

# I

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie  
(Direktor: Professor Dr. med. S. Schreiber)  
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK S-H), Campus Kiel  
der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel

## **Untersuchung der Pilzflora bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen: Veränderung von Zusammensetzung und Diversität**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

OLIVER DREWS

aus Lübeck

Kiel 2009

## II

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Ott. Institut für Klinische  
Molekularbiologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Bröring, Klinik für Allgemeine  
Chirurgie und Thoraxchirurgie
- Tag der mündlichen  
Prüfung: 21.10.2009
- Zum Druck  
genehmigt, Kiel,  
den 11.09.2009
- gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi  
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

### III

#### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CAI	Clinical Activity Index
CDAI	Crohn´s Disease Activity Index
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CFU	Colony Forming Units
dsDNA	Double Strand DNA
MC	Morbus Crohn
N+	Normalkontrollen mit entzündlichen Veränderungen
N-	Normalkontrollen ohne entzündliche Veränderungen
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
ssDNA	Single Strand DNA
U	Unit
CU	Colitis Ulcerosa
UV	Ultra Violett
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle

**Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung .....	1
1.1	Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen .....	1
1.2	Risikofaktoren für die Entstehung der CED: genetische Suszeptibilität.....	4
1.3	Risikofaktoren für die Entstehung der CED: Umweltfaktoren .....	5
1.4	Pathogenese der CED: Definition der intestinalen Barriere.....	6
1.5	Bedeutung der intestinalen Mikroflora an der Entstehung der CED.....	9
1.6	Pilzflora des menschlichen Verdauungstraktes .....	12
1.7	Biodiversität: Molekulare Mikrobiologie und 18S- rDNA .....	13
2.	Fragestellung.....	17
3.	Material und Methoden .....	18
3.1	Kulturmedien, Chemikalien, Verbrauchsmittel.....	18
3.2	Enzyme, Primer und Sonden, Zellen und Vektoren.....	19
3.3	Kits, Gerätschaften und Datenbanken/ Software .....	20
3.4	Patienten .....	21
3.5	Biopsien und DNA-Gewinnung .....	22
3.5.1	DNA Extraktion .....	22
3.5.2	Nachweis der DNA .....	23
3.5.4	Messung der dsDNA Konzentration .....	23
3.6	Quantitative PCR von Pilz-DNA und bakterieller DNA.....	24
3.7	Klonbibliotheken.....	24
3.7.1	Pre- PCR und nested PCR.....	25
3.7.2	Gelextraktion und Aufreinigung.....	26
3.7.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	27
3.7.4	Ligation .....	27
3.7.5	Transformation.....	28
3.7.6	Ausplattieren von Zellen.....	28
3.7.7	Selektion der Klone .....	28
3.7.8	Nachweis des Inserts .....	29
3.7.9	Glycerol- Kulturen .....	29
3.7.10	Sequenzierung.....	30
3.8	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) .....	30

3.8.1	Pre-PCR und nested-PCR .....	31
3.8.2	Silberfärbung der DGGE-Gele.....	31
3.8.3	Weiterverarbeitung der Banden-DNA .....	33
3.8.4	Auswertung der Bandenmuster.....	33
3.9	Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung und in-situ Hybridisierung .....	33
4.	Ergebnisse.....	35
4.1	Quantitative Bestimmung der mukosa-assoziierten Pilzflora sowie der Stuhlflora.....	35
4.2	Vergleich der mukosa-assoziierten Pilzflora mit der Stuhlflora .....	35
4.3	Vergleichende Analyse der Klonbibliotheken-Kohorten ....	36
4.4	Biodiversität der intestinalen Pilzflora anhand der DGGE .	38
4.5	Taxonomische Zuordnung der DGGE-Banden .....	43
4.6	Nachweis von mukosa-adhärenenten Pilzen mittels FISH und non-fluorescent in-situ Hybridisation.....	43
5.	Diskussion .....	47
6.	Zusammenfassung.....	50
7.	Literaturverzeichnis.....	53
8.	Tabellenverzeichnis.....	63
9.	Abbildungsverzeichnis .....	63
10.	Anhang .....	64
11.	Curriculum vitae .....	72
12.	Danksagung .....	73

## **1. Einleitung**

### **1.1 Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden nach klinischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten in zwei Verlaufsformen eingeteilt, Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Als eigenständiges Krankheitsbild innerhalb der CED gilt zusätzlich die sogenannte Pouchitis nach totaler Proktokolektomie bei Colitis ulcerosa. In ca. 10% der Fälle misslingt eine eindeutige diagnostische Zuordnung – in diesem Fall spricht man von einer „*Colitis indeterminata*“.

Die Erstbeschreibung eines Patienten mit Morbus Crohn kann in das 17. Jahrhundert datiert werden. Erstmals beschreibt der deutsche Chirurg Wilhelm Fabry (alias Guilhelmus Fabricius Hildanus) Befunde in einem Autopsiebericht, welche mit einem Morbus Crohn vereinbar sind (Kirsner, 1988). Obwohl im Verlauf, insbesondere im 19. Jahrhundert, immer wieder Krankheitsfälle beschrieben werden, welche an einen Morbus Crohn denken lassen, erfolgt die erste systematische Beschreibung der Symptomatik und Charakteristika im Jahre 1932 durch den amerikanischen Arzt Burril B. Crohn zusammen mit seinen Kollegen L. Ginzburg und G.D. Oppenheimer (Crohn, 1932)

Die Erstbeschreibung einer Colitis ulcerosa geht nach allgemeiner Ansicht auf den britischen Arzt Sir Samuel Wilks zurück (Wilks, 1859). Bereits im Jahre 1859 gab er eine detaillierte Beschreibung einer ulzerösen chronischen Dickdarmerkrankung, welche allerdings nach heutigen Erkenntnissen auch einem Morbus Crohn entsprechen könnte.

Inzidenz und Prävalenz der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhundert deutlich zugenommen. Zudem ist eine geographische Häufung der CED dokumentiert mit deutlich erhöhten Prävalenzraten im Bereich der sog. westlichen, industrialisierten Welt (insbesondere Nordamerika (USA/Kanada), Großbritannien und Europa). Eine teils dramatische Zunahme der CED wird allerdings für Südeuropa, Asien und die meisten Entwicklungs- und Schwellenländer in Afrika beschrieben (Baumgart & Carding, 2007). Die Inzidenz liegt bei 8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr, die kumulative Prävalenz

beträgt bis zu 0.1% der Bevölkerung. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr, Frauen erkranken häufiger als Männer.

Gemeinsam ist beiden Verlaufsformen der CED, also des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa, der chronisch-remittierende Verlauf mit Phasen einer akuten Entzündung („Schub“) und intermittierenden Ruhephasen („Remission“). Von einer chronisch-aktiven Verlaufsform spricht man, wenn trotz suffizienter medikamentöser Therapie keine Remission erreicht werden kann. Eine Vielzahl klinischer Symptome kann bei den CED auftreten, Leitsymptom beider Entitäten sind jedoch Diarrhoen (Farrell & Peppercorn, 2002) (Shanahan, 2002) (Baumgart & Carding, 2007). Die Krankheitsaktivität wird bei beiden Verlaufsformen durch die Klinik, Laboruntersuchungen sowie den endoskopischen Befund bestimmt. Zur besseren Beurteilbarkeit der Krankheitsaktivität werden Befunde zu Krankheitsindices zusammengefasst, von denen der CAI (clinical activity index) (Rachmilewitz, 1989) für die Colitis ulcerosa sowie der CDAI (clinical disease activity index) (Best, 1976) für den Morbus Crohn hervorzuheben sind. Zusätzlich existieren histologische, endoskopische und life-quality-Indices (Hanauer, 1994).

Unterschiede bestehen insbesondere im Befallsmuster und der Ausdehnung der Erkrankung sowie hinsichtlich spezieller klinischer Charakteristika. Die Entzündung bei der Colitis ulcerosa beginnt immer distal im Rektum und schreitet von dort kontinuierlich nach proximal voran, bleibt aber immer auf das Kolon beschränkt. Eine Mitbeteiligung proximaler Abschnitte kommt nur als sogenannte „backwash-Ileitis“ vor. Typischerweise sind Kolon und Sigma mitbetroffen, man spricht dann von einer „Linksseitenkolitis“. Ist der gesamte Dickdarm betroffen spricht man von einer „Pankolitis“. Die Entzündung bei der Colitis ulcerosa betrifft die oberflächlichen Schleimhautstrukturen, also Mukosa und Submukosa.

Im endoskopischen Bild imponiert in frühen Stadien ein Schleimhautödem, in fortgeschrittenen Stadien kommen großflächige Ulzerationen hinzu, in denen häufig Inseln mit unveränderter Schleimhaut zu finden sind („Pseudopolypen“). Histologisch sind Granulozyteninfiltrationen in der Schleimhaut sowie die sogenannten Kryptenabszesse zu finden. Klinisch imponieren blutig-schleimige Diarrhoen mit krampfartigen Abdominalschmerzen (Tenesmen) und Fieber. Zu der gefürchtesten intestinalen Komplikation ist das sogenannte toxische Megakolon (Gefahr der Darmperforation) zu rechnen. Zahlreiche extraintestinale Komplikationen können den

Krankheitsverlauf negativ beeinflussen – in diesem Zusammenhang sind Manifestationen an der Haut (Aphten, Erythema nodosum, Pyoderma granulatum), den Augen (Iritis, Uveitis, Episkleritis), der Gelenke (Arthritis, ankylosierende Spondylitis) sowie der Leber (primär sklerosierende Cholangitis) zu nennen. Die Colitis ulcerosa ist mit einem erhöhten Risiko (10% nach 20 Jahren) für kolorektale Karzinome assoziiert, so dass regelmäßige koloskopische Kontrollen obligat sind.

Therapeutisch stehen im akuten Schub 5-Aminosalicylate (5-ASA) sowie Kortikosteroide in systemischer oder topischer Anwendung (Einläufe, Klysmen und Suppositorien bei distalem Befall) zur Verfügung. Auch Antibiotika können in schweren Fällen indiziert sein. Weitere Medikamente, die sogenannten Biologika (Antikörper gegen TNF $\alpha$ , z.B. Infliximab, Adalimumab, Certolizumab, sowie Antikörper gegen andere proentzündliche Komponenten des Immunsystems) befinden sich derzeit in der klinischen Evaluation. Zur Remissionserhaltung werden neben 5-ASA-Präparationen auch Probiotika (z.B. E coli NISSLE) sowie Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Methotrexat eingesetzt. Eine chirurgische Proktokolektomie (kontinenterhaltende ileoanale Pouchoperation) kann die Colitis ulcerosa durch die Entfernung des Zielgewebes zwar definitiv heilen, allerdings entwickelt ein Großteil der so operierten Patienten (bis zu 15% nach einem Jahr, bis zu 45% nach 10 Jahren) eine sogenannte Pouchitis, welche wiederum eine medikamentöse Therapie (intermittierende Antibiotikagabe, probiotische Therapie, z.B. VLSL#3-Probiotika-Mix) erfordert.

Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa, die auf das Kolon beschränkt ist, kann beim Morbus Crohn der gesamte Gastrointestinaltrakt diskontinuierlich befallen sein, von der Mundhöhle bis zum Rektum. Hauptlokalisation sind das terminale Ileum (30%) und das proximale Kolon (25%). Die Entzündung erstreckt sich – im Gegensatz zur Colitis ulcerosa - auf alle Wandschichten der Schleimhaut (transmurale Entzündung). Im endoskopischen Bild imponieren häufig eine ödematöse Schwellung der Schleimhaut mit fibrotischer Verdickung der Darmwand sowie Schleimhautulzerationen mit dem charakteristischen „Pflastersteinrelief“. Wichtig für die Diagnosestellung ist das histologische Bild, das u.a. Epitheloidzellgranulome mit mehrkernigen Riesenzellen als pathognomonische Veränderung zeigt. Darmstenosen, Abszess- und Fistelbildungen durch die transmurale Entzündung prägen den klinischen Verlauf der Erkrankung. Ob das Karzinomrisiko ebenfalls erhöht ist, ist derzeit noch unklar. Schwerpunkt der Therapie des Morbus Crohn ist die systemische



antientzündliche Therapie. Kortikosteroide kommen im akuten Schub zum Einsatz, überlappend mit einer Reduktion der Steroide werden Immunsuppressiva, insbesondere Azathioprin, gegeben. Die sogenannten Biologika stellen eine fest etablierte Therapieoption insbesondere bei Fistelleiden dar, meist in Kombination mit chirurgischen Maßnahmen. Diese sind im Gegensatz zur Colitis ulcerosa nur begrenzt wirksam und bleiben der Beseitigung von Komplikationen wie z.B. Fisteln und Stenosen vorbehalten.

## **1.2 Risikofaktoren für die Entstehung der CED: genetische Suszeptibilität**

Eine Beteiligung von genetischen Faktoren an der Entstehung der CED wird durch eine häufig beschriebene familiäre Häufung von Erkrankungen unterstützt (Russel, 2004). So haben erstgradig Verwandte von Patienten mit Morbus Crohn ein bis zu 22,5% erhöhtes Risiko für die Entstehung einer CED, bei der Colitis ulcerosa sind es 15,8%. Eine positive Familienanamnese ist bis heute der stärkste unabhängige Risikofaktor für die Entstehung einer CED.

Stärkste Evidenz für eine Beteiligung der Genetik an der Entstehung von CED ergeben sich aus den Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen (37,3 % beim Morbus Crohn, 10% bei der Colitis ulcerosa) (Tysk et al, 1988) (Thompson et al, 1996) (Orholm et al, 2000) (Gaya et al, 2006). Auffallend sind die deutlich höheren Werte für den Morbus Crohn, was auf eine stärkere genetische Komponente im Vergleich zur Colitis ulcerosa hinweist.

Die CED sind polygene Erkrankungen. In verschiedenen genomweiten Studien konnten bisher auf 12 Chromosomen Regionen mit erhöhter Suszeptibilität für CED beschrieben werden (zusammengefasst in Baumgart et al., 2007). Die zugrunde liegenden Gene (CARD15, MAGUK, OCTN 1 und 2,  $\alpha$ -Defensin, HLA), welche für Proteine oder Faktoren codieren, die für die Funktion der intestinalen Barriere wichtig sind, konnten teilweise identifiziert werden. Keines der genannten Gene lieferte jedoch für beide Verlaufsformen der CED konstante Ergebnisse. Bisher am besten dokumentiert und untersucht ist das CARD15 Gen, welches für 10-15% der Morbus Crohn-Erkrankungen verantwortlich gemacht werden kann (Hampe et al., 2001) (Hugot et al., 2001) (Ogura et al., 2001). CARD15 codiert für NOD2, ein Protein der sogenannten NACHT-Familie, einer von zwei großen Gruppen von Rezeptoren, die an der Erkennung und Prozessierung von mikrobiellen Antigenen und der Steuerung der

nachfolgenden Immunantwort des Wirtes beteiligt sind (neben den Toll-like-Rezeptoren, TLR). Hierzu liegen Untersuchungen an Mäusen vor (NOD2-Mausmodelle). Liegt eine gestörte Funktion im NOD2-Locus vor, kommt es zu einer veränderten Funktion der TLR-Signalkaskade und damit zu einer Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Monozyten und Makrophagen oder aber zu einer gestörten Aktivierung von NF $\kappa$ B und somit zu einer gestörten Produktion antimikrobieller Peptide ( $\alpha$ -Defensine) durch intestinale Epithelzellen (Inohara et al., 2003) (Wehkamp et al., 2004) (Abbott et al, 2004) (Watanabe et al, 2004) (Maeda et al., 2005) (Wehkamp et al, 2007).

### **1.3 Risikofaktoren für die Entstehung der CED: Umweltfaktoren**

Neben den geschilderten genetischen Faktoren scheinen auch Umweltfaktoren sowie mikrobielle Einflüsse (siehe unten) in der Pathogenese der CED eine große Rolle zu spielen. Für den Einfluss von Umweltfaktoren spricht eine von geographischen und temporären Faktoren abhängige Prävalenz und Inzidenz der CED (Loftus, 2004). So findet sich die höchste Prävalenz in den Industrienationen in Nordamerika und Nordeuropa, die niedrigsten Prävalenzen weisen die Entwicklungsländer in Afrika und Asien auf (Loftus, 2004). Für die so genannten Schwellenländer, die sich auf dem Wege zu modernen Industrienationen befinden, konnte eine drastische Inzidenzsteigerung für die CED dokumentiert werden, wie es derzeit in z.B. in China und Hongkong der Fall ist (Zheng et al, 2005). Für den Einfluss von Umweltfaktoren bei der Pathogenese der CED spricht auch die niedrigere Frequenz der CED in ländlichen gegenüber urbanen Regionen. Diese Entwicklungen legen nahe, dass sich die CED im Rahmen einer zunehmenden Zivilisierung und Industrialisierung der Gesellschaft entwickelt haben und dass Faktoren wie Hygiene, Qualität der medizinischen Versorgung (einschließlich Impfungen oder dem weit verbreiteten Einsatz von Antibiotika) sowie Ernährungsfaktoren eine zentrale Rolle spielen. Besonders im Bezug auf Ernährungsfaktoren sind genaue Studien rar und zeigen uneinheitliche Ergebnisse, so dass kaum verlässliche Angaben zu machen sind.

