

**Quantifizierung des Bakteriums *Oxalobacter formigenes* in Faeces
mittels real-time quantitative polymerase chain reaction und Auswirkungen auf
ausgewählte Risikofaktoren der Calcium-Oxalat Urolithiasis.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Marie Barbara Pfingsten
aus Attendorn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. Dr. S.C. Müller
2. Gutachter: Professor Dr. Th. Minor

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.10.2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. Dr. med. S.C. Müller

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

**Meiner Familie
und Volker**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	8
2. Grundlagen über <i>Oxalobacter formigenes</i> und den Oxalat-Stoffwechsel	10
2.1 Oxalat.....	10
2.2 <i>Oxalobacter formigenes</i>	10
2.3 Auswirkungen von <i>Oxalobacter f.</i> auf den menschlichen Organismus.....	12
2.4 Häufigkeit physiologischer Besiedlung	14
2.5 Der Nachweis von <i>Oxalobacter f.</i>	15
2.5.1 Kultivierung des Bakteriums	15
2.5.2 Oxalat-Abbau (oxalate degradation)	15
2.5.3 PCR (polymerase chain reaction)	16
2.5.4 PCR-basierter Assay	19
2.5.5 Quantitativ Competitive – PCR (QC-PCR)	21
2.5.6 real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)	24
3. Eigene Untersuchungen	25
3.1 Ein Überblick über die Vorgehensweise.....	25
4. Material und Methoden.....	26
4.1 Patientenkollektiv und Probengewinnung	26
4.2 [¹³ C ₂] Oxalat-Absorption und renale Oxalat-Exkretion.....	29
4.2.1 [¹³ C ₂] Oxalat-Absorption	29
4.2.2 renale Oxalat-Exkretion	30

4.3	Aufreinigung der DNA	30
4.3.1	Kurze Erläuterung der Methode	30
4.3.2	Durchführung der DNA-Aufreinigung	30
4.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
4.5	Isolierung des Standardmaterials	33
4.5.1	Herkunft der Reinkultur	33
4.5.2	Aufbereitung der DNA der Reinkultur und Erstellung einer Eichkurve	33
4.6	real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)	34
4.6.1	Erläuterung der Methode	34
4.6.2	Die Quantifizierung bei der RTQ-PCR	35
4.6.3	Qualitätskontrolle durch die Schmelzkurve	38
4.6.4	Verwendete Produkte	39
4.6.5	Durchführung der RTQ-PCR	41
4.7	Evaluierung der Methode.....	43
5.	Auswertung und Ergebnisse	45
6.	Diskussion.....	50
6.1	Wahl der geeigneten Bezugsgröße.....	62
6.2	Probennahme und Lagerung	64
6.3	Probenhomogenität	66
6.4	Verdünnungsparallelismus.....	67
6.5	Interpretation der Probenergebnisse	67
6.5.1	Besiedlung mit <i>Oxalobacter f.</i> insgesamt und im Bezug auf die Steinhäufigkeit	67
6.5.2	<i>Oxalobacter f.</i> und sein Einfluss auf den Oxalat-Stoffwechsel	69
6.5.3	Auswertung der quantitativen Ergebnisse für <i>Oxalobacter f.</i>	70
7.	Zusammenfassung.....	73

8.	Anhang.....	75
8.1	Detaillierte Ergebnisse.....	75
8.2	Anleitung zur Probenentnahme.....	77
9.	Literatur.....	78
	Danksagung.....	81

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
CaOx	Calcium-Oxalat
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser (= DNase freies Wasser)
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
frc	Formyl-Coenzym-A-Transferase
Fp	<i>forward primer</i>
HS	CaOx-Harnsteinpatienten
KOx	Kalium-Oxalat
MC	<i>Morbus Crohn</i>
MW	Mittelwert
<i>Oxalobacter f.</i>	<i>Oxalobacter formigenes</i>
Oxc	Oxalyl-Coenzym-A-Decarboxylase
OxIT	Oxalat-Formiat-Antiporter
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RNA	<i>ribonucleid acid</i> (Ribonukleinsäure)
rp	<i>reverse primer</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit gibt eine Übersicht über die klinische Bedeutung von *Oxalobacter formigenes*, einem die intestinale Oxalataufnahme im menschlichen Körper beeinflussenden Organismus. Dieses Darmbakterium ist Grundlage vieler wissenschaftlicher Arbeiten, insbesondere in urologischen Disziplinen, aber auch in der Mikrobiologie. Es hat durch seine potentielle Rolle bei der Prophylaxe der Calciumoxalat (CaOx)-Urolithiasis (CaOx-Harnsteinleiden) großes Interesse auf sich gezogen.

Die CaOx-Urolithiasis ist eine in der westlichen Welt weit verbreitete Erkrankung, die 5% der Bevölkerung, häufig rezidivierend, betrifft (Riede, 1999). Da oft eine stationäre Behandlung zur Entfernung des Konkrementes aus dem Harntrakt notwendig wird, bedeutet dies neben einer sehr hohen psychischen Belastung des Patienten auch ein großes sozioökonomisches Problem. Deswegen ist es in vielerlei Hinsicht notwendig eine wirksame Prophylaxe der CaOx-Urolithiasis zu erforschen.

Am häufigsten, in etwa 60% der Fälle, bestehen die Konkreme aus Calcium-Oxalat (CaOx). Ihre Entstehung wird multifaktoriell beeinflusst. Die Konzentration der im Urin gelösten Salze wird durch Dehydratation gesteigert, eine gastrointestinale Erkrankung, zum Beispiel *Morbus Crohn*, fördert die Resorption von Oxalat. Weiterhin haben der Urin-pH und die Einnahme bestimmter Medikamente einen Einfluss auf die Löslichkeit der Salze (Riede, 1999). Die größte Rolle für die Entstehung von CaOx-Konkrementen spielt die Oxalat-Konzentration im Urin, ist diese erhöht (Hyperoxalurie) gilt dies als wichtiger Risikofaktor. Sie ist abhängig von der Oxalat-Absorption im Darm und der Ausscheidung über die Niere (Robertson, 1993).

Die Oxalat-Konzentration im Urin kann zum einen durch eine verminderte Zufuhr des Minerals mit der Nahrung, also durch den Verzicht auf stark oxalathaltige Lebensmittel, wie Spinat oder Rote Beete eingeschränkt werden. Zusätzlich sollte auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr geachtet werden. Oft reichen diese diätetischen Maßnahmen allerdings nicht aus um CaOx-Harnsteinrezidive zu verhindern. Dann gibt es noch die Möglichkeit auf eine medikamentöse Therapie auszuweichen. So vermindert zum Beispiel eine Magnesium oder Calcium-

Supplementation der Nahrung die Aufnahme des Nahrungsoxalates durch Komplexbildung im Darm (Berg, 1994; Curhan, 1993).

Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Prophylaxe von CaOx-Urolithiasis über die Gabe oxalat-degradierender Bakterien, wie *Oxalobacter f.* (Hoppe et al., 2003; Hoppe et al., 2005a; Hoppe et al., 2005b). Bis dato wurden erfolgreiche Versuche unternommen das Bakterium, oder das in ihm enthaltene oxalatabbauende Enzym, in Tierversuchen und später bei CaOx-Harnsteinpatienten zu substituieren, um die Oxalat-Konzentration im Harntrakt zu vermindern und damit auch die Häufigkeit der Rezidive.

Nachdem sich mehrere Arbeitsgruppen mit seiner Herkunft und Wirkungsweise beschäftigt haben, wird zunehmend deutlich, dass der Einfluss von *Oxalobacter f.* auf die Bildung von CaOx-Harnsteinen auch von der nachgewiesenen Menge im Darm abhängt.

Bis jetzt wurden Mengen des Bakteriums nur semiquantitativ in CFU (colony forming units) angegeben. Deswegen wird in dieser Studie eine relativ neue Methode zur Detektion von DNA, die real-time quantitative PCR (RTQ-PCR), zum Nachweis dieses Bakteriums genutzt, und erläutert wo deren Stärken und Schwächen liegen. Dieses Verfahren erlaubt zum ersten Mal genaue, quantitative Aussagen über das Vorkommen von *Oxalobacter f.* im menschlichen Darm. Weiterhin wird auf die klinischen Konsequenzen eingegangen, die sich aus den Messungen ergeben und die sich daraus eventuell ergebenden therapeutischen Optionen, die das Bakterium bietet.

2. Grundlagen über *Oxalobacter formigenes* und den Oxalat-Stoffwechsel

2.1 *Oxalat*

Oxalat ist zum einen ein Abbauprodukt des Körperstoffwechsels und andererseits ein herkömmlicher Bestandteil der Nahrung, der von außen (exogen) zugeführt wird. Es ist ein organisches Anion, das im menschlichen Körper durch aktive Sekretion, über die proximalen Tubuli der Niere, ausgeschieden wird (Silbernagel, 2000). Entgegen früherer Meinungen, nach denen das Oxalat im Körper zu 80% aus körpereigenen (endogenem) Oxalat besteht, zeigen neuere Forschungen, dass der mit der Nahrung aufgenommene, exogene Anteil bis zu 50% des täglich mit dem Urin ausgeschiedenen Oxalats, und somit auch des im Körper befindlichen Oxalats, ausmacht (Holmes et al., 1995).

Die Akkumulation von Oxalat im Körper kann zu verschiedenen pathologischen Zuständen führen, so zum Beispiel Hyperoxalurie, Kardiomyopathie, kardialen Überleitungsstörungen oder Nierensteinen aus Calcium-Oxalat. Es gibt auch mehrere insbesondere chronische Krankheiten wie *Morbus Crohn*, *Steatorrhoe*, *Jejunaler Bypass* oder *Zystische Fibrose (Mukoviszidose)*, welche aufgrund gestörter Resorptionsmechanismen im Colon mit vermehrter Oxalataufnahme einhergehen (Sidhu et al., 1997b).

Aufgrund der Toxizität von Oxalat wurde das Interesse für seine intestinalen Aufnahmemechanismen geweckt, und bald auf *Oxalobacter f.* gelenkt. Ein Darmbakterium, welches auf Grund seiner oxalat-degradierenden Enzyme möglicherweise eine Bedeutung für die intestinale Oxalat-Aufnahme hat.

2.2 *Oxalobacter formigenes*

Der Strang OxB eines obligat anaeroben und Oxalat abbauenden Bakteriums wurde zuerst von Dawson aus dem Pansen eines Schafes angereichert und isoliert, später konnten die selben Bakterien auch in Schweinen, Ratten, Sedimenten und der Faeces von Menschen nachgewiesen werden (Dawson et al., 1980). Diese Stränge wurden als neue Spezies erkannt und wegen ihres untereinander sehr ähnlichen Aufbaus in nur zwei Untergruppen (I und II) unterteilt (Allison et al., 1985).

Es wurde festgestellt, dass Oxalat das einzig verwertete Substrat von *Oxalobacter f.* darstellt und innerhalb des Bakteriums zu fast äquimolaren Mengen CO_2 und Formiat abgebaut wird. Es werden dabei ungefähr 1,1 g Zellmaterial von *Oxalobacter f.* pro Mol verbrauchten Oxalats synthetisiert (Dawson et al., 1980).

Zur Aufnahme des Oxalats besitzt *Oxalobacter f.* einen Oxalat-Formiat-Antiporter (OxIT) (Maloney et al., 1992). Das Substrat wird dann intrazellulär durch Übertragung des Coenzyms A (CoA) von Formyl-CoA mittels des Enzyms Formyl-CoA-Transferase (*frc*) zu Oxalyl-CoA aktiviert. Dann folgt die Decarboxylierung zu CO_2 und Formyl-CoA durch die Oxalyl-CoA-Decarboxylase (*oxc*). Bei diesem Schritt wird ein Proton verbraucht und über den so entstehenden Protonengradienten kann ATP synthetisiert werden. Das entstehende CO_2 diffundiert aus der Zelle während Formyl-CoA, nach Übertragung des CoAs an Oxalat, über den OxIT die Zelle verlässt (siehe Abbildung 1).

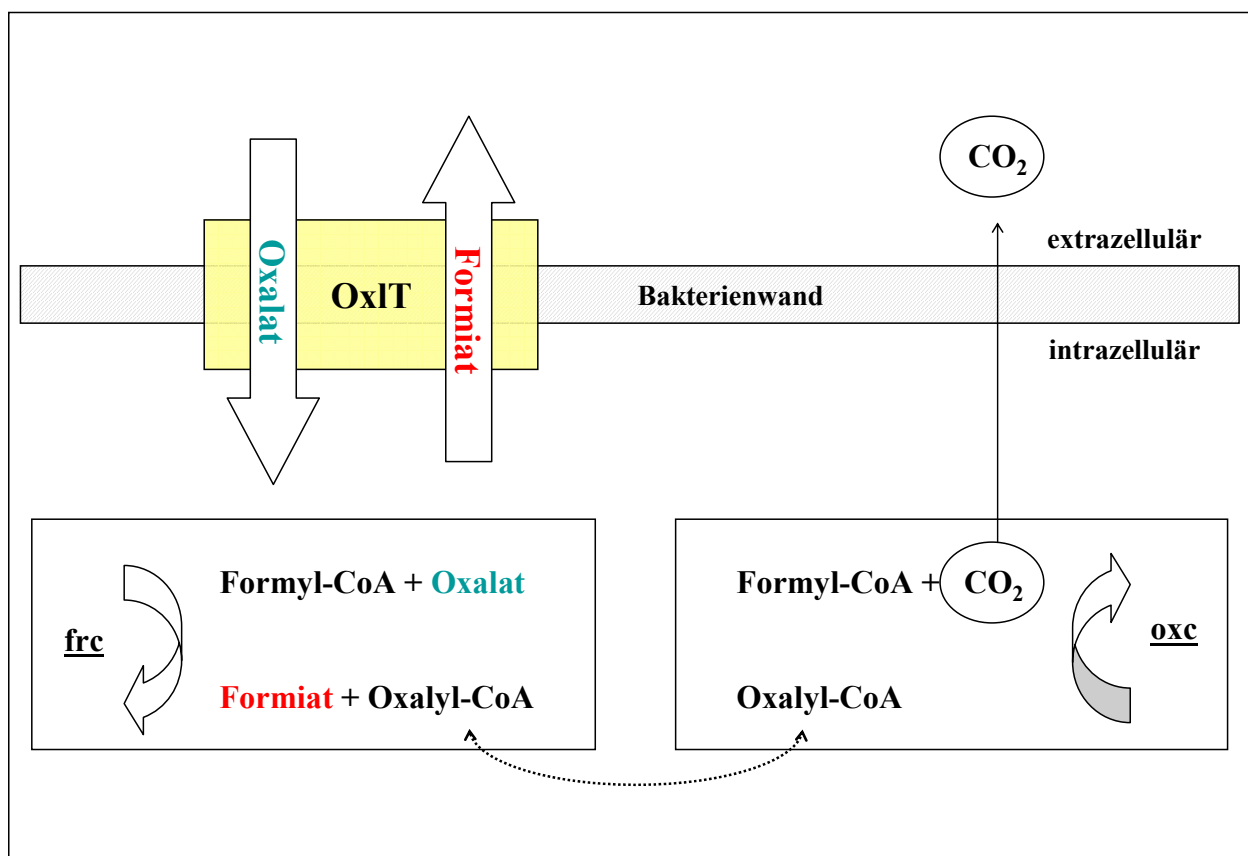


Abbildung 1: Mechanismus des Oxalatabbaus in *Oxalobacter f.* auf zellulärer Ebene. Oxalat wird aufgenommen und zu CO_2 und Formiat degradiert, (*oxc* = Oxalyl-CoA-Decarboxylase, *frc* = Formyl-CoA-Transferase, OxIT = Oxalat-Formiat-Antiporter).

2.3 Auswirkungen von *Oxalobacter f.* auf den menschlichen Organismus

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Mechanismen wird Oxalat im Colon gespalten und hierdurch die Konzentration exogenen Oxalats im Darm und dessen Diffusion ins Blut erniedrigt. Diese Tatsache ist hinreichend durch verschiedene Studien belegt (Kleinschmidt et al., 1994; Kwak et al., 2003).

Vermutet wird, dass insbesondere bei starker Hyperoxalurie auch die transepitheliale Elimination von Plasmaoxalat verbessert wird, da ein Konzentrationsgradient in Richtung Darmlumen entsteht und die Sekretion von Oxalat aus dem Blut in das Darmlumen hierdurch erleichtert wird. Alles zusammen führt zu einer Erniedrigung des Plasma-Oxalats und damit auch zu einer reduzierten Oxalat-Konzentration im Harn (siehe Abbildung 2)

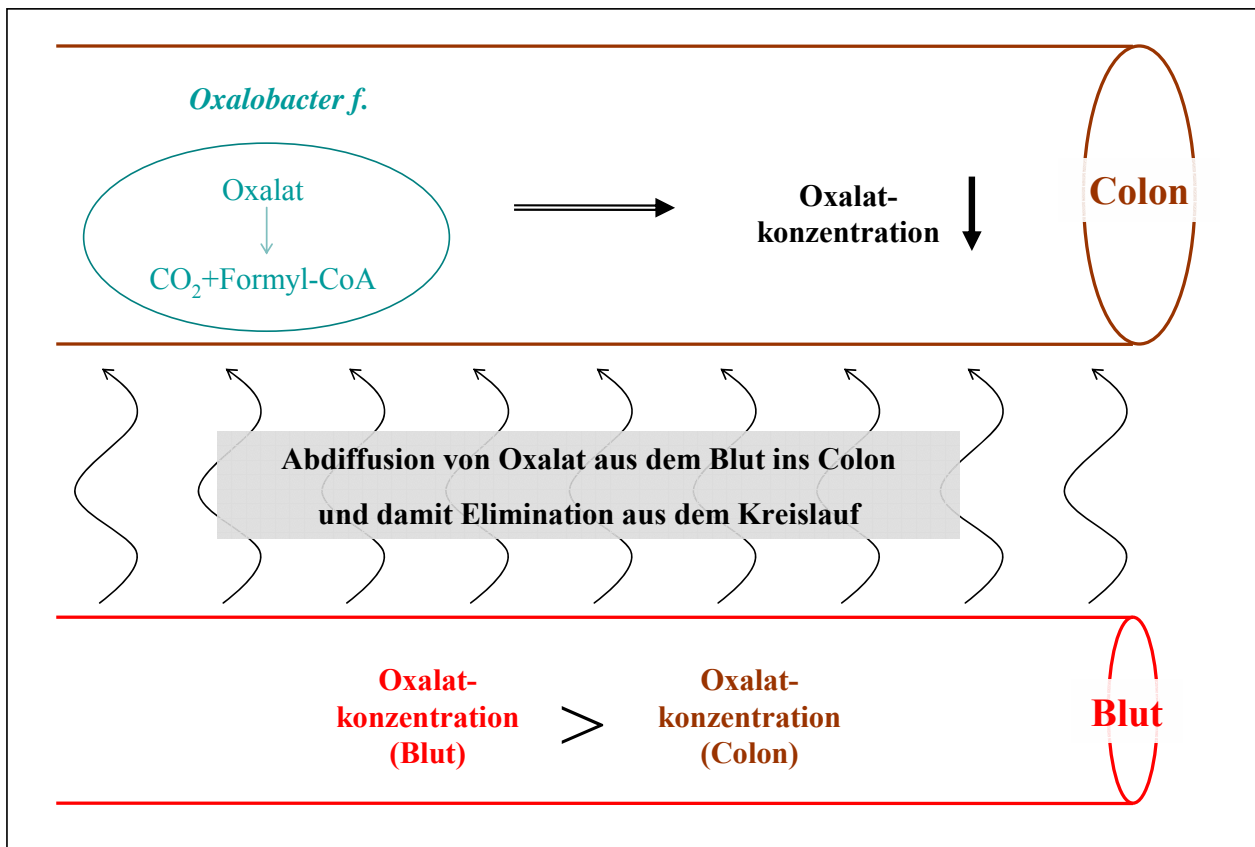


Abbildung 2: Mögliche Auswirkung des Oxalatabbaus durch *Oxalobacter f.* auf die Oxalat-Konzentration im Körper. Das Bakterium senkt im Darm die Konzentration des exogen aufgenommenen Oxalats. Durch diese Senkung kommt es zu einem Diffusionsgradienten für Oxalat in Richtung Darm, sodass Oxalat aus dem Blut (Körper) eliminiert wird. Als Konsequenz sinkt auch die Menge des über die Niere zu eliminierenden Oxalats.

Untermauert wurde diese Theorie zum Beispiel von Sidhu et al., die einen Zusammenhang zwischen Hyperoxalurie und dem Fehlen einer Besiedlung mit *Oxalobacter f.* bei Mukoviszidosepatienten nachwiesen (Sidhu et al., 1998).

Im Tierversuch konnte an mit *Oxalobacter f.* besiedelten Ratten gezeigt werden, dass zwischen der Oxalat-Ausscheidung, welche die Plasma-Konzentration widerspiegelt und *Oxalobacter f.* ein Zusammenhang besteht; insbesondere unter einer oxalatreichen Diät wurde eine signifikante Reduktion der Oxalat-Ausscheidung nach Kolonisation mit dem Bakterium festgestellt. Auch die alleinige Gabe der isolierten Oxalyl-CoA-Decarboxylase führte zu einer Senkung des Spiegels (Sidhu et al., 1999b).

Diese Erkenntnisse können genutzt werden um einen möglichen Therapieansatz für die Hyperoxalurie zu entwickeln, welche ein Risikofaktor für die Nierensteinbildung ist. Die Verabreichung von *Oxalobacter f.* oder seinen Enzymen kann eine Erniedrigung des Plasmaoxalates herbeiführen, welche sich dann positiv auf den Oxalatgehalt des Harns auswirkt und somit das Risiko der Steinbildung mindert.

Dies wurde im Tierversuch von Sidhu et al. schon erfolgreich versucht. Nicht besiedelten Ratten wurde ein Inokulum mit $\approx 200 \times 10^7$ Bakterien verabreicht (Sidhu et al., 1999b). Hierbei wurde auf anaerobe Bedingungen geachtet. Bei den Ratten die eine oxalatreiche Diät erhielten war über neun Wochen eine stabile Besiedlung nachzuweisen. Das Bakterium braucht neben einer speziellen Umgebung und genügend Inokulum also auch eine hohe Oxalatzufuhr um sich anzusiedeln. Anderen Ratten wurde nur das Oxalat-abbauende Enzym (oxc) mit seinen Cofaktoren verabreicht, was von der Administration wesentlich einfacher ist da weder auf anaerobe Bedingungen noch auf eine ausreichende Oxalatzufuhr zu achten ist.

Beide Methoden ergaben einen signifikanten Abfall der Oxalat-Ausscheidung. Nach der Ansiedlung von *Oxalobacter f.* sank die renale Oxalat-Ausscheidung von 4,31 μmol Oxalat/mg Kreatinin auf 1,52 μmol Oxalat/mg Kreatinin. Die Ratten, die das Enzym erhielten, hatten eine wesentlich geringere Oxalat-Ausscheidung (3,71 mmol/l) als die Kontrolltiere (6,99 mmol/l).

Später wurde nachweislich besiedelten Ratten Tetrazyklin verabreicht, schon nach einer Woche war *Oxalobacter f.* bei keinem der Tiere mehr nachweisbar. Bei den Ratten mit einer

oxalatreichen Diät stieg die Oxalat-Ausscheidung sprunghaft an. Dies ist auf eine erhöhte intestinale Oxalat-Resorption nach Verlust des Bakteriums zurückzuführen.

