

**Pathogenetische Bedeutung des  
Hämolysins enterohämorrhagischer Escherichia coli  
am Modell humaner Nabelschnur-Endothelzellen**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**des Fachbereichs Medizin**

**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Matthias Meinhardt**

**aus Gießen**

**Gießen 2006**

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin**

**Medizinische Klinik V**

**Leiter Prof. Dr. Dr. F. Grimminger**

**Betreuer: Prof. Dr. Dr. Grimminger**

**Gutachter: PD Dr. Domann**

**Tag der Disputation: 4.12.2006**

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	VORWORT 1
2	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 2
2.1	Die Endothelzelle als wesentlicher Vermittler zwischen Blutbahn und Organen 2
2.2	Die wichtigsten endothelialen Entzündungsreaktionen 2
2.2.1	Signaltransduktion durch Inositolphosphate (IP <sub>x</sub> ) 3
2.2.2	Prostazyklin(PGI <sub>2</sub> )-Synthese 4
2.2.3	Bildung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) 5
2.3	Pathogene Escherichia coli-Bakterien 7
2.3.1	Uropathogene Escherichia coli (UPEC) 7
2.3.2	Enterotoxische E. coli (ETEC) 8
2.3.3	Enteroinvasive E. coli (EIEC) 8
2.3.4	Enteropathogene E. coli (EPEC) 8
2.3.5	Enterohämorrhagische E. coli (EHEC) 9
2.3.6	Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) als Komplikation der EHEC- Erkrankung 11
2.4	Hämolysine bei E. coli-Bakterien und deren bisher bekannte Bedeutung 14
2.5	Fragestellung 19
3	MATERIAL UND METHODIK 20
3.1	Kultur von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) 20
3.1.1	Präparation der Endothelzellen 20
3.1.2	“Splitten” der Endothelzellen 21
3.1.3	Identifizierung der Endothelzellen 21
3.2	Bakterien 22
3.2.1	Herkunft der Bakterien 22
3.2.2	Bakterienkultur 22
3.3	Messung der Inositolphosphate 23
3.3.1	Versuchsablauf und Extraktion der Inositolphosphate 23

## Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Anionenaustausch-Chromatographie	24
3.4	6-keto-Prostaglandin <sub>1α</sub> -Assay-System	24
3.5	Plättchen-aktivierender Faktor	25
3.5.1	Extraktion	25
3.5.2	PAF-Bioassay	26
3.6	Messung der Lactatdehydrogenase (LDH)	27
3.7	Kulturmedien, Zell- und Bakterienkulturmaterial	27
3.8	Agenzien und Pharmaka	28
3.9	Geräte	29
3.10	Experimentelles Protokoll	30
3.11	Statistik	30
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Das EHEC-Hämolysin bewirkt bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) einen signifikanten Anstieg von Inositolphosphaten (IP <sub>x</sub> )	32
4.2	Von den wesentlichen endothelialen Entzündungsmediatoren PAF und Prostazyklin aktiviert das EHEC-Hämolysin die PAF-Synthese, jedoch nicht die Prostazyklin-Synthese	33
4.3	α-Hämolysin uropathogener E. coli (UPEC) bewirkt bei HUVEC einen noch stärkeren Anstieg von Inositolphosphaten als das EHEC-Hämolysin, zeigt jedoch ein anderes Aktivierungsmuster von Entzündungsmediatoren: Es stimuliert bei HUVEC nur begrenzt die PAF-Synthese, jedoch ausgeprägt die Prostazyklin-Synthese	35
4.4	Das α-Hämolysin wird von UPEC überwiegend frei sezerniert, das EHEC-Hämolysin nur in geringem Ausmaß	40
4.5	Die Hämolysine zeigen jeweils eine partielle Tyrosinkinase-Abhängigkeit in der Signaltransduktion	42

## Inhaltsverzeichnis

4.6	Kontrollexperimente	44
4.6.1	Kontrollexperimente mit LDH zeigen, dass die beobachteten Effekte keine Artefakte durch die lange Versuchsdauer sind	44
4.6.2	Kontrollexperimente mit Acetylsalicylsäure zeigen, dass die Methode der Prostazyklin-Messung die Prostazyklin-Konzentration im Versuchsaufbau erfasst	45
5	DISKUSSION	46
5.1	Das EHEC-Hämolysin bewirkt bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) einen signifikanten Anstieg von Inositolphosphaten (IP <sub>x</sub> ) und steuert damit die bakterielle Adhäsion	47
5.2	Das EHEC-Hämolysin fördert durch eine Induktion der PAF-Synthese ohne gleichzeitige Prostazyklin-Synthese die Ausbildung der hämorrhagischen Kolitis	52
5.3	Das $\alpha$ -Hämolysin uropathogener E. coli (UPEC) bewirkt bei HUVEC einen im Vergleich zu Hly <sub>EHEC</sub> noch stärkere Signaltransduktion, welche ebenfalls eine wesentliche Aktivierungsfunktion in der Pathogenese hat: Die endotheliale Entzündungsreaktion wird jedoch beim $\alpha$ -Hämolysin im Gegensatz zum EHEC-Hämolysin mehr über eine ausgedehnte Prostazyklin-Synthese als über eine PAF-Synthese vermittelt	55
5.4	$\alpha$ -Hämolysin wird frei, EHEC-Hämolysin überwiegend kontaktabhängig sezerniert	60
5.5	Sowohl Hly <sub>EHEC</sub> als auch $\alpha$ -Hämolysin involvieren in der Signaltransduktion Tyrosinkinase; für das $\alpha$ -Hämolysin deutet sich dabei eine wesentliche Bedeutung für die Invasivität von UPEC an	64
5.6	Übersicht: Die Relevanz des EHEC-Hämolysins für die Pathogenese des EHEC-Krankheitsbildes besteht in Synergismus mit dem Shiga-like-Toxin und bisher unbekanntem Steuerungsfunktionen, die über die lokale Wirkung hinausgehen	69

## Inhaltsverzeichnis

6	ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	84
	LITERATURVERZEICHNIS	87
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	108
	LEBENS LAUF	109
	VERÖFFENTLICHUNGEN	110
	DANKSAGUNG	111
	ERKLÄRUNG	112

## 1. VORWORT

Enterohämorrhagische E. coli (EHEC) haben in den letzten Jahren aufgrund gehäuft aufgetretener Fälle öffentliche und wissenschaftliche Aufmerksamkeit erregt. Problematisch bei dieser Infektion ist das oft schwer verlaufende Krankheitsbild mit der Entwicklung des so genannten hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS). Das Wissen über diese Gruppe von Bakterienstämmen hat inzwischen wesentlichen Zuwachs erhalten. Unter anderem wurde ein Exotoxin neu charakterisiert, das für EHEC spezifische Hämolysin. Dieses stand auch im Mittelpunkt der vorliegenden eigenen Untersuchungen. Ziel der Experimente war es dabei, die funktionelle Bedeutung des Toxins zu vergleichen mit dem länger bekannten und ausführlich untersuchten, in der Struktur sehr ähnlichen  $\alpha$ -Hämolysin uropathogener E. coli. Da bei einer EHEC-Infektion mit hämolytisch-urämischem Syndrom primär der Endothelschaden im Vordergrund steht, wurde ein in-vitro-Modell mit humanen Endothelzellen (humane Nabelschnurendothelien/HUVEC) und dem Einfluss des Toxins auf deren wichtigste Stoffwechselfunktionen gewählt.

Der experimentelle Teil der Dissertation wurde in der Zeit von Dezember 1995 bis Juni 1996 in dem Laborbereich der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ unter der Anleitung von Herrn Dr. Frank Rose in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Dr. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin (Leiter Prof. Dr. W. Seeger) durchgeführt. Von April 1996 bis Dezember 1996 beschäftigte ich mich darüber hinaus (siehe Publikationsverzeichnis im Anhang) in der gleichen Arbeitsgruppe mit angrenzenden Fragestellungen, insbesondere der weiteren funktionellen Charakterisierung des  $\alpha$ -Hämolysins als auch der Frage weiterer ähnlich wirkender Pathogenitätsfaktoren von EHEC.

## **2. EINLEITUNG**

### **2.1 Die Endothelzelle als wesentlicher Vermittler zwischen Blutbahn und Organen**

Sämtliche Blutgefäße sind mit einem einschichtigen Epithel ausgekleidet. Daraus ergibt sich, dass der Zugang zu Geweben und Organen beziehungsweise der Abtransport von gelösten Substanzen aller Art, Stoffwechselprodukten, Hormonen, Zellen und auch von fremden Substanzen und Erregern unabdingbar unter engem Kontakt an der Endothelzelle vorbeiführt. Modellversuche mit Endothelzellen sind daher grundsätzlich für die Untersuchung aller Effekte geeignet, die über die Blutbahn vermittelt werden.

Tatsächlich konnte in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Endothelzellen weit mehr als eine bloße Abdichtungsschicht sind und aktiv in lokale Prozesse eingreifen. Dabei spielen sie eine Rolle bei der Blutdruckregulation, bei entzündlichen und immunologischen Prozessen sowie bei der Vermittlung und Steuerung von Gerinnungsvorgängen.

Die Gefäßkontraktion wird reguliert über vasokonstriktive Faktoren wie Thromboxan, Angiotensin II, Endothelin und Sauerstoffradikale und vasodilatative Faktoren wie PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, NO und EDHF. Die Endothelzelle kann verschiedene Entzündungsmediatoren synthetisieren sowie über die Bildung von Adhäsionsmolekülen die Durchwanderung von Entzündungszellen zum Entzündungsherd fördern [1].

Endothelzellen können über die Produktion der Lipidmediatoren Thromboxan, des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) die Plättchen-Adhärenz und -aktivierung regulieren. Sie produzieren mit Plasminogen-Aktivator, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, Gewebefaktor, Protein S und Faktor V Faktoren, die sowohl gerinnungsfördernd als auch -hemmend in Gerinnungsvorgänge eingreifen.

Die Endothelzelle ist damit auch geeignetes Untersuchungsobjekt bei systemischen Infektionen, weil sie nach Streuung des Erregers oder dessen Toxinen in die Blutbahn den unmittelbaren Angriffspunkt der Erkrankung darstellt.



## 2.2 Die wichtigsten endothelialen Entzündungsreaktionen

### 2.2.1 Signaltransduktion durch Inositolphosphate (IP<sub>x</sub>)

Die Signaltransduktion stellt ein Maß für die grundsätzliche Aktivierung der Zelle dar und ist erster Schritt für die Veranlassung weiterer Stoffwechselfunktionen. Einer der Hauptwege dabei ist die Bildung von Inositolphosphaten (Abb.1).

Die Aktivierung der Endothelzelle beginnt mit der Bindung verschiedener Mediatoren an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Weiterleitung in das Zellinnere erfolgt über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) [2,3]. Bei G-Proteinen gibt es stimulierende (G<sub>s</sub>-)Typen, die das Signal weiterleiten, oder hemmende (inhibitorische G<sub>i</sub>-)Typen. G-Proteine sind aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zusammengesetzt, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit die letztendliche Funktion ausübt. An sie ist im inaktiven Zustand GDP gebunden. Bei Bindung eines ein Signal auslösenden Moleküls an den Rezeptor

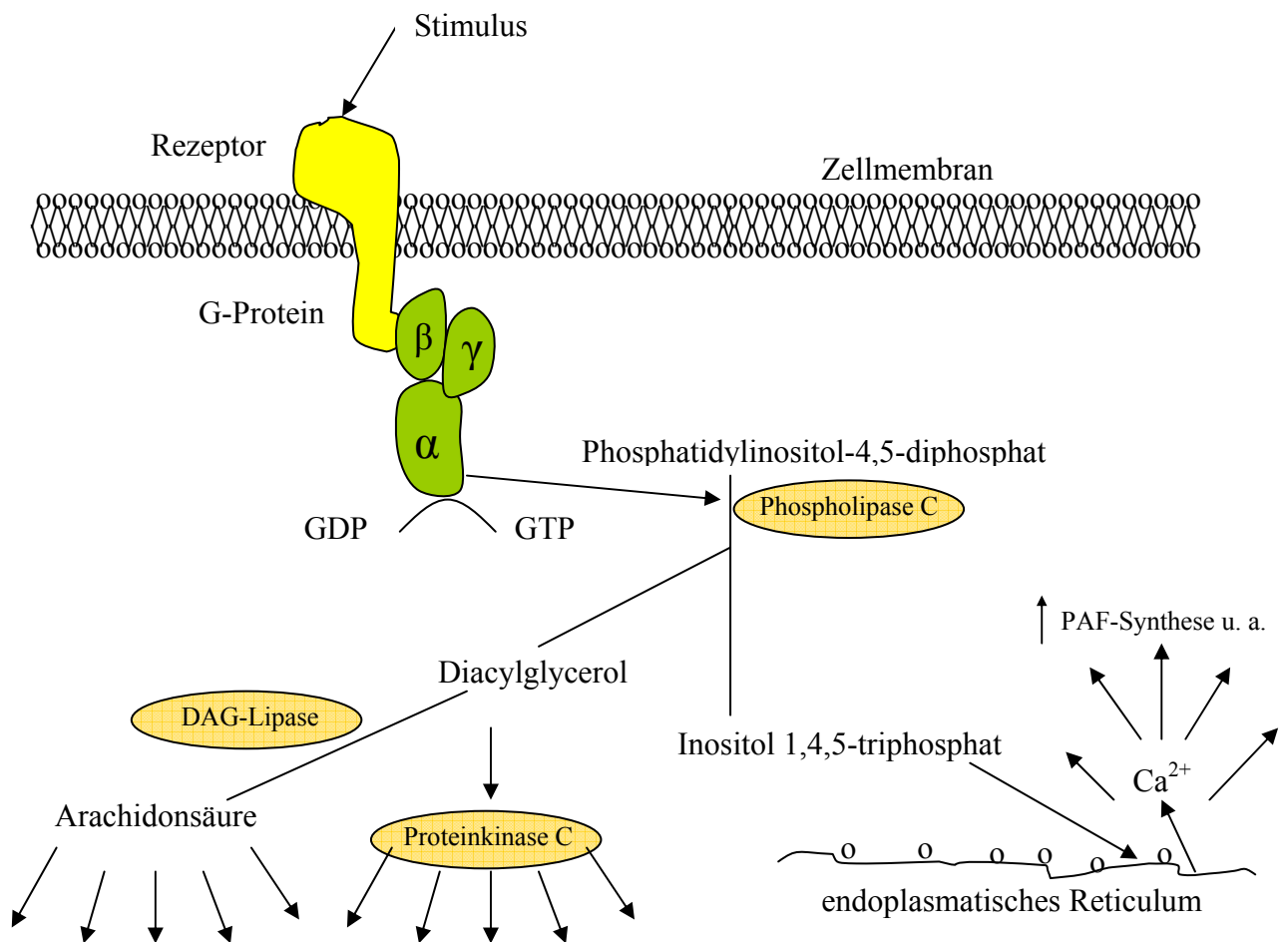


Abb. 1: Signaltransduktion durch Inositolphosphate (IP<sub>x</sub>)

## Einleitung und Fragestellung

wird das GDP dort durch GTP ausgetauscht. Die  $\alpha$ -Untereinheit löst sich dadurch vom restlichen  $\beta\gamma$ -Komplex und löst weitere Enzymsysteme aus. Anschließend wird das GTP durch die  $\alpha$ -Untereinheit wieder zu GDP hydrolysiert, die wieder an den  $\beta\gamma$ -Rest bindet. [4].

G-Proteine aktivieren unter anderem die Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C. Diese bildet durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PtdIns 4,5 P<sub>2</sub>) die second messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-triphosphat (Ins 1,4,5 P<sub>3</sub>) [5,6].

Inositol-1,4,5-triphosphat bindet wiederum an einen Rezeptor auf der dem Zytoplasma zugewandten Oberfläche des endoplasmatischen Reticulums und verursacht einen raschen intrazytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg [7]. Ca<sup>2+</sup>-Ionen wiederum beeinflussen direkt oder indirekt eine Vielzahl weiterer zellulärer Effektorsysteme (unter anderem die PAF-Synthese, Lipoxy- und Cyclooxygenase) [8,9].

Das gebildete Diacylglycerol aktiviert eine spezifische Proteinkinase C, welche ebenfalls zahlreiche Proteine unterschiedlicher Funktion aktivieren kann. Außerdem kann durch eine DAG-Lipase Arachidonsäure abgespalten werden, welche die Ausgangssubstanz für zahlreiche Lipidmediatoren ist (s.u.).

Die Inositolphosphate werden durch verschiedene Phosphatasen dephosphoryliert, wobei ein Teil dieser Phosphatasen durch Li-Ionen hemmbar ist [6].

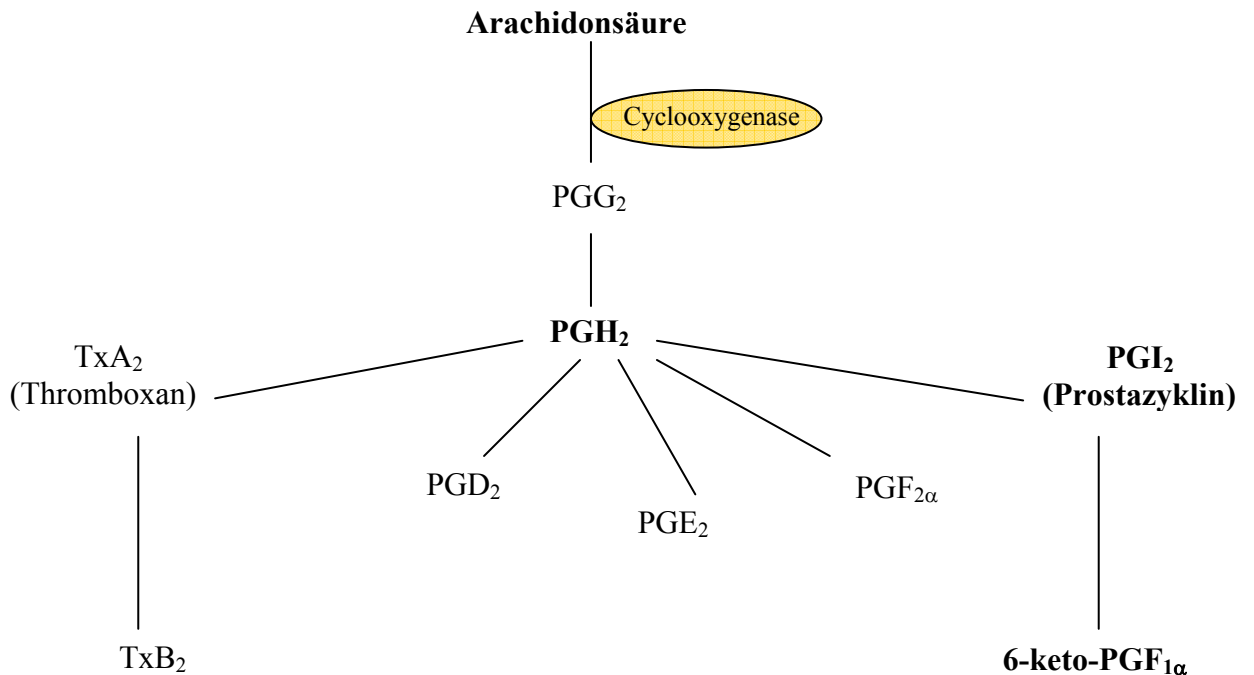
### **2.2.2 Prostazyklin(PGI<sub>2</sub>)-Synthese**

Mit der wichtigste von Endothelzellen gebildete Mediator ist Prostazyklin, welches 1976 entdeckt wurde. Bei den aus der Arachidonsäure gebildeten Lipidmediatoren lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden: Verschiedene Lipoxygenasen stehen am Anfang der Bildung von Leukotrienen und Hydroxyeicosatetraensäuren [10]. Die zweite Gruppe umfasst die Prostaglandine und Thromboxan, erstes Enzym ist hier die Cyclooxygenase [9]. Zu den Prostaglandinen gehört unter anderem Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>). Prostazyklin hemmt Granulozyten und Thrombozyten in ihrer Funktion, außerdem wirkt es relaxierend auf Bronchien und Gefäße und wirkt damit der Wirkung des Thromboxans entgegen. Die Produktion von Prostazyklin selbst wird z. B. durch Endothelin oder Thrombin in den Endothelzellen induziert, wobei die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung dabei eine wesentliche Bedeutung hat, u. a. durch den Einfluss auf die Cyclooxygenase [11, 12].

## Einleitung und Fragestellung

Beim Cyclooxygenase-Weg (Abb. 2) entstehen aus der Arachidonsäure zunächst die kurzlebigen Endoperoxide PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub>.

PGH<sub>2</sub> ist zentrale Ausgangssubstanz für die Entstehung der Prostaglandine und des Thromboxans. Abbauprodukt des Prostazyklins ist das 6-keto-PGF<sub>1α</sub>.



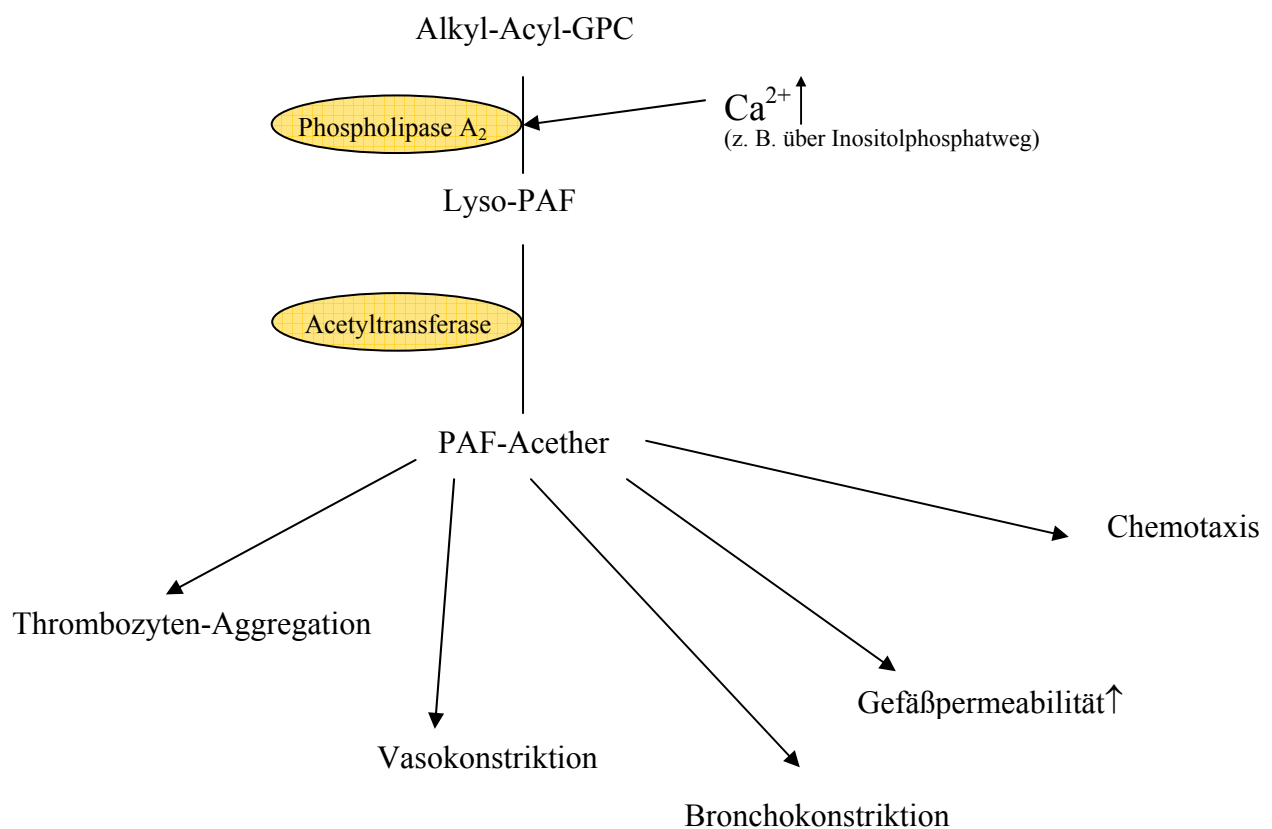
**Abb. 2:** Bildung und Abbau von Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>).

### **2.2.3 Bildung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)**

Der zweite wichtige von Endothelzellen gebildete Lipidmediator ist der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF), ein Phospholipid, welches auch von Thrombozyten gebildet wird [13]. PAF spielt bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle: akute Entzündungen, Endotoxinschock, akute und chronische pulmonale Hypertension, akute allergische Erkrankungen (Asthma bronchiale), adult respiratory distress syndrome (ARDS), Transplantatabstoßung, gastroduodenale Ulzera [14,15,16]. In Tierexperimenten konnten viele verschiedene Wirkungen nachgewiesen werden. In der Lunge kommt es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität mit Ausbildung eines Lungenödems, außerdem zu einer Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes und einer Bronchokonstriktion mit Ventilationsstörungen, Perfusionsstörungen und Shuntbildung [17,18,19,20].

## Einleitung und Fragestellung

PAF wird überwiegend intrazellulär in stimulierten Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen synthetisiert [21,22]. Ausgangssubstanz für die Synthese ist das membrangebundene Phospholipid 1-Alkyl-2-Acyl-Glycerophosphocholin (Alkyl-Acyl-GPC), welches Arachidonsäure gebunden hat. Bei erhöhtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel kommt es zur Aktivierung der Phospholipase  $\text{A}_2$ , welche durch Hydrolyse Lyso-PAF bildet. Im zweiten Schritt entsteht durch eine membranständige Acetyltransferase PAF-Acether. Zur Wirkung kommt es über spezifische PAF-Rezeptoren, die wiederum auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten Endothelzellen und im Lungengewebe nachweisbar sind [23,24,25,26]. Die Aktivierung der Zelle wird in allen genannten Fällen über die oben beschriebene Hydrolyse des Inositolphosphats PtdIns 4,5- $\text{P}_2$  vermittelt mit der Bildung der second messenger  $\text{IP}_3$  und DAG [27,28]. Als letztendliche Wirkungen sind außer den oben genannten in vitro die Auslösung einer Thrombozyten-Aggregation, eine Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Endothelzellen mit Zunahme des Arachidonsäure-Metabolismus sowie die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen worden [23,29,30].



**Abb. 3:** Bildung und Wirkung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF).

## **2.3 Pathogene Escherichia coli-Bakterien**

Escherichia coli, die zu den gramnegativen Bakterien gehören, sind insgesamt sehr häufig für Infektionskrankheiten beim Menschen verantwortlich. Bei den humanpathogenen Stämmen lassen sich grundsätzlich zwei Gruppen unterscheiden: Zum einen gibt es Erregerstämme, die bevorzugt Harnwegsinfektionen verursachen, zum anderen die Gruppe der darmpathogenen Stämme. Entscheidend für die Auslösung eines bestimmten Krankheitsbildes ist wie bei allen pathogenen Bakterien die den verschiedenen Stämmen eigene Ausstattung mit sogenannten Pathogenitätsfaktoren, die eine direkte Wirkung auf den Organismus ausüben oder die Wirkung anderer Faktoren erst ermöglichen. Erste Bedingung oder wesentliche Begünstigung für eine Wirkung des Bakteriums auf den Zielorganismus ist meist der enge Kontakt und die Anheftung an die Zielzelle durch sogenannte Adhäsine. Als nächster Schritt finden sich Faktoren, die Veränderungen innerhalb der Zelle verursachen. Als ein dritter Schritt der Infektion sind Faktoren zu sehen, die nach Eindringen in die Blutbahn eine Wirkung auch auf andere Organe des infizierten Organismus erreichen. Nach diesen Pathogenitätsfaktoren bzw. funktionellen Gesichtspunkten werden pathogene E. coli verschiedener Serotypen in die folgenden Hauptgruppen eingeteilt:

### **2.3.1 Uropathogene Escherichia coli (UPEC)**

Über 80 % aller ambulant erworbenen Harnwegsinfektionen werden von E. coli-Stämmen verursacht bei Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes. Dabei ist die vorherige Besiedlung des Darmes zunächst eine wichtige Voraussetzung für die Besiedlung der Urethra. Eine Schlüsselfunktion ist dann die Fähigkeit der Bakterien, sich gegen den ständigen Spüleffekt an die Blasenwand anzuheften. Eine Reihe von Adhäsinen ist inzwischen entdeckt worden, insbesondere sogenannte P-Pili. Diese binden an spezifische Rezeptoren des Urothels, bestehend aus dem Disaccharid Globobiose und dem membrangebundenen Lipidanteil, einem Ceramid. Harnwegsinfektionen sind charakterisiert durch eine ausgeprägte lokale Entzündungsreaktion. Eine Hypothese ist, dass in der Bakterienwand gebundene Lipopolysaccharide zusammen mit den oben erwähnten P-Pili diese Antwort hervorrufen. Uropathogene E. coli produzieren als Exotoxin ein sogenanntes Hämolysin, welches speziell bei diesen Stämmen als  $\alpha$ -Hämolysin bezeichnet wird (s. u.). Dieses ist inzwischen ausgedehnt untersucht worden und zeigt zahlreiche

insbesondere systemische Wirkungen; die konkrete Bedeutung für aufsteigende Harnwegsinfektion ist bisher jedoch noch nicht geklärt (s. u.).

### **2.3.2 Enterotoxische E. coli (ETEC)**

Sogenannte enterotoxische E. coli rufen ein der Cholera ähnliches Krankheitsbild hervor, wobei es zu Durchfall, begleitet von Erbrechen und Fieber kommt. Dabei bilden die an die Mucosazellen angehefteten Bakterien den Durchfall verursachende Toxine, ohne jedoch eine ausgeprägte Entzündungsreaktion oder erkennbare histologische Veränderungen zu verursachen. Die Krankheit kann bei Kleinkindern einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen und ist eine häufige Todesursache von Kleinkindern in vielen Entwicklungsländern. Erwachsene in diesen Ländern haben offensichtlich eine gewisse Immunität entwickelt, Reisende aus Ländern ohne häufiges Vorkommen von ETEC-Infektionen sind jedoch empfindlich, weswegen die Erkrankung im Erwachsenenalter üblicherweise als Reisediarrhö bezeichnet wird.

ETEC produzieren zwei Typen von Toxinen, ein choleraähnliches sogenanntes hitzelabiles Toxin (LT: heat-labile toxin) und ein zweites hitzestabiles Toxin (HT: heat-stable toxin).

### **2.3.3 Enteroinvasive E. coli (EIEC)**

Enteroinvasive E. coli (EIEC) sind benannt nach ihrer Eigenschaft, aktiv in Mukosazellen des Darms einzudringen und sich in die benachbarten Zellen auszubreiten. Dabei kommt es zu deutlichen histologisch erfassbaren Veränderungen mit Verlust der Mikrovilli. Das Krankheitsbild ist der durch Shigellen verursachten Ruhr sehr ähnlich mit blutigen Durchfällen. Shigellen produzieren jedoch ein zusätzliches spezifisches Toxin, welches in ähnlicher Struktur auch von EHEC, aber nicht von EIEC produziert wird. Diese Eigenschaft macht vermutlich den Hauptunterschied der Symptomatik von EHEC und EIEC-Infektionen aus (s. u.).

### **2.3.4 Enteropathogene E. coli (EPEC)**

Enteropathogene E. coli rufen ebenfalls insbesondere bei Kleinkindern in Entwicklungsländern ein Krankheitsbild mit ausgedehnten und anhaltenden Durchfällen hervor, welches dort nicht selten einen schweren bis tödlichen Verlauf nimmt.

Enteropathogene E. coli (EPEC) sind benannt nach ihrer Eigenschaft, deutliche Veränderungen an der Ultrastruktur von Mucosazellen des Darms hervorzurufen. Dabei

kommt es zur Anheftung von Bakterien an die Zelloberfläche, was einerseits zu einem Verlust von Mikrovilli an den Stellen führt, an dem die Bakterien binden und andererseits zu einer Elongation an angrenzenden Abschnitten. Dieser Vorgang wird „attaching and effacing“ benannt und ist das Ergebnis einer ausgedehnten Umstrukturierung von Aktin der infizierten Zelle. Die Aktin-Filamente akkumulieren dabei unterhalb des Bakteriums und verzerren die Zellmembran, resultierend in der Bildung von charakteristischen Becher-ähnlichen Sockeln [31,32]. Ein 94 kD großes Protein der äußeren Bakterienmembran, Intimin, ist essentiell für die Adhärenz des Bakteriums an Epithelzellen und für die beobachtete (oberflächliche) Invasion [33]. Intimin bindet an einen Rezeptor der Wirtszelle, Tir (translocated intimin receptor), ein 90 kD großes Protein, welches nach neueren Erkenntnissen bakteriellen Ursprungs ist und vom Bakterium in die Zellmembran integriert wird. Bedeutung bei der Ausbildung dieser „attaching and effacing“(abgekürzt „**AE**“)-Läsion haben auch verschiedene Signaltransduktions-Mechanismen.

1990 wurde bei EPEC ein Gen-Lokus nachgewiesen, der notwendig ist für die Ausbildung der Veränderungen [34,35]. Dieser Locus, *eae* (früher *eaeA*) genannt, codiert Intimin [33] und liegt innerhalb einer breiten (35-kb) Region im EPEC-Chromosom, die alle Virulenz-Determinanten der bekannten AE-Läsions-Bildung codiert und LEE (locus for enterocyte effacement) benannt wurde [36]. Innerhalb der LEE-Region sind weitere Gene charakterisiert worden, u. a. *espB* (früher *eaeB*), welches Bedeutung für die Signaltransduktion besitzt (s. u.) [37].

### **2.3.5 Enterohämorrhagische E. coli (EHEC)**

Insbesondere enterohämorrhagische Escherichia coli-Bakterien (EHEC) sind in den letzten Jahren wegen einiger gehäuft aufgetretener Fälle und ihres besonders bei Kleinkindern oft schwer verlaufenden Krankheitsbildes in den Blickpunkt gerückt. Die Symptomatik und Schwere des Krankheitsbildes von EHEC lässt sich dabei in weiten Teilen durch spezielle hochwirksame Pathogenitätsfaktoren erklären (s. u.). Das durch EHEC hervorgerufene Krankheitsbild wird dabei überwiegend durch einen einzelnen Stamm und Serotyp, O157:H7, hervorgerufen, weitere sind O26:H11 und andere Stämme. Enterohämorrhagische E. coli rufen zunächst eine der *Shigellen*-Infektion ähnliche hämorrhagische Kolitis mit schweren blutigen Durchfällen hervor. Entscheidend für den Krankheitsverlauf ist jedoch eine über die lokale Darmmanifestation hinausgehende Komplikation in einem Teil der Fälle (beim

## Einleitung und Fragestellung

klassischen Serotyp zwischen 9-30%), das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), bei dem es zu akutem Nierenversagen zum Teil mit tödlichem Verlauf kommt (s.u.).

EHEC bewohnen asymptomatisch den Darm von Vieh, speziell von Kälbern und Färsen [38]. Die meisten Krankheitsfälle sind daher offenbar verursacht durch kontaminierte Lebensmittel, insbesondere Rinderhackfleisch (Hamburger) [39, 40]. In einzelnen Fällen wurde über eine Infektion durch unpasteurisierte Milch [41], verunreinigtes Trinkwasser und durch Kuhdung kontaminierte Pflanzen [42,43] berichtet. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist jedoch offensichtlich auch möglich [44] und erklärt die meisten sporadischen Fälle des hämolytisch-urämischen Syndroms.

Enterohämorrhagische *E. coli* besitzen ebenfalls den LEE-Locus und zeigen ebenfalls das Phänomen der Anheftung und dem Verlust beziehungsweise der Elongation von Mikrovilli (AE-Läsion), wie dies bei enteropathogenen *E. coli* gesehen wird [45,46,47]. Anders als bei Shigellen oder den ein ähnliches Krankheitsbild hervorrufenden enteroinvasiven *E. coli* kommt es dabei vermutlich nicht zu einer tieferen Invasion des Erregers in die Wirtszelle. Die Wirkung wird hier vielmehr über hochwirksame Toxine erzielt [48]:

EHEC produzieren ein dem von *Shigellen* produzierten Toxin ähnliches Exotoxin, das sogenannte Shiga-like-Toxin (SL-Toxin oder SLT), auch Verotoxin genannt, weil es sich extrem zytotoxisch gegenüber kultivierten Vero-Zellen (Nierenzellen von afrikanischen Grünaffen) verhält. Es sind zwei verschiedene Typen bekannt sind, nämlich SLT-1 und SLT-2, wobei außerdem verschiedene Varianten existieren. SLT-2 hat eine deutlich größere Toxizität und Stämme, die überwiegend SLT-2 produzieren, scheinen virulenter zu sein [49]. EHEC produzieren im Allgemeinen beide Typen von SLT [49].

Die SL-Toxine werden als wesentliche Ursache für die schwere lokale Entzündungsreaktion im Darm sowie die systemischen Komplikationen bei EHEC-Infektionen angesehen. Obwohl sie nicht erforderlich sind für die Initiierung des Durchfalls, verursachen sie meistens die hämorrhagischen und ulzerativen intestinalen Läsionen durch Zerstörung des Mikrogefäßsystems der Darmwand [48].

Neben diesen bekannten und ausführlich untersuchten Faktoren wurde in jüngerer Zeit ein neues, für EHEC spezifisches Exotoxin, ein sogenanntes Hämolysin, entdeckt und in der Folgezeit seine Struktur und genetische Grundlage in weiten Teilen aufgeklärt



(s. u.). Das Hämolysin wird auf einem großen 90 kbp-Plasmid, genannt pO157, kodiert und hat große strukturelle Ähnlichkeit zum  $\alpha$ -Hämolysin der uropathogenen *E. coli*. Es scheint ein wichtiger Pathogenitätsfaktor zu sein, auch für eine klinische Relevanz gibt es inzwischen zahlreiche Hinweise. Weiterhin wenig bekannt ist jedoch bisher über die Wirkungsweise und den Beitrag dieses Hämolysins zum EHEC-Krankheitsbild, insbesondere des hämolytisch-urämischen Syndroms.