Einige Studien befassen sich mit dem Zusammenhang von „Stillen“ und der Entstehung von CED. So konnte gezeigt werden, dass Stillen protektiv im Hinblick auf die Entwicklung einer CED zu sein scheint (Schack-Nielsen & Michaelsen, 2006). Für den Morbus Crohn lag die odds ratio bei 0.45 (95% Konfidenzintervall 0.26-0.79)

und für die Colitis ulcerosa bei 0.46 (0.38-0.81) (Klement et al, 2004). Die steigende Inzidenz der CED in den Entwicklungsländern scheint die sozioökonomischen und hygienischen Änderungen zu reflektieren, welche den steigenden Lebensstandard begleiten (Desai & Gupta, 2005) (Kinra et al, 2006). Beispielsweise ist ein geringeres Risiko für die CED, insbesondere Morbus Crohn, mit der Anzahl der Kinder in einem Haushalt assoziiert, dem Fehlen von fließendem und heißem Wasser als einfachem Hygienestandard, der Größe und dem Einkommen der Familie oder dem Verzehr mikrobiell kontaminierter Lebensmittel (sog. „Hygiene-Hypothese“) (Hampe et al, 2003) (Gent et al, 1994) (McCormick & Manning, 2001). Einen weiteren unabhängigen Risikofaktor stellt das Rauchen dar. Während bei der Colitis ulcerosa das Rauchen mit einer geringeren Anzahl akuter Schübe assoziiert ist, führt es beim Morbus Crohn im Gegenteil zu einer deutlich erhöhten Krankheitsaktivität mit vermehrten Komplikationen (Fisteln und Strikturen). Versuche einer therapeutischen Nutzung dieses Umstandes, z.B. durch Applikation von Nikotinplastern, blieben bisher erfolglos (Cosnes, 2004) (McGrath et al, 2004) (Ingram et al, 2005). Die genauen Wirkmechanismen des Rauchens bei CED sind bisher nur unvollständig verstanden. Ähnliches gilt für die Appendektomie. Bei der Colitis ulcerosa zeigte sich in epidemiologischen Studien ein protektiver Effekt einer Appendektomie, während sie beim Morbus Crohn zu einer Verschlechterung der Situation führt (Koutroubakis et al, 2002) (Radford-Smith et al, 2002) (Cosnes et al, 2006) (Andersson et al, 2003). Ein Zusammenhang mit hygienischen Bedingungen und mikrobiellen Faktoren mag hier vorliegen – genaue Konzepte zur zugrunde liegenden Pathophysiologie fehlen ebenfalls. Als weitere Risikofaktoren wurden unter anderem eine orale Kontrazeption, Impfungen, Virusinfektionen (z.B. Masern) und spezifische Infektionen (Infektion durch *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, Erreger der Johne's Krankheit bei Rindern) angeführt, ohne dass bisher eine sichere Assoziation gezeigt werden konnte. Erwähnenswert ist außerdem, dass nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) einen akuten Schub beider Verlaufsformen der CED auslösen können.

#### **1.4 Pathogenese der CED: Definition der intestinalen Barriere**

Viele Zusammenhänge in der Entstehung der CED sind bis heute nicht vollständig verstanden. Es kann jedoch als gesichert angesehen werden, dass ein gestörtes

Zusammenspiel von genetischen, immunologischen, mikrobiellen und Umweltfaktoren zu einer überschießenden Reaktion des wirtseigenen Immunsystems gegenüber kommensalen Bakterien und luminalen Antigenen führt. Die intestinale Mukosa spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Ihre natürliche Aufgabe besteht in der Selektion und Abwehr von Pathogenen und Antigenen („Barrierefunktion“). Dieses wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Komponenten gewährleistet. Am weitesten luminal befindet sich eine Schicht aus Mikroorganismen („Darmflora“), welche als wichtiger Bestandteil der intestinalen Barriere insbesondere der Abwehr von Pathogenen dient (sog. „first line of defence“). Die Pilzflora soll im Verlauf dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Die Mikroorganismen befinden sich auf und teils in der das Epithel bedeckenden Mukusschicht. Zusammen mit dem Epithel bildet die Mukusschicht den mechanischen Teil der intestinalen Barriere. Durch spezielle Zell-Zell-Verbindungen, sog. tight junctions sind die einzelnen Epithelzellen fest miteinander verbunden. Hierdurch und durch hochspezifische Kanalsysteme stellt das Darmepithel den zellulären und parazellulären Flux durch die intestinale Barriere sicher. Für Störungen der Barrierefunktion werden Veränderungen der Mukusproduktion (Buisine et al., 2001) (Smithson et al, 1997) und der Proteinzusammensetzung der tight junctions (Zeissig et al, 2007) verantwortlich gemacht. Desweiteren befinden sich an der Epitheloberfläche sekretorische IgA-Moleküle und eine Glykokalix, welche entscheidend an der Prägung und Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora beteiligt ist. Spezielle ins Epithel integrierte Zellen, sog. Paneth-Zellen, tragen durch die Produktion antimikrobieller Proteine zur Aufrechterhaltung der Barriere und der Immunabwehr bei (Elphick & Mahida, 2005). Zu nennen sind hierbei die Defensine ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine), welche ein breites antimikrobielles Spektrum sowohl im grampositiven als auch im gramnegativen Bereich besitzen und zu einer Lyse der Bakterienwand führen (Selsted & Ouellette, 2005) (Brogden, 2005). Ein Mangel an Defensinen wird als eine Ursache für einen Verlust der normalen Barrierefunktion bei den CED diskutiert (Wehkamp et al, 2007) (Nuding et al, 2007). Hauptkomponente einer intakten intestinalen Barriere ist das darmassoziierte lymphatische Gewebe (DALM). Es macht ca. 70% aller immunologisch kompetenten Zellen des menschlichen Körpers aus und besteht T- und B-Zellen, Granulozyten, Mastzellen, NK (natural killer)-Zellen, Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Hauptaufgabe ist die Immunregulation und die Antigenerkennung, hierbei insbesondere die Unterscheidung zwischen

kommensalen und pathogenen Mikroorganismen. Das DALT befindet sich dabei in einem Status der sog. „physiologischen Inflammation“ – eine unterschwellige proinflammatorische Komponente besteht also auch beim Gesunden. Den Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen kommt bei der Kontrolle der Immunantwort gegenüber kommensalen und pathogenen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle zu. Über intrazelluläre Signalkaskaden (TLR- und NOD-System) und Ausschüttung antiinflammatorischer Mediatoren (TGF $\beta$  und Interleukin 10) nach Antigen-Erkennung werden beim Gesunden eine Differenzierung von naiven T-Zellen in regulatorische CD4+ T-Zellen induziert, die eine Immunantwort unterdrücken und ein Antigen als „eigen“ tolerieren (Iwasaki & Medzhitov, 2004) (Banchereau & Steinman, 1998) (Steinman et al, 2003). Beim CED-Patienten ist die Immunantwort in Richtung einer proinflammatorischen Reaktion verschoben. Diese Veränderungen sind komplex und werden im Folgenden nur kurz dargestellt:

1. Die Expression von TLR- und NOD-Rezeptoren im Bereich der intestinalen Barriere ist bei CED herabreguliert, was zu einer eingeschränkten Clearance von invasiven Erregern führt (Rosenstiel et al., 2003) (Berrebi et al., 2003) (Cario & Podolsky, 2000) (Akhtar et al, 2003) (Rhee et al, 2005).
2. Die Antigenerkennung und -Präsentation durch dendritische Zellen ist gestört und löst eine proinflammatorische Reaktion aus. Beteiligt sind auch hier Rezeptoren, u.a. der TLR-Familie (Franchimont et al., 2004) (Hart et al., 2005) (Malmström et al., 2001) (Leithäuser et al, 2001) (Krajina et al, 2003) (Ashcroft et al., 2003).
3. Epithelzellen ändern ihren Phänotyp und gelangen in einen aktivierten Status mit nachfolgender Aktivierung einer entzündlichen T-Zell-Antwort (Cruickshank et al, 2004) (van de Wal et al, 2003) (Nakazawa et al, 2004) (Srikrishna et al, 2005) (Hokama et al., 2004).
4. Die natürliche Clearance von hyper- und autoreagiblen Zellen ist eingeschränkt (Ina et al., 1999) (Van den Brande et al, 2003) .
5. Die Balance unter den T-Zell-Populationen, insbesondere T-Helfer und T-Effektorzellen ist verschoben (Martin et al., 2004) (Neurath et al, 2002) (Langrish et al, 2005) (Fuss et al, 2004) (Fuss et al, 2006).

6. Neuroimmunologische Stressfaktoren erhöhen die intestinale Permeabilität (Mangan et al., 2006) (Veldhoen et al., 2006) (Wang et al., 2003) (Neunlist et al., 2003) (Demaude et al., 2006) (Furlan et al., 2006).

### **1.5 Bedeutung der intestinalen Mikroflora an der Entstehung der CED**

Es ist weithin akzeptiert, dass der Schlüsseldefekt der CED in einer erhöhten Permeabilität der intestinalen Barriere für luminale Antigene besteht (sog. „leaky barrier“). Die Permeabilität ist, unabhängig vom Grad der Entzündung und der klinischen Aktivität, sowohl bei MC als auch bei CU erhöht. Die intestinale Mikroflora hat sich hierbei als kritischer Faktor erwiesen. Sie besteht aus ca. 400-500 verschiedenen Bakterienspezies, von denen ca. 50% bisher überhaupt beschrieben sind (Eckburg et al., 2005) sowie einer bisher wenig untersuchten Pilzflora. Die Zusammensetzung der Mikroflora ist individuell und entwickelt sich meist innerhalb der ersten 3 Lebensjahre unter dem Einfluss von maternalen, genetischen- und Umweltfaktoren (insbesondere Ernährung) (Hooper & Gordon, 2001). Die Darmflora trägt entscheidend zur Ausbildung und Reifung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes und zur Barrierefunktion bei. So sind die Mikroorganismen entscheidend für

1. die Modulation der Genexpression in Epithel- und Immunzellen, einschließlich Digestion und Absorption von Nahrungsbestandteilen
2. Regulation von immunologischen Prozessen (Entwicklung von Toleranz, physiologische Entzündung)
3. in der Abwehr von Pathogenen (z.B. durch Konkurrenz um epitheliale Rezeptoren)
4. den Metabolismus (u.a. Produktion von „short chain fatty acids“, Bildung von Vitaminen)
5. die Angiogenese
6. die Reifung des Immunsystems in den ersten Lebensjahren (Hooper & Gordon, 2001).

Zahlreiche klinische und experimentelle (insbesondere tierexperimentelle) Daten weisen auf eine Beteiligung der intestinalen mikrobiellen Flora an der Entstehung der CED hin.

**Tabelle 1** (S. 11) fasst einige der wichtigsten Evidenzen zusammen.

Die Mikroorganismen des Darmes lassen sich grundsätzlich zwei unterschiedlichen Kompartimenten zuordnen: dem Lumen und der Mukosa. Luminale (fäkale) Flora und die mukosaadhärente Flora unterscheiden sich signifikant in ihrer Zusammensetzung (Zoetendal et al, 2002) (Lepage, 2005). Während die Mikroflora im Lumen (Stuhlflora) als sogenannte transiente Flora einer starken Beeinflussung durch Nahrung und Umweltfaktoren unterworfen ist, repräsentiert die mukosale Flora die residente/ adhärente Flora, welche folglich auch in direkten Kontakt mit der intestinalen Barriere steht (Zoetendal et al, 2002). Bemerkenswert ist eine ausgeprägte Stabilität dieser mukosalen Flora – ihre individuelle Zusammensetzung der Mikroorganismen bleibt über Jahre stabil (Seksik et al, 2003). Sie ist des Weiteren in der Lage, ihre ursprüngliche Zusammensetzung auch nach schwerer Beeinträchtigung (z.B. im Rahmen einer infektiösen Diarrhoe) wiederherzustellen, wie dies nach artifizierlicher Schädigung durch Antibiotika experimentell nachgewiesen werden konnte (De La Cochetière et al, 2005).

Zusammenfassend scheint folglich die qualitative und quantitative Zusammensetzung (Biodiversität) der intestinalen Mikroflora für die Integrität der intestinalen Barriere verantwortlich zu sein. Veränderungen dieser Diversität als Ursache der gestörten Permeabilität der intestinalen Barriere werden in jüngster Zeit intensiv als Hypothese für die Entstehung der chronisch- entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert (Tamboli et al, 2004).

**Tabelle 1: Evidenz für die Beteiligung mikrobieller Faktoren an den CED**

Evidenz	Literatur
Läsionen treten bei MC in Regionen mit höchster Bakterienzahlen auf	Sartor RB, 1997
Läsionen können durch Instillation von fäkalem Material in nicht entzündliche Darmabschnitte erzeugt werden	D'Haens GR, 1998 Harper PH, 1985 Sartor RB, 1998
Umleitung des Stuhlflusses führt bei MC zur Abheilung, Rückführung zum Wiederaufflammen der Entzündung	Shanahan F, 2000 Rutgeerts P, 1991
Bei UC-Patienten mit Pouch-Chirurgie kommt es erst nach bakterieller Wiederbesiedelung des Pouches zur Entzündung	Sandborn WJ, 1995
Veränderung der intestinalen Flora durch Anti- oder Probiotika führt zu positivem Effekten bei CED	Shanahan F, 2000 Peppercorn MA, 1997
Vorliegen einer verstärkten Immunreaktion gegen Darmbakterien bei MC-Patienten als ein Hinweis auf eine gestörte Immuntoleranz	Duchmann R, 1995
Das Vorhandensein einer Darmflora ist in Tiermodellen Voraussetzung für die Entwicklung einer Entzündung	Elson CO, 1995 Rath et al, 1996 Ehrhardt RO, 1997 Sellon RK, 1998
Im Tiermodell ist MC über T-Zellen, die gegen Darmbakterien reagieren, auf andere Tiere übertragbar	Cong Y, 1998
Bakterielle Flora besitzt Einfluss auf Reifung, Struktur, Funktion und Erhalt des mukosaeigenen Immunsystems	Gordon JI, 1997 Berg RD, 1996



## 1.6 Pilzflora des menschlichen Verdauungstraktes

Das Reich der Pilze (Synonyme: Fungi, Eumycota) bilden eine unabhängige Gruppe innerhalb der Domäne der Eukaryonten. Über 70.000 Arten sind bisher beschrieben worden, obwohl Schätzungen mittlerweile von 1.5 Millionen verschiedener Arten ausgehen (Hawksworth, 1991). Pilze kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Am Menschen können Pilze häufig als Kommensalen auf den meisten Schleimhäuten und Körperoberflächen nachgewiesen werden. Im Verdauungstrakt kommen Pilze als Vertreter der Darmflora regelmäßig vor und bilden reichhaltige Lebensgemeinschaften (Bernhardt, 1996) (Bernhardt, 1998). Ihre Anzahl steigt von  $0-10^2$  colony forming units/ml (CFU/ml) bzw. g in der Mundhöhle bis auf  $10^4$  CFU/ml im Ileum und Colon bei Stuhlkonzentrationen bis zu  $10^6$  CFU/ml bzw. g (Bernhardt, 1996) (Simon & Gorbach, 1984). Die am häufigsten nachgewiesene Art ist *Candida spp.*, welche zur Normalflora, also zur residenten Flora gehört (Bernhardt, 1996). Bei 23% bis 76% der gesunden Bevölkerung konnten *Candida spp.* im Intestinaltrakt nachgewiesen werden (Knoke, 1999). In einer Studie mit 228 gesunden Probanden konnte in 51,8% Pilze in Stuhlproben nachgewiesen werden (Khatib et al, 2001). Das Risiko einer Pilzbesiedelung stieg mit dem Alter der Patienten an. Bei der größten Anzahl der Probanden (88,1%) konnte jeweils nur eine Pilzspezies isoliert werden. Es wurden in 62,7% *Candida albicans*, in 22% nicht-*albicans Candida* Spezies, in 20,3% Hefen (außer *Candida spp.*) und in 8,5% Schimmelpilze nachgewiesen. Wenige weitere Eumycota-Arten konnten bis heute im Gastrointestinaltrakt des Menschen nachgewiesen werden, darunter *Rhodotorula spp.* und *Saccharomyces spp.* (Buslau et al, 1990).

Trotz ihres häufigen Vorkommens ist die Bedeutung einer Besiedelung des Darmes mit Pilzen nach wie vor umstritten. Obwohl sie Bestandteil der Normalflora sind, können einige Spezies unter besonderen Bedingungen Infektionen hervorrufen (Barclay et al, 1992) (Mavromanolakis et al, 2001) (Diebel et al, 1999). Es ist bekannt, dass die Anwendung von Antibiotika zu einer Überwucherung des Darmes mit *Candida spp.* führen kann, insbesondere nach Zerstörung der normalen anaeroben bakteriellen Flora (Mavromanolakis et al, 2001) (Krause et al, 2001). Infektiöse, wässrige Diarrhoen können die Folge sein. Bei immunsupprimierten Patienten wird die Anwesenheit von *Candida spp.* als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Pilzsepsis angesehen (Müller, 1993) (Merz et al, 1986) (Krcmery et al, 1999).

Weiterhin gibt es experimentelle Hinweise dafür, dass eine Besiedelung des Darms mit *Candida albicans* eine Schädigung der Mukosabarriere gegen gramnegative Bakterien mit dem Risiko einer bakteriellen Translokation bewirkt (Diebel et al, 1999). Andererseits können Pilze auch die Abwehr der Mukosa stärken, wie die Anwendung von *Saccharomyces boulardii* als Probiotikum in der Therapie der CED beweist (Shanahan, 2001) (Sullivan & Nord, 2002).

Die Rolle, welche die Pilzflora in der Pathogenese der CED spielt, ist noch nicht systematisch erforscht. Einzelne Publikationen legen eine Beteiligung der Pilzflora an der Entstehung von CED nahe, die Schlussfolgerungen sind jedoch uneinheitlich. Mit dem Nachweis von Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) beim Morbus Crohn wurde die Diskussion über die Bedeutung der Pilzflora neu entfacht (Main et al, 1988) (Quinton et al, 1998) (Ruemmele et al, 1998) (Rutgeerts & Vermeire, 1998) (Sendid et al, 1998) (Sutton et al, 2000) (Annese et al, 2001) (Walker et al, 2004) (Konrad et al, 2004). Der genaue Ursprung dieser Antikörper sowie das Epitop, gegen welches sie gerichtet sind, ist jedoch weiterhin unklar. Eine weitere Charakterisierung der Pilzflora sowie die Erforschung ihrer Rolle in der Entstehung von CED erscheinen daher notwendig.

## **1.7 Biodiversität: Molekulare Mikrobiologie und 18S- rDNA**

Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen waren bisher die Domäne der klassischen Mikrobiologie. Vorhandene Studien über die Zusammensetzung der Pilzflora im Darm basieren daher meist auf Methoden der In-Vitro-Kultivierung von Pilzen aus Stuhlproben (Khatib et al, 2001) (Buslau et al, 1990). Nachteil ist die geringe Sensitivität dieser Methodik. Für bakterielle Habitate konnte gezeigt werden, dass abhängig von den äußeren Bedingungen, z.B. Kulturmedium und Temperatur, eine Selektion bestimmter Spezies erfolgte. Leicht kultivierbare Arten hemmen andere in ihrem Wachstum. Folge ist eine stark verzerrte Darstellung der vorhandenen Biodiversität. Abhängig von der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft können auf diese Weise nur max. 10% der Keime erfasst werden (Langendijk et al, 1995) (Wilson & Blitchington, 1996).