2.4 Häufigkeit physiologischer Besiedlung

Die Studie von Sidhu et al. über die Darmbesiedlung von 100 Kindern zwischen null und zwölf Jahren mit *Oxalobacter f.* hat nachgewiesen, dass Neugeborene nicht besiedelt sind; die Kolonisation beginnt erst im Alter von ungefähr einem Jahr (Sidhu et al., 1997b). Zwischen dem dritten und vierten Lebensjahr sind annähernd 100 % der Kinder besiedelt. Die Besiedlung beginnt zwischen dem achten und zwölften Lebensjahr abzufallen und erreicht dann eine Kolonisationsrate von 70-80 %, welche der für gesunde Erwachsene in mehreren Studien bestimmten Rate entspricht (Kwak et al., 2001; Sidhu et al., 1998; Sidhu et al., 1999b).

Für oben genannte Studie wurden Kinder aus der Ukraine gewählt, da diese nur limitierten Zugang zu Antibiotika haben. Dass Antibiotika einen negativen Einfluss auf die Kolonisation haben, wurde bei Sidhu et al. im Tierversuch nachgewiesen (Sidhu et al., 1999b). Zunächst erfolgreich besiedelte Ratten zeigten nach Tetracyclingabe keine Besiedlung mit *Oxalobacter f.* mehr.

Neben Antibiotika gehen auch verschiedene Krankheiten mit einer reduzierten Besiedlung einher. So wurde bei Patienten mit Mukoviszidose, statt der normalen Rate von ≈ 70 %, nur eine Kolonisation von 16 % gefunden. Zusätzlich hatten diese Patienten auch eine erhöhte renale Oxalat-Ausscheidung, was die Annahme, das *Oxalobacter f.* Einfluss auf den Oxalat-Stoffwechsel hat, noch unterstützt (Sidhu et al., 1998).

Bei CaOx-Urolithiasis wurde bei Patienten mit mehreren Steinepisoden seltener *Oxalobacter f.* in der Faeces nachgewiesen, als bei Patienten mit wenigen Rezidiven. Bei mehr als fünf Episoden waren es nur noch 13 %. Hier ist noch interessant, dass von den Patienten mit Antibiotikaphylaxe keiner besiedelt war (Sidhu et al., 1999b).

Bei Kleinschmidt et al. wurde eine negative Korrelation zwischen dem Vorhandensein von *Oxalobacter f.* und der Steinhäufigkeit gefunden; es wurde nachgewiesen, dass Patienten mit gehäuften Steinepisoden kaum mit *Oxalobacter f.* besiedelt waren (Kleinschmidt et al., 1994).

Gesunde Probanden sind hingegen zu 75 % positiv getestet. Bei Patienten mit vier oder mehr Episoden wurde ein komplettes Fehlen des Bakteriums beobachtet.

2.5 *Der Nachweis von Oxalobacter f.*

2.5.1 Kultivierung des Bakteriums

Bis jetzt ist bekannt, dass *Oxalobacter f.* ein gram-negatives, nicht bewegliches und nicht sporenbildendes Stäbchen ist, welches obligat anaerob wächst und zur Deckung seines Energiebedarfes ausschließlich auf Oxalat angewiesen ist (Allison et al., 1985; Dawson et al., 1980). Die oxalatabbauenden Bakterien können durch sie umgebende helle Zonen im sonst trüben CaOx-Medium identifiziert werden (Doane, 1989). In Studien wurde nachgewiesen, dass der Wachstumshöhepunkt bei einem Oxalatgehalt im Medium von 1,5 % liegt (Dawson et al., 1980).

Dies alles stellt hohe Ansprüche an das Wachstumsmedium und die umgebende Atmosphäre, welche durch das Standardmedium B (ATCC Culture medium 1514 Modified Oxalate) in Kombination mit einem anaeroben Ambiente erfüllt werden (Allison et al., 1985; Kwak et al., 2001).

2.5.2 Oxalat-Abbau (oxalate degradation)

Die speziellen Bedingungen und insbesondere der hohe Zeitbedarf bei der Kultivierung von *Oxalobacter f.* erschweren die Untersuchungen über das Vorkommen des Bakteriums im Darm. So wurde der Nachweis beschleunigt indem nicht das Bakterium selber, sondern der Abbau von Oxalat im Nährmedium nachgewiesen wurde.

Hierfür wurden 10 ml Medium B erst mit Kalium-Oxalat (KOx) versetzt (Medium B ergänzt mit K-Ox auf 30 mM) und dann mit ungefähr 25 mg frischem Stuhl beimpft. Nach einer Woche Inkubation bei 37°C wurde der Verlust an Oxalat mit Hilfe der Calciumchlorid-precipitationsmethode bestimmt.

Hierzu werden 50 µl des beimpften Mediums mit 100 µl 0,1 % Calciumchlorid (CaCl₂) und 3 ml destilliertem Wasser gemischt um dann die Absorption der Lösung spektrophotometrisch (600 nm) zu messen. Die optische Dichte beträgt bei Proben ohne Oxalat-Abbau circa 0,1 bei

positiven Proben 0,02. Womit ein gut differenzierbares Ergebnis vorliegt (Sidhu et al., 1997b; Sidhu et al., 1998; Sidhu et al., 1999b).

Beide oben genannten Kulturmethode haben einen großen Nachteil nicht nur im Zeitaufwand, da eine Anzucht mehrere Stunden bis Tage bedarf, sondern auch noch in mangelnder Spezifität, da alle oxalat-abbauenden Mikroorganismen nachgewiesen werden und eine sichere Zuordnung zum Stamm *Oxalobacter f.* nicht möglich ist.

2.5.3 PCR (polymerase chain reaction)

Ein schnelleres und genaueres Verfahren ist die Polymerase Chain Reaction (PCR), ein DNA-basiertes Identifikationsverfahren, welches fast alle der oben genannten Probleme, insbesondere den hohen Zeitaufwand und die mangelnde Spezifität, behebt. Sie dient der exponentiellen Vermehrung auch kleinster DNA-Mengen; hierdurch sinkt die untere Nachweisgrenze.

Für dieses Verfahren ist es notwendig DNA-Sequenzen nachzuweisen, die für das gesuchte Bakterium hochspezifisch und überdies konstant vorhanden sind, um damit das Bakterium in der Probe nachzuweisen.

- *Spezifisch*, somit nur in dieser Spezies vorhanden, damit nicht die DNA anderer Mikroorganismen nachgewiesen wird und ein falsch positives Ergebnis entsteht.
- *Konstant*, also in jedem Bakterium und seinen Untergruppen vorhanden, um zu vermeiden, das trotz einer vorliegenden Besiedlung ein negatives Testergebnis entsteht.

Die nachzuweisende DNA (template-DNA) wird mit einer thermostabilen DNA-Polymerase, zwei passenden Oligonucleotidprimern, Nucleotiden und Pufferlösung in ein Reaktionsgefäß gegeben. Primer sind 18-30 Basenpaare lange Sequenzen, die den oben genannten, für das Bakterium konstanten und spezifischen DNA-Sequenzen komplementär sind.

Im ersten Schritt der PCR wird der Ansatz auf 95°C erhitzt. Dadurch teilt sich die, normal als Doppelstrang vorliegende DNA, in zwei Einzelstränge. Dieser Schritt wird auch als

Denaturierung bezeichnet. Dann wird die Temperatur auf 55°C gesenkt um den im Überschuß vorhandenen Oligonukleotidprimern die Möglichkeit zu geben an die zu ihnen homologen Stellen der DNA zu binden. Im dritten Schritt wird die Temperatur wieder auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht. Die DNA-Polymerase dient dazu die Primer mit passenden Nukleotiden zu verlängern und somit wieder eine Doppelstrang-DNA zu synthetisieren, welche der template-DNA exakt gleicht. Nach mehreren Amplifikationsschritten liegen großteils Produkte definierter Länge vor, da nur das Stück zwischen den beiden Primernpaaren multipliziert wird.

Damit die PCR spezifische Produkte amplifiziert müssen die Primer sorgfältig gewählt werden und die Reaktionsbedingungen wie Annealing-Temperatur und Magnesiumionen-Konzentration optimiert werden (Mühlhardt, 2002). Liegt die Matrix-DNA nicht in ausreichender Konzentration vor kann es dazu kommen, dass die Primer miteinander hybridisieren und Dimere bilden.

Schematischer Ablauf der PCR (siehe Abbildung 3, Seite 18):

- *1. Denaturierung* ($\approx 95^{\circ}\text{C}$): Die template-DNA Stränge trennen sich.
- *2. Annealing* ($\approx 55^{\circ}\text{C}$): Die im Überschuß vorhandenen Primer haben nun die Möglichkeit an die DNA zu hybridisieren.
- *3. Elongation* ($\approx 72^{\circ}\text{C}$): Die DNA-Polymerase hat bei dieser Temperatur ihr Arbeitsoptimum und verlängert den Primer bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt.

Dieser dreiteilige Zyklus, bei dem die DNA sich jeweils verdoppelt, kann unterschiedlich oft wiederholt werden.

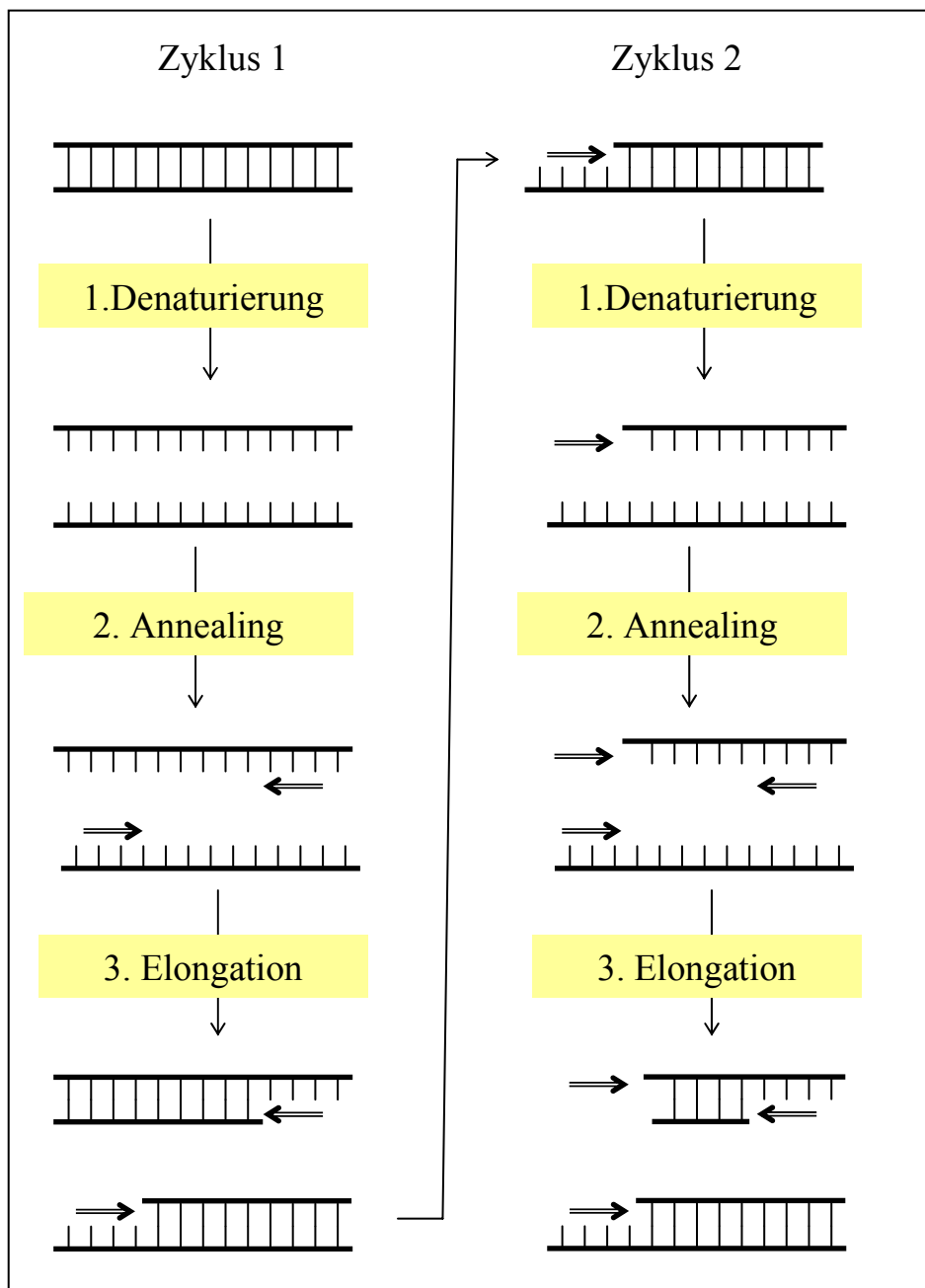


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der PCR. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation zieht jeweils eine Verdopplung der vorliegenden DNA-Matrizen nach sich. Pro PCR werden ungefähr 30-40 Zyklen durchgeführt. (→ = spezifische, angelagerte Primer; die doppelsträngige DNA wird stilisiert dargestellt)

Um die Ergebnisse der DNA-Amplifizierung zu bewerten, wurde in mehreren Studien zu *Oxalobacter f.* nun noch eine Gel-Elektrophorese mit anschließendem Southern Blot durchgeführt (Kodama et al., 2002; Kumar et al., 2002; Kwak et al., 2001; Sidhu et al., 1997b;

Sidhu et al., 1998; Sidhu et al., 1999b). Diese beiden Methoden zusammen nennt man einen PCR-basierten Assay.

2.5.4 PCR-basierter Assay

- *Gel-Elektrophorese*: Dient zur Trennung elektrisch geladener Teilchen entsprechend ihrer Molekülgröße. Hierzu wird die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, sie wandert bei angelegter Spannung zur Anode (+), wobei unterschiedlich große Stücke verschieden schnell (= weit) wandern. Durch das Mitführen eines Markers mit bekannter Basenpaarlänge, kann die Länge der DNA-Fragmente ermittelt werden. Mit dem Farbstoff Ethidiumbromid oder einem Fluoreszenzfarbstoff, zum Beispiel Gelstar, können die Banden im ultravioletten Licht sichtbar gemacht werden.
- *Southern Blot*: Das Blotting dient zur Konservierung des gewonnenen Bandenbildes, indem dieses auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wird. Beim Southern Blot können dann Banden, die aus bestimmten Nukleinsäuresequenzen bestehen, mit Hilfe einer markierten Sonde kenntlich gemacht werden.

Um einen PCR-basierten Assay für den Nachweis von *Oxalobacter f.* möglich zu machen, entwickelten Sidhu et al. Primer aus dem Gen welches für die Oxalyl-CoA-Decarboxylase (*oxc*) codiert (Sidhu et al., 1997a). Wie oben beschrieben ist das ein Enzym, welches in dieser Form nur in diesem Bakterium vorkommt (= spezifisch). Es ist in beiden Untergruppen des Bakteriums gleichermaßen vorhanden und nicht von Mutationen betroffen (= konstant).

- Um die *Spezifität* der Primer für *Oxalobacter f.* nachzuweisen wurden sie in verschiedenen PCRs zusammen mit anderen Bakterien der Darmflora eingesetzt.

Es gab keine Kreuzreaktion mit der aus *Alcaligenes oxalaticus* extrahierten *oxc* oder DNA-Präparationen aus *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Flammulina* oder anderen darmassoziierten Mikroorganismen präsent in Stuhlproben von über 120 Probanden (Sidhu et al., 1997a); daraus lässt sich schließen, dass dieses Fragment der *oxc* für *Oxalobacter f.* einzigartig ist.

Die Ergebnisse des PCR-basierten Southern Blots korrelierten mit denen der Kultivierungsmethode. Fragmente von *Oxalobacter f.* konnten durch die PCR nur in den Proben nachgewiesen werden, in denen das Bakterium im Kultivierungsversuch nachgewiesen worden war (Sidhu et al., 1997a).

- Um die *Sensitivität* zu überprüfen, wurden in einer doppelblinden Studie 100 Stuhlproben von Kinder zwischen null und zwölf Jahren mit Hilfe des Oxalat-Abbaus und zusätzlich des PCR-basierten Assays auf *Oxalobacter f.* untersucht (Sidhu et al., 1997b).

Von diesen 100 Proben zeigten 72 in der PCR ein positives Ergebnis, von welchen 59 auch einen positiven Oxalatabbau aufwiesen. Das bedeutet, daß alle 59 Proben, die einen positiven Oxalatabbau zeigten, auch in der PCR positiv waren. 28 Proben wurden von beiden Methoden als *Oxalobacter f.*-negativ bewertet. In 13 Proben war *Oxalobacter f.* nur in der PCR, nicht aber im biochemischen Test nachweisbar. Es gab keine Probe bei der *Oxalobacter f.* durch den Oxalat-Abbau aber nicht durch die PCR nachgewiesen wurde (Tabelle 1).

Diese Daten zeigen, daß sich auch bei nicht erfolgtem Oxalat-Abbau *Oxalobacter f.* mittels PCR nachweisen lässt, also bei hoher Spezifität der PCR-basierte Assay noch sensitiver als der Oxalat-Abbau ist.

Tabelle 1: Der *Oxalobacter f.*-Nachweis wurde nacheinander mittels Oxalat-Abbau und PCR aus denselben Proben geführt. Die Ergebnisse wurden danach miteinander verglichen. Liegen positive Ergebnisse des Oxalat-Abbaus vor, so ist auch die PCR immer positiv. Bei 13 % der Proben gibt es einen positiven Nachweis nur in der PCR. Hier zeigt sich das die PCR noch sensitiver ist als der Oxalat-Abbau (Sidhu et al., 1997b).

Oxalat-Abbau	PCR	Proben [%]
positiv	positiv	59
negativ	positiv	13
negativ	negativ	28
Positiv	negativ	0

Hier zeigt sich ein weiterer Vorteil der PCR-Methode. Sie benötigt keine lebenden und aktiven Bakterien, da die DNA-Isolierung im Gegensatz zu den Kultivierungs-Methoden auch bei abgestorbenen Organismen funktioniert.

Nachteil ist, dass mit einer herkömmlichen PCR oder einem Southern Blot allein ein quantitativer Nachweis nicht möglich ist.

2.5.5 Quantitativ Competitive – PCR (QC-PCR)

Kleinschmidt et al. haben herausgefunden, dass nicht nur die Aussage über eine vorhandene oder nicht vorhandene Besiedlung mit *Oxalobacter f.* interessant ist, sondern auch die genauen Konzentrationen eine Rolle spielen (Kleinschmidt et al., 1994). Es gibt unter den CaOx-Urolithiasis Patienten eine Untergruppe, welche positiv auf *Oxalobacter f.* getestet wurde, aber eine geringere Anzahl an CFU's (colony forming units) als in der besiedelten Normalbevölkerung aufweist (10^2 statt 5×10^6). Interessanterweise hatten diese Patienten, bei denen *Oxalobacter f.* nachgewiesen werden konnte, weniger als vier symptomatischen Nierensteinepisoden in fünf Jahren. Die nicht besiedelten CaOx-Urolithiasis Patienten hingegen hatten in demselben Zeitraum im Mittel wesentlich mehr Episoden.

Sidhu et al. und später Kwak et al. entwickelten eine Methode, mit der ein quantitativer Nachweis von *Oxalobacter f.* ermöglicht wird (Kwak et al., 2003; Sidhu et al., 1999a).

Dieses Verfahren beruht darauf, jeder PCR einen internen Standard zuzufügen. Ein interner Standard ist eine definierte Menge einer Standard-DNA, dessen PCR-Produkt sich von dem des DNA-Produkts (Template), das einen interessiert, möglichst wenig unterscheidet. Er wird in dem gleichen Reaktionsgefäß, zusammen mit dem gesuchten Template in die PCR eingesetzt. Bedingung ist, dass beide DNA-Fragmente durch dasselbe Primerpaar amplifiziert werden. Da die PCR-Produkte bis auf Ihre Länge sehr ähnliche Sequenzen aufweisen und das gleiche Primerpaar benutzt wird, kann man davon ausgehen, dass die Amplifikationsbedingungen für das Template und den Standard fast identisch sind und sie sich somit in vergleichbarer Weise amplifizieren.

Sidhu et al. generierten dazu ein 227bp (bp = Basenpaare) langes Fragment aus dem *oxc* Gen, welches genspezifisch ist und flankiert wird von Sequenzen, die homolog zu den von ihnen benutzten Primern (OXFfp und OXFrp) für die *Oxalobacter f.*-PCR sind (Sidhu et al., 1999a). Das Produkt das bei der Amplifikation von *Oxalobacter f.*-DNA entsteht, ist hingegen 416bp lang, wodurch sich die PCR-Produkte bei der Gel-Elektrophorese trennen lassen.

Um den Gehalt an template-DNA in einer Probe zu quantifizieren werden mehrere Ansätze mithilfe der PCR gemessen. Diese enthalten eine bestimmte Konzentration der zu analysierenden Probe, aber unterschiedliche, bekannte Mengen an Standardtemplate. Nach der PCR wird eine Gel-Elektrophorese durchgeführt und die Dicke der Banden, die der Mengen an Standard- und Probenprodukt entspricht, miteinander verglichen. Bei Sidhu et al. findet nach der Trennung durch eine Elektrophorese, eine Visualisierung der Banden mit UV Licht und anschließendem Scannen der Intensitäten mit dem Alpha Inotech Imager ISO1000 statt (Sidhu et al., 1999a).

Dort, wo Proben- und Standardbande gleich intensiv sind, ist die Menge an Proben- und Standard-DNA identisch. Da die zugegebene Menge an Standardtemplate bekannt ist, muss die unter gleichen Bedingungen amplifizierte Proben-DNA die gleiche Eingangskonzentration gehabt haben (Mühlhardt, 2002).

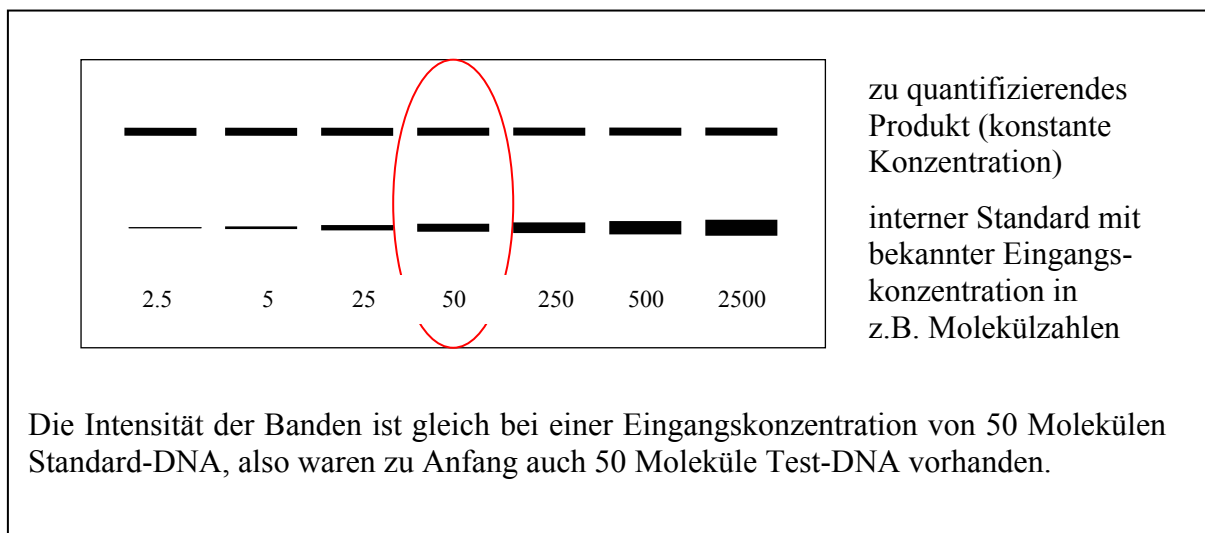


Abbildung 4: Das Prinzip der kompetitiven PCR. Hierbei werden gleichzeitig Standards mit bekannten Molekülmengen und die zu amplifizierende DNA gemessen. Dann wird die Bande des zu quantifizierenden Produkts mit den Standards verglichen. Sind die Banden gleich stark, so liegen gleiche Molekülzahlen vor.