### **2.3.6 Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) als Komplikation der EHEC-Erkrankung**

#### **Klinik des hämolytisch-urämischen Syndroms**

Gasser et al. schufen den Begriff „hämolytisch-urämisches Syndrom“ (HUS) mit der Erstbeschreibung 1955. Beim HUS findet sich die Symptomentriade einer mikroangiopathischen-hämolytischen Anämie, einer Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen [50]. Die ersten beiden Symptome können auch mild ausgeprägt sein oder fehlen, das akute Nierenversagen schwankt zwischen Mikrohämaturie und irreversiblen Nierenversagen, wobei bei ca. 60 % der Patienten eine durchschnittlich eine Woche dauernde Oligurie besteht, bei der Hälfte eine Anurie über drei Tage [51,52,53]. Es betrifft vor allem Säuglinge und Kleinkinder, doch auch ältere Kinder und Erwachsene können darunter leiden. Das hämolytisch-urämische Syndrom ist dabei die häufigste Ursache für akutes Nierenversagen bei Kleinkindern. In ca. 90 % gehen blutige Durchfälle voraus (klassisches HUS) [53], verbunden mit einer enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)-Infektion, ansonsten kann das Syndrom auch sekundär bei einer Vielfalt von Medikamenten, Malignomen, systemischen Störungen, Glomerulopathien und in der Schwangerschaft auftreten.

Als Prodromi kommen neben den gastrointestinalen auch Beschwerden im Respirationstrakt vor.

Das HUS kann kompliziert werden durch andere Bedingungen, speziell eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und das dem HUS verwandte Syndrom der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP). Die TTP tritt meistens bei Erwachsenen auf und zeigt eine neurologische Symptomatik, und obwohl sie durch eine durch EHEC bedingte hämorrhagische Kolitis initiiert werden kann, sind Durchfälle als Prodromi ungewöhnlich.

## Einleitung und Fragestellung

Die Mortalität des HUS liegt bei etwa 5 %, etwa in der gleichen Häufigkeit kommt es zu einer terminalen Niereninsuffizienz oder einem chronischem Hirnschaden und in etwa 30-50 % besteht ein leichter chronischer Nierenschaden [53]. Insgesamt sind blutige Durchfälle bei stationärer Aufnahme ein Marker von eher schweren Krankheitsverläufen und schlechterer Prognose [54,55].

## **Ätiologie des HUS**

In jüngerer Zeit wurden die Gründe für die gastrointestinalen Symptome beim HUS ausführlich untersucht. In den späten 70er Jahren entdeckten Konowalchuk et al. [56], dass einige Stämme von *E. coli* bestimmte Exotoxine produzieren, die eng verwandt sind mit dem 70 kDa-Protein, welches in der DNA von *Shigella dysenteriae* codiert wird. Die klinische Signifikanz von diesen Toxinen, Shiga-like-Toxine oder Verotoxine genannt, blieb ungewiss, bis 1983, als Riley et al. zwei Ausbrüche von hämorrhagischer Kolitis beschrieben, verursacht durch Hamburger, die kontaminiert waren mit einem seltenen *E. coli*-Serotyp, heute bekannt als O157:H7 [40]. Im gleichen Jahr erkannten Karmali et al. zum ersten Mal die Assoziation zwischen den SL-Toxinen, die von diesen Bakterien produziert wurden und dem HUS, indem sie SL-Toxin-produzierende *E. coli* (SLTEC bzw. EHEC oder VTEC für „Verotoxin produzierende *E. coli*“) in 11 von 15 Fällen von sporadischem HUS nachwies [57]. Inzwischen ist klar, dass VTEC/EHEC assoziiert sind mit einem Spektrum von Krankheitsbildern, welches eine asymptomatische Infektion, eine unkomplizierte Diarrhö, eine hämorrhagische Kolitis und das HUS einschließt.

Die meisten Informationen über EHEC wurden gewonnen von Studien des O157:H7-Serotyps, außerdem sind inzwischen über 50 andere non-O157-Serotypen bekannt, die dieses Krankheitsbild beim Menschen verursachen. Den verschiedenen Serotypen beim HUS gemeinsam ist jedoch die Produktion des SL-Toxins (über 90 % der Fälle, 70 % mit dem Serotyp O157:H7), welches damit offenbar für HUS wesentlich ist [57,58,59,60].

Länger bekannt ist auch die Produktion eines Hämolsins bei den meisten Stämmen (siehe Diskussion), deren Bedeutung jedoch bisher unklar war.

Beim HUS liegt anscheinend in 100 % der Fälle mit blutigem Durchfall eine EHEC-Infektion vor, die ebenfalls zumeist durch den klassischen Serotyp verursacht werden [61], während SL-Toxin produzierende *E. coli* von anderen Serotypen meistens mit nicht-blutigem Durchfall [62] assoziiert sind.

### **Pathomechanismus des HUS**

Der charakteristische Befund, die thrombotische Mikroangiopathie [63], ist einzigartig für dieses Syndrom und besteht aus Gefäßwandverdickung der Kapillaren und Arteriolen mit Schwellung und Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran und Akkumulation von lockerem Material im Subendothel. Die endotheliale Dysfunktion scheint ein wesentlicher Faktor in der Sequenz von Ereignissen zu sein, die zu dem mikroangiopathischen Prozess führen. Übereinstimmend mit dieser Interpretation sind Daten, dass die meisten mit der Krankheit assoziierten Agenzien, zum Beispiel bakterielle Endotoxine, Verotoxine, Antikörper und Immunkomplexe sowie gewisse Medikamente toxisch auf endotheliale Zellen wirken.

Das SL-Toxin bindet an spezifische Glykolipid-Rezeptoren. In Folge kommt es zur Endozytose und letztlich zur Hemmung der Proteinsynthese durch ein Toxin-Fragment [64], wodurch die Zellen absterben oder zumindest schwer geschädigt werden.

Die Zytotoxizität und Sensitivität gegenüber dem Toxin wird über körpereigene Entzündungsmediatoren wie dem Tumornekrosefaktor (TNF), Stickoxid (NO) und verstärkte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und auch über Freisetzung der in der Bakterienwand gebundenen Endotoxine verstärkt (siehe Diskussion).

Über Bindung von Thrombozyten am geschädigten Endothel und Aggregation entsteht dann offenbar eine Thrombozytopenie, die allerdings selten so schwer ist, dass sie eine Purpura oder andere Blutungen verursacht.

Weiterhin kommt es zur Fragmentierung der Erythrozyten und damit zur hämolytischen Anämie, einerseits vermutlich durch Scherkräfte beim Durchtritt durch die geschädigten Gefäße, die partiell durch Fibrin und Plättchenthromben verschlossen sind, andererseits durch das von EHEC produzierte Hämolysin, wobei bisher nicht bekannt ist, welcher dieser beiden Mechanismen hierbei überwiegt.

Die thrombotische Mikroangiopathie, die als erstes im Darm auftritt, ist ähnlich zu der, die später in den Nieren gefunden wird. Nachdem die Darm-Blut-Barriere durch den ischämischen Schaden gestört ist, gelangen Shiga-like-Toxine und andere bakterielle Produkte, z. B. Lipopolysaccharide (LPS), in die Blutzirkulation [61]. Gefäßschäden beim HUS und der verwandten thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), deren neurologische Symptome infolge von Plättchen-Aggregation und Obstruktion der zerebralen Mikrozirkulation zu erklären sind, sind mehr oder weniger identisch. Die Läsionen zeigen außerdem große Ähnlichkeit zu den mikrovaskulären Läsionen der Sklerodermie und der malignen Hypertension [65].

Auch wenn insgesamt ein Großteil der Phänomene beim HUS mit den bisher etablierten Pathogenitätsfaktoren erklärt werden können, bestehen dabei jedoch noch Lücken, für die bisher weitere Faktoren gesucht wurden.

## **2.4 Hämolsine bei E. coli-Bakterien und deren bisher bekannte Bedeutung**

Stämme von E. coli, die eine extraintestinale Manifestation verursachen, haben meist die Fähigkeit zur Lyse von Erythrozyten verschiedener Säugetierarten [66, 67]. Dieses „Hämolyse“ genannte Phänomen konnte schon lange vor der Kenntnis der zugrunde liegenden Mechanismen auf Bakterienkulturplatten beobachtet werden. Verantwortlich dafür sind bakterielle Exotoxine, die aufgrund dieser Eigenschaft als **Hämolsine** bezeichnet werden. Sie gehören zur Gruppe der RTX-Toxine, welche benannt sind nach der Wiederholung von Aminosäuresequenzen im Protein (repeats in toxin). Diese können eine Pore in der Membran von eukaryoten Zellen bilden mit spezifischer Ionendurchlässigkeit und/oder wirken als Proteasen oder Lipasen [68]. Dabei werden von den Bakterien zunächst wasserlösliche Proteine synthetisiert und sezerniert, die dann möglicherweise irreversibel in der Lipidmembran der eukaryoten Zellen gebunden werden. [69,70] Das porenbildende Konzept bei eukaryoten Zellen wurde von Bhakdi et al 1987 eingeführt [69] und inzwischen durch weitere Untersuchungen bekräftigt (s. u.).

Verschiedene Hämolsine wurden für E. coli beschrieben:

Das am besten untersuchte Hämolsin ist das chromosomal codierte  **$\alpha$ -Hämolsin**. Es hat ein Molekulargewicht von 107 kD und wird in etwa 50 % der E. coli-Isolate bei extraintestinalen Infektionen gefunden und insbesondere von uropathogenen E. coli (UPEC) sezerniert. Bei intestinalen Infektionen wird es dagegen nur in etwa 5-10 % der E. coli-Infektionen gefunden [71,72,73]. Für ETEC und EIEC ist bekannt, dass sie kein  $\alpha$ -Hämolsin produzieren, während EPEC möglicherweise selten  $\alpha$ -Hämolsin-positiv sind, was jedoch in neuerer Zeit in Frage gestellt wird [74]. Das Toxin ist bei Untersuchung der humanen Fäkalflora oft assoziiert mit P-Fimbrien, Kapselantigenen und Serumresistenz [75].

Die Produktion von  $\alpha$ -Hämolsin erfordert die Produkte von den vier verbundenen Genen *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD* [76]. Das  $\alpha$ -Hämolsin wird als inaktives Polypeptid synthetisiert und durch die Zugabe einer Fettsäuregruppe in die aktive Form konvertiert, katalysiert durch das HlyC-Protein [77].

## Einleitung und Fragestellung

Eine Erhöhung der Membranpermeabilität durch das  $\alpha$ -Hämolsin konnte sowohl an künstlichen Lipidmembranen [78,79] als auch an denen von lebenden Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden [79,80,81], wobei die Porengröße mit einem Durchmesser von etwa 2 nm bestimmt werden konnte (s.u.). Hohe Dosen des  $\alpha$ -Hämolsins führen dabei zum Zelltod durch Störung des inneren Milieus der Zelle, niedrigere Dosen rufen, bei ausreichenden Reparaturmechanismen, eine Vielzahl von Effekten hervor. Dazu gehören z. B. die Permeabilitätssteigerung von Endothelzellverbänden, die Stimulation der Prostazyklinsynthese [80] sowie der Bildung weiterer Entzündungsmediatoren (u. a. Leukotriene, Histamin, Serotonin und Hydroxyeicosatetraensäuren) bei gleichzeitiger Suppression von verschiedenen Zytokinen [82]. Diese Vorgänge werden offenbar teilweise über spezifische Rezeptorsysteme vermittelt [70]. Die Porenbildung bewirkt andererseits einen passiven unphysiologischen  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom und dürfte daher  $\text{Ca}^{++}$ -abhängige Zellprozesse fördern [80]. Für die volle Ausbildung der Entzündungsreaktion sind nachgewiesenermaßen beide Wirkkomponenten, d. h. die Porenbildung einerseits und die offenbar rezeptorabhängige Membranbindung des Hämolsins andererseits erforderlich (sogenannte duale Wirkung) [82].

Bereits 1981 stellten Welch et al. ein Tiermodell einer intraabdominellen Sepsis vor, das die signifikante Rolle des  $\alpha$ -Hämolsins bei E. coli-Infektionen belegt. Dabei wurden Ratten einerseits mit einem für sie apathogenen nicht Hämolsin produzierenden E. coli-Stamm, andererseits mit dem gleichen Stamm unter Zugabe eines Hämolsin-codierenden Plasmids infiziert. Bei letzterem zeigte sich eine signifikant erhöhte Mortalität [71].

Wie bereits erwähnt wurde auch bei Stämmen von enterohämorrhagischen E. coli 1994 ein für EHEC spezifisches Hämolsin beschrieben. Dieses tritt vor allem wie das Shiga-like-Toxin bei den Serotypen O157, O26 und O111 auf [83, 84]. Zunächst wurde angenommen, dass es sich dabei um ein unbekanntes neues Hämolsin handelt, da bisher sogenannte „Enterohämolsine“ bekannt waren. Die auf Kulturplatten beobachtete Hämolyse war denen der „Enterohämolsine“ jedoch praktisch identisch mit kleinen trüben Hämolyse-Zonen nach 20-stündiger Inkubation, im Gegensatz zu der des  $\alpha$ -Hämolsins, welche nach 4-6 h Inkubation breite klare Zonen zeigt [66]. 1996 zeigten Wieler et al. auch auf genetischer Ebene, dass der „enterohämolytische Phänotyp“ bei SL-Toxin produzierenden Stämmen offenbar durch das EHEC-Hämolsin bewirkt wird und damit „Enterohämolsine“ und das EHEC-Hämolsin (im

## Einleitung und Fragestellung

Folgenden auch als „Hly<sub>EHEC</sub>“ abgekürzt) offenbar identisch sind. Damit müssten auch die selten vorkommenden „Enterohämolysin“-produzierenden EPEC als EHEC reklassifiziert werden.

Das Toxin wird auf einem großen 90 kbp-Plasmid, bezeichnet als pO157, im *ehxA*-Gen codiert. Der spontane Verlust des Plasmids führt zu einem Hämolysin-negativen Phänotyp [66] sowie zum Verlust der Fähigkeit zur Adhärenz zu Darmepithelzellen (s. u.) [85], außerdem ist bekannt, dass es einen Sekretionsapparat kodiert.

Auf der Basis der zu erwartenden Aminosäuresequenz hat das Hämolysin ein Molekulargewicht von 107 kDa [86], aus der gleichen Berechnung ergibt sich außerdem ein isoelektrischer Punkt von 4,86. In der Gel-Elektrophorese von Kulturüberständen konnte tatsächlich ein Protein von annähernd 107 kDa außer bei  $\alpha$ -Hämolysin auch bei Hly<sub>EHEC</sub> produzierenden Stämmen nachgewiesen werden, jedoch nicht in Hämolysin-negativen Stämmen [87]. Andere Untersucher schätzen das EHEC-Hämolysin jedoch eher auf 116 kDa [Bauer und Welch, 86].

Bei Untersuchungen der porenbildenden Eigenschaften (Schmidt et. al 1996) an Experimenten mit isolierten Membranen im Vergleich des EHEC-Hämolysins mit dem  $\alpha$ -Hämolysin wurde die Porengröße mit 2,6 nm bestimmt und entspricht damit der des  $\alpha$ -Hämolysins. Der Ionenkanal, der von Hly<sub>EHEC</sub> gebildet wird, ist Kationen-selektiv, d. h. die Durchlässigkeit folgt nicht einfach der Beweglichkeit in der wässrigen Phase, sondern lässt die Kationen etwa 8fach besser durchdringen. Damit handelt es sich nicht einfach um eine Diffusionspore, sondern um einen selektiven Filter. Der Kanal ist offensichtlich relativ groß, da er auch große Ionen wie Tris<sup>+</sup> durchlässt. Die porenbildende Aktivität nimmt beim EHEC-Hämolysin mit sinkendem pH ab, deutlich stärker als beim  $\alpha$ -Hämolysin, die Zahl der Kanäle nimmt mit der Zeit der Einwirkung ständig zu [78,88]. Die Hitzelabilität und die Ca<sup>++</sup>-Abhängigkeit der Hly<sub>EHEC</sub>-Aktivität entspricht den Eigenschaften anderer RTX-Toxine [86].

Erste **funktionelle in vitro-Untersuchungen** zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen EHEC-Hämolysin und  $\alpha$ -Hämolysin: Im Wirksamkeitsgrad und der Zielzellspezifität zeigt sich das  $\alpha$ -Hämolysin deutlich potenter (siehe Diskussion) [86].

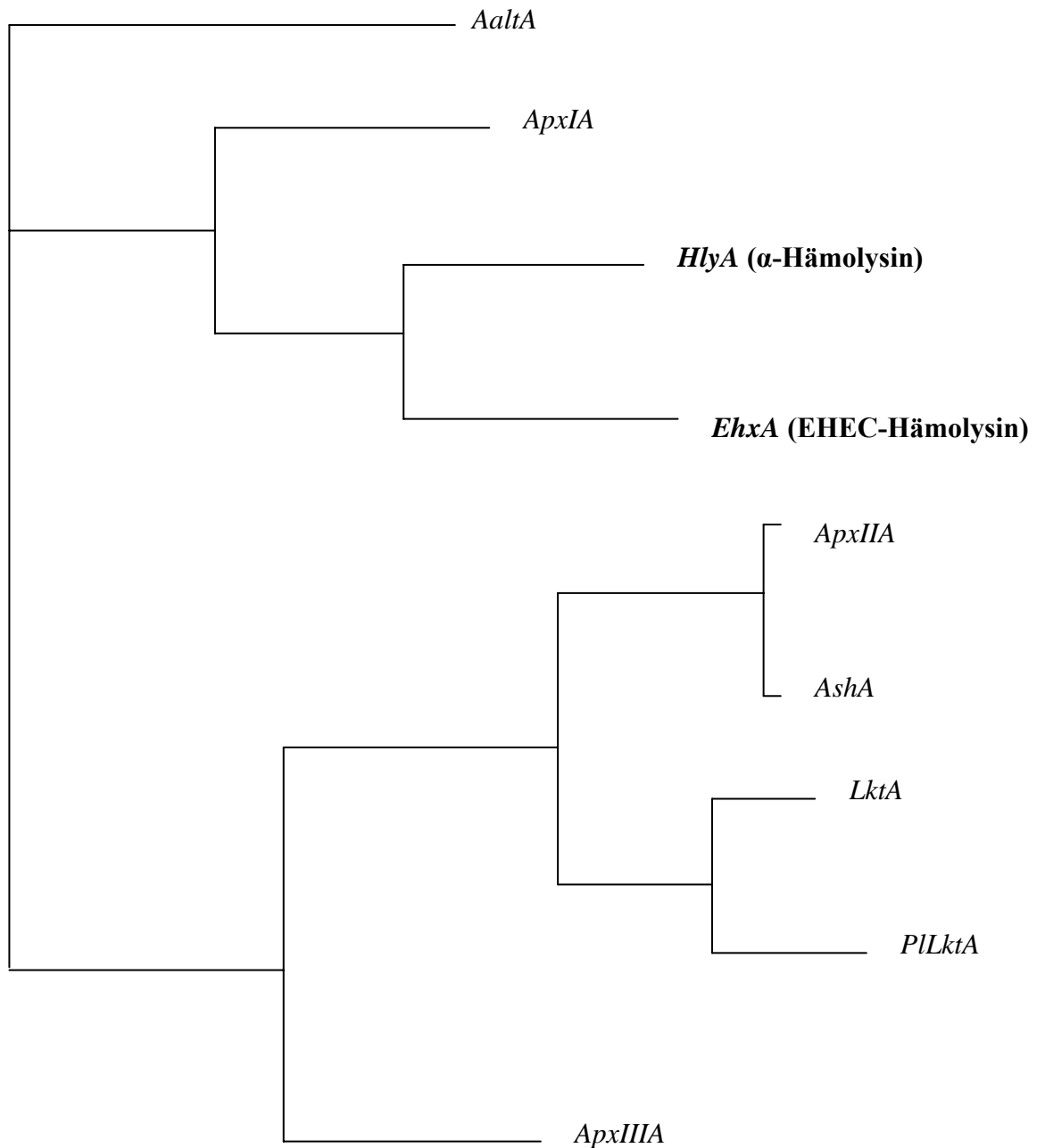
Überlagert werden diese Unterschiede allerdings durch eine geringe freie Sekretion des EHEC-Hämolysins (s. u.).

### **Genetischer Vergleich der Hämolsine**

Die bekannten RTX-Toxine zeigen untereinander unterschiedlich ausgeprägte Homologien in ihrer genetischen Struktur. Sequenzanalysen des  $\alpha$ -Hämolsins ergaben deutliche Homologien zu **Zytolysinen anderer Bakterien**, *Morganella morganii*, *Pasteurella hemolytica* und *Proteus mirabilis* und *vulgaris* [89,90,91].

1986 fanden Beutin et al. durch DNA-Hybridisierung Ähnlichkeiten zwischen den Hämolsin-codierenden Regionen eines uropathogenen Stammes und von mehreren EPEC-Stämmen [92]. Wenn diese Stämme nachträglich EHEC zugeordnet werden müssten, wäre dies ein früher Hinweis auf die enge Verwandtschaft des  $\alpha$ -Hämolsin mit dem EHEC-Hämolsin, die später ausführlich bestätigt wurden: 1994 beschrieben Schmidt et al zwei auf dem großen Plasmid pO157 des EDL 933-Stammes (EHEC) liegende und in der überwiegenden Mehrheit der Serogruppen O157 nachweisbare DNA-Sequenzen, die hochgradige Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten HlyA und HlyC-Proteinen von einigen uropathogenen E. coli-Stämmen zeigen. Beim Vergleich dieser Sequenzen fanden sich jeweils ca. 60 % Übereinstimmung. Der unmittelbare Vergleich der Hämolsin-Strukturgene (*HlyA* und *EhxA*) zeigte signifikante Homologien bezüglich typischer Eigenschaften von RTX-Toxinen [93]: Von den typischen Sequenzwiederholungen in ihrer Aminosäuresequenz, nach denen diese benannt sind, zeigt das  $\alpha$ -Hämolsin 13, die gleiche Zahl wurde auch für das EHEC-Hämolsin festgestellt, während Hämolsine z. B. von *P. haemolytica* und *A. pleuropneumoniae* nur 11 Wiederholungen zeigen. Eine weitere Eigenschaft der Primärstruktur von RTX-Toxinen ist eine Strecke von ca. 200 hydrophoben Aminosäuren in der N-terminalen Region. Solch ein hydrophober Abschnitt war sowohl im  $\alpha$ -Hämolsin als auch im EHEC-Hämolsin nachzuweisen [93]. Weitere Analysen von Bauer und Welch mit Erstellung eines Stammbaums der RTX-Toxine [86] zeigten sogar, dass keines von allen anderen bisher bekannten RTX-Toxinen zum EHEC-Hämolsin mehr genetische Ähnlichkeit zeigt als das  $\alpha$ -Hämolsin. (Abb. 4).  
Trotz der insgesamt großen Homologie der Aminosäuresequenzen bestehen jedoch größere Unterschiede in den N(amino)-terminalen und C(carboxy)-terminalen Abschnitten beider Proteine [78,86].

## Stammbaum der RTX-Toxine



**Abb. 4:** „Stammbaum“ der RTX-Toxine (jeweils Name der codierenden Gene angegeben). Dieser wurde erstellt nach dem Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener bekannter RTX-Toxine (nach BAUER/WELCH [86]). Die Länge der Arme zwischen den Toxinen repräsentiert die mittlere genetische Distanz.

Toxine: *AaltA*: Leukotoxin von *A. actinomycetemcomitans*, *ApxIA* und *ApxIIA*: Hämolysine von *A. pleuropneumoniae*, *HlyA*: *E. coli*-Hämolysin, *EhxA*: EHEC-Hämolysin, *ApxIII A*: Leukotoxin von *A. pleuropneumoniae*, *AshA*: Leukotoxin von *Actinobacillus suis*, *LktA*: Leukotoxin von *P. haemolytica*, *PILktA*: Leukotoxin von *P. haemolytica*-ähnlichem Organismus.



## **2.5 Fragestellung**

Für die funktionelle Einordnung des neuen EHEC-spezifischen Hämolysins ( $Hly_{EHEC}$ ) im Vergleich zum bekannten  $\alpha$ -Hämolysin ergeben sich nun folgende konkrete Fragestellungen:

1. Hat das EHEC-Hämolysin Einfluss auf die Signaltransduktion mittels Phosphoinositol-Antwort bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)?
2. Bewirkt das EHEC-Hämolysin bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) eine Bildung der Entzündungsmediatoren Prostazyklin ( $PGI_2$ ) und des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)?
3. Lässt sich die für isoliertes  $\alpha$ -Hämolysin bekannte Signaltransduktion in HUVEC auch mit dem uropathogenen Wildtyp nachweisen? Welche Unterschiede bestehen zum EHEC-Hämolysin, insbesondere im Hinblick auf die Produktion der nachgeschalteten Mediatoren Prostazyklin und PAF?
4. Handelt es sich bei dem EHEC-Hämolysin um ein frei sezerniertes Produkt oder ist der unmittelbare Kontakt zwischen Bakterium und Endothelzelle für die Wirkung des Hämolysins erforderlich?
5. Welche Mechanismen liegen der durch das EHEC-Hämolysin ausgelösten Signaltransduktion bei HUVEC zugrunde? Besteht eine Abhängigkeit von einer Tyrosinkinase?
6. Lassen sich neue Hypothesen über die pathophysiologische und klinische Bedeutung der E. coli-Hämolysine, insbesondere des EHEC-Hämolysins, ableiten?

### **3. MATERIAL UND METHODIK**

#### **3.1 Kultur von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (humane Nabelschnur-Endothelzellen/HUVEC)**

##### **3.1.1 Präparation der Endothelzellen**

Zur Gewinnung der Endothelzellen wurden Nabelschnüre Neugeborener direkt nach der Abnabelung in sterile Becher gegeben und bei 4° C gesammelt. Nach spätestens 48 h erfolgte die Weiterverarbeitung. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurden die Schnüre mit einer sterilen Kompresse gesäubert. Anschließend wurde vorsichtig eine Knopfkanüle in die Umbilicalvene eingeführt und mit einem Kabelbinder befestigt. Nach Spülen der Vene mit 2 x 50 ml HEPES Buffered Saline wurde das distale Ende mit einer Klemme abgeklemmt und das gesamte Lumen mit ca. 20 ml 37° C warmer, steril filtrierter Collagenase (Aktivität: 45 U/ml HBS) gefüllt. Anschließend wurde die Knopfkanüle mit einem Dreiwegehahn verschlossen und die Nabelschnur bei 37° C für 20 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Nabelschnur kräftig massiert, um weitere Endothelzellen abzulösen und dann die Kollagenase zusammen mit den Zellen in ein Greiner Zentrifugenröhrchen abgelassen, in welches 1 ml fetales Kälberserum (FCS) zur Inaktivierung des Enzyms vorgelegt worden war. Durch kräftiges Spülen mit ca. 30 ml HEPES Buffered Saline wurden restliche Zellen gelöst und das Greiner-Röhrchen auf 50 ml aufgefüllt. Nach 5 Minuten Zentrifugieren mit 250 g bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 5 ml Medium M 199 (Vollansatz) resuspendiert. Die Zellen wurden dann als Primärkultur in eine mit 0,2 %iger Gelatine vorbehandelte T-25-Zellkulturflasche pipettiert und die Flaschen in einem Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Raumluft bei 37° C begast. Unter dem Mikroskop konnten bereits nach wenigen Stunden rosettenförmige Zellnester beobachtet werden. Von diesen Zellnestern aus kam es zur kompletten Bedeckung des Bodens der Zellkulturflasche mit Endothelzellen. Die Bildung einer einschichtigen konfluenten Zellrasens war nach ca. 48 Stunden erreicht.

### **3.1.2 “Splitten” der Endothelzellen**

Nachdem sich eine konfluente Zellschicht gebildet hatte, konnten die Zellen subkultiviert werden. Dazu wurde das Medium aus der T 25-Flasche abgesaugt und die Zellen mit 37° C warmem serumfreiem Medium zwei Mal gewaschen. Dann wurden 4 ml einer auf 37° C erwärmten Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Flaschen in den Inkubator gegeben. Nach ca. 60 Sekunden zeigte sich unter dem Mikroskop eine weitgehende Ablösung der Zellen vom Boden der Flasche, weitere Zellen konnten durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenwand gelöst werden. Die Trypsin-EDTA-Lösung mit den Zellen wurde abgesaugt und in ein mit 1 ml fetales Kälberserum (FCS) zum Inaktivieren des Trypsins gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die restlichen Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen der T-25-Flasche abgelöst. Nach 5 min Zentrifugation wurde bei 250 g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet resuspendiert. Die Zellen von einer T 25-Flasche wurden auf umgerechnet ca. 1,5 12-Multiwell-Platten (insgesamt also  $18 \times 4 = 72 \text{ cm}^2$  gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert bis zu erneuten Ausbildung einer konfluenten einschichtigen Zellschicht. Gegebenenfalls wurde dann ein weiteres Splitting durchgeführt. Bei der vorliegenden Arbeit wurden immer Zellen eingesetzt, die sich in der 1. oder 2. Passage befanden.

### **3.1.3 Identifizierung der Endothelzellen**

Die Endothelzellen wurden nach morphologischen Kriterien identifiziert. Dabei mussten vor allem glatte Muskelzellen und Fibroblasten von Endothelzellen abgegrenzt werden. Endothelzellen zeigten sich unter dem Phasenkontrastmikroskop einschichtig in Form eines kopfsteinpflasterartig angeordneten Reliefs mit polygonalen Zellen und einem mittelständigem Zellkern. Fibroblasten und glatte Muskelzellen dagegen wuchsen in mehrschichtigen Zellschichten und in Bündeln angeordneten spindelförmigen Zellen. Wie insbesondere in der Wachstumsphase zu sehen war, besaßen Fibroblasten außerdem vergleichsweise lange und dünne Zellfortsätze.

Bei einem wesentlichen Anteil von Fibroblasten (größer als ca. 3 %) wurden die Kulturen nicht für den Versuch verwendet, was sehr selten vorkam. Kriterium für die Verwendbarkeit war außerdem das kopfsteinpflasterartig angeordnete Relief mit einem vollständig konfluenten Zellrasen.

## **3.2 Bakterien**

### **3.2.1 Herkunft der Bakterien**

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden von Prof. Dr. Chakraborty aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Als uropathogener E. coli-Stamm (UPEC) wurde ein Standardstamm (klinisches Isolat) mit bekannter Hämolysin-Produktion verwendet.

Für die Untersuchung der Eigenschaften des EHEC-Hämolysins wurde als Grundlage ein boviner Shiga-like-Toxin produzierender E. coli-Stamm (SLTEC) verwendet, der auf der Kulturplatte einen hämolytischen Phänotyp zeigt, 413/89-1. Das Struktur-Gen des Hämolysins liegt dabei ähnlich wie bei humanpathogenen EHEC auf einem ein 94 kbp-Plasmid. Dieses Gen ist praktisch identisch mit dem EHEC-Hämolysin. Die isogene Variante des SLTEC-Stammes, 413/98-6, unterscheidet sich durch das Fehlen der Hämolyse und des 94 kbp großen Plasmids. Wieler et al. kombinierten Teilstücke des großen Plasmids jeweils mit einem Vektorplasmid (pRK415), transformierten diese in einen anderen E. coli-Stamm (DH10 $\beta$ ) und screenen die rekombinanten Stämme auf hämolytische Aktivität. Dabei konnte in einem der rekombinanten Plasmide, pO26-30, die Sequenz des EHEC-Hämolysins nachgewiesen werden [94]. Damit konnte nun ein rekombinanter SLTEC-Stamm konstruiert werden, dessen Plasmid gesichert und vermutlich ohne wesentliche weitere Faktoren das EHEC-Hämolysin kodiert und der sich daher für die annähernd isolierte Untersuchung der Wirkungen des EHEC-Hämolysin eignet. Dieser besteht aus der Hämolysin-negativen SLTEC-Variante 413/98-6, dem reintrozierten Plasmid pO26-30 mit der Sequenz des EHEC-Hämolysins sowie dem Plasmid pACYC, welches eine Chloramphenicol-Resistenz kodiert [37].

Die volle Bezeichnung des rekombinanten Stammes mit dem Gen des EHEC-Hämolysins wäre damit 413/89/6(pacyc184)pO26-30; in den Ausführungen wurde dieser stets vereinfacht als „413/89<sub>Hly+</sub>“ bezeichnet.

Als Kontrolle wurde jeweils der apathogene E. coli-Stamm 470 eingesetzt, dem das Vektorplasmid (pRK415) ohne die Hämolysin-Sequenz hinzugefügt wurde.

### **3.2.2 Bakterienkultur**

Die drei verwendeten Bakterienstämme UPEC, 413/89/6(pacyc184)pO26-30) und 470 wurden auf Kulturplatten mit durch Agar (15g/l) angedicktem LB(Luria-Bertani)-

Medium ausgestrichen und 24 h bei 37° C inkubiert. Von der Agarplatte wurden jeweils 2-3 Kulturen abgenommen und in sterile 15 ml-FALCON-Röhrchen mit jeweils 10 ml LB-Medium überführt. Diese wurden unter Schütteln ca. 16 h weiter inkubiert. Nach dieser Zeit wurden jeweils 1,5 ml in je 30 ml Medium überführt und unter weiterem Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 430 nm gemessen. 30 min. nach Erreichen der stationären Phase wurden die Bakterien im Versuch eingesetzt. Dieser Zeitpunkt war nach ca. 3,5 h erreicht, die optische Dichte betrug dann etwa 1,8.

### **3.3 Messung der Inositolphosphate**

Die Messung der gebildeten Inositolphosphate wurde durchgeführt nach einer von Berridge beschriebenen Methode [95]. Dazu wurden die Endothelzellen vor der Bildung einer konfluenten Zelllage zunächst 24 h in Medium 199 mit 2% FCS mit Tritium- (<sup>3</sup>[H])-markiertem Inositol inkubiert mit dem Ziel des Einbaus des markierten Inositols in die Zellmembran. Pro Well wurde 2,5 µCi Aktivität eingesetzt. Als Maß für die Induktion der intrazellulären Signaltransduktion im Rahmen einer Entzündungsreaktion kann die Bildung von Inositolphosphaten durch die Phospholipase C gelten (InsP<sub>3</sub>, InsP<sub>2</sub> und InsP<sub>1</sub>). Die Inositolphosphate werden anschließend durch Phosphatasen in mehreren Schritten bis zu Inositol [96] dephosphoryliert. Der Meßmethode zugrunde liegt die Hemmbarkeit des letzten Abbauschrittes, vermittelt durch die InsP<sub>1</sub>-Phosphatase, durch Li<sup>+</sup>-Ionen, wodurch es zur Akkumulation insbesondere von InsP<sub>1</sub>-Phosphat kommt [97,95].

#### **3.3.1 Versuchsablauf und Extraktion der Inositolphosphate**

Nach Erreichen einer konfluenten Zelllage und gleichzeitiger 24-stündiger Inkubation mit <sup>3</sup>[H]-Inositol wurden die Zellen 2 x mit Hanks/HEPES mit reduziertem Calciumgehalt gewaschen, in diesem Puffer wurden auch die Versuche durchgeführt. 10 Minuten vor dem Versuch wurde Lithiumchlorid mit dem Ziel einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

Zum Versuch selbst wurden die Zellen mit je 800 µl Puffer und 200 µl LB-Medium im Wasserbad bei 37° Celsius und Raumluft für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Im Bakterienmedium befanden sich dabei auch die in der stationären Wachstumsphase

befindlichen Bakterien in kontrollierter Dichte (s. o.) oder der zeitgleich gewonnene bakterienfreie Überstand, der durch Zentrifugation (5 min bei 250 g) erreicht wurde.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde die Reaktion mit eiskalter Trichloressigsäure im Verhältnis 1:1 (Endkonzentration 7,5 %) zum Probenvolumen abgestoppt. Nach kurzem Schwenken wurden die Kulturplatten für 15 min auf Eis gestellt. Mit einem Kunststoff-Schaber wurden die Zellreste abgelöst und zusammen mit dem Überstand 5 min. bei 250 g zentrifugiert. Durch zweimaliges Ausschütteln des Überstandes mit 4 ml Diethylether pro Probe wurde die Lipidfraktion extrahiert und verworfen. Damit war die Probe für die weitere Aufarbeitung vorbereitet.

### **3.3.2 Anionenaustausch-Chromatographie**

Zur Ionenaustausch-Chromatographie wurden Säulen verwendet, die mit Dowex-Ionenaustauscherharz (Serra, Korngröße: 100-200  $\mu\text{m}$ , Gegenion:Cl), gefüllt wurden. Um  $^3\text{[H]}$ -Inositolreste von vorherigen Versuchen von der Säule zu entfernen, wurden diese vor jedem Gebrauch mit je 5 ml 1,0 M  $\text{NH}_4$ -Formiat/0,1 M Ameisensäure, pH 4,58, und 5 ml Aqua Bidest gespült. Anschließend konnten die 2 ml der extrahierten wässrigen Phase der Proben auf die Säulen gegeben werden. Als nächstes wurden mit je 3 ml 5 mM Inositolösung unspezifisch gebundene Stoffe entfernt. Dann wurde das gebundene Glycerophospho- $^3\text{[H]}$ -Inositol mit je 4 ml 60 mM Ameisensäure/5 mM  $\text{Na}^+$ -Tetraborat ausgespült. Nach Unterstellen von Messgefäßen konnten zuletzt die Inositolphosphate  $\text{InsP}_1$ ,  $\text{InsP}_2$  und  $\text{InsP}_3$  mit 2 ml 1,0 M  $\text{NH}_4$ -Formiat/0,1 M Ameisensäure gemeinsam eluiert werden (Bruttoelution). Die Aktivität der Probe als Maß für den Gehalt an Inositolphosphaten wurde nach Zugabe von 10 ml Szintillatorflüssigkeit (1:5) im  $\beta$ -Counter (je 2 min.) gemessen.

### **3.4 6-keto-Prostaglandin $_{1\alpha}$ -Assay-System**

Für die Messung des in den Überstand freigesetzten Prostazyklins wurde ein kommerzielles Radioimmunoassay-System verwendet. Da das Prostazyklin eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden hat, wurde das Hydrolyseprodukt des Prostazyklins, das 6-keto-Prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$  bestimmt, welches wesentlich stabiler ist und im Endothelzellüberstand kumuliert. Die Endothelzellüberstände wurden -je nach Ausgangskonzentration- 1:5 oder 1:25 mit 10 mM Phosphatpuffer verdünnt, bevor 100  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnung im Messansatz verwendet wurden. Neben 100  $\mu\text{l}$  eines

## Material und Methodik

verdünnten Kaninchen-Antiserums gegen 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, dessen Kreuzreaktivität gegenüber allen anderen Prostaglandinen unter 0,05% lag, wurden außerdem titriertes (3H)-6-keto-PGF<sub>1α</sub> als Tracer zugesetzt. Der Ansatz wurde mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), der 0,1 % Gelatine enthielt, zu einem Probenvolumen von 500 µl aufgefüllt und anschließend die Proben bei 4° C für 16 Stunden inkubiert. Das überschüssige Antigen wurde durch Zugabe einer Dextran-beschichteten Aktivkohlesuspension von den Antikörper-Antigenkomplexen entfernt. Nach Zugabe der Aktivkohle wurden die Proben für 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 10 ml Liquidszintillatorflüssigkeit gemischt und beides zusammen im β-Counter gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Standardreihe zwischen 5-50 pg parallel zu den Proben mit der Messreihe mitgeführt. Die Nachweisgrenze für 6-keto-PGF<sub>1α</sub> lag bei 10 pg, eine 50 %ige Bindung wurde mit 170 pg erreicht.

