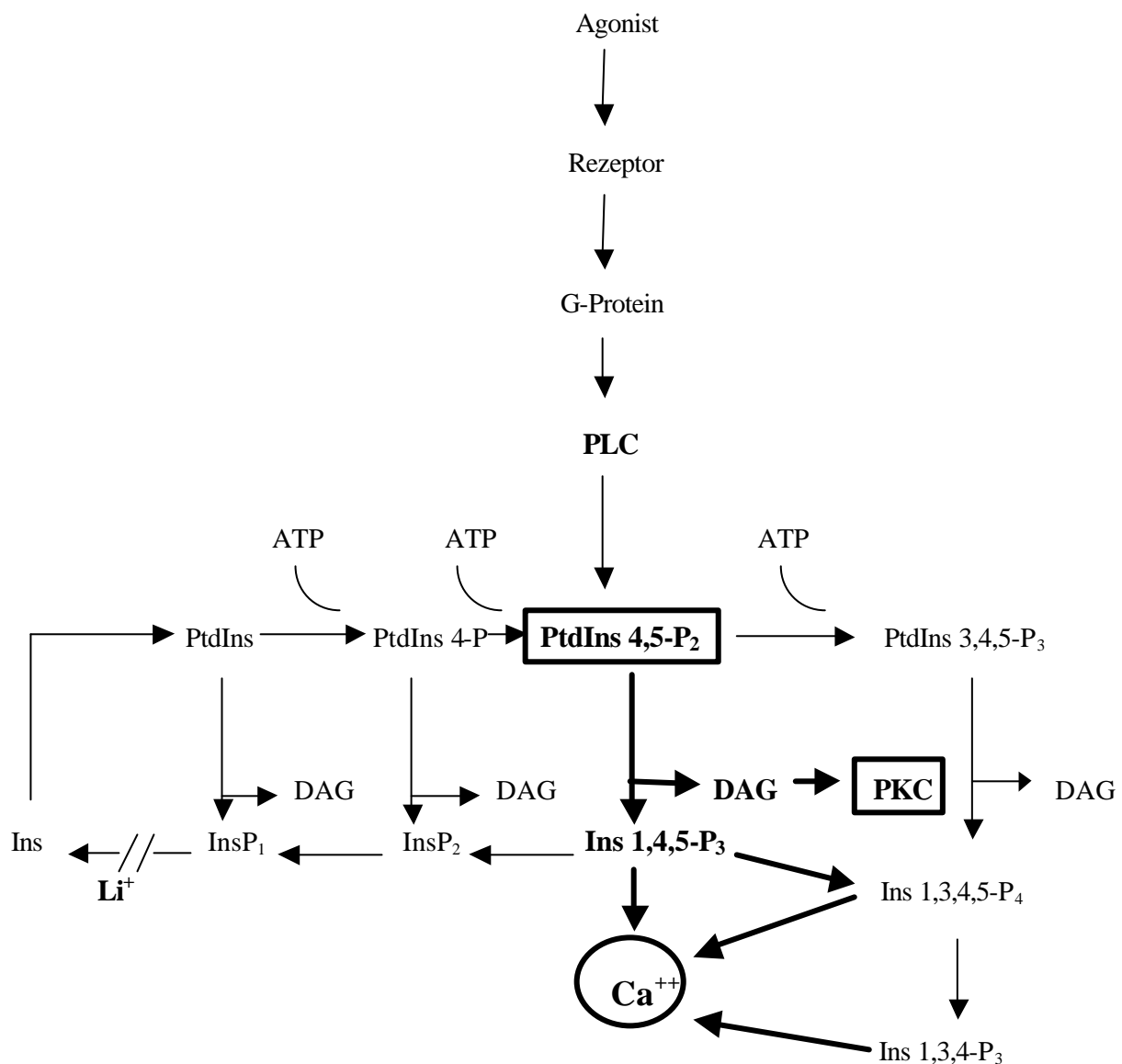


Abbildung 1: Stoffwechsel der Inositol- und des DAG

Nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit konsekutiver Hydrolyse des Membranphospholipids *PtdIns 4,5-P₂* kommt es zur Bildung der second messenger DAG und *Ins 1,4,5-P₃*, dessen sequentielle Dephosphorylierung zu Inositol durch Li^+ -Ionen auf der Ebene der IP_1 -Phosphatase hemmbar ist (10, 66). Die Phosphorylierung des *Ins 1,4,5-P₃* durch eine InsP_3 -Kinase-Reaktion führt zum Inositol-1,3,4,5-tetrakiphosphat (InsP_4), dessen Dephosphorylierung durch eine InsP_4 -Phosphatase zu einer strukturisomeren Form des *Ins 1,4,5-P₃*, dem Inositol 1,3,4-triphosphat (*Ins 1,3,4-P₃*) führt. Diese Metaboliten haben einen protrahierten, lang anhaltenden Effekt auf den Ca^{++} -Spiegel (11, 64, 29). DAG kann entweder innerhalb von Sekunden durch eine DAG-Kinase zur Phosphatidsäure phosphoryliert oder durch eine DAG-Lipase zum Monoacylglycerol hydrolysiert werden, wodurch der Eicosanoidvorläufer Arachidonsäure freigesetzt wird, welcher bei über 70% der Inositollipide in der sn_2 -Position enthalten ist (6).

2.1.2. Freisetzung inflammatorischer Lipidmediatoren aus aktivierten humanen Endothelzellen – Die Rolle der Cyclooxygenase-Produkte Prostazyklin und Thromboxan

Zu den Lipidmediatoren zählen die Oxygenationsprodukte der Arachidonsäure (AA, Eicosanoide) und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF). Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure mit einer Länge von 20 Kohlenstoffatomen, die auf verschiedene Stimuli hin aus der Zellmembran entweder direkt durch eine Phospholipase A₂ oder in zwei Schritten durch eine Phospholipase C₂ und eine Diacylglyceridlipase freigesetzt wird. Benannt nach dem Enzym, das die erste Oxygenation der Arachidonsäure einleitet, unterscheidet man zwischen Lipoxigenase- und Cyclooxygenase-Produkten.

Die verschiedenen Lipoxigenasen katalysieren die Bildung der Leukotriene (LT) und der Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) (67). Die Cyclooxygenase und nachgeschaltete Enzyme vermitteln die Entstehung der Prostaglandine (PG) und des Thromboxans (TXA₂). Auf dem Cyclooxygenase-Weg werden aus der AA durch eine initiale Bis-Deoxygenierungsreaktion die kurzlebigen Endoperoxide PGG₂ und PGH₂ gebildet. PGH₂ nimmt eine zentrale Stellung in der Prostaglandinsynthese ein und dient als gemeinsames Substrat verschiedener Isomerasen, Reduktasen und Synthasen (Abbildung 2). Die Verteilung dieser Enzyme ist für jede Zellpopulation spezifisch; sie können jedoch in einer Zelle je nach Aktivierungszustand im unterschiedlichen Ausmaß exprimiert sein (14). Im weiteren Verlauf soll nur auf die beiden Lipidmediatoren PGI₂ und TXA₂ eingegangen werden, deren Gleichgewicht für die Gefäßwand-Thrombozyten-Interaktion und den Gefäßtonus besonders wichtig ist.

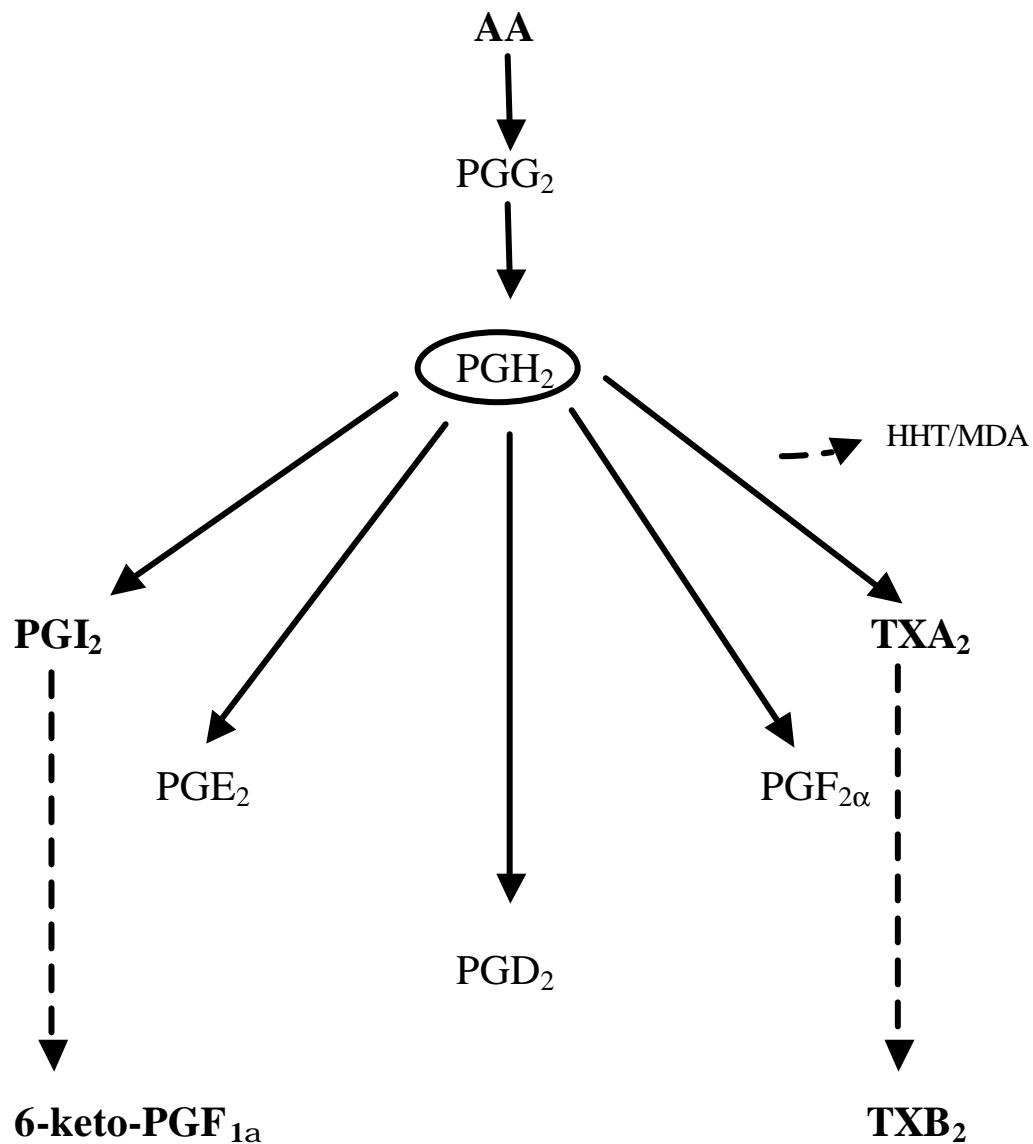


Abbildung 2: Schematische Übersicht des Cyclooxygenaseweges der Arachidonsäure: Dargestellt sind Entstehung des zentralen Produkts PGH₂ und die wichtigsten Metaboliten. Die einzelnen Schritte werden enzymatisch katalysiert, lediglich die Bildung von Hydroxyheptadekatriensäure (HHT) und Malonaldehyd (MDA) aus PGH₂, von 6keto-PGF_{1α} aus PGI₂ und von TxB₂ aus TxA₂ erfolgen spontan.

– Die Rolle der Cyclooxygenase-Produkte Prostazyklin (PGI₂) und Thromboxan (TXA₂)

Prostazyklin zählt neben dem Stickstoffmonoxid zu den Metaboliten endothelialer Herkunft, die eine direkte dilatatorische Wirkung auf den Gefäßtonus haben (27). In der Niere hat PGI₂ neben der vasodilatativen eine stimulatorische Wirkung hinsichtlich der Renin-Produktion (68). An den Bronchien wirkt Prostazyklin relaxierend und hat einen entscheidenden Einfluß auf den pulmonalen Gasaustausch. Granulozytäre Degranulierung sowie thrombozytäre Adhäsion und Aggregation werden durch das PGI₂ gehemmt. So stellt das PGI₂ einen funktionellen Gegenspieler zu dem vorwiegend in Thrombozyten synthetisierten TXA₂ dar, welches vasokonstriktiv und thrombozytenstimulierend wirkt (19, 20). Eine überschießende Freisetzung von PGI₂ kann dagegen an schweren systemischen Vasodilatationen bis hin zum Schock ursächlich beteiligt sein (28).

Die aktiven Mediatoren PGI₂ und TXA₂ hydrolysieren rasch zu den stabilen, aber biologisch inaktiven Verbindungen 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂ (t_{1/2} PGI₂: 3 Min., t_{1/2} TXA₂: 30 Sek.), die mittels ELISA Systemen gemessen wurden.

2.2. Die Art der *Escherichia coli*

Die zu der Familie der Enterobacteriaceae gehörenden *Escherichia coli* sind gramnegative plumpe, abgerundete Enden aufweisende Stäbchenbakterien (31). Die fakultativen Anaerobier sind peritrich begeißelt. Ihre komplexe Antigenstruktur zeichnet sich durch das Vorhandensein von O-Antigenen (spezifische Lipopolysaccharid-Kettenabschnitte), K-Antigenen (lineare Polymere der äußeren Membran), F-Antigenen (Fimbrienantigene) und H-Antigene (Geißelantigene) aus (31).

Als physiologischer Bestandteil des Dickdarms von Mensch und Tier gelten *Escherichia coli* als Indikator für fäkale Verunreinigung von Lebensmitteln und Wasser (47).

Sie sind zwar die häufigsten Erreger bakterieller Infektionskrankheiten beim Menschen, doch kann man sie nicht als primär pathogen bezeichnen. Bei Vorhandensein verschiedener Virulenzgene können *Escherichia coli* eine bemerkenswert große Bandbreite an Erkrankungen auslösen, doch besitzt der Großteil der Stämme diese Gene nicht (78). Bei den pathogenen Stämmen werden enteropathogene und uropathogene Stämme unterscheiden.

2.2.1. Serologische Einteilung der Escherichia coli Stämme

Die serologische Klassifizierung der Escherichia coli in über 160 Serogruppen wird anhand der Reaktivität des O-Antigens des Lipopolysaccharids mit spezifischen Antikörpern vorgenommen. Diese Serogruppen werden durch die Identifikation verschiedener H-Antigene („Hauch“- oder Geißelantigene) in Serotypen eingeteilt. Somit ist es möglich, Escherichia coli aus menschlichen und tierischen Proben oder Lebensmitteln durch ihre antigenen Oberflächeneigenschaften zu identifizieren und zu klassifizieren (78). Dies ist besonders bei der Identifikation von Infektionsquellen und deren Elimination wichtig. Weitere serologische Unterscheidungsmerkmale sind die K- und F-Antigene (Kapsel- und Fimbrienantigene). Die pathogenetische Potenz und klinische Relevanz des betreffenden Escherichia coli Stammes kann dadurch besser eingeschätzt werden (31, 78).

Als Beispiel: Stämme der Serogruppe O 86 besiedeln physiologischerweise die Darmflora, sind aber nur sehr selten für Erkrankungen verantwortlich. Stämme der Serogruppe O 55 findet man nicht in der physiologischen Darmflora, treten sie auf, dann lösen sie fast immer eine Durchfallerkrankung aus (78).

2.2.2. Einteilung der humanpathogenen Escherichia coli

– Allgemein

Neben intestinalen und Harnwegsmanifestationen werden Früh- und Neugeborenenmeningitis sowie Septikämien ebenfalls durch Escherichia coli ausgelöst, hierbei sind grampositive Staphylokokkus aureus und Escherichia coli zu gleichen Teilen an der Hälfte der Septikämien ursächlich beteiligt.

Im Krankheitsfall ist es wichtig, die wenigen primär humanpathogenen (entero- und uropathogene) Escherichia coli als pathogenetische Krankheitsursache zu identifizieren, um so durch Isolation oder Beseitigung der Infektionsquellen weitere Ausbrüche von Escherichia coli-bedingten Erkrankungen zu verhindern (34).

– Uropathogene *Escherichia coli*

Der häufigste extraintestinale Koliinfekt ist der Harnwegsinfekt (HWI), der sich in den unteren Harnwegen (als Zystitis, Urethritis, Zystourethritis) oder auch im Nierenbecken und in der Niere (als Zystopyelitis und Pyelonephritis) manifestieren kann (40). Der HWI entsteht bevorzugt bei Obstruktion der Harnwege (Disposition) oder spontan durch den Pathovar UPEC (Uropathogener *Escherichia coli*). Der Verlauf des HWI kann akut oder chronisch persistierend sein. Als ätiologisches Agens der akuten Zystitis sind *Escherichia coli* zu 70-80%, bei nosokomialer Zystitis zu 50% verantwortlich. Außerdem besteht die Gefahr einer vom Urogenitalsystem ausgehenden Urosepsis mit hoher Mortalitätsrate.

– Enteropathogene *Escherichia coli*

Im Gegensatz zur serologischen Einteilung orientiert sich ein neuer Einteilungsansatz der enteropathogenen *Escherichia coli* Stämme an Virulenzfaktoren wie Invasivität in die betroffene intestinale Epithelzelle, den ausgelösten Symptomen, der Bindungsfähigkeit an den Mukosazellen des Darms oder der Fähigkeit zur Toxinproduktion (78). Hierbei muß man unbedingt beachten, daß viele Stämme Eigenschaften besitzen, die in mehrere als Virotypen bezeichneten Gruppen passen. Einteilung in fünf Virotypen (Tabelle 1) (33, 78):

Im Rahmen einer Kooperation wurde uns von Prof. Dr. T. Chakraborty freundlicherweise EHEC-Stämme zur Verfügung gestellt. Neben anderen waren darunter die Stämme EHEC EDL933 (O157:H7) und ein Shiga-like Toxin produzierender Stamm SLTEC 413/89-1 (O26:H-), humanpathogene Vertreter mit diesen Oberflächeneigenschaften sind neben den O111:H- Stämmen im Erregerspektrum bei der Entstehung des HUS neuerdings hinzugekommen. Die O26-Stämme sind nach den O157-Stämmen die zweithäufigster Erreger der EHEC-assoziierten Erkrankungen (50). Die bovinen und humanen EHEC bzw. SLTEC sind eng miteinander verwandt.

Tabelle 1: Einteilung der enteropathogenen Escherichia coli Stämme in fünf, als Virotypen bezeichnete Gruppen: enterotoxigene (ETEC), enteropathogene (EPEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAaggEC) und enterohämorrhagische (EHEC) Escherichia coli.

| | <u>ETEC</u> | <u>EPEC</u> | <u>EIEC</u> | <u>EAaggEC</u> | <u>EHEC</u> |
|--|--|--|---|---|--|
| Serovare | O78:H12, O8:H37 | O55:H7, O111:H2 | O124:H-, O143:H- | O3:H2, O73:H33 | O157:H7, O26:H-, O111:H- |
| intestinale Affektion | Dünndarm | Dünndarm | Dickdarm | Dünndarm | terminales Ileum und Kolon |
| Interaktion mit der Mukosazelle | Adhäsion, keine Invasion | stärkere Invasion als ETEC | Invasion in die Epithelzelle | Anheftung in Aggregaten auf der Epithelzelle | geringe Invasion |
| Histologie | Keine histologischen Veränderungen, geringe Inflammation | dramatische Veränderung der Zelle, stärkere Inflammation | geschwürige Entzündung | Histologie unauffällig | starke strukturelle Veränderung der Mukosazelle, immense Entzündungsreaktion |
| Pathogenitätsfaktoren | hitzeabiles (LT) und hitzestabiles (ST) Toxin, Adhäsionsfimbrien | Faktoren zur Ausbildung einer A/E-Läsion | Invasionsfaktor, keine Toxine | EAST-1, porenbildendes Toxin | SLT, EAST-1, Enterohämolysin Faktoren zur Ausbildung einer A/E-Läsion |
| Klinik | Durchfall mit Erbrechen und Fieber, kann bei Säuglingen und Kleinkindern tödlich verlaufen In der 3. Welt Hauptgrund der Säuglingssterblichkeit Reisende: „traveller´s diarrhea“, Einheimische oft immun | schwere, oft tödlich verlaufende Durchfälle bei Säuglingen und Kleinkindern, in Entwicklungsländern besonders häufig | bakterielle Dysenterie, ruhrähnliche Durchfälle | wäßrige Durchfälle, persistierende Durchfälle bei Kindern | anfangs wäßrige, später blutig-eitrig Durchfälle post-EHEC-Diarrhoe Komplikation: HUS Nehmen an Bedeutung zu |

2.3. Charakteristika der EHEC-Infektion

2.3.1. Klinische und epidemiologische Aspekte der EHEC-Infektion

Im Jahr 1982 wurden die EHEC erstmals als humanpathogene Keime identifiziert (71). Seitdem nahm ihre klinische Bedeutung immer mehr zu: Innerhalb weniger Jahre ist diese junge und äußerst widerstandsfähige Bakterienspezies zum zweithäufigsten Erreger von Durchfallerkrankungen nach den Salmonellen avanciert (58). In Nordamerika sind die EHEC Hauptauslöser blutiger Durchfälle. Den Zusammenhang zwischen der Hämorrhagischen Colitis (HC) und dem Hämolytisch Urämischem Syndrom (HUS) beschrieben *Karmali et al.* erstmalig 1985 (69, 70). Heute sind EHEC die häufigste Ursache eines Diarrhoe-positiven HUS (D+HUS), d.h. anamnestisch Durchfallerkrankung vor der Entwicklung eines HUS. HC und HUS werden weltweit beobachtet (34).

Reservoir der EHEC ist der Intestinaltrakt von Rindern und anderen Zuchttieren, bei deren Schlachtung eine Kontamination des Fleisches stattfinden kann (44). Bei ungenügend heißer Zubereitung dieses Fleisches können die Keime unversehrt in den Magen-Darm-Trakt des Menschen gelangen (47). Als andere Übertragungswege kommen unpasteurisierte Milch, Apfelmilch, mistgedüngtes Gemüse und kontaminiertes Wasser in Frage (58). Auch eine Bakterienübertragung von Mensch zu Mensch ist bei ungenügender Hygiene beobachtet worden (58).