Seit den späten 70er Jahren wurde deshalb an kulturunabhängigen Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen gearbeitet (Hugenholtz et

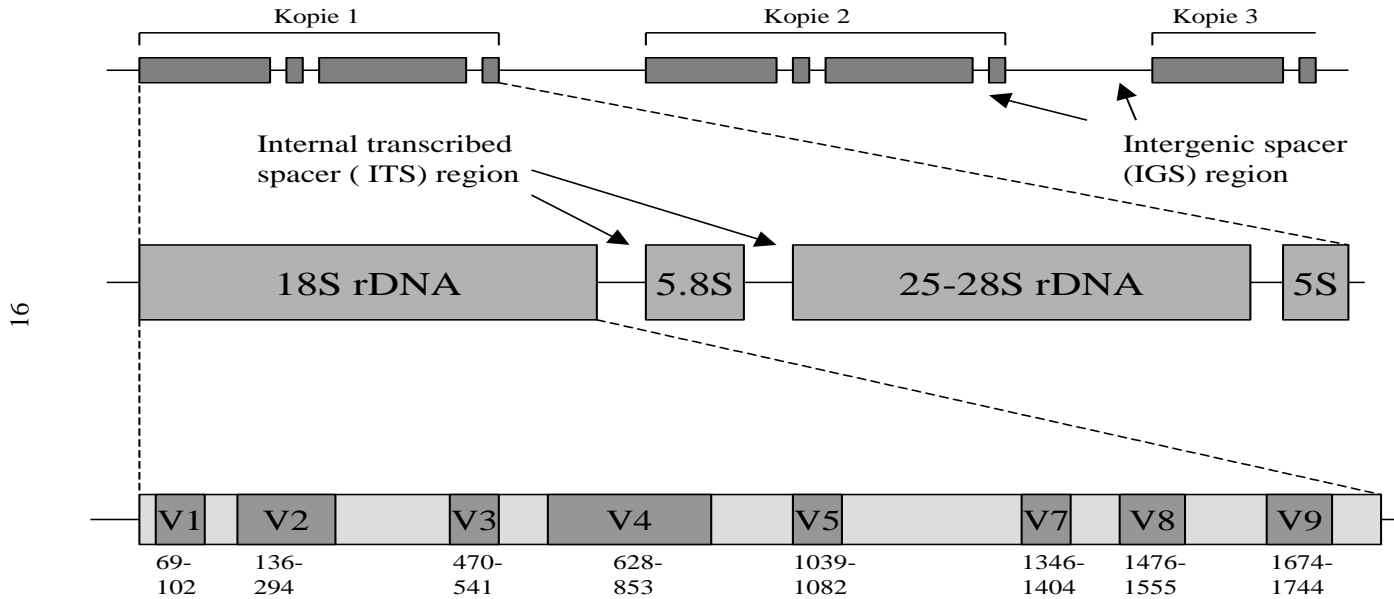
al, 1998) (Amann et al, 1995). Hierbei wurde die vergleichende Analyse von Gensequenzen zur Identifizierung der Mikroorganismen herangezogen. Bewährt hat sich als Zielsequenz das „small subunit ribosomal-DNA-Gen“.

Unter ribosomaler DNA versteht man die DNA, welche für die rRNA kodiert, aus der wiederum die Ribosomen aufgebaut werden. Nukleäre rDNA besteht aus bis zu 5000 hintereinander angeordneten Kopien (Repeats), je Kopie ca. 8-12 kb lang. Jede Kopie besteht aus Genen codierend für die „Small subunit rDNA“ (SSU rDNA, 16S/ 18S rDNA), die 5.8S rDNA und die „Large subunit rDNA“ (LSU rDNA, 25-28S rDNA). Bei allen Eukaryonten, also auch bei den Pilzen, liegt die SSU rDNA immer als 18S rDNA vor, während sie in Prokaryonten als 16S rDNA vorkommt (Amann et al, 1995) (Woese, 1987) (Göbel, 1995). Einige Ascomycetes und Basidiomycetes (Unterstämme der Eumycota) besitzen zusätzlich eine 5S rDNA. Die 5.8S rDNA ist eingebettet in die „internal transcribed spacer regions“ (ITS), während sich die variable 5S rDNA zwischen den „intergenic spacer regions“ (IGS) befindet. Die im Folgenden als Zielsequenz genutzte 18S rDNA besteht aus hochkonservierter DNA, in welche variable Regionen, die phylogenetisch stärker variieren, eingelagert sind. Im Gegensatz zu der 16S rDNA der Prokaryonten fehlt bei Eukaryonten die variable Region V6. Besonders hervorzuheben ist die variable Region 4 (V4), welche in der Literatur als die variabelste beschrieben wird (Nickrent & Sargent, 1991) und somit eine Differenzierung phylogenetisch enger verwandter Spezies unterstützt. Für einen Überblick über den Aufbau der nukleären ribosomalen DNA siehe auch **Abb. 1** (S.16).

Erste Versuche mit ribosomalen DNA-Sequenzen wurden bereits in den 70er Jahre von Carl Woese und Mitarbeitern durchgeführt (Woese & Fox, 1977). Durch Einführung der Polymerasekettenreaktion war es relativ leicht möglich, die gewünschten DNA-Sequenzen zu amplifizieren und zu sequenzieren. Auf der Basis der 16S- und 18S-rDNA-Sequenzen entstand so eine neue, molekulare Taxonomie, welche einen Abgleich von Sequenzen in entsprechenden Datenbanken möglich macht (Pace, 1997). Zur Untersuchung der Biodiversität von Pilzen in komplexen Lebensgemeinschaften hat sich somit in jüngster Zeit die 18S rDNA als häufig genutzte molekulare Zielstruktur erwiesen (Bock et al, 1994) (Smit et al, 1999) (Makimura et al, 1994) (Kappe et al, 1998) (Kappe et al, 1996) (Gomes et al, 2003) (Muyzer & Smalla, 1998). Aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, der hochkonservierten Grundstruktur und dem Vorhandensein von Domänen

unterschiedlicher Variabilität stellt die ribosomale DNA einen idealen Marker für taxonomische Untersuchungen dar (Amann et al, 1995) (Woese, 1987) (Göbel, 1995). Verschiedene molekulare Techniken wurden bei der Untersuchung der intestinalen Mikroflora bisher erfolgreich angewandt. Etabliert haben sich bisher neben dem sogenannten „Community fingerprinting“ (verschiedene molekulare Fingerprint-Techniken, wie DGGE, TGGE und SSCP) die realtime PCR und die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) (Schwieger & Tebbe, 1998) (Doré et al, 1998) (Tebbe et al, 2001) (Kleessen et al , 2002) (Zoetendal et al, 2002) (Swidsinski et al, 2002) (Valinsky et al 2002). Klonbibliotheken stellen eine weitere wichtige Methode zur Untersuchung von komplexen Habitaten dar (Eckburg, et al., 2005). Diese sind jedoch sehr aufwendig und eignen sich im Gegensatz zu den obig genannten Techniken nicht zur Exploration größerer Probensätze.

Abb. 1 Aufbau der nukleären ribosomalen DNA



Dunkelgrau (V1-V9) : Variable Regionen  
 Hellgrau : konservierte Regionen

## 2. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bisher kaum berücksichtigte Pilzflora des Darmes näher zu charakterisieren. Hierfür wurden molekulare Techniken basierend auf der 18S-rDNA verwendet, um die Flora des Darmes kulturunabhängig analysieren zu können. Insbesondere geht es um folgende Fragestellungen:

- 1) Wie groß ist der relative Anteil der Pilz-rDNA im Vergleich zur Gesamtmenge der rDNA (Bakterien und Pilze)? Gibt es individuelle Unterschiede? Unterscheidet sich der relative Anteil zwischen transienter Flora (Stuhlflora) und residierender (mukosa-adhärenter) Flora? Hierzu wurde ein quantitativer PCR-Ansatz gewählt.
- 2) Welche Diversität der mukosa-adhärenten Pilzflora lässt sich für Patienten mit MC, CU und Normalkontrollen (mit/ohne Entzündung) nachweisen? Gibt es Unterschiede in der Diversität zwischen den Gruppen? Können krankheitsauslösende Pilzspezies ermittelt werden? Gibt es Unterschiede zwischen der Stuhlflora und der mukosa-adhärenten Flora? Hierzu wurden Klonbibliotheken angefertigt.
- 3) Liegt eine veränderte Biodiversität der Pilzflora bei MC, CU und den Normalkontrollen vor? Gibt es krankheitsspezifische Erregermuster bei den CED? Liegen individuelle Unterschiede der Erregermuster innerhalb und zwischen den untersuchten Gruppen vor? Hierzu erfolgte „Community fingerprinting“ mittels DGGE.
- 4) Können die molekulargenetisch ermittelten Ergebnisse mikroskopisch bestätigt werden? Hierzu erfolgten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen sowie klassische in-situ-Hybridisierung.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Kulturmedien, Chemikalien, Verbrauchsmittel

- **Kulturmedien**
  - Glycerin-Medium
  - Luria-Bertani-Medium
  - SOC Medium (Invitrogen)

- **Chemikalien:**

In alphabetischer Reihenfolge: Acrylamid (Sigma, Aldrich, Deutschland), Agar Noble (Beckton-Dickensen, Heidelberg, Deutschland), Agarose (Eurogentec, Köln, Deutschland; Biozym, Oldendorf, Deutschland), Ampicillin (Sigma, s.o.), APS (Sigma, s.o.), Avidin Peroxidase-Conjugat (Sigma, s.o.), Biotin (Thermo-Electron, Ulm, Deutschland), Bis-Acrylamid (Sigma, s.o.), Bromphenolblau (Sigma, s.o.), Dextran Sulfat (Sigma, s.o.), Diaminobenzidine substrate solution (Vector laboratories, CA, USA), Dimethylformamid (Sigma, s.o.), dNTP-Set (Promega, Mannheim, Deutschland), EDTA (Sigma, s.o.), Essigsäure 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ethanol (Merck, s.o.), Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Formaldehyd (Sigma, s.o.), Formamid (Sigma, s.o.), H<sub>2</sub>O (Sigma, s.o.), Harnstoff (Sigma, s.o.), Hefeextrakt (Beckton-Dickensen, s.o.), Isopropanol (Merck, s.o.), Kaliumchlorid (Merck, s.o.), Magnesiumchlorid (Merck, s.o.), Mounting Medium (Merck, s.o.), Natriumchlorid (Merck, s.o.), Natriumhydroxid 10 M (Merck, s.o.), Silbernitrat (VWR, Darmstadt, Deutschland), TEMED (Merck, s.o.), Tris-HCl (Merck, s.o.), Trypton (Beckton-Dickensen, s.o.), X-Gal (Sigma, s.o.), Xylencyanol (Sigma, s.o.)

- **Verbrauchsmittel**

Merck	Darmstadt	Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Sigma	Heidelberg	Deutschland

### 3.2 Enzyme, Primer und Sonden, Zellen und Vektoren

- **Enzyme**
  - Exonuclease 1 (GE Healthcare, früher Amersham Bioscience, Chalfont St.Giles, United Kingdom)
  - E.Z.N.A. OB-Protease (PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - Shrimps alkalische Phosphatase (GE Healthcare, s.o.)
  - Taq DNA Polymerase, 5U/μl (Qiagen, Hilden, Deutschland)
  - T4 DNA Ligase, 4U/μl (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

- **Primer und Sonden**

siehe Anhang **Tab. 2**

- **Zellen**

**Tab.3**      **Verwendete Zellen für Klonierung**

Name	Firma	Eigenschaften
TOP10 E.coli	Invitrogen	F-mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

- **Vektoren**
  - pCR@2.1 Vector, 25 ng/μl (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)



### 3.3 Kits, Gerätschaften und Datenbanken/ Software

- **Kits**
  - Fast DNA Spin Kit for Soil (Bio101, Vista, USA)
  - Min Elute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
  - Min Elute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
  - Picogreen dsDNA Quantification Kit (Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland)
  - TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

- **Gerätschaften**

Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Vortex genie 2 (Scientific Industries, New York, USA), Centrifuge 5415 R (Eppendorf, s.o.), Wärme/Umlufttrockenschrank 6000 (Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland), Hoefer™ SE 600/SE 660 (Amersham, s.o.), Shaker Type RS-PL 28-10 (Heto Lab equipment, Allerød, Dänemark), FastPrep™ FP (BIO101,s.o.), Flow BSB 6a (Gelaire, Sydney, Australien), Präzisionswaage Mettler PC440 (Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland), GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) , T-Gradient (Biometra, Göttingen, Deutschland), Wide Mini Sub Cell GT (Bio Rad, München, Deutschland), Gel Cam (Polaroid, Dreieich-Sprendlingen, Deutschland), High Performance Ultraviolet Transilluminator (Ultra Violet Products, Cambridge, UK), Gene Quant 2 RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, nun GE Healthcare, s.o.), ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, s.o.), Schüttelinkubator GFL 3033 (GFL, Burgwedel, Deutschland), Dampfsterilisator FVS 2 Technomora 4937E (Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland), Power Pac 300 (BioRad,s.o.), BioDoc Analyze (Montreal Biotech inc., Dorval, Kanada), Curix 60 (AGFA, Mortsel, Belgien), DGGE-Apparatur (BioRad, s.o.), Axioimager Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland), AxioCam (Carl Zeiss, s.o.).

### ➤ **Datenbanken/ Software**

- ARB software, ribosomal sequence database and handling  
<http://www.arb-home.de>
- NCBI BLAST homepage: <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Ribosomal Database Project II: <http://rdp.cme.msu.edu/>
- VecScreen-database:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>
- SPSS software package (version 10.0, Chicago, IL, USA)
- Sequencher software package (Gene Codes Corp., Ann Arbor, USA).
- Gel compare II Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgien)

### **3.4 Patienten**

31 Patienten mit aktivem Morbus Crohn (im folgenden MC), 26 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa (im folgenden CU) und 47 gesunde Probanden wurden untersucht. Die Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (im folgenden CED) wurde anhand etablierter Kriterien gestellt (Ott et al, 2004). Zur Bewertung der Krankheitsaktivität wurde für den MC der „Crohn’s disease activity index (CDAI)“ herangezogen, für CU der „clinical activity index (CAI)“. Der CDAI lag bei allen Patienten der MC-Gruppe bei >150, der CAI bei den CU-Patienten bei >4. Somit zeigten alle Patienten mit CED hohe Aktivität der Erkrankung. Die Probebiopsien wurden aus makroskopisch stark entzündlichen Regionen des Darmes entnommen. Histologisch wurden die Biopsien in Hinblick auf die Entzündungsaktivität von zwei unabhängigen Pathologen untersucht anhand der von Geboes et al. vorgeschlagenen Kriterien (Geboes et al, 2000). Die Kontrollgruppe bestand aus 22 Patienten mit keinerlei makroskopischen und histologischen Anzeichen einer CED, 6 Patienten mit Divertikulose und 4 Patienten mit Darmpolypen. Zum Ausschluss von Diarrhoen und chronisch unspezifischer Entzündung als alleiniger Ursache einer veränderten Biodiversität der Darmflora wurde eine zweite Kontrollgruppe etabliert. Diese setzte

sich zusammen aus 2 Patienten mit nicht näher spezifizierter Kolitis, 5 Patienten mit Diarrhoen unbekannter Ursache, 4 Patienten mit infektiöser Kolitis und einem Patienten mit Strahlenkolitis. Die Biopsien wurden in allen untersuchten Patientenkollektiven aus verschiedenen Regionen des Kolons entnommen. Eine antibiotische Therapie innerhalb der letzten 6 Monate vor Beginn der Untersuchung wurde ausgeschlossen. Die Studie wurde vom Prüfungsausschuss der Fakultät zugelassen. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis in die Untersuchungen. Zu den Charakteristika der Patienten siehe Anhang **Tabelle 4**.

### **3.5 Biopsien und DNA-Gewinnung**

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden in der endoskopischen Abteilung der 1. Medizinischen Klinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Rahmen einer Koloskopie entnommen. Zur Abschätzung der Aktivität sowie des Schweregrades der Entzündung wurde der koloskopische Befund sowie die anschließende histologische Untersuchung herangezogen. Alle Patienten wurden über Untersuchung und Biopsieentnahme aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Sofort nach der Entnahme wurden die Biopsien in flüssigem Stickstoff (-180°C) schockgefroren und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert, um ein unkontrolliertes Wachstum der vorhandenen Organismen zu verhindern.

#### **3.5.1 DNA Extraktion**

Die Extraktion der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus den Gewebeproben erfolgte mithilfe eines an die Eigenschaften der Mikroorganismen angepassten Protokolls (Ott et al, 2004). Zunächst wird jeweils eine gefrorene Biopsie vorsichtig unter sterilen Bedingungen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl E.Z.N.A. TL-Puffer (peqLab) und 25 µl E.Z.N.A. OB-Protease (PeqLab) erfolgt die Inkubation bei 55°C für 2 Stunden. Alle 20 Minuten wird der

Inhalt des Reaktionsgefäßes gründlich gemischt (Vortex genie 2®, Scientific Industries). Die DNA wird nun nach Protokoll (Fast DNA Spin Kit for Soil , BIO 101) an die spezielle Matrix gebunden und im Verlauf mit dest. Wasser eluiert. Die gewonnene DNA wird sofort zur weiteren Verwendung auf Eis überführt oder bei -20°C gelagert.

### **3.5.2 Nachweis der DNA**

Der Nachweis der extrahierten DNA erfolgt zunächst qualitativ durch Agarose-Gelelektrophorese mithilfe einer Wide Mini Sub Cell GT – Gelelektrophoresekammer (Bio Rad). Durch diese Methode lässt sich dsDNA nach ihrer Größe in Basenpaaren (bp) trennen und dieselbe durch das Mitlaufen eines DNA-Markers abschätzen. Für den Nachweis wird ein 1,5%iges Agarosegel verwendet (Laufparameter 110 V, 400 mA, 30 min). Durch den Zusatz von Ethidiumbromid, welches in die dsDNA interkaliert, wird diese unter UV-Licht sichtbar gemacht (High Performance Ultraviolet Transilluminator, Ultra Violet Products). Zur Dokumentation wird das Gel mit einer Kamera (Gel Cam, Polaroid) photographiert.

Der quantitative Nachweis der extrahierten DNA erfolgt mit Hilfe von PicoGreen™ (dsDNA Quantification Kit, Molecular Probes, Leiden, Netherlands).