### **3.5 Plättchen-aktiverender Faktor**

Zur Messung des im Versuchsansatz gebildeten Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) wurde dessen Fähigkeit zur Thrombozyten-Aktivierung direkt genutzt (Bioassay). Zur Reinigung der Proben wurde zuvor eine Lipid-Extraktion durchgeführt.

#### **3.5.1 Extraktion**

Im Versuch wurde der Reaktionsablauf nach der jeweiligen Stimulationszeit zunächst mit je 0,5 ml eiskaltem Acetoacetat (50 mM) und 2 ml Methanol bei 1 ml Puffervolumen abgestoppt und 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die denaturierten Zellen mit einem Kunststoffschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst. Da in den durchgeführten Versuchen die Gesamtproduktion von PAF innerhalb der Zellen und im Überstand gemessen werden sollte, wurden Überstand und Zellreste zusammen weiterverarbeitet. Zur PAF-Bestimmung wurde dann zunächst eine Lipid-Extraktion nach dem Grundprinzip der Methode von E. G. Bligh and W. J. Dyer (1959) durchgeführt [98]. Dabei wurden wässrige und Lipidkomponente durch Mischung der Proben mit Methanol und Chloroform getrennt. Die Zellsuspension wurde dafür in FALCON-Zentrifugenröhrchen zweimal mit 750 µl Chloroform und einmal mit 750 µl 0,1 mM Natrium-Acetat versetzt. Zwischen diesen Schritten wurden die Proben jeweils dreimalig aufgerüttelt. Nach Absaugen der wässrigen Phase inklusive der Zellreste wurde der Lipidanteil noch dreimal mit jeweils 1 ml eines 10:9-Methanol-Natriumacetat (0,1 mM)-Gemisches gewaschen. Das Chloroform mit dem Lipidextrakt wurde dann in

Eppendorf-Gefäßen mit Stickstoff bei Raumtemperatur verdampft, die Lipidrückstände in 50 µl Methanol mit 2 % DMSO resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### **3.5.2 PAF-Bioassay**

Die Bestimmung des Plättchen-aktivierenden Faktors wurde in Anlehnung an eine Methode von Pinkard et al. mit isolierten Kaninchenthrombozyten durchgeführt. Ausgenutzt wurde dabei die Eigenschaft des PAF, bei Thrombozyten hochwirksam die Freisetzung von Serotonin zu induzieren [99]. Durch Vorinkubation mit radioaktiv markiertem Serotonin kann dabei über die Messung der Aktivität im Überstand eine indirekte Quantifizierung des vorhandenen PAF erfolgen.

Dazu wurde Kaninchen ca. 30 ml Blut abgenommen und durch Zugabe von 10 % eines EDTA/EGTA-Gemisches antikoaguliert. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 320 g wurde das plättchenreiche Plasma abpipettiert. Aus einer kleinen Probe wurde die Thrombozytenkonzentration für die spätere Einstellung der Zelldichte bestimmt. Die Thrombozyten wurden dann durch Zugabe von 1 µCi <sup>3</sup>[H]-Serotonin (5HT)/ml Plasma und einstündiger Inkubation unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37° C und wiederholtem Schwenken radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1400 g für 10 min zentrifugiert, das plättchenreiche Pellet resuspendiert, dieser Vorgang wurde dreimal mit Calciumfreier Tyrode Gelatine-Lösung (pH 6,5) zum Waschen wiederholt. Die letzte Resuspension der Plättchen erfolgte in Calcium-haltiger Tyrode Gelatine-Lösung (pH 6,5), dabei wurde das Volumen so gewählt, dass sich eine Zelldichte von 125000 Zellen/µl ergab. Pro Versuchsansatz wurden zu 100 µl Plättchensuspension 400 µl Tyrode (pH 7,2) hinzugegeben und im Wasserbad auf 37° C erwärmt.

Zum Versuchsstart wurden je 50 µl der Probe bzw. parallel dazu von Standards mit bekannter PAF-Konzentration zugeführt. Nach 60 Sekunden wurden je 200 µl des Versuchsansatzes entnommen und durch je 20 µl vorgelegtes 1,5 mM Formaldehyd gestoppt, welches zu einer Membranstabilisierung führt. Nach Zentrifugation konnte der zellfreie Überstand abgenommen werden, und nach Zugabe von Szintillatorflüssigkeit im Verhältnis 1:10 konnte die Aktivität im β-Counter als Maß für das freigesetzte Serotonin gemessen werden. Durch Vergleich mit der in jedem Assay mitgeführten Standardreihe mit PAF-Konzentrationen von 10<sup>-11</sup> mol bis 10<sup>-7</sup> mol konnte die Menge des in den Proben vorhandenen PAF abgeschätzt werden. Dabei ergab sich als Basalwert orientierend eine Dosis von 1x10<sup>-13</sup>/1 x 10<sup>6</sup> Zellen. Als Positivkontrolle



wurde jeweils Thrombin mitgeführt. Zur Kontrolle des Assays wurde neben der Standardreihe Triton X, welches nahezu sämtliches Serotonin aus den Zellen freisetzte, verwendet. Die höchste PAF-Konzentration in der Standardreihe zeigte dabei ebenfalls eine fast vollständige Serotoninfreisetzung.

### **3.6 Messung der Lactatdehydrogenase (LDH)**

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen durch zytotoxische Effekte wurde die Freisetzung der Lactatdehydrogenase nach der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie photometrisch gemessen. Zum Vergleich wurde in den gleichen Versuchen Mellitin als hochwirksames Toxin mit einer maximalen Enzymfreisetzung in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

### **3.7 Kulturmedien, Zell- und Bakterienkulturmaterial**

- Agarplatten für Bakterienkultur
- Antibiotika (Penicillin G, Streptomycin) lyophilisiert, steril, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Aqua tridestillata - im Milli Q Wasseraufbereitungssystem, Millipore (Eschborn, Deutschland) entionisiert und gefiltert
- Kollagenase (CLS Typ II, 180 U/mg), Worthington Biochemical Corporation (Freehold, N.J.), 25 mg mit 100 ml HBS cum Ca/Mg gelöst (Aktivität: 45 U/ml), steril filtriert
- Endothelzell-Wachstumsfaktor (RDGF), eigene Herstellung aus Rinderaugenretina
- FALCON Zentrifugen-Röhrchen 15 ml und 50 ml (steril)
- fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C, steril filtriert, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Filter (0,2 µm), Nalgene (Hereford, U.K.)
- Fungizone (Amph. B), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Gelatine, Sigma (Deisenhofen, Deutschland), mit aqua destillata gelöst, steril filtriert und die Zellkulturplatten für 3 Stunden mit einer Endkonzentration von 0,2 % bei Raumtemperatur beschichtet
- Hanks/HEPES cum Ca/Mg - Puffer (1l): 100 ml HBSS (10x), +900 ml aqua destillata, +6 g HEPES (= 25 mM), +1 n NaOH ad pH 7,4

## Material und Methodik

- Hanks/HEPES mit reduziertem Calciumgehalt (11): 100 ml HBSS (10x), Ca, Mg frei, +900 ml aqua tridestillata, +6 g HEPES (= 25 mM), +0,5 mM Calcium, +1 n NaOH ad pH 7,4
- Knopfkanülen (Sonderanfertigung für die Endothelzellpräparation), Fischer (Frankfurt, Deutschland)
- LB-Medium: 10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl auf pH 7.0 titriert
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Medium 199 Inositol-arm, Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Vollansatz für HUVEC-Zellkultur (500 ml): 375 ml Medium 199 Inositol-arm, +100 ml FCS (10%), +5 ml Natrium Pyruvate (1 mM), +5 ml L-Glutamin (2 mM), +5 ml RDGF-Konzentrat, +2,5 ml Streptomycin (500 µg), +2,5 ml Penicillin (500 IE), +5 ml Fungizone (Amphotericin B),
- Multiwells, Costar (Bodenheim, Deutschland), 12-well-Platten: 12 x 4 cm<sup>2</sup> (ca. 300.000 Zellen/well)
- Natrium Pyruvate, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Zellkulturflaschen T 25 (25 cm<sup>2</sup>), Nunc,(Bieberich, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, Greiner (Nürtingen, Deutschland)

### **3.8 Agenzien und Pharmaka**

- Ameisensäure, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Borax (Phosphoglycerolinositol), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) destilliert in Glas, UV-cutoff 203nm, geeignet für HPLC, Fluka AG (Bern, Schweiz)
- Diethylether (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) destilliert in Glas, pro analysi, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- D-myo-(2-<sup>3</sup>H) Inositol, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- Dowex (Ionenaustauscherharz), Korngröße 100-200, Gegenion: Chlorid, Serva (Heidelberg, Deutschland)
- EDTA-Lösung:
  - 3,72 g EDTA-dinitrat (Titriplex) / 50 ml aqua destillata
  - 4,34 g EGTA-tetranitrat / 50 ml aqua destillata
- EDTA - Titriplex, Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat; MW 372,24, pro analysi, Merck (Darmstadt, Deutschland)

## Material und Methodik

- EGTA Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)N,N-tetraessigsäure; MW 304,4, pro analysi, Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
- *Escherichia coli* Hämolyisin (Hly), S. Bakhdi (Institut für Mikrobiologie, Joh. Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland)
- Lactatdehydrogenase-Messung (LDH-Test), Boehringer Mannheim (Deutschland)
- Lithiumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- magnetic beads, Immunotech International (Hamburg, Germany)
- Mellitin (aus Bienengift), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Methanol (CH<sub>2</sub>OH) destilliert in Glas, UV-cutoff 203 nm, geeignet für HPLC, Burdick & Jackson Lab. Inc.; Vertrieb durch Fluka AG (Bern, Schweiz)
- Myo-Inositol, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- PAF, platelet activating factor (1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Thrombin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Trichloressigsäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Triton-X-100 - Octylphenoxypolyethoxyethanol (nicht-ionisches Detergens zur Membransolubilisierung)
- Tyrode Gelatine TG ohne Ca<sup>++</sup>: KCl 0,195 g, MgCl 6H<sub>2</sub>O 0,211 g, NaCl 8,0 g, NaHCO<sub>3</sub> 1,015 g, Glucose 1,0 g, EGTA 0,076 g (Ethylenglykol tris (2-aminoethylether)-N-N-N-N tetraacetic acid), Gelatine 2,5 g, ad 1 l aqua destillata, mit HCl ad pH 6,5
- Tyrode pH 6,5  
wie oben, + 0,192 g CaCl 2H<sub>2</sub>O, auf 1 l aqua dest. mit HCl auf pH 6,5 eingestellt
- Tyrode pH 7,2  
wie oben, ad 1 l aqua destillata, mit HCL ad pH 6,5
- Szintillatorflüssigkeit Quicksafe A, Zinsser Analytik (Frankfurt Deutschland)

### **3.9 Geräte**

- Biofuge A, Heraeus (Hanau, Deutschland)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Hamilton Präzisionspritze 50 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Liquidszintillationscounter, Philips (Hamburg, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)

- Photometer (Modell Uvicon 860), Kantron Instruments (Schweiz)
- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Wägezelle, Hottinger Baldwin Messtechnik (Langen, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

### **3.10 Experimentelles Protokoll**

Für die Versuche wurde ein experimentelles Protokoll und ein individueller Versuchsplan erstellt, bei dem insbesondere unterschiedliche Stoppzeiten für die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs berücksichtigt wurden, d. h. dass insbesondere verschiedene Stimuli mit unterschiedlichen Versuchszeiten durch zeitversetzte Zugabe der Stimuli auf einer 12-well-Platte zusammengefasst werden konnten. Bei PAF und Prostazyklin wurden die Messwerte mit der mitgeführten Standardreihe verglichen und bei Prostazyklin den entsprechenden Einheiten zugeordnet, die bei der graphischen Darstellung der X-Achse entsprachen. Bei der Messung der Inositolphosphate und der graphischen Darstellung der Versuche mit PAF wurde wegen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen auf eine Einheit verzichtet und stattdessen die Messwerte in Relation zu den jeweiligen Leerwerten gestellt, wobei als Maß die Anzahl der vom  $\beta$ -Counter gemessenen Zerfälle (counts per minute/cpm) genommen wurde. Für die Dosis der Reagenzien und Stimuli sowie der Bakteriensuspension bzw. des Überstandes wurden übliche Standardmengen verwendet.

### **3.11 Statistik**

Von allen Versuchsanordnungen wurden je vier Versuche durchgeführt; mit Ausnahme der Hauptwerte für PAF, bei denen wegen der methodisch bedingten höheren Streuung zur Erzielung eines signifikanten Ergebnisses jeweils acht Messwerte ermittelt wurden. Für jeden Messzeitpunkt wurde ein eigener Leerwert (lediglich Bakterien-Medium statt Stimulus) ermittelt. Die vier bzw. acht Messwerte wurden gegenüber den entsprechenden Leerwerten mittels des Student'schen t-Tests (zweiseitig, ungleiche Varianz) auf Signifikanz überprüft, wobei als Grenzwert eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% gesetzt wurde ( $p=0,05$ ).

## 4 ERGEBNISSE

Die Besonderheit von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) besteht sowohl in der Auslösung einer schweren hämorrhagischen Entzündung am Darm als auch der Entwicklung eines generalisierten Krankheitsbildes mit schweren Störungen im gesamten Organismus in Form des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS). Zur Klärung dieser Phänomene sind daher insbesondere bakterielle Pathogenitätsfaktoren zu untersuchen, von denen angenommen werden kann oder bekannt ist, dass sie systemische Wirkungen ausüben. Neben den Shiga-like-Toxinen ist dabei das neu charakterisierte für EHEC spezifische Hämolysin von besonderem Interesse. Als Zielzelle des Toxins im Versuchsansatz bietet sich andererseits die Endothelzelle an, die wesentlicher Vermittler systemischer Wirkungen ist und deren Schaden auch nachweislich bei der Ausbildung des hämolytisch-urämischen Syndroms im Vordergrund steht.

Dieses Wechselspiel zwischen dem Hämolysin und der Endothelzelle musste in konkrete Fragestellungen und Versuchsanordnungen umgesetzt werden. Wesentliches Ziel war dabei die Erfassung der Wirkung des EHEC-Hämolysins auf die wesentlichen von Endothelzellen gebildeten Stoffwechselprodukte. Die primäre Frage war die nach der Aktivierung der Signaltransduktion durch Phosphatidylinositol-Hydrolyse. Als wesentliche Folge einer Endothelzell-Aktivierung wurde die mögliche Bildung der Entzündungsmediatoren Prostazyklin und des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) untersucht. Von zusätzlichem Interesse war auch der genauere Mechanismus der ausgelösten Signaltransduktion, wobei für eine erste Orientierung ein unspezifischer Inhibitor einer Tyrosinkinase (Genistein) eingesetzt wurde.

Für das Modell der Gefäßinnenwand dienten humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC). Als Bakterien wurde ein rekombinanter boviner EHEC- (bzw. Shiga-like-produzierender) Stamm verwendet, der in einem Vektorplasmid lediglich die EHEC-Hämolysin-Sequenz enthielt (413/89<sub>Hly+</sub>).

Zur Einordnung der Versuchsergebnisse wurde in allen Versuchsansätzen neben Kontrollwerten parallel der uropathogene Wildtyp (UPEC) mitgeführt. Von diesem ist eine reichliche Produktion des sehr ähnlichen  $\alpha$ -Hämolysins bekannt. Verglichen

## Ergebnisse

wurde dabei auch die Aktivität des Überstandes des Kulturmediums (ohne Bakterien) unter der Frage einer freien Sekretion der Hämolyse. Als Kontrolle diente jeweils ein apathogener *E. coli*-Stamm mit dem Vektorplasmid sowie Bakterienmedium (LB). Die Ergebnisse lassen sich nun wie folgt in verschiedenen Gruppen betrachten (signifikante Abweichungen zum zeitgleichen Leer-/Kontrollwert wurden jeweils mit \* markiert):

### 4.1 Das EHEC-Hämolysin bewirkt bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) einen signifikanten Anstieg von Inositolphosphaten (IP<sub>x</sub>)

Der das EHEC-Hämolysin produzierende rekombinante Stamm, im Folgenden abgekürzt als 413/89<sub>Hly+</sub>, induzierte eine signifikante Phosphatidylinositol-Hydrolyse in den humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) mit einem maximalen Faktor von 2,8 gegenüber dem zeitgleichen Leer-/Kontrollwert, drei Stunden nach Beginn der Inkubationszeit (Abb. 5). Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg erst nach 2 h.

Anzumerken ist, dass der Kontrollstamm keine Signaltransduktion hervorrief, so dass der Kontrollstamm und die Inkubation alleine mit Bakterienmedium praktisch identische Messwerte zeigten; daher wurde als Bezugswert (Leer-/Kontrollwert) jeweils der Mittelwert dieser beiden Beträge verwendet.

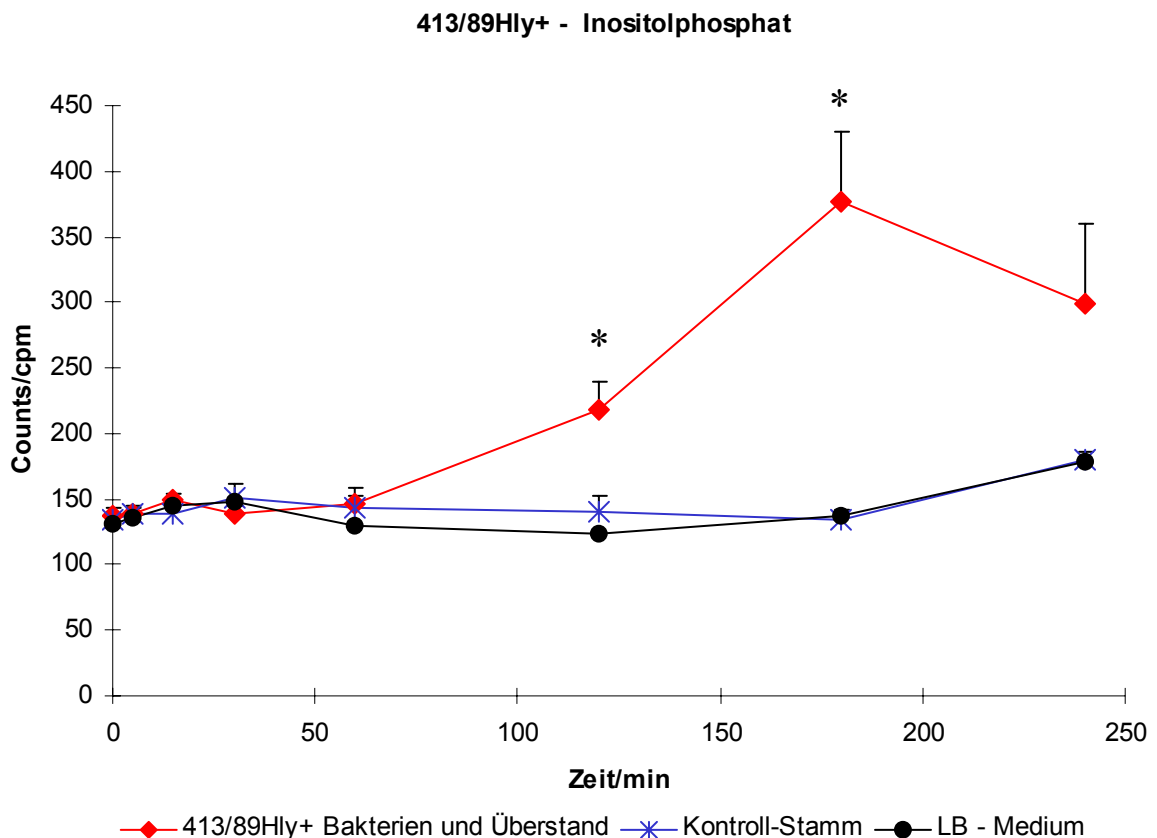


Abb. 5

## Ergebnisse

### 4.2 Von den wesentlichen endothelialen Entzündungsmediatoren PAF und Prostazyklin aktiviert das EHEC-Hämolyisin nur die PAF-Synthese, jedoch nicht die Prostazyklin-Synthese

#### Das EHEC-Hämolyisin bewirkt einen langsamen Anstieg des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)

Nach Inkubation der Endothelzellen mit dem das Hämolyisin produzierenden EHEC-Stamm 413/89<sub>Hly+</sub> kam es zu einem langanhaltenden und kontinuierlichen Anstieg der PAF-Konzentration (Abb. 6): Dabei war sogar auch am Ende des Versuchszeitraumes noch kein Ende der Zunahme absehbar: der 3h-Wert betrug Faktor 1,64 gegenüber dem Leer-/Kontrollwert (bzw. einer Steigerung um 64%).

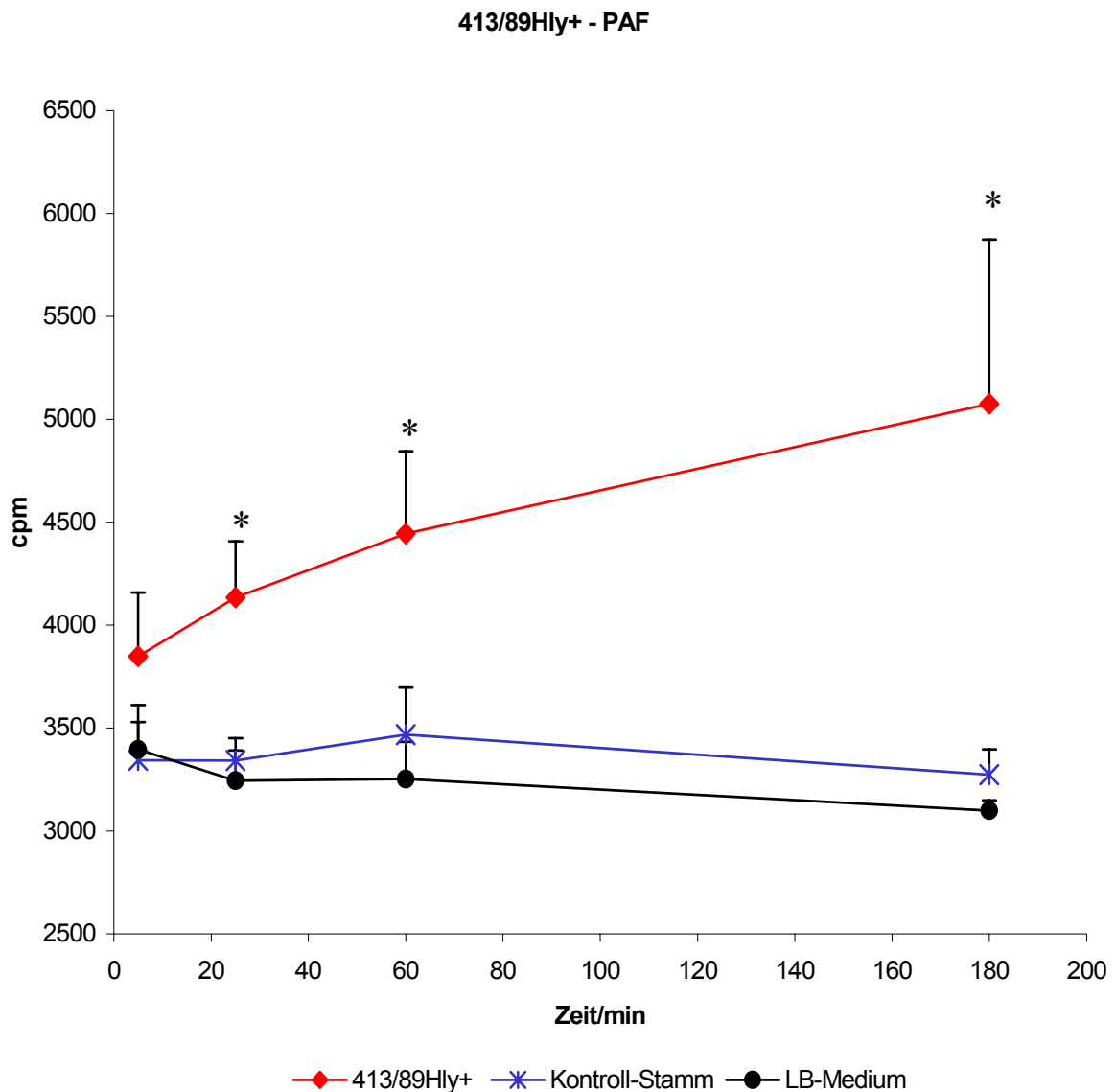


Abb. 6

## Ergebnisse

### Das EHEC-Hämolysin hat keinen signifikanten Einfluss auf die Prostazyklin-Synthese

Die Bestimmung der Prostazyklin(PGI<sub>2</sub>)-Produktion erfolgte indirekt über die Messung des Metaboliten PGF<sub>1 $\alpha$</sub> .

Das EHEC-Hämolysin, im Folgenden auch als Hly<sub>EHEC</sub> abgekürzt, konnte bei HUVEC keine Induktion der Prostazyklin-Synthese bewirken; auch im längeren Verlauf zeigen 413/89<sub>Hly+</sub> und der Kontroll-Stamm keinerlei Anstieg der PGF<sub>1 $\alpha$</sub> -Konzentration. Wie in der Grafik ersichtlich (Abb. 7), ist darüber hinaus, d. h. ab 2 h Versuchsdauer, sogar eine Hemmung der physiologischen Prostazyklin-Synthese zu diskutieren: Der geringste Einfluss auf die Synthese ist von dem reinen Bakterienmedium zu erwarten. Wenn man dieses als entscheidenden Kontrollwert verwendet, würde eine Hemmung auf durchschnittlich 42 % (Faktor 0,42) der physiologischen Synthese vorliegen. Dagegen spricht allerdings, dass auch die Kontrollstämme teilweise diesen Effekt zeigen (durchschnittlicher Faktor 0,54, siehe Diskussion).

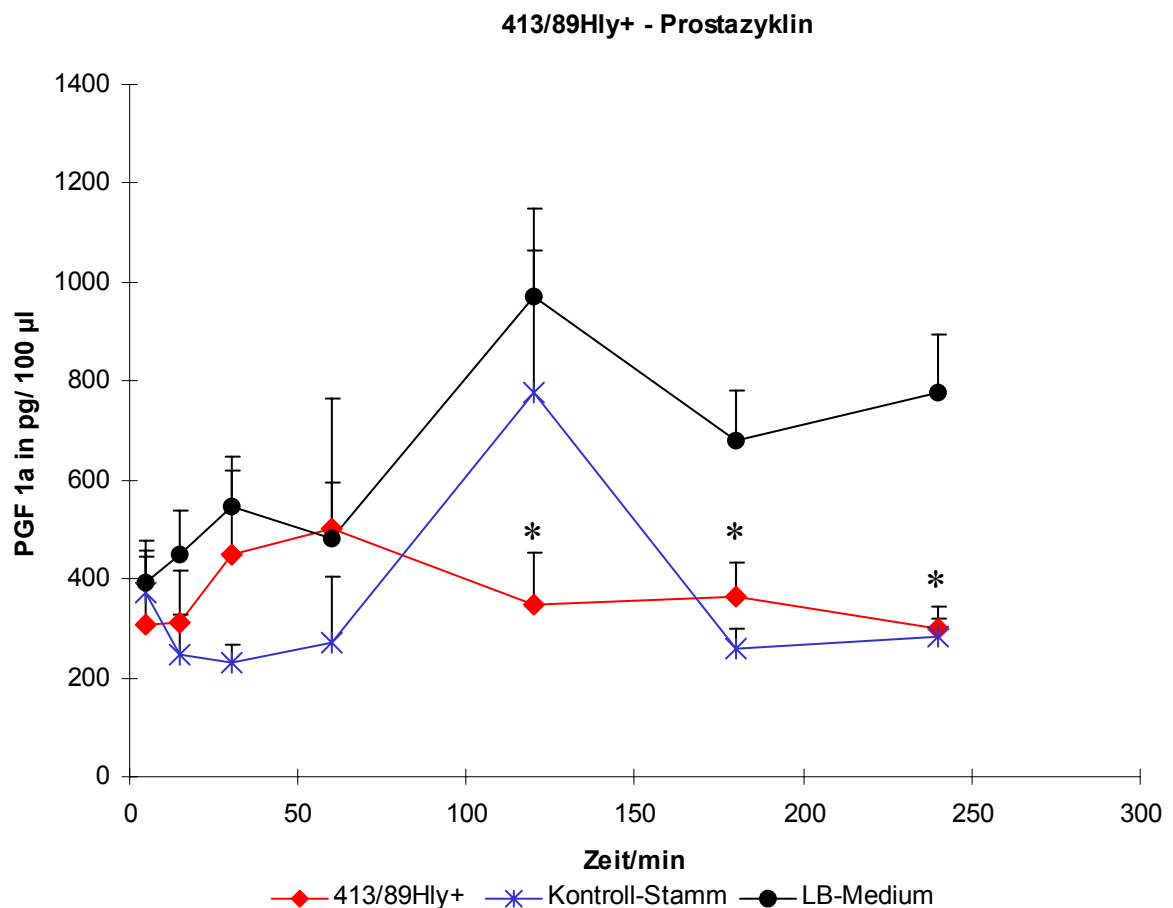


Abb. 7



## Ergebnisse

### 4.3 $\alpha$ -Hämolysin uropathogener E. coli (UPEC) bewirkt bei HUVEC einen noch stärkeren Anstieg von Inositolphosphaten als das EHEC-Hämolysin, zeigt jedoch ein anderes Aktivierungsmuster von Entzündungsmediatoren: Es stimuliert bei HUVEC nur begrenzt die PAF-Synthese, jedoch ausgeprägt die Prostazyklin-Synthese

Die Zugabe von 200  $\mu$ l UPEC-Suspension (in Bakterien-Medium) bewirkte bei den im Versuch eingesetzten humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) eine sehr wirksame und schnelle Induktion der Inositolphosphat-Bildung (Abb. 8): Bereits nach 5 Minuten kam es annähernd zu einer Verdoppelung des Ausgangswertes. Das Maximum wurde etwa nach 2 h mit etwa dem 9-fachen des zeitgleichen Leer-/Kontrollwertes erreicht (Faktor 9,2). Dieser Effekt kann im Wesentlichen dem  $\alpha$ -Hämolysin zugeschrieben werden (siehe unten).

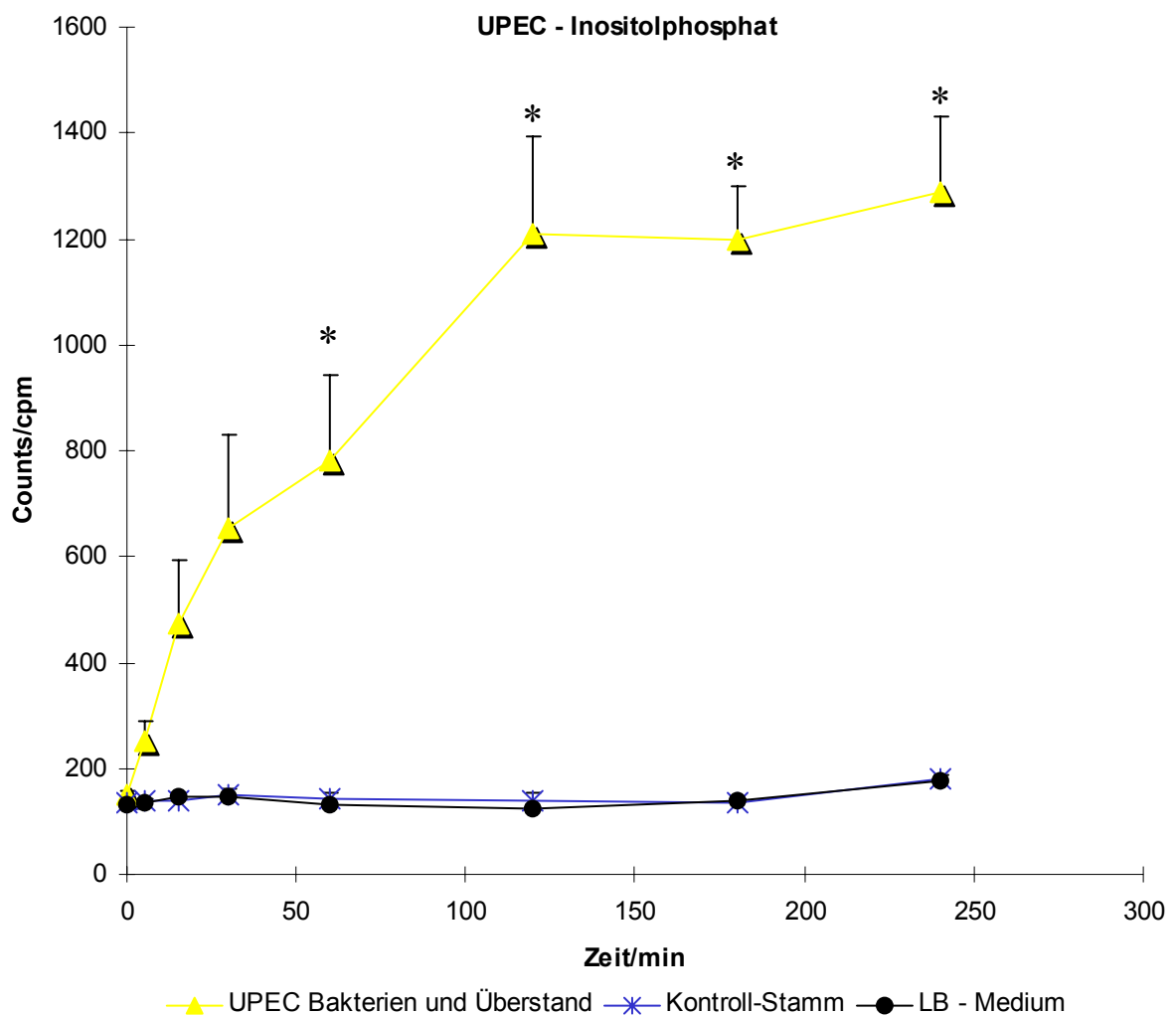


Abb. 8

## Ergebnisse

Der **Vergleich zwischen den beiden Stämmen** verdeutlicht den schnelleren und wesentlich stärkeren Effekt des  $\alpha$ -Hämolysins (UPEC) gegenüber Hly<sub>EHEC</sub> (Stamm 413/89<sub>Hly+</sub>, Abb. 9).