Der klinisch wichtigste Vertreter der EHEC gehört zur Serogruppe/-typ O157:H7; aber auch andere Serogruppen (O26 und O111) (in dieser Studie eingesetzt) gewinnen zunehmend an Bedeutung hinsichtlich einer EHEC-Infektion und des als schwerwiegende Komplikation auftretenden HUS (50). Die Anzahl der HUS-Fälle hat sich im Vergleich von 1995 auf 1996 beinahe verdoppelt. Das Erregerspektrum der EHEC-Infektionen weitet sich aus; O157:H-, H7 waren nur noch für 70,5% der HUS-Fälle verantwortlich (50). Die Vertreter der O26-Gruppe sind die zweithäufigsten Erreger von EHEC-Infektionen beim Menschen.

Symptomatologie der EHEC-Infektion und deren Komplikationen:

Die Symptome einer EHEC-Infektion reichen von einer asymptomatischen Kolonisation über eine milde Diarrhoe bis hin zur schweren HC. Ein Teil der Infektionen verläuft unblutig oder mit so milden Symptomen, daß sie oft nicht als EHEC-Diarrhoe diagnostiziert werden (siehe Übersicht 1). Die Inkubationszeit liegt im Mittel bei 6,1 Tagen. Der Blutverlust reicht von weniger als einem Eßlöffel bis zu vier Tassen pro Tag („all blood no stool“) (34, 50, 58).

Übersicht 1: Symptomatik bei EHEC-Infektionen und deren Komplikationen:

1. Intestinale Manifestation und Komplikationen:

- Wäßriger Durchfall bis hin zu wäßrig-blutigem Durchfall, Risikofaktor für extraintestinale Komplikationen
- Kolikartige Bauchschmerzen, bei Kindern häufig Erbrechen, leichtes Fieber
- Intestinale Komplikationen:
chronische Colitis beim Erwachsenen, nekrotisierende Colitis und Dickdarminvagination mit Ileus beim Säugling

2. Extraintestinale Komplikationen:

- **HUS**, bei bis zu 10% der Infektionen, besonders bei Kindern <6 Jahren und Alten; ca. 5% letaler Verlauf; 5% Nierenversagen (in USA Hauptgrund der NTX bei Kindern), 40% renale Folgeschäden (von milder Proteinurie bis hin zu schweren Nephropathien mit Hypertonie und verminderter Kreatinin-Clearence) bedingt durch renale **Endothelzellschädigung** (39, 72, 73, 74)
- isolierte hämolytische Anämien
- toxischer Myokardschaden (Kinder), Pankreatitis mit nachfolgendem Diabetes bei Kindern
- Multiorganversagen

Therapiestrategien bei EHEC-Enteritis:

Es gibt im Augenblick keine etablierte therapeutische Intervention, welche die Dauer der Erkrankung verkürzt, eventuelle Komplikationen oder die Entwicklung eines HUS effizient verhindert hätte. Die Therapie erfolgt symptomatisch (34). Der Einsatz von motilitätshemmenden Agentien ist kontraindiziert, denn sie vereinfachen die Kolonisation der EHEC im Darm und schwächen die Resistenzfaktoren der Mukosa (47).

Eine antibiotische Behandlung ist umstritten, da sie das Überleben der Patienten nicht verbessert. Die Länge und Schwere des Durchfalls blieben unbeeinflusst (47). Außerdem berichteten zwei retrospektive Studien, daß eine antibiotische Behandlung, wahrscheinlich durch vermehrte Freisetzung bakterieller Pathogenitätsfaktoren (46, 48), einen Risikofaktor für die Ausbildung eines HUS darstellt. Andere Therapieansätze werden zur Zeit geprüft.

2.3.2. Bekannte und postulierte Pathogenitätsfaktoren der EHEC

Mit der Zeit haben die EHEC viele Virulenzgene erworben, die es ihnen ermöglichen, die unterschiedlichsten Pathogenitätsfaktoren zu bilden:

An der intestinalen Manifestation beteiligte EHEC-Virulenzfaktoren:

Im von *Donnenberg* und *Kaper* postulierten Drei-Stufen-Modell der Ausbildung von „attaching and effacing“-Läsionen (A/E-Läsionen), als einem wichtigen pathogenetischen Prozeß der EHEC-Infektionen, kommt es im ersten Schritt, dem „attaching“, zu einer initialen Adhärenz zwischen dem Bakterium und dem Enterozyten durch Interaktion von bakteriellen Fimbrienadhäsinen mit enterozytären Oberflächenrezeptoren (75, 76). Die zweite Stufe ist geprägt durch die Oberflächenveränderung der Enterozyten, dem „effacing“. Die Mikrovilli unter den anheftenden Bakterien verschwinden. Die genetischen Informationen für die Ausbildung der A/E-Läsion befinden sich auf einem 35kb (kilobasen) großen Chromosomenabschnitt, der als „locus of enterocyte effacement“ (LEE) bezeichnet wird (42). Die Reaktionen des Enterozyten auf die im LEE-codierten Proteine sind u.a. eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, Bildung von Inositolphosphaten und enterozytäre Flüssigkeitssekretion (77). In der dritten Phase folgt eine Umorganisation des enterozytären Zytoskeletts. Verantwortlich hierfür ist neben verschiedenen bakteriellen Proteinen ein auf

dem *eaeA* Gen (ein Teil des LEE) codiertes und Intimin genanntes äußeres Membranprotein (41, 43).

Die Entwicklung der A/E-Läsionen mit Änderung der Na^+ - und Cl^- -Absorption bewirkt die initiale sekretorische Diarrhoe der EHEC-Infektion (33). Dazu tragen eine verstärkte intestinale Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die freigesetzten Mediatoren von angelockten polymorphkernigen Neutrophilen bei (34).

Von EHEC gebildete Toxine:

Das bakteriophagencodierte Shiga-like Toxin (SLT) ist ein A/B-Toxin, d.h. die B-Untereinheit ist für die spezifische Bindung an der Zielzelle verantwortlich, die enzymatisch aktive A-Untereinheit gelangt in die Zelle (18). Die B-Einheit bindet spezifisch am Gb₃-Rezeptor, es folgt die Translokation und Endozytose des Toxins. Die A-Untereinheit bindet an der 60S Einheit der Ribosomen und bewirkt eine Hemmung der Proteinbiosynthese. Das SLT unterscheidet sich nur in einer Aminosäure in der A-Untereinheit vom Shigatoxin (statt Threonin 45 - Serin 45), sie wirken beide zyto-, neuro- und enterotoxisch (18, 33).

Der Tropismus der endothelialen Affektion ist durch die Gb₃-Rezeptordichte bedingt (15). Diese organspezifische Toxizität des SLT auf vaskuläre Endothelzellen ist vorwiegend im Bereich des Kolons und der Niere, aber auch im ZNS und auf Nierenepithel zu beobachten (74) und konnte in vitro (auf HUVEC) durch eine Koinkubation mit LPS, IL-1 und TNF durch up-Regulation des Gb₃-Rezeptors sogar noch gesteigert werden (57).

Das hitzestabile Toxin-1 enteroaggregativer *Escherichia coli* (EAST-1) kann von 89% der EHEC gebildet werden. Es hat eine Molekulargröße von 4100Da (36). Bei einem weiteren EAggEC-Toxin handelt es sich um ein 120kDa großes porenbildendes Exotoxin, ähnlich dem Hämolyysin von uropathogenen *Escherichia coli* (33). Der durch die Pore stattfindende Ca^{2+} -Einstrom hat verschiedene Effekte auf die Funktionen der eukaryotischen Wirtszelle.

Weiterhin sind EHEC in der Lage, ein ebenfalls porenbildendes 107kDa großes Enterohämolyysin zu bilden. Wie das α -Hämolyysin ist auch das EHEC-Hämolyysin ein RTX-Toxin (repeats-in-toxin, d.h. sich wiederholende Aminosäureabschnitte innerhalb des Toxinmoleküls) (33).

Postulierte Pathogenitätsfaktoren Enterohämorrhagischer *Escherichia coli*:

Aufgrund der Tatsache, daß die hämorrhagischen *Escherichia coli* eine junge Bakterienspezies sind und mit der Zeit viele Virulenzgene erworben haben, kann man zur Zeit noch nicht die gesamte pathogenetische Potenz dieser Stämme überblicken (34). Das bakterielle Spektrum für die Entstehung einer EHEC-Durchfallerkrankung und für die Entwicklung des HUS weitet sich weiter aus (50). Wie in den oberen Abschnitten beschrieben wurde, können die EHEC durch eine Vielzahl von bakteriophagencodierten und chromosomalen Pathogenitätsgenen verschiedene, unterschiedlich schwerwiegende Krankheitsbilder verursachen.

Dieser große und zukünftig vielleicht noch größer werdende Gen-„pool“ beinhaltet wahrscheinlich neben den bekannten Pathogenitätsfaktoren bislang noch nicht identifizierte bakterielle Produkte (33, 50). Einige Autoren deuten die Beteiligung weiterer Virulenzfaktoren an der EHEC-Pathogenese an, z.B. bei der Adhärenz (50, 74), bei der massiven inflammatorischen EHEC-Darmerkrankung (33) oder bei der Schädigung des Endothels (39).

Ob diese noch nicht identifizierten Faktoren membrangebunden oder frei vorliegen, ob und wo sie im komplexen Pathogenitätsmodell der EHEC-Infektion einzuordnen sind, erfordert noch weitere experimentelle Anstrengung.

Ungeklärt ist bislang ebenfalls die immense renale Endothelzellaktivierung bei Ausbildung des HUS. Gegenstand dieser Arbeit ist die Hypothese, daß weitere bakterielle Faktoren und Toxine an der Endothelzellschädigung beteiligt sind.

2.3.3. Pathogenetisches Modell des HUS – systemische Begleitreaktionen der EHEC-Infektion

Die säuretoleranten EHEC überwinden die Säurebarriere des Magens (58) und binden im terminalen Ileum und Kolon an Enterozyten (34). Es kommt zum Phänomen der „A/E“-Läsion, einer dramatischen Zytoskelett- und Oberflächenveränderung der Enterozyten (33).

Die Barrierefunktion der Mukosa geht verloren, und sezernierte bakterielle Produkte gelangen in das subepitheliale Gewebe (34).

Einerseits kommt es nun zu einer lokalen Wirkung des SLT und/oder anderer, unbekannter Pathogenitätsfaktoren auf das Darmepithel, andererseits ist eine indirekte Epithelschädigung

durch gestörte Mikrozirkulation, also einer Affektion des Gefäßendothels, an der Entwicklung einer HC beteiligt (33, 34).

Aus diesem Endothelschaden der kleinen Arteriolen und Kapillaren resultiert eine lokale intravasale Koagulation und verstärkte Leukozytenadhäsion mit einer Zunahme der Produktion von vasoaktiven und proinflammatorischen Substanzen (IL-1,-6,-8, TNF). Die Folge sind letztlich ischämische Intestinalschäden durch Thrombenbildung, Vaskulitis und Hämorrhagie mit dem Zusammenbruch der Blut-Gewebe-Barriere, was bakteriellen Toxinen und anderen bislang unbekanntem Faktoren den Zugang zum Gefäßsystem eröffnet (34). Die kompletten bakteriellen Organismen gelangen nicht in die Blutbahn, es besteht also keine Bakteriämie.

Das HUS ist durch ein plötzliches Auftreten von mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, akutem Nierenversagen und Thrombozytopenie definiert (39). Diese klinische Trias tritt etwa eine Woche nach dem Beginn des Durchfalls auf. Pathogenetisch nimmt die Schädigung des Endothels die entscheidende Rolle ein (58).

2.3.4. Die Rolle des Endothels bei Entstehung der thrombotischen Mikroangiopathie (TMA)

Der zentrale pathogenetische Vorgang des HUS ist die Schädigung des Gefäßendothels, die zur thrombotischen Mikroangiopathie, hervorgerufen durch bakterielle Produkte und körpereigene Effektorsysteme, führt (Abbildung 3) (16, 34, 39, 49).

Durch ein chemotaktisches Anlocken, eine erhöhte Adhärenz und eine Aktivierung der PMNs kommt es zur vermehrten Zytokinfreisetzung und der Bildung von NO. Dieser immunologische Vorgang ist bei der intestinalen Affektion durch EHEC für die immense Entzündungsreaktion verantwortlich (9, 34). Der endotheliale Schaden führt zu einer Schwellung der Endothelzelle, was zu einer Einengung des Lumens der terminalen Gefäße und somit zu einer Deformierung von Erythrozyten (Fragmentozyten) und deren vorzeitiger Elimination in der Milz führt (74). Diese durch den erhöhten „shear stress“-bedingte Verminderung der Erythrozytenzahl imponiert klinisch als mikroangiopathische hämolytische Anämie, einem Bestandteil der HUS-Trias. Die von den geschädigten Endothelien abgegebenen Zytokine (Prostazyklin, Thromboxan) und andere Mediatoren (IL-1, -8, TNF und PAF) treiben durch Aktivierung der PMNs und der Thrombozyten die Ausprägung der thrombotischen Mikroangiopathie immer weiter voran (34). Die Blutspiegel von IL-6 und TNF korrelieren mit der Aktivität, der IL-8 Spiegel mit dem tödlichen Verlauf des HUS (30).

Durch die Wirkung der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren verlieren die Endothelzellen ihre antithrombotischen und antikoagulatorischen Eigenschaften, was zu einer Störung des prokoagulatorisch-fibrinolytischen Gleichgewichts zu Gunsten einer Thrombusbildung führt (39). Die Endothelzellschädigung ist die Quelle der im HUS erhöhten Spiegel von Gerinnungsfaktoren (von-Willebrand-Faktor (vWF), Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) und Gewebepasminogenaktivator (t-PA)) (38, 39). Die intravasale Thrombusbildung hängt kausal mit den zur Trias des HUS gehörenden Thrombozytopenie und dem Nierenversagen zusammen. Die Störung der glomerulären Funktion der Niere ist Folge eines anoxischen Gewebes Schadens. Ein Ungleichgewicht der vasoaktiven Mediatoren Prostazyklin, Thromboxan und die vermehrte Synthese von Endothelin durch geschädigte renale Endothel-, aber auch Epithelzellen kann durch Vasokonstriktion zusätzlich zur Thrombosierung der intrarenalen Gefäße die Schädigung der Nieren im HUS noch verschlimmern (34, 39).

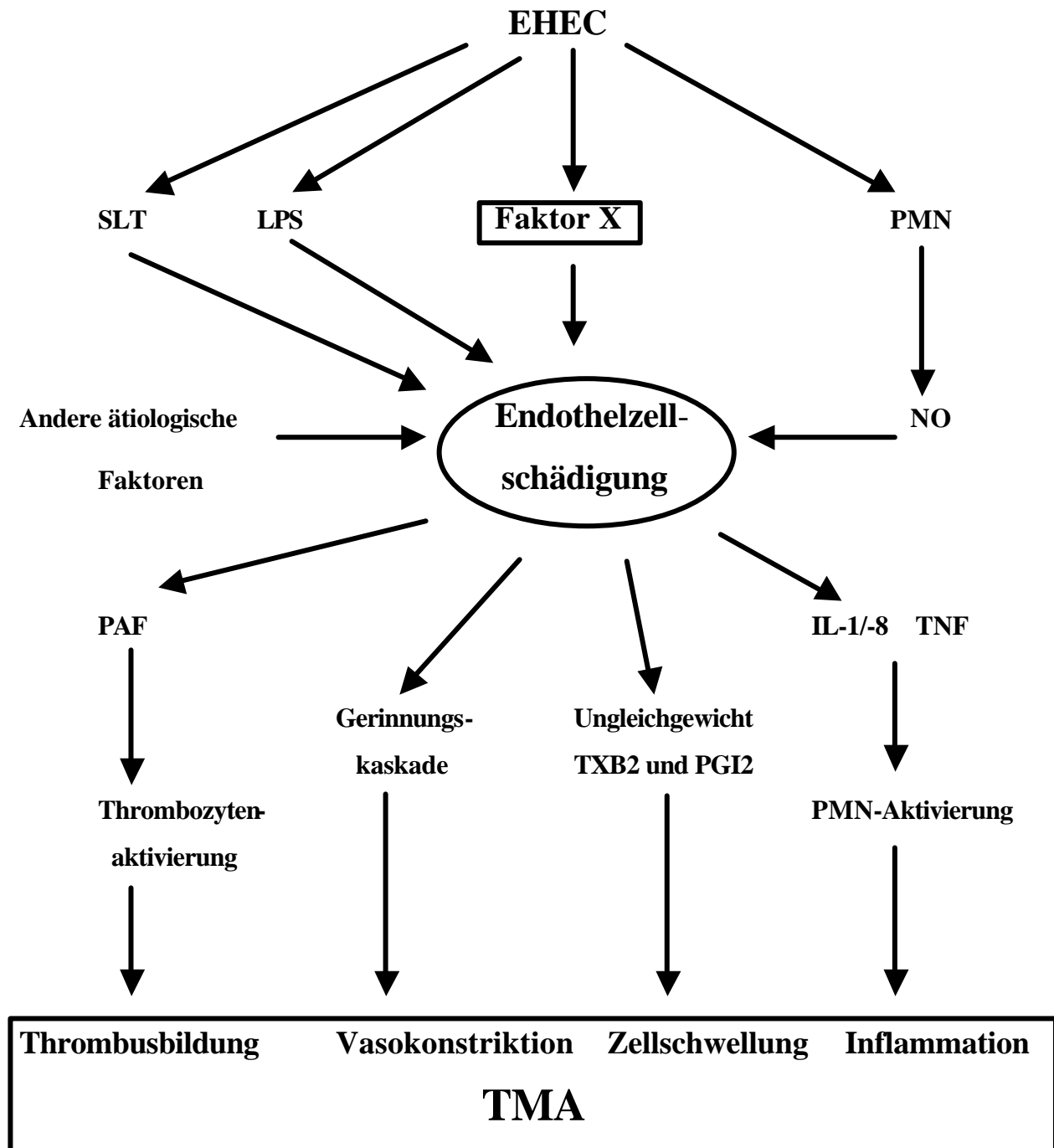


Abbildung 3: Mechanismus der Pathogenese der thrombotischen Mikroangiopathie (TMA).

Der zentrale pathogenetische Vorgang des HUS ist die Schädigung des Gefäßendothels, die zur thrombotischen Mikroangiopathie, hervorgerufen durch bakterielle Produkte und körpereigene Effektorsysteme, führt. Abkürzungen in der Abbildung: LPS, Lipopolysaccharid; PAF, Plättchenaktivierender Faktor; IL-1,-8, Interleukin-1,-8; TNF, Tumor Nekrose Faktor; andere ätiologische Faktoren sind z.B. Medikamente (z.B. Cyclosporin A), Vaskulitis, Ganzkörperbestrahlung, und andere noch nicht identifizierte bakterielle Faktoren.

Somit steht das Organ Endothel im Zentrum eines sich selbst beschleunigenden Teufelskreises.

Viele Fragen zur Pathogenese der EHEC-Erkrankungen, beispielsweise die prominente Beteiligung der Nieren oder die Ursache der dramatischen Hämolyse, sind noch unerforscht.

2.4. Fragestellung

Seit der Erstbeschreibung durch *Karmali* 1985 wurden umfassende Erkenntnisse hinsichtlich der EHEC-Pathogenitätsfaktoren und der pathogenetischen Vorgänge bei der HC und dem HUS gewonnen. Allerdings gibt es noch etliche Lücken im Verständnis der pathogenetischen Prozesse. Eine zentrale Rolle spielt jedoch die Interaktion zwischen den Bakterien und dem Endothel, dessen Schädigung der maßgebliche Vorgang bei der Entwicklung des HUS ist.

Hier greifen die Überlegungen und Fragestellungen dieser Doktorarbeit an:

Sind vielleicht noch andere bislang unbekannte bakterielle Faktoren bei der Entstehung der endothelialen Schäden bei der intestinalen EHEC-Infektion und bei der Entwicklung des HUS beteiligt?

Die grundlegende Frage dieser Arbeit untersucht den Effekt von Agentien aus EHEC-Kulturüberständen auf das Signaltransduktionsverhalten und die Synthese und Freisetzung inflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren in bzw. aus humanen Endothelzellen. Da die Schädigung von Endothelzellen im Mittelpunkt des pathogenetischen Modells der EHEC-Infektionen steht, wurden für die Versuchsreihen humane umbilikalvenöse Endothelzellen (HUVEC) ausgewählt. Die EHEC-Kulturüberstände und nicht die bakteriellen Gesamtorganismen wurden in den Experimenten eingesetzt, da es sich weder bei der HC noch beim HUS um Bakteriämien handelt. Beides sind Krankheitsbilder, die durch sezernierte bakterielle Pathogenitätsfaktoren und eine massive körpereigene Reaktion entstehen. Zum Vergleich zu den EHEC-Kulturüberständen werden die Kulturüberstände apathogener *Escherichia Coli* Stämme eingesetzt.

Weiterhin wird versucht, den stofflichen Charakter des von den EHEC sezernierten Endothelzellstimulans genauer zu definieren und bekannte EHEC-Pathogenitätsfaktoren auszuschließen. Hierzu werden physikalische, chemische, enzymatische und pharmakologische Maßnahmen bzw. Methoden angewendet, um so ein besseres Bild von den Eigenschaften der verantwortlichen Substanz zu erhalten.