### **3.5.4 Messung der dsDNA Konzentration**

Um sicherzustellen, dass in etwa äquimolare Mengen DNA auf das DGGE-Gel aufgetragen werden, werden von der eluierten DNA 2 µl entnommen, 1:100 mit 0.1×TE-Puffer verdünnt und zur Konzentrationsmessung verwendet. Die Messung der Konzentration der dsDNA erfolgt mit einem PicoGreen DNA Quantification Kit (s.o.), bestehend aus dem „PicoGreen dsDNA quantification reagent“ (Fluoreszenzfarbstoff) und einem DNA-Standard. Der Farbstoff wird 1:200 mit 0.1×TE-Puffer verdünnt. Für die Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, bestehend aus 5 Konzentrationen: 1000ng/ml, 500 ng/ml, 100ng/ml, 10 ng/ml und 1ng/ml. Die Proben

werden ebenfalls mit 0.1×TE-Puffer verdünnt, so dass die zu erwartende Konzentration im Bereich der von der Standardkurve erfassten Werte liegt (ca.1:100 bis 1:200). Die Konzentration der Probe wird photometrisch mit einem Fluoreszenzspektrometer (SpectraFluor plus, Tecan) bestimmt.

### 3.6 Quantitative PCR von Pilz-DNA und bakterieller DNA

Ein quantitativer PCR-Ansatz wurde gewählt zur näheren Abschätzung der relativen Mengen an bakterieller rDNA und Pilz-rDNA der mukosa-assoziierten Flora sowie der Stuhlflora. Es wurden jeweils die Stuhlproben sowie die Biopsien von 3 gesunden Probanden untersucht. Die gesamte bakterielle 16S rDNA wurde hierzu amplifiziert (Primer TPU/RTU8), entsprechend die 18S rDNA der Pilze (Primer NS1/FR1).

Der Reaktionsansatz bestand aus den Primern (jeweils in einer Konzentration von 0.2µM), je 0.2µM der dNTPs, 10xPCR-Puffer, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U DNA-Polymerase und 100ng der entsprechenden DNA.

Für die Bakterien-PCR wurden die folgenden Reaktionsbedingungen gewählt: initiale Denaturierung bei 95°C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 94°C für 30 s, 58°C für 45 s und 72°C für 2 min. Die Reaktionsbedingungen der Pilz –PCR bestanden aus 35 Zyklen mit 94°C für 30 s, 51°C für 45 s und 72°C für 3 min. Die Standardkurven zur Quantifizierung der bakteriellen DNA und der Pilz-DNA wurden mithilfe von Verdünnungsreihen bekannter DNA-Konzentrationen hergestellt. Als Referenz-DNA diente *Escherichia coli* für die Bakterien sowie *Candida albicans* für die Pilze (freundlicherweise überlassen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Zur Gelanalyse diente die BioDocAnalyse Bildverarbeitungssoftware.

### 3.7 Klonbibliotheken

Es wurden vier Klonbibliotheken hergestellt, jeweils eine für MC, CU, entzündliche (NC+) und nicht entzündliche (NC-) Normalkontrollen mit einer Gesamtanzahl von 318 Klonen. Hierfür wurden jeweils die 8 Proben mit der höchsten Biodiversität in der

DGGE ausgewählt (s. Anhang **Abb. 2**), getrennt bearbeitet und vor der Ligation wieder zusammengeführt, um eine möglichst große Vielfalt der Pilzflora im Darm charakterisieren zu können.

Zusätzlich wurden von zwei gesunden Probanden jeweils Klonbibliotheken aus Biopsieproben sowie aus Stuhlproben angefertigt.

### 3.7.1 Pre- PCR und nested PCR

Zunächst wird in einem ersten Schritt mit Hilfe des Primerpaares NS0/EF3 ein ca.1700 bp großes Fragment der 18S rDNA amplifiziert (Pre-PCR). Die PCR wird in einer 96well Platte (Costar) ausgeführt. Der Reaktionsmix enthält 5µl 10×PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub>), je 1µl der 0.2 µM Primer , 1µl des dNTP-Mixes (je 0.2 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.2µl Taq DNA Polymerase und 100 ng der extrahierten DNA, aufgefüllt mit A.dest. auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl. Gestartet wird die PCR mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min, gefolgt von 30 Zyklen mit je 15 s bei 94°C, 30 s bei 54°C und 3 min bei 72°C. Ein abschließender Syntheseschritt erfolgt für 4 min.

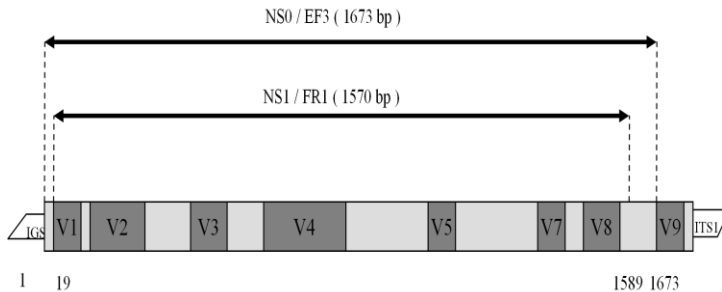
Das PCR-Produkt wird durch wieder durch Agarose-Gelelektrophorese (1.5%iges Agarosegel) nachgewiesen und die Größe des amplifizierten Produktes verifiziert.

Wird aus einer DNA-Probe mit "externen" Primern ein größerer Abschnitt amplifiziert und aus dem PCR-Produkt mit "internen" Primern eine kürzere Sequenz erneut synthetisiert, nennt man dies verschachtelte PCR (*nested* PCR). Durch diese Methode erhöht sich die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich, da die unspezifischen Produkte in der zweiten PCR für die inneren Primer nicht mehr genügend komplementäre Sequenzen bieten und somit als Matrize nicht mehr zur Verfügung stehen. Auf diese Weise wird bevorzugt die Zielsequenz amplifiziert. Für die vorliegende Arbeit wurde ein bereits etablierter nested-PCR Ansatz verwendet (van Elsas et al, 1999). Von dem gewonnenen PCR-Produkt wird mit dem Primerpaar NS1/FR1 die „nested-PCR“ angefertigt und ein ca. 1650 bp großes Fragment der 18S rDNA amplifiziert (s. **Abb. 3**, S. 26)

Der verwendete Reaktionsmix enthält 5µl 10×PCR-Puffer, 0,2 µM dNTPs, je 0.2µM eines jeden Primers, 0.2µl Taq DNA Polymerase und 5µl des PCR-Produktes.

Aufgefüllt wird wieder mit A.dest. zu einem Reaktionsansatz von 50 µl. Auf einen Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min folgen 25 Zyklen mit je 94°C für 30 sek, 48°C für 45 sek. und 72°C für 45 sek., gefolgt von einem abschließenden Syntheseschritt bei 72°C für 10 min.

**Abb. 3: Position der Primer NS0/EF3 und NS1/FR1 auf der 18S-rDNA**



Dunkelgrau (V1-V9) : variable Regionen  
 Hellgrau : konservierte Regionen  
 IGS : intergenetic spacer region  
 ITS1 : internal transcribed spacer region

### 3.7.2 Gelextraktion und Aufreinigung

Die nun folgenden Arbeitsschritte bis zur Transformation der Vektoren sollten zügig durchgeführt werden, da die durch die Taq-Polymerase erzeugten und für die Ligation erforderlichen 3'-Überhänge mit der Zeit verloren gehen. Daher empfiehlt es sich auch, die PCR sofort nach ihrer Fertigstellung aufzureinigen, um ein optimales Ergebnis der Klonierung zu erzielen.

Das 1600bp-Fragment wird nun für die folgende Ligation aufgereinigt. Durch die Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich evtl. vorhandene Nebenbanden und Primer-Rückstände entfernen und gleichzeitig die korrekte Größe

des PCR-Produktes nachweisen. Die Aufreinigung wird mit einem Min Elute Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Je 5µl der Proben werden nun zusammengeführt (jeweils getrennt nach MC, CU und NC) und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 3.7.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der aufgereinigten dsDNA wird mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie bestimmt. Hierfür wird ein Gene-Quant-2-RNA/DNA-Calculator (Pharmacia Biotech) verwendet. Es werden 5µl dsDNA und 95µl A.dest gemischt (1:20 Verdünnung) und die Absorption der Lösung bei 260nm gemessen. Da die Absorption dem DNA-Gehalt direkt proportional ist, lässt sich die Konzentration recht genau bestimmen. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA-Lösung wird der Quotient der Absorptionen von 260nm zu 280nm hinzugezogen. Für reine DNA-Lösungen liegt dieser Quotient bei 1.8. Geringerem Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

### 3.7.4 Ligation

Die Ligation und die Transformation werden mit Hilfe eines TA Cloning Kit (Invitrogen) durchgeführt. Die dsDNA und der verwendete Klonierungsvektor pCR®2.1 werden in einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 gemischt. Zur Berechnung der benötigten dsDNA Menge X wird folgende Formel herangezogen:

$$X[\text{ng}] = \frac{\text{Größe PCR - Produkt [bp]} * \text{Menge Vektor [ng]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} = 20.5\text{ng}$$

Die dsDNA wird nun auf eine Konzentration von 20.5 ng/µl verdünnt.

Der Ligationsansatz besteht aus 1µl dsDNA, 1µl 10×Ligationspuffer, 2µl pCR®2.1 Vektor und 1µl T4 DNA Ligase, aufgefüllt mit A.dest. zu einem Volumen von 10µl. Bei 14°C wird nun der Ligationsansatz über Nacht inkubiert. Der Ligationsansatz kann bei -20°C für den späteren Gebrauch gelagert werden.



### **3.7.5 Transformation**

Für die Transformation werden chemisch kompetente E.coli- Zellen (TOP10, Invitrogen) verwendet. Durch kurzzeitig rasche Temperaturerhöhung werden die Zellen zur Aufnahme der Vektoren angeregt – die Vektoren gelangen in die E.coli-Zellen und werden so bei der Zellteilung mit vermehrt. Der eigentliche Wirkungsmechanismus des „Hitzeschocks“ ist bisher ungeklärt. Im Anschluss werden die Zellen mit 250µl SOC-Medium versetzt und für 1h bei 37°C und 300rpm inkubiert.

### **3.7.6 Ausplattieren von Zellen**

Die Zellen werden nun auf Agar-Platten ausgestrichen. Um mindestens eine Platte mit disseminiert stehenden Kolonien zu erhalten, werden drei verschiedenen Volumina ausplattiert (50µl, 75µl und 100µl). Nun werden die Zellen über Nacht im Brutschrank (37°C) inkubiert. Die verbliebenen kompetenten Zellen werden bei -20°C gelagert.

### **3.7.7 Selektion der Klone**

Durch den Zusatz von Ampicillin zu den Agarplatten, können nur solche E.coli-Zellen zu Kolonien heranwachsen, welche bei der Transformation einen Vektor, codierend für die Ampicillinresistenz, aufgenommen haben. Der Nachweis des Inserts erfolgt durch Blau-Weiß-Selektion. Diese Methode macht sich das auf dem Vektor befindliche lacZ'-Gen zunutze. Dieses Gen codiert für einen Teil des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase, welches zusammen mit dem  $\alpha$ -Anteil aus dem E.coli-Chromosom dazu dient, Lactose in Galaktose und Glucose zu spalten. Anstelle von Lactose spaltet die  $\beta$ -Galaktosidase auch das Lactoseanalogon X-GAL, wodurch ein dunkelblaues Reaktionsprodukt entsteht. Die Schnittstelle für das Insert befindet sich mitten im LacZ'-Gen. Ist also ein Insert vorhanden, wird das Gen unterbrochen und nicht mehr

transkribiert und die E.coli-Zellen verlieren damit ihre Fähigkeit zur Lactosespaltung. Folglich wird auch X-Gal nicht mehr gespalten, die Kolonien erscheinen weißlich. Ist kein Insert vorhanden, ist das Gen aktiv und durch das X-GAL-Reaktionsprodukt erscheinen die Kolonien dunkelblau.

Eine 96well-Zellkulturplatte wird mit 1,2 ml LB-Medium (beinhaltet 100µg/ml Ampicillin) pro well gefüllt. Mit einem Zahnstocher werden die weißen Kolonien vorsichtig aufgenommen, der Zahnstocher mit der Kolonie in das Medium gestellt. Nach wiederholtem schütteln werden die Zahnstocher entfernt, die Zellkulturplatte wird abgedeckt und bei 37°C und 160 rpm über Nacht inkubiert.

### **3.7.8 Nachweis des Inserts**

Das Insert wird durch PCR nachgewiesen. Zunächst werden je 7µl Bakteriensuspension bei 95°C für 10 min inkubiert, dann auf 4°C abgekühlt und mit je 45µl Reaktionsansatz aufgefüllt. Der Reaktionsansatz beinhaltet 5µl 10×PCR-Puffer, 0,2 µM dNTPs, je 0,2µM der Primer M13(21)F und M13(24)R, 0,2µl Taq DNA Polymerase, aufgefüllt mit A.dest. auf 50µl. Auf einen Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min folgen 35 Zyklen mit je 95°C für 30 sek., 53°C für 1 min und 72°C für 3 min, gefolgt von einem abschließenden Syntheseschritt bei 72°C für 7 min. Die M13-Primer setzen kurz vor und kurz nach dem Insert auf dem LacZ'-Gen an und amplifizieren so ein dsDNA-Fragment, welches um einige bp größer ist als das Insert selbst. Die positiven Klone werden mittels Agarose-Gelelektrophorese des PCR-Produktes ermittelt (1.5%iges Agarosegel).

### **3.7.9 Glycerol- Kulturen**

Zur weiteren Aufbewahrung werden von den positiven Klonen Glycerol-Kulturen angefertigt. Hierzu werden in einer 96-well-Platte 150µl Glycerol-Medium und 150µl Bakteriensuspension gemischt. Durch den Zusatz von Glycerol zum LB-Medium können die transformierten E.coli -Zellen bei -80°C gelagert und ohne Schäden wieder aufgetaut werden.

### **3.7.10 Sequenzierung**

Die PCR-Produkte werden zunächst enzymatisch aufgereinigt. 8µl PCR-Produkt werden mit 0.3µl Shrimps alkalische Phosphatase (SAP), 0.15µl Exonuklease 1 und 1.55 A.dest. für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt bei 72°C für 15 min.

Die Sequenzierungsreaktion beinhaltet 1 µl Terminator Reaction Mix (Big Dye Version 2), 1µl des 1.6µM Primers, 6µl A.dest. sowie 2µl des aufgereinigten PCR-Produktes. Als Primer werden FR1, BF2 und TR1 verwendet. Die Denaturierung findet bei 96°C für 5 min statt, gefolgt von 25 Zyklen mit je 95°C für 1 min, 52°C für 45 sek. und 60°C für 4 min.

Die weitere Aufreinigung erfolgt mit Hilfe von Sephadex Puder (G50 Superfine) nach Protokoll statt. Die nun aufgereinigten Produkte werden auf einem ABI PRISM™3700 DNA Analyser sequenziert. Das Alignment und die Nachbearbeitung der Sequenzen erfolgt mit dem Sequencher Software Paket (Gene Codes Corp.). Zur Identifikation der einzelnen Klone werden die Sequenzen auf dem Server des NCBI geblastet (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ergebnisse mit über 97%iger Ähnlichkeit werden berücksichtigt.

### **3.8 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**

Mit Hilfe der Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) lassen sich DNA-Fragmente gleicher Länge aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten auftrennen (Fischer & Lerman, 1979). Mit zunehmender Konzentration des denaturierenden Agens werden die DNA-Doppelstränge in Abhängigkeit von ihrer Basensequenz aufgetrennt, wobei eine GC-reiche Klammer ein vollständiges dissoziieren in Einzelstränge verhindert. Beim Öffnen der Doppelstränge verringert sich jedoch die Laufgeschwindigkeit der DNA in der Gelmatrix bis sie schließlich gegen Null strebt. Aufgrund der unterschiedlichen Basenzusammensetzung der DNA-Fragmente wird die Laufgeschwindigkeit

unterschiedlich herabgesetzt – es entstehen auf diese Weise sequenzspezifische Bandenmuster.

Die DGGE-Analyse aller 104 Patienten wurde mit einem denaturierenden Gradienten von 18-38% durchgeführt (Gomes et al, 2003) (Heuer et al, 2001). Die Laufzeit des Gels beträgt 18 Stunden bei 180V und 58°C.

### **3.8.1 Pre-PCR und nested-PCR**

Die Pre-PCR wird wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der PCR-Produkte dient die Agarose-Gelelektrophorese (s.o.). Die nested-PCR erfolgt mit den Primer NS1 und FR1-GC unter folgenden Bedingungen: 95°C für 3 min, gefolgt von 25 Zyklen mit je 94°C für 30 sek., 48°C für 45 s und 72°C für 45 sek.. Der Primer FR1-GC fügt eine GC-reiche Sequenz am 5' Ende hinzu, um ein vollständiges Schmelzen der DNA-Doppelstränge zu verhindern. Die Produkte der PCR werden wie oben wieder durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Zur Bestimmung der Konzentration der PCR-Produkte wird PicoGreen™-Reagens (dsDNA Quantification Kit, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) verwendet. Die Proben werden dahingehend mit denaturiertem Wasser verdünnt, dass jeweils dieselbe Konzentration von 200 ng pro Bahn vorliegt. Vor dem Auftragen werden die Proben und der DGGE-Ladepuffer im Verhältnis von 1:1 gemischt.

### **3.8.2 Silberfärbung der DGGE-Gele**

Die Gele werden nach Beendigung des Laufes aus der Elektrophoresekammer entnommen und sofort gefärbt (s.u.). Die auf diese Weise konservierten Gele können für längere Zeit ohne Schäden an der DNA bei Raumtemperatur gelagert werden. Für eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte s. **Tab. 5** (S. 32).

Tab. 5: Färbeprozedur der DGGE-Gele

Arbeitsschritt	Lösung	Zusammensetzung	Dauer
1.	Fixier-Lösung	10% vergälltes Ethanol 0.5% Essigsäure	2 x 3 min
2.	Silberfärbung	0.2% Silbernitrat	15 min
3.	Waschlösung	Aqua dest.	2 x 2 min
4.	Entwicklung	1.5% Natriumhydroxid 0.4% Formaldehyd	10 - 30 min
5.	Stopplösung	0.75% Natriumcarbonat	10 min
6.	Imprägnierer	10% Glycerol 25% vergälltes Ethanol	5 - 10 min

### **3.8.3 Weiterverarbeitung der Banden-DNA**

Zur Identifikation der Pilze, welche mit den einzelnen Banden des Gels korrelieren, werden einzelne Banden sorgfältig mit einem sterilem Skalpell auf einem Leuchttisch (L110, FAMED) ausgeschnitten und nach Protokoll (Schwieger & Tebbe, 1998) in dest. Wasser gelöst. Die Reamplifikation erfolgt mit den Primern BF2 und TR1 wie bereits beschrieben.