Die kritischen Punkte bei der QC-PCR sind:

- Die Effizienz der PCR für Bakterien-DNA und Standard-DNA muss gleich sein, damit die äquivalente Menge an PCR Produkten entsteht. Voraussetzung dafür ist, dass die Templates von der Verteilung der Basen einen sehr ähnlichen Aufbau haben, gleiches gilt für ihre Länge, die für die QC-PCR in nur geringem Ausmaß variieren darf.

- Die Anzahl der PCR Zyklen darf nicht über die exponentielle Phase der PCR (25-30 Zyklen) hinausgehen, da nur im Bereich der optimalen Replikation eine äquivalente Amplifikation von Standard und Testtemplate erfolgt.
- Eine realistische Bewertung ist nur bei einem Mengenverhältnis von Test- zu Standard-DNA zwischen 10:1 und 1:10 möglich; am genauesten ist sie bei einer Verteilung von 1:1 (Mühlhardt, 2002).
- Die Quantifizierung des Produktes kann entweder mit dem bloßen Auge, das heißt semiquantitativ, oder mit dem Phosphor-Imager vorgenommen werden wobei die Banden hierbei leicht in Sättigung geraten. Mit letzterer Methode kann das Ergebnis in Zahlen gefasst werden.

Sidhu et al. stellten die Korrelation zwischen den Ergebnissen der QC-PCR und der DNA-Kopienzahl her, um die Ergebnisse in Moleküle/ μ l angeben zu können (Sidhu et al., 1999a). Sie benutzten dafür eine Verdünnung von *Oxalobacter f.*-DNA mit bekannter Menge von 1,126 μ g DNA/ μ l. Unter der Annahme, dass das Genom ähnlich groß ist wie das von *Escherichia coli*, würde dies etwa 2×10^8 Moleküle/ μ l entsprechen.

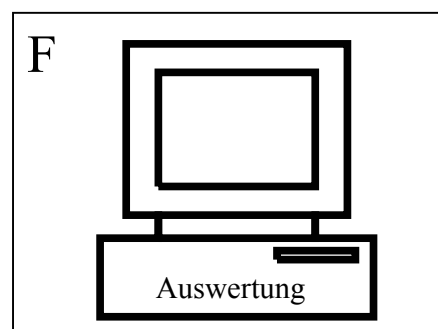
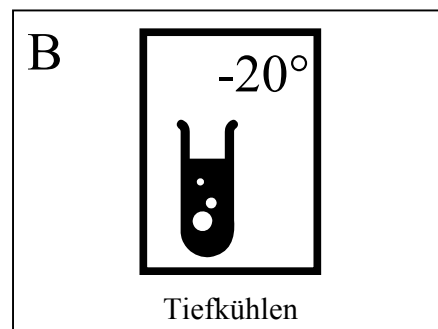
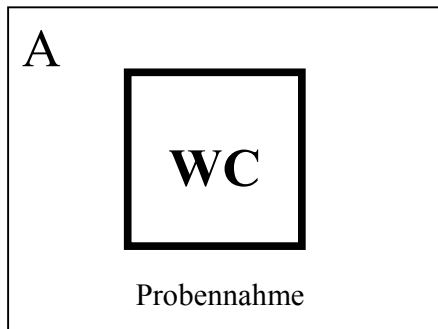
Daraus gewannen sie zwei Verdünnungen, 10.000fach (\approx 20.000 Genome) und 100.000fach (\approx 200 Genome) und setzten diese als Testtemplate in die QC-PCR ein. Außerdem wurden von unterschiedlichen Verdünnungen von Standardtemplates, mit 50 bis 250.000 Molekülen, eine PCR durchgeführt. In einem Diagramm wurde dann die Intensität der Banden gegen die Molekülzahl/ μ l aufgetragen und daraus eine Eichgerade erstellt. Daran wurden die Proben der QC-PCR abgelesen. Als Ergebnis kam für die 10.000fache Verdünnung ein Ergebnis zwischen 20.000 bis 25.000 Moleküle/ μ l, für die 100.000fache zwischen 120 und 160 Moleküle/ μ l heraus. Trotz einer größeren Streuung der Einzelergebnisse ist die Dimension der durch die QC-PCR gemessenen Kopienzahl und der theoretisch berechneten Kopienzahl im Einklang, was die Richtigkeit der Methode bestätigt. In derselben Arbeit von Sidhu et al. wurde eine gute Korrelation zwischen der Kultivierungsmethode (Ergebnisse in CFU) und der QC-PCR festgestellt (Sidhu et al., 1999a).

2.5.6 real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Diese Methode, zur erstmaligen absoluten Quantifizierung von *Oxalobacter f.*, wurde in dieser Studie etabliert. Bei der RTQ-PCR werden die PCR-Produkte schon während der exponentiellen Phase der Amplifikation, mithilfe fluoreszierender Farbstoffe, detektiert. Anhand einer Eichkurve kann durch die Fluoreszenz eine genaue Berechnung der Konzentration erfolgen. Im Teil „Material und Methoden“ (siehe 4.6, Seite 34) wird das Verfahren genau erläutert.

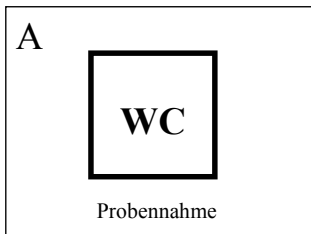
3. Eigene Untersuchungen

3.1 *Ein Überblick über die Vorgehensweise*



4. Material und Methoden

4.1 *Patientenkollektiv und Probengewinnung*



Am Anfang einer jeden Untersuchung von Stuhlproben stehen die Probengewinnung und der Transport der Proben in das jeweilige Labor.

Eine gesonderte DIN Norm (55515) regelt die Anforderungen, die an Materialeigenschaft und Sterilität des Transport-Gefäßes gestellt werden. Sind diese erfüllt kann eine Lagerung der Probe bei Raumtemperatur über circa 72 Stunden ohne Veränderung der Ergebnisse erfolgen. Danach kann es durch Überschreitung der Überlebenszeiten einzelner Bakterien, oder Selektion unempfindlicher Bakterien zu verfälschten Ergebnissen kommen. Um dies zu vermeiden wurden die Proben im Labor direkt bei Eintreffen tiefgefroren, was laut einer Studie von Kwak et al. auf den Nachweis von *Oxalobacter f.* via PCR keinen Einfluss hat (Kwak et al., 2001).

Eine große Fehlerquelle ist, neben dem Transport, natürlich die Probengewinnung durch den Patienten. Dieser sollte gut darüber aufgeklärt werden, dass (nach DIN 58959) eine mindestens erbsgroße Probe genommen werden sollte, welche nach Möglichkeit direkt ins Labor zu transportieren ist. Diese DIN Norm ist auch auf der homepage www.hauss.de nachzulesen.

Um zu gewährleisten das die Bakterien-Konzentrationen überall in der Stuhlportion und damit auch hinterher in der zu untersuchenden Probe gleich sind, müsste die Faeces homogenisiert und Stichproben an sechs verschiedenen Stellen genommen werden. Die Probe durchzumischen ist jedoch einem Patienten schwer zuzumuten und würde dadurch der Compliance des Patienten entgegenwirken. Deshalb wurde in der Anleitung zur Probennahme (siehe 9.2, Seite 79) darum gebeten, Proben an mehreren verschiedenen Stellen der Stuhlportion zu entnehmen.

Zusätzlich sollte versucht werden eine Kontamination mit Urin oder eine Verdünnung mit Spülwasser zu vermeiden.

Auch problematisch ist, dass der Anteil der Bakterien im Stuhl nicht unbedingt Rückschlüsse auf deren Vorkommen im Darm geben muß. So haben Pochart et al. mit Hilfe einer intraluminalen Probeentnahme aus dem Colon (Pyxigraphie) gezeigt, dass fakultative Anaerobier im Caecum 35 % der funktionsfähigen Bakterien ausmachten, während es in der Faeces nur knapp 1 % war (Pochart et al., 1993). Unter ungünstigen Bedingungen kann dieser Effekt sich auch auf *Oxalobacter f.* auswirken, obwohl es ein obligat anaerobes Bakterium ist.

Von manchen Stellen wird empfohlen Stuhlportionen über mehrere Tage zu sammeln um ernährungsbedingte Schwankungen auszugleichen. Da hierdurch die Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung der Probe steigt, haben wir bei dieser Untersuchung zur quantitativen Messung von Bakterien hiervon abgesehen. Zusätzlich besteht durch die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen in den verschiedenen häuslichen Umgebungen der Patienten, was zum Beispiel Temperatur oder Luftkontakt betrifft, noch das Risiko bestimmte Keime zu selektieren. Ein umgehender Transport ins Labor sowie das Tieffrieren der Proben beugen diesem Problem vor.

Bei manchen Studien wird versucht interindividuelle Unterschiede auszugleichen indem die Probanden eine Diät einhalten oder bestimmte Medikamente, so zum Beispiel Antibiotika, nicht einnehmen (Sghir et al., 2000).

Da jede Form von Diät eine Abweichung des Patienten von seiner normalen Lebenssituation darstellt, und in dieser Studie Wert gelegt wird auf die möglichst realistische Zusammensetzung der Darmflora, wurde von einer speziellen Ernährungsvorschrift abgesehen. Die Patienten wurden nur gebeten auf exzessiven Alkoholkonsum zu verzichten und ihre alltägliche Ernährungsweise beizubehalten.

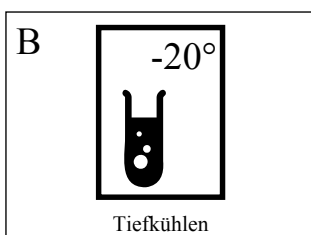
Eine Einschränkung der Medikamenteneinnahme insbesondere notwendiger Antibiotika-Therapien erschien nicht gerechtfertigt, da eine unnötige Schädigung des Patienten durch die Studie dann nicht auszuschließen gewesen wäre.

Es erschien angemessen den Patienten nach einem ausführlichen Informationsgespräch zusätzlich ein Merkblatt (siehe 9.2, Seite 79) zur richtigen Probenentnahme mitzugeben, damit die wichtigen Maßnahmen nicht vergessen werden. Bei der Probenübergabe wurden in einem

Patientengespräch die Einhaltung der Allgemeinmaßnahmen und der korrekte Ablauf der Probenentnahme sichergestellt.

Insgesamt wurden 80 Stuhlproben untersucht, darunter sind 49 CaOx-Harnsteinpatienten, neun *M. Crohn* Patienten, mit nachgewiesener CaOx-Urolithiasis und 22 gesunde Probanden (siehe Tabelle 2, Seite 29). Die Proben wurden auf drei unterschiedliche Arten gelagert um die für die Untersuchung vorteilhafteste zu ermitteln.

- 62 Proben wurden *nativ in Stuhlröhrchen* gesammelt. In dieser Gruppe waren 34 CaOx-Urolithiasis Patienten und 8 *M. Crohn*-Patienten sowie 19 gesunde Probanden. Den Patienten wurden ein Stuhlprobenröhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht Nr. 78.898) und eine Anleitung zur Probennahme (siehe 9.2, Seite 79) mit nach Hause gegeben. Damit kein Abbau der DNA stattfindet, wurden die Proben direkt nach Eintreffen im Labor eingefroren. 20 dieser Proben wurden durch Zimmermann im Rahmen ihrer Dissertation „Studie zur Wirkung von Laktobakterien auf die intestinale Oxalat-Absorption“ gesammelt, aufbereitet und gemessen (Zimmermann, 2004). Dies erfolgte jedoch genau nach den im Folgenden beschriebenen Prozeduren, sodass die Proben und ihre Ergebnisse ohne Einschränkung miteinander vergleichbar sind.
- 12 Proben wurden als *Stuhlabstriche auf Gel* gelagert (Firma Becton Dickinson, Heidelberg, BBL CultureSwab Plus) Einem Agarosegel für den Transport und die Lagerung von aeroben und anaeroben Organismen. Hier waren neben CaOx-Harnsteinpatienten auch drei gesunde Probanden enthalten.
- 6 Proben wurden in 5 ml *flüssiger Kulturlösung* für anaerobe Bakterien, die wir von Sidhu erhielten, aufbewahrt.



Im Labor wurden alle ankommenden Proben sofort tief gefroren und bei minus 20°C gelagert, was laut Kwak et al. auf die Ergebnisse PCR basierter Untersuchungen auf *Oxalobacter f.* keinen Einfluss hat (Kwak et al., 2001). Auf diese Weise wird einer Selektion oder Vermehrung der Bakterien vorgebeugt.

Tabelle 2: Art der Lagerung bezogen auf Probandenkollektive. Es gibt drei Lagerungsarten, die meisten Proben wurden nativ, im Stuhlprobenröhrchen, gelagert. Die anderen auf Nährmedium beziehungsweise in NaCl-Lösung. Unter den Probanden fanden sich großteils CaOx-Harnsteinpatienten und zusätzlich *Morbus Crohn* (MC) Patienten sowie eine Kontrollgruppe, bei der anamnestisch keine CaOx-Urolithiasis bestand (Zimmermann, 2004).

	Harnstein	MC	Gesund	Gesamt
nativ	34	8	19	61
Gel	9	0	3	12
flüssig	6	0	0	6
gesamt	49	8	22	79

4.2 $[^{13}\text{C}_2]$ Oxalat-Absorption und renale Oxalat-Exkretion

Bei jedem Probanden wurden durch die analytische Abteilung der Urologie der Unikliniken Bonn standardmäßig die Oxalat-Absorption und die renale Oxalat-Ausscheidung bestimmt. Dies erfolgte mittels dort etablierter Testverfahren, die im weiteren beschrieben sind (Hesse, 1999; von Unruh, 2000; von Unruh, 1998).

4.2.1 $[^{13}\text{C}_2]$ Oxalat-Absorption

Die Oxalat-Absorption zeigt, welcher Anteil zugeführten Nahrungsoxalats (i.e. exogenes Oxalat) vom Darm resorbiert und über die Nieren ausgeschieden wird. Der Testverlauf geht über zwei Tage, an denen die Probanden Standardkost mit bekanntem Oxalatgehalt bekommen und den Urin in mehreren Portionen sammeln. Am zweiten Tag wird eine Kapsel verabreicht die 33,8 mg $[^{13}\text{C}_2]$ markiertes Oxalat enthält. Das so markierte Oxalat kann mittels Massenspektrometrie von $[^{12}\text{C}_2]$ -Oxalat unterschieden werden. Im 24h-Urin des zweiten Tages wird die Menge an ausgeschiedenem $[^{13}\text{C}_2]$ Oxalat bestimmt. Somit ist bekannt wieviel Prozent des exogenen markierten Oxalates (33,8 mg) vom Patienten resorbiert und danach über die Niere ausgeschieden wurden (markiertes Oxalat im 24h-Urin). Das Ergebnis entspricht der Oxalat-Absorption [%]. Ab einer Absorption von 10% wird diese als erhöht angesehen (Oxalat-Hyperabsorption) (Hesse, 1999).

4.2.2 renale Oxalat-Exkretion

Diese wird enzymatisch mithilfe der Oxalatoxidase gemessen. Eine Hyperoxalurie liegt ab einer Ausscheidung von über 0,5 mmol/d vor (Zimmermann, 2004). Der Hyperoxalurie können angeborene genetische Defekte oder sekundär erworbene gastrointestinale Erkrankungen wie *M. Crohn* zugrunde liegen.

4.3 Aufreinigung der DNA



Mit Hilfe des QIAamp DNA Stool Mini Kits (Firma Quiagen, Hilden) und nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll II „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ wird die DNA aus den vorliegenden Stuhlproben isoliert. Zusätzlich werden die PCR-Inhibitoren entfernt.

4.3.1 Kurze Erläuterung der Methode

Nach dem Abwiegen der Stuhlportion werden die Bakterien- und Zellwände in der Probe zerstört und so die DNA in Lösung gebracht. Dies wird zum einen durch chemische Reaktion mit dem verwendeten optimierten ASL-Puffer erreicht und weiterhin durch ein mechanische Aufbrechen der Zellwand mithilfe wiederholten Einfrierens und Erhitzens der Probe. Nach Abtrennung der ungelösten Bestandteile mittels Zentrifugation werden mögliche DNA-zerstörende Substanzen und PCR-Inhibitoren durch die Anlagerung an ein InhibitEx-Material absorbiert. Dieses wird durch Zentrifugation wieder entfernt. Mit Hilfe einer Proteinase werden störende Proteine abgedaut. In der Gegenwart von Ethanol bindet die DNA an die Silicagelmembran der Aufreinigungssäule und wird dort mehrmals gewaschen. Die hochreine DNA wird mit dem Elutionspuffer wieder in Lösung gebracht und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

4.3.2 Durchführung der DNA-Aufreinigung

Die drei in der Studie verwendeten unterschiedlichen Faeces-Lagerungsarten (genaue Beschreibung unter 4.1) bedingten eine leichte Variation des ersten Präparationsschrittes zur Gewinnung aufgereinigter DNA.

Allen Proben ist gemein, dass die Faeces in 1,4 ml ASL-Puffer aufgenommen wird.

- *Direktprobe*: 200 mg der gefrorenen Faeces wird oben genannte Menge ASL-Puffer zugefügt. Die Probe wird nun gevortext bis eine homogene Suspension entsteht, welche dann nach Protokoll weiterverwendet wird.
- *Flüssig*: Die in 5 ml Flüssigkeit gelagerte Probe wird zunächst bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das die DNA enthaltende Pellet in 1,4 ml ASL-Puffer gelöst.
- *Gel*: Der Tupper wird, mit den an ihm haftenden Stuhlpartikeln, abgetrennt und in 1,4 ml ASL-Puffer 1 Minute gevortext. Die Lösung wird dann bei Raumtemperatur zur weiteren Reaktion ca. 1 Minute stehen gelassen, und nach Entfernung des Tupfers weiterverwendet.

Die weiteren Schritte sind für alle Proben, unabhängig von der Lagerungsart, vollkommen identisch, nach Protokoll II „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ des QIAamp DNA Stool Mini Kits (Firma Quiagen, Hilden), durchgeführt worden. 1,6 ml der entstandenen Suspension werden im 2 ml Tube im Wechsel fünf mal auf 95°C erhitzt und im Stickstoffbad tiefgefroren um die Zellwände aller Bakterien und Parasiten zu zerstören, damit deren DNA frei zugänglich ist.

Danach wird 15 Sekunden gevortext und nochmal eine Minute zentrifugiert. 1,2 ml des Überstandes, also nur die löslichen Anteile, werden in ein neues 2 ml Tube zu überführt und die restlichen festen Bestandteile anschließend verworfen.

Um die DNA zersetzenden und die PCR störenden Substanzen zu entfernen wird die beiliegende InhibitEx Tablette zugefügt, welche diese Substanzen bindet. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird nun 3 min zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues 1,5 ml Tube überführt und nochmals 3 min zentrifugiert. Nun kann man davon ausgehen die störenden Bestandteile vollständig eliminiert zu haben.

In ein neues 1,5 ml Microtube, in welches schon 15 µl Proteinase K pipettiert wurde, werden nun 200 µl des Überstandes und danach 200 µl AL Puffer zugegeben und alles homogenisiert. Nach

10 minütiger Inkubation bei 70°C sind die Proteine abgedaut. Zur DNA-Fällung werden 200 µl reinen Ethanols zugegeben.

Diese Lösung wird nun komplett in ein QIAamp spin column — eine Aufreinigungssäule mit Silicagelmembran — überführt und 1 min zentrifugiert. Die DNA bindet an die Membran während die sonstigen Bestandteile im Durchlauf verworfen werden. Nach dem Austausch des Tubes, auf welches die Säule aufgesetzt wird, wird die Probe erst mit 500 µl Waschpuffer AW1 und dann mit 500 µl AW2 gewaschen.

Nach Überführung in ein neues Tube werden 80 µl AE-Puffer auf den „Filteraufsatz“ gegeben um die DNA wieder zu lösen. Durch erneute Zentrifugation von einer Minute gelangt die gelöste DNA in das Tube.

Bis zur Weiterverarbeitung wird die aufbereitete DNA wieder eingefroren, was laut einer Studie von Kwak et al. keinen Einfluss auf die PCR-Ergebnisse bei *Oxalobacter f.* hat (Kwak et al., 2001).

4.4 Bestimmung der DNA-Konzentration



Die Konzentration einer DNA-Lösung kann bestimmt werden durch die Messung der Absorption bei 260 nm mithilfe eines Photometers. Dies gelingt, da eine DNA-Lösung mit einer optischen Dichte von 1 (einer Absorptionseinheit) immer eine Konzentration von 50 µl/ml aufweist. Dies gilt zumindest in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm. Vor der Messung der DNA-Konzentration wurde mit AE-Puffer, in welchem die Proben-DNA gelöst ist, ein Nullabgleich am Photometer vorgenommen. Der Puffer wurde, ebenso wie die aufbereitete DNA-Lösung, vor der Messung mit DEPC-Wasser (durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat DNase-freies, destilliertes Wasser) auf 1:16 verdünnt. Von der verdünnten Lösung wurden 75 µl in die Küvette des Photometers pipettiert. Das Ergebnis der Messung [mg/ml] wurde dann mit dem oben genannten Verdünnungsfaktor wieder multipliziert um die Konzentration der Originallösung zu bestimmen.

Um alle PCR-Ansätze im optimalen Messbereich analysieren zu können, wurden die Proben mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt. Bei höheren Konzentrationen

kann es durch den entstehenden relativen Mangel an Primern und anderen Reaktionsprodukten, wie $MgCl_2$, zu fehlerhaften Messungen kommen. Damit die PCR ungestört ablaufen kann müssen sich die DNA-Fragmente frei mit den, im Überschuß vorhandenen, Reagenzien verbinden können. Bei einer geringeren DNA-Konzentration ergeben sich diese Probleme nicht. Die Proben werden unverdünnt eingesetzt und anschließend die Ergebnisse auf 100 ng/ μ l bezogen wurden.

4.5 *Isolierung des Standardmaterials*

4.5.1 Herkunft der Reinkultur

Eine Ampulle *Oxalobacter f.* (strain OxB), erhielten wir von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) aus Braunschweig. Dieser Bakterienstamm entspricht der Kultur „American Type Culture Collection“ (ATTC) Nummer 35274. Beide Firmen beziehen sich bei der Angabe zur Herkunft der Proben auf Arbeiten von Allison et al. (Allison et al., 1985).