Ziel der gesamten Forschungsbemühungen sollte die Entdeckung einer effektiven Therapie zur erfolgreichen Behandlung der EHEC-Infektionen und des potentiell tödlich verlaufenden HUS sein. Vorstellbar wären prophylaktischen Maßnahmen sowie immunologische und antibiotischen Therapieansätze.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Sind die Kulturüberstände der EHEC in der Lage, in humanen Endothelzellen eine Signaltransduktion auszulösen? Ist dieser Effekt zeit- und dosisabhängig?
2. Welchen Einfluß haben die EHEC-Überstände auf die Synthese und Freisetzung inflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren in humanen Endothelzellen?
3. Gibt es pharmakologische Ansatzpunkte, die Aktivierung der Endothelzellen durch die EHEC-Überstände zu beeinflussen?
4. Welche Eigenschaften hat die für die Endothelzellaktivierung verantwortliche Substanz in den Überständen der EHEC? Welche bekannten Pathogenitätsfaktoren können ausgeschlossen werden?
5. Wie läßt sich dieses neue EHEC-Endothelzellstimulans in das bekannte pathogenetische Modell der EHEC-Infektionen einordnen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- Antibiotika (Penicillin G, Streptomycin) lyophilisiert, steril, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Aqua tridestillata – im Milli Q Wasseraufbereitungssystem, Millipore (Eschborn, Deutschland) entionisiert und gefiltert
- Cell-scraper, steril, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Collagenase (CLS Typ II, 180U/mg), Worthington Biochemical Corporation (Freehold, N.J.), 25mg mit 100ml HBS cum Ca/Mg gelöst (Aktivität: 45U/ml), steril filtriert
- D-[+]-Glukose, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Dreiwegehahn, Braun (Melsungen, Deutschland)
- Endothelzellwachstumsfaktor (RDGF), eigene Herstellung aus Rinderretinae
- Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat, Merck (Darmstadt)
- Falcon Röhrchen, konisch, Polypropylen 50/15ml, Becton Dickinson (Meyland, U.S.A)
- FCS, fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C, steril filtriert, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Filter 0,22µm als Spritzenaufsatz, Mepore (Deutschland)
- Filter (0,2µm), Nalgene (Hereford, U.K.)
- Fungizone (Amphoterecin B), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Gelatine, Sigma (Deisenhofen, Deutschland), in aqua destillata gelöst, steril filtriert, Beschichtung der Zellkulturplatten für drei Stunden mit einer Endkonzentration von 0,2% bei Raumtemperatur
- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS cum Ca/Mg, Phenolrot frei) (10x) 100ml, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Hanks/HEPES cum Ca/Mg-Puffer (1l): 100ml HBSS (10x), +900ml aqua destillata, +6g HEPES (= 25mM), +1n NaOH ad pH 7,4
- HEPES Buffered Saline (HBS 1x): 950ml aqua destillata, +NaCl 8g, +KCl 0,3g, +HEPES 2,38g, +Glukose 2g, +aqua destillata ad 1000ml, +1n NaOH ad pH 7,4, steril filtriert (0,2µm)

- HEPES Buffered Saline (HBS 1x) cum Ca/Mg: wie oben, +0,22g CaCl₂ (1,5mM), +0,01g MgCl₂ (0,5mM)
- HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; MW 238,3; pKa 7,5 bei 25°C, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Immunglobulin, Anti-Human vWF IgG der Maus, Dako (Glostrup, Dänemark)
- Immunglobulin, Fluoreszein (FITC)-markiertes Anti-Maus IgM vom Kaninchen, Dianova (Hamburg, Deutschland)
- Kabelbinder, BTF (Gießen, Deutschland)
- Knopfkanülen (Sonderanfertigung für die Endothelzellpräparation), Fischer (Frankfurt, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Multiwells, Costar (Bodenheim, Deutschland), 12-well-Platten: 12 x 4cm² (ca. 300.000 Zellen/well)
- Objektträger aus Polysterene mit je 8 Kammern für die Immunhistologie, Nunc, (Bieberich, Deutschland)
- Pasteur capillary Pipettes, WU (Mainz, Deutschland)
- Pipetten/-spitzen Eppendorf, verschiedene Volumina, Fischer (Frankfurt, Deutschland)
- Pipetten 5ml, 10ml, 25ml, Greiner (Frickenhäuser, Deutschland)
- Natrium Pyruvate, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Szintillationsflaschen mit Verschluss, 20ml
- Tris ultrapure (NH₂C(CH₂OH)₃), United States Biochemical (Cleveland, USA)
- Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Waymouth Medium, Boehringer (Ingelheim, Deutschland), Vollansatz für HUVEC-Zellkultur (500ml): 375ml Medium 199 Inositol-arm, +100ml FCS (10%), +5ml Natrium Pyruvate (1mM), +5ml L-Glutamin (2mM), +5ml RDGF-Konzentrat, +2,5ml Streptomycin (500µg), +2,5ml Penicillin (500IE), +5ml Fungizone (Amphotericin B)
- Zellkulturflaschen T-25 (25cm²), Nunc (Bieberich, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, Greiner (Nürtingen, Deutschland)

3.2. Pharmaka und Agenzien

- Ameisensäure, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Ammoniaklösung suprapur, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- A 23187 (Calciumionophor), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Borax (Phosphoglycerolinositol), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Chloroform (CHCl₃) destilliert in Glas, UV-cutoff 203nm, geeignet für HPLC, Fluka AG (Bern, Schweiz)
- Diethylether (C₂H₅-O-C₂H₅) destilliert in Glas, pro analysi, Merck (Darmstadt)
- D-myo-(2-³H) Inositol, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- D-myo-(2-³H) Inositol-1-Phosphat, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- D-myo-(2-³H) Inositol-1,4,-Biphosphat, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- D-myo-(2-³H) Inositol-1,4,5,-Triphosphat, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- Dowex (Ionenaustauscherharz), Korngröße 100-200, Gegenion: Chlorid, Serva (Heidelberg, Deutschland)
- Ethanol pro analysi, J. T. Baker Chemicals (Deventer, Holland)
- Glaswolle, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Histamin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Lithiumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (CH₂OH) destilliert in Glas, UV-cutoff 203nm, geeignet für HPLC, Burdick & Jackson Lab. Inc.; Vertrieb durch Fluka AG (Bern, Schweiz)
- Myo-Inositol, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumacetat, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Proteinase k von Tritirachium album, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Pyrilamin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Thrombin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Trichloressigsäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Szintillatorflüssigkeit Quicksafe A, Zinsser Analytik (Frankfurt, Deutschland)
- Szintillatorflüssigkeit Rotiszint eco plus, Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.3. Geräte

- Biofuge A, Heraeus (Hanau, Deutschland)
- CO₂-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Chromatographie-Säule (25 x 0,46cm), biorad (Deutschland)
- ELISA-Reader, SLT Labinstruments (Crailsheim, Deutschland)
- Liquidszintillationscounter, Philips (Hamburg, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Pipetus, Hirschmann, Fischer (Frankfurt, Deutschland)
- Photometer (Modell Uvicon 860), Kantron Instruments (Schweiz)
- Schüttelgerät Heidolph Reax 2000, MAGV (Rabenau-Londorf, Deutschland)
- Steriler Arbeitsplatz (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Tischzentrifuge Biofuge 13, Haraeus Sepatech, MAGV (Rabenau-Londorf, Deutschland)
- Waage, Mettler Toledo (Schweiz)
- Wägezelle, Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen, Deutschland)
- Wasserbad Thermomix ME, Braun (Melsungen, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

3.4. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

3.4.1. Isolation der Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen

Die Isolierung der Endothelzellen erfolgt aus den Nabelschnüren Neugeborener. Die Nabelschnüre werden direkt nach der Abnabelung in sterile Becher gegeben und bei 4°C für maximal 48 Stunden aufbewahrt. Um eine Kontamination bei der Isolation der Zellen zu vermeiden, werden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt. Nach Säuberung der Schnüre mit einer sterilen Kompresse wird eine Knopfkanüle vorsichtig in die Vena umbilicalis eingeführt und mit einem Kabelbinder fixiert. Die Vene wird mit 2x50ml HEPES Buffered Saline gespült, das distale Ende mit einer Klemme abgeklemmt und das gesamte Lumen anschließend mit ca. 20ml 37°C warmer, steril filtrierter Collagenase-Lösung (Aktivität: 45U/ml HBS) gefüllt. Auf die Knopfkanüle wird ein Dreiwegehahn aufgesetzt und somit verschlossen. Die Nabelschnur wird daraufhin für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wird die Nabelschnur kräftig massiert, um weitere Endothelzellen abzulösen. Zur Inaktivierung der enzymatischen Aktivität werden die abgelösten Zellen in ein 50ml Falcon Zentrifugenröhrchen mit 1ml FCS abgelassen. Durch kräftiges Spülen mit ca. 30ml HEPES Buffered Saline werden weitere Zellen gelöst und das Falcon Röhrchen auf 50ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wird bei Raumtemperatur für fünf Minuten mit 250g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 5ml HUVEC-Medium (Vollansatz) resuspendiert (3).

Die Primärkultur wird in eine mit Gelatine vorbehandelte T-25-Zellkulturflasche pipettiert und die bepflanzten Flaschen bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Raumluft in einem Inkubator begast. Bereits nach wenigen Stunden ist es möglich, unter dem Mikroskop die rosettenförmige Zusammenlagerung von Zellen ("Zellnester") zu beobachten. Von diesen Zellen als Kristallisationspunkt geht das Wachstum radiär aus bis zur vollständigen Bedeckung des Bodens der Zellkulturflasche mit Endothelzellen. Die Ausbildung eines konfluenten Monolayers dauert etwa 48 Stunden.

3.4.2. "Splitten" der Endothelzellen

Nachdem sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hat, können die Zellen subkultiviert werden. Dazu wird das Medium aus der T-25-Flasche abgesaugt und die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium (37°C) gewaschen. Anschließend wird mit 4ml auf 37°C erwärmter Trypsin-EDTA-Lösung solange inkubiert, bis sich der Endothelzellmonolayer vom Boden der Kulturflasche gelöst hat (ca. 30 Sekunden). Dieser Vorgang wird unter dem Mikroskop kontrolliert und kann durch leichtes Klopfen des Gefäßes unterstützt werden. Die in der Trypsin-EDTA-Lösung schwimmenden Zellen werden in einer Pipette aufgenommen und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, das zuvor mit 1ml FCS zur Inaktivierung des Trypsins vorbereitet wird. Durch mehrmaliges Spülen der T-25-Flasche werden alle Zellen abgelöst. Das Zentrifugenröhrchen wird bei 250g fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in HUVEC-Medium resuspendiert und die Zellen einer T25-Flasche auf drei 6- oder 12-Multiwell-Platten gleichmäßig ausgesät. Die Zellen werden nach Bildung eines vollständigen Zellrasens in den Versuchen eingesetzt. Erfahrungsgemäß dauert dies ca. zwei Tage.

3.4.3. Identifizierung und Charakterisierung der Endothelzellen

Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgt nach morphologischen und immunhistochemischen Kriterien. Hierbei ist essentiell, die Endothelzellen von glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu unterscheiden. Während die Endothelzellen unter dem Phasenkontrastmikroskop einschichtig in Form eines kopfsteinpflasterartig angeordneten Reliefs mit polygonalen Zellen und einem mittelständigem Zellkern wachsen, erkennt man Fibroblasten und glatte Muskelzellen an ihren mehrschichtigen Zelllagen und ihren parallel angeordneten spindelförmigen Zellen. Fibroblasten zeichnen sich weiter durch ihre vergleichsweise langen und dünnen Zellfortsätze aus, die insbesondere in der Wachstumsphase der Zellen deutlich zu sehen sind.

Immunhistologisch wird die Identifizierung der Endothelzellen durch den Nachweis des von Willebrand Faktors auf der Zelloberfläche durchgeführt. Dazu werden sterile Objektträger aus Polyesterene mit Endothelzellen bepflanzt. Nach zwei Tagen wird der Zellmonolayer dreimal mit HH^{+/+} gewaschen und die Zellen mit MeOH/Aceton (1:1) für fünf Minuten permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit HH^{+/+} wird mit 10 μ g eines ersten Antikörpers gegen humanen von Willebrand Faktor (IgG der Maus) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Überschüssige, nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Spülen entfernt und 10 μ g eines mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Antikörpers gegen Maus-IgG (Kaninchen-IgM) für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Erneut werden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen entfernt und die Zellen auf dem Glasträger mit Dako-Eindeckmedium beschichtet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich die FITC-markierten Endothelzellen leicht identifizieren und von den Fibroblasten und glatten Muskelzellen unterscheiden (17).

3.5. In den Experimenten eingesetzte Bakterienstämme

3.5.1. Herkunft der verwendeten Bakterienstämme

Alle in den nachfolgenden Versuchen eingesetzte Bakterienstämme wurden uns freundlicherweise von Prof. T. Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

- apathogener Escherichia coli-Stamm 470
- Escherichia coli-Stamm **413/89-1** (SLTEC), isoliert aus Stuhlproben von Kälbern (Serogruppe/-typ O26/H-)
- EDL 933 humanpathogener EHEC-Stamm (O157:H7)
- E2346/69 humanpathogener EPEC-Stamm (O127:H6)

3.5.2. Kulturmedien und Materialien

- Sterilfilterspritzenaufsatz Millex-GP 0,22µm, Millipore (Bedford, USA)
- sterile Einmalspritzen, verschiedene Größen, Braun (Melsungen, Deutschland)
- Cryovials, Nalge Company (Rochester, USA)
- Enterohämolysin Agar mit Blut-Platten, OXOID, bezogen über Unipath GmbH (Wesel, Deutschland)
- Glycerin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Proteinase k, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Terrific Broth (Tartof and Hobbs, 1987): 12g Tryptone, 24g Yeast-extract, 4ml Glycerol ad 900ml deionisiertem H₂O, dazu 100ml einer Lösung aus 0,17M KH₂PO₄ und 0,72M K₂HPO₄ in deionisiertem H₂O hinzufügen. Beide Lösungen zuvor autoklavieren und vor dem Zusammenfügen auf unter 60°C erkalten lassen.
- Centriprep, Molecular weight cut-off 3000Da, Amicon (Witten, Deutschland)
- Makrosep Molekularfilter <4000Da, Millipore (Bedford, USA)

3.5.3. Wachstumsbedingungen und Gewinnung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände

Die in den Versuchen eingesetzten Bakterien werden in 25ml Terrific Broth (TB-Medium) in 50ml Falcon Röhrchen als Übernachtskulturen stehend in einem 37°C warmen Wasserbad angesetzt.

Pro Ansatz wird eine Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes mit einer ausgeglühten Öse von der Enterohämolysin-Agar-Platte abgetragen und in die mit 25ml TB-Medium gefüllten Röhrchen gegeben. (Dauerkulturen der verschiedenen Stämme werden als Glycerinkulturen in Cryovials bei -70°C aufbewahrt.)

Nach 15-17 Stunden im Wasserbad werden die in der 50ml Röhren angesetzten Kulturen zehn Minuten bei 1300g zentrifugiert, der Überstand mit einer sterilen Spritze aspiriert und durch einen 0,22µm Sterilfilterspritzenaufsatz in ein steriles Röhren filtriert.

3.6. Weiterführende Behandlung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände zur Charakterisierung des neuen Endothelzellstimulans

3.6.1. Ultrafiltration der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände zur Trennung bei 3000Da Molekulargewicht

Nach der Filtration durch den 0,22µm Sterilfilterspritzenaufsatz werden ca. 15ml Überstand in die äußere Kammer eines *unicon* Molekularfiltrators pipettiert und bei 3000g für 30 Minuten zentrifugiert, dadurch wird etwa die Hälfte des eingesetzten Überstandes durch die Filtermembran in die innere Kammer gepreßt und so eine Trennung bei 3000Da erreicht.

3.6.2. Hitzebehandlung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände bei 56°C

Um die Frage einer Hitzestabilität der gesuchten endothelstimulierenden Substanz in den sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände zu beantworten, wurden sie in 15ml Falcon-Röhren für 30 beziehungsweise 60 Minuten in einem 56°C warmen Wasserbad inkubiert.

3.6.3. Auftrennung der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände mittels der von *Bligh* und *Dyer* beschriebenen Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgt in enger Anlehnung an die Methode von E. G. Bligh *und* W. J. Dyer (7), bei der eine optimale Lipidextraktion durch Mischung der Proben mit Chloroform und Methanol erreicht wurde. Die sterilfiltrierten Bakterienüberstände werden wie folgt aufgearbeitet: Pro 1ml Bakterienüberstand wird 2,5ml Methanol in Schliffgläser zugesetzt und wie auch bei den folgenden Schritten gleichmäßig eine Minute gerüttelt. Darauf folgend zweimal je 750µl Chloroform und 750µl Natrium-Acetat (0,1mM) zugesetzt. Der wäßrige Überstand wird von der organischen Phase getrennt und gleichmäßig in neue Gefäße

überführt. Anschließend folgen drei Waschschriffe mit Zugabe von jeweils 1ml Methanol: Natriumacetat (0,1mM) im Verhältnis 10:9, bevor die untere Chloroform-Phase zu gleichen Teilen in Eppendorfgefäße überführt und unter Stickstoff eingengt wird. So ist es möglich die wäßrigen und organischen Teile der Bakterienüberstände separat zur Stimulation der Endothelzellen einzusetzen.

3.6.4. Inkubation der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände mit dem proteolytischen Enzym Proteinase k

Die Stabilität der von den Bakterien in den Überstand sezernierten Substanzen gegenüber einem proteolytischen Enzym, wird durch eine Inkubation der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände mit 1µg/ml Proteinase k für 15, 30 und 60 Minuten in sterilen Röhren bei 37°C im Inkubator überprüft. Die so behandelten Überstände werden im Versuch eingesetzt.

3.7. Messung der Inositolphosphate

Die Quantifizierung der verschiedenen Inositolphosphate erfolgt nach einer von *Berridge* beschriebenen Methode (8). Aus ³[H]-Inositol-vormarkierten Membran-Inositiden (24-stündige Präinkubationsperiode mit 10µCi ³[H]-Inositol/well in HUVEC-Medium) kann die Aktivierung inflammatorischer Signaltransduktionsmechanismen über die Phospholipase C-induzierte Entstehung der Inositolphosphate (InsP₃, InsP₂ und InsP₁) bestimmt werden. Das InsP₃ wird hierbei durch Phosphatasereaktionen sequentiell bis zum Inositol dephosphoryliert (10). Um eine Akkumulation der freigesetzten Inositolphosphate in der Zelle zu erreichen, wird das letzte Enzym dieser Sequenz, die InsP₁-Phosphatase, durch Li⁺-Ionen gehemmt (8, 59).

3.7.1. Versuchsablauf und Extraktion der Inositolphosphate

Nach der Präinkubationsperiode zum Einbau des radioaktiv-markierten Inositols in die Zellmembran werden die Zellen zweimal mit 37°C warmer Hanks/HEPES Lösung gewaschen, um die nicht von den Endothelzellen eingebaute Radioaktivität zu beseitigen.

Zusätzlich wird dem Stimulationsansatz 10mM Lithiumchlorid zugefügt. Die Reaktion wird durch Zugabe von eiskalter Trichloressigsäure im Verhältnis 1:1 zum Probenvolumen gestoppt (Endkonzentration 7,5%) und nach kurzem Schwenken für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wird die Lipidfraktion durch viermaliges Ausschütteln mit 1ml Diethylether pro ml Probenvolumen extrahiert und die nach dem letzten Schritt zurückbleibende wäßrige Phase auf die Chromatographiesäulen gegeben.

3.7.2. Anionenaustauschchromatographie

Selbstgepackte Säulen, gefüllt mit Dowex-Ionenaustauscherharz (Serra, Korngröße: 100-200µm, Gegenion: Cl), werden vor Gebrauch jeweils mit 5ml 1,0M NH₄-Formiat/0,1M Ameisensäure, pH 4,58 und 5ml Bidest konditioniert, um ³[H]-Inositolreste vorangegangener Versuche von der Säule zu entfernen. Weiterhin muß das Harz mit 3ml 5mM Inositollösung zwecks Absättigung unspezifischer Bindungsstellen nach Auftragen der mit Diethylether extrahierten wäßrigen Phase der Proben (2ml/1ml Probenvolumen) behandelt werden. Nach 4ml 60mM Ameisensäure/5mM Na⁺-Tetraborat zur Elution des Glycerophospho-³[H]-Inositol erfolgt die Eluierung der Phosphoinositide mit 4ml 1,0M NH₄-Formiat/0,1M Ameisensäure.

Diese als Bruttoelution bezeichnete Säulenspülung erfaßt die Inositolphosphate InsP₁, InsP₂ und InsP₃, deren Fraktionen gemeinsam, jeweils im Verhältnis 1:5 mit Szintillatorflüssigkeit verdünnt, im β-Counter gemessen wurden.

Die Differentialeluierung von InsP₁, InsP₂ und InsP₃ wird mit dem Ziel einer Überprüfung der Trennleistung einzelner Säulen jeweils parallel zu den Versuchen mit authentischen Standards durchgeführt und erfordert die sequentielle Säulenspülung mit Phasen ansteigender Ionenstärke: IP₁ wird mit 5ml 0,2M NH₄-Formiat/0,1M Ameisensäure (pH 3,81) eluiert, IP₂ wird mit 5ml 0,4M NH₄-Formiat/0,1M Ameisensäure (pH 4,12) und IP₃ wird mit 5ml 1,0M NH₄-Formiat/0,1M Ameisensäure (pH 4,9) eluiert. Ein repräsentatives Elutionsprofil der getrennt aufgefangenen Eluatfraktionen ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

Anionenaustauschchromatographie der Inositolphosphate

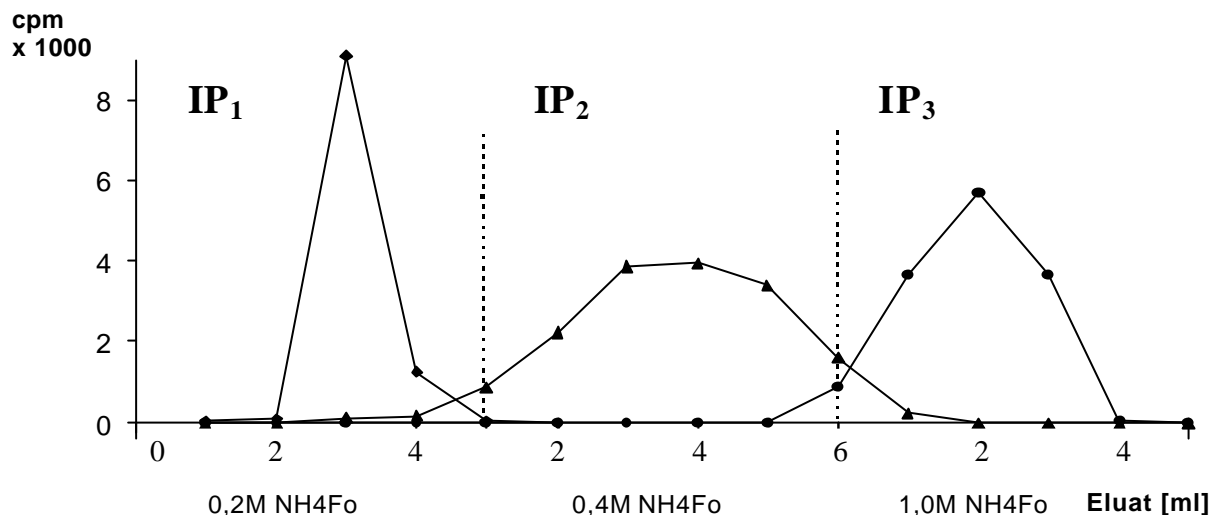


Abbildung 4: Anionenaustauschchromatographie der Inositolphosphate:

Dargestellt ist das Trennprofil eines äquimolaren Cocktails der Inositolphosphatisomere *InsP1*, *InsP2* und *InsP3*, erhalten durch sequentielle Elution mittels ansteigender Ionenstärke: *IP1* wird mit 5ml 0,2M NH_4 -Formiat/0,1M Ameisensäure (pH 3,81), *IP2* mit 5ml 0,4M NH_4 -Formiat/0,1M Ameisensäure (pH 4,12) und *IP3* mit 5ml 1,0M NH_4 -Formiat/0,1M Ameisensäure (pH 4,9) eluiert. Die separat aufgefangenen Eluatfraktionen werden im Verhältnis 1:10 mit Szintillatorflüssigkeit verdünnt und im **b**-Counter gemessen.