Die PCR-Produkte werden wie oben beschrieben in kompetente *Escherichia coli* Zellen geklont (s. Kapitel 3.7.4-3.7.7). Das Insert wird wieder durch eine M13-PCR nachgewiesen (s. Kapitel 3.7.8). Die Sequenzierung der Banden-DNA erfolgt ebenfalls wie weiter oben beschrieben (s. Kapitel 3.7.10).

### **3.8.4 Auswertung der Bandenmuster**

Zur weiteren digitalen Bearbeitung werden die fertigen DGGE-Gele mit einem Durchsichtsscanner eingescannt und mit Hilfe der GelCompareII-Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) bearbeitet. Die Diversität der Pilze wurde nach *Seksik et al.* als Anzahl der vorhandenen Banden berechnet (Seksik, et al., 2003) sowie als gewichteter Diversitätsindex (Wenderoth & Reber, 1999) (Ott et al, 2004), in welchen neben der Anzahl der Banden auch deren Intensität sowie deren relative Position zueinander eingeht. Die Cluster-Analyse der DGGE-Profile wurde ebenfalls durchgeführt wie früher bei *Ott et al.* beschrieben (Ott et al, 2004).

### **3.9 Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung und in-situ-Hybridisierung**

Biopsieproben von 15 Patienten (NC=5, MC=5, CU=5, alle ohne Glukokortikoid- oder immunsuppressiver Therapie) wurden mittels Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung und in-situ-Hybridisierung untersucht, s.a. Ott et al, 2007 (Ott et al., 2007). Hierzu wurden universelle pilzspezifische Sonden mit der 18S-rRNA als Ziel ausgewählt. Die

Biopsieproben wurden mit einer Mischung aus 2 verschiedenen Cy3-markierten Sonden behandelt: FUN1492 5'-GTGATGTACTCGCTGGCC-3', MY1574 5'-TCCTCGTTGAAGAGC-3' (Baschien, 2003). Die Durchführung erfolgte anhand bereits etablierter Protokolle (Forghani et al, 1985) (Kerstens et al, 1994). Zum Nachweis der Fluoreszenz diente ein Axioimager Mikroskop (Zeiss, Deutschland), die Bilddokumentation erfolgte mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss, Deutschland).

Für die in-situ-Hybridisierung wurden mit Biotin 3'-markierte Sonden verwandt. Die weitere Durchführung erfolgte ebenfalls anhand etablierter Protokolle (Forghani et al, 1985) (Kerstens et al, 1994).

Zur Auswertung wurde die Anzahl der nachgewiesenen Pilzkolonien in 10 unabhängigen Gesichtsfeldern herangezogen. Die mittlere Anzahl innerhalb der Gruppen wurde ermittelt und zwischen den Gruppen verglichen. Die Auswertung erfolgte mittels zweier unabhängiger Untersucher.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Quantitative Bestimmung der mukosa-assoziierten Pilzflora sowie der Stuhlflora

Bisher beriefen sich Daten zur Einschätzung der Quantität mikrobieller Pilzflora allein auf Experimente, welche mittels eines kulturellen Ansatzes durchgeführt wurden. So konnte gezeigt werden, dass die Menge der Pilze nur einen kleinen Prozentsatz der gesamten intestinalen Mikroflora bildet ( $10^2$  -  $10^6$  pro Gramm Stuhl, oder entsprechend 0.000000001 - 0.00001%).

Die Menge der Pilz-DNA in den durchgeführten Untersuchungen variierte bei den 3 untersuchten Probanden. Die durchschnittliche Menge der Pilz-DNA betrug 0.03% der Stuhlflora (0.46%, 0.0006%, 8.03%) sowie 0.02% der mukosa-assoziierten Flora (0.98%, 0.02%, 1.63%). Die Gesamtmenge der Pilz-DNA plus die Menge der bakteriellen-DNA wurde als 100% angesetzt.

### 4.2 Vergleich der mukosa-assoziierten Pilzflora mit der Stuhlflora

Hierzu wurden jeweils Klonbibliotheken von Stuhl- und Biopsieproben zweier gesunder Probanden miteinander verglichen. Insgesamt konnten 13 verschiedene Klone identifiziert und den beiden großen Stämmen der Eumycota zugeordnet werden – in 12/13 Fällen den Ascomycetes (92%), in nur einem Fall den Basidiomycetes (7.7%). Wie erwartet entstammten die meisten Klone den Arten *Candida (glabrata*, 2/13, 5.4%), *Penicillium (italicum, glabrum, sacculum, verruculosum*, 5/13, 38.5%), *Saccaromyces (cerevisiae, cariocanus, bayanus* 3/13, 23.1%), einige jedoch auch bisher nicht kultivierten Ascomycetes und Basidiomycetes.

Im direkten Vergleich mit den Klonbibliotheken der mukosaassoziierten Pilzflora stellt sich bei der Stuhlflora der untersuchten Probanden ein signifikant unterschiedliches Spektrum an OTUs dar. *Cladosporium cladosporioides*, *Raciborskiomyces longisetosum* und *Penicillium italicum* sind die einzigen Arten,



welche sowohl mukosaassoziiert vorkommen als auch im Stuhl nachgewiesen werden konnten.

In Übereinstimmung mit der Literatur, konnten *Saccharomyces spp.*, *Candida glabrata* und einige *Penicillium spp.* in den Stuhlproben nachgewiesen werden konnten. Diese Spezies scheinen jedoch hauptsächlich im Stuhl vorzukommen, da ein Nachweis bei der mukosaassoziierten Flora negativ war.

### 4.3 Vergleichende Analyse der Klonbibliotheken-Kohorten

Die Klonbibliotheken sollen einen Überblick über die vorhandenen mukosa-assoziierten Pilzspezies liefern und Vergleiche zwischen den einzelnen Kohorten (MC, CU, NC-, NC+) ermöglichen. Insgesamt konnten 43 verschiedene Sequenzen nach BLAST-Analyse der Datenbanken verschiedenen OTUs (operational taxonomic units) zugeordnet werden, wobei 53,5% den Ascomycetes (n=23/43) und 46,5% den Basidiomycetes (n=20/43) zugerechnet werden konnten. Für eine Zuordnung der Klone zu ihren am engsten verwandten Spezies, siehe Anhang **Tab. 6**.

Die höchste Anzahl verschiedener OTUs wurde bei Patienten mit Morbus Crohn gefunden (25), bei der Colitis ulcerosa betrug die Diversität 12 OTUs, bei den entzündlichen Kontrollen (C+) und den nicht entzündlichen Kontrollen (C-) 14 bzw. 20.

Obwohl in allen vier Patientengruppen eine große Vielfalt an Pilzsequenzen gefunden werden konnte, unterscheidet sich die Zusammensetzung der Flora in den einzelnen Kohorten (CU und MC gegenüber den gesunden Normalkontrollen C-) deutlich.

Einige OTUs sind z.B. exklusiv bei den MC-Patienten zu finden sind (z.B. *Cheatomium globosum*, *Sirroccoccus conigenus*, *Aureobasidium pullulans*). Andere Sequenzen sind hingegen in fast allen Patientengruppen zu finden, z.B. *Cladosporidium cladosporioides*.

Eine statistische Analyse der Zusammensetzung der einzelnen Klonbibliotheken wurde mithilfe der S-LIBSHUFF Software erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzungen der verschiedenen Klonbibliotheken statistisch relevant differieren. Hierzu siehe auch **Tab.7** (S. 37).

**Tabelle 7 : Statistischer Vergleich der Klonbibliotheken**

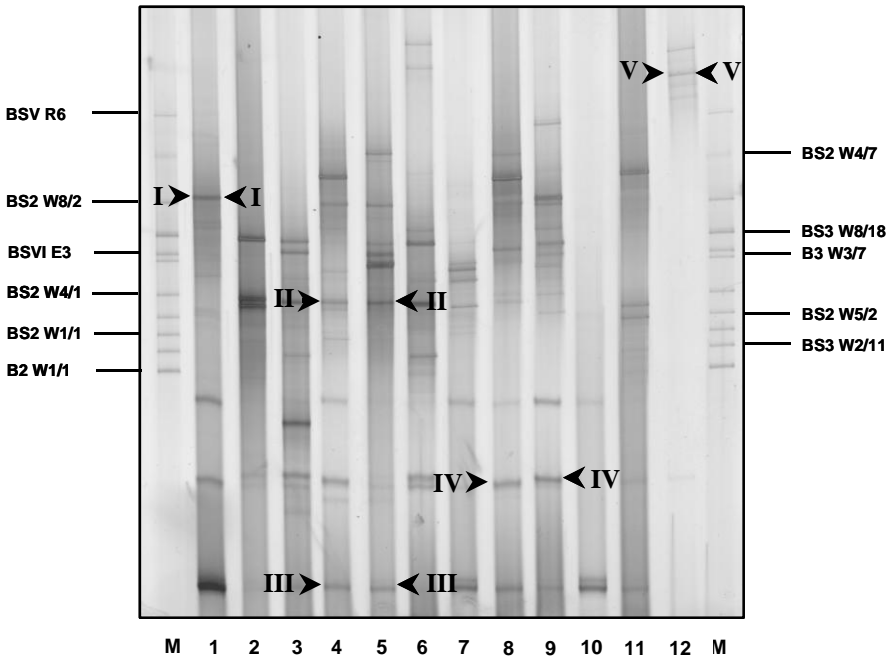
S-LIBSHUFF p Werte		
Vergleich der Bibliotheken (D = 0.03)		Statistisch signifikant unterschiedlich? (minimaler P Wert 0.0253)
Coverage	P Wert	
<b>C- (X) vs. MC (Y)</b>		
XY 0.0714	<0.001	Ja
YX 0.1744	<0.001	
<b>C- (X) vs. CU (Y)</b>		
XY 0.2048	0.001	Ja
YX 0.1012	0.001	
<b>C-1 (X) vs. C+ (Y)</b>		
XY 0.3493	0.001	Ja
YX 0.4823	0.001	
<b>MC (X) vs. CU (Y)</b>		
XY 0.2441	0.001	Ja
YX 0.1750	0.001	
<b>MC (X) vs. C+ (Y)</b>		
XY 0.2414	<0.001	Ja
YX 0.0353	<0.001	
<b>CU (X) vs. C+ (Y)</b>		
XY 0.2785	<0.001	Ja
YX 0.3176	<0.001	

**Tabelle 7:** Libshuff Analyse der Klonbibliotheken zum Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede in der Zusammensetzung, D (Distanz) = 0.03 entsprechend einer 97%igen Ähnlichkeit der Klonbibliotheken. Eine statistische Signifikanz konnte jeweils nachgewiesen werden.

#### **4.4 Biodiversität der intestinalen Pilzflora anhand der DGGE**

Mit Hilfe der DGGE wurde die Zusammensetzung der mukosaadhärenten Pilzflora im Darm genauer betrachtet. Untersucht wurden 31 Patienten mit Morbus Crohn, 26 Patienten mit Colitis ulcerosa sowie 47 Kontrollen, davon 15 mit und 32 ohne entzündliche Veränderungen. In allen 104 untersuchten Patienten konnten Pilze als Bestandteil der mikrobiellen Flora des Darmes nachgewiesen werden. Für alle Proben wurde ein genetisches Profil der vorhandenen Mikroflora erstellt. Die daraus resultierenden Bandenmuster zeigten eine hohe interindividuelle Variabilität (**Abb. 4, S. 39**). Eine Cluster-Analyse der normalisierten DGGE-Profile ergab keine spezifischen Muster.

Abbildung 4:

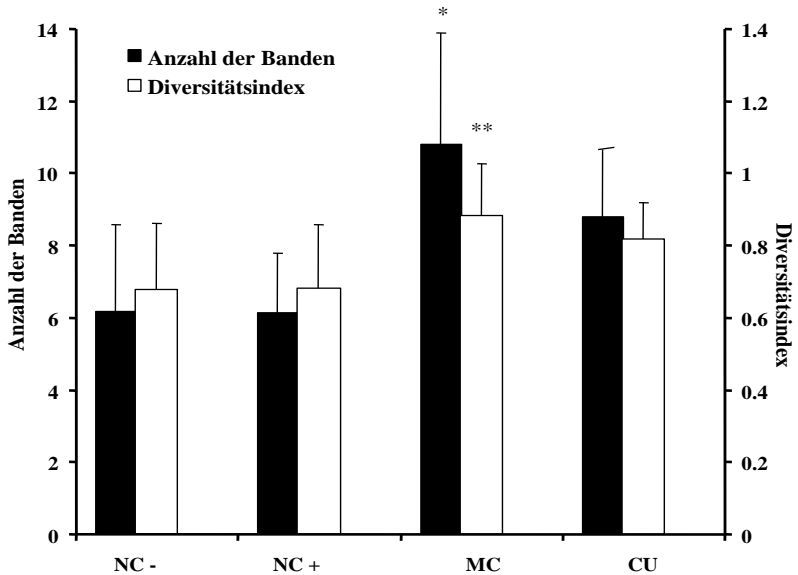


**Abbildung 4:** Original DGGE-Gel mit genetischen Profil der Pilzflora von 12 Probanden der Morbus Crohn-Studiengruppe. Das Gel zeigt die hohe interindividuelle Variabilität zwischen den einzelnen Profilen. Extrahierte und sequenzierte Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet (I = *Candida dubliensis*, II = *Trametes versicolor*, III = *Candida albicans*, IV = *Filobasidium globisorum*, V = *Saccharomyces cerevisiae*). Der Marker (M), bestehend aus Standard Amplicons verschiedener Pilzisolat, dient der Normalisierung sowie der besseren Vergleichbarkeit der Gele (s. Smalla et al., 2001).

Die Biodiversität, berechnet als Anzahl der Banden (s.o.), zeigte Unterschiede in den einzelnen Untersuchungsgruppen. Die Gruppe der MC-Patienten ( $10.8 \pm 3.1$ ) zeigte eine signifikant höhere Diversität als die Kontrollgruppen ( $6.2 \pm 2.4$  in der nicht-entzündlichen und  $6.1 \pm 1.7$  in der entzündlichen Kontrollgruppe,  $p \leq 0.001$ ). Die Gruppe der CU Patienten wies ebenfalls eine höhere Anzahl an Banden auf ( $8.8 \pm 1.9$ ) und somit eine höhere Diversität, jedoch ist dieses Ergebnis statistisch gesehen nicht signifikant.

Die gleiche Tendenz ließ sich auch beim Vergleich der berechneten Diversitätsindices ausmachen. Hier wiesen die MC-Gruppe ( $0.88 \pm 0.14$ ) im Vergleich mit den Kontrollgruppen (nicht-entzündliche NC  $0.68 \pm 0.18$ ; entzündliche NC  $0.68 \pm 0.18$ ) einen höheren Wert auf. Der Wert der CU-Gruppe lag bei  $0.82 \pm 0.10$  und ist ebenfalls nicht als statistisch signifikant zu bewerten (s. **Abb. 5**, S. 41)

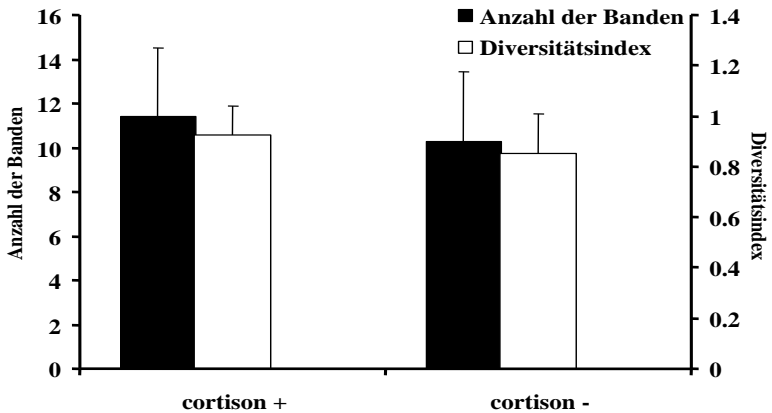
Abbildung 5:



**Abbildung 5:** Vergleich der Bandenanzahl und der Diversitätsindices der DGGE-Profile aller Studiengruppen (MC, CU, NC+ und NC-). Die mittlere Anzahl der Banden sowie die mittleren Diversitätsindices (jeweils  $\pm$  SD) sind graphisch dargestellt. Die Diversität der MC-Patienten ist gegenüber beiden Kontrollgruppen statistisch signifikant erhöht. Die Diversität der CU-Patienten ist ebenfalls erhöht, aber nicht statistisch signifikant. (\*: $\leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.001$ ).

In einer sich anschließenden Datenanalyse wurde die Diversität der Pilzflora analysiert in Bezug auf die jeweilige medikamentöse Behandlung (5-ASA, Glukokortikoide, Immunsuppressiva), die Krankheitsaktivität (Aktivitätsindex und Histologische Parameter, jeweils eingeteilt nach leichter, moderater und schweren Form), die Lokalisation der Biopsieentnahme sowie Alter und Geschlecht der Patienten. Eine Korrelation zwischen diesen Parametern und der Biodiversität bestand nicht. Folglich führte keiner der oben genannten Parameter zu einer Beeinflussung der Diversität der intestinalen Pilzflora. Als ein Beispiel ist in **Abb.6** der Vergleich der Biodiversität von MC-Patienten mit (n=14) bzw. ohne (n=17) Gabe von Glukokortikoiden dargestellt.

**Abbildung 6:**



**Abbildung 6:** Vergleich der Bandenanzahl und der Diversitätsindices exemplarisch für MC-Patienten mit Glukokortikoidbehandlung (n=14) und ohne (n=17). Dargestellt sind die mittlere Anzahl der Banden ( $\pm$ SD) sowie die mittleren Diversitätsindices ( $\pm$ SD). Es ergab sich kein Einfluss der Therapie auf die Diversität der intestinalen Pilzflora.

