

Struktur-Funktions-Analyse der Darmbakterien mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Bakterien sind im Magen und Dünndarm Konkurrenten des Wirtes und unerwünscht. Sie werden durch Magensäure, Defensine, Fikoline und andere Mechanismen eliminiert. Bei anhaltender Zufuhr von Bakterien durch Speiseaufnahme ist eine komplette Sterilisierung unmöglich. Deswegen finden sich im Dünndarm episodisch Mikroorganismen in geringen Konzentrationen. Eine konstante Besiedlung des Magens oder des Dünndarms (*Helicobacter pylori*, *E.coli*, *Salmonella* etc.) ist stets ein Hinweis auf eine Krankheit oder Infektion. Die Situation ist im Dickdarm völlig anders. Dort werden unverdauliche Substanzen durch Mikroorganismen fermentiert, Wasser und Elektrolyte zurück gewonnen. Bakterien werden im Wachstum gefördert und erreichen im Dickdarm eine Konzentration von über 10^{12} /ml. Die Effektivität des Dickdarm-Bioreaktors ist hoch. Zum Vergleich: Bioreaktoren zur Produktion von Insulin oder Wachstumshormon erreichen auf der Höhe ihrer Leistung gerade 10^{10} Bakterien/ml.

Die Förderung des Biowachstums im Dickdarm hat ihren Preis. Die optimalen Bedingungen locken viele und nicht nur fermentierende Bakterien an. Moderne molekulargenetische Methoden zeigen die Anwesenheit von über 5000 verschiedenen Bakterienarten im Dickdarm jedes Menschen. Man kann mit Gewissheit sagen, dass die meisten dieser Spezies mit der Fermentation nichts zu tun haben. Ein Grossteil der „normalen“ Darmflora ist zufällig, viele Mikroorganismen sind darüber hinaus eindeutig pathogen. *Clostridium perfringens* (Gasbrand), *Bacteroides* (Abszesse), *E.coli* (Sepsis), Enterokokken (Endokarditis) sind in hohen Konzentrationen im Dickdarm jedes Menschen zu finden.

Der Mensch lebt unbeschwert mit der explosiven (Bakterien-) Mischung, da bei Gesunden die Mukus-Schicht Bakterien von der Darmwand vollständig trennt (Gastroenterology 2002). Durch den Entzug von Wasser und Elektrolyten wird die Mukusschicht auf der dem Epithel zugewandten Seite steinhart und undurchdringlich für Bakterien (IBD 2005). Auf der dem Darmlumen zugewandten Seite ist der Mukus aufgeweicht. Bakterien sind hierin gefangen und bilden eine Keimschicht, die nach Perioden des Fastens, einer antibiotischen Therapie oder Durchfalls zur Bestückung des Bioreaktors dient und die Stabilität der Biofermentation über Jahrzehnte ermöglicht. Solange die Mukusbarriere und die Keimzone intakt sind, geht es dem Wirt und Bakterien gut: es sind keine Zeichen der Entzündung in der Darmwand zu finden, Bakterien erreichen die oben erwähnten astronomischen Konzentrationen (Gastro Clin Biol 2010). Bei Störungen der Mukusbarriere kommt es sowohl zur Wirtreaktion auf durchwandernde Pathogene, als auch zu Einbrüchen des Bakterienwachstums. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist neben der defekten Mukusbarriere und Störungen der Biofermentation auch die Keimschicht zerstört (IBD 2008).

Die Untersuchung der bakteriellen Durchwanderung der Mukosa und der Konzentrationsverschiebungen der Biofermentation war bisher sehr schwierig. Die Vielfalt von über 5000 Bakterienarten macht die individuelle Analyse ihrer quantitativen und qualitativen Zusammensetzung mit Methoden wie bakteriologischer Kultur oder PCR extrem kostspielig. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Bakterien nicht homogen verteilt, sondern räumlich in diskrete funktionelle Bereiche eingeteilt sind. Die Bakterienkonzentrationen schwanken hier je nach Region zustands- und krankheitsabhängig. PCR oder Kultur erlauben aber keine Aussage zu den Verteilungsgradienten und somit zu dem funktionellen Zustand. Die Situation änderte sich mit der Etablierung der 16SRNA Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).

FISH erlaubt nicht nur die Identifizierung und Quantifizierung von Bakteriengruppen und Spezies, sondern auch die Beurteilung ihrer räumlichen Organisation im Verhältnis zur Mukosa, dem Mukus, der Keimschicht und biofermentativen Region. Hiermit werden Struktur und Funktion in Beziehung gebracht. Die Struktur-Funktions-Analyse enteraler Mikrobiota ist sowohl in Biopsien als auch in Stuhlproben möglich. Die Untersuchung von Biopsien ermöglicht es, pathogene Bakterien (*AIEC*, *Brachyspira*, *Fusobakterien*, *Hp*. etc.) direkt am Eintrittsort zu identifizieren und das Ausmaß der unspezifischen Störung der Mukusbarriere sowie der lokalen Wirtsreaktion zu ermitteln (JCM 2005).

Jede Biopsie stellt jedoch nur einen isolierten Zeitpunkt in der Geschichte der Erkrankung und Ausdehnung des Befundes dar. Der Mukus, die Keimschicht und die fermentative Region sind auch im Stuhl klar abgrenzbar. Die Untersuchung nativer Stuhlzylinder ermöglicht eine nicht invasive longitudinale Struktur-Funktions-Analyse der Darmbakterien, die an den Verlauf der Erkrankung angepasst ist. Drei im Abstand von 2 bis 4 Wochen entnommene Stuhlzylinder ermöglichen die Diagnose von aktiven Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa mit einer Sensitivität und Spezifität von nahezu 95% Prozent. Da dabei die Aktivität der Erkrankung direkt erkennbar ist, ist die Methode ebenfalls zum Monitoring und zur Gestaltung der Therapie einsetzbar, was gegenwärtig in der Ambulanz der Charité bereits routinemäßig erfolgt.