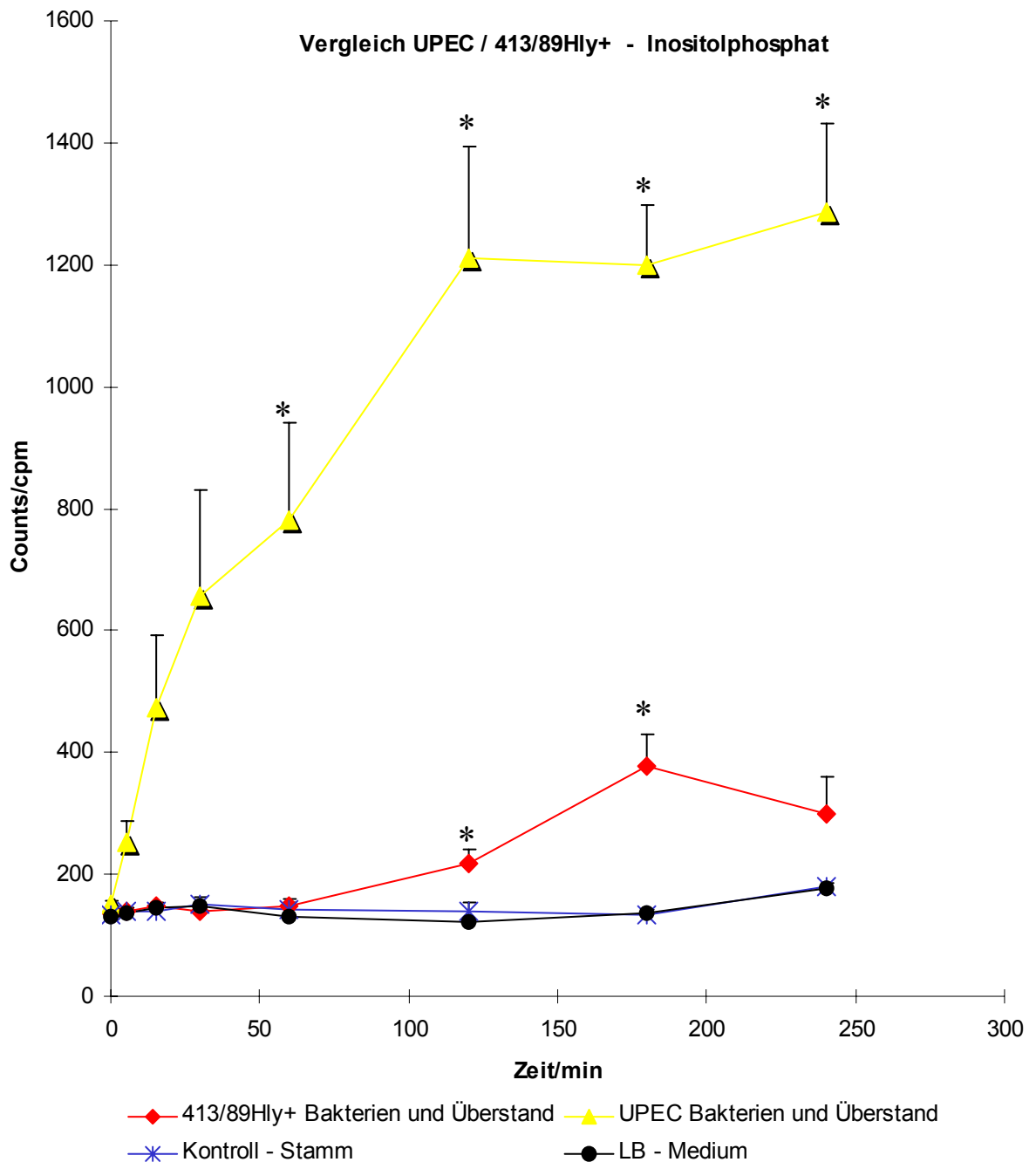
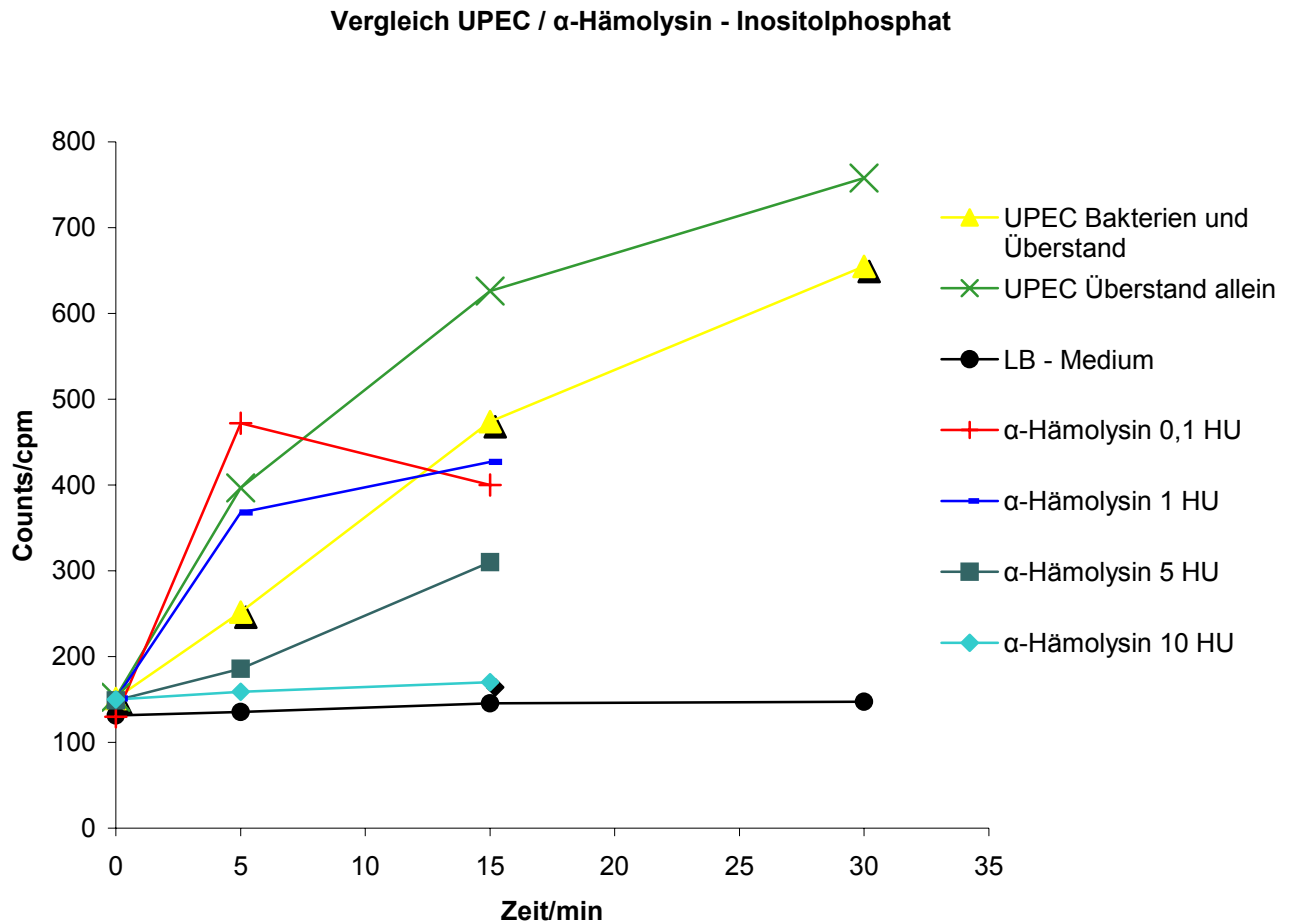


Abb. 9

## Ergebnisse

Der Vergleich der Wirkung von UPEC auf Endothelzellen mit isoliertem  $\alpha$ -Hämolyysin weist darauf hin, dass bei UPEC das  $\alpha$ -Hämolyysin für den Inositolphosphat-Anstieg verantwortlich ist:



**Abb. 10**

Die Grafik (Abb. 10) zeigt im Vergleich zur  $\alpha$ -Hämolyysin-Produktion durch den UPEC-Wildstamm die Bildung von Inositolphosphaten durch isoliertes  $\alpha$ -Hämolyysin eines Standard-Stammes. Von diesem wurde die gezeigte Dosisreihe bei sonst gleichem Versuchsaufbau eingesetzt. Als Einheit ist die Hämolytische Einheit [HU] üblich. Wie die Graphik zeigt, dürfte die geschätzte Aktivität des vom Wildtyp sezernierten  $\alpha$ -Hämolyysins dabei etwa der Dosis von 1 HU entsprechen. Diese Dosis entspricht auch der wirksamsten Dosis in den Literaturangaben.

Für das EHEC-Hämolyysin ist eine solche Standardreihe bislang nicht möglich, da noch nicht mit isoliertem Toxin gearbeitet wurde.

## Ergebnisse

### **$\alpha$ -Hämolyysin bewirkt im Gegensatz zum EHEC-Hämolyysin nur eine zeitlich begrenzte vermehrte Bildung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)**

Die Analyse von freiem und zellgebundenen PAF zeigte eine deutliche Bildung dieses Lipidmediators als Antwort auf das von UPEC gebildete  **$\alpha$ -Hämolyysin**. Dabei konnten signifikant über die Kontrollen hinausgehende Werte nachgewiesen werden mit einem Maximum von 28 % (Faktor 1,28) gegenüber dem gleichzeitigen Leer-/Kontrollwert. Im weiteren Verlauf bis zu 1 h kam es allerdings zum Wiedererreichen des Leer-/Kontrollwertes (Abb. 11).

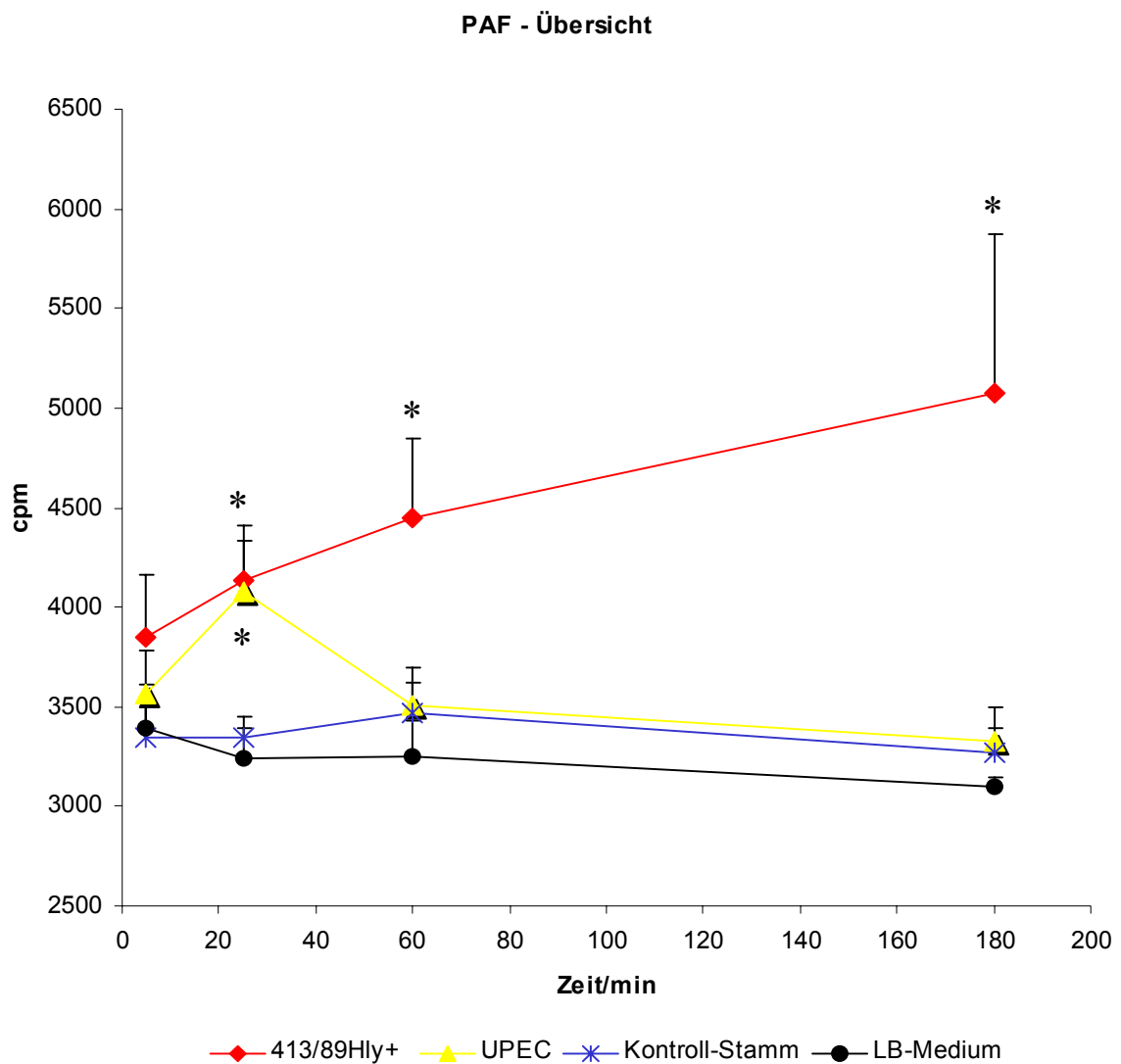


Abb. 11.

## Ergebnisse

### Das $\alpha$ -Hämolysin uropathogener E. coli (UPEC) induziert im Gegensatz zum EHEC-Hämolysin eine hochgradige Steigerung der Prostazyklin-Synthese

Als Antwort auf die UPEC-Einwirkung wurde eine deutliche Produktion dieses Mediators beobachtet (Abb. 12) mit einem frühzeitigen ausgeprägten Anstieg und einem Maximum bei 2 h mit der 8,3-fachen Konzentration des Ausgangswertes (LB-Medium 5 min.) bzw. der 3,4-fachen Konzentration gegenüber dem 2 h-Leerwert (LB-Medium). Die lediglich mit dem Bakterienmedium inkubierten Endothelzellen zeigten dabei im längeren Verlauf ebenfalls einen geringen Anstieg des Prostazyklin-Spiegels.

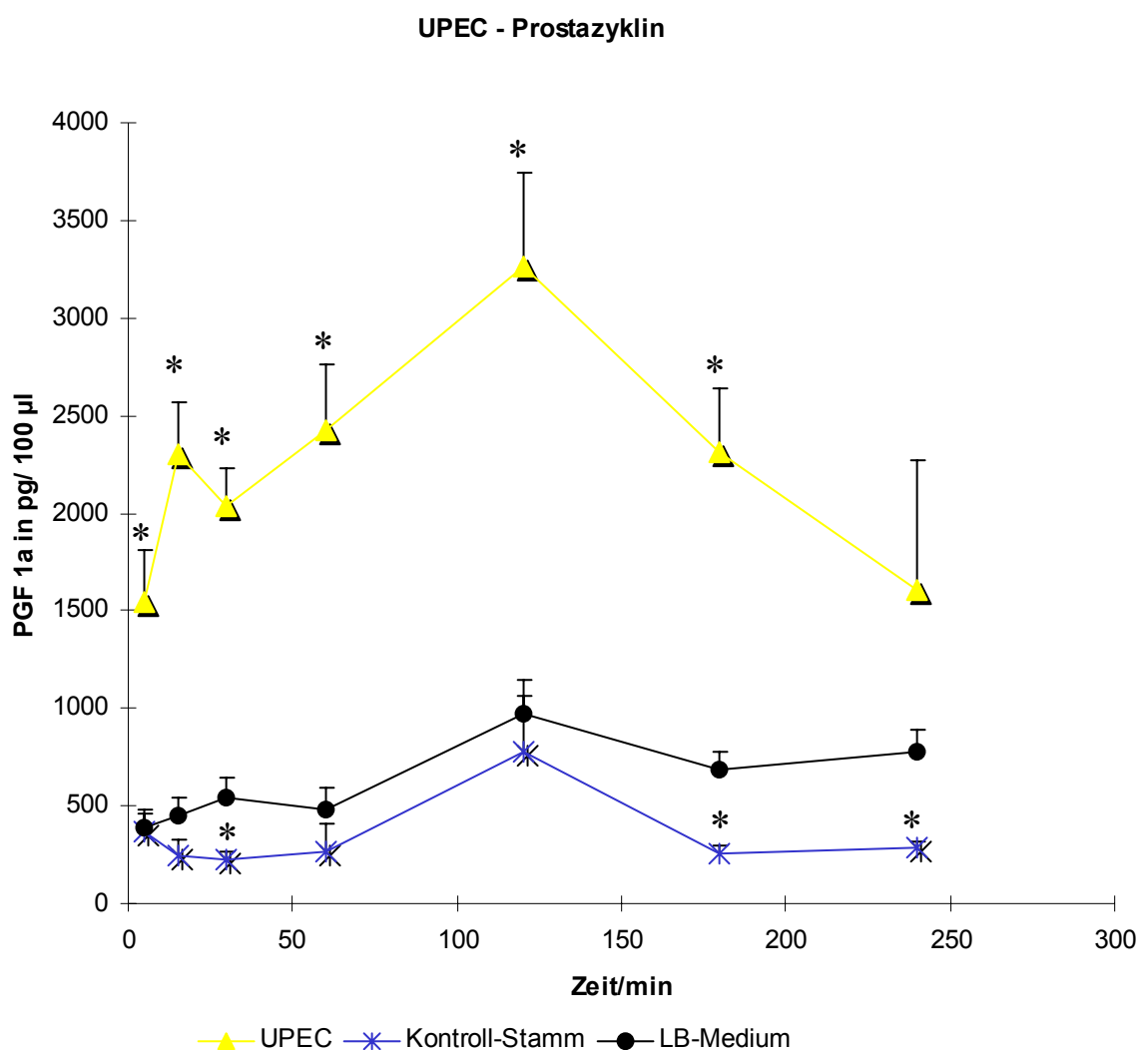


Abb. 12

## Ergebnisse

### **4.4 $\alpha$ -Hämolyysin wird von UPEC überwiegend frei sezerniert, das EHEC-Hämolyysin nur in geringem Ausmaß**

Für die Fragestellung, ob die Hämolyisine frei sezerniert werden oder ob eine Bindung an die Zielzelle erforderlich ist, wurden zentrifugierte Bakterien-Überstände alleine mit den Endothelzellen inkubiert, bei sonst identischen Versuchsbedingungen. Als Maß der Aktivität des Hämolyisins wurde wiederum der Anstieg der Inositolphosphate bestimmt. Die Werte wurden verglichen mit denen von im gleichen Versuchsansatz eingesetzten Bakterien und Überständen zusammen.

Die Inkubation lediglich mit Überständen des rekombinanten Stammes **413/89<sub>Hly+</sub>**, der das Gen des EHEC-Hämolyisins enthält, zeigte zunächst einen parallelen Verlauf mit einem hier langsamen und geringen Inositolphosphat-Anstieg bis etwa 2 h. Danach kam es jedoch zu keinem weiteren Anstieg, so dass die Maximalwirkung des Überstandes nur 26 % der Maximalwirkung der Bakterien mit Überstand zusammen entsprach (d. h. Faktor 1,5 des Leer-Kontrollwertes, Abb. 13).

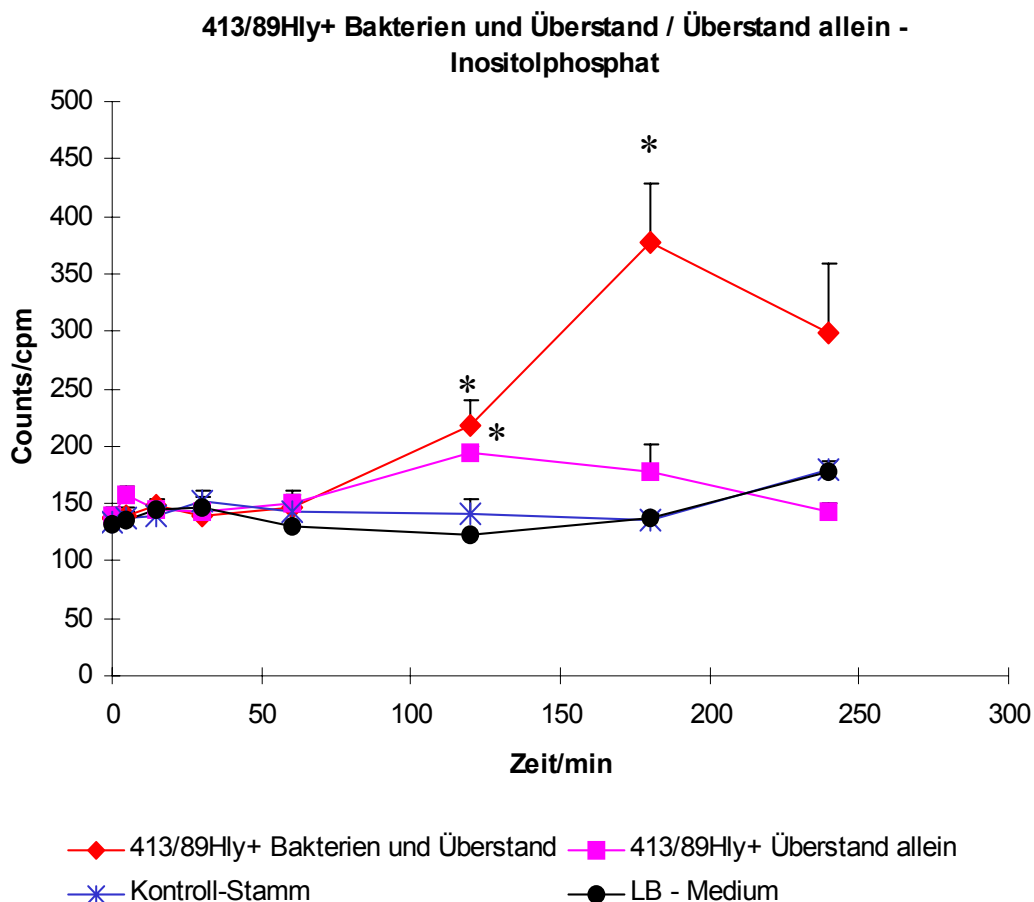


Abb. 13

## Ergebnisse

Bei UPEC zeigte sich innerhalb der ersten Stunde ein paralleler Verlauf, bei den weiteren Messwerten erreichten die Überstände allein jeweils etwa 72 % der entsprechenden Wirkung von Bakterien und Überstand zusammen bzw. Faktor 6,9 des entsprechenden Leer-/Kontrollwertes (Abb. 14.).

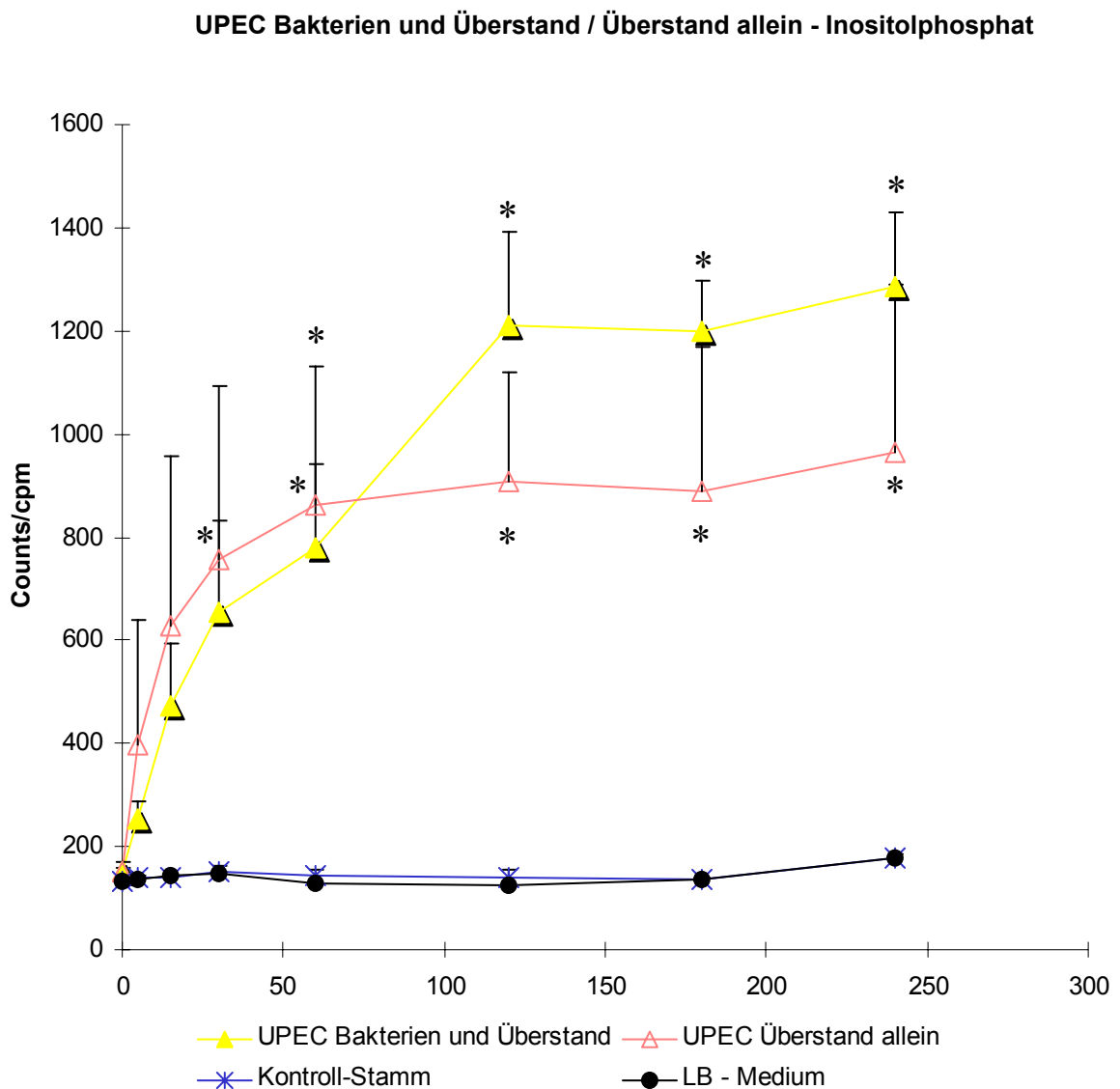


Abb. 14

#### 4.5 Die Hämolsine zeigen jeweils eine partielle Tyrosinkinase-Abhängigkeit in der Signaltransduktion

##### Der durch das EHEC-Hämolsin bedingte Inositolphosphat-Anstieg bei HUVEC ist teilweise Tyrosinkinase-abhängig

Für die orientierende Frage nach dem Mechanismus der durch das EHEC-Hämolsin ausgelösten Signaltransduktion, insbesondere der **Abhängigkeit von einer (oder mehreren) Tyrosinkinasen** wurde dem Versuchsansatz 10 Minuten vor Versuchsbeginn Genistein (Endkonzentration 250  $\mu$ M) hinzugegeben. Diese Substanz hemmt unspezifisch verschiedene Tyrosinkinasen.

Der Stammes 413/89<sub>Hly+</sub> erreichte in dieser Versuchsreihe zunächst ohne Einsatz von Genistein wie in den vorausgegangenen Versuchen Werte bis Faktor 2,7 der Kontrollen. Die Inkubation mit Genistein bewirkte eine hochgradige Hemmung des Inositolphosphat-Anstiegs (Abb. 15), der nur noch durchschnittlich Faktor 1,3 des Leer-Kontrollwertes erreichte, was einer 75 %igen Hemmung entspricht. Dieser Effekt nahm im zeitlichen Verlauf noch zu: Nach 2 h zeigte sich eine Hemmung um 37 % des zeitgleichen ungehemmten Wertes, nach 4 h um 100 %.

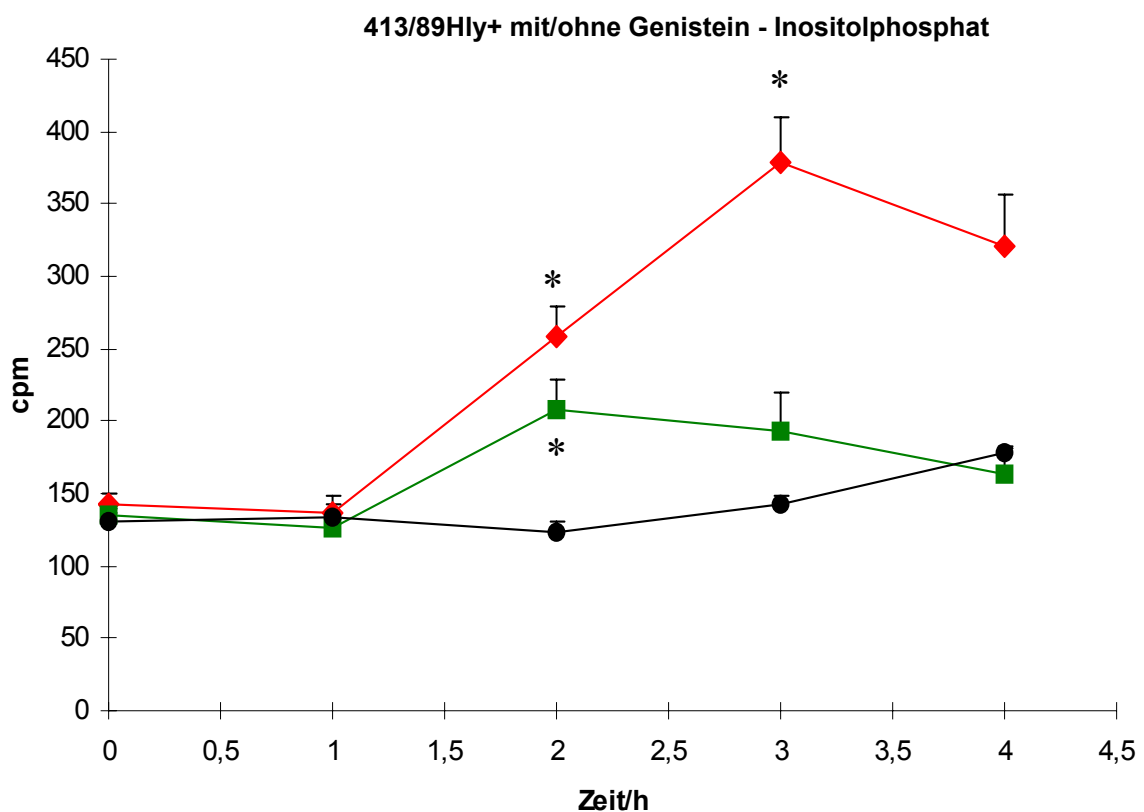


Abb. 15    ◆ 413/89Hly+    ■ 413/89Hly+ mit Genistein    ● LB-Medium



## Ergebnisse

### **Der durch das $\alpha$ -Hämolysin bedingte Inositolphosphat-Anstieg bei HUVEC ist in etwas geringerem Ausmaß Tyrosinkinase-abhängig**

Als ein weiterer Unterschied zwischen den Hämolysinen kann eine geringere Abhängigkeit der Signaltransduktion des  $\alpha$ -Hämolysins von einer (oder mehreren) Tyrosinkinasen nachgewiesen werden: Wie in der Darstellung ersichtlich (Abb. 16), wurde die Induktion der Inositolphosphat-Bildung in Endothelzellen durch uropathogene E. coli (UPEC) unter Zugabe von Genistein um 46 % verglichen mit dem Maximalwert gehemmt. Der Maximalwert betrug dabei in dieser Versuchsreihe Faktor 8,2 des Leerwertes, mit Genistein zusammen nur noch Faktor 4,9.

In Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass Genistein alleine den Inositolphosphatspiegel nicht beeinflusst (nicht dargestellt).

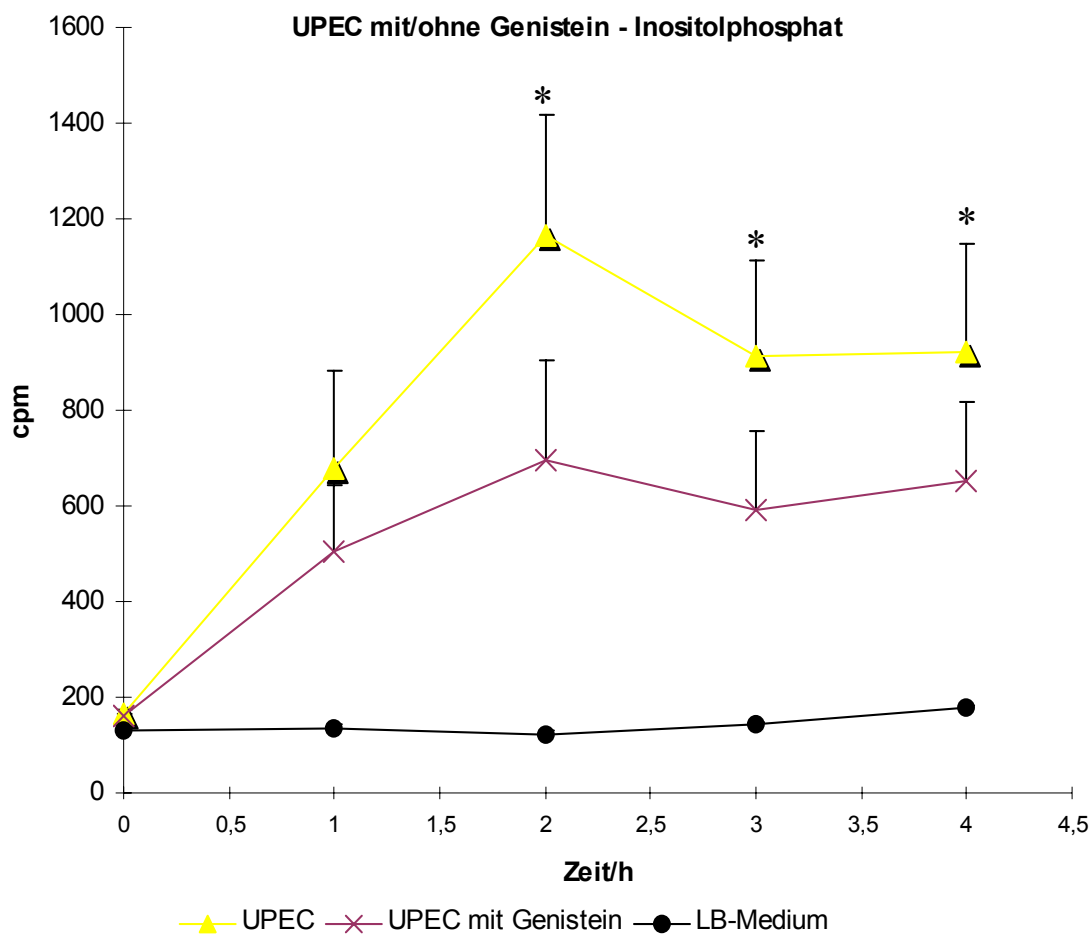


Abb. 16

#### 4.6 Kontrollexperimente

##### **Kontrollexperimente mit LDH zeigen, dass die beobachteten Effekte keine Artefakte durch die lange Versuchsdauer sind**

Die LDH-(Lactatdehydrogenase-)Freisetzung gilt als unspezifischer Marker einer Zellschädigung. Mit deren Bestimmung sollten zwei Hauptziele erreicht werden:

1. Die Vitalität der Zellen auch im längeren Versuchsverlauf nachzuweisen und damit die repräsentative Aussage über die Zellfunktion zu sichern.
2. Eine Stimulation der Zellfunktion über die bloße Schädigung der Zelle (z. B. durch Lyse) oder durch Zellstress („Notfallaktivierung“) auszuschließen und vielmehr rezeptorgesteuerte oder andere spezifische Funktionen zu bestätigen.

Die im Folgenden genannten Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei den bisher genannten Messungen durchgeführt.

Der UPEC-Stamm bewirkte nach 15 min. keine LDH-Freisetzung im Vergleich zum Leerwert (Abb. 17). Nach dreistündiger Inkubation von 413/89<sub>Hly+</sub> zeigten sich etwa doppelte Werte im Vergleich zu der nur mit dem Medium inkubierten Kontrolle.

Die Zugabe des Bienengifts Mellitin als Positivkontrolle bewirkte jedoch bereits nach 45 min. die fast 10fache Freisetzung im Vergleich zum Leerwert.

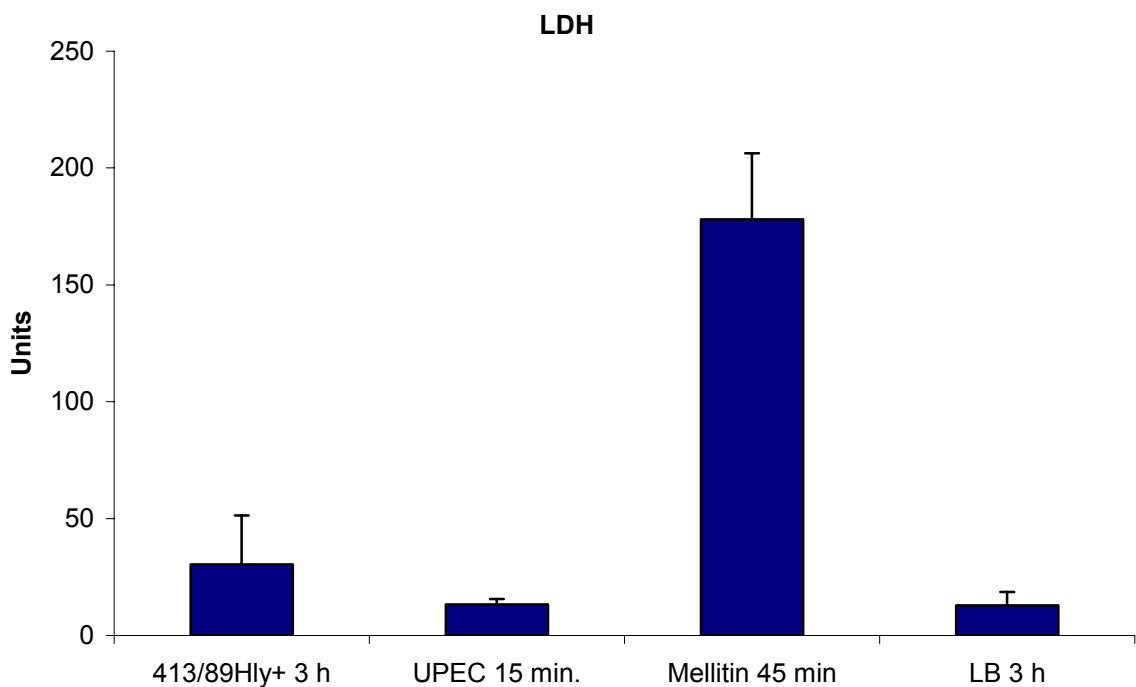


Abb. 17

## Ergebnisse

Bei UPEC beweist der niedrige LDH-Wert bei 15 min. dass die Phosphoinositol-Antwort der schädigenden Wirkung deutlich vorausgeht, da sich zu diesem Zeitpunkt schon deutlich vermehrt Inositolphosphate finden (s. o.). Für isoliertes  $\alpha$ -Hämolysin ist bekannt, dass es erst in einer Konzentration von 10 HU/ml einen signifikanten LDH-Anstieg als Zeichen eines Zellschadens bewirkt [100], eine Dosis, die hier –geschätzt– für das  $\alpha$ -Hämolysin bei weitem nicht vorlag (s. o.).

Für 413/89<sub>Hly+</sub> ist ähnliches anzunehmen, insbesondere auch dadurch, dass die bisher nicht messbaren Konzentrationen des EHEC-Hämolysins deutlich niedriger als die des  $\alpha$ -Hämolysins sein dürften, da das EHEC-Hämolysin in geringerem Umfang sezerniert wird (s. o.).

### **Kontrollexperimente mit Acetylsalicylsäure zeigen, dass die Methode der Prostazyklin-Messung die Prostazyklin-Konzentration im Versuchsaufbau erfasst**

Ein weiteres Kontrollexperiment war die einstündige Inkubation mit einem bekannten wirksamen Inhibitor der Prostazyklinsynthese, Acetylsalicylsäure (ASS). Diese konnte die Wirkung des hochpotenten  $\text{Ca}^{++}$ -Porenbildners A23187 auf die Prostazyklinsynthese vollständig verhindern, was zeigt, dass die in den Versuchen erhaltenen Messwerte tatsächlich der Prostazyklin-Konzentration äquivalent sind (Abb. 18).

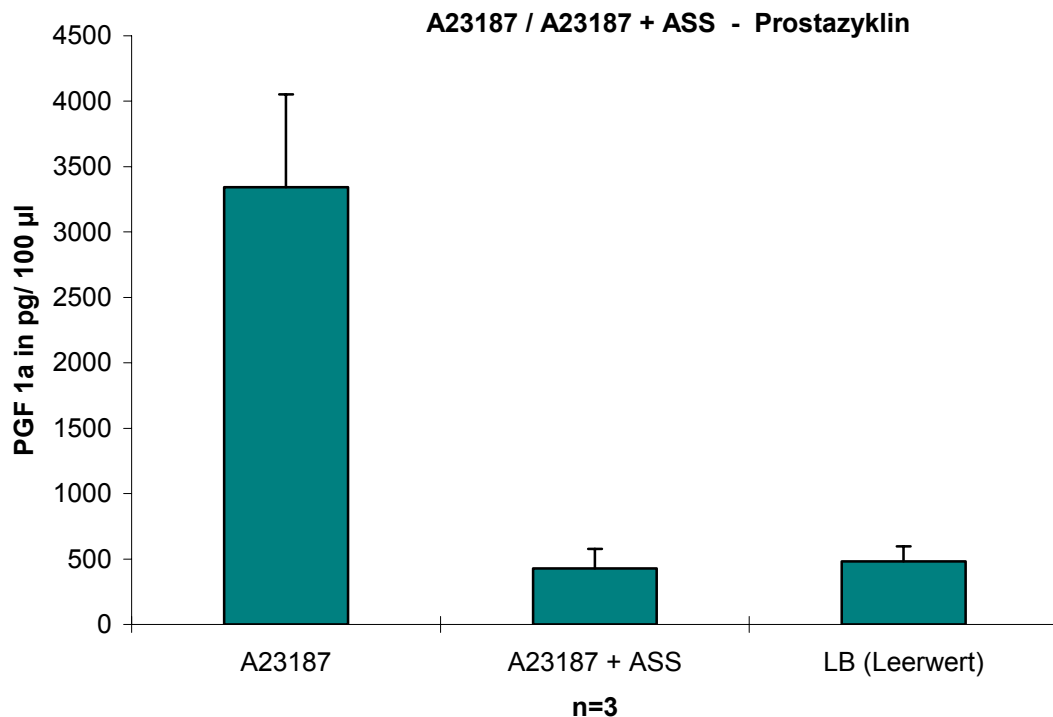


Abb. 18

## 5 DISKUSSION

Die durchgeführten Experimente hatten das Ziel, das neu entdeckte bzw. charakterisierte Exotoxin enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC), das für EHEC spezifische Hämolysin ( $Hly_{EHEC}$ ) im Modell mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) zu untersuchen. Diese Zellreihe wurde gewählt, da bei EHEC neben einer schweren lokalen hämorrhagischen Entzündung im Dickdarm die systemische Wirkung von besonderer Bedeutung ist, bei der wiederum Endothelzellen eine entscheidende Rolle spielen. Dabei kommt es zur Ausbildung des so genannten hämolytisch-urämischen Syndroms. Verschiedene Faktoren in dessen Pathogenese sind inzwischen bekannt, jedoch nichts über die Bedeutung des EHEC-spezifischen Hämolytins. Ziel der Versuche war es daher, die wichtigsten bekannten Reaktionsmechanismen der Endothelzellen unter Einwirkung dieses Hämolytins zu überprüfen: neben der Signaltransduktion mittels Inositolphosphaten die Bildung der Entzündungsmediatoren Prostazyklin und des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF). Verwendet wurde dazu der annähernd selektiv das EHEC-Hämolysin produzierende rekombinante Bakterienstamm 413/89 $Hly+$ , und zwar teils als Bakteriensuspension, teils als deren Überstand. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurde im gleichen Versuchsansatz jeweils ein uropathogener *E. coli*-Stamm (UPEC) mitgeführt; dieser produziert das länger bekannte und strukturell sehr ähnliche  $\alpha$ -Hämolysin. Neu an der Versuchsanordnung war dabei auch der Einsatz eines UPEC-Wildstammes, da bisherige Untersuchungen nur mit isoliertem  $\alpha$ -Hämolysin durchgeführt wurden.