3.8. Versuchsabläufe der kommerziellen Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Verwendete ELISA-Systeme:

- Thromboxane B₂ Enzyme Immunoassay Kit, Cat# 519031, Cayman Chemical (Ann Arbor, U.S.A.)
- 6-keto-Prostaglandin F_{1α} Enzyme Immunoassay Kit, Cat# 515211, Cayman Chemical (Ann Arbor, U.S.A.)

3.8.1. Gewinnung der Proben aus HUVEC-Zellkulturüberständen

Endothelzellen in 12er Multiwell Platten werden in 500µl Probenvolumen (Serumfreies Medium, Waymouth) mit bakteriellen Überständen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationsdauer werden die Zellüberstände abgenommen, in auf Eis stehende Eppendorfgefäße pipettiert und in einer Tischzentrifuge bei 13.000rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die so erhaltenen Überstände sind zellfrei. Sie werden in neue Cups überführt und bei -20°C bis zum Einsatz im ELISA gelagert.

3.8.2. Versuchsablauf des 6-keto-Prostaglandin F_{1α} Assay Systems

Die Bestimmung des in den Überstand freigesetzten Prostazyklins wird indirekt mit einem kommerziellen Assay-System durchgeführt. Da Prostazyklin in wäßriger Lösung eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden hat, wird das Hydrolyseprodukt des Prostazyklins, das 6-keto-Prostaglandin F_{1α}, nachgewiesen. Dieser Metabolit ist wesentlich stabiler und kumuliert im Endothelzellüberstand. Die Kreuzreaktivität des Kaninchenantiserums gegen 6-keto-PGF_{1α} gegenüber allen anderen Prostaglandinen lag bei maximal 2,1%. Je nach Ausgangskonzentration werden die Endothelzellüberstände 1:20 oder 1:100 mit serumfreiem Medium (Waymouth) verdünnt, bevor 50µl dieser Verdünnung im Meßansatz zum Einsatz kommen. In die mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Kaninchenantiserum beschichteten Vertiefungen der 96-well Platte wird zu den 50µl Probe 50µl einer Lösung an 6-keto-Prostaglandin F_{1α} gebundener Acetylcholinesterase (Tracer) und 50µl eines 6-keto-Prostaglandin F_{1α} Antiserums vom Kaninchen gegeben.

Freies 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ und 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ gebunden an ein Acetylcholinesterasemolekül konkurrieren um eine begrenzte Anzahl an 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -spezifischen Kaninchenantiserumbindungsstellen. Die Konzentration des Tracers ist konstant, die der Standards und der Proben variieren. Je mehr freies 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ sich in der Probe befindet, desto weniger Tracer kann am Kaninchenantiserum gebunden werden, welches seinerseits an der monoklonalen Mausantikörpern am Boden der Platte bindet. Folglich ist die Intensität der später stattfindenden enzymatischen Farbreaktion umgekehrt proportional zur 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -Konzentration in den Wells.

Die 96-well Reaktionsplatte wird mit einem Plastikfilm bedeckt und bei 4°C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend werden durch fünf Waschschriffe ungebundene Reagenzien entfernt und Ellman`s Reagenz zugesetzt, welches das Substrat für die Acetylcholinesterase enthält. Die Platte wird für 90-120 Minuten im Dunkeln auf einem horizontalen Schüttler bei Zimmertemperatur entwickelt und bei 412nm Wellenlänge spektrophotometrisch gemessen. Anhand einer Eichkurve, die mit jedem Meßansatz mitlaufen muß, werden die Farbtintensitäten der Probenvertiefungen entsprechenden Mengen von 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ zugeordnet.

3.8.3. Versuchsablauf des Thromboxan B_2 Assay Systems

Der Versuchsablauf dieses ELISA ist identisch mit dem oben beschriebenen 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ Assay System mit dem Unterschied, daß die Acetylcholinesterase an Thromboxan B_2 (Tracer) gebunden ist und das Kaninchenantiserum spezifisch mit Thromboxan B_2 bindet. Außerdem wird die 96-well Reaktionsplatte für 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Entwicklung und Messen der Platte unterscheiden sich nicht vom o.g. Assay.

3.9. Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse

Alle Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) bzw. gepaartem T-Test auf ihre Signifikanz überprüft. In den Diagrammen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

4. ERGEBNISSE

4.1. Übersicht der dargestellten Ergebnisse

Die Schwerpunkte der eingereichten Dissertationsschrift befassen sich mit der Wirkung der Kulturüberstände von EHEC hinsichtlich ihres Einflusses auf das Signaltransduktionsverhalten von HUVEC.

Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen wird ihr Effekt auf die Synthese und Freisetzung inflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren in bzw. aus diesen Zellen untersucht.

Zentraler Bestandteil des letzten Abschnittes ist die stoffliche Charakterisierung des sich im bakteriellen Überstand befindlichen neuen Endothelzellstimulans und seine Abgrenzung gegenüber anderen bekannten sezernierten Pathogenitätsfaktoren der EHEC. Die Identifizierung der Reinsubstanz ist Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist nach folgenden Gesichtspunkten gegliedert:

Im ersten Abschnitt werden die endothelialen Signaltransduktionswege im Rahmen der EHEC-Kulturüberstand-induzierten inflammatorischen Prozesse untersucht. Die Zeit- und Dosisabhängigkeit der endothelstimulatorischen Potenz der EHEC-Überstände wird mit Thrombin, einem rezeptorgekoppelten Induktor der PtdIns-Hydrolyse, sowie dem Überständen apathogener *Escherichia coli* verglichen.

Mit der Darstellung der Sekretionsprofile der vasoaktiven Mediatoren Thromboxan und Prostazyklin wird die inflammatorische Potenz der eingesetzten Kulturüberstände zeitabhängig demonstriert.

Nachfolgend werden die Ergebnisse bezüglich der stofflichen Qualitäten des neuen sezernierten EHEC-Endothelstimulans und damit seine Abgrenzung gegenüber den bekannten Pathogenitätsfaktoren der EHEC aufgeführt. Hierbei findet auch ein Vergleich zwischen den Bakterien und ihren Kulturüberständen hinsichtlich der Wirkung auf den PtdIns-Metabolismus in HUVEC statt.

Der letzte Punkt des Ergebnisteils befaßt sich mit der Hemmbarkeit der EHEC-Kulturüberstand-induzierten endothelialen Stimulation durch Einsatz eines Histamin-1-Rezeptorantagonisten.

4.2. Aktivierung endothelialer Signaltransduktionswege durch sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstand (413/89-1)

4.2.1. Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC durch sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstand (413/89-1) – Zeit- und Dosisabhängigkeit

Die Aktivierung endothelialer Signaltransduktionswege im Rahmen inflammatorischer Prozesse erfolgt über die Aktivierung spezifischer Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Signalübertragung in das Zellinnere wird durch G-Proteine gewährleistet, über die Enzyme aktiviert werden. Hierzu zählt die phosphoinositolspezifische Phospholipase C, die durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat die Bildung der zytoplasmatischen second messenger Diacylglycerol (DAG) und InsP_3 bewirkt. Während InsP_3 einen raschen Ca^{2+} -Anstieg durch Bindung an ein Rezeptorprotein auf der zytoplasmatischen Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums verursacht, besitzt DAG zwei mögliche Signalfunktionen. Einerseits kann die durch die DAG-Lipase abgespaltene Arachidonsäure in Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Produkte überführt werden, andererseits kann DAG über die Aktivierung der Proteinkinase C zahlreiche Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in der Zielzelle aktivieren.

Die Quantifizierung der Inositolphosphate wird mittels $^3\text{[H]}$ -Inositol-vormarkierter Membran-Inositide bestimmt. Nach der Präinkubationsperiode werden die markierten Zellen gewaschen und mit den sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberständen stimuliert. Um eine sequentielle Dephosphorylierung des intrazellulär gebildeten InsP_3 zu Inositol zu verhindern, werden dem Versuchsansatz Li^+ -Ionen zugegeben und so die InsP_1 -Phosphatase gehemmt, was zur Akkumulation der Inositolphosphate führt. Zum Abstoppen der Reaktion werden die Ansätze mit eiskalter Trichloressigsäure versetzt und die Lipidfraktionen durch Zugabe von Diethylether extrahiert. Die Fraktion der Inositolphosphate in der wässrigen Phase wird anschließend mit Hilfe der im Methodenteil beschriebenen Anionenaustausch-Chromatographie konzentriert und mit Hilfe eines β -Counter gemessen.

In einigen Vorversuchen hinsichtlich der Wachstumsbedingungen und -zeiten erwies sich ein Wachstumsintervall von 15-18 Stunden stehend in einem 37°C warmen Wasserbad in TB-Medium als optimal. Der auf Endothelzellen beobachtete Effekt war in anderen Medien, bei Schütteln der Bakteriensuspension und Wachstum bis zur steady-state-Phase geringer.

- Dosisabhängigkeit des durch die sterilfiltrierten EHEC-Überstände ausgelösten Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC:

Eine Inkubation von HUVEC mit den sterilfiltrierten Überständen von Übernachtskulturen des EHEC-Stammes 413/89-1 führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der PtdIns-Hydrolyse (Abbildung 4). Ein Stimulationsvolumen von 200µl erwies sich als optimale Dosis bei einer Stimulationsdauer von 30 Minuten bei 1ml Probenvolumen. Geringere Volumina unterscheiden sich nicht signifikant von der basalen, unstimulierten PtdIns-Hydrolyse. Der Einsatz von 300µl Bakterienüberstand im Versuchsansatz erzielte geringere Werte als das durch 200µl Überstand erzielte Maximum. Die endotheliale Aktivierung durch den Überstand des Escherichia coli-Stammes 470 liegt zu allen Zeiten und bezüglich aller eingesetzten Dosierungen nur minimal über den Kontrollwerten (Abbildung 4). Eine Inkubation der HUVEC mit 200µl TB-Medium bewirkt keine über der basalen PtdIns-Hydrolyse liegende Stimulation (in den Abbildungen nicht aufgeführt).

- Zeitabhängigkeit des durch die sterilfiltrierten EHEC-Überstände ausgelösten Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC

In dieser Versuchsreihe wurden die EHEC-Stämme 413/89-1 und EHEC EDL 933 sowie der EPEC-Stamm E2346 zur Stimulation der HUVEC eingesetzt.

Ein Vergleich der Zeitabhängigkeit der HUVEC-Aktivierung durch die Kulturüberstände der verschieden Escherichia-coli Stämme zeigt, daß der Überstand des EPEC-Stammes keine über dem basalen Niveau liegende PtdIns-Hydrolyse bewirken kann. Der Überstand des Stammes 413/89-1 erreichte nach einer Inkubationsdauer zwischen 30 und 60 Minuten eine maximale Endothelzellaktivierung, die im weiteren Verlauf abnimmt (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu kommt es bei der Stimulation mit dem Überstand des EHEC-Stammes EDL933 erst bei langen Inkubationszeiten zu einem Anstieg der Inositolphosphate.

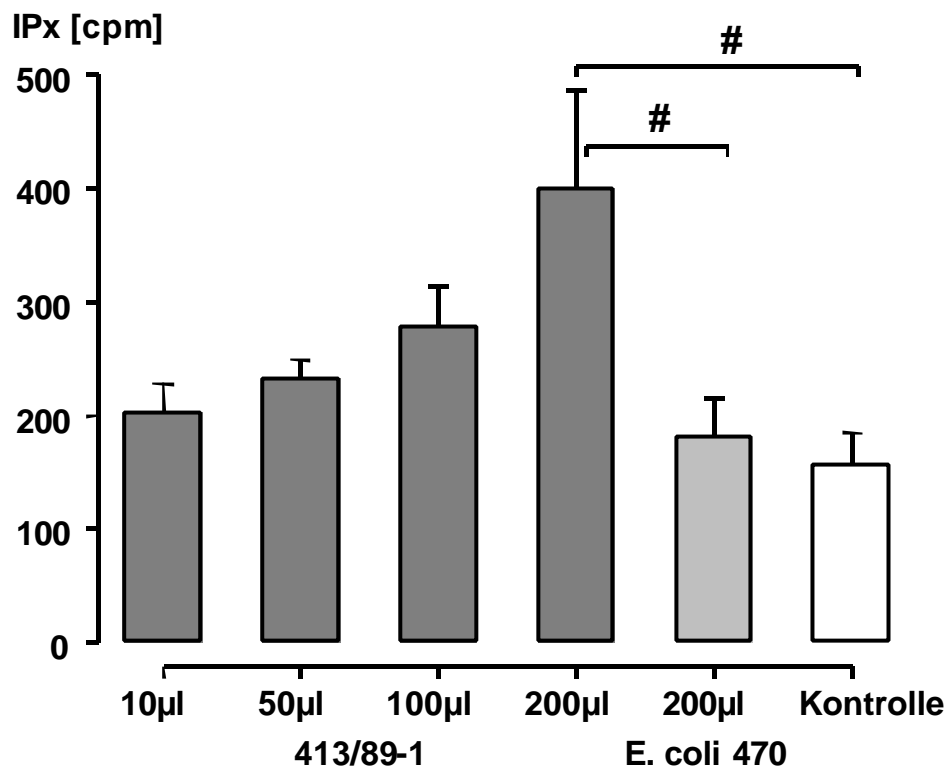


Abbildung 4: Gegenüberstellung der Überstand-bedingten PtdIns-Hydrolyse durch Inkubation mit den Stämmen 413/89-1 und 470 – Dosisabhängige Akkumulation von Inositolphosphaten.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden mit verschiedenen Volumina der sterilfiltrierten Kulturüberstände des EHEC-Stammes 413/89-1 inkubiert, als Vergleich wird der sterilfiltrierte Überstand des apathogenen Escherichia coli-Stammes 470 eingesetzt. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefaßt. # unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Daten \pm SEM stammen aus zehn unabhängigen Experimenten.

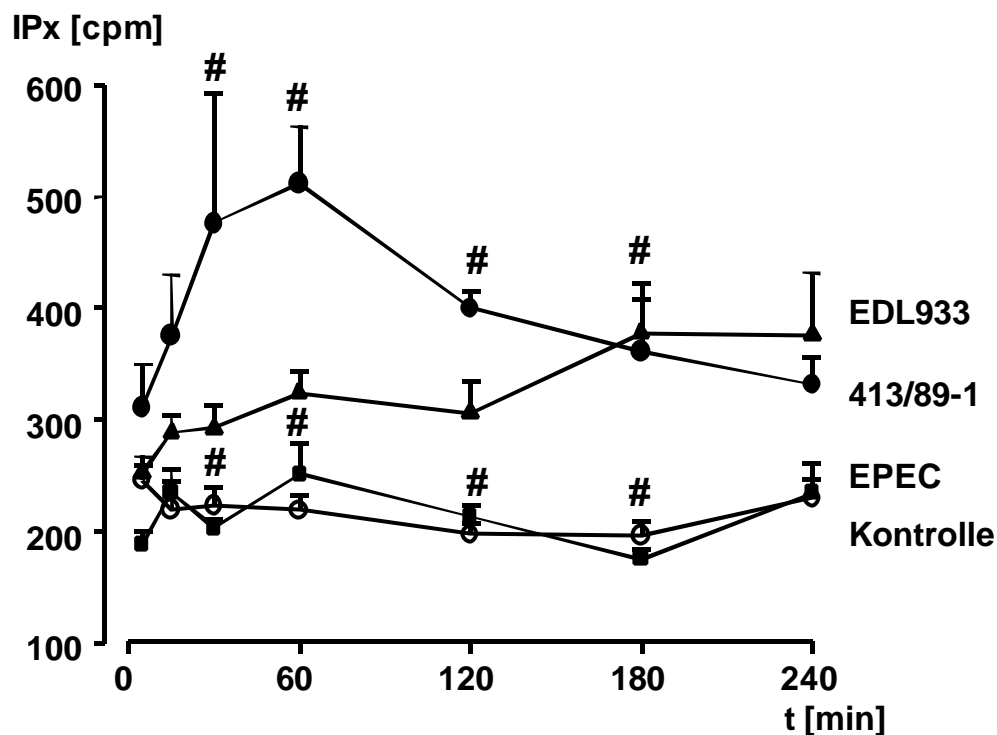


Abbildung 5: Gegenüberstellung der durch die Kulturüberstände verschiedener Escherichia coli-Stämme bewirkte PtdIns-Hydrolyse – Zeitabhängige Akkumulation von Inositolphosphaten innerhalb von 240 Minuten.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden mit den sterilfiltrierten Kulturüberständen der EHEC-Stämme 413/89-1 und EDL 933 inkubiert. Parallel dazu werden die HUVEC mit den Kulturüberständen des EPEC E2346 inkubiert. Kontrolle steht für die basale, ohne Stimulation stattfindende PtdIns-Hydrolyse. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefasst. Die mit # markierten Werte unterscheiden sich signifikant zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Daten \pm SEM stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

4.2.2. Freisetzung vasoaktiver Mediatoren aus HUVEC durch Inkubation mit sterilfiltriertem EHEC-Kulturüberstand (413/89-1) – Prostacyclin und Thromboxan

- Durch sterilfiltrierte EHEC-Kulturüberstände (413/89-1) bedingte endotheliale Freisetzung von Prostazyklin (PGI_2)

Prostazyklin spielt als Arachidonsäuremetabolit eine wichtige Rolle bei der Relaxation der Bronchien und der Regulation des Gefäßtonus. Eine überschießende entkoppelte Freisetzung von Prostazyklin kann ursächlich an einer massiven systemischen Vasodilatation und schwerem Schock beteiligt sein.

Da es sich bei Prostazyklin um einen sehr kurzlebigen Mediator handelt, wird dessen Freisetzung durch das Messen seines Abbauproduktes 6-keto-Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ nachgewiesen. Dieser Metabolit ist wesentlich stabiler als Prostazyklin und kumuliert im Endothelzell-Kulturüberstand. Die verdünnten Endothelzellüberstände werden neben einer authentischen Standardreihe in einem kommerziellen 6-keto-Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ ELISA-System eingesetzt.

Die Stimulation der HUVEC mit den sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberständen führt zu einer gesteigerten Sekretion von Prostazyklin in die Endothelzellkulturüberstände, wobei sich ein Stimulationsvolumen von 100 μl Überstand auf 500 μl Probenvolumen in Vorversuchen als optimal erwies.

Der EHEC 413/89-1 bewirkt im Gegensatz zum apathogenen Stamm 470 eine fast doppelt über der basalen Sekretion liegende Prostazyklin (PGI_2)-Freisetzung (Abbildung 6). Das als Maximalstimulus eingesetzte Calcium-Ionophore A23187 erzielte eine weitaus höhere Menge an abgegebenem Prostazyklin (57900pg/ml; SEM 11600pg/ml).

Betrachtet man die durch den Einsatz des EHEC 413/89-1 Überstandes erhaltene Kinetik der PGI_2 -Liberierung, so zeigt sich ein Maximum der PGI_2 -Sekretion innerhalb von 30 Minuten (Abbildung 7), das während des gemessenen Zeitraumes bis 60 Minuten plateauartig konstant bleibt und bei längeren Inkubationszeiten der Endothelzellen wieder abfällt.

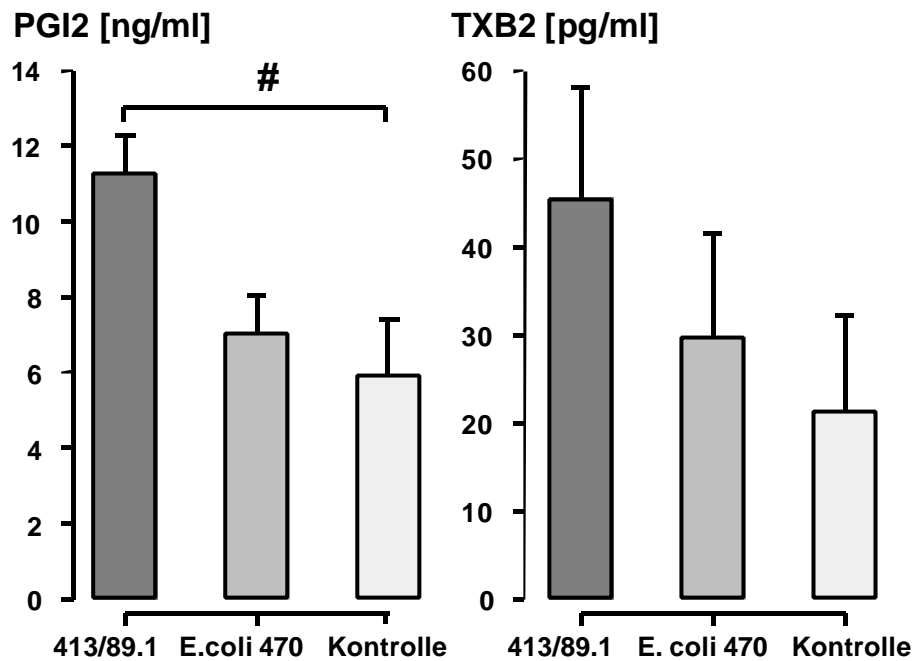


Abbildung 6: Freisetzung von PGI_2 bzw TXA_2 aus HUVEC innerhalb von 60 Minuten, Gegenüberstellung der Sekretion durch die sterilfiltrierten Kulturüberstände der *Escherichia coli* Stämme 413/89-1 und 470.