4.5.2 Aufbereitung der DNA der Reinkultur und Erstellung einer Eichkurve

Die gefriergetrocknete Kultur wurde mit 1 ml sterilem entionisiertem Wasser aufgenommen und als Standard-Lösung verwendet. 200 μ l dieser Reinkultur wurden zur Isolierung der Bakterien-DNA eingesetzt. Dies geschah nach oben beschriebenen Protokoll (siehe 4.3, Seite 30). Die DNA-Konzentration der *Oxalobacter f.*-Standard-Lösung betrug 18,4 μ g/ml, gemessen im Photometer bei 260nm (siehe 4.4, Seite 32).

Aus dieser Lösung wurde die Standardreihe für eine Eichkurve erstellt. Hierzu wurden Verdünnungen über sechs Potenzen von 10 ng/ μ l bis 0,0001 ng/ μ l aus der DNA Stocklösung gewonnen. Da für die PCR jeweils 2 μ l der Probe eingesetzt wurden ergibt sich für die Eichkurve eine absolute DNA-Menge zwischen 20 ng und 0,0002 ng. Die eingesetzte DNA-Menge wurde gegen den Schwellenwert (CT-Wert) der PCR aufgetragen, der die genaueste Messung während des Prozesses gestattet. Anhand dieser Eichkurve kann bei bekanntem CT-Wert die Konzentration einer Lösung ermittelt werden. Dies geschieht automatisch am Ende jeder PCR durch die LightCycler Software (Version 3.1). Beispieleichkurve siehe Abbildung 5, Seite 34.

Die genaue Methodik der Quantifizierung wird im Folgenden bei der Erläuterung der RTQ-PCR dargelegt (siehe 4.6.1, Seite 34).

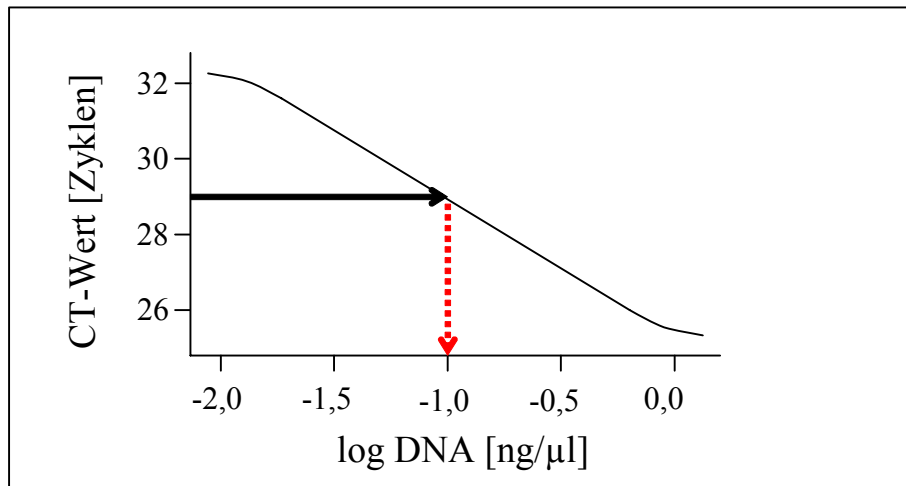


Abbildung 5: Beispielseichkurve: Ein CT-Wert von 29 (durchgehender Pfeil) entspricht nach dieser Eichkurve einer DNA-Menge von 10^{-1} ng (gestrichelter Pfeil). Details siehe Text.

Um nicht bei jedem PCR-Lauf eine eigene Eichkurve mitzuführen und trotzdem den Einfluß der täglichen Schwankungen auf die RTQ-PCR zu minimieren lief bei jedem Ansatz eine Standardverdünnung bekannter Konzentration (Kalibrator) mit. Dadurch konnte eine Anpassung der Standardkurve durchgeführt werden. Diese Anpassung wurde nach jeder PCR mithilfe des LightCycler-Computerprogramms berechnet.

4.6 real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)

4.6.1 Erläuterung der Methode



Aufgrund der vorher erläuterten Problematik bei der Quantitative Competitive-Template PCR (QC-PCR) bei der die Bestimmung der Menge relativ zu einem internen Standard am Endpunkt der PCR-Reaktion bestimmt wird und die Quantifizierung nach dem Southern Blot anhand von Bandenintensitäten erfolgt, haben wir nach einer

Verbesserung der Methode zur Quantifizierung von *Oxalobacter f.* gesucht.

Bei der verwendeten real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) liegt der Vorteil in der Aufzeichnung des Signals des PCR-Produktes eines jeden Amplifikationszyklus schon während der Reaktion. Dadurch ist es möglich die Quantifizierung in der Phase der PCR durchzuführen, in der sich die DNA exponentiell vermehrt.

Dies wird erreicht durch Detektionshilfsmittel die die DNA-Replikation widerspiegeln und während der PCR gemessen werden können. In der Regel werden fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorophore verwandt. In dieser PCR wurde SYBRGreen eingesetzt, ein kleines, für den spezifischen Nachweis von Doppelstrang-DNA etabliertes Molekül, welches zwischen doppelsträngigen Nucleinsäuren eingebunden (interkaliert) wird (Day, 2000). Nach Anregung durch kurzwelliges UV-Licht emittiert es längerwelliges Licht, welches als Fluoreszenz gemessen wird. Steigt also die Anzahl der amplifizierten Moleküle so steigt auch die Anzahl der eingelagerten Farbstoffe und damit die Emission langwelligen Lichts in proportionaler Weise an. Mithilfe des LightCyclers (*Roche*) wird nach jedem Zyklus die Emission gemessen. Die Vervielfältigung der DNA-Matrix und ihre quantitativen Messung findet ohne weitere Verfahrensschritte statt. Die Quantifizierung erfolgt über eine mit dem gleichen Verfahren gemessene Eichkurve (siehe 4.5.2, Seite 33).

4.6.2 Die Quantifizierung bei der RTQ-PCR

Grundlage der Quantifizierung ist, dass sich die vorhandene *Oxalobacter f.*-DNA in jedem Zyklus verdoppelt, also einer exponentiellen Vervielfältigung unterliegt. Diese Exponentialität besteht nur am Anfang der Reaktion, da mit der Akkumulation des Produktes in späteren Zyklen auch die störenden Einflüsse steigen. Diese können bedingt sein durch den Verbrauch von Primern und Oligonukleotiden, durch eine Schädigung der Taq-Polymerase und Nucleotide aufgrund der anhaltend hohen Temperaturen oder über eine Hemmung der Reaktion durch die angehäuften Produkte. In jedem Fall verlangsamt sich der Prozess zu einem linearen Wachstum um dann zum Stillstand zu kommen (Mühlhardt, 2002).

Als Richtwert für die Quantifizierung dient die Zykluszahl, in der sich das Fluoreszenzsignal signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation der DNA exponentiell. Dieser Zyklus wird auch als CT-Wert oder Treshold-Cycle (Schwellenwert) bezeichnet. Die Hintergrund-Fluoreszenz wird verursacht von der Grund-

Fluoreszenz des Ansatzes, die wiederum beeinflusst wird von der Konzentration der Probe und dem zugegebenen Fluorophor, hier SYBRGreen (Day, 2000).

Zunächst wird die Fluoreszenzintensität gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die entstandene Funktion zeigt die Entwicklung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl und spiegelt so die PCR-Produktentwicklung in jedem Zyklus wieder. Die gleichen Fluoreszenzkurven werden nun dargestellt in einem logarithmischen Maßstab. Die CT-Werte werden in dem Bereich der Kurve ermittelt, in dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft. Dies entspricht dem linearen Bereich der Kurve. Das Verfahren der Quantifizierung ist in den folgenden Abbildungen 7-9 schematisch dargestellt.

Bei bekannter PCR-Effizienz könnte man schon allein anhand der Ergebniskurve auf die Template-Menge rückschliessen. Da diese aber durch sehr viele Faktoren beeinflusst wird, ist es genauer Standards mit bekannten Template-Mengen zu amplifizieren und ihre CT-Werte zu bestimmen. Mit diesen Ergebnissen ist es möglich eine Standardkurve zu erstellen, aus der sich dann die DNA-Konzentration der Proben ablesen lässt, wie für diese Studie geschehen (Details dazu siehe 4.5.2, Seite 33). Abbildung 6 zeigt die Eichkurve, die mithilfe des LightCycler-Programmes aus den Ergebnissen der Messung der Standard-Proben berechnet wurde.

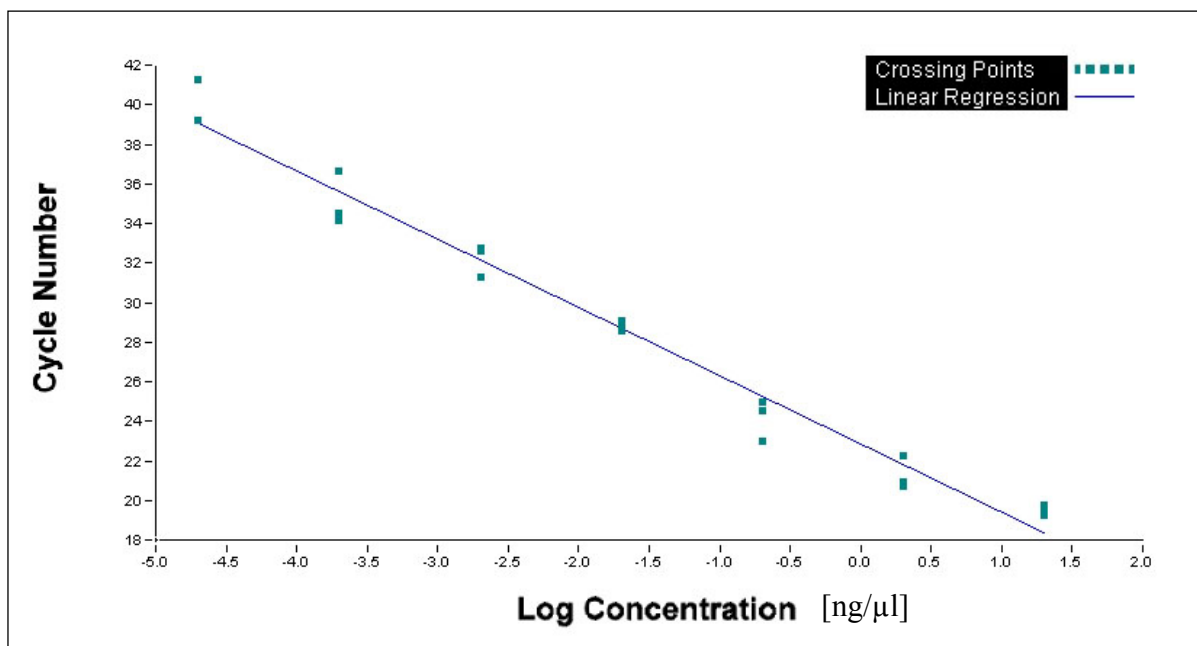


Abbildung 6: Eichkurve aus dem LightCycler, die nach Messung der Verdünnungsreihe einer *Oxalobacter f.*-Reinkultur erstellt wurde.

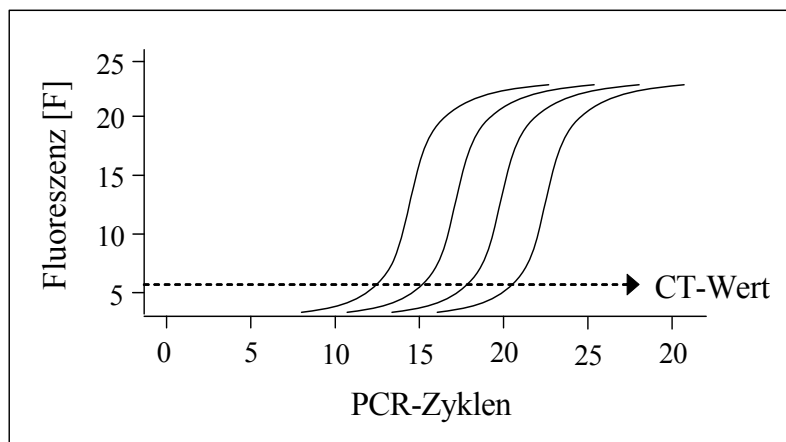


Abbildung 7: Das Prinzip der Quantifizierung in der RTQ-PCR. Fluoreszenzkurven für vier Amplifikationen mit unterschiedlichen Template-DNA Mengen (nach Mühlhardt, 2002).

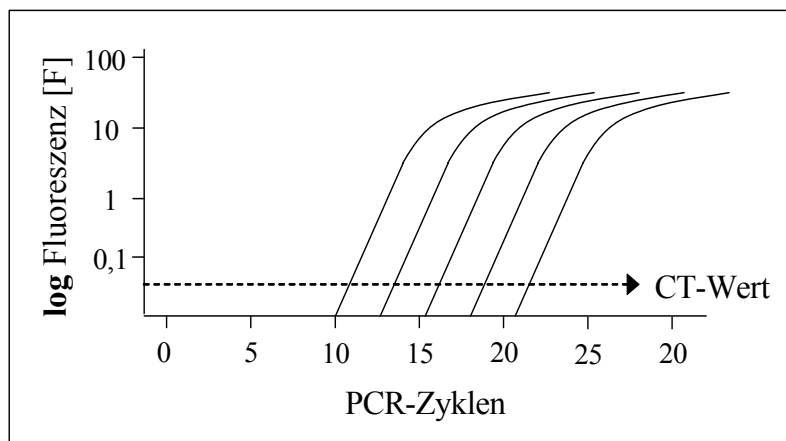


Abbildung 8: Gleiche Fluoreszenzkurven mit logarithmischem Maßstab. Die CT-Werte werden in dem Bereich ermittelt, in dem sich eine exponentielle Amplifikation findet (linearer Bereich der Kurve) (nach Mühlhardt, 2002).

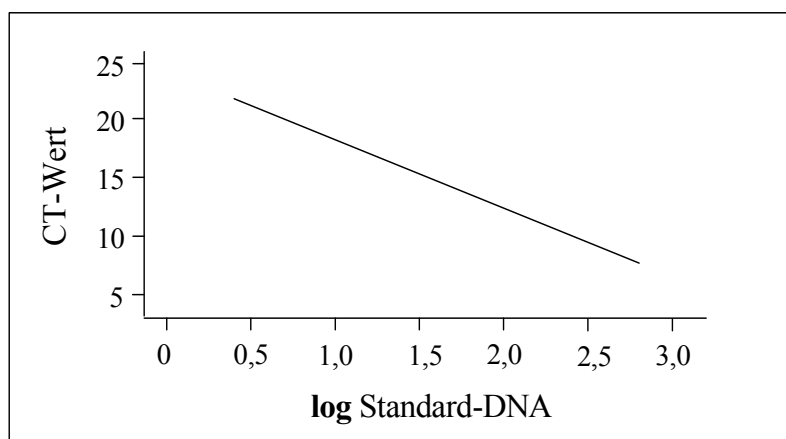


Abbildung 9: Trägt man den ermittelten CT-Wert gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA auf, erhält man eine Standard-Kurve, die es erlaubt, aus den CT-Ansätzen der Versuchsansätze die jeweils ursprünglich vorhandene DNA-Menge zu ermitteln (nach Mühlhardt, 2002).

4.6.3 Qualitätskontrolle durch die Schmelzkurve

Nach erfolgter PCR wird noch eine Schmelzkurve erstellt. Sie dient der Qualitätskontrolle der Reaktion, da durch sie ermittelt werden kann, ob Produkte spezifischer Länge entstanden sind, oder die Signale durch Verunreinigungen (zum Beispiel Primer-Dimere) zu stande kamen.

Hierfür wird der gesamte Ansatz am Ende der Amplifikation nochmals langsam erhitzt und währenddessen die Emission kontinuierlich gemessen. Jedes Amplikon hat einen spezifischen, von Länge und Zusammensetzung abhängigen, Schmelzpunkt. Bei Erreichen genau dieser Temperatur geht die Emission schlagartig zurück, da die Amplifikationsprodukte denaturieren und das SYBRGreen nicht mehr angeregt wird.

Kommt es durch Verunreinigungen oder Zusammenlagerung von Primern (Bildung von Dimeren) zu fehlerhaften Produkten, so wird dieser Peak nicht bei der für das gesuchte Amplikon spezifischen Temperatur sondern meist schon früher erreicht. Das bedeutet, dass es möglich ist an der Schmelzkurve abzulesen ob die Emission durch die Verbindung des SYBRGreen mit dem gesuchten Amplikon oder aber durch eine fehlerhafte Zusammenlagerung unspezifischer DNA-Fragmente entstanden ist (siehe Abbildung 10-12).

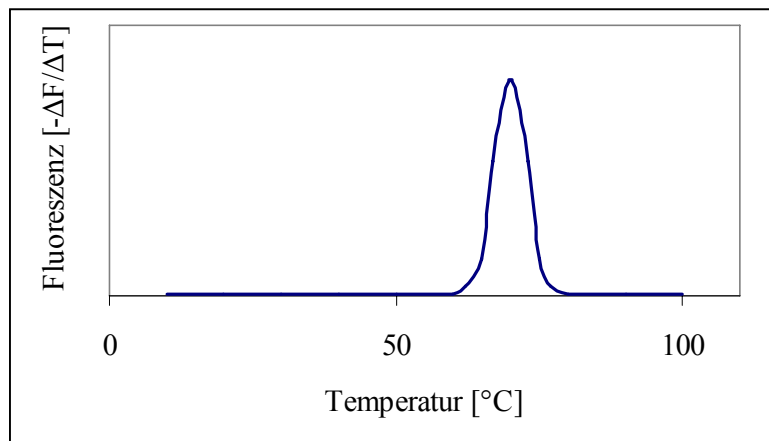


Abbildung 10: Schmelzkurve 1. Die Änderung der Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit wird hier gegen die Temperatur aufgetragen, schmelzen die Amplikons gibt es eine Abnahme der Fluoreszenz hier als Peak dargestellt. Man sieht hier eine Schmelzkurve mit einem einzelnen Peak bei $\approx 70^\circ\text{C}$. Er ist entstanden durch das gesuchte Amplikon bestimmter Länge und Zusammensetzung. Diese Kurve stellt die erwartete Schmelzkurve dar.

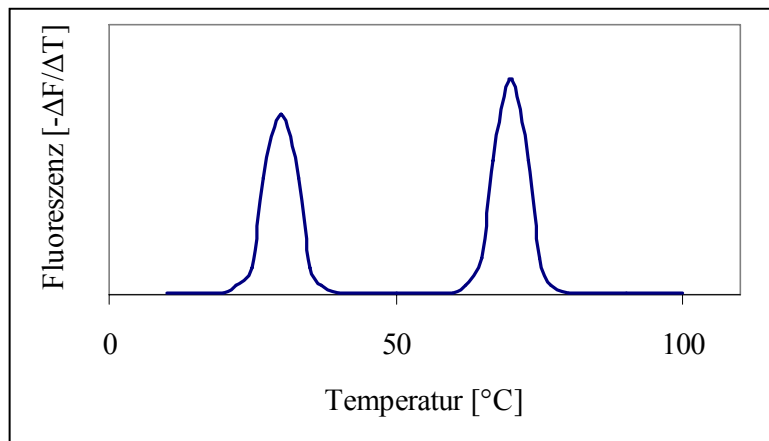


Abbildung 11: Schmelzkurve 2. Hier sieht man zwei Peaks, einen bei der gewünschten, und einen zweiten bei niedrigerer Temperatur. Wahrscheinlich ist der zweite Peak durch Primer-Dimere entstanden. Das sind fehlerhafte Zusammenlagerungen zweier Primer (siehe Text), die zu fehlerhaft hohen Fluoreszenzwerten führen. Die Intensität der Emission lässt sich nicht nur auf das gewünschte Amplicon beziehen. Die Ergebnisse sind nicht verwertbar. Die PCR sollte wiederholt werden.

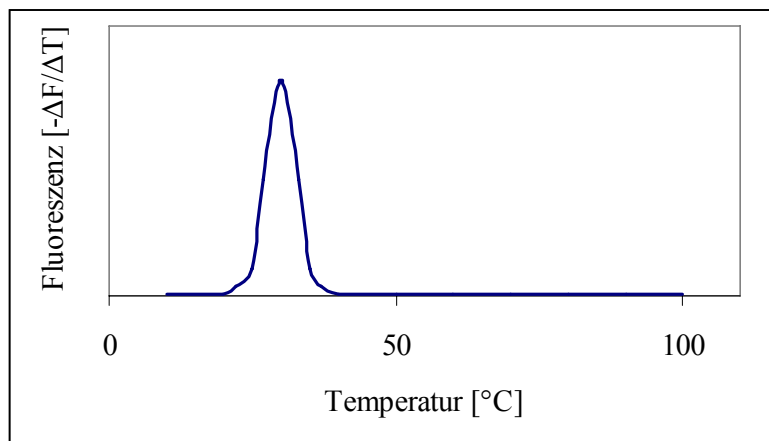


Abbildung 12: Schmelzkurve 3. Es liegt nur ein Peak vor, allerdings nicht bei der spezifischen Temperatur von $\approx 70^\circ\text{C}$. Somit liegen nur unspezifische Dimere vor, so dass davon ausgegangen werden kann dass die gesuchte DNA nicht in dem Ansatz vorhanden war.

4.6.4 Verwendete Produkte

Benutzt wurde das LightCycler FastStart DNA Master Mix SYBR-Green Kit (Firma Roche, Mannheim); es enthält alle für die PCR notwendigen Substanzen :

- FastStart Taq DNA Polymerase
- Nucleotidmix
- SYBR-Green

- optimierter PCR-Puffer
- MgCl₂-Konzentrat

Der Vorteil der verwendeten *FastStart Taq DNA Polymerase* gegenüber anderen DNA-Polymerasen liegt darin, dass sie erst nach einer Hitzeaktivierung reaktiv wird. Dies wird dadurch erreicht, dass an manchen ihrer Aminosäuren hitzelabile blockierende Gruppen angelagert sind, welche das Enzym bei Raumtemperatur inaktivieren. Dadurch kann keine Elongation bei Temperaturen stattfinden in denen die Primer unspezifisch binden könnten. Die Polymerase wird erst aktiv, wenn die blockierenden Gruppen bei hoher Temperatur abgebaut werden. Dies geschieht bei der Präinkubation bei der die Proben für 10 Minuten auf 95°C erhitzt wurden (siehe 4.6.5, Seite 41).

Die hier benutzten *Primer* für die 16SrRNA sowie für *Oxalobacter f.* wurden von Sidhu et al. etabliert (Sidhu et al., 1999a). Das universelle Primer-Paar, das das Gen für die bakterielle 16SrRNA codiert, welche in allen Bakterien nachweisbar ist, wurde als Referenz Gen (Housekeeping Gen) eingesetzt.

- forward primer : 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3' [16Sfp]
- reverse primer : 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' [16Srp]

Ein Housekeeping Gen ist eine endogene Kontrolle und wird eingesetzt um zu zeigen, dass mit der Probe eine funktionsfähige PCR durchgeführt werden kann (siehe Inhibitoren) und Bakterien-DNA nachweisbar ist. Hierdurch können falsch-negative Ergebnisse, infolge fehlerhafter Aufbereitung der Proben, ausgeschlossen werden.

Für die Studienproben wurde nachgewiesen, dass 16SrRNA vorhanden ist, was andeutet dass ein negativer *Oxalobacter f.*-Nachweis nicht aus einer inadäquaten DNA-Isolation resultiert, sondern aus dem Fehlen des Organismus in der vorliegenden Probe.