Die Thematik wurde in folgende konkrete Fragestellungen umgesetzt, die zusammen mit den eigenen Ergebnissen im Folgenden diskutiert werden:

1. Hat das EHEC-Hämolysin Einfluss auf die Signaltransduktion mittels Phosphoinositol-Antwort bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)?
2. Bewirkt das EHEC-Hämolysin bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) eine Bildung der Entzündungsmediatoren Prostazyklin ( $PGI_2$ ) und des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)?

## Diskussion

3. Lässt sich die für isoliertes  $\alpha$ -Hämolysin bekannte Signaltransduktion in HUVEC auch mit dem uropathogenen Wildtyp nachweisen? Welche Unterschiede bestehen zum EHEC-Hämolysin?
4. Handelt es sich bei dem EHEC-Hämolysin um ein frei sezerniertes Produkt oder ist der unmittelbare Kontakt zwischen Bakterium und Endothelzelle für die Wirkung des Hämolysins erforderlich?
5. Welche Mechanismen liegen der durch das EHEC-Hämolysin ausgelösten Signaltransduktion bei HUVEC zugrunde? Besteht eine Abhängigkeit von einer Tyrosinkinase?
6. Lassen sich neue Hypothesen über die pathophysiologische und klinische Bedeutung der E. coli-Hämolysine, insbesondere des EHEC-Hämolysins, ableiten?

### **5.1 Das EHEC-Hämolysin bewirkt bei humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) einen signifikanten Anstieg von Inositolphosphaten (IP<sub>x</sub>) und steuert damit die bakterielle Adhäsion**

#### **Hly<sub>EHEC</sub> induziert bei HUVEC einen langsamen Anstieg von Inositolphosphaten**

Im Versuch wurde ein rekombinanter Shiga-like produzierender E. coli-Stamm verwendet, entstanden aus einem Hämolysin-negativen bovinen EHEC-Stamm (413/89-6), dem in einem Plasmid die Sequenz des EHEC-Hämolysins (Hly<sub>EHEC</sub>) zugefügt worden war. Der resultierende Stamm, im Folgenden vereinfacht immer als „413/89<sub>Hly+</sub>“ bezeichnet, lässt damit eine quasi isolierte Betrachtung der Wirkung des Hämolysins zu. Als Kontrollstamm wurde jeweils ein apathogener E. coli Stamm (470) verwendet, der nur das Vektorplasmid enthielt. Als Bezugswert (Leerwert) für die beobachteten Effekte wurden jeweils zeitgleich zum Stimulus Endothelzellen lediglich mit Bakterien-Medium versetzt.

## Diskussion

Der rekombinante Stamm 413/<sub>89Hly+</sub> induzierte eine signifikante Phosphatidylinositol-Hydrolyse in den Endothelzellen mit dem 2,8fachen des Leer-/Kontrollwertes und einem Maximum bei drei Stunden nach Beginn der Inkubationszeit.

Dies ist ein relativ langsamer Effekt, im Gegensatz z. B. zu vielen Wachstumsfaktoren und Hormonen [101] und auch zum  $\alpha$ -Hämolyisin (s. u.), jedoch ähnlich wie bei der durch EPEC ausgelösten Signaltransduktion (s. u.).

In bisherigen Untersuchungen mit EHEC-Wildstämmen wurde bereits grundsätzlich eine Signaltransduktion für EHEC nachgewiesen. Diese zeigt in ihrer Ausprägung und im zeitlichen Verlauf Ähnlichkeit zu der von EPEC (s. u.): Ismaili et al. inkubierten 1995 Kulturen der humanen Epithelzell-Linie Hep-2 mehrere Stunden mit verschiedenen VTEC- (Synonym für EHEC) Stämmen. Dabei zeigte sich eine Anhebung des Inositolphosphat-Spiegels um durchschnittlich  $167 \pm 25$  %. Diese Werte waren ähnlich denen mit EPEC erzielten [102]. Neue eigene Versuche mit dem EHEC-Wildstamm EDL 933 [103, unveröffentlichte Daten] zeigten ebenfalls nach 3 h eine um etwa 90 % erhöhte Konzentration von Inositolphosphaten gegenüber dem Ausgangswert.

Die genaue Rolle des durch das Hämolyisin ausgelösten Inositolphosphat-Anstiegs bei EHEC ist im Folgenden zu diskutieren, wobei lokale und systemische Wirkungen zu unterscheiden sind. Für enteropathogene E. coli (EPEC), welche ähnliche strukturelle Veränderungen an der Darmschleimhaut bewirken, ist die Bedeutung verschiedener Formen der Signaltransduktion für ihren Pathomechanismus bekannt. Es erscheint daher sinnvoll, zunächst die bei EPEC bereits bekannten Phänomene (siehe auch Einleitung) noch einmal zu erörtern, um mögliche Parallelen zu EHEC zu erkennen:

### **Bei enteropathogenen E. coli (EPEC) treten ähnlich wie bei EHEC verschiedene Formen der Signaltransduktion auf, die in Zusammenhang mit der Bildung der AE-Läsion stehen**

Eine EPEC-Infektion löst bei Darmepithelzellen verschiedene Vorgänge aus, die im weiteren Sinn zu den Signaltransduktions-Mechanismen gezählt werden: Zytoskelett-Veränderungen mit einer Umstrukturierung von Aktin [104], eine Phosphorylierung von leichten Myosin-Ketten [105] sowie der Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors (Tir, früher Hp90 genannt) [106]. Mit einem Anstieg der second-messenger-Moleküle freies intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  [107] und der Inositolphosphate kommt es zur

Signaltransduktion im engeren Sinn [108,109,101]. Das zeitliche Maximum für die Inositolphosphate wird bei 3-4 h angegeben [104,108], auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und Tyrosin-Phosphorylierung treten entsprechend spät auf [110,108].

Alle Vorgänge resultieren bzw. sind Teil der Ausbildung der für EPEC charakteristischen attaching and effacing-(AE)-Läsion:

**Die „attaching and effacing“- (AE) Läsion als Kombination von Adhäsion und Zellumstrukturierung ist das wichtigste Korrelat der Pathogenese von EPEC**

Die Adhärenz von Bakterien an die Wirtszelle stellt zunächst eine wesentliche Bedingung dar, um einerseits die lokale Konzentration von bakteriellen Produkten zu erhöhen und andererseits gegebenenfalls auch in die Zelle einzudringen.

Die erste lockere Anheftung des Bakteriums an die Epithelzelle der Darmschleimhaut erfolgt bei EPEC über Fimbrien. 1991 beschrieben Giron et al. [111] induzierbare Fimbrien, die von EPEC produziert werden und die dazu neigen, zu aggregieren und Bündel zu formen („bundle-forming pilus“/BFP). Weitere von EPEC produzierte Fimbrien sind bekannt.

Nach Anheftung der Bakterien an die Zelloberfläche kommt es zu ausgedehnten Veränderungen der Ultrastruktur mit einerseits einem Verlust von Mikrovilli an den Stellen, an denen die Bakterien binden und andererseits zu einer Elongation an angrenzenden Abschnitten. Dieser Vorgang ist Folge einer ausgedehnten Umstrukturierung von Aktin mit dem Ergebnis der Bildung von charakteristischen Becher-ähnlichen Sockeln [31,32].

**Erste Schritte der Bildung der AE-Läsion sind die Bildung von Intimin und dem Intimin-Rezeptor**

Im EPEC-Chromosom befindet sich die so genannte LEE-Region mit einer Größe von 35 kbp, die alle bekannten, für die Bildung der AE-Läsionen notwendigen Virulenzfaktoren codiert (LEE=locus for enterocyte effacement). Innerhalb dieser Region liegt das *eae*- (früher *eaeA* genannt) Gen. Dieses codiert ein 94 kDa großes Protein der äußeren Bakterienmembran [33], welches für die enge Anheftung (attachment) von EPEC zu Epithelzellen verantwortlich ist [112]. Dabei ist es offenbar weitgehend nur für diesen Anheftungs-Aspekt der attaching and effacing (AE)-Läsion erforderlich, da die *eae*-Mutanten die übrigen mit der AE-Läsion in Zusammenhang stehenden Fähigkeiten behalten [106,101,35,113]. Das Protein ist hoch homolog zu

## Diskussion

Invasin, dem Produkt der *inv*-Gene von *Yersinia enterocolica* und *Y. pseudotuberculosis* und wurde „**Intimin**“ benannt [110].

Das homologe Invasin fördert die bakterielle Invasion durch Bindung an eukaryote Transmembran-Proteine, und zwar speziell an das  $\beta_1$ -Integrin. Ähnlich wie Invasin kann auch Intimin an die extrazelluläre Domäne von eukaryoten Transmembran-Proteinen binden [114].

Für Bakterien, die Invasin oder Intimin bzw. ähnliche Proteine bilden, ist bekannt, dass der C-terminale Abschnitt (280 Aminosäuren) dieser Proteine Rezeptor-bindende Aktivität enthält [115]. Für Intimin ist der entsprechende Rezeptor ein ursprünglich Hp 90 genanntes 90 kDa-Protein in der Wirts-Zellmembran. Kenny et al entdeckten 1997, dass dieses Protein bakteriellen Ursprungs ist und von EPEC in die Wirts-Zellmembran integriert wird; seitdem wird es als **Tir** (translocated intimin receptor) bezeichnet [116].

### **EHEC bilden in ähnlicher Weise wie EPEC die AE-Läsion mit Intimin und Intimin-Rezeptor**

Unterschiede zu EPEC bestehen zunächst beim Erstkontakt: Im Gegensatz zu EPEC bilden EHEC keine „bundle-forming pili“ (BFP) [117], für einen Teil der Stämme sind jedoch einzelne andere Adhäsine nachgewiesen.

Andererseits besitzen EHEC die gleiche LEE-Region und damit gleichermaßen alle bekannten, für die Bildung der AE-Läsionen notwendigen Gene. Es gibt konkrete Hinweise, dass die AE-Läsion auch bei EHEC-Stämmen den wesentlichen Adhärenzfaktor darstellt, da sie mit der Produktion anderer wesentlicher Faktoren eng korreliert: In einer Untersuchung von Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (entspricht EHEC) von Sandhu et al. wurde die Hämolyysin-Gensequenz in 98 % der *eae*-positiven Isolate nachgewiesen, jedoch nur in 34 % der *eae*-negativen Isolate [117].

Während AE-Läsionen für EPEC auch direkt bei Patienten nachgewiesen wurden [118,119], war dies für EHEC bislang erst in Gewebekulturen und im Tiermodell möglich [39,45,46,47].

Die Gene scheinen funktionell gleichwertig zu sein, da bei EHEC-*eae*-Mutanten die fehlende Funktion sowohl durch Auffüllen mit dem EHEC *eae*-Gen als auch mit dem EPEC-*eae*-Gen wiederhergestellt werden kann.

Die prädiktiven (vorhergesagte) Aminosäure-Sequenzen beider Proteine (Intimine) sind zu 83% identisch, wobei die Unterschiede im C-terminalen Bereich liegen, der für die Rezeptorbindung verantwortlich ist [120,121]. Auch für EHEC ist ein Intimin-Rezeptor



der Wirtszelle (Tir) bekannt, der einem bakteriellen Protein entspricht, welches in die Zellmembran integriert wird. Ein wesentlicher Unterschied zu EPEC besteht jedoch darin, dass dieser nicht Tyrosin-phosphoryliert ist (s. 5.5) [123,124].

**Die Bildung der AE-Läsion wird bei EPEC und EHEC durch den Inositolphosphat-Signaltransduktionsweg gesteuert, bei EHEC durch das Hämolysin induziert**

Die AE-Läsion ist bei EPEC und EHEC von der Phosphatidylinositol-Hydrolyse abhängig: In einer Untersuchung von Dytoc et al. führte die Pufferung des freien intrazellulären Calciums (als second messenger) bei EPEC zur Hemmung der Bildung der AE-Komplexe [109]. In einer neuen Arbeit von Johnson-Henry et al. wurde die Wirkung verschiedener spezifischer Inhibitoren der Inositolphosphat-Signaltransduktion auf die Bildung der AE-Läsion bei EPEC und EHEC untersucht [125]. Dabei zeigten EPEC und EHEC jeweils parallel eine Hemmung der  $\alpha$ -Aktinin-Akkumulation bzw. -reorganisation bei Hemmung aller Schritte der Inositolphosphat-Signaltransduktion.

Damit kann angenommen werden, dass Hly<sub>EHEC</sub> als Induktor des Inositolphosphat-Anstiegs wesentlich für die Steuerung der Bildung der AE-Läsion ist. Auch Beobachtungen bezüglich der Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors unterstützen diese Annahme (siehe 5.5).

Die Bedeutung des Hämolysins als ein Hauptfaktor in diesem Mechanismus ist direkt nachweisbar: Karch et al. zeigten 1987, dass das Plasmid pO157, welches das EHEC-Hämolysin codiert, für die Adhäsion zu epithelialen Zellen erforderlich ist, da der spontane Verlust des Plasmids zum Verlust dieser Fähigkeit führt [85].

Die Bildung der Inositolphosphate geht zwangsläufig zeitlich der Bildung der AE-Läsion voraus: Dazu passt, dass bei EHEC und EPEC die AE-Läsion nach Inkubationszeiten zwischen 3 h und 6 h nachgewiesen wird [126,102,6].

## **5.2 Das EHEC-Hämolysin fördert durch eine Induktion der PAF-Synthese ohne gleichzeitige Prostazyklin-Synthese die Ausbildung der hämorrhagischen Kolitis**

### **Hly<sub>EHEC</sub> bewirkt einen langsamen Anstieg des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)**

Der Einfluss auf die PAF-Synthese ist offenbar eine weitere wesentliche Funktion der Hämolyse. Zumindest finden sich für EPEC, welche kein Hämolysin produzieren, in der Literatur keine Angaben zum Einfluss auf den PAF, während für das  $\alpha$ -Hämolysin einige Kenntnisse vorhanden sind, auch bezüglich des EHEC-Hämolyseins gibt es indirekte Hinweise (s. u.). In den eigenen Versuchen zeigte die Messung von freiem und zellgebundenen PAF unter Einfluss von 413/89<sub>Hly+</sub> einen signifikanten und anhaltenden Anstieg der Konzentration (maximaler Faktor 1,64 gegenüber dem Leerwert). Erstaunlicherweise hatte der durch 413/89<sub>Hly+</sub> verursachte Effekt sogar bei längeren Inkubationszeiten (3 h) noch kein eindeutiges Maximum erreicht, so dass der weitere Verlauf offen ist.

Dieser beobachtete Effekt ist gut vereinbar mit den bisherigen Kenntnissen über PAF bei EHEC-Infektionen. PAF löst eine Vielzahl von Effekten aus, die im Rahmen des Schockgeschehens von Bedeutung sind, u. a. eine Thrombozyten-Aktivierung und -aggregation welche neben anderen Phänomenen (s. u. 5.6) wesentlich in der Pathogenese des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) sind. PAF wird während der akuten Phase des HUS im Urin von Patienten gefunden [127], auch im Plasma ist es beim HUS nachweisbar [128,129].

Die Bedeutung des PAF für den mikrozirkulatorischen Schaden bei der hämorrhagischen Enteritis (durch verschiedene Erreger) wurde auch konkret nachgewiesen: In einem Tiermodell von Sjogren et al. mit einem SL-Toxin produzierenden E. coli-Stamm spielte PAF eine wichtige Rolle [130]. In Versuchen von Tashiro et al bewirkte eine intraarterielle Injektion von Shiga-like-Toxinen beim Dünndarm von Ratten hämorrhagische Läsionen unter gleichzeitigem Anstieg von PAF. Diese Effekte wurden durch einen PAF-Antagonisten abgeschwächt [131]. Ähnliche Ergebnisse berichtete Boku 1994, wobei verschiedene Einzelbefunde einer durch Clostridium difficile-Toxin ausgelösten hämorrhagischen Enteritis durch den PAF-Antagonisten CV6209 signifikant supprimiert wurden [132]. Auch in einer anderen

Untersuchung konnte der protektive Effekt eines PAF-Antagonisten gegenüber einem durch Endotoxin induzierten PAF-bedingten Mucosa-Schaden nachgewiesen werden [133].

Für das EHEC-Hämolysin, das bisher nicht als isoliertes Toxin verwendet wurde, sind die eigenen Versuche bisher die einzigen, in denen die unmittelbare Stimulation der PAF-Synthese durch das Hämolysin gezeigt wurde. Zusammenfassend besteht damit offenbar eine synergistische Wirkung von Hly<sub>EHEC</sub> und Shiga-like-Toxin bezüglich der PAF-Synthese.

**Hly<sub>EHEC</sub> zeigt bezüglich der Induktion der PAF-Synthese sowohl eine unspezifische als auch eine rezeptorvermittelte Wirkung**

Die PAF-Synthese von Endothelzellen wird durch erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel induziert. Dies kann durch zwei verschiedene Vorgänge bewirkt werden: Der eine besteht in einer intrazellulären Freisetzung aus Ca<sup>2+</sup>-Speichern, bedingt durch einen spezifischen rezeptorabhängigen Signaltransduktionsweg mit Anstieg von Inositolphosphaten. Die andere Möglichkeit ist ein transmembranöser Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von extrazellulär. Dabei kann wiederum zwischen einem rezeptorbedingten und einem unspezifischen, durch Membrandefekte bedingten Effekt unterschieden werden.

In bisherigen Untersuchungen an Hly<sub>EHEC</sub> wurden konkrete porenbildende Eigenschaften nachgewiesen: Es bildet einen etwa 2,6 nm großen Kanal, der eine hohe Kationen-Selektivität aufweist [78]. Calcium-Ionen wurden bisher nicht direkt gemessen, es kann jedoch angenommen werden, dass das Toxin analog dem  $\alpha$ -Hämolysin einen Calcium-Einstrom verursacht.

Für einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von extrazellulär spricht zunächst, dass die PAF-Synthese in den durchgeführten Versuchen relativ frühzeitig stimuliert wird und damit der hier langsamen Signaltransduktion zeitlich deutlich vorausgeht. Da diese jedoch ebenfalls eine Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels bewirkt, besteht offenbar eine so genannte duale Wirkung des Hämolysins, d. h. eine Überlagerung beider Effekte.

Bei anderen Toxinen wurde eine sekundäre autokrine Aktivierung der Inositolphosphat-Bildung durch den PAF diskutiert. Solch ein Effekt kann mit den bisherigen Untersuchungen hier nicht ausgeschlossen werden. Beim  $\alpha$ -Hämolysin ist er jedoch nicht erforderlich für die Inositolphosphat-Bildung (s. u.), dies könnte in Analogie dazu auch für das EHEC-Hämolysin gelten.

## **Das EHEC-Hämolysin bewirkt keinen oder verhindert den Anstieg der Prostazyklin-Synthese**

Prostazyklin ist einer der wichtigsten, von Endothelzellen gebildeten Entzündungsmediatoren (siehe Einleitung). Damit ist auch die Frage von Interesse, ob sich die Bildung des Prostazyklins von Hämolysinen stimulieren lässt. Die Bestimmung der Prostazyklin(PGI<sub>2</sub>)-Produktion erfolgte hier indirekt über die Messung des Metaboliten PGF<sub>1α</sub>.

Hly<sub>EHEC</sub> konnte in den durchgeführten Versuchen nicht die Prostazyklin-Synthese fördern; auch im längeren Verlauf bewirkten 413/89<sub>Hly+</sub> ebenso wie der Kontroll-Stamm keinerlei Anstieg der PGF<sub>1α</sub>-Konzentration. Ob hier ein einfaches Fehlen der Stimulation oder sogar eine aktive Hemmung der physiologischen Prostazyklin-Synthese vorliegt, für die es in der Literatur Hinweise gibt (s. u.), ist anhand der eigenen Ergebnisse nicht signifikant zu klären.

Die Arachidonsäure-Metabolite Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan (Tx)A<sub>2</sub> sind bei dem hämolytisch-urämischen Syndrom von besonderem Interesse. Das von den Endothelzellen produzierte Prostazyklin ist ein Vasodilatator, welcher auch die Plättchen-Aggregation und –Adhäsion hemmt. Thromboxan, welches von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird, ist eine vasokonstriktiv wirkende Substanz, die die Plättchen-Aggregation fördert. Ein Missverhältnis zwischen diesen Gegenspielern könnte das Nierenversagen beim hämolytisch-urämischen Syndrom durch eine renale Vasokonstriktion verursachen und eine Thrombose der renalen Mikrovaskularisation bewirken oder diese zusammen mit der beim HUS auftretenden endothelialen Dysfunktion fördern (s. u.). Hier deutet sich auch eine weitere Bedeutung des PAF für den mikrozirkulatorischen Schaden an (s. o.) durch die Tatsache, dass PAF über die Thrombozyten-Aktivierung die Bildung von Thromboxan fördert.

Während der akuten Phase des Syndroms findet sich tatsächlich ein Anstieg des Thromboxans [134,135] als Ergebnis einer Plättchenaktivierung. Die Beobachtungen bezüglich des Verhaltens des Prostazyklin-Spiegels beim HUS sind dagegen kontrovers: Mehrfach wurde eine verminderte Bildung des Prostazyklins (PGI<sub>2</sub>) durch die Gefäße und eine reduzierte Serum-Bindungskapazität für PGI<sub>2</sub> festgestellt [136,137,138,139,140]. Dabei handelte es sich um indirekte Messungen, wobei jedoch auch die reduzierte Ausscheidung des (renalen) Metaboliten von PGI<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, diese Beobachtung bestätigt. Diese kehrt in der Remission zu normalen Werten zurück [141]. Andere, jedoch weniger Untersucher haben auch eine Zunahme der PGI<sub>2</sub>-

Produktion beobachtet [142]. Vereint werden könnte dies mit der Theorie, dass bei einem bestimmten Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt der PGI<sub>2</sub>-Spiegel die Mischung von hemmenden und stimulierenden Faktoren reflektiert [142], etwa mit einer anfänglichen Zunahme der Produktion durch eine anfängliche Verwirrung und dadurch Stimulierung der Endothelzellen und einer verminderten Produktion bei bereits geschädigten Zellen [141]. Gegen diese einfache Erklärung sprechen jedoch die eigenen Ergebnisse, bei denen auch in frühen Stadien keine Prostazyklin-Synthese nachweisbar war, in denen noch keine Zellschädigung anzunehmen ist. Die gezielte Hemmung der Prostazyklin-Synthese durch bakterielle Faktoren bleibt daher eine interessante Hypothese. Dazu passen würde auch die Beobachtung, dass die Bildung der AE-Läsion nicht durch eine Hemmung der Cyclooxygenase vermindert wird, d. h. eine Hemmung der Prostazyklin-Synthese durch das Bakterium würde nicht anderen bakteriellen Effekten entgegenwirken [125].

Eine durch isoliertes Shiga-like (SL)-Toxin verursachte Abnahme der Prostazyklin-Synthese konnte bereits direkt nachgewiesen werden [69]. Selbst wenn sich dies für das EHEC-Hämolysin nicht parallel bestätigen lässt, bleibt doch davon unbenommen der zumindest passiv fehlende Anstieg der Synthese, der die gleiche pathogenetische Bedeutung hat.

**5.3 Das  $\alpha$ -Hämolysin uropathogener E. coli (UPEC) bewirkt bei HUVEC einen im Vergleich zu Hly<sub>EHEC</sub> noch stärkere Signaltransduktion, welche ebenfalls eine wesentliche Aktivierungsfunktion in der Pathogenese hat: Die endotheliale Entzündungsreaktion wird jedoch beim  $\alpha$ -Hämolysin im Gegensatz zum EHEC-Hämolysin mehr über eine ausgedehnte Prostazyklin-Synthese als über eine PAF-Synthese vermittelt**

**Das  $\alpha$ -Hämolysin uropathogener E. coli bewirkt beim Einsatz eines Wildtyps einen starken Anstieg von Inositolphosphaten, wobei ebenfalls eine duale Wirkung besteht**

Die bisherigen Kenntnisse über die Wirkungen des  $\alpha$ -Hämolysins wurden alle an Untersuchungen mit dem isolierten Toxin erworben. In den hier durchgeführten Versuchen wurde dagegen erstmals der UPEC- (uropathogene E. coli-) Wildstamm

## Diskussion

direkt mit Endothelzellen in Kontakt gebracht. Dabei kam es bereits 5 min. nach Beginn der Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der Inositolphosphate. Bis zum Maximum bei 2 h stieg der Spiegel etwa auf das 9fache des Leerwertes. Damit tritt die Wirkung im Vergleich zu Hly<sub>EHEC</sub> wesentlich früher ein und erreicht mehrfach höhere Maximalwerte (dort erst nach 2 h mit einem maximalen Faktor von 2,8 gegenüber dem Leerwert, s. o.).

Für Endothelzellen, z. B. humane Nabelschnur-Endothelien (HUVEC), ist bekannt, dass sie durch  $\alpha$ -Hämolyisin aktiviert werden. In einer Untersuchung von Grimminger et al 1997 bewirkte das  $\alpha$ -Hämolyisin einen ausgeprägten dosisabhängigen Inositolphosphat-Anstieg, deutlich höher als das mituntersuchte Staphylococcus aureus- $\alpha$ -Toxin [100]. Daneben wird die Bildung inflammatorischer und vasodilatatorischer Mediatoren induziert (s. u.), wobei auch diese Effekte über die Signaltransduktion mittels Inositolphosphatweg vermittelt werden.

Die eigenen Ergebnisse sind im zeitlichen Verlauf und im Ausmaß diesen ähnlich, weshalb angenommen werden kann, dass auch bei dem UPEC-Wildtyp die Signaltransduktion im Wesentlichen durch das Hämolyisin bewirkt wird.

Im Vergleich mit einer standardisierten Dosisreihe isolierten  $\alpha$ -Hämolyisins (siehe Ergebnisteil) konnte in den eigenen Versuchen die durch den UPEC-Stamm produzierte  $\alpha$ -Hämolyisin-Menge auf etwa 1 HU (standardisierte hämolytische Einheit) geschätzt werden. Diese Dosis hat sich auch in anderen veröffentlichten Untersuchungen, etwa der von Grimminger et al. [100], als besonders effektiv gezeigt. Auch bei humanen neutrophilen Granulozyten ist das  $\alpha$ -Hämolyisin ein Induktor der Phosphoinositol-Hydrolyse mit der nachfolgenden Bildung verschiedener Inositolphosphate sowie von Diacylglycerol. Das Hämolyisin ist auch hier hochwirksam, seine Wirkung übertrifft die, welche bei optimalen Konzentrationen z. B. von PAF, Leukotrien B<sub>4</sub> oder Staphylococcus alpha-Toxin auftritt. Die Signaltransduktion via Inositolphosphat-Bildung ist offenbar auch hier -ähnlich wie bei Endothelzellen- der wesentliche Mechanismus, über die das Hämolyisin die Granulozyten aktiviert [143].

In der Untersuchung von Grimminger et al. 1997 mit Endothelzellen übertraf der durch das  $\alpha$ -Hämolyisin hervorgerufene Inositolphosphat-Anstieg mehrfach den Effekt des unspezifischen Ca<sup>2+</sup>-durchlässigen Porenbildners A 23187. Andererseits ließ sich der Effekt durch Pertussis-Toxin hemmen, welches ein Inhibitor von G-Proteinen ist und

damit rezeptorvermittelte Prozesse anzeigt [100]. Dies zeigt, dass hier die rezeptorbedingte Wirkung des Hämolytins bedeutsamer ist als die Porenbildung mit dem dadurch bedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und der daraus folgenden unspezifischen Zellaktivierung. Auch die bekannte, durch das Toxin bewirkte Zelllyse, tritt damit in den Hintergrund.

Von Interesse in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Laestadius et al [144]: In renalen proximalen Tubuluszellen bewirken niedrige Dosen von  $\alpha$ -Hämolytin eine nach fünf Minuten einsetzende Oszillation der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, höhere Dosen verursachen einen anhaltenden  $\text{Ca}^{++}$ -Anstieg. Insgesamt besteht also eine duale Wirkung des  $\alpha$ -Hämolytins- parallel zu den Beobachtungen bezüglich PAF bei  $\text{Hly}_{\text{EHEC-}}$ , indem niedrige Dosen eine rezeptorvermittelte Wirkung erzielen, während bei höherer Konzentration die Porenbildung an Bedeutung gewinnt [144]. Die Bindungsstelle des  $\alpha$ -Hämolytin-Rezeptors ist inzwischen bekannt, sie wurde im ionotropen Glutamat-Rezeptor identifiziert [145].

### **$\alpha$ -Hämolytin bewirkt im Gegensatz zum EHEC-Hämolytin nur eine zeitlich begrenzte Stimulation der PAF-Synthese**

Für  $\alpha$ -Hämolytin wurde bereits früher nachgewiesen, dass es als aufbereitetes Toxin humane Endothelzellen zur dosisabhängigen Bildung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) stimuliert. Das Maximum der Wirkung wurde dabei bereits nach 5 Minuten erreicht, die wirksamste Dosis betrug 1 HU/ml (hämolytische Einheit); die Maximalwirkung entsprach etwa der Hälfte der von Thrombin als Positivkontrolle [100,146].

Diese Ergebnisse konnten auch in den eigenen Versuchen mit dem UPEC-Wildstamm zunächst bestätigt werden, wenn auch in geringerer Ausprägung: Die Endothelzellen zeigten hier parallel zu den Versuchen mit  $413/89_{\text{Hly}+}$  einen Anstieg der PAF-Konzentration bis 30 min., der Maximalwert betrug dabei Faktor 1,28 des Leer-/Kontrollwertes. Eine überraschende Entwicklung zeigte sich allerdings im längeren Verlauf: Nach etwa 60 Minuten waren die Werte annähernd wieder auf den Leerwert gesunken. Für ein solches Verhalten gibt es bisher nur einzelne Hinweise in der Literatur: In den oben genannten Versuchen von Grimminger et al. deutet sich ein mögliches Wiederabsinken des PAF-Wertes bereits an, längere Inkubationszeiten als 10 Minuten wurden jedoch nicht untersucht [100]. In einer Untersuchung von Tufano et al. stimulierten (unspezifische) Porine, die in der äußeren Membran gramnegativer

Bakterien liegen und transmembranale Poren bilden, die PAF-Biosynthese in humanen Endothelzellen. Dabei zeigte sich ein ähnlicher Verlauf mit einem Maximum nach etwa 15 Minuten und dem Wiedererreichen des Leerwertes nach 60 Minuten [147].

Eine Erklärung für diese Beobachtung existiert nicht. Eine Hypothese wäre, dass ein länger anhaltender hoher Inositolphosphat-Spiegel die Herunterregulierung oder den Abbau von PAF induziert, wozu es jedoch noch keinerlei Untersuchungen gibt. Eine Erschöpfung der Zellen zu einem so frühen Zeitpunkt ist dagegen eher unwahrscheinlich, da bei den anderen untersuchten Reaktionen - der Produktion von Prostazyklin und der Bildung von Inositolphosphat - bis zu 2 h noch ein deutlicher weiterer Anstieg zu verzeichnen war.

### **Auch bei der durch das $\alpha$ -Hämolyysin vermittelten PAF-Synthese besteht eine duale Wirkung**

Wenn das  $\alpha$ -Hämolyysin eine duale Wirkung bezüglich der Signaltransduktion zeigt, ist anzunehmen, dass dies auch für die nachgeschaltete Stimulation der PAF-Synthese zutrifft, parallel zu Hly<sub>EHEC</sub> (S. 5.2).

Direkte Kenntnisse über den Einfluss bakterieller porenbildender Toxine auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel und/oder auf die Ca<sup>2+</sup>-abhängige PAF-Synthese sind bisher wenig vorhanden. Es wird einerseits angenommen, dass bei bakteriellen Infektionen ein extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom der häufigste Mechanismus bezüglich der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung ist, da die Sekretion von porenbildenden Proteinen ein typisches Phänomen ist: Tufano et al. schließen aus ihren Ergebnissen, dass die Stimulation der PAF-Synthese durch unspezifische Porine im wesentlichen durch einen Ca<sup>2+</sup>-Einfluß und weniger durch die intrazelluläre Freisetzung verursacht wird, da sie unter Abwesenheit von extrazellulärem Calcium nicht auftritt [147].

Auch Whatley et al fanden eine Abhängigkeit der PAF-Synthese boviner Endothelzellen von einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, offenbar durch entsprechende Ca<sup>2+</sup>-Kanäle: In parallelen Versuchen verursachten porenbildende Toxine (Mellitin, Clostridium perfringens-Theta-Toxin) den gleichen Effekt [148]; dasselbe ist offenbar bei dem von Staphylococcus aureus gebildeten  $\alpha$ -Toxin der Fall, bei dem die Wirkung ebenfalls abhängig von der Anwesenheit extrazellulären Calciums ist [100].

Für  $\alpha$ -Hämolyysin konnte die Frage der Abhängigkeit der Stimulation der PAF-Synthese von extrazellulärem Calcium bisher aus methodischen Gründen nicht geklärt werden, da



die Bindung des Toxins an die Ziel-Zellmembran als Voraussetzung für seine Wirkung selbst calciumabhängig ist (s. o.) [147]. Versuche mit Pertussis-Toxin zur Frage der Abhängigkeit seiner Wirkung von einem G-Protein, wie sie parallel für Prostazyklin existieren, wurden bisher nicht durchgeführt.

So bleibt hier nur folgende Schlussfolgerung: Da das  $\alpha$ -Hämolysin über seine ausgeprägte Inositolphosphat-Signaltransduktion einen intrazellulären Calcium-Anstieg bewirkt, ist anzunehmen, dass dieser Weg für das Toxin zumindest in niedriger Konzentration den Hauptmechanismus zur Stimulation der PAF-Synthese darstellt. Andererseits ist über die bekannte Porenbildung des Toxins zumindest in höheren Konzentration ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär zu erwarten. Damit kann also auch hier von einer dualen, sowohl unspezifischen als auch spezifischen rezeptorvermittelten Wirkung ausgegangen werden.

**$\alpha$ -Hämolysin induziert im Gegensatz zum EHEC-Hämolysin eine hochgradige Steigerung der Prostazyklin-Synthese mit überwiegender rezeptorvermittelter Wirkung**

Als Antwort auf die UPEC-Einwirkung wurde bei HUVEC eine deutliche Produktion von Prostazyklin bzw. des Metaboliten  $\text{PGF}_{1\alpha}$  beobachtet mit einem frühzeitigen und starken Anstieg und einem Maximum bei 2 h mit etwa der 5,8-fachen Konzentration des durchschnittlichen Leerwertes (LB-Medium). Die lediglich mit dem Bakterienmedium inkubierten Endothelzellen zeigten im längeren Verlauf allenfalls einen geringen Anstieg des Prostazyklin-Spiegels.

Ähnliche Wirkungen isolierten  $\alpha$ -Hämolysins sind bekannt: Bei Perfusion lebender Bakterien durch isolierte Kaninchenlungen bewirkt es z. B. einen Anstieg u. a. von Prostazyklin im Perfusat [149]. Für kultivierte pulmonale Endothelzellen wurde ebenfalls eine Stimulation der Produktion von Prostazyklin unter Einfluss dieses Hämolysins nachgewiesen [80]. Auch bei Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) ist bereits die Stimulation der Prostazyklin-Synthese durch isoliertes  $\alpha$ -Hämolysin gezeigt worden [100].

Auch die Prostazyklin-Synthese wird –wie bei PAF- wesentlich stimuliert durch einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg. Damit stellt sich auch hier wieder die Frage, inwieweit ein rezeptorvermittelter gegenüber einem porenbildenden Effekt des Hämolysins von Bedeutung ist.

## Diskussion

In der Studie mit pulmonalen Endothelzellen [80. s. o.] bestand eine strenge Abhängigkeit von der Anwesenheit extrazellulären Calciums, was wiederum für eine unspezifische Aktivierung der Prostazyklin-Synthese durch Porenbildung spricht. Dagegen stehen jedoch auch hier – parallel zu den o. g. Beobachtungen - die Untersuchungen von Grimminger et al. [100], bei denen die durch das Hämolysin induzierte Prostazyklin-Synthese ähnlich hohe Werte wie die mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Porenbildner A23187 erreichte; die Wirkung des Hämolysins ließ sich jedoch sehr wirkungsvoll durch Pertussis-Toxin hemmen (Inhibitor von G-Proteinen und damit von rezeptorvermittelten Mechanismen, s. o.). Der Widerspruch lässt sich klären durch die Kenntnis, dass schon die Bindung des Hämolysins an die Zielzell-Membran und damit seine Wirkung von der Anwesenheit (extrazellulären) Calciums abhängig ist (s. o.), d. h. diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit beweist hier nicht die Porenbildung [150]. Darüber hinaus setzt die Bildung von Prostazyklin sehr frühzeitig ein (nach 5 min. schon das Dreifache des Leerwertes), gleichzeitig zeigen die eigenen Kontrollversuche mit LDH, dass die Signaltransduktion deutlich vor einer wesentlichen Erhöhung der Membranpermeabilität stattfindet. Insgesamt wird also die Prostazyklin-Synthese noch deutlich mehr –im Gegensatz zu PAF- über eine Rezeptoraktivierung als über einen unspezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom induziert.