#### 4.5 Taxonomische Zuordnung der DGGE-Banden

Insgesamt wurden acht Banden der DGGE-Gele sequenziert und durch BLAST-Analyse taxonomisch den entsprechenden Spezies zugeordnet. Drei der acht Banden konnten in mehr als der Hälfte der untersuchten Probanden (in allen Gruppen) nachgewiesen werden (57-62%). Sie konnten den Spezies *Candida albicans*, *Galactomyces geotrichum* und *Penicillium commune* zugeordnet werden.

Einige Banden der DGGE-Profile konnten häufiger in der Gruppe der CED-Patienten als in den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Bei diesen OTUs handelt es sich um: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Exidiopsis calcea*, *Candida oofensis*, *Candida parapsilosis*, *Trametes vesicolor* und *Saccharomyces cerevisiae*. Andere Banden traten statistisch signifikant häufiger bei Patienten der MC-Gruppe auf. Diese Banden konnten nach Sequenzierung und Identifizierung den Pilzspezies *Trametes vesicolor*, *Candida dublienses* und *Filobasidium floriforme* zugeordnet werden.

Es konnten bei den DGGE-Analysen keine krankheitsspezifischen Keime ermittelt werden.

#### 4.6 Nachweis von mukosa-adhärenenten Pilzen mittels FISH und non-fluorescent in-situ Hybridisation

Untersucht wurden insgesamt 15 Biopsie-Proben von Patienten mit aktiver CED (MC: n=5, CU: n=5), jeweils ohne immunsuppressiver- oder Glucocortikoid-Therapie, sowie gesunden Patienten (n=5). Sowohl in der fluorescent in-situ Hybridisation als auch in der non-fluorescent in-situ Hybridisation konnte die Präsenz von Pilzen in Assoziation mit der Darmflora nachgewiesen werden, sowohl in der Gruppe der CED-Patienten, als auch in den Normalkontrollen. Die non-fluorescent in-situ Hybridisation wurde zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse durch Autofluoreszenz durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte wie bereits oben beschrieben als durchschnittliche Anzahl der Signale in 10 unabhängigen Gesichtsfeldern.



Es zeigte sich in der Gruppe der CED eine größere Anzahl an Pilzen (MC:  $5.2 \pm 0.9$  und CU:  $6.3 \pm 0.5$ ) im Vergleich mit den Normalkontrollen ( $4.2 \pm 1.1$ ). Die bereits erhobenen molekularen Daten werden durch die FISH und non-fluorescent in-situ Hybridisation-Analyse unterstützt. Eine statistische Signifikanz zeigte sich nur für die CU-Patienten im Vergleich mit den Normalkontrollen ( $p=0.0158$ ).

Abbildung 7:

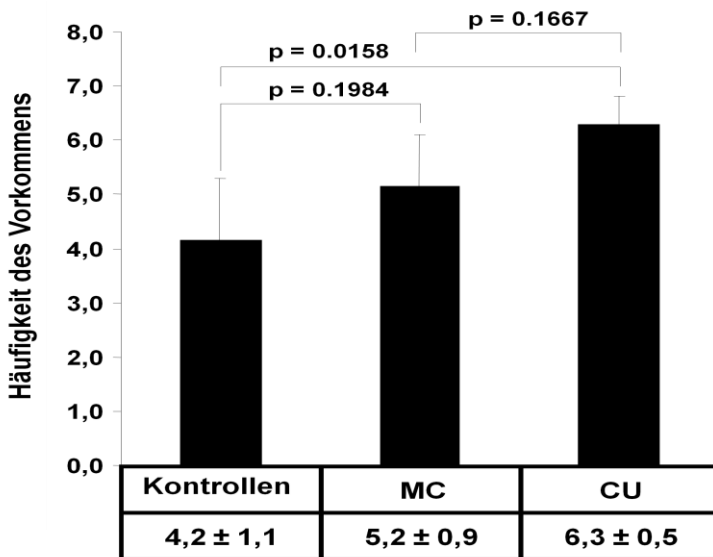
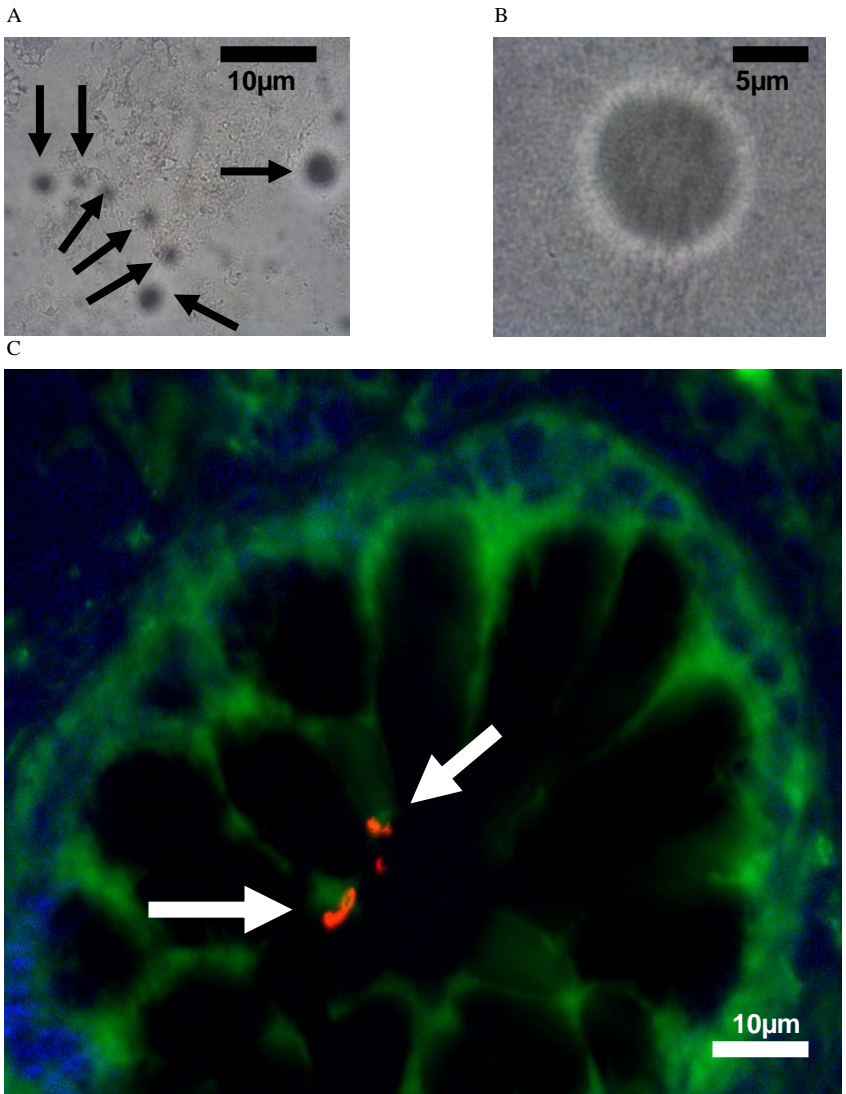


Abbildung 7: Häufigkeit an Pilz- Signalen (durchschnittliche Anzahl pro Gesichtsfeld) in einer Patientenuntergruppe (Kontrollen  $n=5$ , MC  $n=5$ , CU  $n=5$ ), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Abweichung zwischen den Kontrollen und den Colitis ulcerosa Patienten ist als statistisch signifikant zu betrachten ( $p=0.0158$ )

Abbildung 8:



**Abbildung 8:** in-situ-Hybridisation und FISH von mukosaadhärenten Pilzen. Bild A (50-fache Vergrößerung) und Bild B (100-fache Vergrößerung) zeigen non-fluorescent in-situ-Hybridisation Signale von Pilzen (Pfeile), Bild C zeigt eine Ansammlung von Pilzen dargestellt mit FISH (rote Signale).

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, die in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bisher wenig untersuchte Pilzflora des menschlichen Verdauungstraktes genauer zu untersuchen. Im Gegensatz zur bereits früher durchgeführten kulturellen Bestimmung der Pilzspezies aus Stuhlproben erfolgte nun eine Bestimmung mittels molekularer Methoden. Während mittels einer kultureller Methodik hauptsächlich verschiedene Hefepilze (meist *Candida* spp. und *Sacharomyces* spp.) sowie Schimmelpilze (*Penicillium* spp.) nachgewiesen werden konnten, zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen der 18S rDNA sowohl eine erhöhte Quantität als auch qualitativ eine größere Anzahl verschiedener Pilzspezies.

Hierunter befinden sich auch viele „neue“ Spezies, d.h. Spezies, welche bisher nicht kulturell angezüchtet werden konnten. Hierin besteht auch einer der Hauptkritikpunkte der 18S rDNA Analysen, nämlich die fehlende Überprüfbarkeit der Ergebnisse durch etablierte Kulturmethoden. Desweiteren stellt sich die Frage, ob es sich bei den ermittelten Pilzspezies um lebende, aktive Pilze handelt, oder ob auch Pilzkontaminationen erfasst werden. Geht man davon aus, dass die 18S rRNA lebende und somit aktive Pilze wiederspiegelt, könnte die Analyse der 18S rDNA potentiell auch abgestorbene Organismen erfassen. Da die gleichzeitige Analyse von 18S rDNA und 18S rRNA Signalen vergleichbare Resultate für die meisten der ermittelten Pilzstränge ergab (z.B. *Yarrowia lipolytica*), gehen wir im folgenden davon aus, dass es sich bei den ermittelten Pilzspezies um aktive und lebende Mitglieder der mukosa-assoziierten Darmflora handelt.

In Bezug auf eine mögliche Kontamination der Darmflora durch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten, parenterale Ernährung oder Diäten konnten trotz langjähriger Studien bisher keine relevanten Unterschiede bezüglich Patienten mit CED und Normalkontrollen festgestellt werden.

Bei allen Patienten und auch allen Normalkontrollen konnte eine individuell unterschiedlich ausgeprägte Zusammensetzung der Darmflora ermittelt werden. Zahlreiche Spezies, welche in den Klonbibliotheken nachgewiesen wurden, konnten bereits früher aus dem Gastrointestinaltrakt isoliert werden (*Candida* spp.,

*Galactomyces* spp., *Penicillium* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *Yarrowia* spp). Andere in den Klonbibliotheken ermittelten Sequenzen konnten Pilzen zugeordnet werden, welche in der Regel anderen Lebensräumen angehören oder als opportunistische Infektionserreger bekannt sind (z.B. *Cladosporidium* spp, *Trichosporon* spp.), einige der Sequenzen gehörten zu bisher nicht klassifizierten Pilzen.

Im Vergleich mit den gesunden Normalkontrollen zeigte sich in der Gruppe der CED-Patienten sowie der entzündlichen Normalkontrollen zahlreiche dieser „neuen“ Pilzspezies, bei welchen es sich in den meisten Fällen um ubiquitär vorkommende Pilze handelt, welche als potentielle Infektionserreger bekannt sind. Wichtig zu bemerken ist, dass ein direkt krankheitsauslösender Pilz nicht ermittelt werden konnte, was ja, wie oben beschrieben, eine Fragestellung dieser Arbeit war.

Ein generelles Problem bei der taxonomischen Zuordnung der 18S rDNA Sequenzen zu den entsprechenden Pilzspezies ist das Fehlen von Vergleichssequenzen in den Datenbanken – wenige Vergleichssequenzen liegen bisher für die intestinale Flora vor. Desweiteren wird die taxonomische Zuordnung durch Ungereimtheiten in der Systematik erschwert – hier sind noch weitere Arbeiten notwendig, um die Datenbanken zu komplettieren und die kulturelle und molekulare Systematik in Einklang zu bringen.

Beim Vergleich der mukosa-adhärenten Darmflora zwischen CED –und Kontrollgruppe wurde eine signifikant erhöhte Diversität der Pilzflora bei Patienten mit Morbus Crohn dokumentiert. Gestützt wird dieses Ergebnis durch die ebenfalls erhöhte Anzahl an Pilzen in der Gruppe der CED-Patienten im Vergleich mit den Normalkontrollen bei der in-situ Hybridisierung. Somit scheint die Anzahl der Pilze sowie die Diversität der Darmflora bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erhöht zu sein.

Eine erhöhte Anzahl und Diversität intestinaler Pilze wurde bereits früher bei Erkrankungen mit entzündlich gestörter Barrierefunktion dokumentiert – in einer 1990 veröffentlichten Studie wurden Stuhlproben von insgesamt 1000 Patienten mit Psoriasis und atopischer Dermatitis sowie Normalkontrollen auf das Auftreten von Pilzen untersucht. In 68% der Psoriasis-Patienten und in 70% der Patienten mit atopischer Dermatitis konnten Pilze im Stuhl nachgewiesen werden, hingegen zeigten nur 50% der Normalkontrollen ein Wachstum von Pilzen (Buslau et al, 1990).

Einige Pilzspezies, darunter hauptsächlich *Candida albicans*, konnten wiederholt und in hoher Anzahl aus dem Gastrointestinaltrakt isoliert werden. Auch in den obigen Untersuchungen konnte *Candida albicans* zu einer hohen Prozentzahl isoliert werden (57-62%). Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf eine intestinale Entzündung (Nachweis sowohl in der Patienten- als auch in der Vergleichsgruppe). Diese Beobachtungen sind somit konkordant mit den Ergebnissen früherer Studien, welche *Candida albicans* als Bestandteil der normalen, residenten Darmflora sehen. In der Literatur wird das Vorkommen von *Candida spp.* im Gastrointestinaltrakt mit einer Häufigkeit von 23-76% in Quantitäten von  $10^2$  bis  $10^4$  CFU/ml angegeben. Vor diesem Hintergrund scheint eine Relevanz zwischen dem Vorkommen von *Candida spp.* im Darm und der Entstehung von CED sehr unwahrscheinlich zu sein. Allerdings zeigten andere Pilzspezies ein deutlich höheres Vorkommen bei Patienten mit CED, darunter auch *Saccharomyces cerevisiae*. Beim Morbus Crohn können Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCAs) häufig nachgewiesen werden. Über eine Relevanz in Bezug auf die Pathogenese der CED ist viel spekuliert worden. Jüngst konnte in einer Studie gezeigt werden, dass einzig Lymphozyten ASCA-positiver Morbus Crohn-Patienten nach Kontakt mit Mannan, einem Hefepilz-Antigen, proliferieren. Dieses Phänomen mag zurückzuführen sein auf eine gestörte Toleranz gegenüber Hefepilzen, ebenso denkbar ist jedoch auch eine höhere Antigenbelastung aufgrund einer höherfrequenten Kolonisation bei Patienten mit Morbus Crohn. In der Literatur zeigt sich eine erhöhte Nachweisbarkeit von ASCAs bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich mit Colitis ulcerosa-Patienten. In Konkordanz ergeben sich in den oben durchgeführten Untersuchungen ein häufigeres Auftreten von *Saccharomyces cerevisiae* in Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich mit Colitis ulcerosa-Patienten. Weitere Einflüsse, zum Beispiel das therapeutische Regime, demographische Parameter sowie Krankheitscharakteristika, konnten ausgeschlossen werden. Über Ursachen oder Relevanz bedarf es weiterer Studien.

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Untersuchungen das Vorhandensein sowie die Individualität und Reichhaltigkeit der Pilze der Darmflora nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Anzahl sowie eine vergrößerte Diversität der Pilze zeigte sich bei den Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Über die zugrunde liegende Ursache lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren. Zum einen wäre die erhöhte Diversität als eigenständiger Trigger für die Entstehung von

CED denkbar (z.B. vermittelt über eine immunologische Antwort des Wirts auf Pilzantigene oder direkt über eine Toxinproduktion), andererseits könnte es sich auch um einen sekundären Effekt aufgrund einer Veränderung der bakteriellen Darmflora handeln. Weitere Studien sind zur Klärung dieser Fragen daher notwendig.

## 6. Zusammenfassung

Unter dem Oberbegriff der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden heute die Krankheiten Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist die chronisch-rezidivierende und schubweise verlaufende Entzündung des Gastrointestinaltrakts. Trotz intensiver Forschung sind Ätiologie und Pathogenese der CED weitgehend unverstanden. Neben einer genetischen Prädisposition wurden in jüngster Zeit wiederholt mikrobielle Faktoren sowie die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora für den Krankheitsausbruch verantwortlich gemacht.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen grundlegenden Überblick über die bisher wenig erforschte humane intestinale Pilzflora zu liefern. Hierzu wurden molekularbiologische Methoden basierend auf der 18S rDNA angewandt, um die Mikroflora kulturunabhängig darstellen zu können.

Eine quantitative Bestimmung der Pilz-DNA aus Stuhl- und Biopsieproben wurde mittels eines speziellen PCR-Ansatzes bei 3 gesunden Probanden durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Pilze im Intestinum einen größeren Anteil ausmacht, als bisher durch Kultivierungsexperimente angenommen wurde. Die Pilze stellen daher einen signifikanten Anteil der intestinalen Mikroflora dar. Vergleichende Analysen zeigten eine deutliche Divergenz der Pilzspezies in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Material (Biopsie/ Stuhlproben).

Die allgemeine Biodiversität der intestinalen Pilzflora wurde durch das Anfertigen von Klonbibliotheken für die zu untersuchenden Kollektive (MC, CU, NC+, NC-) dargestellt. Insgesamt konnten 43 verschiedene Sequenzen isoliert und ihren am nächsten verwandten Pilzspezies zugeordnet werden, wobei die Zusammensetzung der Pilzflora zwischen den Studienkollektiven stark variierte.

Mit Hilfe der DGGE wurden Profile von 31 MC-Patienten, 26 CU-Patienten sowie 47 gesunden Probanden (NC+ und NC-) angefertigt. Bei allen Probanden konnten Pilze in der intestinalen Schleimhaut nachgewiesen werden. Die Profile zeigten eine starke interindividuelle Varianz der Bandenmuster. Insgesamt war die Biodiversität bei den Patienten mit Morbus Crohn am größten (statistisch signifikant). Bei den CU



Patienten lag ebenfalls eine erhöhte Biodiversität im Vergleich mit den Kontrollgruppen vor (statistisch nicht signifikant).