HUVEC werden mit 100 μ l der sterilfiltrierten Kulturüberstände der *Escherichia coli*-Stämme 413/89-1 und 470 für eine Stunde inkubiert. Der Kontrollwert entspricht der unstimulierten, basalen Sekretion von PGI_2 bzw TXA aus humanen umbilikalvenösen Endothelzellen unter den Versuchsbedingungen. # unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Daten \pm SEM stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

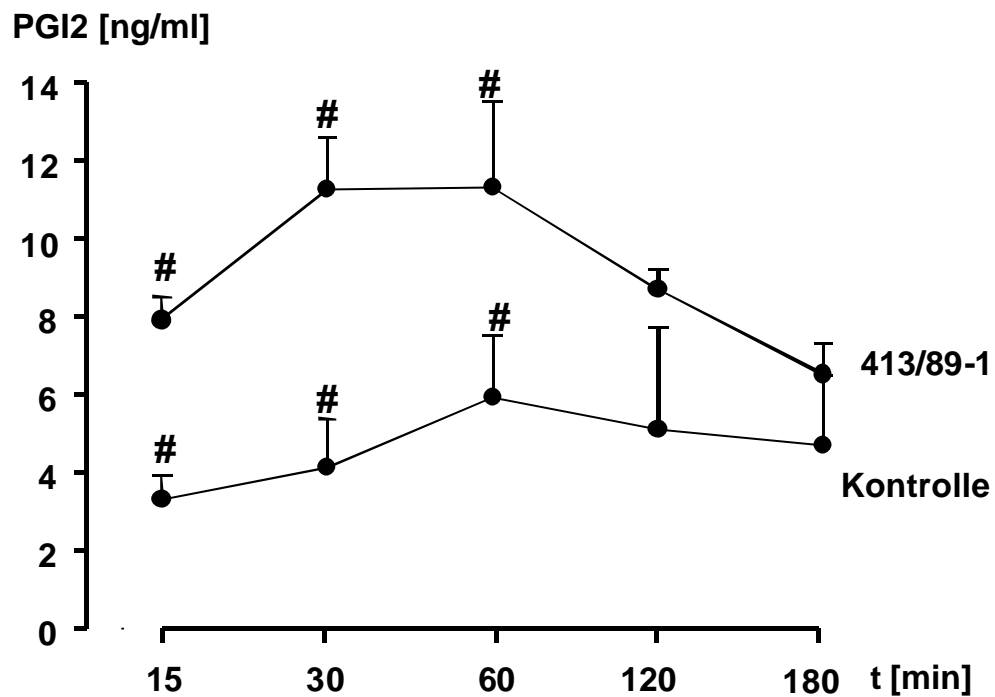


Abbildung 7: Zeitabhängige Freisetzung von PGI₂ aus HUVEC bei Koinkubation mit sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberständen.

HUVEC werden mit 100µl der sterilfiltrierten Kulturüberstände des *Escherichia coli*-Stammes 413/89-1 für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Die mit # markierten Werte unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Daten ± SEM stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

- Endotheliale Freisetzung von Thromboxan (TXA₂) durch Stimulation mit sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberständen (413/89-1)

Die Freisetzung von Thromboxan aus HUVEC auf eine Koinkubation mit den bakteriellen Überständen des EHEC-Stammes 413/89-1 ist mengenmäßig nicht mit der Prostazyklin Liberierung vergleichbar (Abbildung 6), die TXA₂-Synthese der Endothelzellen hängt von Spezies und Art ab. (Thrombozyten sind als *Hauptsyntheseort* anzusehen.) Die in den Experimenten beobachtete Steigerung der Freisetzung der beiden vasoaktiven Mediatoren PGI₂ und TXA₂ spricht für eine Störung des Gleichgewichts zwischen den prokoagulatorischen und fibrinolytischen Kräften und für eine Dysregulation des Gefäßwiderstandes.

Die Thromboxan-Freisetzung aus HUVEC erreicht einen Höhepunkt nach 60 Minuten, davor heben sich die gemessenen TXB₂-Spiegel nicht von der basalen Sekretion unter Versuchsbedingungen ab (Abbildung 8). Wie in den Prostazyklin-Versuchen werden ebenfalls je 100µl der sterilfiltrierten bakteriellen Kulturüberstände eingesetzt.

Ein Vergleich der TXA₂-Konzentration bei Inkubation der humanen Endothelzellen mit den beiden Escherichia coli-Stämmen EHEC 413/89-1 und 470 zum Zeitpunkt 60 Minuten zeigt einen deutlichen Unterschied in deren stimulatorischer Potenz (Abbildung 6). Die mit Kontrolle bezeichnete Säule entspricht der basalen unstimulierten TXA₂-Sekretion aus HUVEC unter Versuchsbedingungen. Das Calcium-Ionophore A23187 erzielte nach einer Stunde einen Wert von 345,5pg/ml, SEM 45,5pg/ml.

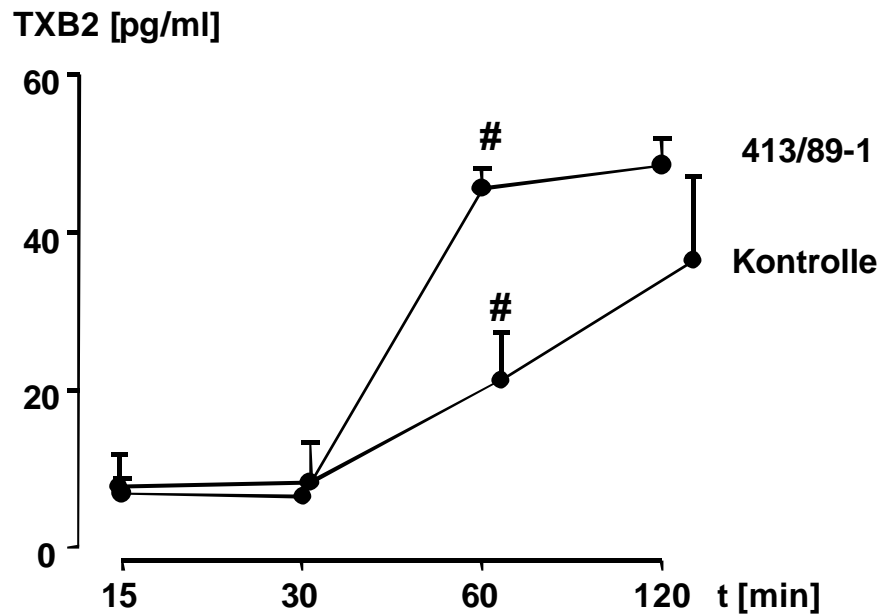


Abbildung 8: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von TXA₂ aus HUVEC bei Koinkubation mit sterilfiltriertem EHEC-Kulturüberstand.

HUVEC werden mit 100µl der sterilfiltrierten Kulturüberstände des Stammes 413/89-1 für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Die mit # markierten Werte unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die im TXB₂ ELISA gemessenen Daten \pm SEM stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

4.3. Charakterisierung des neuen Endothelzellstimulans im sterilfiltrierten Kulturüberstand des EHEC-Stammes 413/89-1

4.3.1. Gegenüberstellung: Endothelzellaktivierung durch Bakterien versus Endothelzellaktivierung durch sterilfiltrierten Kulturüberstand

Um einen direkten Effekt der Bakterien auf HUVEC im Versuch auszuschalten, werden die Übernachtkulturen für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand mit einer sterilen Spritze entnommen und unter sterilen Arbeitsbedingungen durch einen 0,22µm Sterilfilterspritzenaufsatz in ein neues Gefäß filtriert.

Beim Verwenden von unbehandelten Übernachtkulturen (Suspension aus Bakterien und Überständen) als Stimuli erreicht der Stamm 413/89-1 innerhalb von zwei Stunden bereits ein Maximum, welches sich von dem durch den sterilfiltrierten 413/89-1 Überstand erzielten Werten nicht wesentlich unterscheidet (Abbildungen 5, 9). Die stimulatorische Hauptwirkung auf die HUVEC stammt aus den 413/89-1 Überständen. Die durch den Stamm EDL 933 ausgelöste Inositolphosphat-Akkumulation liegt anfänglich unter dem 413/89-1-Niveau, fällt aber während des Beobachtungszeitraum nicht ab (Abbildung 9). Der durch den EPEC ausgelöste stetige Inositolphosphat-Anstieg bei fehlender Endothelzellaktivierung durch den entsprechenden Überstand über den selben Zeitraum spricht für eine direkte, vom Überstand unabhängige Bakterien-Endothelzell-Interaktion (Abbildung 10).

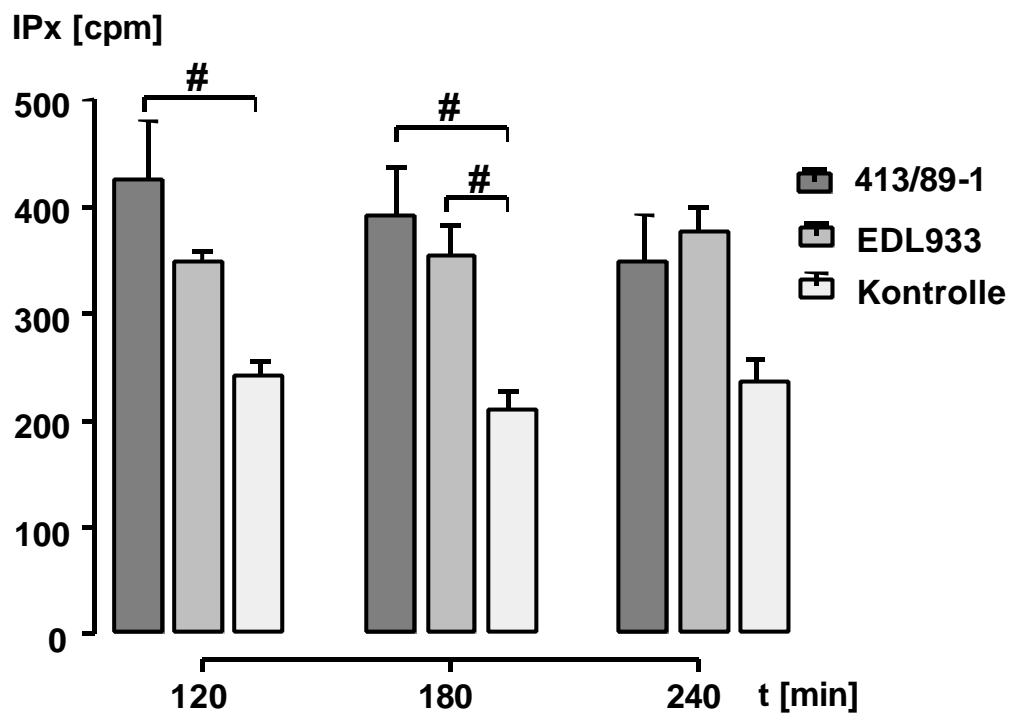


Abbildung 9: Akkumulation von Inositolphosphaten in HUVEC bei Inkubation mit Bakteriensuspensionen verschiedener EHEC-Stämme.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden mit 200 μl einer Übernachtskultur der EHEC-Stämme 413/89-1 und EDL 933 für eine Zeitspanne von zwei bis vier Stunden inkubiert. Die mit Kontrolle bezeichneten Säulen entsprechen der unstimulierten PdtIns-Hydrolyse unter Versuchsbedingungen. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustausch-Chromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefaßt. Die mit # markierten Werte unterscheiden sich signifikant. Die Daten \pm SEM stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

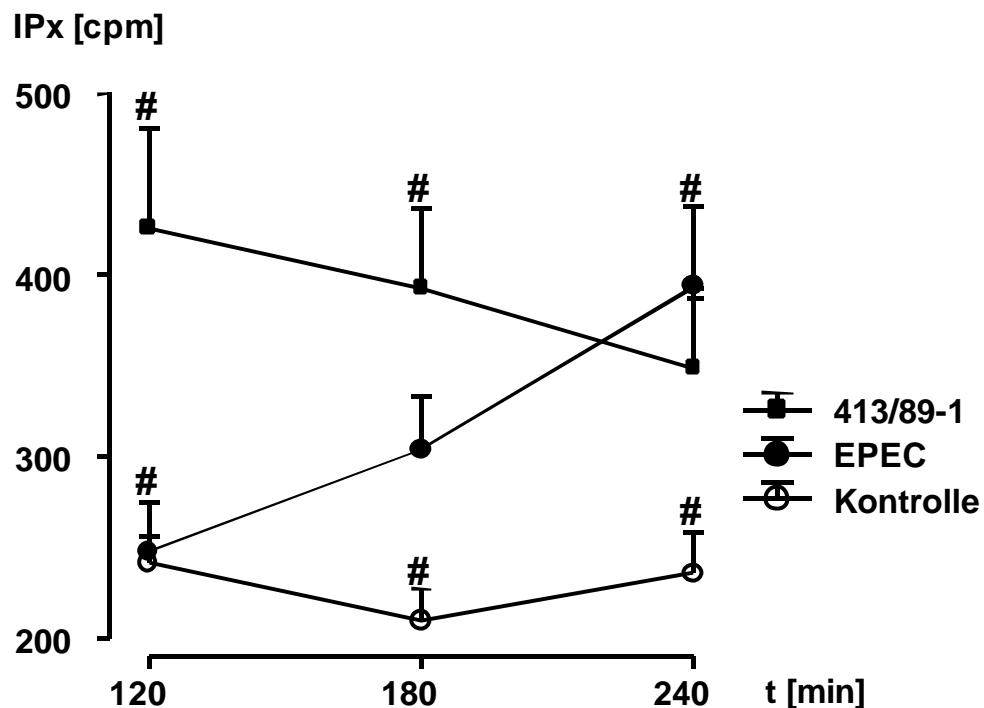


Abbildung 10: Akkumulation von Inositolphosphaten in HUVEC bei Inkubation mit Bakteriensuspensionen verschiedener Escherichia coli-Stämme.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden mit 200 μl einer Übernachtskultur der Escherichia coli Stämme EHEC 413/89-1 und EPEC E2346 für eine Zeitspanne von zwei bis vier Stunden inkubiert. Die mit Kontrolle bezeichnete Kurve entspricht der unstimulierten PdtIns-Hydrolyse unter Versuchsbedingungen. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefasst. Die mit # markierten Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Daten \pm SEM stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

4.3.2. Auftrennung des sterilfiltrierten Kulturüberstandes (413/89-1) durch verschiedene Verfahren - Einfluß auf den Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC

4.3.2.1. Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC bei Stimulation mit ultrafiltrierten EHEC-Kulturüberständen

Als erste weiterführende Maßnahme zur Eingrenzung des Endothelzellstimulans im Überstand des Stammes 413/89-1 wird der durch die Sterilfiltration gewonnene Überstand der Übernachtskultur in einen Molekularfiltrator mit einem „cut-off“ bei 3.000 Dalton gegeben. Die niedermolekulare Fraktion der sterilfiltrierten Überstände erweist sich bei der Endothelzellaktivierung als ebenso potent wie die sterilfiltrierten Überstände (in den Abbildungen nicht aufgeführt). Es handelt sich also um eine niedermolekulare Substanz.

4.3.2.2. Einfluß von Hitzebehandlung auf die endothelstimulierende Potenz der sterilfiltrierten Kulturüberstände

Um weitere Eigenschaften des im Überstand des Stammes 413/89-1 befindlichen Pathogenitätsfaktors hinsichtlich seiner thermischen Stabilität aufzudecken, wurden die sterilfiltrierten Überstände bei 56°C im Wasserbad für eine halbe bzw. eine Stunde inkubiert und nach der Abkühlung auf 37°C im Versuch eingesetzt. Die hitzebehandelten Überstände sind weiterhin in der Lage, das basale Niveau der PtdIns-Hydrolyse zu erhöhen (Abbildung 11). Dies spricht für eine zumindest partielle Hitzestabilität des endothelstimulierenden Agens.

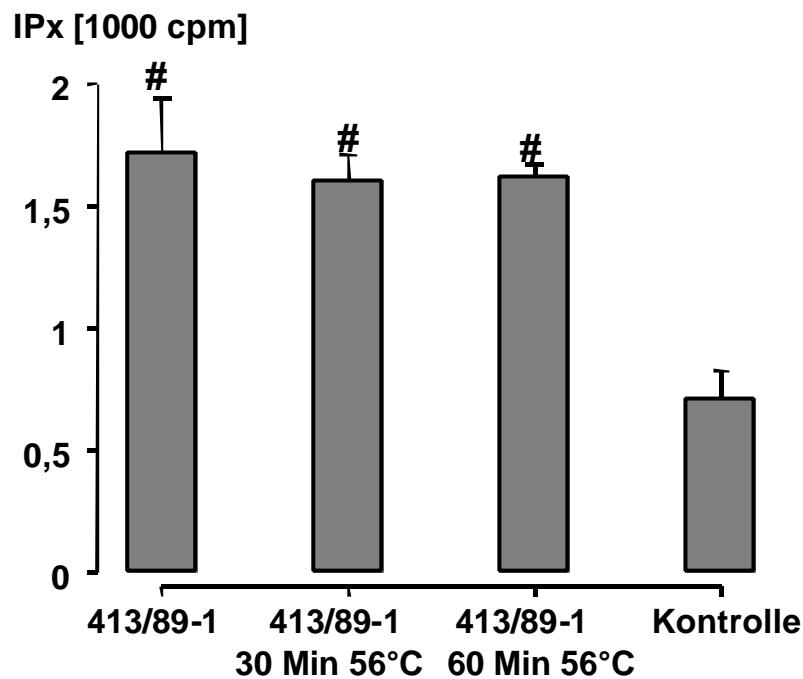


Abbildung 11: Vergleich der Akkumulation von Inositolphosphaten in HUVEC bei Inkubation mit hitzebehandelten Überständen mit dem unbehandelten sterilfiltrierten EHEC 413/89-1 Kulturüberstand.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden sowohl mit 200 μl von sterilfiltrierten EHEC 413/89-1 Überständen als auch mit 200 μl bei 56°C hitzebehandelten Überständen des EHEC 413/89-1 für eine halbe Stunde inkubiert. Die im Vergleich zu anderen Versuchsreihen höher liegenden cpm-Werte kommen durch den Einsatz eines anderen Szintillators zustande. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefaßt. # unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle. Die Daten \pm SEM stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.2.3. Endothelzellaktivierung nach Lipidextraktion der sterilfiltrierten EHEC-Kultur- überstände nach *Bligh* und *Dyer*

Zur Untersuchung der Frage, ob es sich bei dem für die Endothelzellaktivierung verantwortlichen Agens in den Überständen des EHEC-Stammes 413/89-1 um eine lipo- oder hydrophile Substanz handelt, wurde mit den sterilfiltrierten Überständen die von *Bligh* und *Dyer* beschriebene Lipidextraktion durchgeführt. Die Bestandteile der Überstände werden anhand ihrer Hydro- bzw. Lipophilität in zwei Phasen aufgetrennt, getrocknet und im Versuchsmedium resuspendiert. Die Frage zum Einfluß der *Bligh* und *Dyer*-Methode auf HUVEC hinsichtlich der Akkumulation von Inositolphosphaten wird durch den Einsatz von identisch behandeltem TB-Medium untersucht.

Ein Einsatz der so gewonnenen Proben im Versuch zeigt, daß sich die endothelstimulierende Substanz in der hydrophilen Fraktion der Überstände beider EHEC-Stämme (413/89-1 und EDL 933) befindet (Abbildung 12). Die im Vergleich zu den sterilfiltrierten Überständen abgeschwächte Inositolphosphat-Akkumulation spricht für methodisch bedingte Verluste.

4.3.2.4. Effekt der Proteinase k-Inkubation der sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände auf die Endothelzellstimulation

Der nächste Schritt, die Substanz näher zu definieren, war eine Inkubation mit einem proteinspaltenden Enzym; hierfür wurde eine Proteinase k von *Tritirachium album* gewählt.

Die aus Übernachtskulturen durch Zentrifugation und nachfolgender Sterilfiltration gewonnenen Überstände werden bei 37°C im Inkubator für eine Zeitspanne von 15 bis 180 Minuten mit der Proteinase k, bei einer Konzentration von 1mg/ml, inkubiert. Parallel dazu werden auch sterilfiltrierte Überstände in den Inkubator gestellt.

Die jeweiligen Paare, Proteinase k-behandelter und unbehandelter sterilfiltrierter EHEC Kulturüberstand, werden nach den entsprechenden Inkubationszeiten aus dem Inkubator genommen und unmittelbar im Versuch eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, daß die auf HUVEC aktivierend wirkende Substanz der *Escherichia coli* 413/89-1 Überstände durch das proteinspaltende Enzym Proteinase k ihre endothelstimulierende Wirkung verliert (Abbildung 13).

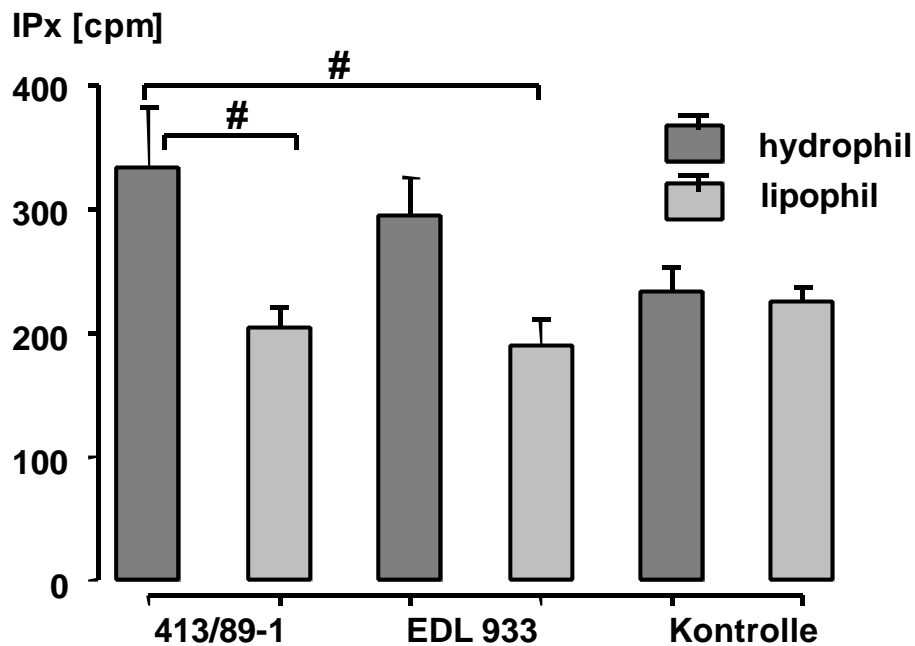


Abbildung 12: Vergleich der Akkumulation von Inositolphosphaten in HUVEC nach Stimulation mit sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberständen (nach der Methode von Bligh und Dyer aufgetrennt).