Die Primer für *Oxalobacter f.* amplifizieren ein 416 Basenpaare (bp) langes Fragment in Strängen der Untergruppe II und ein 413 bp langes in der Untergruppe I. Die Primer wurden von Sidhu et al. designed, basierend auf der von Lung et al. sequenzierten Oxalyl-CoA-Decarboxylase (*oxc*)

(Lung et al., 1994; Sidhu et al., 1997a; Sidhu et al., 1997b). Dieses Gen ist nur in *Oxalobacter f.*-Spezies zu finden, was die Synthese eines genus-spezifischen PCR-Primerpaars erlaubte.

- forward primer : 5'-AATGTAGAGTTGACTGA-3' [OXFfp]
- reverse primer : 5'-TTGATGCTGTTGATACG-3' [OXFrp]

4.6.5 Durchführung der RTQ-PCR

Für die Optimierung der PCR-Bedingungen wurden in Testläufen die Annealingtemperatur, das heißt die Temperatur für die Anlagerung der Primer, von 55°C bis 60°C, und die Magnesiumionen-Konzentration, von 1 mmol/l bis 5 mmol/l, variiert.

Als optimale Bedingungen erwiesen sich eine Präinkubation bei 95°C für 10 Minuten, zur Aktivierung der FastStart-Polymerase, gefolgt von 45 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase bei 95°C für 10 Sekunden, dem Anlagern der Primer (Annealing) bei 60°C über 5 Sekunden, der 10 Sekunden dauernden Elongation bei 72°C und der abschliessenden Emissionsmessung zur Quantifizierung vorhandener PCR-Produkte (siehe Tabelle 3, Seite 42).

Ab dem 15ten Zyklus wurde, entsprechend der "Touch-down-Methode", die Annealingtemperatur auf 55°C gesenkt, um die Anlagerung der Primer zu erleichtern und damit eine höhere Zahl an Amplifikationsprodukten zu erlangen

Um die Schmelzkurve zu erstellen wurde der Ansatz nochmals auf 95°C erhitzt, für 15 Sekunden auf 65°C abgekühlt um dann nochmals sehr langsam, mit 0,1°C pro Sekunde, auf 95°C gebracht zu werden. Es erfolgt gleichzeitig eine kontinuierliche Emissionsmessung. Abschliessend folgt eine Abkühlungsphase bei der die Proben auf 40°C gekühlt wurden.

Tabelle 3: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der RTQ-PCR. Zusätzlich sind die Prozess-Temperaturen während der einzelnen Schritte und die Zeitpunkte der Fluoreszenzmessung aufgeführt.

	T_{\max} [°C]	Zeit [s]	Aufheizrate [°C/s]	Emissions- messung
Enzymaktivierung	95	10	20	keine
Zyklen (45)	95	10	20	keine
	60	5	20	keine
	72	10	20	einfach
Schmelzkurve	95	0	20	keine
	65	15	20	keine
	95	0	0,1	kontinuierlich
Kühlung	40	30	20	keine

Jeder Ansatz setzt sich zusammen aus 8 μl Mastermix und 2 μl DNA. Im Mastermix waren 4,4 μl Aqua dest, 1,6 μl des 5 millimolaren Magnesium-Chlorids (MgCl_2), 1 μl Lightcycler Reagenz, sowie 5 pmol des forward Primers und 5 pmol des reverse Primers. Insgesamt wurden also 10 μl Lösung in jede LightCycler-Glaskapillare überführt (siehe Tabelle 4, Seite 43).

Es gab je einen Ansatz für die Detektion nach 16SrRNA und *Oxalobacter f.*-DNA, in denen unterschiedliche Primer verwendet wurden. Außerdem liefen bei jeder PCR jeweils noch eine Standardprobe zur Kalibration und eine Negativkontrolle mit. Bei der Negativkontrolle wurde die DNA durch DEPC-Wasser ersetzt um eine eventuelle Kontamination auszuschließen.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Grundstocks für die RTQ-PCR, der sich aus MgCl₂, H₂O, Primern und SYBRGreen zusammensetzt. Um Pipettierfehler zu minimieren wurde dieser „Mastermix“ für alle Proben gemeinsam pipettiert. Von dem Ansatz wurden dann je 8 µl in ein Tube gegeben und mit 2 µl der Proben-DNA vermischt.

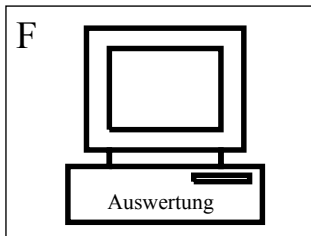
	Substanz	Menge
	H ₂ O	4,4 µl
	MgCl ₂ (5 mM)	1,6 µl
Mastermix	Primer forward	0,5 µl≡5 pmol
	Primer reverse	0,5 µl≡5 pmol
	SYBRGreen	1,0 µl
DNA	100 ng/µl	2,0 µl
Insgesamt		10 µl

4.7 Evaluierung der Methode

- **Bezugsgröße:** Als Verhältnisgröße wird die in die PCR eingesetzte Gesamt-DNA genutzt. Diese setzt sich aus der bakteriellen und der DNA der Körperzellen zusammen. (In Abschnitt 6.1 folgt eine detaillierte Begründung hierfür.) In jedem Lauf werden 200 ng dieser Gesamt-DNA (DNA_{ges}) eingesetzt. Somit werden die Ergebnisse in Pikogramm *Oxalobacter f.* respektive 16SrRNA pro 200 ng Gesamt-DNA angegeben [pg/200ngDNA_{ges}].
- **Spezifität:** Die RTQ-PCR ist, wie schon in 2.5.4 beschrieben, sehr spezifisch für den *Oxalobacter f.*-Nachweis. Diese Spezifität wird durch die benutzten Primer erreicht, welche für Sequenzen in der Oxalyl-CoA-Decarboxylase (*oxc*) kodieren, die nur in diesem Bakterium vorkommen. Um die Spezifität der Primer nachzuweisen wurden sie in verschiedenen PCRs zusammen mit verschiedenen Bakterien der Darmflora eingesetzt. Es gab keine Kreuzreaktion mit der aus *Alcaligenes oxalaticus* extrahierten *oxc* oder DNA-Präparationen aus *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Flammulina* oder anderen darmassoziierten Mikroorganismen, präsent in Stuhlproben von über 120 Probanden (Sidhu et al., 1997a); daraus lässt sich schließen, dass dieses Fragment der *oxc* nur in *Oxalobacter f.* zu finden ist.

- Zum einen ist es wichtig die *Bedingungen für die PCR*, wie etwa die Magnesium-Konzentration und die Annealingtemperatur zu optimieren (siehe 4.6.4, Seite 39). Dies geschah in vielen Vorversuchen in der Testphase der RTQ-PCR und kann somit als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.
- Mögliche in den Proben vorhandene *PCR-Inhibitoren*, die den Ablauf der Messung stören können, werden bei der DNA-Aufreinigung (siehe 4.3, Seite 30) mithilfe eines, im *QIAamp DNA Stool Mini Kits* (Firma *Quiagen*, Hilden) enthaltenen, Absorptionsmaterials entfernt. Kommt es trotzdem zu einer Störung der PCR durch diese Substanzen würde das durch eine sehr niedrige DNA-Konzentration in der aufbereiteten Probe und/oder durch einen fehlerhaften Nachweis der 16SrRNA auffallen, die in jeder Probe vorhanden ist. Diese Störung trat innerhalb dieser Studie nicht auf; ein Lösungsansatz wäre eine erneute Aufreinigung der betroffenen Probe mit der doppelten Menge an Absorptionsmaterial, um die die PCR störenden Substanzen zu entfernen.
- Als Kontrolle für die *Aufarbeitung der Proben* wurde für jede Probe eine PCR mit Primern für bakterienspezifische 16SrRNA durchgeführt. Bei negativem Nachweis erfolgte eine neuerliche Aufbereitung der Probe mit anschließender PCR. Dies war bei einer von 80 Proben der Fall.
- Die *Standardkurve*, anhand derer die Berechnung der Ergebnisse vorgenommen wird, wurde jeweils an die Tagesbedingungen angepasst, indem sie mit Proben aus dem Standardmaterial die in jedem Lauf mit gemessen wurden, abgeglichen wurde. Dies geschah automatisiert durch die Software des LightCyclers.
- Um insgesamt die Fehler zu minimieren und die Genauigkeit zu erhöhen wurden von jeder Probe *drei Ansätze* in der PCR quantifiziert. Die im Weiteren beschriebenen Ergebnisse ergeben sich aus deren Mittelwerten.

5. Auswertung und Ergebnisse



Das Procedere nach der Probennahme lief ordnungsgemäß ab; die Proben wurden nach der Entnahme schnellstmöglich durch den Patienten, der über die Wichtigkeit der sofortigen Übergabe informiert wurde, an das Labor weitergeleitet. Bei der Ankunft im Labor wurden die Stuhlproben umgehend bei minus 20°C tiefgefroren. Die Aufbereitung bereitete keine Probleme, sodass die folgende Ermittlung der DNA-Konzentration und die Messungen in der PCR ohne Störungen durchgeführt werden konnten.

In der Vorbereitungsphase der Studie wurden wichtige Kriterien festgelegt und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt:

- *Oxalobacter f.*-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze:

Anhand der Messung von standardisierten DNA-Proben zur Erstellung der Eichkurve (Details siehe 4.5.2, Seite 33) kann die *untere Nachweisgrenze* von *Oxalobacter f.* ermittelt werden. Grundlage ist, dass jeder Ansatz 3fach gemessen wird. Ist genug DNA in den Ansätzen vorhanden so liegen die Fluoreszenz-Kurven dicht beieinander (siehe Abbildung 13, Ziffer 1, Seite 47). Bei den Proben mit zu geringen DNA-Mengen weichen die Ergebnisse der Messungen stark voneinander ab, schwanken sogar zwischen positiven und negativen Nachweisen. Die Kurven entstanden teilweise durch Primer-Dimere, wie sich bei der Auswertung der Schmelzkurve zeigte. Diese Probleme, die bei zu geringen DNA-Mengen von *Oxalobacter f.* im Ansatz entstanden, traten bei CT-Werten über 40 auf. Daraus ergibt sich, dass die durch den LightCycler berechneten Ergebnisse bei so hohen CT-Werten nicht verlässlich sind. Proben, deren CT-Wert über 40 Zyklen liegt, werden somit als *Oxalobacter f.*-negativ gewertet da sie die untere Nachweisgrenze unterschreiten. Dies entspricht ungefähr 3×10^{-3} pg des Bakteriums.

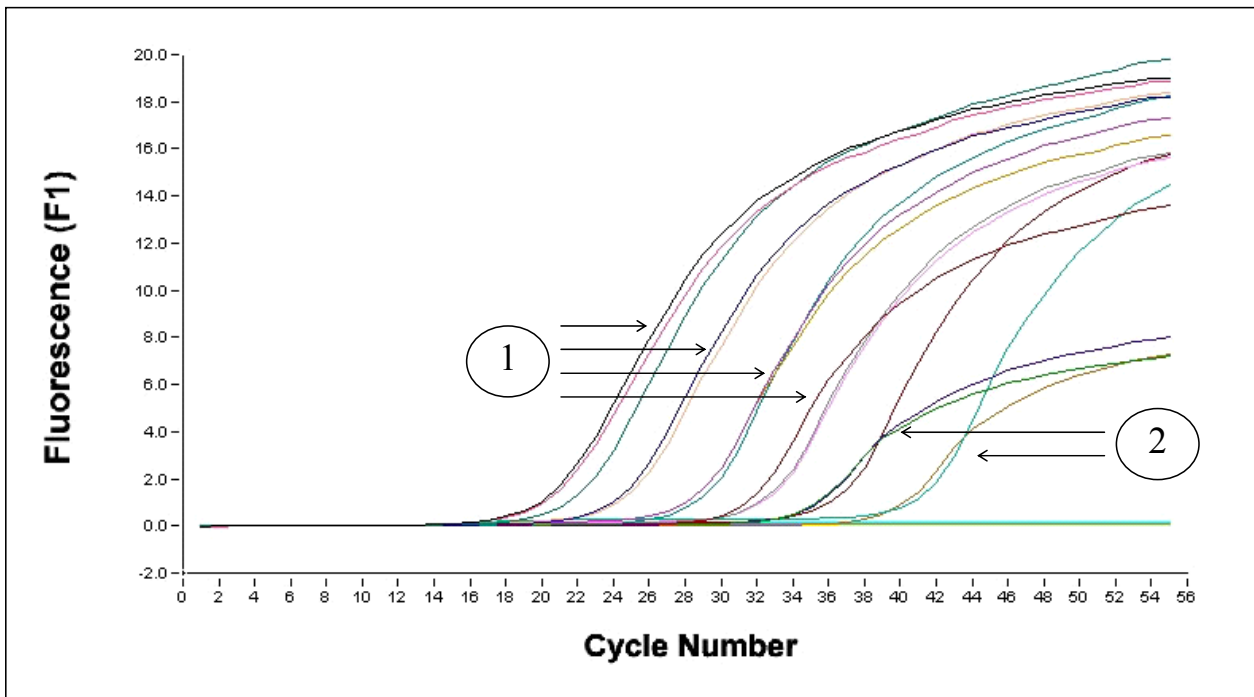


Abbildung 13: Fluoreszenz-Kurve der LightCycler-Messung von den auf 20 ng bis 0,0002 ng verdünnten Proben des *Oxalobacter f.*-Standards. Ziffer 1: Je drei Ansätze einer Probe zeigen sich überlagernde Fluoreszenzkurven im linearen Bereich (exponentielle Phase der PCR). Ziffer 2: Diese beiden 3fach-Messungen zeigen stark voneinander abweichende Kurven. (weitere Details siehe Text)

- *16SrRNA-Konzentration* unterhalb der Nachweisgrenze:

Eine Mindestmenge an 16SrRNA ist in jeder Stuhlprobe zu finden, da Faeces zum Großteil aus Bakterien besteht. Ist dies nicht der Fall, sollte eine erneute Aufbereitung und Messung der Probe erfolgen, um Fehler bei diesen Schritten auszuschließen. Bleibt der Nachweis weiterhin negativ, sollte die Probe ausgeschlossen werden. Bei einer von achtzig Proben konnte auch nach Wiederholung des Procedere keine 16SrRNA nachgewiesen werden, aus diesem Grund wurde diese Probe, als einzige in dieser Studie, ausgeschlossen.

- Nachweis von *Primer-Dimeren*:

Sind Primer-Dimere in der Schmelzkurve zu sehen, welche darauf schließen lassen, dass die Fluoreszenz in der PCR nicht nur durch das spezifische Amplikon sondern durch fehlerhafte Produkte entstanden ist, werden die Proben als frei von *Oxalobacter f.* gewertet (siehe 4.6.3, Seite 38). Bei gleichzeitigem Auftreten von Dimeren und einem DNA-Peak wurde die PCR wiederholt. In den PCR-Läufen zur Detektion von 16SrRNA fanden sich keine Dimere, während es bei der Detektion von *Oxalobacter f.* häufig zur Bildung unspezifischer DNA-

Produkte kam. In der folgenden Abbildung (Abbildung 14) ist die Schmelzkurve einer Probe zu sehen, in der sich Primer-Dimere zeigen. Im Vergleich dazu sieht man die Schmelzkurve der mitgelaufenen Standardprobe. Es fällt auf, dass die Temperatur bei der die Fluoreszenzänderung in der Probe auftritt niedriger ist, als die bei der dieselbe Änderung in der Standardprobe entsteht. Da die Schmelztemperatur mit der Länge der DNA-Fragmente korreliert, folgt, dass die Fluoreszenz in der Probe durch kürzere DNA-Fragmente entstanden ist als die im Standard. Somit ist diese Probe trotz gemessener Fluoreszenz als frei von *Oxalobacter f.* zu werten.

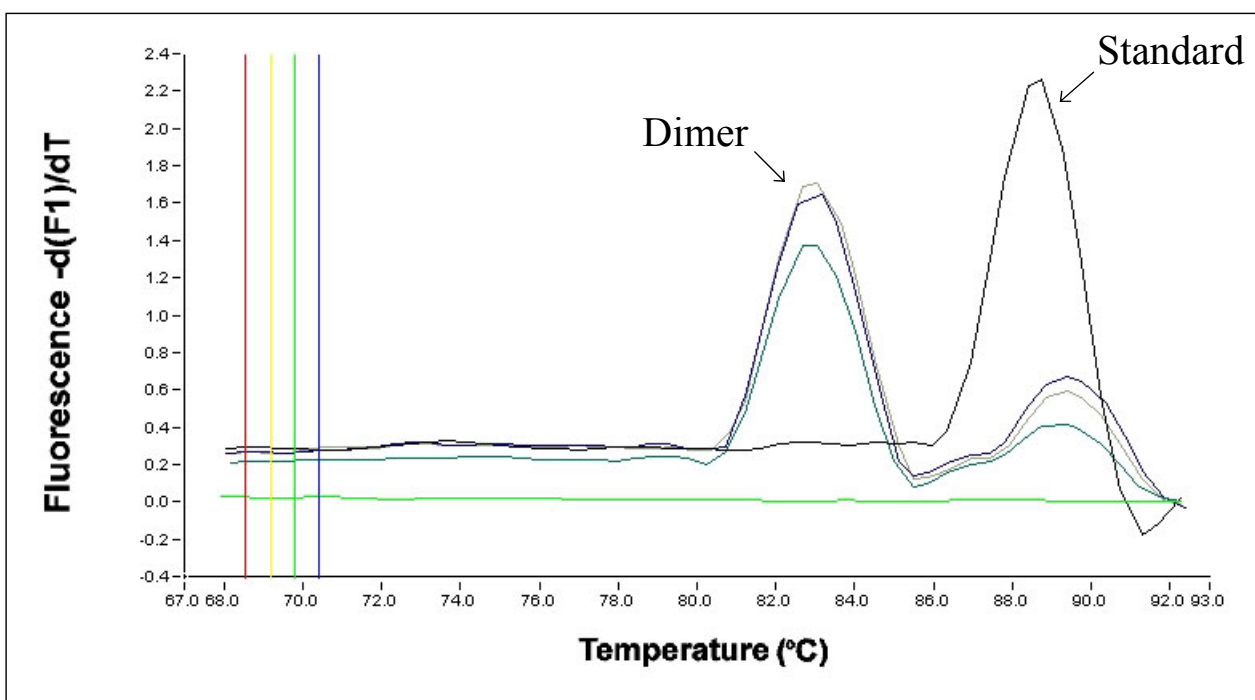


Abbildung 14: LightCycler-Darstellung der Schmelzkurve einer Probe mit Primer-Dimeren im Vergleich zur Schmelzkurve des internen Standards. Die Schmelztemperatur korreliert mit der Länge der DNA-Fragmente. Die Fragmente in der Probe zerfallen bei niedrigeren Temperaturen als die des internen Standards. Das bedeutet, dass sie kürzer sind als die durch Primer entstandenen Fragmente, und somit nicht durch die Amplifizierung von *Oxalobacter f.*-DNA entstanden. In dieser Probe ist trotz eines Anstiegs der Fluoreszenz kein *Oxalobacter f.* nachweisbar.

- Durch DNA *kontaminierte Negativkontrolle*:

Bei der Negativkontrolle wird der Reaktions-Lösung anstelle der 2 µl DNA-Lösung nur DEPC-Wasser zugesetzt, diese Probe wird zusammen mit den restlichen Ansätzen in jeder PCR amplifiziert. In dieser Probe ist keine DNA vorhanden, darum kann während der PCR kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Kommt es trotzdem zu einem Fluoreszenz-Anstieg ist dies ein Indiz für die Verunreinigung der gemessenen Proben mit DNA oder Hinweis darauf, dass die Signale durch die Reaktion der einzelnen Substanzen untereinander entstanden sind. Dieses Problem trat innerhalb der Versuchsreihe nicht auf. Bei Auftreten ist eine erneute Messung des gesamten Laufes notwendig, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Von 80 Proben erfüllten 79 uneingeschränkt die festgelegten Kriterien.

Nur eine Probe beinhaltete, auch bei mehrmaliger Neuaufbereitung der Probe, keine 16SrRNA. Wie in der vorangehenden Auswertung auf Seite 47 aufgezeigt, ist dies ein Zeichen für einen Fehler bei der Entnahme, Konservierung oder Aufbereitung und Messung der Probe. Die letzten beiden Fehlerquellen wurden durch die erneute Aufbereitung und Messung ausgeschlossen, sodass von fehlerhaftem Material ausgegangen und die Probe somit ausgeschlossen werden muss.

In Tabelle 5 findet sich eine Zusammenfassung der Ergebnisse; eine detaillierte Aufstellung findet sich im Anhang (siehe 9.1, Seite 77).

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse bezogen auf den *Oxalobacter f.*-Nachweis. Die Gesamtergebnisse werden getrennt dargestellt für die verschiedenen Lagerungsarten (nativ, Gel, flüssig) und die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Kontrollgruppe und den an CaOx-Urolithiasis erkrankten Probanden, die sich aus CaOx-Harnsteinpatienten mit und ohne *Morbus Crohn* zusammensetzen. (HS = CaOx-Harnsteinpatienten, MC = CaOx-Harnsteinpatienten mit *Morbus Crohn*)

	gesamt	Einwaage <100 ng/μl	<i>Oxalobacter</i> positiv	<i>Oxalobacter</i> positiv [%]
Nativ	61	3	19/61	31
Kontrolle	19	0	10/19	53
HS und MC	42	3	9/42	21
Gel	12	12	5/12	42
Kontrolle	3	3	3/3	100
HS	9	9	3/9	33
flüssig	6	6	6/6	100
Kontrolle	0	0	0	0
HS	6	6	6/6	100
gesamt	79	21	31/79	39
Kontrolle	22	0	13/22	59
HS und MC	57	3	18/57	32

In der Darstellung der Ergebnisse für die *Oxalobacter f.*-positiven Proben sowie den Gehalt an 16SrRNA in Tabelle 6 und den dazugehörige Abbildungen 15 und 16, zeigt sich, dass die verschiedenen Lagerungsarten einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der quantitativen Messung haben. Dies führt zum Ausschluss der Ergebnisse der Gruppen Gel und Flüssig in der quantitativen Auswertung. Details siehe 6.2.