Im Vergleich mit Studien der bakteriellen mukosaassoziierten Mikroflora ergibt sich eine inverse Korrelation der Biodiversitäten bei CED-Patienten (verringerte Diversität der bakteriellen Flora gegenüber einer gesteigerten Diversität der Pilzflora). Weitere Studien müssen klären, ob diese erhöhte Diversität der Pilzflora ein eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung einer CED oder Ursache / Auswirkung einer veränderten bakteriellen Flora ist.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbott, D.**, Wilkins, A., Asara, J., & Cantley, L. (2004, Dezember). The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* (14), pp. 2217-27.
- Akhtar, M.**, Watson, J., Nazli, A., & McKay, D. (2003, Juli). Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J*, 17 (10), pp. 1319-21.
- Amann, R.**, Ludwig, W., & Schleifer, K. (1995, März). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59 (1), pp. 143-69.
- Andersson, R.**, Olaison, G., Tysk, C., & Ekblom, A. (2003, Januar). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 124 (1), pp. 40-46.
- Annese, V.**, Andreoli, A., Andriulli, A., Dinca, R., Gionchetti, P., Latiano, A., et al. (2001, August). Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan antibodies in Crohn's disease and ulcerative colitis: a GISC study. *Am J Gastroenterol* 96 (8), pp. 2407-12.
- Ashcroft, A.**, Cruickshank, S., Croucher, P., Perry, M., Rollinson, S., Lippitt, J., et al. (2003, Dezember). Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity*, 19 (6), pp. 849-61.
- Banchereau, J.**, & Steinman, R. (1998, März). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392 (6673), pp. 245-52.
- Barclay, G.**, McKenzie, H., Pennington, J., Parratt, D., & Pennington, C. (1992). The effect of dietary yeast on the activity of stable chronic Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*, 27 (3), pp. 196-200.
- Baschien, C.** (2003). Development and evaluation of rRNA targeted in situ probes and phylogenetic relationships of freshwater fungi. 30-32. (S. o. Engineering, Ed.) Technical University of Berlin.
- Baumgart, D.**, & Carding, S. (2007, Mai). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, 369 (9573), pp. 1627-40.
- Bernhardt, H.** (1996). Candida in the ecological system of the orointestinal tract. *Mycoses*, 39 (1), pp. 44-7.
- Bernhardt, H.** (1998, April). Fungi in the intestine--normal flora or pathogens? *Z Arztl Fortbild Qualitatssich*, 93 (3), pp. 154-6.
- Berrebi, D.**, Maudinas, R., Hugot, J., Chamailard, M., Chareyre, F., De Lagausie, P., et al. (2003, Januar). Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut*, 52 (6), pp. 840-6.
- Best, W.**, Bechtel, J., Singleton, J., & Kern, R. (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70 (3), pp. 439-44.
- Bock, M.**, Maiwald, M., Kappe, R., Nickel, P., & Näher, H. (1994, März bis April). Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses*, 37 (3-4), pp. 79-84.
- Brogden, K.** (2005, März). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3 (3), pp. 238-50.

- Buisine, M.**, Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M., Colombel, J., Porchet, N., et al. (2001, Oktober). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut*, *49* (4), pp. 544-51.
- Buslau, M.**, Menzel, I., & Holzmann, H. (1990, Februar). Fungal flora of human faeces in psoriasis and atopic dermatitis. *Mycoses*, *33* (2), pp. 90-4.
- Cario, E.**, & Podolsky, D. (2000, Dezember). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, *68* (12), pp. 7010-7.
- Cong, Y.**, Brandwein, S., McCabe, R., Lazenby, A., Birkenmeier, E., Sundberg, J., et al. (1998, März). CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med*, *187* (6), pp. 855-64.
- Cosnes, J.** (2004, Juni). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *18* (3), pp. 481-96.
- Cosnes, J.**, Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., & Gendre, J. (2006, Februar). Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, *12* (8), pp. 1235-42.
- Crohn, B.**, Ginzburg, L., & Oppenheimer, G. (1932). Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA* (99), pp. 1223-29.
- Cruickshank, S.**, McVay, L., Baumgart, D., Felsburg, P., & Carding, S. (2004, Mai). Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut*, *53* (5), pp. 678-84.
- De La Cochetière, M.**, Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J., & Doré, J. (2005, November). Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol*, *43* (11), pp. 5588-92.
- Demaude, J.**, Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L., & Bueno, L. (2006, Mai). Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut*, *55* (5), pp. 655-61.
- Desai, H.**, & Gupta, P. (2005, Januar-Februar). Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian J Gastroenterol*, *24* (1), pp. 23-24.
- D'Haens, G.**, Geboes, K., Peeters, M., Baert, F., Penninckx, F., & Rutgeerts, P. (1998, Februar). Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*, *114* (2), pp. 262-7.
- Diebel, L.**, Liberati, D., Diglio, C., Dulchavsky, S., & Brown, W. (1999, Dezember). Synergistic effects of Candida and Escherichia coli on gut barrier function. *J Trauma*, *47* (6), pp. 1045-50.
- Doré, J.**, Sghir, A., Hannequart-Gramet, G., Corthier, G., & Pochart, P. (1998, März). Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal Bacteroides populations. *Syst Appl Microbiol*, *21* (1), pp. 65-71.
- Eckburg, P.**, Bik, E., Bernstein, C., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005, Juni). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308* (5728), pp. 1635-8.

- Ehrhardt, R.**, Lúdvíksson, B., Gray, B., Neurath, M., & Strober, W. (1997, Januar). Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol*, *158* (2), pp. 566-73.
- Elphick, D.**, & Mahida, Y. (2005, Dezember). Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*, *54* (12), pp. 1802-9.
- Farrell, R.**, & Peppercorn, M. (2002, Januar). Ulcerative colitis. *Lancet*, *359* (9303), pp. 331-40.
- Fischer, S.**, & Lerman, L. (1979, Januar). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, *16* (1), pp. 191-200.
- Forghani, B.**, Dupuis, K., & Schmidt, N. (1985, Oktober). Rapid detection of herpes simplex virus DNA in human brain tissue by in situ hybridization. *J Clin Microbiol*, *22* (4), pp. 656-8.
- Franchimont, D.**, Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., et al. (2004, Juli). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*, *53* (7), pp. 987-92.
- Furlan, R.**, Ardizzone, S., Palazzolo, L., Rimoldi, A., Perego, F., Barbic, F., et al. (2006, Januar). Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *290* (1), pp. R224-32.
- Fuss, I.**, Becker, C., Yang, Z., Groden, C., Hornung, R., Heller, F., et al. (2006, Januar). Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis*, *12* (1), pp. 9-15.
- Fuss, I.**, Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feig, I. S., et al. (2004, Mai). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*, *113* (10), pp. 1490-7.
- Gaya, D.**, Russel, R., Nimmo, E., & Satsangi, J. (2006, April). New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*, *367* (9518), pp. 1271-84.
- Geboes, K.**, Riddell, R., Ost, A., Jensfelt, B., Persson, T., & Löfberg, R. (2000, September). A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut*, *47* (3), pp. 404-9.
- Gent, A.**, Hellier, M., Grace, R., Swarbrick, E., & Coggon, D. (1994, März). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*, *343* (8900), pp. 766-7.
- Göbel, U.** (1995). Phylogenetic amplification for the detection of uncultured bacteria and the analysis of complex microbiota. *J Microbiol Meth* (23), pp. 117-128.
- Gomes NC, F. O.**, Costa, R., Rumjanek, N., Buchner, A., Mendona-Hagler, L., & Smalla, K. (2003, Juli). Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl Environ Microbiol*, *69* (7), pp. 3758-66.
- Guttman, D.**, & Charlesworth, D. (1998, Mai). An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature*, *393* (6682), pp. 263-6.
- Hampe, J.**, Cuthbert, A., Croucher, P., Mirza, M., Mascheretti, S., Fisher, S., et al. (2001, Juni). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, *357* (9272), pp. 1925-8.
- Hampe, J.**, Heymann, K., Krawczak, M., & Schreiber, S. (2003, September). Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis*, *18* (5), pp. 413-7.

- Hanauer, S.** (1994). *Measurements of disease activity*. (S. Targan, & F. Shanahan, Eds.) Baltimore: Williams & Williams.
- Harper, P., Lee, E., Kettlewell, M., Bennett, M., & Jewell, D.** (1985, März). Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut*, *26* (3), pp. 279-84.
- Hart, A., Al-Hassi, H., Rigby, R., Bell, S., Emmanuel, A., Knight, S., et al.** (2005, Juli). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *129* (1), pp. 50-65.
- Hawksworth, D.** (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* (95), pp. 641-655.
- Heuer, H., Wieland, G., Schönfeld, J., Schönwälder, A., Gomes, N., & Smalla, K.** (2001). *Bacterial Profiling using DGGE or TGGE analysis*. (P. Rouchelle, Ed.) Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press.
- Hokama, A., Mizoguchi, E., Sugimoto, K., Shimomura, Y., Tanaka, Y., Yoshida, M., et al.** (2004, Juni). Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation. *Immunity*, *20* (6), pp. 681-93.
- Hooper, L., & Gordon, J.** (2001, Mai). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, *292* (5519), pp. 1115-8.
- Hughenoltz, P., Goebel, B., & Pace, N.** (1998, September). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol.*, *180* (18), pp. 4765-74.
- Hugot, J., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J., Belaiche, J., et al.** (2001, Mai). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411* (6837), pp. 599-603.
- Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., Kusugami, K., Yamaguchi, T., Kyokane, K., et al.** (1999, Juli). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol*, *163* (2), pp. 1081-90.
- Ingram, J., Thomas, G., & Rhodes, J.** (2005, November). A randomized trial of nicotine enemas for active ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *3* (11), pp. 1107-14.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., et al.** (2003, Februar). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, *278* (8), pp. 5509-12.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R.** (2004, Oktober). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, *5* (10), pp. 987-95.
- Kappe, R., C, F., Okeke, C., & Maiwald, M.** (1996, Januar-Februar). Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rDNA. *Mycoses*, *39* (1-2), pp. 25-30.
- Kappe, R., Okeke, C., Fausser, C., Maiwald, M., & Sonntag, H.** (1998, September). Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. *J Med Microbiol*, *47* (9), pp. 811-20.
- Kerstens, H., Poddighe, P., & Hanselaar, A.** (1994, August). Double-target in situ hybridization in brightfield microscopy. *J Histochem Cytochem*, *42* (8), pp. 1071-7.
- Khatib, R., Riederer, K., Ramanathan, J., & Baran, J. J.** (2001). Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients. *Mycoses*, *44* (5), pp. 151-6.
- Kinra, S., Davey, S., Jeffreys, M., Gunnell, D., Galobardes, B., & McCarron, P.** (2006, Januar). Association between sibship size and allergic diseases in the Glasgow Alumni Study. *Thorax*, *61* (1), pp. 48-53.

- Kirsner, J.** (1988, Juni). Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*, 10 (3), pp. 286-97.
- Kleessen, B., Kroesen, A., Buhr, H., & Blaut, M.** (2002, September). Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*, 37 (9), pp. 1034-41.
- Klement, E., Cohen, R., Boxman, J., Joseph, A., & Reif, S.** (2004, November). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 80 (5), pp. 1342-52.
- Knoke, M.** (1999). Gastrointestinal microecology of humans and *Candida*. *Mycoses*, 42 (1), pp. 30-4.
- Konrad, A., Rütten, C., Flogerzi, B., Styner, M., Göke, B., & Seibold, F.** (2004, März). Immune sensitization to yeast antigens in ASCA-positive patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 10 (2), pp. 97-105.
- Koutroubakis, I., Vlachonikolis, I., & Kouroumalis, E.** (2002, Juli). Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*, 8 (4), pp. 277-86.
- Krajina, T., Leithäuser, F., Möller, P., Trobonjaca, Z., & Reimann, J.** (2003, April). Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol*, 33 (4), pp. 1073-83.
- Krause, R., Schwab, E., Bachhiesl, D., Daxböck, F., Wenisch, C., Krejs, G., et al.** (2001, Oktober). Role of *Candida* in antibiotic-associated diarrhea. *J Infect Dis*, 184 (8), pp. 1065-9.
- Krcmery, V., Spanik, S., Kunova, A., Trupl, J., Grausova, S., Krupova, I., et al.** (1999, April). Nosocomial *Candida krusei* fungemia in cancer patients: report of 10 cases and review. *J Chemother*, 11 (2), pp. 131-6.
- Langendijk, P., Schut, F., Jansen, G., Raangs, G., Kamphuis, G., Wilkinson, M., et al.** (1995, August). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol*, 61 (8), pp. 3069-75.
- Langrish, C., Chen, Y., Blumenschein, W., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J., et al.** (2005, Januar). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201 (2), pp. 233-40.
- Leithäuser, F., Trobonjaca, Z., Möller, P., & Reimann, J.** (2001, Oktober). Clustering of colonic lamina propria CD4(+) T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model. *Lab Invest*, 81 (10), pp. 1339-49.
- Lepage P, S. P.** (2005, Mai). Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 11 (5), pp. 473-80.
- Loftus, E. J.** (2004, Mai). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126 (6), pp. 1504-17.
- Maeda, S., Hsu, L., Liu, H., Bankston, L., Iimura, M., Kagnoff, M., et al.** (2005, Februar). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*, 307 (5710), pp. 734-8.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G., Kerr, M., Robson, D., Pennington, C., et al.** (1988, Oktober). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ*, 297 (6656), pp. 1105-6.

- Makimura, K.**, Murayama, S., & Yamaguchi, H. (1994, Mai). Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol*, *40* (5), pp. 358-64.
- Malmström, V.**, Shipton, D., Singh, B., Al-Shamkhani, A., Puklavec, M., Barclay, A., et al. (2001, Juni). CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol*, *166* (11), pp. 6972-81.
- Mangan, P.**, Harrington, L., O'Quinn, D., Helms, W., Bullard, D., Elson, C., et al. (2006, Mai). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, *441* (7090), pp. 231-4.
- Martin, B.**, Banz, A., Bienvenu, B., Cordier, C., Dautigny, N., Bécourt, C., et al. (2004, März). Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol*, *172* (6), pp. 3391-8.
- Mavromanolakis, E.**, Maraki, S., Cranidis, A., Tselentis, Y., Kontoyiannis, D., & Samonis, G. (2001). The impact of norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin on human gut colonization by *Candida albicans*. *Scand J Infect Dis*, *33* (6), pp. 477-8.
- McCormick, P.**, & Manning, D. (2001, Juli-August). Chronic inflammatory bowel disease and the 'over-clean' environment: rarity in the Irish 'traveller' community. *Ir Med J*, *94* (7), pp. 203-4.
- McGrath, J.**, McDonald, J., & Macdonald, J. (2004). Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD004722).
- Merz, W.**, Karp, J., Schron, D., & Saral, R. (1986, Oktober). Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. *J Clin Microbiol*, *24* (4), pp. 581-4.
- Müller, J.** (1993, Februar). Characteristics of fungus carriers as a source of infection. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, *194* (1-2), pp. 162-72.
- Muyzer, G.**, & Smalla, K. (1998, Januar). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *73* (1), pp. 127-41.
- Nakazawa, A.**, Dotan, I., Brimnes, J., Allez, M., Shao, L., Tsushima, F., et al. (2004, Mai). The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, *126* (5), pp. 1347-57.
- Neunlist, M.**, Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P., et al. (2003, Januar). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut*, *52* (1), pp. 84-90.
- Neurath, M.**, Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., et al. (2002, Mai). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med*, *195* (9), pp. 1129-43.
- Nickrent, D.**, & Sargent, M. (1991, Januar). An overview of the secondary structure of the V4 region of eukaryotic small-subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, *19* (2), pp. 227-35.
- Nuding, S.**, Fellermann, K., Wehkamp, J., & Stange, E. (2007, September). Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut*, *56* (9), pp. 1240-7.
- Ogura, Y.**, Bonen, D., Inohara, N., Nicolae, D., Chen, F., Ramos, R., et al. (2001, Mai). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411* (6837), pp. 603-6.
- Orholm, M.**, Binder, V., Sorensen, T., Rasmussen, L., & Kyvik, K. (2000, Oktober). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*, *35* (10), pp. 1075-81.

- Ott, S., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U., Timmis, K., & Schreiber, S.** (2004, Mai). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, *53* (5), pp. 685-693.
- Ott, S., El Mokhtari, N., Rehman, A., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Kühbacher, T., et al.** (2007, Dezember). Fungal rDNA signatures in coronary atherosclerotic plaques. *Environ Microbiol* (9), pp. 3035-45.
- Pace, N.** (1997, Mai). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, *276* (5313), pp. 734-40.
- Peppercorn, M.** (1993). Is there a role for antibiotics as primary therapy in Crohn's ileitis? *J Clin Gastroenterol*, *17* (3), pp. 235-7.
- Quinton, J., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., et al.** (1998, Juni). Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut*, *42* (6), pp. 788-91.
- Rachmilewitz, D.** (1989, Januar). Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ*, *298* (6666), pp. 82-6.
- Radford-Smith, G., Edwards, G., & Purdie, D.** (2002, Dezember). Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, *51* (6), pp. 808-13.
- Rath, H., Herfarth, H., Ikeda, J., Grentner, W., Hamm, T. J., Balish, E., et al.** (1996, August). Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest*, *98* (4), pp. :945-53.
- Rhee, S., Im, E., Riegler, M., Kokkotou, E., O'Brien, M., & Pothoulakis, C.** (2005, September). Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102* (38), pp. 13610-5.
- Rosenstiel, P., Fantini, M., Bräutigam, K., Kühbacher, T., Waetzig, G., Seeger, D., et al.** (2003, April). TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, *124* (4), pp. 1001-9.
- Ruemmele, F., Targan, S., Levy, G., Dubinsky, M., Braun, J., & Seidman, E.** (1998, Oktober). Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *115* (4), pp. 822-9.
- Russel, R., & Satsangi, J.** (2004, Juni). IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *18* (3), pp. 525-39.
- Rutgeerts, P., & Vermeire, S.** (1998, Oktober). Clinical value of the detection of antibodies in the serum for diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *115* (4), pp. 1006-9.
- Sandborn, W., Landers, C., Tremaine, W., & Targan, S.** (1995, Mai). Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol*, *90* (5), pp. 740-7.
- Sartor, R.** (2000). Colitis in HLA-B27/beta 2 microglobulin transgenic rats. *Int Rev Immunol*, *19* (1), pp. 39-50.
- Sartor, R.** (1997, Oktober-Dezember). The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol*, *148* (8-9), pp. 567-76.
- Schack-Nielsen, L., & Michaelsen, K.** (2006, Mai). Breast feeding and future health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *9* (3), pp. 289-96.