### **5.4 $\alpha$ -Hämolysin wird frei, EHEC-Hämolysin überwiegend kontaktabhängig sezerniert**

#### **$\alpha$ -Hämolysin wird von uropathogenen E. coli überwiegend frei sezerniert**

Für die Fragestellung der Sekretion wurden in den hier durchgeführten Versuchen die Bakteriensuspensionen zentrifugiert und die Überstände als (bakterienfreier) Stimulus eingesetzt. Dabei induzierte bei UPEC der Überstand alleine einen Anstieg der Inositolphosphat-Bildung, der 72 % der von Bakterien und Überstand gemeinsam entsprach bzw. Faktor 6,9 des Leer-Kontrollwertes (s. o.).

Zunächst ist damit festzustellen, dass das  $\alpha$ -Hämolysin durch den UPEC-Wildtyp im Wesentlichen frei sezerniert wird. Ein Teil der Wirkung dieses Toxins ist vielleicht auch vom direkten Zellkontakt (Zellassoziaton) abhängig, möglicherweise ist dieser

## Diskussion

Unterschied auch dadurch zu erklären, dass sich bei Inkubation des Überstandes zusammen mit den Bakterien eine höhere Konzentration des Toxins am Wirkort durch die Sedimentation der Bakterien auf die Endothelzellen ergibt.

Die extrazelluläre Sekretion von Toxinen, die Zell- und Gewebeschäden verursachen, ist als ein Hauptmechanismus für die Virulenz bei bakteriellen Infektionen anzusehen. Dabei müssen bei gramnegativen Bakterien zwei Membranen bis zur Ausschleusung aus der Bakterienhülle überwunden werden. Verschiedene hochspezialisierte Mechanismen haben sich zu diesem Zweck entwickelt, wobei zur Zeit sechs Formen bekannt sind: Der Signalpeptid-unabhängige Pathway Typ I, der Haupt-Sekretionsweg Typ II, der kontaktabhängige Weg (Typ III), der Typ IV-Pathway, der *Bordetella pertussis*-TPS-Weg und der Autotransporter-Pathway [151]. Der Typ III-Sekretionsweg beispielsweise wird aktiviert durch den Kontakt mit eukaryoten Zellmembranen und erlaubt dem Bakterium, bakterielle Proteine durch die bakteriellen Membranen und die eukaryote Zellmembran hindurch in die Zielzelle zu injizieren; dieses System findet sich z. B. bei EPEC [152,153].

Die Gene für Virulenzfaktoren und deren Sekretionsapparate liegen bei Bakterien oft in Blöcken zusammen. Für EPEC und EHEC ist dies der bereits mehrfach erwähnte LEE-Abschnitt.

Für  $\alpha$ -Hämolyisin ist bekannt, dass es frei sezerniert wird. Der Sekretionsweg für dieses Hämolyisin ist sogar der Prototyp und der am besten charakterisierte bakterielle Sekretionsweg überhaupt und zählt zu den Typ I-Sekretionssystemen [154,155]. Diese sind von äußeren Signalpeptiden unabhängig, da die sezernierten Proteine selbst im Gegensatz zu allen anderen Sekretionssystemen eine Signalsequenz am C-terminalen Ende besitzen, die bei  $\alpha$ -Hämolyisin 50-60 Aminosäuren lang ist [154,156].

Der spezifische Sekretionsapparat besteht aus zwei Proteinen, deren Gene dem Strukturgen des  $\alpha$ -Hämolyisins (*hlyA*) benachbart sind, HlyB und HlyD. Für die Sekretion erforderlich ist außerdem das Membran-Protein TolC, welches außerhalb des *hlyCABD*-Clusters codiert wird [157,158].

### **Hly<sub>EHEC</sub> ist nur in geringer Konzentration in aktiver Form im Überstand vorhanden**

Bei den eigenen Untersuchungen erzielte die gemeinsame Inkubation mit Bakterien und Überständen des rekombinanten Stammes 413/89<sub>Hly+</sub>, der das Gen des EHEC-Hämolytins enthält, eine deutliche Inositolphosphat-vermittelte Signaltransduktion auf Faktor 2,8 des Leerwertes (s. 5.1), während die Inkubation mit dem zentrifugierten Überstand alleine eine deutlich geringere, nur im 2 h-Wert noch signifikante Wirkung erzielte (Faktor 1,5 des Leerwertes). Daraus ist zunächst zu folgern, dass der die Signaltransduktion auslösende Faktor, das Hämolytin, überwiegend kontaktabhängig sezerniert wird. Andererseits besteht jedoch zusätzlich auch eine geringe freie Sekretion.

Zur Einordnung dieser Ergebnisse muss zunächst auf die bekannten Sekretionsmechanismen von EPEC und EHEC eingegangen werden:

### **EPEC besitzen ein Typ III (kontaktabhängiges)-Sekretionssystem**

Kulturüberstände von EPEC-Stämmen enthalten verschiedene Proteine mit Größen 19 kDa bis 110 kDa [153]. Dennoch ist bei EPEC der direkte Kontakt des Bakteriums mit epithelialen Zellen erforderlich (kontaktabhängiges Typ III-Sekretions-System), um weitergehende Schritte in der Pathogenese zu bewirken: Die Inkubation mit den EPEC-Proteinen allein ist dafür nicht ausreichend [126], bakterienfreie EPEC-Überstände lösen z. B. keine Protein-Phosphorylierung aus [159].

Unter den sezernierten Proteinen sind insbesondere die Proteine EspA, EspB (früher eaeB-Protein) und EspD, die durch gleichlautende Gene codiert werden und zusammen mit dem *cfm*-Genprodukt für die Ausbildung der AE-Läsion erforderlich sind [160,161]. Die wesentlichen Gene für den Typ-III Sekretionsapparat selbst sind bei EPEC *sepA* bis *sepI* (*sep* für Sekretion von E. coli-Proteinen) und *esc* [160,162,163]: In Versuchen mit Mutanten wurde nachgewiesen, dass sie für die volle Ausbildung der AE-Läsion nötig sind [153].

### **EHEC besitzen verschiedene Sekretionssysteme gleichzeitig**

Für EHEC ist die Sekretion von extrazellulären Proteinen wie bei EPEC direkt nachgewiesen: Jarvis und Kaper untersuchten die Kultur-Überstände von EHEC-Stämmen und fanden bei fast allen untersuchten EHEC-Stämmen 100- bis 110 kDa-, 37 kDa (vermutlich EspB)- und 24 kDa (vermutlich EspA)-Polypeptide. Jarvis und Kaper

## Diskussion

vermuteten unter den sezernierten großen Proteinen auch das EHEC-Hämolysin [163], für das ein Molekulargewicht von 107 kDa anzunehmen ist. Die Frage, ob und auf welche Weise Hly<sub>EHEC</sub> sezerniert wird, ist jedoch vielschichtig zu beantworten:

Aufgrund des auch bei EHEC vorhandenen LEE-Locus lässt sich annehmen, dass auch EHEC ein Typ III-System besitzen. Im LEE-Locus von EHEC finden sich u. a. homologe Regionen zu den EPEC-sep-Genen [163], außerdem wurde ein weiteres Protein beschrieben (Pas), welches wahrscheinlich über eine Typ III-Sekretion abgegeben wird [164]. Die eigenen Versuche weisen zunächst auf eine kontaktabhängige Sekretion hin. Andererseits gibt es sowohl in den eigenen Versuchen als auch in einer anderen Arbeit Belege für eine (zusätzliche) freie Sekretion: Bei Untersuchungen mit dem EHEC-Wildstamm EDL 933 wurde eine signifikante Signaltransduktion alleine durch den Überstand ausgelöst [103].

Genetisch findet sich dafür folgende mögliche Erklärung:

Das große 90kb-Plasmid pO157, welches in den meisten EHEC O157:H7 Stämmen gefunden wird, beinhaltet eine weitere Gruppe von Genen, die der Typ II-Sekretion zugeordnet werden, *etpC-etpM*, *etpO* und *etpS*. [165,166]. Dieser *etp*-Gen-Cluster kommt in allen in einer Untersuchung getesteten Stämmen der Serogruppe O 157 vor und in 60 % der anderen Serogruppen, jedoch nicht bei EPEC, ETEC und EIEC [166,165].

Weitere Beobachtungen verschiedener Autoren sind hier zu berücksichtigen: Schmidt et al konnten beim EHEC-Wildtyp-Stamm EDL 933 keine hämolytische Aktivität im Überstand entdecken. EHEC-Wildtyp-Stämme wurden dann mit dem rekombinanten Plasmid pRSC6 transformiert, welches die *hlyB* und *hlyD*-Gene von dem E. coli  $\alpha$ -Hämolysin beinhaltet, die ein spezifisches Membran-Transport-System codieren. Diese transformierten Stämme zeigten auf Kulturplatten eine Hämolyse ähnlich dem  $\alpha$ -Hämolysin, außerdem konnte aktives EHEC-Hämolysin im Kultur-Überstand nachgewiesen werden. [93]. Welch und Bauer fanden dagegen ähnlich wie in den eigenen Versuchen eine geringe Sekretion des EHEC-Hämolysins bei einem apathogenen E. coli-Stamm (K12), dem ein pO157-ähnliches Plasmid hinzugefügt wurde, wobei die Sekretion durch Zugabe der *hlyBD* -Transportgene ebenfalls deutlich gesteigert werden konnte [86]. Bei der Untersuchung der porenbildenden Eigenschaften des EHEC-Hämolysins durch Schmidt et al. wurde festgestellt, dass die Kanalbildung

auch durch konzentrierte Überständen des Stamms EDL 933 bewirkt wurde, jedoch nicht durch nicht konzentrierte Überstände [78].

Diese Ergebnisse bestätigen trotz einzelner Widersprüche, dass Hly<sub>EHEC</sub> in geringem Umfang frei sezerniert wird. Zusammenfassend verwenden also EHEC offenbar neben dem (kontaktabhängigen) Typ III-System des chromosomalen LEE-Locus ein auf dem Plasmid pO157 codiertes Typ II-System für die freie Hämolyisin-Sekretion. Ob das Toxin wegen der strukturellen Ähnlichkeit zum  $\alpha$ -Hämolyisin auch noch eine Signalsequenz besitzt, die ein weiteres (Typ 1-) Sekretionssystem codieren würde, ist zurzeit reine Spekulation.

### **5.5 Sowohl Hly<sub>EHEC</sub> als auch $\alpha$ -Hämolyisin involvieren in der Signaltransduktion Tyrosinkinase; für das $\alpha$ -Hämolyisin deutet sich dabei eine wesentliche Bedeutung für die Invasivität von UPEC an**

Um den Mechanismus der beobachteten Signaltransduktion orientierend weiter einzugrenzen, wurde ein unspezifischer Hemmstoff von Tyrosinkinase, Genistein, in parallelen Versuchansätzen eingesetzt. Dabei lassen sich zwischen UPEC und 413/89<sub>Hly+</sub> deutliche Unterschiede erkennen, wie im folgenden erläutert wird:

#### **Der durch das EHEC-Hämolyisin bedingte Inositolphosphat-Anstieg bei HUVEC ist teilweise Tyrosinkinase-abhängig**

Die Bildung von Inositolphosphaten, induziert durch den das EHEC-Hämolyisin produzierenden Stamm 413/89<sub>Hly+</sub>, wurde in den eigenen Versuchen durch die Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein stark gehemmt: Die Werte betragen nur noch Faktor 1,3 des Kontroll-/Ausgangswertes, d. h. die Maximalwirkung wurde um 75 % reduziert. Es besteht also offenbar eine Teil-Abhängigkeit der durch Hly<sub>EHEC</sub> ausgelösten Signaltransduktion von einer Tyrosin-Phosphorylierung. Daraus ergibt sich die Frage nach der Funktion dieser Phosphorylierung. Der wesentliche bekannte Prozess, bei dem im Rahmen einer E. coli-Infektion eine Tyrosin-Phosphorylierung auftritt, ist für EPEC bekannt, nicht jedoch für EHEC. Wegen der Ähnlichkeit des lokalen Pathomechanismus von EHEC und EPEC soll daher die Bedeutung dieses Vorgangs wiederum zunächst am Beispiel von EPEC erläutert werden:

**Die Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors ist ein notwendiger Teil der AE-Läsionsbildung bei EPEC, nicht jedoch bei EHEC**

Die Voraussetzung für die Anheftung von Intimin an den Intimin-Rezeptor (Tir/Hp90) der Wirtszellmembran bei EPEC ist die Tyrosin-Phosphorylierung dieses Rezeptors. Die Phosphorylierung war z. B. in Versuchen von Rosenshine et al. mit HeLa-Zellen nach einer Stunde Inkubation mit Bakterien nachweisbar, ähnliches wurde für die Caco-2-Zelllinie und MDCK-Nierenzellen gezeigt [102,106].

Dieser Vorgang ist bei EPEC wesentlich für die Bildung des AE-Komplexes: Bei Hemmung der Tyrosin-Proteinkinase durch Genistein wird die Bindung des Intimins deutlich vermindert [Rosenshine et al., 126], andere Versuche mit EPEC-infizierten Zellen zeigten bei Vorinkubation mit Genistein eine fast vollständige Hemmung [106]. Essentiell für die Induktion dieser Tyrosin-Protein-Phosphorylierung von EPEC sind die im LEE-Locus codierten und sezernierten (s. o.) *espB(eaeB)*- und *cfm*-Genprodukte; dies wurde durch Versuche mit Mutanten nachgewiesen [104,106,112,36,37]. Die Bildung von Intimin ist jedoch davon unabhängig: Eine *espB*-Deletions-Mutante von EPEC kann dieses Protein noch produzieren [37].

In Studien von Ismaili et al. von 1995 [102] induzierten die VTEC(EHEC)-Stämme im Gegensatz zu EPEC-Stämmen keine mikroskopisch nachweisbare Tyrosin-Phosphorylierung von epithelialen Zellproteinen [102,167].

Dies ist erstaunlich, da auch EHEC die *espB(eaeB)*- und die *cfm*-Gene besitzen. Möglich wäre, dass bei posttranslationalen Modifikationen in EHEC das Produkt des *espB (eaeB)*- oder des *cfm*-Gens nicht in einer aktiven Form exprimiert wird. Außerdem wäre es denkbar, dass EHEC defizient in der Sekretion dieser Proteine ist, parallel zu der geringen Sekretion des Hämolytins.

Ob die *espB*- und *cfm*-Genprodukte auch bei EHEC für die Aufnahme in die Zelle eine Rolle spielen, ist nicht geklärt: Es ist bekannt, dass EHEC bei Infektion in vitro nicht in alle Zellreihen aufgenommen werden, also möglicherweise ein verminderte oder fehlende Aktivität dieser Proteine vorliegt [168, 169]. Andererseits gibt es jedoch Hinweise, dass die Funktion der *espB*- und *cfm*-Gene bei EHEC gar nicht benötigt wird:

**Die Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors (Tir) ist bei EPEC Voraussetzung für die Inositolphosphat-Signaltransduktion, bei EHEC wird diese durch andere Faktoren ersetzt; hierfür ist das EHEC-Hämolysin ein Kandidat**

EHEC benötigen nicht die Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors für die Ausbildung der AE-Läsion: Ismaili et al. wiesen in EHEC-infizierten HEp2-Zellen mit einer positiven Fluoreszenz-Aktin-Färbung (FAS) quasi die Endstrecke der AE-Läsionsbildung nach, jedoch ohne gleichzeitige Tyrosin-Phosphorylierung [102].

Bestätigt werden diese Beobachtungen durch eine kürzlich veröffentlichte Studie von Goosney et al. (2001), in der bemerkenswerte Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Struktur der AE-Läsion von EPEC und EHEC detailliert gezeigt wurden: Fast alle untersuchten Proteine kamen sowohl bei EPEC als auch bei EHEC vor. Während jedoch für etwa die Hälfte der Proteine bei EPEC eine Abhängigkeit von der Tyrosin-Phosphorylierung des Tir nachgewiesen wurde, war dies bei EHEC nicht der Fall [170]. Eine weitere bekannte Beobachtung ist, dass auch der Inositolphosphat-Anstieg bei EPEC von der Tyrosin-Phosphorylierung des Tir abhängig ist, nicht jedoch bei EHEC [101,102].

Auch hierbei sind die Ergebnisse von Goosney et al. richtungsweisend: Auffällig war dort, dass zwei Proteine innerhalb der AE-Läsion, Grb2 und CrkII, nur bei EPEC nachweisbar waren. Diese gehören zu den so genannten Adapterproteinen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und eine wichtige Rolle in der Vermittlung bzw. Verstärkung von Signaltransduktions-Mechanismen spielen, u. a. bei dem Inositolphosphatweg. Gleichzeitig wird auch die Wirkung von Tyrosinkinase vermittelt [171,172,173,174].

Damit verdichtet sich die Forderung, dass bei EHEC unabhängig ein oder mehrere Faktoren existieren müssen, die ohne die Hilfe dieser Adapterproteine und ohne Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors den beobachteten Inositolphosphat-Anstieg direkt auslösen.

Experimente zeigen, dass diese Signaltransduktion bei EHEC sogar ganz unabhängig von der Bildung der AE-Läsion ist, in deren Rahmen sie bei EPEC auftritt: Der EHEC-Stamm O113:H21 CL 15, der von einem Kind mit hämorrhagischer Kolitis isoliert wurde, bildet keine AE-Läsionen in infizierten Gewebekultur-Zellen [175], induziert jedoch einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg; auch für andere EHEC-Stämme wird die Induktion eines Calcium-Signals in infizierten Zellen ohne erkennbare Bildung von AE-



Läsionen berichtet [102]. Umgekehrt wurde schon in Abschnitt 5.1. ausgeführt, dass die AE-Läsion abhängig vom Inositolphosphat-Anstieg ist. Dieser steht also an erster Stelle in der EHEC-Pathogenese.

Da für das EHEC-Hämolyisin in den hier durchgeführten Versuchen eine solche unabhängige Signaltransduktion direkt nachgewiesen wurde, kommt es als wesentlicher verantwortlicher Faktor zwangsläufig in Betracht (siehe auch 5.1).

### **Die Funktion der Tyrosin-Phosphorylierung bei EHEC bleibt unbekannt**

Ungeklärt bleibt, warum dennoch der Inositol-Anstieg in den eigenen Versuchen durch Genistein reduziert wurde. Es ist daher eine Tyrosinkinase an anderer Lokalisation anzunehmen, die in den Untersuchungen von Ismaili et al. nicht erfasst wurde.

Eine Tyrosin-Phosphorylierung im Rahmen von Signaltransduktions-Mechanismen kann z. B. zeitlich begrenzt sein [174]. Außerdem sind im Rahmen der Phosphatidylinositol-Hydrolyse humaner Endothelzellen alternative, von einer Tyrosin-Phosphorylierung abhängige Mechanismen beschrieben worden, insbesondere die Tyrosin-Phosphorylierung der Phospholipase C $\gamma$ , die z. B. durch Thrombin vermittelt wird. Auch für MAP-Kinasen (p42 und p44) wurde eine Tyrosin-Phosphorylierung im Rahmen einer Stimulation von Endothelzellen durch Thrombin berichtet [176].

### **Der durch das $\alpha$ -Hämolyisin bedingte Inositolphosphat-Anstieg bei HUVEC ist ebenfalls teilweise Tyrosinkinase-abhängig**

Parallele Versuche wurden in der hier vorgelegten Arbeit mit dem uropathogenen Wildtyp-Stamm, welcher das  $\alpha$ -Hämolyisin produziert, durchgeführt. Auch hier wurde einem Teil der Versuchsansätze der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein hinzugefügt. In diesen Proben wurde der durch den UPEC-Stamm bewirkte Anstieg des Inositolphosphat-Spiegels um durchschnittlich 46 % (verglichen mit dem Maximalwert) gehemmt, indem er nur noch Faktor 4,9 des Kontroll-/Ausgangswertes erreichte. Dies entspricht einer etwas schwächeren Hemmwirkung von Genistein verglichen mit dem Stamm 413/89<sub>Hly+</sub> (s. o.).

Damit scheint auch bei dem  $\alpha$ -Hämolyisin ein Teil der bei Endothelzellen hervorgerufenen Signaltransduktion über eine Tyrosin-Phosphorylierung abzulaufen. In der Literatur finden sich diesbezüglich fast keine Angaben außer einer kürzlich erschienenen Arbeit von Martinez et al., bei der die Tyrosinkinase im Zusammenhang

## Diskussion

mit der Adhäsion eine Rolle spielt [177]: Für UPEC ist inzwischen eine Reihe von Adhäsinen bekannt. Die wichtigste Gruppe sind die so genannten P pili, die an spezifische Rezeptoren des Urothels binden (siehe Einleitung). Beispiele für weitere Adhäsine sind die afimbriale Adhäsine (AFAI, AFAIII), das Dr-Adhäsin und Typ 1-Pili. In der Studie von Martinez nun wurde gezeigt, dass Typ 1-Pili ähnlich wie Intimin wirken, indem sie neben der Adhärenz auch mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts die Invasion der Bakterien in die Harnblasen-Urothelzellen vermitteln. Erforderlich dafür ist die Aktivierung des Phosphoinositol-Signaltransduktionsweges sowie die Tyrosin-Phosphorylierung eines Wirtsproteins: Die bakterielle Invasion wurde durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein gehemmt. Diese Ergebnisse sind in mehrfacher Hinsicht von großem Interesse: Martinez et al zeigten, dass das Typ 1-Pilus-Adhäsin FimH direkt die Signalkaskade triggern kann, vermuteten in diesem Vorgang jedoch auch mögliche andere Faktoren. Dafür könnte sehr gut das  $\alpha$ -Hämolysin in Frage kommen, da deren Wirkung ein ähnliches Profil zeigt: Es bewirkt eine sehr ausgeprägte Signaltransduktion, die durch die Tyrosinkinase teilweise gehemmt werden kann. Das Hämolysin wäre damit auch direkt verantwortlich für die Invasion der Bakterien, womit eine weitere Funktion in seinem Wirkungsspektrum hinzukäme. Wenn dies alles zutrifft, bestünden schließlich überraschend neue Parallelen in der Wirkungsweise von UPEC, EPEC und EHEC.

## **5.6 Übersicht: Die Relevanz des EHEC-Hämolytins für die Pathogenese des EHEC-Krankheitsbildes besteht in Synergismus mit dem Shiga-like-Toxin und bisher unbekanntem Steuerungsfunktionen, die über die lokale Wirkung hinausgehen**

Bevor auf die komplexe Pathogenese der durch EHEC verursachten Krankheit und insbesondere die Rolle des Hämolytins eingegangen wird, sollen zunächst noch einmal die Pathomechanismen von EPEC und UPEC zusammengefasst werden:

### **Bei der Pathogenität von uropathogenen E. coli (UPEC) ist neben Adhäsinen die lokale und systemische Wirkung des $\alpha$ -Hämolytins ein wesentlicher Faktor**

Verschiedene Pathogenitätsfaktoren sind bei uropathogenen E. coli (UPEC) bekannt. Dazu gehören zunächst die bereits erwähnten Adhäsine, insbesondere die P-Pili. Für Typ 1-Pili von UPEC wurde gezeigt, dass sie ähnlich wie Intimin wirken mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und dass deren Wirkung ähnlich wie bei EHEC und EPEC von der Signaltransduktion abhängig ist; darüber hinaus ist bekannt, dass die Invasion bei UPEC Tyrosinkinase- und Phosphoinositol-Kinase-abhängig ist. Die Entzündungsreaktion wird möglicherweise durch die in der Bakterienwand gebundenen Lipopolysaccharide ausgelöst, zusammen mit den P-Pili. Bei allen Aspekten der Wirkung stellt sich auch die Frage nach der jeweiligen Bedeutung des von UPEC produzierten  $\alpha$ -Hämolytins.

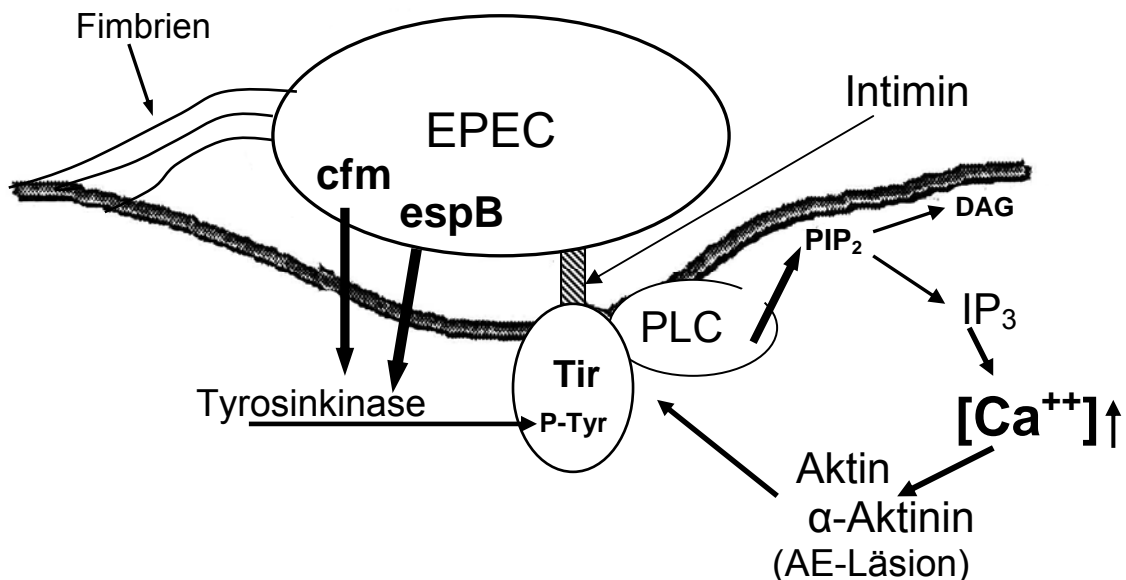
Für das  $\alpha$ -Hämolytin wurden zahlreiche Wirkungen nachgewiesen, die einerseits auf einen Zellschaden durch Porenbildung, andererseits auf rezeptorvermittelte Wirkungen bei niedriger Dosis hinweisen, die beide zusammen die volle Entzündungsreaktion auslösen. Dabei kommt es zu einer hochgradigen Aktivierung der Endothelzellen über die Inositolphosphat-vermittelte Signaltransduktion sowie eine ausgedehnte Produktion von Entzündungsmediatoren, neben Prostazyklin auch von PAF. Dabei existieren offenbar verschiedene Signaltransduktionswege, von denen einer Tyrosinkinase-abhängig ist.

Das  $\alpha$ -Hämolytin ist damit ein hochwirksames Toxin. Für die lokale Entzündung fördert es mit der Signaltransduktion die Invasion durch Typ 1-Pili, die wiederum die Signaltransduktion verstärken. Darüber hinaus übt das  $\alpha$ -Hämolytin nach Zerstörung der Gefäßschranke durch die lokale Entzündung systemische Wirkungen aus.

**Der wesentliche Aspekt der -lokal begrenzten- Pathogenität von EPEC ist die Ausbildung der „attaching and effacing“ (AE)-Läsion**

Die Störung der Darmfunktion mit Auftreten von Durchfall wird bei EPEC durch die Veränderungen der Ultrastruktur (AE-Läsionen) verursacht, wofür eine Zellassoziation erforderlich ist. Wesentliche Pathogenitätsfaktoren sind dabei neben Fimbrien (BFP) das äußere Membranprotein Intimin, codiert vom *eae(A)*-Gen und der entsprechende, vom Bakterium in die Wirtszelle integrierte Rezeptor (Tir), außerdem die vom *espB*- und vom *cfm*-Gen codierten Proteine.

Die Pathogenese der EPEC-Infektion ist in folgender Grafik zusammengefasst (Abb.19):



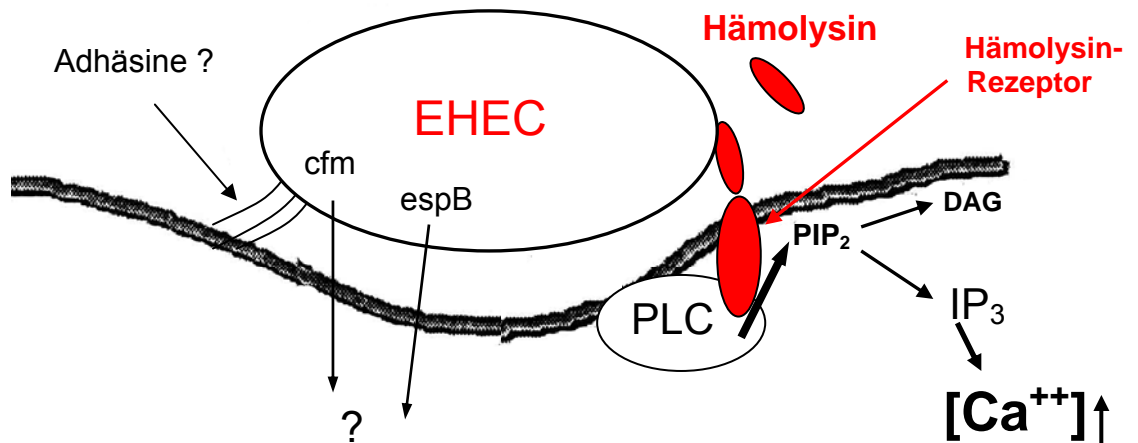
**Abb. 19:** Übersicht des (lokalen) Pathomechanismus von EPEC, modifiziert und ergänzt nach Foubister et al. 1994 [101]

Nach der initialen Anheftung durch die Fimbrien erfolgt durch Sekretion der *cfm*- und *espB*-Genprodukte die Induktion der Tyrosinkinase, die den Intimin-Rezeptor (Tir) phosphoryliert (P-Tyr). Diese Phosphorylierung ist eine Voraussetzung für die enge Anheftung des Bakteriums mit seinem Protein Intimin, außerdem bewirkt sie die Induktion der Signaltransduktion über die Phospholipase C (PLC). Die Signaltransduktion mit resultierenden Ca<sup>++</sup>-Anstieg wiederum führt zur Ausbildung der AE-Läsion durch eine Umstrukturierung von Aktin.

**EHEC zeigen einen EPEC ähnlichen lokalen Pathomechanismus, wobei das Hämolyysin einen Teil der Faktoren in seiner Wirkung ersetzt**

Die Infektion mit EHEC bewirkt zunächst ein Krankheitsbild mit schweren blutigen Durchfällen. Wie bei EPEC kommt es zur Anheftung an die Wirts-Zellmembran mit Bildung der AE-Läsionen (mit Verlust bzw. Elongation der Mikrovilli).

Die **Abbildungen 20 a) und b)** demonstrieren diese Vorgänge im Vergleich zu EPEC, wie im Folgenden erläutert:



**Abb. 20 a)**

Das Hämolyysin aktiviert zunächst unabhängig von anderen Faktoren den Hämolyysin-Rezeptor (Abb. 20 a) und löst damit eine Signaltransduktion über Inositolphosphate aus. Ob eine initiale Adhäsion wie bei EPEC eine wesentliche Rolle spielt, ist nicht klar, ebenso die Bedeutung der auch bei EHEC nachweisbaren *cfm*- und *espB*-Gene. Auf jeden Fall übernimmt jedoch das Hämolyysin einen Teil der Aufgaben im Pathomechanismus: Die Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors findet bei EHEC nicht statt und wird durch die direkte Aktivierung des Inositolphosphat-Signalwegs umgangen.

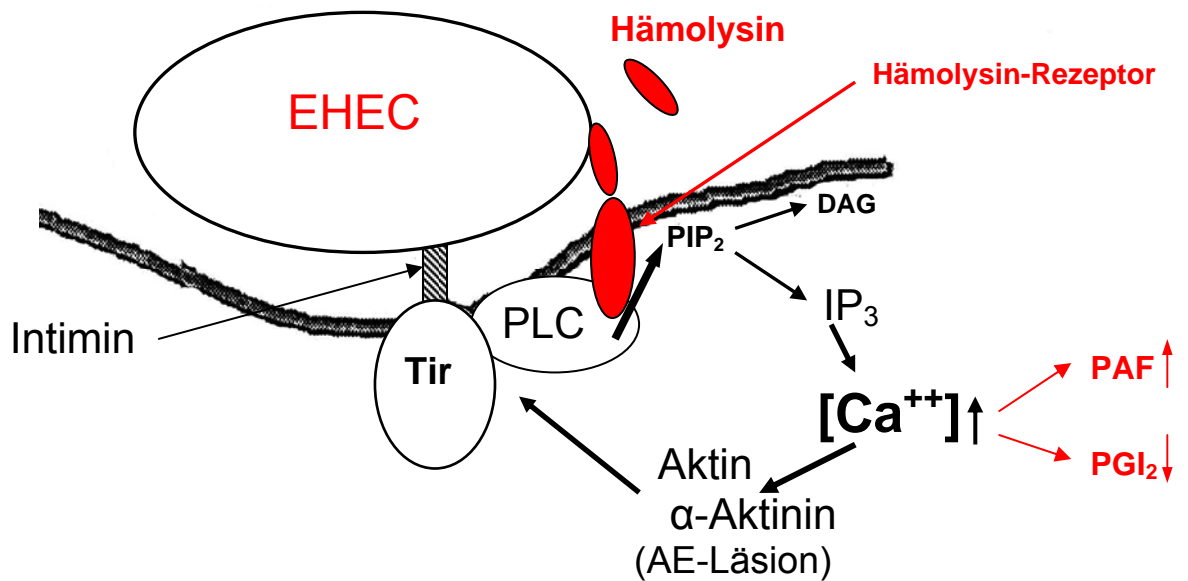


Abb. 20 b)

Der durch den Inositolphosphat-Anstieg bedingte Ca<sup>++</sup>-Anstieg wiederum induziert (Abb. 20 b) die Ausbildung der AE-Läsion einschließlich Aktin-Umstrukturierung und Intimin/Intimin-Rezeptor(Tir)-Bindung, entsprechend wie bei EPEC.

Darüber hinaus beeinflussen EHEC über den Ca<sup>++</sup>-Anstieg die PAF- und Prostacyclin-Synthese. Diese über die Wirkung von EPEC hinausgehenden, für EHEC spezifischen Effekte sind im Folgenden in das gesamte EHEC-Krankheitsbild einzuordnen:

**Wesentlich für die Ausbildung der hämorrhagischen Kolitis und des hämolytisch-urämischen Syndroms sind bei EHEC weitere, unabhängige und systemisch wirkende Faktoren, von denen das bekannteste das Shiga-like-Toxin (Verotoxin) ist**

Die Ausbildung der AE-Läsion führt klinisch wie bei EPEC zu Diarrhöe, Shiga-like Toxine sind dafür nicht erforderlich. Die Besonderheit der EHEC-Erkrankung ist jedoch durch weitere Pathogenitätsfaktoren zu erklären, von denen bisher das Shiga-like-Toxin als Hauptfaktor etabliert ist: Im Wesentlichen nur Stämme, die Shiga-like-Toxine (Verotoxine) produzieren, verursachen eine hämorrhagische und ulzerierende Kolitis sowie das hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) [48,178].

Die Zielstruktur des Shiga-like-Toxins ist einerseits die Mucosazelle des Darms, andererseits die Endothelzellen, wobei beim HUS insbesondere die Nierengefäße von

## Diskussion

Bedeutung sind. Das Ausmaß der Schädigung bewegt sich zwischen verschiedenen Formen endothelialer Dysfunktion bis hin zum Zelltod.

Der Name „Shiga-like-Toxin“ wird wegen der engen Homologie mit dem von *Shigella dysenteriae* Typ 1 produzierten Toxin verwendet [122]. Die synonyme Bezeichnung „Verotoxin“ leitet sich ab aus der Zytotoxizität gegenüber kultivierten Vero-Zellen, d. h. Nierenzellen von afrikanischen Grünaffen. Zwei verschiedene Shiga-like-Toxine/Verotoxine sind bekannt, Shiga-like-Toxin –1 und –2. Es sind eng verwandte Toxine, die in der DNA von Bakteriophagen im *stx*-Gen codiert und in das Chromosom einer begrenzten Anzahl von O:H-Serotypen inkorporiert werden. Mit dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) assoziierte Stämme können SL-Toxin-1 oder SL-Toxin-2 alleine oder beide produzieren. Das SL-Toxin wird gebildet aus einer biologisch aktiven Untereinheit A und einer Anzahl von B-Untereinheiten [179].

Im Tierversuch mit Affen wurde beim Wildtyp von *S. dysenteriae* das Shiga-Toxin genetisch inaktiviert. Diese Stämme verursachten ähnliche gastrointestinale Störungen, jedoch nur der unveränderte Wildtyp bewirkte einen gastrointestinalen Gefäßschaden [180]. Beim Menschen verursachen Shiga-like-Toxin-produzierende Stämme von *E. coli* (EHEC) die hämorrhagische Kolitis durch einen direkten Effekt des Toxins auf die Gefäße der Kolon-Schleimhaut [181,182,183]. Dieser Effekt kann durch Antikörper gegen Untereinheiten des Toxins gehemmt werden [184]. Eine synergistische Wirkung mit anderen Faktoren z. B. PAF und dem Hämolysin ist hier anzunehmen.

In den systemischen Zielorganen, insbesondere der Niere, entsteht der mikrovaskuläre Schaden, nachdem die Toxine Zugang zur Blutzirkulation erlangt haben. Das Shiga-like-Toxin bindet stabil und wird innerhalb von zwei Stunden Endocytose in das Cytosol internalisiert [185]; die Proteinsynthese wird dann innerhalb von 30 Minuten inhibiert.

Während der Internalisierung dissoziiert die A-Untereinheit von den B-Untereinheiten, wobei von der A-Untereinheit nach einem proteolytischen Prozess eine maximal aktive 27 kDa-Enzymuntereinheit übrig bleibt. Dieses Fragment ist ein direkter Inhibitor der Proteinsynthese und verantwortlich für die zytotoxische Wirkung des Toxins.