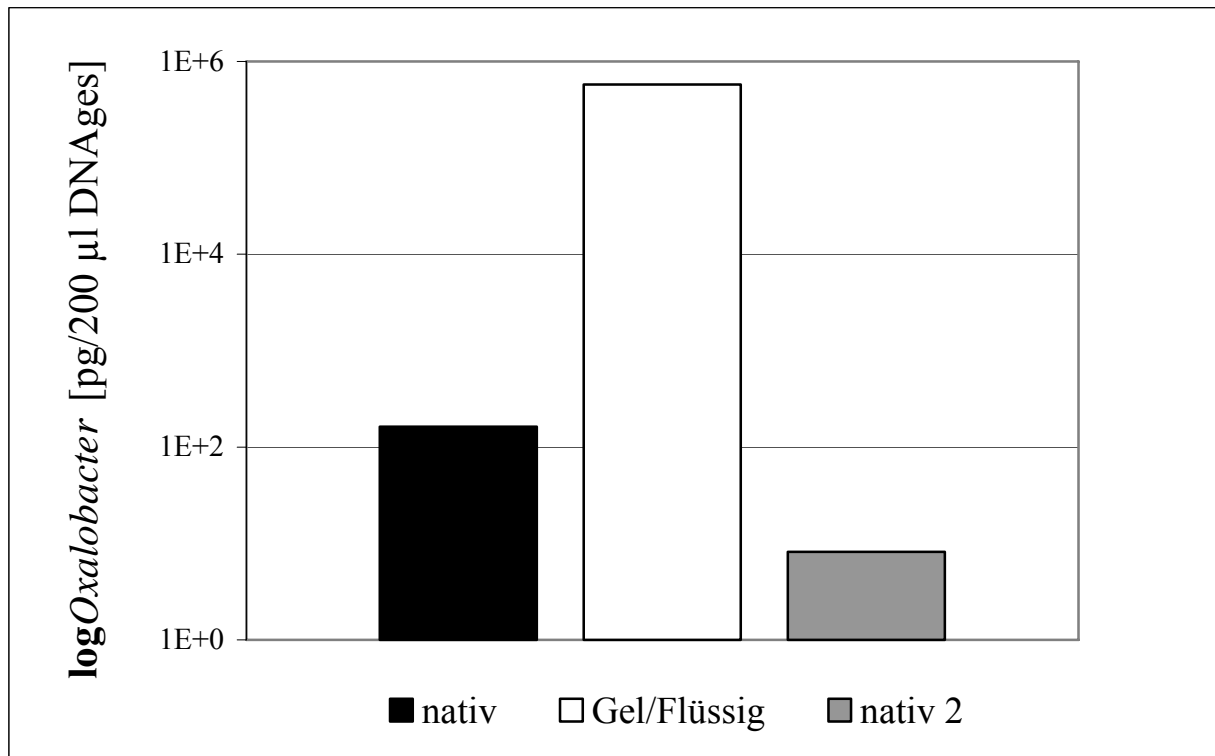


Abbildung 15: Mittelwerte der Ergebnisse für die *Oxalobacter f.*-positiven Proben, Die „Flüssig“- und „Gel“-Proben, zeigen sehr hohe Werte. Da bei genau denselben Proben auch für die 16SrRNA extrem hohe Werte zu finden sind (siehe Abbildung 16), werden diese zwölf Proben bei der *quantitativen* Auswertung nicht berücksichtigt. (nativ 1 = 43, Gel/Flüssig = 18, nativ 2 = 19 Proben)

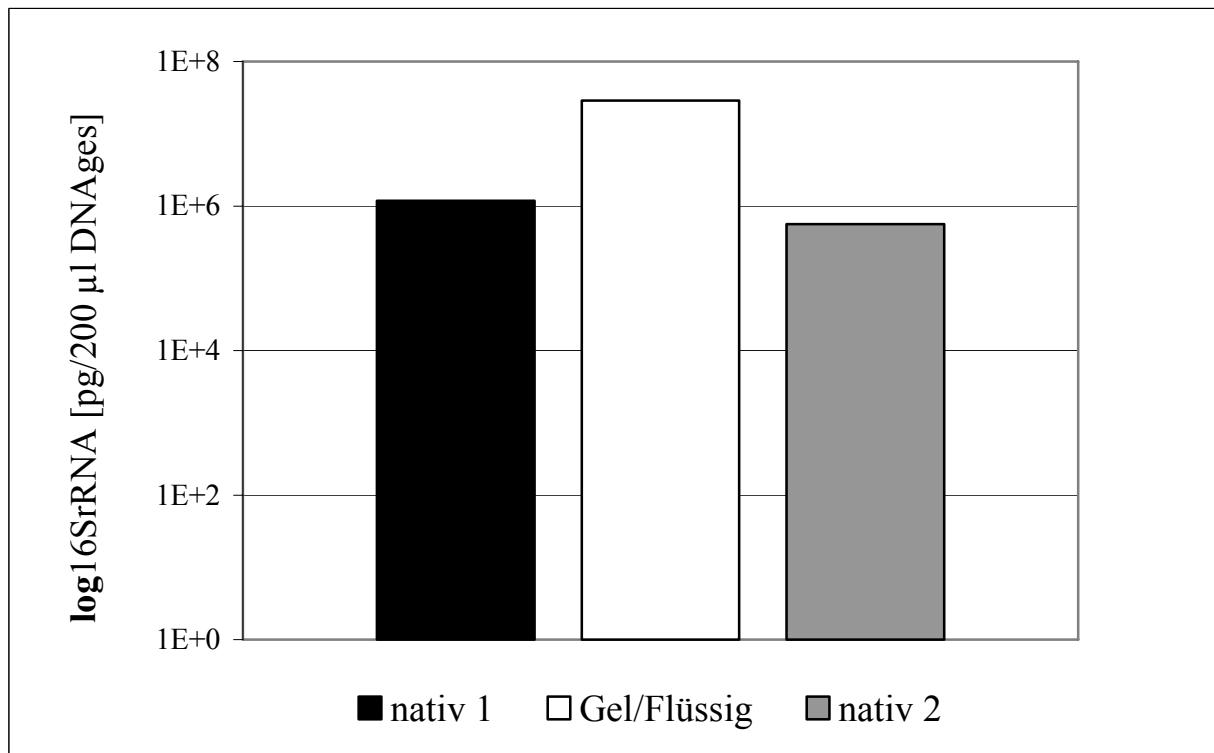


Abbildung 16: Abweichungen der 16SrRNA-Konzentration innerhalb der Proben, aufgeteilt nach Lagerungsarten. Die nativ 2-Proben zeigen wenig, die Flüssig- und Gel-Proben hingegen übermäßig viel 16SrRNA. Diese Gruppen werden wegen dieser Ergebnisse und der Ergebnisse beim *Oxalobacter f.*-Nachweis nur bei der qualitativen, nicht aber bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt.

Tabelle 6: Mittelwerte der Ergebnisse für *Oxalobacter f.*- und 16SrRNA-DNA gemessen mittels RTQ-PCR bezogen auf die drei verschiedenen Lagerungsarten beziehungsweise Untergruppen (siehe 4.1, Seite 28).

	<i>Oxalobacter</i> [pg/200µl DNA]	16SrRNA [pg/200µl DNA]
nativ 1	163	1.180.963
Gel/flüssig	576.421	28.894.458
nativ 2	8	561.067

Um Informationen über die Variation des Ergebnisses abhängig vom Ort der Probenentnahme in der Stuhlprobe und der Aufbereitung der Probe zu gewinnen, wurden aus einer Stuhlportion zehn Proben genommen. Die Proben 1-5 sind an verschiedenen Stellen der nativen Stuhlportion entnommen, die anderen an unterschiedlichen Stellen der nun homogenisierten Probe (Entnahmeschema siehe Abbildung 28, Seite 66). Die so gewonnenen Ergebnisse für 16SrRNA und *Oxalobacter f.*, aufgeführt in Tabelle 7 sowie dargestellt in Abbildungen 17 und 18 (siehe folgende Seite), aus ein- und derselben Stuhlprobe variieren stark.

Tabelle 7: Die Ergebnisse für 16SrRNA und *Oxalobacter f.* aus ein- und derselben Stuhlprobe variieren stark. Diese Schwankungen können minimiert werden durch eine Homogenisierung der Proben. Die Proben 1-5 sind an verschiedenen Stellen der nativen Stuhlportion entnommen, die anderen an unterschiedlichen Stellen der nun homogenisierten Probe (Entnahmeschema siehe Abbildung 28); MW = Mittelwert SD = Standardabweichung.

natura	16SrRNA [pg/200µl DNA]	<i>Oxalobacter</i> [pg/200µl DNA]	homogen	16SrRNA [pg/200µl DNA]	<i>Oxalobacter</i> [pg/200µl DNA]
1	5796	2,969	6-1	6514	0,530
2	8836	3,095	6-2	3925	0,701
3	2852	0,304	6-3	4752	0,720
4	2559	0,518	6-4	3367	0,730
5	2962	0,380	6-5	3867	0,473
MW	4601	1,453	MW	4485	0,631
SD	2420	1,291	SD	1108	0,107

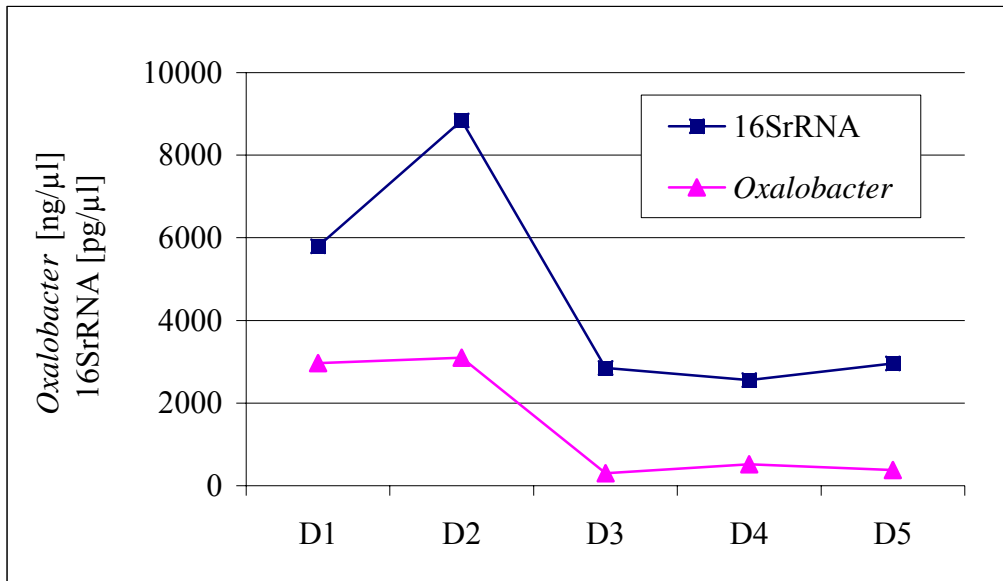


Abbildung 17: Faeces natura. Abweichungen der DNA-Konzentration innerhalb einer Stuhlportion. Hier bei Probenahme aus einer nativen Stuhlportion. Die nachstehende Abbildung zeigt die Ergebnisse von Messungen aus derselben Stuhlportion nach Homogenisierung der Probe.

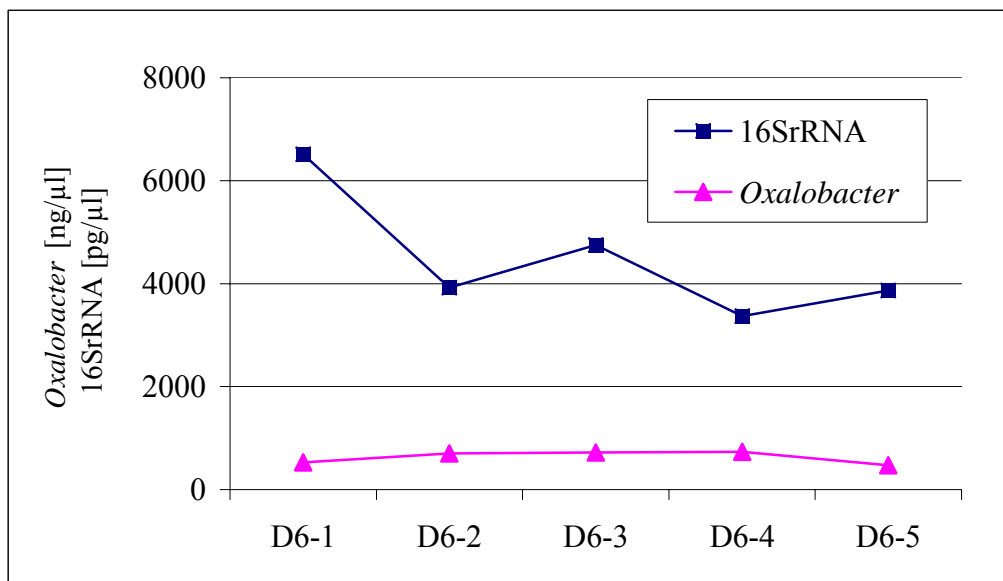


Abbildung 18: Faeces homogen. Abweichungen der DNA-Konzentration innerhalb einer Stuhlportion bei Probenentnahme an unterschiedlichen Stellen nach Homogenisierung der Stuhlportion. Im Vergleich zu Abbildung 17 wird die Schwankungsbreite durch die Homogenisierung der Probe minimiert. Zu beachten ist hier die Darstellung von 16SrRNA und *Oxalobacter f.* in unterschiedlichen Einheiten.

Um zu überprüfen welchen Einfluss die in die PCR eingesetzte Menge an Proben-DNA hat wird bei drei bekannt *Oxalobacter f.*-positiven Proben die aufgereinigte Gesamt-DNA auf 100, 10 und 1 ng/μl eingestellt. Diese Verdünnungsreihe wird in die PCR eingesetzt, um zu testen ob die Konzentration der Bakterien in entsprechender Linearität sinkt. Eine Korrelation zwischen der Konzentration der eingebrachten Gesamt-DNA und den Ergebnissen der Quantifizierung von 16SrRNA sowie *Oxalobacter f.*-DNA ist gegeben, wie aus Tabelle 8 und den folgenden Abbildungen 19 und 20 ersichtlich ist.

Tabelle 8: Messung von drei Proben mittels RTQ-PCR bei denen unterschiedliche Verdünnungen zwischen 100 , 10 und 1 ng DNA/μl eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der RTQ-PCR für die 16SrRNA korrelieren mit der eingebrachten DNA-Menge. Bei *Oxalobacter f.* ist die Tendenz die gleiche, allerdings sind die nachweisbaren Mengen nahe der unteren Nachweisgrenze, sodass die Schwankungen messtechnisch bedingt etwas höher sind. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 und 20 (Seite 55) graphisch dargestellt.

Probe	DNA-Konz. [ng DNA/μl]	<i>Oxalobacter</i> [pg/200μl DNA]	16SrRNA [pg/200μl DNA]
DS	100	3,1	33790
	10	0,9	4448
	1	0,1	429
L1	100	9,6	16350
	10	1,6	2110
	1	0,1	161
L4	100	19,3	156000
	10	13,8	18900
	1	1,3	1852

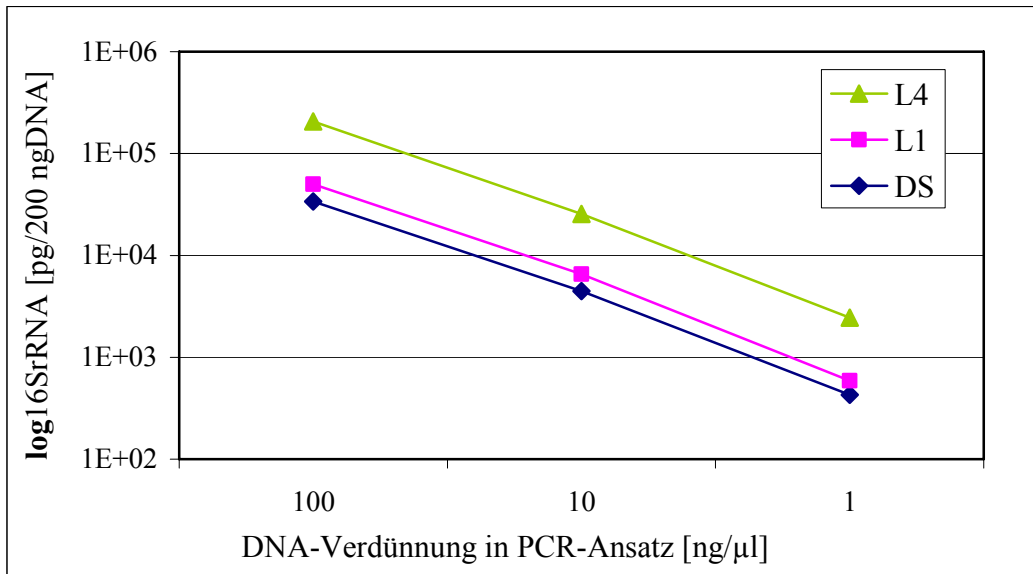


Abbildung 19: Messung von drei Proben mittels RTQ-PCR, bei denen unterschiedliche Verdünnungen zwischen 100 , 10 und 1 ng DNA/μl eingesetzt wurden. Es zeigt sich, dass die Ergebnisse der RTQ-PCR für die 16SrRNA mit der eingebrachten DNA-Menge korrelieren.

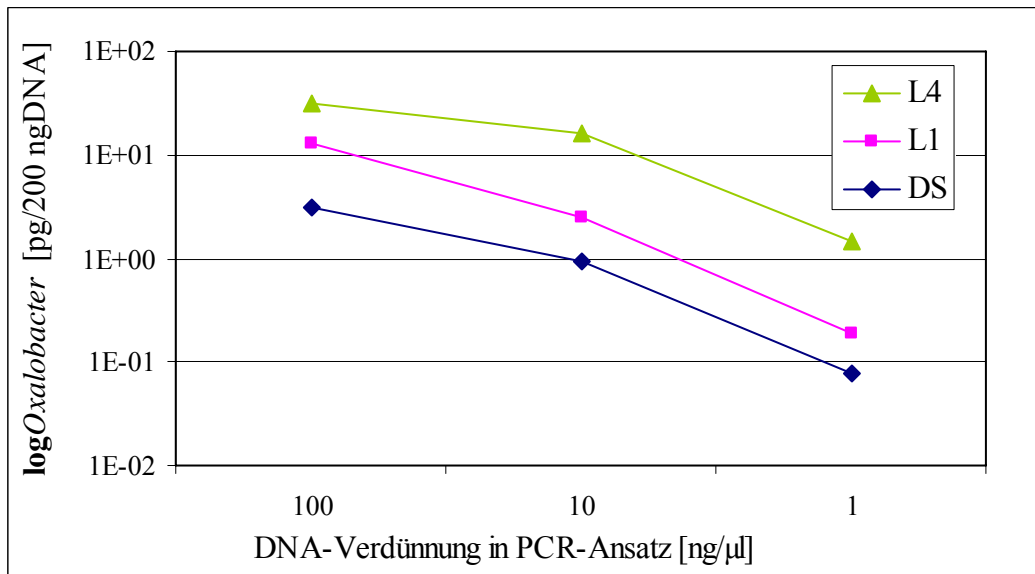


Abbildung 20: Messung von drei Proben mittels RTQ-PCR, bei denen unterschiedliche Verdünnungen zwischen 100 , 10 und 1 ng DNA/μl eingesetzt wurden. Bei *Oxalobacter f.* ist die Tendenz einer Korrelation zwischen DNA-Menge und Bakterien-Nachweis gegeben.

Aus Umfragen bei den untersuchten Harnsteinpatienten, konnte bei 68 der 79 Probanden die Häufigkeit an Episoden symptomatischer Urolithiasis evaluiert werden. Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigen Patienten denen *Oxalobacter f.* im Darmtrakt fehlt gehäuft Ereignisse symptomatischer Urolithiasis. In Abbildung 22 zeigt sich, dass dieser Trend sich auch in der quantitativen Analyse fortsetzt.

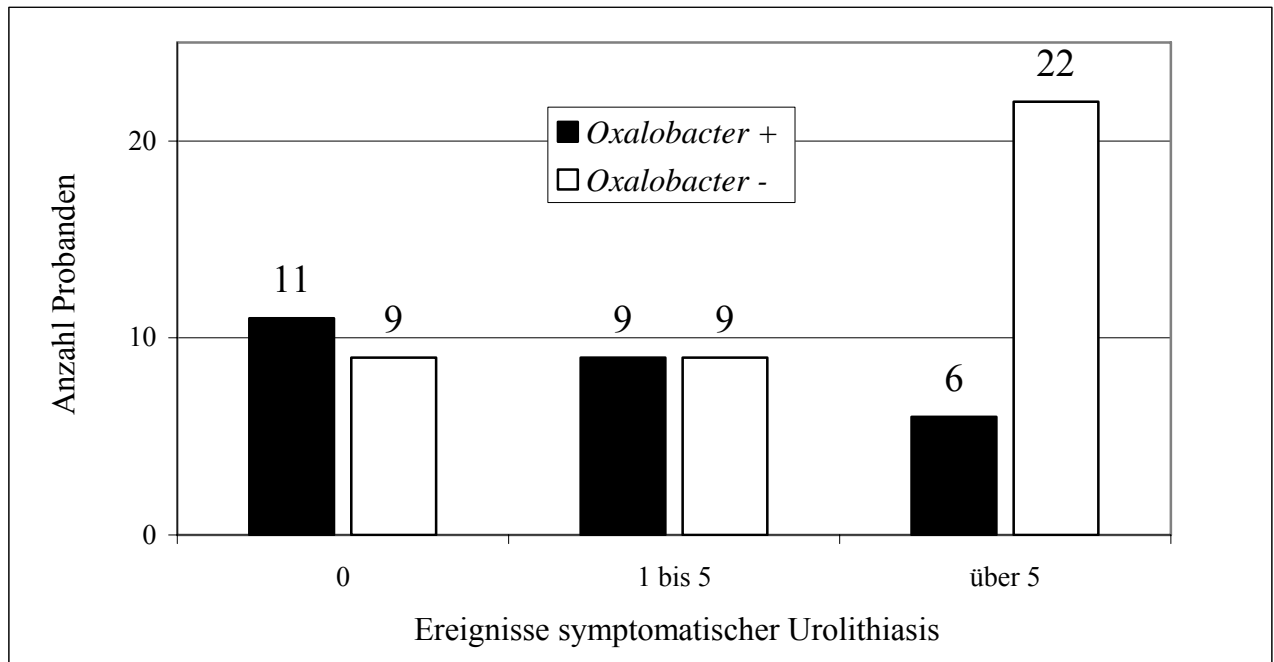


Abbildung 21: Nachweis von *Oxalobacter f.* bezogen auf die Steinhäufigkeit. Da nicht bei allen Probanden die genaue Anzahl der Steinepisoden bekannt war, gehen nur 66 von 79 Proben in diese Abbildung ein. Auffällig ist, dass bei häufiger symptomatischer Urolithiasis, die Besiedlung der Probanden mit *Oxalobacter f.* stark abnimmt.