- Schwieger, F.,** & Tebbe, C. (1998, Dezember). A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol*, *64* (12), pp. 4870-6.
- Seksik, P.,** Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., et al. (2003, Februar). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, *52* (2), pp. 237-42.
- Sellon, R.,** Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L., Grenther, W., Balish, E., et al. (1998, November). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, *66* (11), pp. 5224-31.
- Selsted, M.,** & Ouellette, A. (2005, Juni). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, *6* (6), pp. 551-7.
- Sendid, B.,** Quinton, J., Charrier, G., Goulet, O., Cortot, A., Grandbastien, B., et al. (1998, August). Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, *93* (8), pp. 1306-10.
- Shanahan, F.** (2002, Januar). Crohn's disease. *Lancet*, *395* (9300), pp. 62-9.
- Shanahan, F.** (2000, Mai). Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis*, *6* (2), pp. 107-15.
- Shanahan, F.** (2001, Mai). Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut*, *48* (5), p. :609.
- Simon, G.,** & Gorbach, S. (1984, Januar). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*, *86* (1), pp. 174-93.
- Smalla, K.,** Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., et al. (2001, Oktober). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*, *67* (10), pp. 4742-51.
- Smit, E.,** Leeftang, P., Glandorf, B., van Elsas, J., & Wernars, K. (1999, Juni). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, *65* (6), pp. 2614-21.
- Smithson, J.,** Campbell, A., Andrews, J., Milton, J., R, P., & Jewell, D. (1997, Februar). Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. *Gut*, *40* (2), pp. 234-40.
- Srikrishna, G.,** Turovskaya, O., Shaikh, R., Newlin, R., Foell, D., Murch, S., et al. (2005, Oktober). Carboxylated glycans mediate colitis through activation of NF-kappa B. *J Immunol*, *175* (8), pp. 5412-22.
- Steinman, R.,** Hawiger, D., & Nussenzweig, M. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* (21), pp. 685-711.
- Sullivan, A.,** & Nord, C. (2002, November). The place of probiotics in human intestinal infections. *Int J Antimicrob Agents*, *20* (5), pp. 313-9.
- Sutton, C.,** Yang, H., Li, Z., Rotter, J., Targan, S., & Braun, J. (2000, Januar). Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in affected and unaffected relatives of patients with Crohn's disease. *Gut*, *46* (1), pp. 58-63.
- Swidsinski, A.,** Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., et al. (2002, Januar). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *122* (1), pp. 44-54.
- Tamboli, C.,** Neut, C., Desreumaux, P., & Colombel, J. (2004, Juli). Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut*, *53* (7), p. 1057.

- Tebbe, C.**, Schmalenberger, A., Peters, S., & Schwieger, F. (2001). Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for Microbial Community Analysis. In P. A. Rochelle (Ed.), *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* (Vol. 18, pp. 161–175). Wymondham, UK: Horizon Scientific Press.
- Thompson, N.**, Driscoll, R., Pounder, R., & Wakefield, A. (1996, Januar). Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ*, *312* (7023), pp. 95-6.
- Tysk, C.**, Lindberg, E., Jarnerot, G., & Floderus-Myrhed, B. (1988, Juli). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, *29* (7), pp. 990-6.
- Vainio, E.**, & Hantula, J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res*, *104* (8), pp. 927-936.
- Valinsky, L.**, Della Vedova, G., Jiang, T., & Borneman, J. (2002, Dezember). Oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes for analysis of fungal community composition. *Appl Environ Microbiol*, *68* (12), pp. 5999-6004.
- van de Wal, Y.**, Corazza, N., Allez, M., Mayer, L., Iijima, H., Ryan, M., et al. (2003, Mai). Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, *124* (5), pp. 1420-31.
- Van den Brande, J.**, Braat, H., van den Brink, G., Versteeg, H., Bauer, C., Hoedemaeker, I., et al. (2003, Juni). Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, *124* (7), pp. 1774-85.
- van Elsas, J.**, Duarte, G., Keijzer-Wolters, A., & Smit, E. (2000, Dezember). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*, *43* (2), pp. 133-51.
- Veldhoen, M.**, Hocking, R., Atkins, C., Locksley, R., & Stockinger, B. (2006, Februar). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, *24* (2), pp. 179-89.
- Waidmann, M.**, Bechtold, O., Frick, J., Lehr, H., Schuber, t. S., Dobrindt, U., et al. (2003, Juli). *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, *125* (1), pp. 162-77.
- Walker, L.**, Aldhous, M., Drummond, H., Smith, B., Nimmo, E., Arnott, I., et al. (2004, März). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clin Exp Immunol*, *135* (3), pp. 490-6.
- Wang, H.**, Yu, M., Ochani, M., Amella, C., Tanovic, M., Susarla, S., et al. (2003, Januar). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, *421* (6921), pp. 384-8.
- Watanabe, T.**, Kitani, A., Murray, P., & Strober, W. (2004, August). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*, *5* (8), pp. 800-8.
- Wehkamp, J.**, Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., et al. (2004, Oktober). NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun*, *72* (10), pp. 5750-8.

- Wehkamp, J.**, Schmid, M., & Stange, E. (2007, Juli). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* , 23 (4), pp. 370-8.
- Wenderoth, D.**, & Reber, H. (1999, März). Correlation between structural diversity and catabolic versatility of metal-affected prototrophic bacteria in soil. *Soil Biology and Biochemistry* , 31 (3), pp. 345-352.
- Wilks, S.** (1859). Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *Lond Med Gaz* (2), pp. 264-265.
- Wilson, K.**, & Blitchington, R. (1996, Juli). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* , 62 (7), pp. 2273-8.
- Woese, C.** (1987, Juni). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* , 51 (2), pp. 221-71.
- Woese, C.**, & Fox, G. (1977, November). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 74 (11), pp. 5088-90.
- Zeissig, S.**, Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., et al. (2007, Januar). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* , 56 (1), pp. 61-72.
- Zheng, J.**, Zhu, X., Huangfu, Z., Gao, Z., Guo, Z., & Wang, Z. (2005). Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis* , 6 (4), pp. 175-81.
- Zoetendal, E.**, von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A., & de Vos, W. (2002, Juli). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* , 68 (7), pp. 3401-7.

## 8. Tabellenverzeichnis

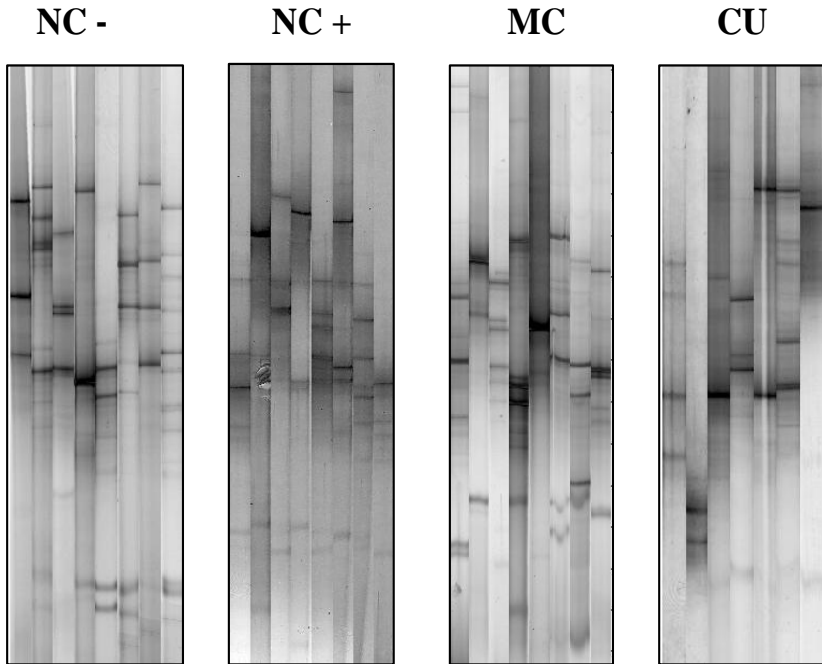
<b>Tabelle 1:</b>	Evidenz für die Beteiligung mikrobieller Faktoren an den CED
<b>Tabelle 2:</b>	Übersicht der verwendeten Primer
<b>Tabelle 3 :</b>	Verwendete Zellen für die Klonierung
<b>Tabelle 4:</b>	Charakteristika der untersuchten Patienten
<b>Tabelle 5:</b>	Färbeprozedur der DGGE-Gele
<b>Tabelle 6:</b>	Auswertung der Klonbibliotheken
<b>Tabelle 7:</b>	Statistischer Vergleich der Klonbibliotheken

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Aufbau der nukleären ribosomalen DNA
<b>Abbildung 2:</b>	18S rDNA DGGE-Profile von jeweils 8 Patienten mit MC, CU, NC- und NC+
<b>Abbildung 3:</b>	Position der Primer NS0/EF3 und NS1/FR1 auf der 18S-rDNA
<b>Abbildung 4:</b>	Original DGGE-Gel mit genetischen Profil der Pilzflora von 12 Probanden der Morbus Crohn-Studiengruppe.
<b>Abbildung 5:</b>	Vergleich der Bandenanzahl und der Diversitätsindices der DGGE-Profile aller Studiengruppen (MC, CU, NC+ und NC-).
<b>Abbildung 6:</b>	Vergleich der Bandenanzahl und der Diversitätsindices exemplarisch für MC-Patienten mit Glukokortikoidbehandlung (n=14) und ohne (n=17)
<b>Abbildung 7:</b>	Häufigkeit an Pilz- Signalen (durchschnittliche Anzahl pro Gesichtsfeld) in einer Patientenuntergruppe (Kontrollen n=5, MC n=5, CU n=5)
<b>Abbildung 8:</b>	In-situ-Hybridization und FISH von mukosaadhärenten Pilzen

## 10. Anhang

Abbildung 2:



**Abbildung 2:** Dargestellt sind 18S rDNA DGGE-Profile von jeweils 8 Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) sowie den entzündlichen (NC+) sowie nicht entzündlichen Normalkontrollen (NC-). Die Anfertigung der Klonbibliotheken erfolgte aus gepoolter DNA dieser Proben.

**Tab 2:** Übersicht der verwendeten Primer

Anwendung	Primer	Richtung	Position	Sequenz (5' - 3')	Referenz
Pre-PCR	NS0	vorwärts		TACCTGGTTGATCCTGCC	(Smit et al, 1999)
Pre-PCR	EF3	rückwärts	1653-73	TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	(Smit et al, 1999)
Sequenzierung	M13 (21)	vorwärts	389-404 <sup>b</sup>	TGTAAAACGACGGCCAGT	(Guttman et al.,1998)
Sequenzierung	M13 (24)	rückwärts	205-21 <sup>b</sup>	AACAGCTATGACCATG	(Guttman et al.,1998)
DGGE/Klonierung	NS1	vorwärts	19-38 <sup>a</sup>	GTAGTCATATGCTTGCTC	(Vainio & Hantula, 2000)
DGGE/Klonierung	FR1-GC	rückwärts	1572-1589 <sup>a</sup>	CCCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGC GGGGC ACGGGCCGAICCATTC AATCGGTAIT	(Vainio & Hantula, 2000)

Anwendung	Primer	Richtung	Position	Sequenz (5' - 3')	Referenz
Sequenzierung	BF2	vorwärts	316-334 <sup>a</sup>	ACTTTCGATGGTAGGATAG	(Makimura et al, 1994)
Sequenzierung	TR1 <sup>c</sup>	rückwärts	838-856 <sup>a</sup>	TACGGCGGCCTAGAAAC	(Bock et al., 1994)
Quantitative PCR	TPU1	vorwärts	8-27 <sup>c</sup>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Ott et al., 2004)
Quantitative PCR	RTU8	Rückwärts	1522-41 <sup>c</sup>	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	(Ott et al., 2004)

<sup>a</sup>Position im Vergleich zu einer *Saccharomyces cerevisiae* Referenzsequenz      <sup>b</sup> Ansatz der M13 Primer auf dem pCR<sup>TM</sup> 2.1 plasmid Vector

<sup>c</sup> Position im Vergleich zu einer *Escherichia coli* Referenzsequenz

**Tab 4: Charakteristika der untersuchten Patienten**

	<b>Nicht-entzündliche Kontrollen*</b>	<b>entzündliche Kontrollen<sup>†</sup></b>	<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
	<b>(n=32)</b>	<b>(n=15)</b>	<b>(n=31)</b>	<b>(n=26)</b>
Durchschnittsalter (Jahre)	50(24-74)	50(20-82)	34(16-56)	42(23-74)
Geschlechterverhältnis (m/w)	9/23	6/9	13/18	17/9
Lokalisation				
Rechtes Kolon	30	6	20	12
Linkes Kolon	2	9	12	18
Therapie				
Kortikosteroide	0	0	14	8
Purinanaloga	0	0	2	1
5-ASA	0	0	4	14
Spezifische Krankheitsaktivität	-	-	CDAI>150	CAI>4

\*beinhaltet Patienten ohne verdächtige makroskopische oder histologische Befunde (n=21), Patienten mit Divertikulose (n=7) und Patienten mit Darmpolypen (n=4)

<sup>†</sup> beinhaltet Patienten mit Kolitis unklarer Genese (n=2), unklarer Diarrhoe (n=5), infektiöser Diarrhoe (n=7) und Patienten mit Strahlenkolitis (n=1)



**Tabelle 6: Auswertung der Klonbibliotheken (Ascomycetes)**

Nächste Verwandte in NCBI	Zugangs- nummer	C -	C+	MC	CU	Stuhl	Stamm
		n=86	n=87	n=85	n=80	n=83	
Uncultured ascomycete	AY934714	16	5	4			A
Dothideomycete sp.	AY934695	11	6		1		A
Galactomyces geotrichum	AY934691	6		1			A
Candida albicans	AY934693	5	13			2	A
Septoria epambrosiae	AY934687	4					A
Candida dubliensis	AY934688	4	7				A
Botryotinia fuckeliana	AY934724	2			7		A
Paraphaeosphaeria filamentosa	AY934684	2					A
Cladosporium cladosporioides	AY934700	1	6	1		2	A
Candida austromarina	AY934692	1		4			A
Raciborskiomyces longisetosum	AY934721	1	6		1		A
Sclerotium sp.	AY934712	1	3	1	2		A
Yarrowia lipolytica	AY934698		3				A
Fusarium oxysporum	AY934681		4				A
Madurella mycetomatis	AY934710			1			A
Sirococcus conigenus	AY934704			2			A

Nächste Verwandte in NCBI	Zugangs- Nummer	C -	C+	MC	CU	Stuhl	Stamm
		n=86	n=87	n=85	n=80	n=83	
<i>Pleospora herbarum</i>	AY934725				12		A
<i>Penicillium italicum</i>	AY934701			4		27	A
<i>Penicillium sacculum</i>	AY934730			4		9	A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AY934732					16	A
<i>Penicillium glabrum</i>	AY934729					12	A
Uncultured fungal sp.	AY934734					4	A
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	AY934727					3	A
<i>Candida glabrata</i>	AY934731					3	A
<i>Penicillium verruculosum</i>	AY934726					1	A
<i>Saccharomyces bayanus</i>	AY934733					1	A

C - = nicht entzündliche Kontrollen, C + = entzündliche Kontrollen , MC=Morbus Crohn, CU=Colitis ulcerosa, A = Ascomycetes,; Zugangsnummer laut GenBank

Fortsetzung Tabelle 6: Auswertung der Klonbibliotheken (Basidiomycetes)

Nächste Verwandte in NCBI	Zugangs- Nummer	C -	C+	MC	CU	Stuhl	Stamm
		n=86	n=87	n=85	n=80	n=83	
<i>Ustilago</i> sp.	AY934683	6		2			B
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AY934690	6		1			B
<i>Cryptococcus carnescens</i>	AY934685	4					B
Uncultured basidiomycete	AY934694	4	7	15	4	1	B
<i>Bullera crocea</i>	AY934696	4		7			B
<i>Exidiopsis calcea</i>	AY934682	3		2			B
<i>Ustilago maydis</i>	AY934703	3		2			B
Uncultured ustilaginomycete	AY934706	2	4	3			B
<i>Cystofilobasidium capitatu</i>	AY934699		10				B
<i>Fomitopsis pinicola</i>	AY934697		9				B
<i>Trichosporon dermatis</i>	AY934708			2			B
<i>Tricholoma saponaceum</i>	AY934702			1			B
<i>Sporolobomyces yunnanensis</i>	AY934711			5			B
<i>Trametes versicolor</i>	AY934720			1	15		B
<i>Graphiola phoenicis</i>	AY934715			1			B

Nächste Verwandte in NCBI	Zugangs- Nummer	C -	C+	MC	CU	Stuhl	Stamm
		n=86	n=87	n=85	n=80	n=83	
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	AY934722			11	15		B
<i>Dacrymyces</i> sp.	AY934719				3		B
<i>Filobasidium globisporum</i>	AY934717				6		B
<i>Flammulina velutipes</i>	AY934718				3		B

C - = nicht entzündliche Kontrollen, C + = entzündliche Kontrollen , MC=Morbus Crohn, CU=Colitis ulcerosa, B = Basidiomycetes; Zugangsnummer laut GenBank

## 11. Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name	:	Oliver Drews
Geburtsdatum	:	14.03.1978
Geburtsort	:	Lübeck
Eltern	:	Dr. med. Michael Drews Gisela Drews, geb. Johannsen

### Ausbildungsdaten:

1984-1988	Grundschule Tanneck, Mölln
1988-1997	Lauenburgische Gelehrtenschule, Ratzeburg
Juni 1997	Abitur
1997-1998	Wehrdienst, Boostedt
1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 2000	Ärztliche Vorprüfung
September 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
2004-2005	Praktisches Jahr (Wahlfach Orthopädie)
Mai 2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
Juli 2005	Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, Johanniter Krankenhaus Geesthacht
Januar 2008	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie, Johanniter Krankenhaus Geesthacht
Juli 2008	Weiterbildungsassistent im Bereich Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Michael Drews, Mölln

## **12. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. med. S. Schreiber, der mit der freundlichen Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in den Räumen des Instituts für Klinische Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie aller notwendigen Mittel diese Arbeit möglich gemacht hat.

Zu großem Dank bin ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Stephan Ott verpflichtet. Seinem großen Einsatz bei der Betreuung dieser Arbeit und seinem fachlichen Rat ist es zu verdanken, dass diese Arbeit in der vorliegenden Form möglich war.

Für die tatkräftige Hilfe möchte ich mich bei den vielen Labormitarbeitern, insbesondere Frau Maïke Barche, bedanken, welche mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützten und bei Rückschlägen ermutigten. Ohne ihre stetige Hilfe wäre mein bisheriger Werdegang und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau Maïke, die mich ebenfalls zu jedem Zeitpunkt unterstützt und ermutigt hat.