### **Die Wirkung der Shiga-like-Toxine ist rezeptorabhängig und erklärt die Verteilung der Organschäden bei der EHEC-Erkrankung**

In Untersuchungen von Zoja und Richardson mit Kaninchen induzierte Verotoxin (Shiga-like-Toxin)-1 eine reproduzierbare Erkrankung mit neurologischen und intestinalen Symptomen sowie Endothelschwellung und Gefäßverschlüssen von kleinen Arterien und Arteriolen, jedoch keine renale Dysfunktion. Mikrovaskuläre Schäden bei diesen Tieren waren beschränkt auf das zentrale Nervensystem, Kolon und Lunge [186,187]. Für die organspezifische Verteilung der Schäden wurden Verotoxin-Rezeptoren verantwortlich gemacht, und zwar spezifische Glykolipid-Rezeptoren, an die das Toxin über verschiedene B-Untereinheiten bindet [184].

Zwei verschiedene Rezeptortypen, Galabiosyl-Ceramid und Globotriosyl-Ceramid (Gb3) werden inzwischen unterschieden, die ein gemeinsames terminales Disaccharid, Gal  $\alpha$  1-4 Gal besitzen [188,189,190,191]. Gb3-Rezeptoren werden beim Menschen in der Nierenrinde und -mark und in renalen Tubulusepithelzellen exprimiert [192]. Im Tierexperiment fand sich beim Kaninchen eine Verteilung der Gb3-Rezeptoren, die exakt der organspezifischen Verteilung der Wirkung des SL-Toxins entsprach.

Zu beachten ist auch die Beobachtung in einer Untersuchung von Mahan et al 1994, in der die Lebensfähigkeit und die Proteinsynthese von Endothelzellen der Niere nach Inkubation mit Shiga-like-Toxin um 50 % reduziert wurde, während Endothelzellen der Nabelvene bei wesentlich höherer Dosierung noch lebensfähig waren. Die Basalspiegel von Gb3 (-Rezeptoren) waren dabei annähernd 50fach höher in renalen Endothelzellen als in umbilicalen Endothelzellen [193].

### **Die endotheliale Dysfunktion ist der wesentliche primäre Effekt in der Pathogenese des hämolytisch-urämischen-Syndroms**

Neben der letalen Schädigung ergeben sich eine Anzahl Hinweise für eine subletale Funktionsstörung der Endothelzelle beim HUS. Diese werden ausgelöst durch das SL-Toxin und offenbar auch das Hämolysin. Dabei spielen zunächst verschiedene Entzündungsmediatoren eine wesentliche Rolle. Das Verhalten der zwei wichtigsten von Endothelzellen gebildeten Mediatoren im Rahmen des HUS, **PAF** und **Prostazyklin**, wurde bereits ausführlich diskutiert (s. o.) und erklärt zusammen mit dem SL-Toxin pathogenetisch weite Teile der beim HUS beobachteten Effekte. Während die unphysiologische Steigerung der PAF-Synthese u. a. eine Thrombozyten-Aggregation auslöst und damit wesentlich die Bildung von schwerwiegenden



Mikrozirkulationsstörungen durch Gefäßthrombosen fördert, verstärkt das Fehlen oder die Hemmung des Gegenspielers Prostazyklin, mit dessen vasodilatatorischen und Thrombozytenaggregations-hemmenden Eigenschaften diese Effekte noch. Damit wird offenbar eine adäquate „physiologische“ Entzündungsreaktion beim HUS verhindert.

Ein weiteres Zeichen der endothelialen Dysfunktion ist, dass Plasma von Patienten mit HUS oft ungewöhnlich große von Willebrandt-Faktor-(vWF)-Multimere enthalten. Diese sind normalerweise in den Endothelzellen gespeichert, ihre Präsenz im peripheren Blut zeigt einen Endothelzellschaden an.

Neben SL-Toxin und dem Hämolysin scheint auch der flüssigkeitsbedingte **Scher-Stress** ein weiterer wichtiger Faktor bei der endothelialen Dysfunktion zu sein: Diese vermehrte Kraft auf die Endothelzelloberfläche entsteht beim HUS durch Störung der Mikrozirkulation, insbesondere im Rahmen von Thrombenbildung. Bei experimentellen Untersuchungen ergaben sich Hinweise für eine abnormale vWF-Fragmentation bei erhöhten Scherkräften [194]. Des Weiteren wird auch die endotheliale Stickoxid (**NO**)-**Synthese** gefördert. NO ist einer der Hauptprodukte, die von Endothelzellen gebildet werden und ein multifunktionseller Faktor mit vasodilatatorischen und zytotoxischen Eigenschaften [195,196]. NO ist auch selbst ein potenter Mediator von Gefäßschäden [197] und Scher-Stress vermittelte Überproduktion von NO könnte als ein wesentlicher toxischer Faktor wirken. Da NO selbst außerdem einen Anstieg von TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 bei inflammatorischen Zellen bewirkt und die Leukozyten-Aktivierung fördert, verstärkt dies weiter den durch die Entzündung bewirkten Schaden [198]. Auch hier ist wiederum eine verstärkende Funktion des EHEC-Hämolysins anzunehmen; für das  $\alpha$ -Hämolysin wurde jedenfalls eine direkte ausgeprägte Stimulation der NO-Synthese bei Endothelzellen nachgewiesen [100]. Im Urin allerdings zeigen andere Untersuchungen eine Abnahme des zyklischen Guanosin-Monophosphats (GMP) als Marker der NO-Aktivität, eine Erklärung dafür existiert bisher nicht [199].

Des Weiteren findet sich beim HUS eine Erhöhung von **Endothelin**, welches den renalen Gefäßwiderstand deutlich ansteigen lässt und die glomeruläre Filtrationsrate reduziert [200]; auch dies könnte zum akuten Nierenversagen beitragen.

**Weitere Phänomene unterstützen die Wirkung des Shiga-like Toxins oder sind dessen Folge**

Die aus der Bakterienwand gramnegativer Bakterien wie *E. coli* freigesetzten **Lipopolysaccharide** (Endotoxine), die beim HUS häufig im Blut nachweisbar sind [201], können unabhängig vom Shiga-like-Toxin Endothelzellen schädigen [202] und die Thrombose fördern durch eine ansteigende Gewebsfaktor-Expression, eine Hochregulation des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors und eine Herunterregulierung der Thrombomodulin-Expression [203]. Lipopolysaccharide können außerdem die Zytotoxizität der Shiga-like-Toxine gegenüber Endothelzellen verstärken [64].

Ein ähnlicher Synergismus ist gezeigt worden zwischen Shiga-like Toxin und **TNF- $\alpha$**  (**Tumornekrosefaktor**), dessen Bildung wiederum durch Endotoxine gefördert wird [204]. TNF hat mehrere Eigenschaften, die wichtig sind in der Pathogenese des HUS, u. a. die ausgeprägte Induzierung der GB<sub>3</sub>-Rezeptor-Expression von humanen Endothelzellen mit einer 10- bis 100fach höheren Zahl von spezifischen Bindungsstellen für Verotoxin [205,206]. Siegler et al. fanden erhöhte Spiegel von TNF- $\alpha$  im Urin von Kindern mit HUS [207]. Außerdem sind Mäuse, die kein TNF produzieren, weniger empfindlich gegenüber den letalen Effekten von Verotoxin [208]. Weitere in vitro-Versuche zeigten dass das renale Endothel nach Präinkubation mit Endotoxin und Endotoxin-abgeleitetem TNF- $\alpha$  und **IL-1 $\beta$**  weit mehr empfindlich ist gegenüber dem Verotoxin-Schaden [205], so dass eine hohe lokale Konzentration von inflammatorischen Zytokinen insgesamt eine pathogenetische Rolle beim HUS haben könnte. Interessant im Zusammenhang mit der Rezeptorverteilung ist auch die Beobachtung, dass Shiga-like-Toxin die TNF- $\alpha$ -Biosynthese in der Niere induziert, nicht jedoch in anderen Organen oder Geweben [209].

Ein weiterer verstärkender Effekt ist die Förderung der **Adhäsion von neutrophilen Granulozyten** zu endothelialen Zellen durch Shiga-like-Toxin [210, 211]. Dieser Effekt konnte auch für das  $\alpha$ -Hämolysin gezeigt werden, für eine analoge Wirkung des EHEC-Hämolysins gibt es noch keinen Nachweis [146].

Die **Hämolyse** beim HUS resultiert neben der Wirkung des Hämolysins wahrscheinlich aus der mechanischen Fragmentation der Erythrozyten beim Durchtritt durch die kleinen Gefäße, die partiell durch Plättchen und Fibrin verschlossen sind. Eine erhöhte Lipid-Peroxidation und verminderte antioxidierende Aktivität lassen eine verstärkte Empfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber der (oxidativen) Hämolyse erkennen [212].

Die **Thrombozytopenie** zeigt eine intravaskuläre Plättchen-Aggregation (Verbrauch) an, die wahrscheinlich in erster Linie eine Konsequenz des Endothelschadens ist und durch die Wirkung des PAF verstärkt wird (s. o.).

Die **gastrointestinalen Flüssigkeitsverluste** können eine Hypovolämie verursachen und in Kombination mit der Hämoglobinämie, der Hyperbilirubinämie und Hyperurikämie das akute Nierenversagen begünstigen.

Verschiedene **Antikörper** gegen Endothelzellen und Immunkomplexe werden außerdem in der akuten Phase des HUS gefunden [213,214]. Ob diese Beobachtungen als Konsequenz des Epithelzellschadens lediglich ein Epiphänomen sind oder eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Krankheit spielen, ist nicht klar.

**Auch das EHEC-Hämolysin ist klinisch relevant und möglicherweise ein zentraler Schaltebel für die Ausbildung des hämolytisch-urämischen Syndroms**

In diese Vielzahl von Effekten ist nun das Hämolysin einzuordnen. Die schwierige Frage seiner spezifischen Rolle in der Pathogenese der EHEC-Erkrankung wurde bisher kaum diskutiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie Einzelfakten aus der Literatur geben hierzu jedoch durchaus relevante Hinweise. Diese wurden in den vorigen Abschnitten dieser Arbeit in Einzelteilen bereits besprochen, müssen jedoch in ihrer klinischen Bedeutung und im Gesamtzusammenhang eingeordnet werden.

Zunächst ist festzustellen, dass inzwischen neben wenigen experimentellen bereits zahlreiche klinische Arbeiten die Bedeutung des Hämolysins im konkreten Erkrankungsfall belegen: Eine durchgemachte EHEC-Infektion mit HUS hinterlässt als Zeichen einer spezifischen Immunantwort **Antikörper**. Bei Tests mit den Seren von rekonvaleszenten Patienten mit durchgemachtem hämolytisch-urämischen Syndrom reagierten z. B. in einer Untersuchung von Schmidt et al. 19 von 20 Patienten spezifisch mit dem Hly<sub>EHEC</sub>, im Gegensatz dazu zeigte nur eine der 20 Kontrollen eine Reaktion [93]. Ein anderes Beispiel ist eine chinesische Arbeit mit 42 Patienten mit Durchfall, gefolgt von akutem Nierenversagen, von denen 34 Antikörper entweder gegen das EHEC-Hämolysin oder den E. coli-Stamm O157 zeigten [215].

Eine weitere Beobachtung bei EHEC ist das meist **gemeinsame Auftreten von Hämolysin und Shiga-like-Toxin** (Assoziation). Der hämolytische Effekt von Shiga-like-Toxin produzierenden E. coli ist bereits länger bekannt, weswegen die Existenz so genannter „Enterohämolsine“ – im Analogie zu denen von uropathogenen Stämmen - angenommen wurde; diese entsprechen nach heutigem Wissen dem EHEC-Hämolysin [94]. Beutin et al. untersuchten 64 Verotoxin-produzierende E. coli-Stämme, von denen

## Diskussion

60 positiv für die Produktion eines Hämolysins waren [84]. Dass diese Assoziation zwischen Hly<sub>EHEC</sub> und Shiga-like-Toxin kein Zufall ist, zeigen z. B. Beutins Untersuchungen von 1994, in denen verschiedene E. coli-Stämme entweder  $\alpha$ -Hämolysin oder SL-Toxin produzierten, jedoch in keinem Fall beide Toxine zusammen [216]. Bettelheim folgerte 1995 aus ähnlichen Fakten, dass schon die auf Kulturplatten erkennbare Hämolyse in der Praxis zur Identifizierung von EHEC-Stämmen herangezogen werden kann [217].

Nach der Entdeckung des spezifischen EHEC-Hämolysins und der Aufklärung seiner **genetischen Struktur** (1995) konnte die Assoziation der Toxine molekularbiologisch bestätigt werden: In 53 von Schmidt et al. untersuchten Patienten-Isolaten verschiedener E. coli-Serotypen zeigten alle O 157:H7 (EHEC)-Stämme die Gene für das Shiga-like-Toxin (*stx*) und das EHEC-*hlyA*-Gen, während alle *stx*-negativen Stämme auch *hlyA*-negativ waren [93]. Meng et al. erfassten 1998 umfangreich die Ausstattung mit Virulenzgenen in 178 Isolaten von pathogenen E. coli von Menschen, Tieren und Nahrungsmitteln. Dabei enthielten alle EHEC-Isolate ein oder beide *stx*-gene und alle EHEC-Stämme bis auf einen non-O157:H7-Stamm auch das EHEC-*hlyA*-Gen. Ähnliche Ergebnisse fanden z. B. Eklund et al. in Finnland oder Sandhu et al in Ontario [218,117]. In statistischen Untersuchungen verschiedener Virulenzfaktoren von EHEC war das EHEC-Hämolysin-Gen signifikant assoziiert mit Isolaten bei schweren Krankheitsverläufen in der univariaten Analyse, jedoch nicht in multivariaten Regressionsmodellen. Dies ist jedoch möglicherweise mit der strengen Assoziation zwischen dem Intimin- und Hämolysin-Gen zu erklären [219].

In jedem Fall scheint jedoch sowohl der Zusammenhang zwischen Shiga-like-Toxin und EHEC-Hämolysin untereinander hinreichend bestätigt als auch die Verbindung der Bildung dieser Faktoren mit dem Auftreten des HUS. Damit kann das EHEC-*hlyA*-Gen in die Reihe der etablierten diagnostischen Marker der EHEC-Infektion eingefügt werden.

In der Zukunft wird zu diskutieren sein, welche funktionellen Zusammenhänge zwischen den Toxinen bestehen. Dass das Hämolysin tatsächlich eine eigenständige Rolle in der Entwicklung des HUS spielt, zeigen die hierfür sehr wichtigen Untersuchungen von Schmidt et al 1996 an SL-Toxin produzierenden E. coli Stämmen: 88% dieser Stämme von Patienten mit HUS waren Hämolysin-positiv, jedoch nur 22% der Patienten, die (nur) Durchfall zeigten [220]. Dies bedeutet umgekehrt, dass das SL-

Toxin nur in 12 % alleine (ohne Hämolyisin) gegenüber 88 % mit Hämolyisin ein HUS auslöste; außerdem lag bei den „Versagern“ (nur Durchfall trotz Toxin) unter den Bakterienstämmen das SL-Toxin in 78 % alleine vor, nur in 22 % der „Versager“ schafften es beide Toxine zusammen nicht, das hämolytisch-urämische Syndrom auszulösen. Natürlich ist diese Betrachtung noch vereinfacht, dennoch erscheint die Bedeutung des EHEC-Hämolyisins als zentraler Schalthebel für das hämolytisch-urämische Syndrom möglich.

**Zusammenfassung: Die Einordnung der Toxinwirkungen in die Pathogenese der Krankheitsbilder: Im Vergleich verwenden EHEC-Hämolyisin und  $\alpha$ -Hämolyisin in ihrem Wirkungsspektrum Variationen desselben Grundmusters**

Für das  $\alpha$ -Hämolyisin gibt es inzwischen zahlreiche Untersuchungen zu seiner Bedeutung in der Pathogenese allgemein und im konkreten Wirkmechanismus, die von der Zellkultur bis zum Tierexperiment reichen. Mit EHEC-Stämmen wurden dagegen bisher nur einzelne Studien durchgeführt, mit isoliertem Toxin bisher überhaupt nicht gearbeitet. Hier setzen die eigenen Versuche an, bei denen erstmals beide Toxine in einem funktionellen Ansatz verglichen wurden. Wegen der hohen strukturellen Ähnlichkeiten der Hämolyisine ist es zulässig, die bisherigen Kenntnisse über  $\alpha$ -Hämolyisin zu verwenden, um analoge Hypothesen über die Wirkung des EHEC-Hämolyisins abzuleiten. Die einzelnen Aspekte der Wirkung der beiden Hämolyisine sollen im Folgenden noch einmal unmittelbar gegenübergestellt werden:

**Signaltransduktion:** Beide Toxine sind wirkungsvolle Induktoren der Inositolphosphat-Signaltransduktion. Im Vergleich läuft diese bei dem rekombinanten EHEC-Stamm mit dem „isolierten“ Hämolyisin gegenüber dem uropathogenen Wildtyp jedoch schwächer und langsamer ab. Verschiedene Erklärungen sind dafür möglich:

- a) Die bei EHEC *geringe freie Sekretion* ist als Ursache denkbar, kann jedoch durch den bakteriellen Kontakt evtl. ausgeglichen werden.
- b) Auch eine *Zielzellspezifität* (s. u.) könnte dafür verantwortlich sein; tatsächlich wurde ein unterschiedliches Ansprechen auf verschiedene Zelllinien nachgewiesen [86,193]. Sowohl für das  $\alpha$ -Hämolyisin als auch für Hly<sub>EHEC</sub> sind spezifische Rezeptoren zu vermuten, wobei für  $\alpha$ -Hämolyisin die Bindungsstelle des Rezeptors bereits bekannt ist. Als Bereich innerhalb der beiden Hämolyisine, der für die Zielzellspezifität verantwortlich ist, wurde das amino-terminale Ende vorgeschlagen, da dort in den ersten 50 Aminosäuren eine niedrige Homologie von etwa 40 % besteht [221].

c) Nach Bauer et al. [86] bestehen deutliche Unterschiede in der *Potenz* der beiden Hämolsine, gemessen an der Ausprägung der zytotoxischen Aktivität.

d) *Zusammenwirkung mit anderen Faktoren*: Bereits bei Welch et al. (1981) zeigten UPEC-Wildstämme am Tiermodell eine stärkere Wirkung als rekombinante  $\alpha$ -Hämolysin produzierende Stämme, ähnliches wird von weiteren Untersuchern berichtet [71]. Dies unterstreicht, dass das Zusammenspiel mehrerer Pathogenitätsfaktoren für die Ausbildung des Krankheitsbildes erforderlich ist.

### **Wirkung des Hämolsins als Mediator**

Shiga-like-Toxin und EHEC-Hämolysin ergänzen sich in ihrem Wirkungsspektrum: Ersteres verursacht eine Apoptose-Induktion [222]. Das Hämolysin dagegen kann als Porenbildner einerseits über eine unspezifische Zellyse den Zelltod verursachen, andererseits – was offenbar seiner Hauptfunktion entspricht - Steuerungs- und Mediatorfunktionen ausüben. Dies geschieht über den Weg der Signaltransduktion:

Bekannt war bisher schon, dass der Inositolphosphat-Anstieg erforderlich ist für die **Ausbildung der AE-Läsion** bei EPEC- und EHEC-Infektionen. Bei EHEC kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit das Hämolysin als wesentlicher Stimulus dafür angesehen werden. Welchen Beitrag weitere Faktoren zur Signaltransduktion leisten, ist zur Zeit noch unklar. In einer einzigen Arbeit wurde auch über einen Inositolphosphat-Anstieg durch isoliertes Shigellen-Toxin berichtet, allerdings bei Enterozyten (im Gegensatz zu den hier eingesetzten Endothelzellen), ob dies auf das Shiga-like-Toxin von EHEC übertragbar ist, ist zu diskutieren [183]. Möglich wäre auch eine „Aufgabenteilung“ von Hämolysin und SL-Toxin durch eine unterschiedliche Zielzellspezifität. Mindestens ein weiterer löslicher Faktor scheint außerdem eine Bedeutung zu haben, der bisher nur in Umrissen bekannt ist [103].

Die Stimulation der **Produktion von Prostazyklin** durch das  $\alpha$ -Hämolysin, die aus Untersuchungen mit isoliertem Toxin bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem UPEC-Wildtyp bestätigt.

Der rekombinante EHEC-Stamm zeigte dagegen einen fehlenden Anstieg der Prostazyklin-Synthese. Eine Hemmung der physiologischen Synthese bzw. ein Verhindern einer adäquaten Reaktion der Endothelzelle wurde hier nicht bewiesen, würde jedoch gut zum Pathomechanismus des hämolytisch-urämischen Syndroms passen: Prostazyklin bewirkt eine Vasodilatation und Hemmung der

Plättchenaggregation, was der Mikrothrombosierung beim HUS entgegensteht. Für das Shiga-like-Toxin ist ein solcher Effekt bereits bekannt.

Bezüglich der **Stimulation der PAF-Synthese** konnten ebenfalls neue Beobachtungen gemacht werden: Die Akkumulation von PAF durch  $\alpha$ -Hämolyisin, die bereits aus früheren Arbeiten bekannt ist, konnte bestätigt werden. Ein überraschender Befund ist dabei, dass die PAF-Werte im längeren Verlauf zum Ausgangswert zurückkehren. In der Literatur gibt es über längere Versuchszeiten in einer gleichartigen Versuchsanordnung erst wenige ähnliche Angaben. Das EHEC-Hämolyisin bewirkte dagegen einen kontinuierlichen Anstieg des PAF. Dies würde ebenfalls gut zur Pathogenese des HUS passen, da PAF u. a. eine Plättchen-Aggregation bewirkt und damit die Entstehung der Mikrothromben begünstigt. Auch diese Wirkung wurde bereits für das Shiga-like-Toxin nachgewiesen.

**bakterielle Sekretion/Adhärenz:** Das EHEC-Hämolyisin wird im Gegensatz zum  $\alpha$ -Hämolyisin nur in geringem Umfang frei sezerniert, wobei sich genetisch Hinweise sowohl auf einen Typ 2-Weg (Plasmid-codiert) als auch den kontaktabhängigen Typ 3 - Weg (chromosomal codiert) zeigen. Damit ist die Adhärenz von EHEC zu Darmepithelzellen von besonderer Bedeutung, die durch die Bildung von AE-Läsionen ausgeübt wird.

### **Tyrosin-Phosphorylierung im Rahmen der Signaltransduktion**

Die Tatsache, dass in den eigenen Versuchen der durch den rekombinanten EHEC-Stamm 413/89<sub>Hly+</sub> induzierte Inositolphosphat-Anstieg erheblich, jedoch nicht vollständig, durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein gehemmt wurde, ist schwierig einzuordnen. Für EPEC ist eine Tyrosin-Phosphorylierung im Rahmen der Signaltransduktion bekannt, und zwar des Adhäsionsproteins Tir. Diese tritt bei EHEC nicht auf. Es sind daher andere Tyrosinkinase-abhängige Schritte zu suchen, die parallel zu unabhängigen Vorgängen ablaufen. Einzelne konkrete Hinweise dafür gibt es inzwischen in der Literatur.

Überraschend und bisher nicht bekannt war die Beobachtung, dass auch die durch das  $\alpha$ -Hämolyisin induzierte Signaltransduktion teils von einer Tyrosinkinase abhängig ist. Dies stimmt überein mit der Beobachtung von Martinez et al., dass bei uropathogenen E. coli ebenfalls eine Tyrosin-Phosphorylierung von Wirtsproteinen beobachtet wird, und dass gleichzeitig die Inositolphosphat-Signaltransduktion für die bakterielle Invasion erforderlich ist [177], hier bestehen möglicherweise bisher nicht bekannte Parallelen zu EPEC.

**Schlussfolgerungen und Wirkmodell: Die in dieser Arbeit gezeigten Wirkungen des EHEC-Hämolytins sind geeignet, „Lücken“ in der Pathogenese der EHEC-Erkrankung zu schließen; darüber hinaus werden die Kenntnisse über die Funktion des  $\alpha$ -Hämolytins ergänzt**

Mit den bisher etablierten Pathogenitätsfaktoren, insbesondere dem Shiga-like-Toxin, konnten nicht alle Fragen zur Pathogenese der durch EHEC verursachten hämorrhagischen Kolitis und des hämolytischen Syndroms geklärt werden [223]. Lücken ergaben sich dabei insbesondere im Bereich der Signaltransduktion. Klinisch war bereits länger die Bildung eines Hämolytins bekannt, bei dem insbesondere wegen des konstanten Auftretens eine pathogenetische Bedeutung zu vermuten war. In den hier durchgeführten Versuchen wurde das EHEC-Hämolytin, wie es in Analogie zum  $\alpha$ -Hämolytin zu erwarten war, als wirkungsvoller Mediator bestätigt, dessen Wirkung primär über die Inositolphosphat-vermittelte Signaltransduktion abläuft. Dabei sind die der Signaltransduktion nachgeschalteten Vorgänge unmittelbar involviert in die EHEC-Infektion, insbesondere die Ausbildung der attaching and effacing (AE)-Läsion und die Beeinflussung der PAF- und Prostazyklin-Synthese (s. o.).  $\alpha$ -Hämolytin und Hly<sub>EHEC</sub> zeigen hier jedoch trotz struktureller Ähnlichkeiten durchaus Unterschiede, die sich bei EHEC funktionell erklären lassen.

Unter Berücksichtigung der Literatur kann man einen Synergismus zwischen Shiga-like-Toxin und EHEC-Hämolytin bei der Ausbildung des HUS annehmen, was auch durch klinische Beobachtungen bestätigt wird. Dem Shiga-like-Toxin kommt dabei eher eine unmittelbar schädigende, dem Hämolytin eher eine steuernde Wirkung zu („Lenkrakete“).

Abschließend lässt sich folgendes **Wirkmodell** insbesondere für das EHEC-Hämolytin aufstellen: In niedriger Konzentration, wenn das Bakterium noch nicht eng an die Darmepithelzelle angeheftet ist, wirkt das Toxin als „Pionier-Landtruppe“ und löst durch Signaltransduktion die Bildung der AE-Läsion aus. Mit der engen Anheftung durch die AE-Läsion kann das Toxin in einer zweiten Stufe in höherer lokaler Konzentration auch eine Porenbildung mit nachgeschalteten Ca<sup>2+</sup>-bedingten Effekten und dann als Maximalwirkung den Zelltod durch Zellyse erreichen, zusammen mit dem Shiga-like-Toxin. Dabei wird durch die schwere Gefäß- und Epithelschädigung, die für das Shiga-like-Toxin und zumindest parallel für das  $\alpha$ -Hämolytin [224] unmittelbar belegt ist, als Korrelat der hämorrhagischen Kolitis die Blutbahn eröffnet; für das



## Diskussion

EHEC-Hämolysin ist ein solcher Effekt durchaus ebenfalls anzunehmen. In die Blutbahn wiederum dringen eher die Toxine als das ganze Bakterium ein. Für die niedrige Konzentration in der Blutbahn ständen erneut zunächst Funktionen der Signaltransduktion im Vordergrund. Eine finale Konzentration der Toxine mit zellschädigender Wirkung und Ausbildung des hämolytisch-urämischen Syndroms käme schließlich durch spezifische Rezeptoren an den Zielorganen, insbesondere der Niere, zustande, deren Expression u. a. durch Shiga-like-Toxin gefördert wird. Die Struktur der Rezeptoren ist für das Shiga-like-Toxin und in Grundzügen auch für das  $\alpha$ -Hämolysin bereits bekannt.

Ausblickend ist zu sagen, dass das Gebiet der Wirkungen des EHEC-Hämolysins und sein Beitrag zum hämolytisch-urämischen Syndrom immer noch Neuland ist, wenngleich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen wesentlichen Schritt darauf darstellen. Weitere experimentelle Studien zur Bestätigung der aufgestellten Hypothesen und zur Ausgestaltung der vorhandenen Umrisse dürften von großem Interesse sein.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Hämolsine gehören zu den porenbildenden bakteriellen Exotoxinen. Für uropathogene *E. coli* ist das gut charakterisierte  $\alpha$ -Hämolysin bekannt. Enterohämorrhagische *E. coli*, die das schwere Krankheitsbild des hämolytisch-urämischen Syndroms verursachen, produzieren ebenfalls ein Hämolysin, das in neuerer Zeit insbesondere strukturell und genetisch charakterisiert wurde. Auch wenn seine klinische Bedeutung sich bereits abzeichnet, existierten über seine konkrete Funktion bislang fast keine Kenntnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden daher grundlegende biochemische Parameter von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) als Antwort auf die Einwirkung des EHEC-Hämolysins im direkten Vergleich mit dem  $\alpha$ -Hämolysin bestimmt. Dafür wurde zum einen ein rekombinanter boviner EHEC- (bzw. Shiga-like-produzierender) Stamm verwendet, der in einem Vektorplasmid lediglich die EHEC-Hämolysin-Sequenz enthielt (413/89<sub>Hly+</sub>), zum anderen ein uropathogener Wildtyp-Stamm (UPEC) mit nachgewiesener ausgeprägter  $\alpha$ -Hämolysin-Produktion. Als Kontrolle diente ein apathogener *E. coli*-Stamm mit dem Vektorplasmid sowie bakterienfreies Wachstumsmedium.

Wie erwartet bewirkte der UPEC-Wildstamm mit dem  $\alpha$ -Hämolysin eine ausgeprägte schnelle Signaltransduktion, gemessen an dem Anstieg der Inositolphosphate, der bis zum 9-fachen des Kontrollwertes reichte mit ähnlichen Werten durch den bakterienfreien Überstand als Zeichen einer ausgeprägten Sekretion. Der rekombinante Stamm mit dem EHEC-Hämolysin (413/89<sub>Hly+</sub>) zeigte dagegen einen nur langsamen und schwächeren Anstieg der Inositolphosphate (Maximum bei 3h mit dem 2,8-fachen des Kontrollwertes). Dabei fand sich nur eine geringe Wirkung durch den Überstand alleine als Zeichen einer geringen Sekretion; letzteres ist für EHEC bekannt.

Wie aus Untersuchungen mit isoliertem  $\alpha$ -Hämolysin bekannt, stimulierte der UPEC-Stamm die Produktion von Prostazyklin. Bei dem EHEC-Hämolysin konnte kein Prostazyklin-Anstieg induziert werden, eine aktive Hemmung war nicht signifikant nachweisbar. Auch die PAF-Synthese wurde erwartungsgemäß durch UPEC gefördert. Überraschend ist hier die Beobachtung, dass im längeren Verlauf die PAF-Werte zum Ausgangswert zurückkehren. Der rekombinante EHEC-Stamm zeigte dagegen einen kontinuierlichen Anstieg des PAF.

Der durch das  $\alpha$ -Hämolysin induzierte Inositolphosphat-Anstieg wurde um 46 % durch einen unspezifischen Tyrosinkinase-Hemmer, Genistein, reduziert; übereinstimmend

## Zusammenfassung

mit einzelnen neuen Literaturangaben. Schwieriger einzuordnen ist die Tatsache, dass auch die Wirkung des EHEC-Hämolytins erheblich durch Genistein reduziert wurde. Die genaue Lokalisation der Tyrosin-Phosphorylierung ist nämlich bei EHEC im Gegensatz zu EPEC bisher nicht bekannt.

Insgesamt zeigt sich das EHEC-Hämolytin als wirkungsvoller Mediator, der im Rahmen der hämorrhagischen Kolitis und des hämolytisch-urämischen Syndroms auf einen Teil der bisher ungeklärten Fragen zur Pathogenese eine Antwort geben kann. Dabei ergänzt es die Endothelzell-schädigende Wirkung des Shiga-like Toxins und übernimmt insbesondere über die Signaltransduktion – sei es rezeptorvermittelt oder durch unspezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom mittels Porenbildung - eine entscheidende Steuerungsfunktion, die über die bekannte zytotoxische Wirkung hinausgeht. Von Bedeutung sind damit die der Signaltransduktion nachgeschalteten Vorgänge. Dies betrifft zunächst die AE-Läsion (Adhäsion), für die eine Abhängigkeit von der Signaltransduktion bekannt ist. Der darüber hinaus in den hier durchgeführten Versuchen gezeigte Einfluss auf die PAF- und Prostazyklin-Synthese fügt sich gut in die bekannten Phänomene des hämolytisch-urämischen Syndroms und der hämorrhagischen Kolitis ein: Im Vordergrund steht die Förderung der Plättchenaggregation über PAF, möglicherweise auch die gleichzeitige Hemmung des Gegenspielers Prostazyklin. Hier zeigt sich ein Synergismus zum Shiga-like-Toxin.

## 6 ABSTRACT

Hemolysins belong to the pore-forming bacterial exotoxins;  $\alpha$ -hemolysin of UPEC is well characterized. Enterohemorrhagic *E. coli* causing the hemolytic uremic syndrome also produce a hemolysin, which was structurally and genetically characterized more recently. Even though there is increasing evidence for the clinical impact of this hemolysin, its concrete function is yet unclear. Therefore, in this study the reaction of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to EHEC hemolysin and  $\alpha$ -hemolysin were compared by measuring certain biochemical parameters. A recombinant bovine Shiga-like producing strain, which contained the EHEC hemolysin sequence in a plasmid (413/89Hly+), and a uropathogenic  $\alpha$ -hemolysin producing strain (UPEC) was used. An apathogenic *E. coli* strain was used as a control. As expected, UPEC with its  $\alpha$ -hemolysin caused a strong and fast signal transduction, measured by the increase of inositolphosphate, with similar values induced by bacteria and bacteria-free supernatant, indicating the secretion of  $\alpha$ -hemolysin. In contrast, the recombinant strain with the EHEC-hemolysin (413/89Hly+) showed a slower and weaker increase of inositolphosphate. Only a small effect was induced by bacteria-free supernatant indicating a low secretion of the hemolysin, which is well-known for EHEC. As known from studies with isolated  $\alpha$ -hemolysin, UPEC stimulated the production of prostacyclin. EHEC hemolysin did not increase prostacyclin levels in the HUVECs studied. As expected, PAF synthesis was promoted by UPEC. Surprisingly, PAF values returned to the initial value after long-term stimulation with  $\alpha$ -hemolysin. In contrast, the recombined EHEC strain induced a continuous increase of PAF. An increase of inositolphosphate induced by  $\alpha$ -hemolysin was reduced by genistein, a non-specific tyrosinkinase inhibitor. This finding is in line with newer data from other groups. Interestingly, the effect of the EHEC hemolysin was also reduced substantially by Genistein. This effect is not well understood since the exact localization of tyrosine phosphorylation in EHEC is not yet known.

In conclusion, EHEC-hemolysin is an effective mediator controlling signal transduction in the infected cells, an effect that goes beyond the well-known cytotoxic effect. EHEC-hemolysin promotes platelet aggregation by PAF, possibly also the simultaneous inhibition of the opponent prostacyclin, in synergism to shiga like toxin. These findings contribute to the understanding of the mechanisms causing haemolytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Davies M.G., Per-Otto-Hagen P.O.: The vascular endothelium, a new horizon. *Annals of Surgery* 1993; 218:593-609.
2. 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.* 1985; 162:145-156.
3. 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* 1986; 239:97-102.
4. Rodbell M.: The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 1980; 284:17-22.
5. Berridge M. J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:159-193.
6. Bansal V.S., Inhorn R.C., Majerus P.W.: The metabolism of inositol 1,3,4-trisphosphate to inositol 1,3-bisphosphate. *J Biol Chem.* 1987; 262(20):9444-7.
7. Lew D.P.: Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur J Clin Invest* 1989; 19:338-346.
8. Johnson J.D., Mills J.S.: Calmodulin. *Med Res Rev* 1986; 6:341-363.
9. Needleman P., Turk J., Jaschick B. A., Morrison A. R., and Lefkowitz J. B.: Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:335-357.
10. Holtzman M. J.: Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 188-203.
11. Schifffrin E.L., Touyz R.M.: Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 Suppl 3:2-13
12. Hallam T.J., Pearson J.D., Needham L.A.: Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. *Biochem J.* 1988; 251(1):243-9.
13. Rose P.E., Armour J.A., Williams C.E., Hill F.G.: Verotoxin and neuraminidase induced platelet aggregating activity in plasma: their possible role in the pathogenesis of the haemolytic uraemic syndrome. *J Clin Pathol.* 1985; 38(4):438-41.

14. Feuerstein G., Hagenbeck J. M. : Prostaglandins, leukotrienes, and platelet activating factor in shock. *J Immunol* 1988; 140:1618-1624.
15. Fink A., Geva D., Zung A., Konichezky S., Eliraz A., Bentwich Z.: Adult respiratory distress syndrome: role of leukotriene C<sub>4</sub> and platelet activating factor. *Crit Care Med* 1990; 18(9):905-910.
16. Terashita Z.I., Imura Y., Nishikawa K., Sumida S.: Is platelet activating factor(PAF) a mediator of endotoxin shock? *Eur J Pharmacol* 1985; 109:257-261.
17. Salzer W. L., McCall.C.E.: Primed stimulation of isolated perfused rabbit lung by endotoxin and platelet activating factor induces enhanced production of thromboxane and lung injury. *J Clin Invest* 1990; 85:1135.
18. Ono S., Westcott J. Y., Voelkel N.F.: PAF antagonists inhibit pulmonary vascular remodeling induced by hypobaric hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 1992; 73:1084.
19. Bolin R.W., Martin T.R., Albert. R.K: Lung endothelial and epithelial permeability after platelet activating factor. *J Appl Physiol* 1990; 63:125-130.
20. Olson N.C., Joyce P.B., Fleisher L.N.: Role of platelet activating factor and eicosanoids during endotoxin-induced lung injury in pigs. *Am J Physiol* 1990; 258:H1674-1686.
21. Mueller H.W., O'Flaherty J.T., Wykle, R. L.: Biosynthesis of platelet activating factor in rabbit polymorphnuclear neutrophils. *J. Biol Chem* 1983; 258:6213-6218.
22. Whatley, R.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., and Prescott, S.M.: Endothelium from diverse vascular sources synthesizes platelet activating factor. *Arteriosclerosis* 1988; 8:321-331.
23. Hwang S.B.: Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanism. *J. Lipid Med* 1990; 2:123-158.
24. Chung K. F.: Platelet-activating factor in inflammation and pulmonary disorders. *Clin Sci* 1992; 83:127.
25. Koltai M., Hosford D., Guinot P., Esanu A., Braquet P.: Platelet activating factor (PAF). A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part I). *Drugs* 1991; 42:9.
26. Zimmermann G.A., McIntyre T.M., Mehrea M., Prescott S.M.: Endothelial associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990; 110:529-540.