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden sowohl mit den lipophilen bzw. hydrophilen Phasen der sterilfiltrierten Überstände der EHEC-Stämme 413/89-1 und EDL 933 eine Stunde inkubiert. Zum Ausschluß einer durch die Bligh und Dyer-Lipidextraktion bedingte Stimulation der Endothelzellen wird auch so behandeltes TB-Medium im Versuch eingesetzt. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefaßt. # unterscheiden sich signifikant. Die Daten \pm SEM stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

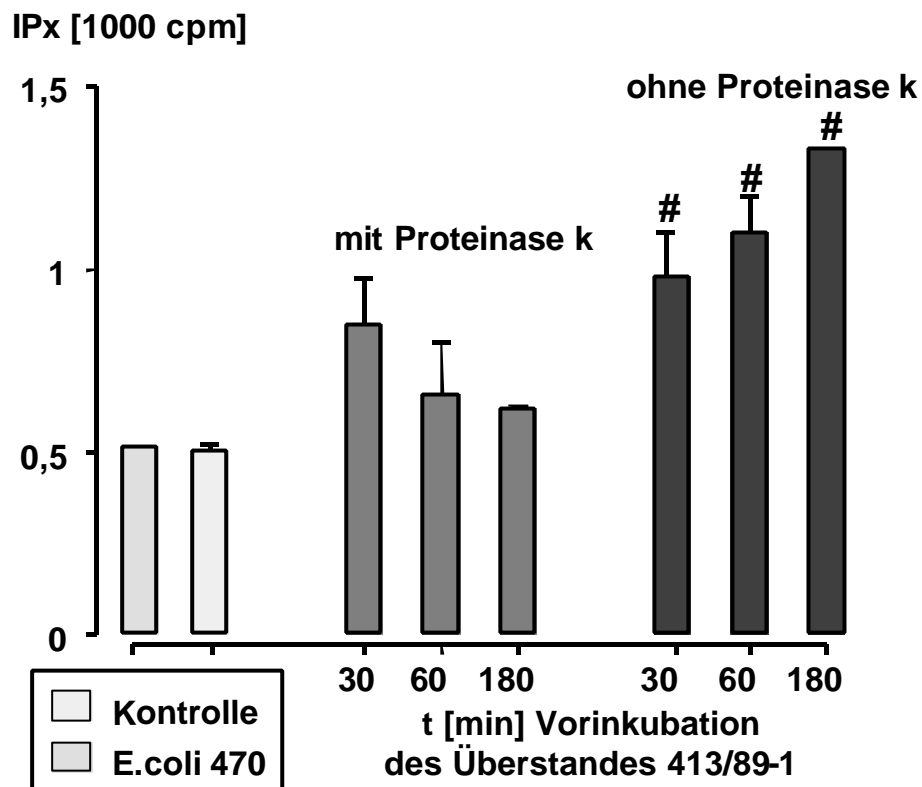


Abbildung 13: Vergleich der Akkumulation von Inositolphosphaten in HUVEC bei Inkubation mit sterilfiltriertem und mit enzymatisch behandeltem EHEC 413/89-1 Kulturüberstand.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden mit EHEC-Kulturüberständen stimuliert. Die Überstände werden vor dem Einsatz im Versuch unterschiedlich lange mit Proteinase k behandelt. Die Stimulationsdauer beträgt eine halbe Stunde. Die Säule 470 steht für die durch 200 μl Überstand des apathogenen *E. coli* Stammes 470 bedingte PtdIns Akkumulation nach 30 Minuten. Die mit Kontrolle bezeichnete Säule steht für die basal unter Versuchsbedingungen stattfindende PtdIns-Hydrolyse. Die im Vergleich zu anderen Versuchsreihen höher liegenden cpm-Werte kommen durch den Einsatz eines anderen Szintillators zustande. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefasst. # unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle. Die Daten \pm SEM stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4. Pharmakologische Interventionsversuche zur Hemmung der endothelialen Stimulierbarkeit durch sterilfiltrierte EHEC-Kulturüberstände (413/89-1)

4.4.1. Hemmung des Inositolphosphatmetabolismus durch den Histamin-1-(H-1) Rezeptorantagonist Pyrilamin

Pyrilamin ist als Histamin H-1 Rezeptorantagonist in der Lage am Histamin-Rezeptor auf humanem Endothel ohne intrinsische Aktivität zu binden, die basal stattfindende PtdIns-Hydrolyse unter Versuchsbedingungen wird nicht beeinflusst. Endothelzellen werden sowohl mit als auch ohne Pyrilamin in einer Konzentration von 10 μ M für eine halbe Stunde inkubiert, um eine Endothelzellaktivierung durch den Rezeptorantagonisten auszuschließen (Abbildung 14).

Pyrilamin bindet kompetitiv am H-1 Rezeptor; eine durch Histamin ausgelöste, stark gesteigerte Kumulation von Inositolphosphaten in HUVEC kann durch unmittelbare Vorgabe von Pyrilamin in den Versuchsansatz auf Kontrollniveau gesenkt werden (Abbildung 14).

Eine Koinkubation von HUVEC mit 200 μ l der sterilfiltrierten EHEC 413/89-1 Überstände und dem Rezeptorantagonisten Pyrilamin bewirkt bei unmittelbarer Vorgabe von Pyrilamin vor der Stimulation mit dem 413/89-1 Überstand ebenfalls eine Hemmung der Inositolphosphat-Hydrolyse bis auf das Niveau der basal, unstimuliert stattfindenden PtdIns-Hydrolyse (Abbildung 14).

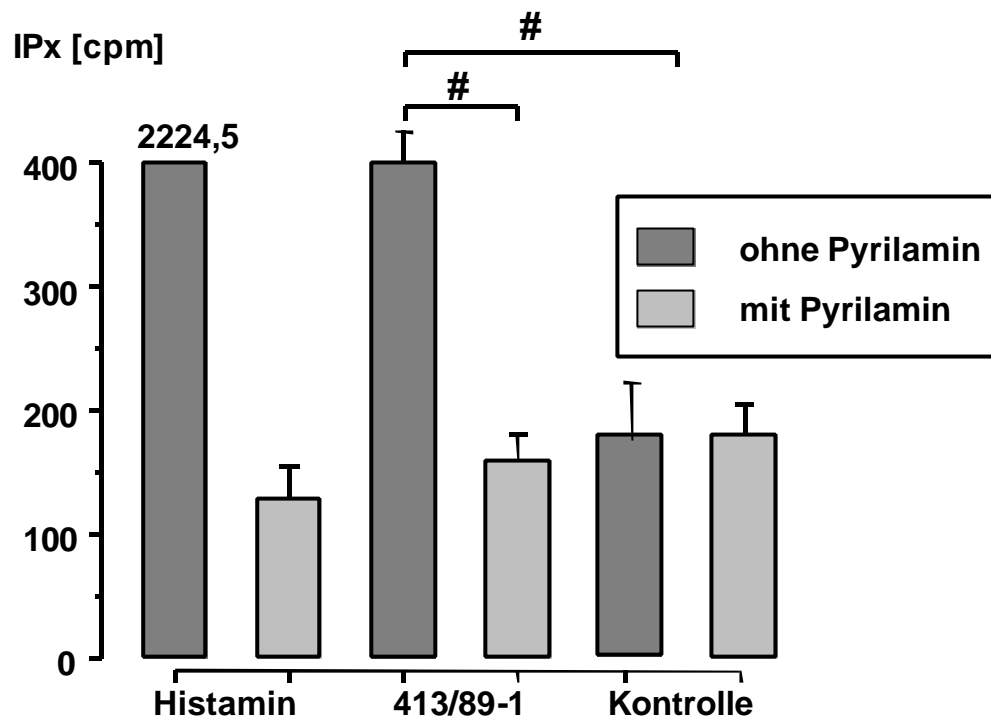


Abbildung 14: Vergleich der PtdIns-Hydrolyse in HUVEC jeweils mit und ohne Zugabe von Pyrilamin: Vergleich zwischen Histamin, dem sterilfiltrierten EHEC 413/89-1 Überstand und der Kontrolle.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden nach unmittelbarer Vorgabe des Histamin-Rezeptorantagonisten Pyrilamin ($10\mu\text{M}$) mit $200\mu\text{l}$ des sterilfiltrierten Überstandes des EHEC-Stammes 413/89-1 bzw. mit Histamin ($10\mu\text{M}$) für eine halbe Stunde inkubiert. Die mit Kontrolle bezeichnete Säule steht für die basal, unstimuliert stattfindende PtdIns-Hydrolyse. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefaßt. # unterscheiden sich signifikant. Die Daten \pm SEM stammen aus vier (Histamin: $n=2$) unabhängigen Experimenten.

4.4.2. Hemmbarkeit der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus HUVEC durch den H-1-Rezeptorantagonisten Pyrilamin

Wie auch bei den Messungen des Inositolphosphatmetabolismus hat die Zugabe des H1-Rezeptorantagonisten Pyrilamin unmittelbar vor der Inkubation der HUVEC mit dem sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstand des Stammes 413/89-1 eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. Pyrilamin bewirkt sowohl eine reduzierte TXA₂- als auch PGI₂-Sekretion, die auf Kontrollniveau liegt (Abbildungen 15). Die Inkubation der Zellen mit Pyrilamin veränderte die basale Freisetzung der beiden Mediatoren nicht.

4.4.3. Verminderte Stimulierbarkeit der HUVEC durch Histamin nach Vorinkubation mit dem sterilfiltrierten Kulturüberstand des EHEC Stammes 413/89-1

Da sich durch den H1-Rezeptorantagonisten Pyrilamin die Kumulation von Inositolphosphaten sowohl bei Stimulation mit Histamin als auch bei Inkubation mit dem Überstand des Escherichia coli Stammes 413/89-1 auf das basale Niveau reduzieren ließ, wurde in den folgenden Versuchen der bakterielle Überstand, unter der Vorstellung einer Besetzung der H1-Rezeptoren durch den Überstand, unmittelbar vorgegeben. Eine anschließende Stimulation mit Histamin in einer Konzentration von 1µM erzielte weniger als 50% der PtdIns-Hydrolyse der nur mit Histamin behandelten Proben (Abbildung 16).

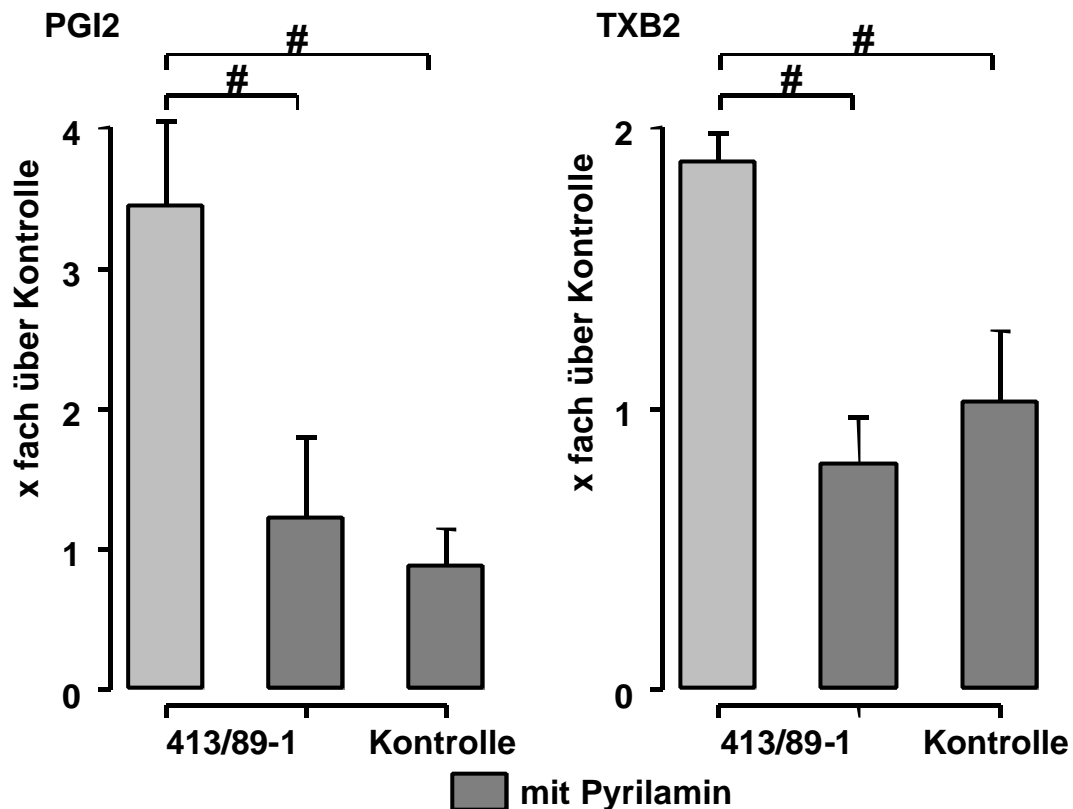


Abbildung 15: Einfluß des H1-Rezeptorantagonisten Pyrilamin auf die endotheliale PGI₂- und TXA₂-Freisetzung bei Inkubation mit dem sterilfiltrierten Überstand des EHEC-Stammes 413/89-1.

HUVEC werden mit 100µl des sterilfiltrierten Kulturüberstandes des Stammes 413/89-1 inkubiert. Die Y-Achse bezieht sich auf die unstimulierte Prostazyklin- bzw. Thromboxan-Liberierung aus HUVEC unter Versuchsbedingungen (entspricht 1 auf der Y-Achse). Die eingesetzte Konzentration des H1-Rezeptorantagonisten Pyrilamin beträgt 10mM. # unterscheiden sich signifikant. Die Daten und SEM stammen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

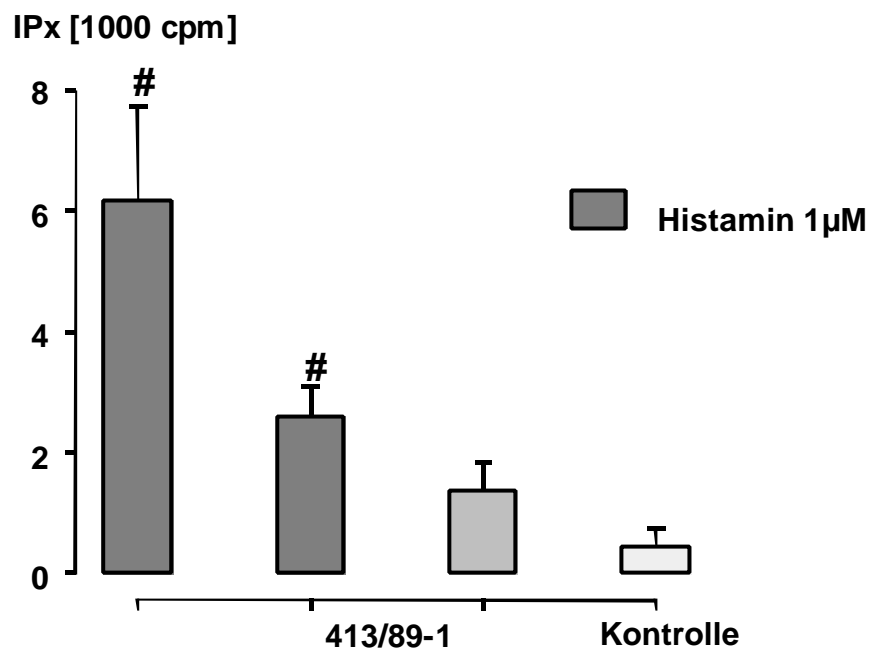


Abbildung 16: Vergleich der Akkumulation von Inositolphosphaten in HUVEC bei Inkubation mit dem sterilfiltrierten 413/89-1 Kulturüberstand und nachfolgender Histamin-Stimulation.

HUVEC, präinkubiert mit ^3H -Inositol, werden nach unmittelbarer Vorgabe von 200µl des sterilfiltrierten Überstandes des EHEC-Stammes 413/89-1 für eine halbe Stunde mit 1µM Histamin inkubiert. Zum Vergleich werden die Endothelzellen mit 200µl des Überstandes 413/89-1 und Histamin jeweils separat inkubiert. Die mit Kontrolle bezeichnete Säule steht für die basal, unstimuliert stattfindende PdtIns-Hydrolyse unter Versuchsbedingungen. Die im Vergleich zu anderen Versuchsreihen höher liegenden cpm-Werte kommen durch den Einsatz eines anderen Szintillators zustande. Extrahierte Inositolphosphate werden durch Anionenaustauschchromatographie separiert. IP_1 , IP_2 , IP_3 werden gemeinsam gemessen und als IP_x zusammengefaßt. # unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle. Die Daten \pm SEM stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

5. DISKUSSION

5.1. Die Rolle des Endothels bei EHEC-Infektionen und beim HUS

Die Einschwemmung bakterieller Toxine oder anderer bakterieller Pathogenitätsfaktoren aus einem Infektionsfokus wird sowohl bei der Entwicklung des HUS als auch der des septischen Schocks mit Aktivierung körpereigener Effektorsysteme als wesentliche pathophysiologische Ursache angesehen (28).

Die Endothelzelle ist aufgrund ihres disponierten Kontaktes mit dem fließenden Blut die bevorzugte Zielzelle von zirkulierenden Toxinen, anderen bakteriellen Produkten oder Bakterienbestandteilen. Die Schädigung des Endothels, speziell des intestinalen und renalen Gefäßendothels, nimmt bei der Entstehung des HUS die zentrale Rolle ein (34, 39).

Durch die Schädigung des Gefäßendothels durch bakterielle Pathogenitätsfaktoren kommt es sekundär zu einem ischämischen Intestinalschaden (74). Die lokale Affektion des Endothels mit Thrombozytenaktivierung, Vasokonstriktion und chemotaktischem Anlocken von immunkompetenten Zellen und deren Aktivierung führt zur Entwicklung der Hämorrhagischen Colitis (HC), die klinisch durch die namensgebenden hämorrhagischen Durchfälle imponiert (71, 74).

Im Rahmen der HC kommt es zu einem Zusammenbruch der Blut-Gewebe-Barriere. Dies eröffnet den bakteriellen Pathogenitätsfaktoren den Zugang zum Gefäßsystem und bietet ihnen so die Möglichkeit entfernte empfängliche Gewebe zu erreichen (74).

Die Endothelzelle wurde als „main-target“ Zelle des SLT identifiziert (18). Das Endothel ist der Schlüssel zum pathogenetischen Verständnis des Zusammenhangs zwischen der HC und der Ausbildung des HUS.

Das SLT – der bekannteste Pathogenitätsfaktor der EHEC – hemmt die Proteinbiosynthese der Gb3-Rezeptor-tragenden Zellen. Der im HUS beobachtete endotheliale Tropismus erklärt sich durch die unterschiedliche endotheliale Gb3-Rezeptor-Dichte (15, 49). Die Empfänglichkeit gegenüber SLTs differiert bei Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft. Shiga-like Toxin II wirkt auf humane renale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMEC) 1000-fach toxischer als das SLT I, obwohl quantitativ SLT I 10-fach mehr gebunden wird; die Zytotoxizität von SLT I und II bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten HUVEC ist identisch (13). Die Zytotoxizität der SLTs konnte experimentell durch eine gleichzeitige

Inkubation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) auf HUVEC sogar noch verstärkt werden (24, 57).

Ebenso führt das gleichzeitige Vorhandensein von induzierbaren inflammatorischen Mediatoren, wie zum Beispiel TNF- α oder Interleukinen, zu einer up-Regulation der Gb3-Rezeptoren (57). Diese Mediatoren werden von den Endothelzellen selbst und auch von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen gebildet. Die Sensitivität der Endothelzellen gegenüber den SLT erhöht sich dadurch um den Faktor 10^6 , schon niedrigste Dosen von SLT können zytotoxisch wirken (9). Das Toxin alleine ist ohne vorherigen Kontakt der Endothelzellen mit anderen bakteriellen oder körpereigenen Mediatormolekülen nicht in der Lage, die fatalen im HUS beobachteten Schäden zu verursachen (26). In dieser Arbeit wurde ein anderes bakterielles Agens der Endothelzellaktivierung untersucht, welches als additiver oder sogar multiplikativer Faktor die Schwere der EHEC-Infektion beeinflusst.

Eine Aktivierung der Endothelzellen als Syntheseort inflammatorischer Mediatoren führt zu mikrozirkulatorischen Dysfunktionen, wodurch die Steuerung des totalen peripheren Gefäßwiderstandes und die Aufrechterhaltung der Schrankenfunktion gegenüber dem Interstitium beeinträchtigt wird (60, 61). Darüber hinaus kann eine erhöhte Reaktivität auf diese Mediatoren, ausgelöst durch starke Alteration (lokale Hypoxie, Azidose, Toxämie), auftreten. Es kommt zu lokalen Gerinnungs- und Vasotonusregulationsstörungen mit der Folge einer Fehlsteuerungen der Permeabilität und einer Extravasation weißer Blutzellen in das umliegende Gewebe. Die Leukozytenadherenz an Endothelzellen wird durch eine Koinkubation mit SLT dosisabhängig stark gesteigert (vergleichbar nur mit IL- 1β , dem potentesten Stimulus der endothelialen Adherenz (25)). Dies erklärt den immensen Entzündungsprozeß, welcher am Dickdarm, dem primärem Angriffsort der EHEC, neben Thrombenentwicklung und anoxischen Gewebeschäden entsteht.

Die ausgeprägte und fatale Schädigung des Gefäßendothels bei EHEC-Infektionen ist von mindestens zwei Faktoren abhängig: vom systemischen Auftreten bakterieller Pathogenitätsfaktoren und von körpereigenen inflammatorischen Mediatoren.