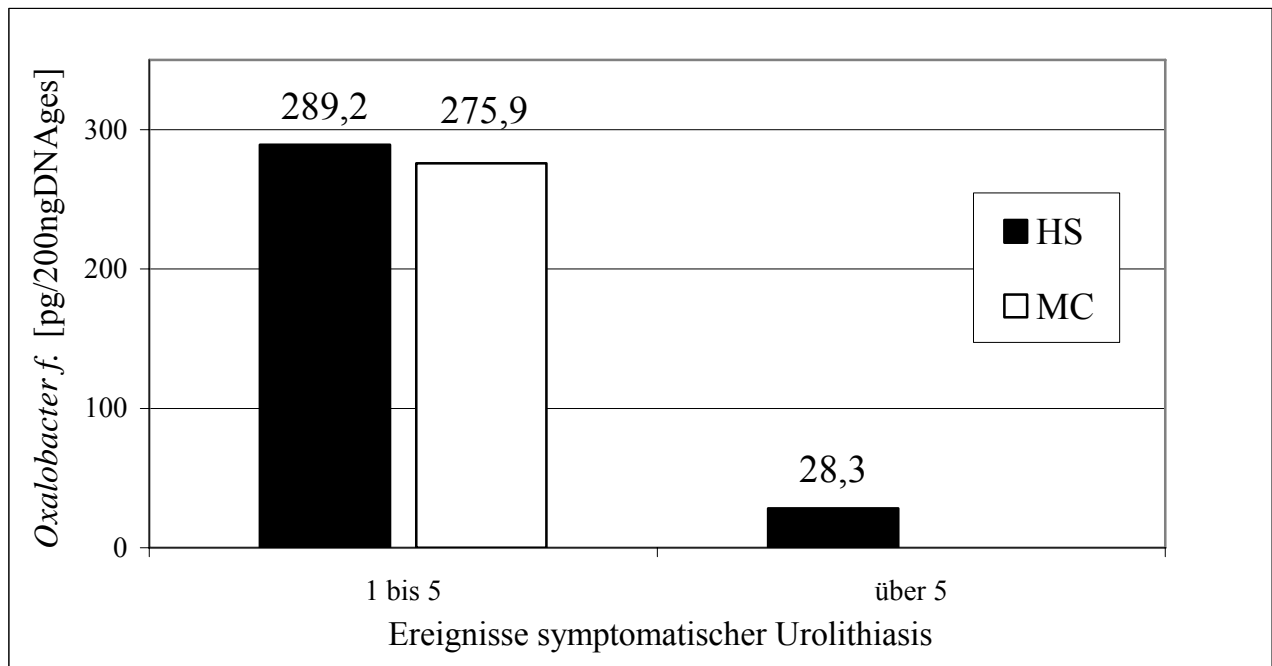


Abbildung 22: Ergebnisse des quantitativen Nachweises von *Oxalobacter f.* bezogen auf die Steinhäufigkeit. Bei den Patienten mit vielen Steinepisoden sind nur geringe Mengen des Bakteriums zu finden. Die Menge des Bakteriums bei Probanden mit weniger als fünf Harnsteinepisoden war um ein zehnfaches höher. Dies ist möglicherweise auf einen protektiven Effekt von *Oxalobacter f.* bei der Bildung von CaOx-Harnsteinen zurückzuführen. Es gab keinen *Morbus Crohn* Patienten mit mehr als fünf CaOx-Urolithiasis-Ereignissen. MC = *Morbus Crohn* n=2, HS = CaOx-Harnsteinpatienten n=5.

Die Auswirkung von *Oxalobacter f.* auf die renale Oxalat-Exkretion, als Indikator für die Auskristallisationspotenz von CaOx im Urin, ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den *Oxalobacter f.* positiven Individuen fand sich ein reduzierter Gehalt an Oxalat im 24h-Urin (siehe Abbildung 23).

Die CaOx-Konzentration und damit auch die Gefahr der CaOx-Kristallisation sinken mit quantitativ zunehmender Besiedlung mit *Oxalobacter f.* Eine Hyperoxalurie, also eine Ausscheidung über 0,5 mmol/d, als einer der Risikofaktoren für CaOx-Urolithiasis, findet sich nur bei den *Oxalobacter f.* negativen Individuen (siehe Abbildung 24). Details siehe Diskussionsteil (6.5.2) und Tabelle 9 auf Seite 61.

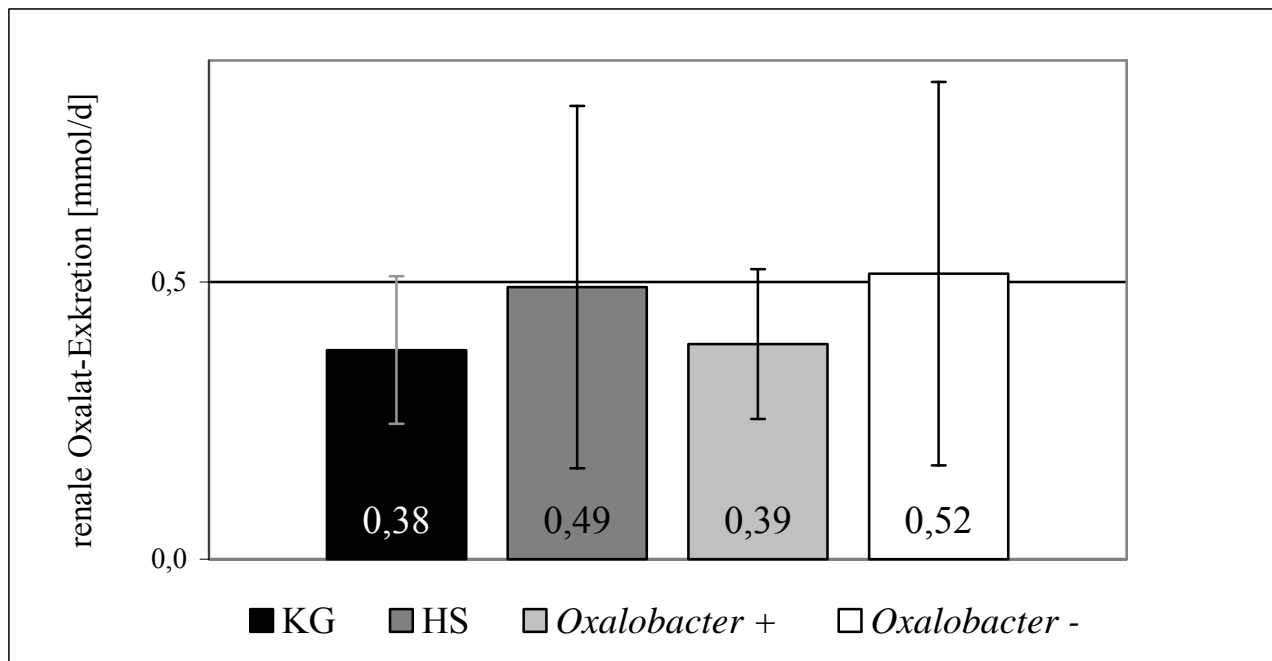


Abbildung 23: Auswirkung von *Oxalobacter f.* auf die renale Oxalat-Exkretion. Sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den *Oxalobacter f.* positiven Individuen fand sich ein reduzierter Gehalt an Oxalat im 24h-Urin und somit ein geringeres Risiko für CaOx-Urolithiasis., Wie bei postuliertem Wirkungsmechanismus zu erwarten fand sich eine Hyperoxalurie bei den Probanden die keine Besiedlung mit *Oxalobacter f.* zeigten; KG = Kontrollgruppen = 22, HS = CaOx-Harnsteinpatienten = 57, *Oxalobacter* + = 31, *Oxalobacter* - = 48)

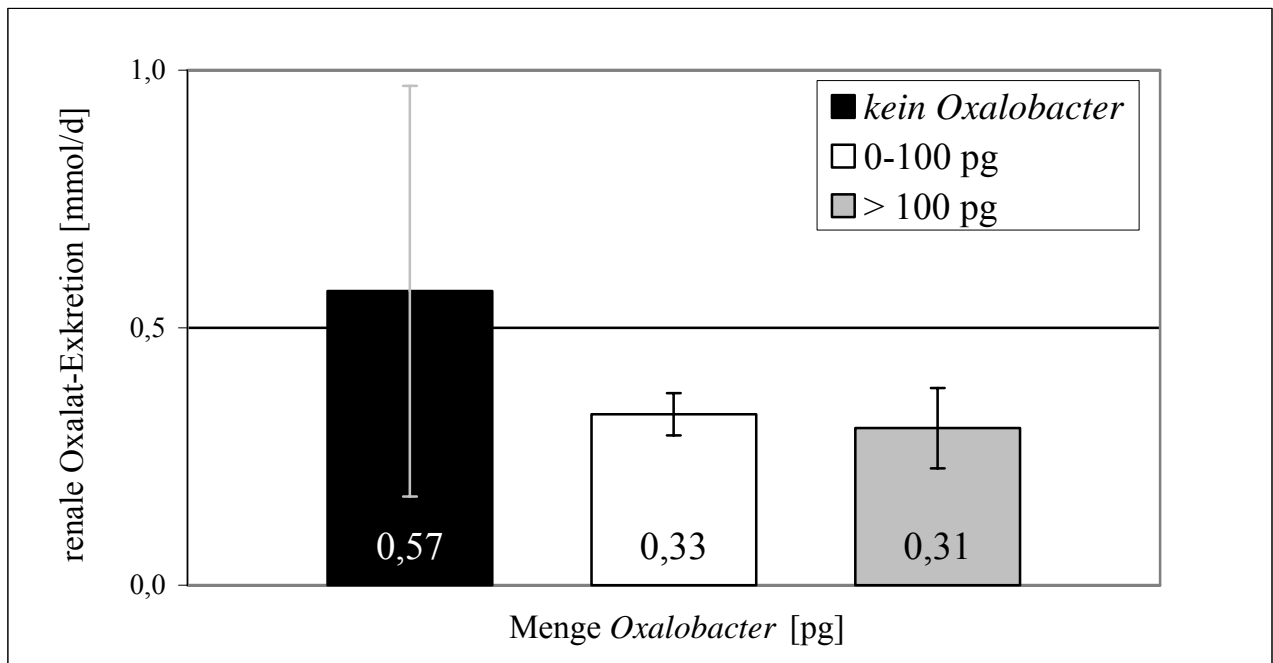


Abbildung 24: Auswirkung von *Oxalobacter f.* auf die renale Oxalat-Exkretion. Die CaOx-Konzentration und damit auch die Gefahr der CaOx-Kristallisation sinkt mit zunehmender Besiedlung mit *Oxalobacter f.* Eine Hyperoxalurie, also eine Ausscheidung über 0,5 mmol/d, als einer der Risikofaktoren für CaOx-Urolithiasis, findet sich nur bei den *Oxalobacter f.* negativen Individuen. *Oxalobacter f.* neg = 29, 0 bis 100 pg = 6, über 100 pg = 3.

Der mögliche Einfluss von *Oxalobacter f.* auf die Oxalat-Absorption, also dem Anteil des aus der Nahrung über den Darm aufgenommenen Calcium-Oxalats, lässt sich folgender Darstellung entnehmen. Im Vergleich zwischen gesunden Probanden und CaOx-Harnsteinpatienten beziehungsweise zwischen *Oxalobacter f.* positiven und negativen Probanden, sind Unterschiede in der Oxalat-Absorption erkennbar (siehe Abbildung 25). Gleiches gilt auch für die quantitative Auswertung. Details siehe Diskussionsteil (6.5.2) und Tabelle 9 auf Seite 61.

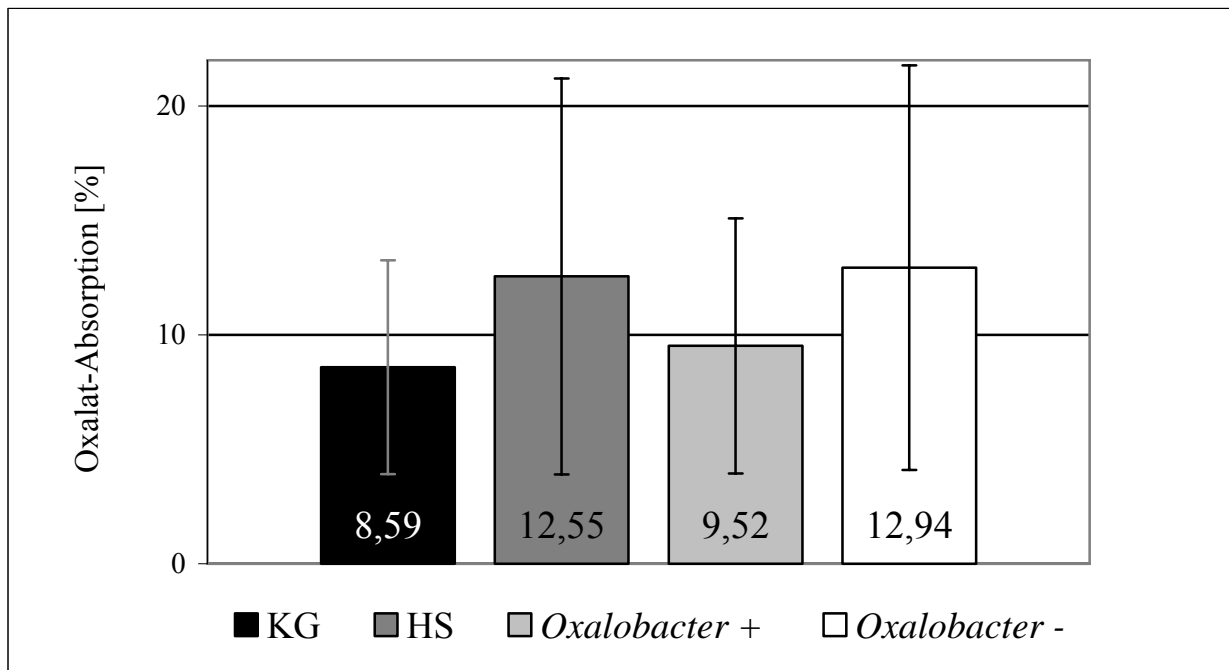


Abbildung 25: Auswirkung von *Oxalobacter f.* auf die Oxalat-Absorption. Links die Absorption im Vergleich zwischen gesunden Probanden und CaOx-Harnsteinpatienten, rechts zwischen *Oxalobacter f.* positiven und negativen Probanden. (KG = Kontrollgruppen n = 22, HS = CaOx-Harnsteinpatienten n = 57, *Oxalobacter +* n = 31, *Oxalobacter -* n = 45)

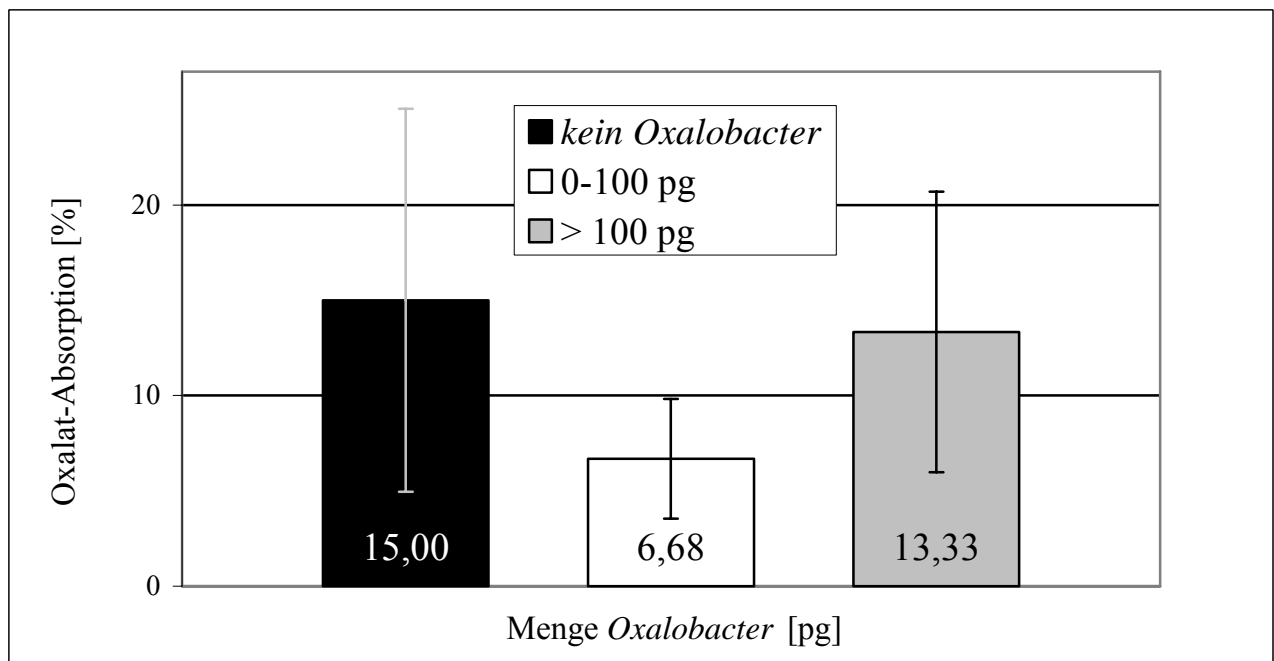


Abbildung 26: Auswirkung von *Oxalobacter f.* auf die Oxalat-Absorption. Beachte: Probanden mit großen Mengen des Bakteriums, die wie oben gezeigt eine geringe Oxalat-Ausscheidung haben, zeigen eine Hyperabsorption (>10 %) für Oxalat. Anzahl *Oxalobacter f.* neg = 29, 0 bis 100 pg = 6, über 100 pg = 3.

Tabelle 9: Ergebnisse der quantitativen Auswertung bezogen auf die renale Oxalat-Exkretion sowie die Oxalat-Absorption bei verschiedenen Probanden-Kollektiven. Graphische Darstellung in den vorangehenden Abbildungen 23-26. Die Ergebnisse zeigen den Einfluss von *Oxalobacter f.* auf den Oxalat-Stoffwechsel. Bei hohen Konzentrationen des Bakteriums, sinkt die Ausscheidung von Oxalat im Urin und ebenso der Anteil des aus der Nahrung aufgenommenen Oxalates. Dies könnte eine Risikoreduktion der CaOx-Urolithiasis bewirken.

Probe	n=	Oxalat-Exkretion [mmol/d]	Standard-Abweichung	Oxalat-Absorption [%]	Standard-Abweichung
kein <i>Oxalobacter</i>	29	0,57	0,40	15,00	10,05
0-100 [pg/200µl DNA]	6	0,33	0,04	6,68	3,14
>100 [pg/200µl DNA]	3	0,31	0,08	13,33	7,36
KG	22	0,38	8,59	0,13	4,67
HS	57	0,49	12,55	0,33	8,65
<i>Oxalobacter</i> +	31	0,39	9,52	0,13	5,58
<i>Oxalobacter</i> -	45	0,52	12,94	0,35	8,84

6. Diskussion

6.1 *Wahl der geeigneten Bezugsgröße*

Bei der Auswertung der Ergebnisse, besonders auf quantitativer Ebene, gibt es Hindernisse. Denn worauf kann man die Ergebnisse beziehen? Zur Lösung dieses Problems gibt es in verschiedenen Studien unterschiedlichste Ansätze. Zum einen wurde die Zellzahl auf das Gramm Stuhl bezogen (Mai et al., 2004) zum anderen können die Ergebnisse auch in Prozent der gesamten 16SrRNA angegeben werden (Sghir et al., 2000).

Für diese Studie ist die Wahl der Bezugsgröße, auf Grund des quantitativen Nachweises, sehr wichtig. Die Ansätze der anderen Arbeitsgemeinschaften können, wegen der hier verwendeten Aufbereitungsmethoden nicht verwendet werden.

Die erste Variante, Zellzahl/Faeces [g], ist problematisch, da bei der Aufreinigung (siehe 4.3, Seite 30), nach Entfernung der PCR-inhibierenden Stoffe, nicht der komplette Überstand weiterverwendet wird. Je nach Volumen der Probe wird ein unterschiedlich großer Anteil der DNA aus den 200 mg Faeces übertragen. Ein Bezug auf die Einwaage ist somit nach dieser Aufarbeitung nicht mehr möglich. Ein allgemeines Problem liegt in der Inhomogenität der Stuhlproben, zum Beispiel den Wassergehalt oder den Anteil an Ballaststoffen betreffend. Hat die Faeces einen sehr hohen Wassergehalt, so ist der Anteil an Bakterien-DNA verhältnismäßig geringer als in einer Probe, die stärker konzentriert ist.

Der Bezug *Oxalobacter f./16SrRNA*, hat den Vorteil, dass der Bezugspunkt aus demselben Ausgangsmaterial, der aufgereinigten DNA, gewonnen und mit derselben Methode gemessen wird (Sghir et al., 2000). Daraus ergibt sich die Unabhängigkeit von der Konsistenz der Faeces. Es besteht aber allgemein das Problem, dass der Gehalt an Bakterien und somit an 16SrRNA interindividuell stark schwankt; bei gesunden Probanden zwischen 10^{11} und 10^{12} Bakterien pro Gramm Stuhl (Hammer, 2003). Zu beachten ist bei vorliegendem Patientenkollektiv die durch die Erkrankung, insbesondere bei *M. Crohn*, und damit einhergehende Therapien veränderte Darmflora. Ein fiktiver Proband mit sehr starker bakterieller Besiedlung hätte zwar nur einen

geringen Prozentsatz an *Oxalobacter f.*, die absolute Anzahl im Colon, und damit das Potential Oxalat zu degradieren, kann aber immer noch höher als beim Durchschnitt sein. Ein reduzierender Einfluss auf die Urinoxalat-Konzentration ist trotzdem gegeben.

Aus diesen Gründen werden vorliegende Ergebnisse weder auf die Einwaage noch auf die gesamte 16SrRNA bezogen. Grundlage für die gewählte Bezugsgröße ist das Verhältnis zwischen der gesamten in der Probe vorliegenden DNA und der *Oxalobacter f.*-DNA. Es wird durch die verschiedenen Aufreinigungsschritte nicht beeinflusst. In dem PCR-Ansatz ist es genauso groß wie in der Stuhlprobe (siehe Abbildung 27).

Um über die nachgewiesene DNA-Menge von *Oxalobacter f.* in 200 ng gesamt-DNA auf eine absolute Menge des Bakteriums in der Stuhlportion schließen zu können muß unter anderem von homogenem Ausgangs-Probenmaterial ausgegangen werden. Aufgrund der unter 6.2 bis 6.4 angestellten Fehlerbetrachtungen ist das mit Faeces nicht befriedigend möglich.

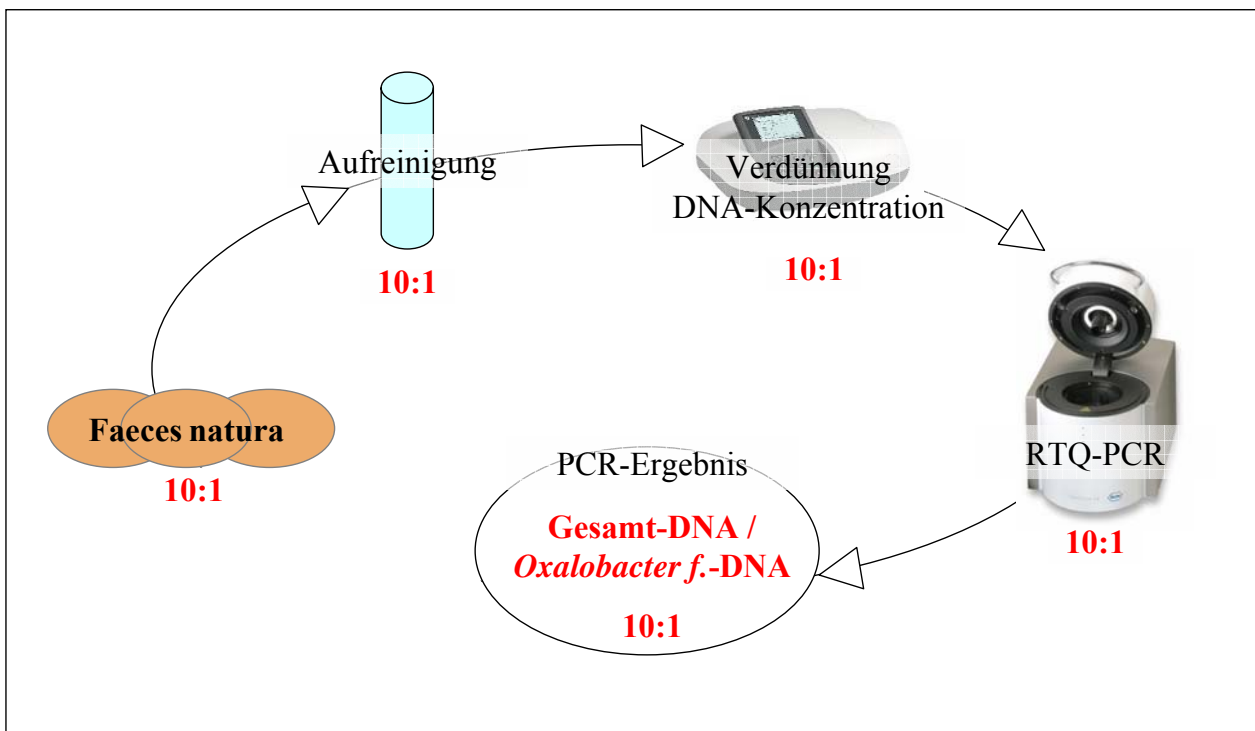


Abbildung 27: Während aller Prozessschritte bleibt das Mengenverhältnis zwischen der Gesamt-DNA und der *Oxalobacter f.*-DNA konstant. Aus diesem Grund ist die Gesamt-DNA eine gute Bezugsgröße.