27. Snyder F.: Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 1990; 260:C697-708.
28. Stewart A.G., Dubbin P.N., Harris T., Dusting G. J.: Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leucocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3215-3219.
29. Bussolino F., Camusi G., Aglietta M., Braquet P., Bosia P., Pescamona G., Sanavio F., D'Urso N., Marchisio P.C.: Human endothelial cells are target for platelet-activating factor: platelet-activating factor induces change in cytoskeleton structures. *J Immunol* 1987; 139:2430-2446.
30. Prescott S.M., McIntyre T. M., Zimmerman. G. A.: The role of platelet-activating factor in endothelial cells. *Thromb Haemost* 1990; 65:99-103.
31. Knutton S., Baldwin T., Williams P.H., McNeish A.S.: Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1989; 57(4):1290-8.
32. Moon H.W., Whipp S.C., Argenzio R.A., Levine M.M., Giannella R.A.: Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun.* 1983; 41(3):1340-51.
33. Jerse A.E., Kaper J.B.: The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun.* 1991; 59(12):4302-9.
34. Jerse A.E., Yu J., Tall B.D., Kaper J.B.: A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(20):7839-43.
35. Donnenberg M.S., Kaper J.B.: Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1992; 60(10):3953-61.
36. McDaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M.S., Kaper J.B.: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(5):1664-8.
37. Donnenberg M.S., Yu J., Kaper J.B.: A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol.* 1993; 175(15):4670-80.

38. Hancock D.D., Besser T.E., Kinsel M.L., Tarr P.I., Rice D.H., Paros M.G.: The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect.* 1994; 113(2):199-207.
39. Griffin P.M., Tauxe R.V.: The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 1991;13:60-98.
40. 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., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 1983; 308(12):681-5.
41. Kennedy S.S., Zacharski L.R., Beck J.R.: Thrombotic thrombocytopenic purpura: analysis of 48 unselected cases. *Semin Thromb Hemost.* 1980; 6(4):341-9.
42. Swerdlow D.L., Woodruff B.A., Brady R.C., Griffin P.M., Tippen S., Donnell H.D. Jr, Geldreich E., Payne B.J., Meyer A. Jr, Wells J.G., et al.: A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med.* 1992; 117(10):812-9.
43. Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C., Williams L.P. Jr, Hedberg K., Oxman G.L., Barrett T.J., Pfaller M.A., Fleming D.W.: A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med.* 1994; 331(9):579-84.
44. Rowe P.C., Orrbine E., Lior H., Wells G.A., McLaine P.N.: A prospective study of exposure to verotoxin-producing *Escherichia coli* among Canadian children with haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol Infect.* 1993; 110(1):1-7.
45. Francis D.H., Collins J.E., Duimstra J.R. : Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun.* 1986; 51(3):953-6.
46. Tzipori S., Wachsmuth I.K., Chapman C., Birden R., Brittingham J., Jackson C., Hogg J.: The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis.* 1986; 154(4):712-6.
47. Tzipori S., Gibson R., Montanaro J.: Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infect Immun.* 1989; 57(4):1142-50.



48. Tesh V.L., O'Brien A.D.: Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 1992; 12(4):245-54.
49. Tesh V.L., Burris J.A., Owens J.W., Gordon V.M., Wadolkowski E.A., O'Brien A.D., Samuel J.E.: Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun.* 1993; 61(8):3392-402.
50. Gasser C., Gautier E., Steck A., Siebenmann R.E., Oechslin R.: Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz Med Wochenschr.* 1955; 85(38-39):905-9.
51. Robson W.L., Leung A.K., Kaplan B.S.: Hemolytic-uremic syndrome. *Curr Probl Pediatr.* 1993; 23(1):16-33.
52. Rogers M.F., Rutherford G.W., Alexander S.R., DiLiberti J.H., Foster L., Schonberger L.B., Hurwitz E.S.: A population-based study of hemolytic-uremic syndrome in Oregon, 1979-1982. *Am J Epidemiol.* 1986; 123(1):137-42.
53. Siegler R.L., Pavia A.T., Christofferson R.D., Milligan M.K.: A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics.* 1994; 94(1):35-40.
54. Gully P.R.: Haemolytic-uraemic syndrome: epidemiology and report of an outbreak. *J R Soc Health.* 1984; 104(6):214-7.
55. Walters M.D., Matthei I.U., Kay R., Dillon M.J., Barratt T.M.: The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1989; 3(2):130-4.
56. Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1977; 18(3):775-9.
57. Chart H., van der Kar N.C., Tolboom J.J., Monnens L.M., Rowe B.: Serological detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in patients with haemolytic uraemic syndrome in western Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993; 12(9):707-9.
58. Rowe P.C., Orrbine E., Lior H., Wells G.A., Yetisir E., Clulow M., McLaine P.N.: Risk of hemolytic uremic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: results of a Canadian collaborative study. *J Pediatr.* 1998; 132(5):777-82.
59. Tozzi A.E., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., De Petris L., Edefonti A., Montini G., Ferretti A., De Palo T., Gaido M., Rizzoni G.: Shiga toxin-producing

- Escherichia coli infections associated with haemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(1):106-8.
60. Ludwig K., Bitzan M., Zimmermann S., Kloth M., Ruder H., Muller-Wiefel D.E.: Immune response to non-O157 Vero toxin-producing Escherichia coli in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis.* 1996; 174(5):1028-39.
  61. Siegler R.L.: The hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology* 1995; 42:1505-29.
  62. Lopez E.L., Diaz M., Grinstein S., Devoto S., Mendilaharsu F., Murray B.E., Ashkenazi S., Ruboglio E., Woloj M., Vasquez M., et al.: Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis.* 1989; 160(3):469-75.
  63. Symmers W.S.: Thrombotic microangiopathic haemolytic anaemia (thrombotic microangiopathy). *Br Med J.* 1952; 2(4790):897-903.
  64. 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. *Infect Immun.* 1992; 60(4):1536-43.
  65. Oliver J.A., Cannon P.J.: The kidney in scleroderma. *Nephron.* 1977; 18(3):141-50.
  66. Schmidt H., Karch H. and Beutin L.: The large-sized plasmids of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the E. coli  $\alpha$ -hemolysin family. *FEMS Microbiology Letters* 1994; 117:189-196
  67. Cavalieri S.J., Bohach G.A., Snyder I.S.: Escherichia coli alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1984; 48(4):326-43.
  68. Czuprynski C.J., Welch R.A.: Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol.* 1995; 3(12):480-3.
  69. Bhakdi S., Trantum-Jensen J.: Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1987; 107:147-223.
  70. Bhakdi S. Trantum-Jensen J.: Damage to cell membranes by pore -forming bacterial cytolysins. *Prog Allergy* 1988; 40:1.
  71. Welch R.A., Dellinger E.P., Minshew B und Falkow S: Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections. *Nature* 1981; 294:665-666.

72. van den Bosch, J.F., Emody, L., and Keteyi, I.: Virulence of haemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models. *FEMS Microbiol. Lett.* 1982; 13:427-430.
73. Hughes C., Hacker J., Robert A., and Goebel W.: Haemolysin production as a virulence marker in symptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983; 39:546-551.
74. Smith H.W.: The haemolysins of *Escherichia coli*. *J Pathol Bacteriol.* 1963; 85:197-211.
75. Hacker J., Schroter G., Schrettenbrunner A., Hughes C., Goebel W.: Hemolytic *Escherichia coli* strains in the human fecal flora as potential urinary pathogens. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. 1983; 254(3):370-8.
76. Welch R.A., and Pellett S.: Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J. Bacteriol.* 1988; 170:1622-30.
77. Issartel J.P., Koronakis V., Hughes C.: Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* 1991; 351(6329):759-61.
78. 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.* 1996; 241:594-601
79. Menestrina G., Mackman N., Holland I.B., Bhakdi S.: *E. coli* hemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochem Biophys Acta* 1987; 905:109-116.
80. Suttorp N., Floer B., Schnittler H., Seeger W., Bhakdi S.: Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 1990; 58:3796-801.
81. Bhakdi S., Greulich S., Muhly M., Eberspächer B., Becker H., Thiele A., Hugo F.: Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* 1989; 169:737.
82. König B., Ludwig A., Goebel W., König W.: Pore formation by the *Escherichia coli* alpha-hemolysin: role for mediator release from human inflammatory cells. *Infect Immun.* 1994; 62(10):4611-7.
83. Beutin L., Bode L., Ozel M., Stephan R.: Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. *J Bacteriol.* 1990; 172(11):6469-75.

84. Beutin L., Montenegro M.A., Orskov I., Orskov F, Prada J., Zimmermann S., Stephan R.: Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(11):2559-64.
85. Karch H., Heesemann J., Laufs R., O'Brien A.D., Tacket C.O., Levine M.M.: A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun.* 1987; 55(2):455-61.
86. Bauer M.E. and Welch R.A.: Characterization of an RTX Toxin from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity* 1996; 64:167-175.
87. Schmidt H., Karch H. unpublished data.
88. Benz R., Schmid A., Wagner W., Goebel W.: Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun.* 1989; 57(3):887-95.
89. Lo R.Y., Strathdee C.A., Shewen, P.E.: Nucleotide sequence of the leukocin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 1987; 55:1987-1995.
90. Koronakis V., Cross M., Senior, B., Koronakis E., Hughes C.: The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *Bacteriol* 1987; 169:1509-1516.
91. Strathdee C.A., Lo R.Y.: Extensive homology between the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 and the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987; 55:3233-3240.
92. Beutin L., Montenegro M., Zimmermann S., Stephan R.: Characterization of hemolytic strains of *Escherichia coli* belonging to classical enteropathogenic O-serogroups. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1986; 261:266-79
93. Schmidt H., Beutin L. and Karch H.: Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infection and Immunity* 1995; 63:1055-1061
94. Wieler L.H., Tigges M., Ebel F., Schaferkordt S., Djafari S., Schlapp T., Baljer G., Chakraborty T.: The enterohemolysin phenotype of bovine Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. *Vet-Microbiol.* 1996; 52(1-2):153-64

95. Berridge M. J., Dawson R.M.C., Downes C. P., Heslop J. P., Irvine R.F.: Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J* 1983; 212:473-482.
96. Majerus P.W., Conolly T.M., Deckmyn H., Ross T.S., Bross T.E., Ishi H., Bansal V.S., Wilson D.B.: The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science (Wash. DC)* 1986; 234:1519-1526.
97. Hallcher L.J., 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* 1980; 255:10896-10901.
98. Bligh E. G., Dyer W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:753.
99. Majerus P. W., Conolly T.N, Bansal V.S., Inhorn R.C., Ross T. C., Lips D. L.: Inositol Phosphates: synthesis and degradation. *J Biol Chem* 1988; 263:3051.
100. Grimminger F., Rose F., Sibelius U., Meinhardt M., Potzsch B., Spriestersbach R., Bhakdi S., Suttorp N., Seeger W.: Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 1997; 159:1909-16.
101. Foubister V., Rosenshine I., Finlay B.B.: A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med.* 1994; 179(3):993-8.
102. Ismaili A., Philpott D.J., Dytoc M.T. and Sherman P.M.: Signal Transduction Responses following Adhesion of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1995; 63:3316-26.
103. Rose F., Bayer C., Meinhardt M., Chakraborty T., Ebel F., Grimminger F. and Sibelius U. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* secrete a low molecular weight heat-stable agent-impact on signal transduction in HUVEC. (Posterbeitrag): 49. Kongreß der DGHM, Jena 1997
104. Foubister V., Rosenshine I., Sonnenberg M.S., and Finlay B.B.: The *eaeB* Gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* Is Necessary for Signal Transduction in Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 1994; 62:3038-40.
105. Manjarrez-Hernandez H.A., Baldwin T.J., Aitken A., Knutton S., Williams P.H.: Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet.* 1992; 339(8792):521-3.

106. Rosenshine I., Donnenberg M.S., Kaper J.B., and Finlay B.B.: Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *The EMBO Journal* 1992; 11:3551-60.
107. Berridge M.J.: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993; 361(6410):315-25.
108. Baldwin T.J., Ward W., Aitken A., Knutton S., Williams P.H.: Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1991; 59(5):1599-604.
109. Dytoc M., Fedorko L., Sherman P.M.: Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro. *Gastroenterology*. 1994; 106(5):1150-61.
110. (Miller V.L. Hrsg.) Kaper J.B. *Molecular Pathogenesis of Bacterial Pathogenesis*. 1994; 173-195.
111. Giron J.A., Ho A.S., Schoolnik G.K.: Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1993; 175(22):7391-403.
112. Donnenberg M.S., Tzipori S., McKee M.L., O'Brien A.D., Alroy J and Kaper J.B.: The Role of the *eae* Gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Intimate Attachment In Vitro and in a Porcine Model. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 92:1418-24
113. Donnenberg M.S., Calderwood S.B., Donohue-Rolfe A., Keusch G.T., Kaper J.B.: Construction and analysis of *TnphoA* mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. *Infect Immun*. 1990; 58(6):1565-71.
114. Isberg R.R., Leong J.M.: Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 1990; 60(5):861-71.
115. Frankel G., Candy D.C., Everest P., Dougan G.: Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun*. 1994; 62(5):1835-42.
116. Kenny B., De Vinney R., Stein M., Reinscheid D.J., Frey E.A., Finlay B.B.: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. 1997; 91(4):511-20.

117. Sandhu K.S., Clarke R.C., Gyles C.L.: Virulence markers in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle. *Can J Vet Res.* 1999; 63(3):177-84.
118. Rothbaum R., McAdams A.J., Giannella R., Partin J.C.: A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology.* 1982; 83(2):441-54.
119. Ulshen M.H., Rollo J.L.: Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man--another mechanism. *N Engl J Med.* 1980; 302(2):99-101.
120. Yu J., Kaper J.B.: Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* 1992;6(3):411-7.
121. Leong J.M., Fournier R.S., Isberg R.R.: Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J.* 1990; 9(6):1979-89.
122. O'Brien A.O., Lively T.A., Chen M.E., Rothman S.W., Formal S.B.: *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet.* 1983; 1(8326 Pt 1):702.
123. Sekar M.C., Dixon J.F., Hokin L.E.: The formation of inositol 1,2-cyclic 4,5-trisphosphate and inositol 1,2-cyclic 4-bisphosphate on stimulation of mouse pancreatic minilobules with carbamylcholine. *J Biol Chem.* 1987; 262(1):340-4.
124. Irvine R.F., Letcher A.J., Lander D.J., Berridge M.J.: Specificity of inositol phosphate-stimulated Ca<sup>2+</sup> mobilization from Swiss-mouse 3T3 cells. *Biochem J.* 1986; 240(1):301-4.
125. Johnson-Henry K., Wallace J.L., Basappa N.S., Soni R., Wu G.K., Sherman P.M.: Inhibition of attaching and effacing lesion formation following enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* infection. *Infect Immun.* 2001; 69(11):7152-8.
126. Rosenshine I., Ruschkowski S., Stein M., Reinscheid D.J., Mills S.D., and Finlay B.B.: A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopodes formation. *The EMBO Journal* 1996; 15:2613-24
127. Benigni A., Boccardo P., Noris M., Remuzzi G., Siegler R.L.: Urinary excretion of platelet-activating factor in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 1992; 339(8797):835-6.

128. Appiani A.C., Edefonti A., Bettinelli A., Cossu M.M., Paracchini M.L., Rossi E.: The relationship between plasma levels of the factor VIII complex and platelet release products (beta-thromboglobulin and platelet factor 4) in children with the hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol.* 1982; 17(4):195-9.
129. Walters M.D., Levin M., Smith C., Nokes T.J., Hardisty R.M., Dillon M.J., Barratt T.M.: Intravascular platelet activation in the hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 1988; 33(1):107-15.
130. Sjogren R., Neill R., Rachmilewitz D., Fritz D. et al: Role of Shiga-like-Toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterology* 1994; 106(2) :540-3
131. Tashiro H., Miura S., Kurose I., Fukumura D., Suzuki H., Suematsu M., Yoshioka M., Tsuchiya M., Kai A., Kudoh Y.: Verotoxin induces hemorrhagic lesions in rat small intestine. Temporal alteration of vasoactive substances. *Dig Dis Sci* 1994; 39:1230-8
132. Boku S.: A role of platelet activating factor in experimental hemorrhagic enteritis induced by *Clostridium difficile* toxin. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1994; 91(9):1407-14.
133. Etienne A., Thonier F., Braquet P.: Protective effect of the PAF-antagonist BN 52021 on several models of gastro-intestinal mucosal damage in rats. *Int J Tissue React.* 1989;11(2):59-64.
134. Noris M., Benigni A., Siegler R., Gaspari F., Casiraghi F., Mancini M.L., Remuzzi G.: Renal prostacyclin biosynthesis is reduced in children with hemolytic-uremic syndrome in the context of systemic platelet activation. *Am J Kidney Dis.* 1992; 20(2):144-9.
135. Tönshoff B., Momper R., Kuhl P.G., Schweer H., Scharer K., Seyberth H.W.: Increased thromboxane biosynthesis in childhood hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 1990; 37(4):1134-41.
136. Remuzzi G., Misiani R., Marchesi D., Livio M., Mecca G., de Gaetano G., Donati M.B.: Haemolytic-uraemic syndrome: deficiency of plasma factor(s) regulating prostacyclin activity? *Lancet.* 1978; 2(8095):871-2.
137. Defreyn G., Proesmans W., Machin S.J., Lemmens F., Vermeylen J.: Abnormal prostacyclin metabolism in the hemolytic uremic syndrome: equivocal effect of prostacyclin infusions. *Clin Nephrol.* 1982; 18(1):43-9.



138. Levin M., Elkon K.B., Nokes T.J., Buckle A.M., Dillon M.J., Hardisty R.M., Barratt T.M.: Inhibitor of prostacyclin production in sporadic haemolytic uraemic syndrome. *Arch Dis Child*. 1983; 58(9):703-8.
139. Chen Y.C., McLeod B., Hall E.R., Wu K.K.: Prostacyclin degradation in the thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1981; 2(8241):267-9.
140. Wu K.K., Hall E.R., Rossi E.C., Papp A.C.: Serum prostacyclin binding defects in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest*. 1985; 75(1):168-74.
141. Noris M., Benigni A., Siegler R., Gaspari F., Casiraghi F., Mancini M.L., Remuzzi G.: Renal prostacyclin biosynthesis is reduced in children with hemolytic-uremic syndrome in the context of systemic platelet activation. *Am J Kidney Dis*. 1992; 20(2):144-9.
142. Siegler R.L.: Prostacyclin in the haemolytic uremic syndrome. *J Nephrol* 1993; 6:64-69.
143. Grimminger F., Sibelius U., Bhakdi S., Suttorp N., Seeger W.: Escherichia coli hemolysin is a potent inducer of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J Clin Invest*. 1991; 88(5):1531-9.
144. Laestadius A., Richter-Dahlfors A., Aperia A.: Dual effects of Escherichia coli alpha-hemolysin on rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2002; 62(6):2035-42.
145. Paas Y., Eisenstein M., Medevielle F., Teichberg V.I., Devillers-Thiery A.: Identification of the amino acid subsets accounting for the ligand binding specificity of a glutamate receptor. *Neuron*. 1996 Nov;17(5):979-90. Erratum in: *Neuron* 1997; 18(1):177.
146. Krull M., Dold C., Hippenstiel S., Rosseau S., Lohmeyer J., Suttorp N.: Escherichia coli hemolysin and Staphylococcus aureus alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol*. 1996; 157(9):4133-40
147. Tufano M.A., Biancone L., Rossano F., Capasso C., Baroni A., De Martino A., Iorio E.L., Silvestro L., Camussi G.: Outer-membrane porins from gram-negative bacteria stimulate platelet-activating-factor biosynthesis by cultured human endothelial cells. *Eur J Biochem* 1993; 214:685-93
148. Whatley R.E., Nelson P., Zimmermann G.A., Stevens D.L., Parker C.J., McIntyre T.M., Prescott S.M.: The regulation of platelet-activating factor production in

- endothelial cells. The role of calcium and protein kinase C. *J Biol Chem* 1989; 264:6325-33
149. Seeger W., Obernitz R., Thomas M., Walmrath D., Suttorp N., Holland I.B., Grimminger F., Eberspacher B., Hugo F., Bhakdi S.: Lung vascular injury after administration of viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in isolated rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1991 ; 143(4 Pt 1):797-805.
  150. Ludwig A., Jarchau T., Benz R., Goebel W.: The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet.* 1988; 214(3):553-61.
  151. Sandkvist M.: Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun.* 2001; 69(6):3523-35.
  152. Cornelis G.R.: Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2000; 355(1397):681-93.
  153. Jarvis K.G.; Giron J.A., Jerse A.E., McDaniel T.K., Donnenberg M.S. and Kaper J.B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attachin and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:7996-8000.
  154. Gentshev I., Dietrich G., Goebel W.: The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* 2002; 10(1):39-45.
  155. Welch R.A.: Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 1991; 5(3):521-8.
  156. Sheps J.A., Cheung I., Ling V.: Hemolysin transport in *Escherichia coli*. Point mutants in HlyB compensate for a deletion in the predicted amphiphilic helix region of the HlyA signal. *J Biol Chem.* 1995; 270(24):14829-34.
  157. Wandersman C., Delepelaire P.: TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(12):4776-80.
  158. Vakharia H., German G.J., Misra R.: Isolation and characterization of *Escherichia coli* tolC mutants defective in secreting enzymatically active alpha-hemolysin. *J Bacteriol.* 2001; 183(23):6908-16.
  159. Baldwin T.J., Brooks S.F., Knutton S., Manjarrez Hernandez H.A., Aitken A., Williams P.H.: Protein phosphorylation by protein kinase C in HEP-2 cells

- infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1990; 58(3):761-5.  
Erratum in: *Infect Immun* 1990; 58(6):2024.
160. Abe A., Heczko U., Hegele R.G., Brett Finlay B.: Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *J Exp Med*. 1998; 188(10):1907-16.
  161. Neves B.C., Shaw R.K., Frankel G., Knutton S.: Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2003; 71(4):2262-5.
  162. Goffaux F., China B., Janssen L., Pirson V., Mainil J.: The locus for enterocyte effacement (LEE) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from dogs and cats. *Adv Exp Med Biol*. 1999; 473:129-36.
  163. Jarvis K.G., Kaper J.B.: Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun*. 1996; 64(11):4826-9.
  164. Kresse A.U., Schulze K., Deibel C., Ebel F., Rohde M., Chakraborty T., Guzman C.A.: Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1998; 180(17):4370-9.
  165. Burland V., Shao Y., Perna N.T., Plunkett G., Sofia H.J., Blattner F.R.: The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(18):4196-204.
  166. Schmidt H., Henkel B., Karch H.: A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 148(2):265-72.
  167. De Vinney R., Stein M., Reinscheid D., Abe A., Ruschkowski S., Finlay B.B.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun*. 1999; 67(5):2389-98.
  168. Sherman P., Soni R., Petric M., Karmali M.: Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 1987; 55(8):1824-9.

169. Oelschlaeger T.A., Barrett T.J., Kopecko D.J.: Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infect Immun.* 1994; 62(11):5142-50.
170. Goosney D.L., DeVinney R., Finlay B.B.: Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun.* 2001; 69(5):3315-22.
171. Downward J.: The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett.* 1994; 338(2):113-7.
172. Goh E.L., Zhu T., Yakar S., LeRoith D., Lobie P.E.: CrkII participation in the cellular effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent and independent effects. *J Biol Chem.* 2000; 275(23):17683-92.
173. Matsumoto T., Yokote K., Take A., Takemoto M., Asaumi S., Hashimoto Y., Matsuda M., Saito Y., Mori S.: Differential interaction of CrkII adaptor protein with platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptors is determined by its internal tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270(1):28-33.
174. Kurokawa K., Mochizuki N., Ohba Y., Mizuno H., Miyawaki A., Matsuda M.: A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. *J Biol Chem.* 2001; 276(33):31305-10. Epub 2001.
175. Dytoc M.T., Ismaili A., Philpott D.J., Soni R., Brunton J.L., Sherman P.M.: Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect Immun.* 1994; 62(8):3494-505.
176. Helgadottir A., Halldorsson H., Magnúsdóttir K., Kjeld M., Thorgeirsson G. : A role for tyrosine phosphorylation in generation of inositol phosphates and prostacyclin production in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(2):287-94.
177. Martinez J.J., Mulvey M.A., Schilling J.D., Pinkner J.S., Hultgren S.J.: Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 2000; 19(12):2803-12.
178. Sherman P., Soni R., Karmali M.: Attaching and effacing adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium in vivo. *Infect Immun.* 1988; 56(4):756-61.

179. O'Brien A.D., Holmes R.K.: Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 1987; 51(2):206-20.
180. Fontaine A., Arondel J., Sansonetti P.J.: Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox- mutant of *Shigella dysenteriae* 1. *Infect Immun.* 1988; 56(12):3099-109.
181. Moon H.W.: Comparative histopathology of intestinal infections. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 412:1-19.
182. Dykstra S.A., Moxley R.A., Janke B.H., Nelson E.A., Francis D.H.: Clinical signs and lesions in gnotobiotic pigs inoculated with Shiga-like toxinI from *Escherichia coli*. *Vet Pathol.* 1993;30(5):410-7.
183. Richardson S.E., Karmali M.A., Becker L.E., Smith C.R.: The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum Pathol.* 1988; 19(9):1102-8.
184. Boyd B., Lingwood C.: Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron.* 1989; 51(2):207-10. Erratum in: *Nephron* 1989; 51(4):582.
185. Obrig T.G., Del Vecchio P.J., Brown J.E., Moran T.P., Rowland B.M., Judge T.K., Rothman S.W.: Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun.* 1988; 56(9):2373-8.
186. Richardson S.E., Rotman T.A., Jay V., Smith C.R., Becker L.E., Petric M., Olivieri N.F., Karmali M.A.: Experimental verocytotoxemia in rabbits. *Infect Immun.* 1992; 60(10):4154-67.
187. Zoja C., Corna D., Farina C., Sacchi G., Lingwood C., Doyle M.P., Padhye V.V., Abbate M., Remuzzi G.: Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1. *J Lab Clin Med.* 1992; 120(2):229-38.
188. Remuzzi G. and Ruggenenti P.: The hemolytic uremic syndrome. *Kidney international* 1995; 47:2-19.
189. Lingwood C.A., Law H., Richardson S., Petric M., Brunton J.L., De Grandis S., Karmali M.: Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem.* 1987; 262(18):8834-9.
190. Lindberg A.A., Brown J.E., Stromberg N., Westling-Ryd M., Schultz J.E., Karlsson K.A.: Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem.* 1987; 262(4):1779-85.

191. Waddell T., Head S., Petric M., Cohen A., Lingwood C.: Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the Escherichia coli verocytotoxin 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 152(2):674-9.
192. Tesh V.L., Samuel J. E., Burriss J. A., Owens J. W., Taylor F. B. J. R., Siegler R. L.: Quantitation and localization of shiga toxin/shiga-like toxin binding glycolipid receptors in human and baboon tissues. VTEC 94, 2<sup>nd</sup> International Symposium and workshop on "Verocytotoxin-producing Escherichia coli infections" June 27-39, Bergamo, Italy, 1994.
193. Mahan J.D., van Setten P.A., McAllister C., van den Heuvel L.P.W.J., Monnens L.A.H.: Effect of verotoxin-1 on viability and protein synthesis of human glomerular capillary endothelial cells (abstract): VTEC 94, 2<sup>nd</sup> International Symposium and workshop on "Verocytotoxin-producing Escherichia coli infections" June 27-39, Bergamo, Italy, 1994
194. Tsai H.M., Sussman I.I., Nagel R.L.: Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994; 83(8):2171-9.
195. Moncada S., Higgs A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329(27):2002-12.
196. Noris M., Morigi M., Zoja C., Aiello S., Foppolo M., Remuzzi G., Remuzzi A.: Modulation of nitric oxide (NO) synthesis by endothelial cells in vitro is a function of flow conditions. (abstract) *JASN* 1993; 4:562.
197. Mulligan M.S., Hevel J.M., Marletta M.A., Ward P.A.: Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(14):6338-42.
198. Lander H.M., Sehajpal P., Levine D.M., Novogrodsky A.: Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol.* 1993; 150(4):1509-16.
199. Siegler R.L., Christofferson R.D., Edwin S.S. et al: Urinary cyclic GMP as a measure of endothelin derived relaxation factor (EDRF) in the hemolytic uremic syndrome.: *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:274.
200. Siegler R.L., Edwin S.S., Christofferson R.D., Mitchell M.D.: Endothelin in the urine of children with the hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics.* 1991; 88(5):1063-6.

201. Koster F.T., Boonpucknavig V., Sujaho S., Gilman R.H., Rahaman M.M.: Renal histopathology in the hemolytic-uremic syndrome following shigellosis. *Clin Nephrol.* 1984; 21(2):126-33.
202. Harlan J.M., Harker L.A., Reidy M.A., Gajdusek C.M., Schwartz S.M., Striker G.E.: Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest.* 1983; 48(3):269-74.
203. Roth R.I.: Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood.* 1994; 83(10):2860-5.
204. Louise C.B., Obrig T.G.: Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun.* 1991; 59(11):4173-9.
205. van de Kar N.C., Monnens L.A., Karmali M.A., 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.* 1992; 80(11):2755-64.
206. van den Kar NCAJ, Kooistra T., Monnens L.A.H., van Hinsbergh V.W.M.: Role of TNF receptors and protein kinase C in the induction of the verocytotoxin receptor, GB3, in human endothelial cells (abstract). VTEC 94, 2<sup>nd</sup> International Symposium and workshop on "Verocytotoxin-producing Escherichia coli infections" June 27-30, Bergamo, Italy, 1994
207. Siegler R.L., Edwin S.S., Christofferson R.D., Mitchell M.D.: Plasma and urinary cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome (abstract) *JASN* 1991; 2:274.
208. Barrett T.J., Potter M.E., Strockbine N.A.: Evidence for participation of the macrophage in Shiga-like toxin II-induced lethality in mice. *Microb Pathog.* 1990; 9(2):95-103.
209. Harel Y., Silva M., Giroir B., Weinberg A., Cleary T.B., Beutler B.: A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in haemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest.* 1993; 92(5):2110-6.
210. Zoja C., Morogi M., Foppolo M., Figliuzzi M., Gallego M.J., Karmali M.A., Remuzzi G.: Verotoxin-1 increases leukocyte adhesion to endothelial cells under dynamic flow conditions: VTEC 94, 2<sup>nd</sup> International Symposium and workshop

- on “Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections” June 27-30, Bergamo, Italy, 1994
211. Forsyth K.D., Simpson A.C., Fitzpatrick M.M., Barratt T.M., Levinsky R.J.: Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 1989; 2(8660):411-4.
  212. O'Regan S., Chesney R.W., Kaplan B.S., Drummond K.N.: Red cell membrane phospholipid abnormalities in the hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol*. 1981; 15(1):14-7.
  213. Koenig D.W., Barley-Maloney L., Daniel T.O.: A western blot assay detects autoantibodies to cryptic endothelial antigens in thrombotic microangiopathies. *J Clin Immunol*. 1993; 13(3):204-11.
  214. Olavarria F., Mezzano S., Ardiles L., Lopez M.I., Kunick M.: Presence of circulating immune complexes in the classic form of haemolytic uremic syndrome: a constant finding. *Nephron*. 1989; 52(4):313-6.
  215. Xu J., Cheng B., Feng L., Jing H., Yang J., Zhao G., Wang H., Li H.: Serological investigations on patients with hemolytic uremic syndromes due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2002; 23(2):114-8
  216. Beutin L., Aleksic S., Zimmermann S., Gleier K.: Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1994; 183(1):13-21.
  217. Bettelheim K.A.: Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin. *J of Applied Bacteriology* 1995; 79:178-80
  218. Eklund M., Scheutz F., Siitonen A.: Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(8):2829-34.
  219. Boerlin P., McEwen S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L.: Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(3):497-503.
  220. Schmidt H., Karch H.: Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(10):2364-7.



221. Forestier C, Welch RA. Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infect Immun.* 1991; 59(11):4212-20.
222. Kiyokawa N., Taguchi T., Mori T., Uchida H., Sato N., Takeda T., Fujimoto J.: Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* Shiga toxins 1 and 2. *J Infect Dis.* 1998; 178(1):178-84.
223. Tzipori S., Karch H., Wachsmuth K.I., Robins-Browne R.M., O'Brien A.D., Lior H., Cohen M.L., Smithers J., Levine M.M.: Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 1987; 55(12):3117-25.
224. Mayer K., Temmesfeld-Wollbrück B., Friedland A., Olschewski H., Reich M., Seeger W., Grimminger F.: Severe microcirculatory abnormalities elicited by *E. coli* hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(4):1171-8.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- AE-Läsion „Attaching and effacing“-Läsion
- DAG Diacylglycerol
- EDHF endothelial derived hyperpolarisation factor
- EHEC enterohämorrhagische Escherichia coli
- EPEC enteropathogene Escherichia coli
- FCS fetales Kälberserum
- HlyA *Escherichia coli* Hämolysin
- HUVEC human umbilical vein endothelial cells
- HUS hämolytisch-urämisches Syndrom
- IP<sub>x</sub> verschiedene Inositol-Phosphate
- LB Luria Bertani
- LEE Locus for enterocyte effacement
- NO Stickstoffmonoxid
- PAF Plättchen-aktivierender Faktor
- PGI<sub>2</sub> Prostazyklin
- RTX “repeats in toxin”
- SLT Shiga-like-Toxin
- SLTEC Shiga-like-Toxin produzierende Escherichia coli (=EHEC)
- UPEC uropathogene Escherichia coli
- VTEC Verotoxin-produzierende Escherichia coli (=EHEC)
- Hly<sub>EHEC</sub> EHEC-Hämolysin

## LEBENS LAUF

Matthias Meinhardt  
Zur Schafstränke 41  
01705 Pesterwitz  
Tel. 0351 / 458-3000 (dienstlich)  
oder 0351 / 650 4660

### **Persönliche Angaben**

Geburtsdatum und –ort: 16.12.1967 in Gießen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### **Schulbildung**

1974-1978: Grundschule Großen-Linden  
1978-1987: Förderstufe, Gymnasialzweig und Gymnasiale Oberstufe der  
Landgraf Ludwig-Schule Gießen mit Abschluss der Hochschulreife

### **Wehrdienst**

10/87-12/88: Flugabwehrregiment Marburg (Grundausbildung), Heeresmusikcorps  
300 in Koblenz

### **Studium**

ab 4/1989: Studium der Humanmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen  
3/1991: Ärztliche Vorprüfung  
3/1992: Ärztliche Prüfung, 1. Teil  
9/1994: Ärztliche Prüfung, 2. Teil  
10/94-10/95: Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Gießen bzw.  
Evangelischen Krankenhaus Gießen, Wahlfach: Neurologie  
11/95: Ärztliche Prüfung, 3. Teil

### **Promotion**

12/95-6/96: Praktischer Teil der Promotion am Institut für Innere Medizin der Justus  
Liebig-Universität Gießen, Prof. Dr. Dr. med. Grimminger

### **Berufstätigkeit**

1/97-11/97: Arzt im Praktikum am Institut für Pathologie der Universität Göttingen  
bei Prof. Dr. med. Schauer / Prof. Dr. med. Radzun  
12/97-6/98: Arzt im Praktikum an der Abteilung für Endokrinologie der  
Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf, Direktor: Prof.  
Dr. med. Scherbaum  
8/99-12/99: wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Neuropathologie der  
Universität  
Düsseldorf (Komm. Leitung: Frau PD Dr. Neuen-Jacob)  
seit 1/2000: wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pathologie der Universität  
Dresden, Direktor: Prof. Dr. med. Baretton

## VERÖFFENTLICHUNGEN

### **Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin**

Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W; Journal of Immunology 1997 Aug 15; 159(4): 1909-16

### **Enterohemorrhagic Escherichia coli secrete a low molecular weight heat-stable agent-impact on signal transduction in HUVEC (Poster)**

F. Rose, C. Bayer, M. Meinhardt, T. Chakraborty, F. Ebel, F. Grimminger and U. Sibelius  
(49. Kongress der DGHM, Jena 1997)

### **Das Myelolipom – ein Beitrag zur Differentialdiagnose adrenaler und retroperitonealer Raumforderungen (Poster)**

M. Meinhardt, U. Fischer, A. Schauer, R.-H. Ringert, J. Feldkamp, W. A. Scherbaum  
(2. Jahrestagung der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Endokrinologie & Diabetologie, Düsseldorf 1998)

### **Intracerebral neurocysticercosis mimicking glioblastoma multiforme (Poster)**

M. Meinhardt, M. Sabel, F. Weber, C. Vogt, E. Neuen-Jacob  
(44. Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy, Bonn, 1999)

### **Changes in skeletal muscles in patients with knee joint replacement (Poster)**

M. Meinhardt, M. Egl, B. Fink, E. Neuen-Jacob (Düsseldorf, Bad Bramstedt)  
(Leipzig 2000-International Symposium and 45. Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy 29.3.-1.4.2000)

### **Extramedullary blast crisis of chronic myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mimicking aggressive, translocation t(14;18)-positive B-cell lymphoma.**

F. Kroschinsky, K. Friedrich, M. Hanel, B. Mohr, T. Langer, M. Meinhardt, C. Thiede, M. Bornhauser, G. Baretton, G. Ehninger:  
Ann Hematol. 2003 Jan; 82(1):47-52. Epub 2002 Nov 29.

### **Comparative evaluation of microsatellite marker, AP-PCR and CGH studies in primary renal cell carcinoma.**

C. Hoefling, H. Schmidt, M. Meinhardt, A. Lohse, H. Taubert, S. Fuessel, U. Schmidt, K. Schuster, G. Baretton, M. P. Wirth, A. Meye A:  
Int J Mol Med. 2004 Jun; 13(6):835-42.

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. med. Grimminger danken für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie für die freien und vielfältigen Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Dr. med. Ulf Sibelius danke ich für die Vermittlung der Fragestellung und ausführliche wissenschaftliche Beratung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Frank Rose für die sehr engagierte und hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Fragestellung, insbesondere Anleitung von Methoden, Erstellen von Versuchsaufbauten nach der wissenschaftlichen Fragestellung, Vermittlung der Zusammenarbeit mit anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie stete Ansprechbarkeit bei auftretenden methodischen Problemen, nicht zuletzt auch der Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Chakraborty und PD Dr. med. Frank Ebel vom Institut für Mikrobiologie für die wirkungsvolle Zusammenarbeit, insbesondere der inhaltlichen Beratung zur mikrobiologischen Fragestellung und der Herstellung der Bakterienstämme.

Ein großer Dank geht auch an Frau Anette Tschuschnner für die sorgfältige und zuverlässige Präparation der Endothelzellen, die Einführung in die Zellkultur und stete Ansprechbarkeit bei praktischen Problemen.

Zum Schluss möchte ich besonders meinen Eltern, Margarete Meinhardt und Prof. Dr. phil. Helmut Meinhardt danken, die es mir ermöglicht haben, zu studieren und damit auch die Rahmenbedingungen für diese Arbeit gaben.

## **ERKLÄRUNG**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.