Der kausale Zusammenhang zwischen bakteriellen Zytolysinen, wie dem Hämolyysin von *E. coli* (HlyA) und den SLTs, und einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion zeigt, wie bedeutsam das Endothel bei diesen Infektionen ist. Endothelzellen sind für einen Angriff dieser medizinisch bedeutsamen Toxine sehr empfänglich, doch ist nicht klar, ob nicht noch andere

bislang undefinierte bakterielle Pathogenitätsfaktoren bei diesem Prozeß beteiligt sind. Das SLT kann ohne zusätzliche Mediatoren nicht alleine die fatale Nierenschädigung bedingen (26).

An dieser Stelle greift die Fragestellung dieser Arbeit an. Sie leistet einen Beitrag dazu, andere nicht toxinbedingte, pathogenetische Vorgänge am Endothel während einer EHEC-Infektion oder den darauffolgenden Komplikationen (insbesondere HUS) aufzuzeigen.

Vergleichend wird das Potential der sterilfiltrierten Kulturüberstände verschiedener Bakteriensämme hinsichtlich einer Verstärkung der Phosphatidylinositol-Hydrolyse in HUVEC betrachtet. Auch die durch EHEC-Kulturüberstand bedingte Freisetzung von den vasoaktiven und gerinnungsbeeinflussenden Mediatoren Prostazyklin und Thromboxan wurde untersucht.

Die Aktivierung der Endothelzellen durch die EHEC-Kulturüberstände (EDL 933 und **EHEC 413/89-1**) sprechen für eine Beteiligung des neuen Endothelzellstimulans an den inflammatorischen Vorgängen am Endothel während einer EHEC-Infektion. Die beobachteten Veränderungen der Mediatorfreisetzung bei Koinkubation der HUVEC mit den sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberständen könnten zu einer lokalen Dysregulation der Gerinnung und des Vasotonus beitragen.

Somit könnte das neue Endothelstimulans bei der Entwicklung der HC oder des HUS neben dem SLT und den körpereigenen Effektorsystemen eine pathogenetische Rolle bei der Ausbildung der thrombotischen Mikroangiopathie, der pathogenetischen Basis dieser Krankheitsbilder, spielen.

5.2 Abgrenzung des neuen Endothelzellstimulans des Stammes 413/89-1 gegenüber bekannten Virulenzfaktoren und stoffliche Charakterisierung

EHEC besitzen das genetische Potential, eine Vielzahl unterschiedlichster Pathogenitätsfaktoren zu bilden. Teils sind diese Faktoren auf dem Chromosom, teils auf Plasmiden codiert. Diese junge und äußerst widerstandsfähige Bakterienspezies hat im Laufe der Zeit viele dieser genetischen Informationen erworben (21). Wahrscheinlich gibt es auf dem umfangreichen Genom der EHEC gegenwärtig noch undefinierte Adhärenz- und Pathogenitätsfaktoren (15, 33, 50).

Noch sind nicht alle pathogenetischen Möglichkeiten der klinisch bedeutsamen *Escherichia coli* aufgeklärt. Das Spektrum der Keime, die kausal mit der Entwicklung des HUS in Verbindung stehen, hat sich in den letzten Jahren ausgeweitet (58). Waren Anfang der 90-er Jahre nur die Stämme O157:H7 bei HUS-Patienten identifiziert worden, so haben vor allem Erkrankungsfälle durch die Stämme O26:H- und O111:H- zugenommen (50).

Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrieren sich auf den SLT-produzierenden Stamm 413/89-1, einen Vertreter der O26:H- EHEC.

Bei der Entwicklung der HC und des HUS spielt das SLT eine entscheidende Rolle, doch wird seine Toxizität um mehrere Zehnerpotenzen verstärkt, wenn die Endothelzelle als Hauptzielzelle schon durch andere bakterielle Produkte (z.B. LPS oder andere) oder körpereigene inflammatorische Mediatoren, wie den Interleukinen oder dem TNF- α , „vorgeschiedigt“ ist (24, 57). Die EHEC-assoziierten Infektionskrankheiten sind keine Bakteriämien. Die pathogenetisch bedeutende Schädigung findet an Endothelzellen statt. Deshalb wurden für die Untersuchung der EHEC-Pathogenität HUVEC gewählt und in den Versuchen vorwiegend die sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände und nicht die Bakterien eingesetzt.

Die vollständige Ausprägung der Pathogenese der EHEC-Infektionen ist durch die bakteriellen Pathogenitätsfaktoren und die starke Reaktion der humanen immunologischen und inflammatorischen Effektorsysteme bedingt.

Um den Verdacht einer bislang unentdeckten Substanz in den Kulturüberständen des EHEC-Stammes 413/89-1 zu erhärten, wurden bekannte Pathogenitätsfaktoren durch verschiedene Maßnahmen und Methoden vor dem Einsatz in den Versuchen zur Messung der Phosphatidylinositol-Hydrolyse in HUVEC ausgeschlossen.

Durch Sterilfiltration der zentrifugierten EHEC-Übernachtulturen werden die Bakterien und bakteriengebundene Faktoren, wie z.B. das Intimin und das Lipopolysaccharid (LPS), von den Überständen getrennt. Damit scheiden diese Faktoren und auch eine direkte Bakterium-Zielzell-Interaktion als Ursache für die auf HUVEC beobachteten Effekte aus. Ebenso kommen bakterielle Proteine nicht in Frage, welche erst nach Bindung der EHEC im Darm im Rahmen der Ausbildung der epithelialen A/E-Läsionen gebildet werden (esp A, esp D und esp B sind eaeA Gen-Produkte) (33, 34, 35).

Nach der Sterilfiltration werden durch Ultrafiltration mit einem molekularen cut-off von 3kDa höhermolekulare Bestandteile des Kulturüberstandes des Stammes 413/89-1 abgetrennt.

Dadurch werden größere sezernierte EHEC-Toxine als Ursache der in den Versuchen beobachteten Endothelzellaktivierung ausgeschlossen.

Das bakteriophagencodierten SLT ist ein A/B-Toxin. Das Verhältnis zwischen A- und B-Untereinheit beträgt 1:5, die Masse der A-Einheit 32kDa, die der B-Untereinheit 7kDa (18), somit liegen beide Molekülmassen über dem cut-off. Andere von den EHEC gebildete Toxine, wie das enteroaggregative heat-stable Toxin-1 (89% der EHEC können das 4,1kDa große EAST-1 bilden (23)) und das EHEC-Enterohämolysin scheiden als Agentien der Endothelzellstimulation ebenfalls durch ihre Molekülgröße aus (15, 22). Das von den verschiedenen EHEC gebildete porenformende Enterohämolysin ist 107kDa groß und sein Vorkommen ist eng mit den Serotypen O157, O111 und O26 assoziiert (52). Die Inzidenz des EHEC-Hämolysin, welches mit dem alpha-Hämolysin verwandt, aber nicht mit diesem identisch ist, ist in SLT-produzierenden *E. coli* hoch. SLT und EHEC-Hämolysin haben bei der Störung wichtiger Zellfunktionen einen synergistischen Effekt (15).

Nach Ausschluß der von EHEC produzierten Toxine und der A/E-Läsion-Produkte wurden verschiedene Methoden angewendet, um den Charakter des postulierten neuen Endothelzellstimulans in den EHEC 413/89-1 Kulturüberständen genauer zu definieren.

Die Ultrafiltration durch einen Molekularfilter mit einem cut-off bei 3kDa schließt alle höhermolekularen Bestandteile der EHEC-Kulturüberstände als Agens der beobachteten Endothelzellstimulation aus.

Eine Erhitzung der EHEC-Kulturüberstände auf 56°C für 30 bzw. 60 Minuten führte nicht zu einer Beseitigung des aktivierenden Effekts des EHEC-Kulturüberstände auf HUVEC, was für eine zumindest partielle Hitzestabilität des neuen Endothelzellstimulans spricht.

Die EHEC-Kulturüberstände wurden durch die nach *Bligh* und *Dyer* durchgeführte Lipidextraktion in hydro- und lipophile Phasen getrennt (7). Beide Fraktionen wurden in den Messungen des Inositolphosphatmetabolismus in HUVEC mit dem Ergebnis eingesetzt, daß sich die HUVEC-stimulierende Potenz in der hydrophilen Fraktion befindet. Über die *Bligh* und *Dyer*-Lipidextraktion hinaus wurden die sterilfiltrierten 413/89-1 Kulturüberstände mit Hilfe einer HPLC (High performance liquid chromatography) aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen in den Versuchen eingesetzt. Die maximale stimulatorische Potenz befand sich in den frühen also hydrophilen peaks, was das Ergebnis der Lipidextraktion bestätigte (Daten nicht gezeigt).

Eine Koinkubation der sterilen Kulturüberstände des Stammes 413/89-1 mit dem proteolytischen Enzym Proteinase k für einen Zeitraum von 15 bis 60 Minuten bei 37°C und

ein nachfolgender Einsatz in den Versuchen zur Messung der PtdIns zeigte eine deutliche Reduktion der HUVEC-stimulierenden Potenz der Bakterienkulturüberstände nach Proteinase k-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten sterilfiltrierten Überständen. Folglich ist das neue EHEC-Endothelzellstimulans ein Protein.

Zusammenfassend handelt es sich bei dem endothelstimulierenden Agens um eine sezernierte niedermolekulare, hydrophile, partiell-hitzestabile, Proteinase k-sensible Substanz, die sich in den Überständen der stehenden Übernachtkulturen des EHEC-Stammes 413/89-1, nicht aber in den jeweils gleichbehandelten Kulturüberständen des apathogenen Escherichia coli Stammes 470 befindet.

Mittels pharmakologischer Intervention wurde getestet, ob selektiv in die endothelialen Signaltransduktionswege im Rahmen der EHEC-Kulturüberstand-induzierten inflammatorischen Prozesse eingegriffen werden kann.

In Vorversuchen mit Rezeptorantagonisten konnte bei den Proben, in denen der Histamin-1 Rezeptorantagonist Pyrilamin zugesetzt wurde, im Gegensatz zu anderen Rezeptorantagonisten eine deutliche Reduktion der Phosphatidylinositol-Hydrolyse in HUVEC auf die Stimulation mit dem sterilfiltrierten Überstand des Stammes 413/89-1 hin beobachtet werden. In weiterführenden Experimenten bestätigte sich die Hemmung durch diesen H-1 Rezeptorantagonisten. Die Werte bei Koinkubation mit den Überständen konnten bis auf das Niveau der unstimulierten Kontrollen gesenkt werden. Pyrilamin alleine löste keine HUVEC-Stimulation aus. Auch die Freisetzung der vasoaktiven Cyclooxygenase-Produkte Prostazyklin und Thromboxan aus humanen Endothelzellen konnte durch Pyrilamin deutlich vermindert werden.

Die Vorgabe der EHEC 413/89-1 Kulturüberstände unter der Vorstellung einer Belegung der H-1 Rezeptoren und einer darauffolgenden Stimulation mit Histamin für 30 Minuten, zeigte, daß der maximale Histamin-Effekt auf HUVEC ausbleibt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die durch die in den Überständen befindliche Substanz herbeigeführte Endothelstimulation rezeptorvermittelt abläuft oder den von Histamin beschrittenen Signaltransduktionsweg beeinträchtigt.

5.3. Postulierte Rolle des neuen Endothelzellstimulans und Einordnung in das pathogenetische Modell der EHEC-Infektionen und ihrer Komplikationen

Nach dem initialen Kontakt zwischen Bakterium und Kolonepithelzelle bilden EHEC die für die Entwicklung der „attaching and effacing“-Läsion notwendigen bakteriellen Produkte, die auf dem „locus of enterocyte effacement“ (LEE) kodiert sind (75). Unter anderem durch die Intimin-assoziierte (im LEE kodiert) enge Bindung kommt es zur vollständigen Ausprägung der A/E-Läsionen mit dramatischen Zytoskelettveränderungen in den intestinalen Epithelzellen. Die funktionelle Integrität der Mukosazelle ist gestört, es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen Resorption und Sekretion, was klinisch als wäßrige Durchfälle imponiert (33).

Bei der Ausbildung der A/E-Läsionen dringen nicht bakteriengebundene, sezernierte bakterielle Produkte in das subepitheliale Gewebe vor. Die resultierende Hämorrhagische Colitis (HC) ist durch die direkte lokale Wirkung des SLT und/oder anderen unbekanntem Pathogenitätsfaktoren auf das Darmepithel bedingt, aber vor allem Folge einer indirekten, sekundären Schädigung des Epithels durch Störung der Mikrozirkulation, also einer Affektion des intestinalen Endothels.

Hierbei könnte das neue EHEC-Endothelzellstimulans beteiligt sein. Seine geringe Größe und Hydrophilität, aber vor allem die Tatsache, daß es nicht an den bakteriellen Gesamtorganismus gebunden ist, ermöglicht sein Einschwemmen in das subepitheliale Gewebe und das Erreichen der sich dort befindlichen Endothelzellen. Der neue EHEC-Endothelzellstimulans könnte also bei diesem Schritt der Pathogenese neben dem SLT beteiligt sein. Darüber hinaus zeigt die Endothelzelle nach Aktivierung durch z.B. den neuen Faktor eine verstärkte Toxizität gegenüber dem SLT.

Aus diesen Endothelschäden der kleinen Arteriolen und Kapillaren resultiert eine lokale intravasale Koagulation und verstärkte Leukozytenadhäsion mit einer Zunahme der Produktion von vasoaktiven und proinflammatorischen Substanzen, was letztlich zu ischämischen Intestinalschäden durch Thrombenbildung, Vaskulitis und Hämorrhagie mit dem Zusammenbruch der Blut-Gewebe-Barriere führt.

Der Untergang der Blut-Gewebe-Schranke eröffnet den Toxinen und anderen bakteriellen Faktoren den Zugang zum Gefäßsystem. Das Endothel als zentrale Zielzelle bei der Entwicklung des HUS kann so durch die sezernierten EHEC-Pathogenitätsfaktoren erreicht werden (34, 74). Der Tropismus der endothelialen Affektion ist durch die

Globotriaosylceramid- (Gb3-) Rezeptordichte bedingt (15, 18). Dieser Rezeptor, dessen Anzahl durch vorherigen Kontakt mit proinflammatorischen Mediatoren wie TNF, IL-1 und LPS *in vitro* hochreguliert wird (57), ist Angriffspunkt des SLT und befindet sich hauptsächlich auf dem Endothel der Niere, des Kolons und dem ZNS (74).

Der zentrale Vorgang bei der Pathogenese des HUS ist die Schädigung des Gefäßendothels hervorgerufen durch bakterielle Produkte und körpereigene Effektorsysteme. Auch hier ist der neue EHEC-Endothelstimulans als additiver bis sogar multiplikativer Faktor neben dem SLT und den proinflammatorischen und prokoagulatorischen körpereigenen Faktoren denkbar. Folge der endothelialen Affektion ist eine thrombotische Mikroangiopathie (Abbildung 17), die Basis der anoxischen Gewebeschäden des Kolons und besonders der Niere, mit intravasaler Thrombusbildung, Vasokonstriktion, Inflammation und endothelialer Zellschwellung.

Ein Zusammentreffen von systemisch vorliegenden EHEC-Pathogenitätsfaktoren und -toxinen und der starken Reaktion der humanen Effektorsysteme auf den infektiösen Focus, mit verstärkt systemisch vorliegenden proinflammatorischen Mediatoren, sind die Grundlage der Entwicklung eines HUS. Die pathogenetischen Zusammenhänge sind nicht endgültig geklärt. Beteiligt sind eine verstärkte Adhäsion, aktivierte polymorphkernige Neutrophile und ein Ungleichgewicht der Gerinnungssysteme zugunsten einer Thrombenbildung. Außerdem sind vasoaktive Mediatoren, Komplementfaktoren, veränderte Flußeigenschaften des Blutes, Erythrozytenschädigungen und noch andere Blutbildveränderungen während eines HUS zu beobachten.

Ein noch detaillierterer Pathomechanismus des HUS und die endgültigen Zusammenhänge aller beteiligter EHEC-Pathogenitätsfaktoren, humaner Faktoren und Systeme müssen noch geklärt werden, um effektive Therapieansätze entwickeln zu können.

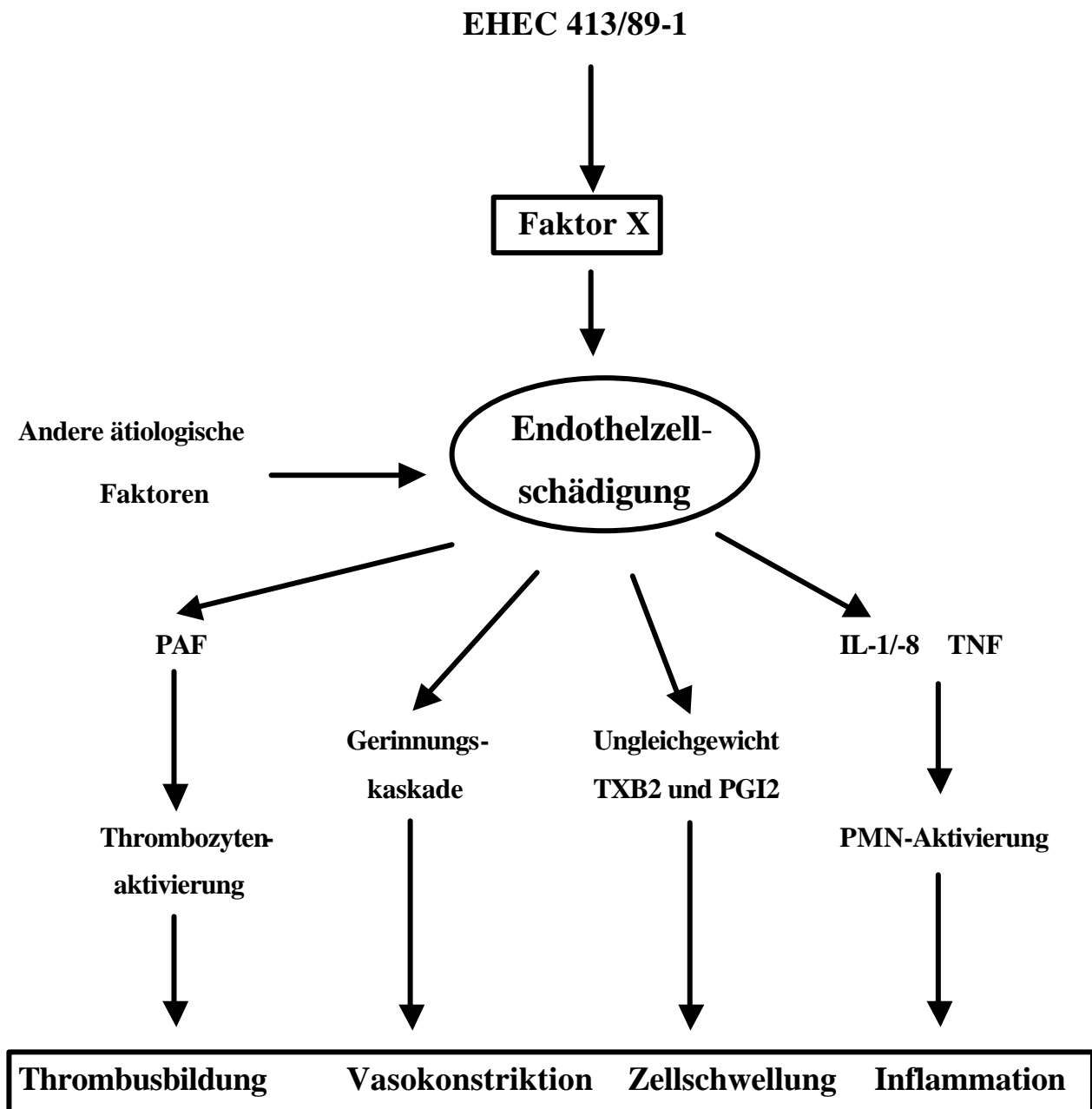


Abbildung 17 : Mechanismus der Pathogenese der Endothelzellaktivierung durch die EHEC-Kulturüberstände (413/89-1), postulierte Stellung des neuen Faktors.

Der zentrale pathogenetische Vorgang des HUS ist die Schädigung des Gefäßendothels, die zur thrombotischen Mikroangiopathie, hervorgerufen durch bakterielle Produkte und körpereigene Effektorsysteme, führt. Abkürzungen in der Abbildung: PAF, Plättchenaktivierender Faktor; IL-1,-8, Interleukin-1,-8; TNF, Tumor Nekrose Faktor; PMN, Polymorphkernige Neutrophile; andere ätiologische Faktoren, SLT, Medikamente (z.B. Cyclosporin A), Vaskulitis, Ganzkörperbestrahlung und andere noch nicht identifizierte bakterielle Faktoren und genetische Informationen.

5.4. Ausblick

Die klinische Bedeutung der weltweit vorkommenden EHEC nimmt immer mehr zu. Viele Studien haben die Korrelation zwischen einer intestinalen EHEC-Infektion und dem sich als schwerwiegende Komplikation entwickelnden HUS bestätigt (69, 70). Nach der Entdeckung dieses Zusammenhangs im Jahr 1986 durch *Karmali et al.*, ist diese junge und äußerst widerstandsfähige Bakterienspezies innerhalb weniger Jahre zum zweithäufigsten Erreger von Durchfallerkrankungen nach den Salmonellen avanciert (58). EHEC sind ein interessantes Beispiel für Erreger, die sich, durch inter- und intraspezifischen Gen-Austausch virulent geworden, weltweit ausbreiten und in die Nahrungskette des Menschen eindringen (21). Die Fülle an genetischer Information birgt wahrscheinlich noch andere bislang unentdeckte Faktoren. Das Spektrum der EHEC-Stämme, die bei HUS identifiziert werden konnten, weitet sich aus (50). Vielleicht haben diese Stämme (z.Zt. hauptsächlich O26, O111) noch andere pathogenetische Eigenschaften, die sie vom klassischen EHEC O157:H7 unterscheiden.

Es gibt im Augenblick keine etablierte therapeutische Intervention, welche die Dauer der Erkrankung verkürzt und eventuelle Komplikationen oder die Entwicklung eines HUS effizient verhindern könnte. Die Therapie erfolgt symptomatisch (34).

Im Vordergrund steht die Überwachung und das Ausgleichen des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes, auch der evtl. substitutionsbedürftige Blutverlust und das etwaige Entwickeln eines HUS wird genau beobachtet (58). Diese symptomatische Therapie hat aber den prozentualen Anteil der Patienten, die ein HUS entwickeln, nicht beeinflusst. Eine antibiotische Behandlung ist umstritten, sie verbessert das Outcome der Patienten nicht. Länge und Schwere des Durchfalls blieben unbeeinflusst, außerdem berichteten Studien, daß eine antibiotische Behandlung, wahrscheinlich durch vermehrte Freisetzung bakterieller Pathogenitätsfaktoren, einen Risikofaktor für die Ausbildung eines HUS darstellt (34, 21).

Die Entdeckung eines neuen Endothelzellstimulans zeigt, daß die komplexe Pathogenese der EHEC-Infektionskrankheiten noch nicht vollständig aufgedeckt ist. Das Endothel, geschädigt durch das Zusammentreffen von systemisch zirkulierenden bakteriellen Pathogenitätsfaktoren und durch die immense Antwort körpereigener Effektorsysteme, steht im Mittelpunkt dieser potentiell letalen Krankheitsbilder und ist vielleicht der Schlüssel zu einer erfolgversprechenden Therapie oder zu prophylaktischen Maßnahmen.

Andere Therapieansätze werden zur Zeit geprüft: Ein an Kieselgur gebundener synthetischer Oligosaccharid-Gb3 Rezeptor soll im Darm an die SLT binden und so die Progression von EHEC-Colitis in ein HUS verhindern. Ein anderer Forschungsbereich zielt auf eine Immunisierung gegen bakterielle EHEC-Antigene, um so zu einer brauchbaren Immunisierungsmethode zu gelangen (Impfung gegen EHEC O157 an 87 Menschen erfolgreich, Bildung ausreichend hoher AK-Titer (JAMA 279, 1998)).

Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit sollen Möglichkeiten für neue therapeutische Perspektiven aufzeigen: Durch spezifische monoklonale Antikörper gegen den neuen Faktor könnte die Endothelzellschädigung vermindert werden (bsp.: Monoklonale AK gegen alpha-Toxin von *Staphylokokkus aureus* (*Bhakdi et al.*)). Außerdem könnte durch eine Blockade des Histamin-1 Rezeptors in die Signaltransduktion der Endothelzelle bei der EHEC-Infektion eingegriffen werden. Eine Immunisierung gegenüber dem neuen endothelstimulierenden Faktor der EHEC wäre ebenso denkbar, doch Voraussetzung hierfür und für die o.g. spezifischen Antikörper wäre die exakte stoffliche Charakterisierung des neuen EHEC-Endothelzellstimulans. Dies ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aktuelle pathophysiologische Konzepte führen die Entstehung des HUS auf eine Einschwemmung bakterieller Pathogenitätsfaktoren aus einem Infektionsfokus und auf die sekundäre Aktivierung körpereigener Mediatorsysteme zurück. Diese beiden pathogenetischen Vorgänge sind gemeinsam für die Problematik der EHEC-induzierten Erkrankungen verantwortlich.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Hypothese, wonach in Abwesenheit des bakteriellen Gesamtorganismus eine Aktivierung des Endothels bzw. die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren aus Endothelzellen induzierbar ist. Darüber hinaus wurde ein kausaler Zusammenhang der Endothelzellaktivierung mit den von EHEC in die Kulturüberstände sezernierten Toxinen durch die gewählten Behandlungsmethoden wie z.B. der Ultrafiltration ausgeschlossen. Folglich ist ein bislang unbekannter Faktor der EHEC für die beobachteten Zellreaktionen verantwortlich.

Aus diesen Ergebnissen ergaben sich folgende weiterführende Fragestellungen:

- Welche Eigenschaften besitzt dieser neue von EHEC gebildete, für die Endothelzellstimulation verantwortliche Faktor?
- Bestehen pharmakologische Interventionsmöglichkeiten, selektiv in die endothelialen Signaltransduktionswege im Rahmen der EHEC-Kulturüberstand-induzierten inflammatorischen Prozesse einzugreifen?
- Kann der neue EHEC-Endothelzellstimulans auch andere Zellen stimulieren?

Hinsichtlich der untersuchten biochemischen Parameter des neuen EHEC-Endothelzellstimulans in den Kulturüberständen des Stammes 413/89-1 ergaben sich folgende Hauptbefunde:

- Die sterilfiltrierten EHEC-Kulturüberstände des Stammes 413/89-1 waren nach Ultrafiltration („cut-off“: 3000Da) beinahe unverändert in der Lage, die PtdIns-Hydrolyse in HUVEC zu induzieren. Der neue EHEC-Endothelzellstimulans ist eine niedermolekulare Substanz.
- Der Endothelzellstimulus befindet sich nach der Durchführung der Lipidextraktion nach *Bligh* und *Dyer* in der hydrophilen Fraktion. Die Ergebnisse der Ultrafiltration und der

Lipidextraktion bestätigten sich beim Einsatz der mittels HPLC fraktionierten EHEC-Kulturüberstände.

- Der Einsatz von verschiedenen Rezeptorantagonisten im Versuchsansatz der PI-Response in HUVEC führte zu dem Ergebnis, daß die durch die EHEC-Kulturüberstände des Stammes 413/89-1 ausgelöste Kumulation der Inositolphosphate durch die Koinkubation mit dem Histamin-1 Rezeptorantagonisten Pyrilamin verhindert werden konnte. Eine Stimulation der HUVEC bei Koinkubation von Histamin und Pyrilamin fand nicht statt.
- Eine verminderte Stimulierbarkeit der HUVEC durch Histamin nach Vorinkubation mit dem sterilfiltrierten Kulturüberstand des EHEC Stammes 413/89-1 weist auf eine Belegung des Histaminrezeptors hin.
- Auch tubuläre Epithelzellen sind durch den neuen Endothelzellstimulans des Stammes 413/89-1 stimulierbar.

Zusammenfassend scheint ein niedermolekularer, hydrophiler, hitzestabiler und Proteinase k-sensibler Pathogenitätsfaktor in den Überständen der EHEC-Übernachtskulturen des Stammes 413/89-1 in der Lage zu sein, eine differenzierte Reaktion der Endothelzelle durch Aktivierung präformierter zytoplasmatischer Effektorsysteme auslösen zu können.

Diese nicht durch bekannte Pathogenitätsfaktoren bedingte Endothelzellaktivierung trägt zu den Veränderungen des Gleichgewichts zwischen pro- und antikoagulatorischen Systemen ebenso bei, wie zu einer Dysregulation des Gefäßtonus. Die Affektion des Endothels als pathogenetischer Mittelpunkt bei der Entwicklung des HUS als Komplikation nach einer EHEC-Durchfallerkrankung ist unumstritten. Der neue EHEC-Endothelzellstimulus findet bei der Entstehung der thrombotischen Mikroangiopathie seinen Platz im „Modell“ der EHEC-Erkrankungen bzw. deren Komplikationen.

Diese Arbeit zeigt, daß die EHEC noch nicht endgültig erforschte Krankheitserreger sind. Die Fähigkeit, ihre genetischen Informationen hinsichtlich verschiedenster Pathogenitätsfaktoren intra- und interspezifisch zu vermehren, erfordert eine ständige Überwachung von EHEC-assoziierten Erkrankungen und die Identifikation der beteiligten Stämme, besonders hinsichtlich ihrer Pathogenitätsfaktoren. Die Entdeckung des neuen endothelstimulierenden Faktors des Stammes 413/89-1 zeigt, daß die komplexe Pathogenese der EHEC-Infektionskrankheiten noch nicht vollständig aufgedeckt ist.

Die exakte stoffliche Charakterisierung des neuen EHEC-Endothelzellstimulans wäre die Grundlage für die Entwicklung von effektiven Therapieansätzen bei EHEC-Infektionen und deren schwerwiegenden Komplikationen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Davies, M.G., F.R.C.S.I., M.D., and Per-Otto-Hagen, Ph.D.: The vascular endothelium, a new horizon. *Annals of Surgery* 218:593-609, 1993
2. Jaffe, E.A., ed Biology of the Endothelial Cell. 1st ed. New York: Martinus Nijhoff, 1984
3. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., and Minick, C.R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52:2745, 1973
4. Rodbell, M.: The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284:17-22, 1980
5. Masters, S.B., Stroud, R.M., and Bourne, H.R.: Family of G protein α chains: amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Protein Engineering* 1:47-54, 1986
6. Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56:159-193, 1987
7. Bligh, E. G., and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:753, 1959
8. Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F.: Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212:473, 1983
9. Tesh, V.L., Ramegowda, B., Samuel, J.E.: Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity* 62:5085-5094, 1994
10. Majerus, P.W., Conolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishi, H., Bansal, V.S., and Wilson, D.B.: The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* 234:1519-1526, 1986
11. Irvine, R.F., Letcher, A.J. Heslop, J.R., and Berridge, M.J.: The inositol tris/tetrakisphosphate pathway - demonstration of Ins(1,4,5)P₃ kinase activity in animal tissues. *Nature* 320:6321-634, 1986
12. Tonshoff, B., Momper, R., Kuhl, P.G., Schweer, H., Scharer, K., Seyberth, H.W.: Increased thromboxane biosynthesis in childhood hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 37(4):1134-41, 1990

13. Louise, C.B., Obrig, T.G.: Specific interactions of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 172:1397-401, 1995
14. Needleman, P., Turk J., Jaschick, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowitz, J.B.: Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Immunol.* 2:335-357, 1984
15. Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *E. coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity* 63(3):1055, 1995
16. Hinshaw, L.B.: Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit.-Care-Med.* 24:1072-8, 1996
17. Pötzsch, B., Grulich-Henn, J., Rössing, R., Wille, D. and Müller-Berghaus, G.: Identification of endothelial cells by specific cell markers. *Lab. Invest.* 63:841-52, 1990
18. Obrig, T.G.: Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. *Frontiers in Bioscience* 2 d635-642, 1997
19. Seeger, W. and Lasch, H.G.: Septic Lung. *Rev. Infect. Dis.* 9:570-579, 1987
20. Seeger, W. and Suttorp, N.: Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:462-466, 1988
21. Karch, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A.: Enterohämorrhagische *Escherichia Coli* (EHEC). *Die gelben Hefte* 36:125, 1996
22. Schmidt, H., Maier, E., Karch, H. and Benz, R.: Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur. J. Biochem.* 241:594-601, 1996
23. Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., Fasano, A.: Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173(4):1019-1022, 1996
24. Louise, C.B., Obrig, T.G.: Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Combined cytotoxic effects of Shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infection and Immunity* 60:1536-43, 1992
25. Morigi, M., Micheletti, G., Figliuzzi, M., Imberti, B., Karmali, M.A., Remuzzi, A., Remuzzi, G., Zoja, C.: Verotoxin-1 promotes leukocyte adhesion to cultured endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood* 86:4553-8, 1995

26. Archeson, D.: The family of Shiga and Shiga-like Toxins, Sourcebook of bacterial protein toxins, 1991
27. Nies, A.S.: Prostaglandins and the control of the circulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 39:481, 1986
28. Seeger, W., Suttorp, N., Grimminger, F. and Bhakdi, S.: Bacterial exotoxins and vascular injury. In Schlag, G., Redl, H. (eds): *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, p 427, 1993
29. Majerus, P.W., Conolly, T.N., Bansal, V.S., Inhorn, R.C., Ross, T.C. and Lips, D.L.: Inositol Phosphates: synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.* 263:3051, 1988
30. Fitzpatrick, M.M., Shah, V., Trompeter, R.S., Dillon, M.J., Barratt, T.M.: Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int.* 42:951-956, 1992
31. Kayser, H.F., Bienz, K.A., Eckert, J. and Lindenmann, J.: Allgemeine Bakteriologie: *Medizinische Mikrobiologie*, Stuttgart New York, Thieme-Verlag, S. 79ff., 1993
32. Berridge, M.J.: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315, 1993
33. Sears, C.L., Kaper, J.B.: Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal sekretion. *Microbiological reviews* Mar. 1996:167.
34. Noel, J.M., Boedecker, E.C.: Enterohemorrhagic Escherichia coli: A family of emerging pathogens. *Dig. Dis.* 15:67, 1997
35. Ebel, F., Deibel, C., Kresse, A.U., Guzman, C.A. and Chakraborty, T.: Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by shiga toxin-producing Escherichia coli. *Infection and Immunity* 64:4472, 1996
36. Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., Guerry, P.: Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3093, 1993
37. Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C. and Levine, M.M.: Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87:1450, 1991
38. Nevard, C.H.F., Jurd, K.M., Lane, D.A., Philippou, H., Haycock, G.B. and Hunt, B.J.: Activation of coagulation and fibrinolysis in childhood diarrhea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Thromb. Haemost.* 78:1450, 1997
39. Gordjani, N., Sutor, A.H., Zimmerhackl, L.B., Brandis, M.: Hemolytic uremic syndromes in childhood. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 23:281, 1997

40. Johnson, J.R.: Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Reviews* 80:128, 1991
41. China, B., Pirson, V., Jacquemin, E., Pohl, P., Mainil, J.G. : Pathotypes of bovine verotoxigenic Escherichia coli isotates producing attaching/effacing (AE) lesions in the ligated intestinal loop assay in rabbits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412:311, 1997
42. Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., Phillips, A.D.: Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic Escherichia coli adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infection and Immunity* 66:1570, 1998
43. Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B.: Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7996, 1995
44. Allenberger, F., Solder, B., Caprioli, A., Karch, H.: Enterohämorrhagische Escherichia coli und hämolytisch-urämisches Syndrom. *Wien. Klin. Wochenschrift* 109:669, 1997
45. Salyers, A.A., Whilt, D.D.: Escherichia coli - Gastrointestinal infections aus Bacterial Pathogenesis - A molecular approach, *ASM Press*
46. Yoh, M., Honda, T.: The stimulating effect of fosfomycin, an antibiotic in common use in Japan, on the production/release of verotoxin-1 from enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in vitro. *Epidemiol. Infect.* 119:101, 1997
47. Qadri, S.M., Kayali, S.: Enterohemorrhagic Escherichia coli. A dangerous food-borne pathogen. *Postgrad. Med.* 103:179-80, 185-7, 1998
48. Walterspiel, J.N., Ashkenazi, S., Morrow, A.L., Cleary, T.G.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection* 20:25, 1992
49. Tesh, V.L., O'Brian, A.D.: The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol. Microbiol.* 5:1817. 1991
50. Bockemühl, J., Karch, H., Tschäpe, H.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) in Deutschland 1996. *Bundesgesundheitsbl.* 6/97 S. 193, 1997
51. Mitra, D, Jaffe, E.A., Weksler, B., Hajjar, K.A., Soderland, C., Laurence, J.: Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human mikrovascular endothelial cells. *Blood* 89:1224, 1997
52. Wieler, L.H., Tigges, M., Ebel, F., Schäferkord, S., Djafari, S., Schlapp, T., Baljer, G. and Chakraborty, T.: The enterohemolysin phenotype of bovine Shiga-like toxin-

- producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. *Vet. Microbiology* 52:153, 1996
53. Carson, M.R., Shasby, S.S. and Shasby, D.N.: Histamine and inositol phosphate accumulation in endothelium: cAMP and a G protein. *American Journal of Physiology* 257:L259, 1989
54. Karpman, D., Andreasson, A., Thysell, H., Kaplan, B.S. and Svanborg, C.: Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr. Nephrology* 9:694, 1995
55. Neumann, M. and Urizar, R.: Hemolytic uremic syndrome: current pathophysiology and management. *ANNA Journal* 21: 147, 1994
56. Ito, K. and Shiraga, H.: Advances in the treatment of hemolytic uremic syndrome (HUS). *Nippon Rinsho*. 55:715, 1997
57. Van de Kar, N.C., Monnens, L.A., Karmali, M.A. and van Hinsbergh, V.W.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* 80:2755, 1992
58. Karch, H., Bockemühl, J. und Huppertz, H.I.: Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia Coli* (EHEC). *Dt. Ärzteblatt* 97;A 2314-2318 (Heft 36), 2000
59. Hallcher, L.J., and Sherman, W.R.: The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphate from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255:10896-10901, 1980
60. Brigham, K., Begley, C., Bernard, G., et al: Septicemia and lung injury. *Clin. Lab. Med.* 3:719-744, 1983
61. Seeger, W., Suttorp, N., Grimminger, F. and Bhakdi, S.: Bacterial exotoxins and vascular injury. In Schlag G, Redl H (eds): *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, , p 427, 1993
62. Goldman, D.W., Chang, F.H., Gifford, L.A., Goetzl, E.J., and Bourne, H.R.: Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilisation and function in human polymorphnuclear leucocytes. *J. Exp. med.* 162:145-156, 1985
63. Bradford, P.G., and Rubin, R.P.: Guanine nucleotide regulation of phospholipase C activity in permeabilized rabbit neutrophils. Inhibition by pertussis toxin and sensitization to submicromolar calcium concentrations. *Biochem. J.* 239:97-102, 1986

64. Lew, D.P.: Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur. J. Clin. Invest.* 19:338-346, 1989
65. Bell, R.M.: Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45:631-632, 1986
66. Hallcher, L.J. and Sherman, W.R.: The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphate from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255:10896-10901, 1980
67. Holtzman, M.J.: Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 188-203, 1991
68. Schwertschlag, U., Stahl, T. and Hackenthal, E.A.: Comparison of the effects of prostacyclin and 6-keto-prostaglandin E1 on renin release in the isolated rat and rabbit kidney. *Prostaglandins* 23(1):129-38, 1982
69. Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Steele, B.T.: E. coli cytotoxin haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. *Lancet* 2:1299-1300, 1983
70. Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S., Lior, H.: The association between idiopathic haemolytic uraemic syndrome and infections by verotoxin-producing E. coli. *J. Infect. Dis.* 151:775-782, 1985
71. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.: Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685, 1983
72. Taylor, C.M., Williams, J.M., Lote, C.J., Howie, A.J., Thewles, A., Wood, J.A., Milford, D.V., Raafat, F., Chant, I., Rose, P.E.: A laboratory model of toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 55(4):1367-74, 1999
73. Ruggenenti, P., Remzzi, G.: Pathophysiology and management of thrombotic microangiopathies. *J. Nephrol.* 11(6):300-10, 1998
74. Tschäpe, H., Böhme, G.: Die hämorrhagischen Colitis und das hämolytisch-urämische Syndrom - E. coli als ätiologisches Agens. *Kinderärztl. Praxis* 59:161-65, 1991
75. Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B.: Enteropathogenic Escherichia coli: Minireview. *Infection and Immunity* 60:3953-61, 1992
76. Sonnenberg, M.S., Yu, J., Kaper, J.B.: A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic Escherichia coli to epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175:4670-80, 1993

-
77. Foubister, V., Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Finlay, B.B.: The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infection and Immunity* 62:3038-40, 1994
78. Kaufmann, S.H.E. editor: *Escherichia coli - Gastrointestinal Infections*. In *Host Response to Intracellular Pathogens*; R.G. Landes Company: 190-204, 1997

8. EIGENE PUBLIKATIONEN

Veröffentlichte Abstracts zum Publikationsthema

Comparison of the signal transduction responses following treatment of human endothelial cells with Escherichia coli HlyEHEC and HlyUTEC

F. Rose, C. Bayer, M. Meinhardt, T. Chakraborty, F. Ebel, F. Grimminger and U. Sibelius

Department of Internal Medicine and Microbiological Institute, JLU Gießen.

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie E. V., Jena, Oktober 1997

Enterohemorrhagic Escherichia coli secrete a low molecular weight heat-stable agent - impact on signal transduction in HUVEC

F. Rose, C. Bayer, M. Meinhardt, T. Chakraborty, F. Ebel, F. Grimminger and U. Sibelius

Department of Internal Medicine and Microbiological Institute, JLU Gießen.

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie E. V., Jena, Oktober 1997

Dieses Poster wurde anlässlich des 49. Jahreskongresses 1997 in Jena mit dem Posterpreis des Vorstandes der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) ausgezeichnet.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Christian Bayer
Geburtsdatum/-ort: 30.10.1970 in Heidelberg
Familienstand: verheiratet mit Nadia Bayer, geb. Eboe
1 Kind (Tom Christian, geb. 19.09.2001)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Rosengasse 6c, 35394 Gießen

Schulbildung:

1977 - 1981 Friedrich-Ebert-Grundschule Oftersheim
1981 - 1987 Hebel-Gymnasium Schwetzingen
1987 - 1990 Max-Planck-Schule, Gymnasium Groß-Umstadt, Hochschulreife

Zivildienst/Ausbildung:

09/1990 - 11/1991 Zivildienst, Kreiskrankenhaus Groß-Umstadt, intern. Station
04/1992 - 09/1993 Krankenpflegelehre, Krankenpflegeschule der Städtischen
Kliniken in Darmstadt, abgebrochen wegen Studienbeginn
03/1994 Examen zum Krankenpflegehelfer in Darmstadt

Studium:

10/1993-05/2000 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität
in Gießen; Abschluß mit dem 3. Staatsexamen im Mai 2000

Ärztliche Tätigkeit:

seit 06/2000 Arzt im Praktikum in der chirurgischen Abteilung der Asklepios
Klinik in Lich
seit 12/2001 Wissenschaftlicher Angestellter (Assistenzarzt), urologische
Abteilung im med. Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und
Urologie der JLU-Gießen

Aushilfstätigkeiten:

08/1994 Krankenpflegehelfer im Zentrum für Psychiatrie (JLU)
Sommer 1996 - 1997 Krankenpflegehelfer auf der operativen Intensivstation im med.
Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie (JLU)

Gießen, 2002

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich zuerst bei Prof. Dr. Dr. F. Grimminger bedanken. Er schuf die logistischen und finanziellen Rahmenbedingungen für die Durchführung meiner experimentellen Arbeit. Das positive und produktive Arbeitsklima innerhalb der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ trug einen entscheidenden Teil zum Gelingen meiner Promotionsarbeit bei.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. T. Chakraborty, der die für die Versuche notwendigen Bakterienstämme im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Promotionsarbeit Dr. Frank Rose, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinen Eltern danke ich, weil sie mich stets in meinen Zielen und Plänen unterstützen.

Und der meiste Dank gebührt meiner Frau Nadia. Sie gab mir den Rückhalt und die Energie, die zum Schreiben der Arbeit notwendig waren.