Verhältnisgröße ist somit die Gesamt-DNA, die in die PCR eingesetzt wird. Diese setzt sich aus der bakteriellen und der DNA der Körperzellen zusammen. In jedem Lauf werden 2 µl der aufgereinigten DNA-Lösung, deren DNA-Konzentration auf 100 ng/µl eingestellt wurde, eingesetzt. Somit werden die Ergebnisse in Pikogramm *Oxalobacter f.* respektive 16SrRNA in 200 ng Gesamt-DNA angegeben.

Die Einheit ist: **pg/200ngDNA_{ges}**

6.2 Probennahme und Lagerung

Die Anleitung zur Probennahme, nach der die 80 Probanden ihre Stuhlproben sammelten, wurde mithilfe verschiedener DIN-Normen sowie Erfahrungswerten aus anderen Studien erstellt (Kwak et al., 2001; Pochart et al., 1993; Sghir et al., 2000). Ausser dieser Anleitung findet sich auch eine Beurteilung der allgemeinen Probleme, die mit der Untersuchung von Faeces einhergehen (siehe 4.1, Seite 26).

Die Proben wurden in unterschiedlichen Medien gelagert. Daraus ergaben sich sehr stark variierende Ergebnisse, die auf die Eigenschaften der Medien zurückzuführen sind.

- 62 Proben wurden *nativ in Stuhlröhrchen* gesammelt. 19 dieser Proben, im weiteren als Gruppe nativ 2 benannt, wurden von Zimmermann et al. aufbereitet und gemessen. In die Probengefäße wurde keine Nährmedien zugegeben (Zimmermann, 2004).
- 12 Proben wurden als *Stuhlabstriche auf Gel* gelagert. Die Probenröhrchen enthielten Agarose Gel für den Transport und die Lagerung von aeroben und anaeroben Organismen.
- 6 Proben wurden in 5 ml *flüssiger Kulturlösung* für anaerobe Bakterien, die wir von Herrn Dr. Sidhu erhielten, aufbewahrt.

Die Proben, die auf Nährmedium in flüssiger oder fester Form gelagert waren, zeigen im Vergleich zu den nativ gelagerten Stuhlproben bei der quantitativen RTQ-PCR sehr hohe Werte

für *Oxalobacter f.* und 16SrRNA (siehe Tabelle 6, Seite 51 und Abbildungen 15 und 16, Seite 50).

Die Bakterien der Darmflora im Allgemeinen und *Oxalobacter f.* im Speziellen fanden somit nach der Probengewinnung gute Bedingungen zur Vermehrung. Wichtig für den Nachweis von *Oxalobacter f.* ist, dass es nicht zu einer Überwucherung durch die Darmflora kommt. Hierdurch würde der Nachweis per PCR erschwert. Dies konnte durch den hohen Oxalat-Gehalt der Medien, der das Wachstum anderer Bakterien hemmt und *Oxalobacter f.* einen Selektionsvorteil schafft, gewährleistet werden.

Die beiden Lagerungsarten in flüssigem Medium und auf Gel können für den qualitativen Nachweis uneingeschränkt empfohlen werden.

Ein quantitativer Nachweis ist aufgrund der Selektion von *Oxalobacter f.*, und einem somit verändertem Verhältnis von Gesamt- zu *Oxalobacter f.*-DNA nicht möglich. Aus diesem Grund werden diese 18 Proben bei der weiteren Berechnung von *quantitativen* Durchschnittswerten aus dem Kollektiv der CaOx-Harnsteinpatienten nicht weiter berücksichtigt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse für die 16SrRNA (siehe Abbildung 16, Seite 51) fielen starke interindividuelle Schwankungen auf. Dies ist nicht ungewöhnlich, da die Anzahl der Bakterien pro Gramm Stuhl zwischen 10^{11} bis 10^{12} variiert (Hammer, 2003). Es sind aber große Unterschiede, über mehrere Potenzen, zwischen den verschiedenen Lagerungsarten zu sehen. Wie nach Betrachtung der Ergebnisse von *Oxalobacter f.* zu erwarten ist in den Flüssig- und Gel-Proben sehr viel 16SrRNA zu finden.

In den nativ 2-Proben ist insgesamt sehr wenig 16SrRNA vorhanden, obwohl die Proben laut der Arbeit von Zimmermann auf die gleiche Weise gelagert, aufbereitet und gemessen wurden wie die vergleichbaren nativ 1-Proben (Zimmermann, 2004). Diese Ergebnisse (siehe Abbildung 16, Seite 51) weisen auf Diskrepanzen zwischen den Arbeiten hin, welche auch nach nochmaliger Messung der Proben nicht eruierbar waren. Deswegen werden bei der quantitativen Auswertung der Ergebnisse nur die nativ 1-Proben berücksichtigt, während die auf Gel und in Flüssigkeit gelagerten Proben und die nativ 2-Proben aus der oben genannten Studie nur bei qualitativen Auswertungen mit einbezogen werden (Zimmermann, 2004).

6.3 Probenhomogenität

Ein wesentlicher Punkt bei der Aufreinigung der Probe ist die native Konsistenz der Faeces. Diese kann aus eher festen Materialien bestehen oder aber, zum Beispiel bei Diarrhoe, eine große Menge Wasser enthalten. Deswegen ist es schwer abzuschätzen wie hoch der Anteil der Bakterienflora, der Ballaststoffe oder der Flüssigkeit an der Probe ist. Durch die inhomogene Struktur der Faeces und die unterschiedlichen Lagerungsarten gestaltet es sich sehr schwierig exakt vergleichbare Proben von 200 mg abzuwiegen. Somit kann die Menge der Bakterien in 200 mg Stuhl auch intraindividuell extrem variieren.

Um diese Problematik genauer einschätzen zu können, haben wir fünf unterschiedliche Proben von einer frischen Stuhlportion genommen. Danach wurde die Probe homogenisiert und nochmals fünf Proben genommen. Diese insgesamt zehn Proben wurden danach aufgereinigt und in die RTQ-PCR eingesetzt (Entnahmeschema siehe Abbildung 28).

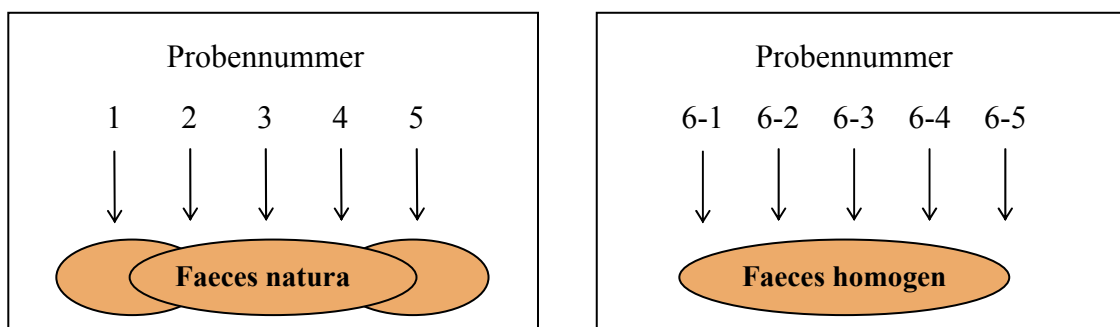


Abbildung 28: Darstellung der Probenentnahmestellen bei der Messung der Schwankungsbreite der Ergebnisse innerhalb einer Stuhlprobe vor und nach ihrer Homogenisierung. Erst werden die Proben 1-5 an verschiedenen Stellen der frischen Stuhlportion genommen, danach wird die Probe homogenisiert und Proben 6-1 bis 6-5 werden entnommen.

Die Ergebnisse zeigen eine Schwankungsbreite um den Faktor 2-3 (siehe Tabelle 7, Seite 52) bei der Probennahme aus ein und derselben Stuhlportion. Diese Ungenauigkeit muss bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Schwankungsbreite in der homogenisierten Probe ist wesentlich geringer und somit sollte insbesondere beim quantitativen Nachweis nicht auf eine Homogenisierung verzichtet werden. Die Abbildungen 17 und 18 (siehe Seite 53) zeigen die Schwankungen der nachgewiesenen Mengen an 16SrRNA und *Oxalobacter f.*, welche in den zehn Proben aus der gleichen Stuhlprobe vor und nach Homogenisierung gemessen wurden.

6.4 Verdünnungsparallelismus

Wie bereits besprochen (siehe 4.4, Seite 33) ergibt sich in den auf Gel und in Flüssigkeit gelagerten Proben das Problem, dass nach der Aufreinigung unterschiedliche Mengen an DNA vorlagen.

Um zu sehen ob dies einen Einfluss auf die Ergebnisse hat verdünnten wir bei drei bekannt *Oxalobacter f.*-positiven Proben die aufgereinigte DNA in drei Stufen auf 100, 10 und 1 ng/μl. Diese Verdünnungsreihe setzten wir in die PCR ein, um zu testen ob die Konzentration der Bakterien in entsprechender Linearität sinkt. Für die 16SrRNA ergab sich für alle Proben eine der Verdünnung entsprechende Verteilung, das heißt das in der Grundlösung ungefähr zehnmal mehr 16SrRNA enthalten war als in der Verdünnung auf 10 ng/μl.

Oxalobacter f. zeigte bei allen Proben Abweichungen von der erwarteten Linearität der unterschiedlichen Verdünnungen (siehe Abbildung 19/20 und Tabelle 8, Seite 54/55), insbesondere für das Ergebnis bei der Konzentration von 1 ng/μl gesamtDNA. Dies kann darin begründet sein, dass es nahe der unteren Nachweisgrenze zu Problemen bei der Anlagerung der Primer an die DNA kommt und somit zu fehlerhaften, erniedrigten Ergebnissen. Dieses Problem tritt beim Nachweis der 16SrRNA nicht auf. Die Menge an 16SrRNA ist auch in den stark verdünnten Proben weit entfernt von der unteren Nachweisgrenze.

6.5 Interpretation der Probenergebnisse

6.5.1 Besiedlung mit *Oxalobacter f.* insgesamt und im Bezug auf die Steinhäufigkeit

Den Erwartungen aus anderen Studien entsprechend ist die Besiedlung mit *Oxalobacter f.* in dieser Studie in der Kontrollgruppe häufiger als bei den CaOx-Harnsteinpatienten. Bei 59% (13 von 22) der Probanden ohne CaOx-Harnsteine ist *Oxalobacter f.* nachweisbar, während bei den Probanden mit CaOx-Urolithiasis nur 31% (18 von 58) besiedelt sind. Das entspricht den Ergebnissen aus vorangehenden Studien, in denen eine Besiedlung zwischen 70-80% bei den gesunden Probanden vorlag (Kwak et al., 2001; Sidhu et al., 1998; Sidhu et al., 1999b).

In Abhängigkeit von der Häufigkeit der CaOx-Harnsteinepisoden zeigen insbesondere Probanden mit mehr als fünf Steinereignissen einen starken Abfall in der Besiedlung mit *Oxalobacter f.*; nur 27% zeigten einen positiven Nachweis.

Patienten mit weniger Episoden sind dem gegenüber noch zu 50% besiedelt (siehe Abbildung 21, Seite 56). Ob allerdings die verminderte Besiedlung mit *Oxalobacter f.* eine erhöhte Anzahl von Steinepisoden bedingt, oder aber die häufigere Behandlung mit Antibiotika bei rezidivierender CaOx-Urolithiasis eine Reduktion des Bakteriums hervorruft, ist im Rahmen dieser Studie schwer einzuschätzen.

Bei der Auswertung der quantitativen Ergebnisse sind nur die Tests aus der nativ 1-Gruppe eingeschlossen (siehe 6.2, Seite 52). Diese Gruppe besteht aus 38 Probanden, von denen 31 an CaOx-Urolithiasis leiden und sieben an *Morbus Crohn* erkrankt sind, und bei denen im Rahmen dieser Erkrankung CaOx-Harnsteine auftraten.

Innerhalb dieser Gruppe sind nur 24 % (9 von 38) der Individuen, mit *Oxalobacter f.* besiedelt. Dies liegt daran, dass die Anzahl der Episoden rekurrenter CaOx-Urolithiasis in dieser Gruppe sehr hoch ist. Bei den Probanden, die genaue Angaben zur Anzahl der Episoden von CaOx-Harnsteinen gemacht haben liegt der Mittelwert bei 33 Ereignissen.

Tabelle 10: Ergebnisse der Messung innerhalb des Patientenkollektivs, das aufgrund der Lagerungsbedingungen als nativ 1-Gruppe beschrieben wird. Mit 24 % ist der Anteil der *Oxalobacter f.* positiven Individuen auch für Patienten mit CaOx-Harnsteinleiden gering. Grund hierfür kann die im Mittel häufige Episodenanzahl an CaOx-Harnsteinen sein, die wie in Abbildung 23, Seite 61 gezeigt einen Einfluss auf die Besiedlung mit *Oxalobacter f.* hat; HS = CaOx-Harnsteinpatienten, MC = *Morbus Crohn*-Patienten mit CaOx-Harnsteinen.

	<i>Oxalobacter</i> positiv	<i>Oxalobacter</i> positiv [%]
gesamt	9/29	24
HS	7/22	23
MC	2/7	29

Betrachtet man die Ergebnisse der quantitativen RTQ-PCR auf *Oxalobacter f.* so fällt auf, dass diese interindividuell zwischen 1 pg und 579 pg/200ngDNA_{ges} schwanken. Es sind insbesondere bei den Patienten hohe Mengen des Bakteriums nachzuweisen, die weniger als fünf CaOx-

Harnsteinepisoden durchgemacht haben (siehe Abbildung 22, Seite 57). Hatten die Probanden mehr als fünf Episoden, so war die Konzentration von *Oxalobacter f.* um ein vielfaches geringer.

6.5.2 *Oxalobacter f.* und sein Einfluss auf den Oxalat-Stoffwechsel

In verschiedenen Studien wurden signifikante Unterschiede bei der Oxalat-Ausscheidung zwischen Harnstein-Patienten und gesunden Probanden gefunden (Baggio, 1983; Robertson, 1978); die Hyperoxalurie ist einer der wichtigen Risikofaktoren für die Bildung von CaOx-Harnsteinen. Eine Oxalat-Ausscheidung von mehr als 0,5 mmol/24h wird als Hyperoxalurie definiert (Zimmermann, 2004).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von *Oxalobacter f.* mit einer erhöhten Oxalat-Ausscheidung im 24h Urin einhergeht (siehe Abbildung 23, Seite 58). Die *Oxalobacter f.*-negativen Probanden haben eine Oxalat-Ausscheidung im Urin von durchschnittlich 0,54 mmol/d gegenüber nur 0,33 mmol/d bei den *Oxalobacter f.*-positiven Individuen.

Da die Hyperoxalurie in den abführenden Harnwegen die Bildung von CaOx-Steinen fördert, ist zu vermuten, dass die potentielle Reduktion der Oxalat-Ausscheidung unter Anwesenheit von *Oxalobacter f.* eine Prävention von CaOx-Nierensteinen ermöglicht.

Auch bei der Oxalat-Absorption sind gleichsinnige Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zu erkennen.

Die Oxalat-Absorption zeigt den Anteil zugeführten Nahrungsoxalats (i.e. exogenes Oxalat) der vom Darm resorbiert und über die Nieren ausgeschieden wird. Dies geschieht, indem eine definierte Menge [¹³C₂]-markiertes Oxalat der Nahrung zugeführt und nach einer bestimmten Resorptions- und Ausscheidungszeit über Massenspektrometrie im Harn nachgewiesen wird (Details siehe 4.2.1, Seite 29).

Eine Hyperabsorption ist definiert als eine nachgewiesene Absorption über 10% (Hesse, 1999). Da *Oxalobacter f.* die intestinale Resorption von Oxalat herabsetzt ist es nicht verwunderlich, dass die Oxalat-Absorption in Anwesenheit des Bakteriums niedriger ist als bei nicht besiedelten Probanden (siehe Abbildung 25, Seite 60). Bei den CaOx-Harnsteinpatienten, in deren Stuhl kein *Oxalobacter f.* meßbar war, war mehrheitlich eine Hyperabsorption nachweisbar (20/34

Patienten). Das lässt die Vermutung zu, dass *Oxalobacter f.* einen protektiven Effekt auf die Häufigkeit symptomatischer Urolithiasis hat, indem es die intestinale Aufnahme von Oxalat reduziert.

Die oben beschriebene Beziehung zwischen dem Vorhandensein von *Oxalobacter f.* und der Oxalat-Ausscheidung sowie Oxalat-Absorption entspricht dem, was nach dem propagierten Wirkmechanismus zu erwarten war.

Das Bakterium *Oxalobacter f.* hat einen günstigen, senkenden Einfluss auf die intestinale Oxalat-Resorption. Dadurch wird die Oxalat-Konzentration im Plasma und folgend auch die Oxalat-Konzentration im Harntrakt verringert. Dies führt zu einer Verminderung des CaOx-Kristallisationspotentials und somit zu einem geringeren Risiko der CaOx-Urolithiasis.

6.5.3 Auswertung der quantitativen Ergebnisse für *Oxalobacter f.*

Darüber hinaus sind im Rahmen der Studie nicht nur qualitative sondern zum ersten Mal *quantitative* Messungen auf *Oxalobacter f.*-DNA in den Stuhlproben durchgeführt worden. Interessant ist die Beziehung zwischen der nachgewiesenen Menge *Oxalobacter f.* und der Oxalat-Konzentration im Harntrakt, beziehungsweise ob die Reduktion der Oxalat-Ausscheidung proportional zu der Menge an *Oxalobacter f.* ist.

Bei der quantitativen Auswertung werden die 40 Proben aus der Gruppe nativ 1 berücksichtigt, die Ergebnisse der anderen Untergruppen, nativ 2, Gel- und Flüssig-Lagerung, dienen nur der qualitativen Auswertung (siehe 6.1, Seite 51). Bei zwei Probanden konnten von der analytischen Abteilung keine Ergebnisse zur Oxalat-Absorption gemessen werden.

Die Probanden wurden anhand der gemessenen Menge *Oxalobacter f.* in drei Gruppen eingeteilt.

- Gruppe 1: kein *Oxalobacter f.*
- Gruppe 2: 0 bis 100 pg *Oxalobacter f.*-DNA/200 ng DNAs
- Gruppe 3: über 100 pg *Oxalobacter f.*-DNA/200 ng DNAs

29 Probanden sind nicht besiedelt (im weiteren als Gruppe 1 bezeichnet), weitere sechs Proben enthalten Mengen zwischen 1 und 100 pg (Gruppe 2) und drei Probanden, die stark Besiedelten, enthielten mehr als 100 pg *Oxalobacter f.* pro 200 ng gesamt DNA (Gruppe 3).

Bei den Ergebnissen fällt eine große Differenz zwischen dem Einfluss des Bakteriums auf die Oxalat-Ausscheidung und die Oxalat-Absorption auf.

Die *Oxalat-Ausscheidung* sinkt mit ansteigenden Mengen des Bakteriums ab (siehe Abbildung 24, Seite 59). Während bei den Probanden ohne *Oxalobacter f.* eine Hyperoxalurie vorliegt, sinkt die Oxalat-Ausscheidung bei den besiedelten Probanden auf niedrignormale Werte ab. Die nachgewiesene Menge des Bakteriums scheint nur einen geringen Einfluss auf die Höhe der Oxalat-Ausscheidung zu haben, wie der geringe Unterschied zwischen den Gruppen zwei und drei impliziert.

Oxalobacter f. senkt die Menge des ausgeschiedenen Oxalats durch eine Minderung der intestinalen Resorption. Eine erhöhte CaOx-Ausscheidung mit dem Urin und die damit verbundene höhere Wahrscheinlichkeit der Kristallisation gehört zu den Risikofaktoren für die Bildung von CaOx-Harnsteinen. Es ist nahe liegend, dass *Oxalobacter f.* einen protektiven Effekt auf die Bildung von CaOx-Harnsteinen für die Testpersonen bewirkt.

Anders hingegen sieht es bei der gemessenen *Oxalat-Absorption* aus, also dem Anteil an aufgenommenem Nahrungsoxalat.

Während bei den *Oxalobacter f.* negativen Probanden, im weiteren als Gruppe 1 bezeichnet, eine Hyperabsorption vorliegt, findet sich bei den wenig besiedelten Individuen (<100 pg), Gruppe 2, eine mehr als 50 prozentige Reduktion dieser Absorption. Überraschend ist allerdings der folgende Anstieg der gemessenen Absorption in der Gruppe der stark besiedelten Probanden (>100 pg), Gruppe 3. Sie steigt auf Werte über 10%, was einer Hyperabsorption entspricht (siehe Tabelle 9, Seite 61 und Abbildung 26, Seite 60).

Es wäre ein weiterer Abfall der gemessenen Absorption von Gruppe 2 zu Gruppe 3 zu erwarten gewesen. Zumindest ein Wert im Normbereich auch in Gruppe 3.

- Die Auswertung der gemessenen *renalen Oxalat-Ausscheidung* zeigt eine starke Absenkung des Urin-Oxalates bei besiedelten Probanden von 0,544 mmol/d in Gruppe 1 auf 0,332 respektive 0,305 mmol/d in den Gruppen 2 und 3 (siehe Tabelle 9, Seite 61).

Dieses ausgeschiedene Oxalat setzt sich aus einem endogenen und einem exogenen Anteil zusammen, wobei der exogene Anteil zwischen 20 und 50 % des renal eliminierten Oxalates ausmacht (Holmes et al., 1995; Silbernagel, 2000). Da die Oxalat-Absorption Informationen ausschließlich über den exogenen Anteil gibt sind die Ergebnisse nur bedingt verwertbar.

7. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode der real-time PCR etabliert werden, die zum ersten Mal den quantitativen Nachweis für *Oxalobacter f.* erlaubt. Auch niedrige Bakterienkonzentrationen, bei nur schwach besiedelten Probanden, können jetzt sicher nachgewiesen werden. Gegenüber der bisher etablierten Methode der Kultivierung ergibt sich zusätzlich eine große Zeitersparnis. Die Anzucht des Bakteriums dauert einige Tage und erfordert ein spezielles Kulturmedium, während die RTQ-PCR innerhalb weniger Stunden durchführbar ist. Die einfachere Aufbereitung und die Möglichkeit des Nachweises auch von abgestorbenen Bakterien minimieren bisherige materialspezifische Fehlerquellen bei Aufbereitung und Lagerung.

Experimentelle Therapieansätze versuchen die CaOx-Urolithiasis durch gesteigerten Oxalatabbau zu verringern. Hoppe et al. beschrieben die Reduktion des Urin-Oxalates durch orale Applikation von *Oxalobacter f.*-Bakterienkulturen. Bisher konnte jedoch in den meisten Fällen keine Langzeitbesiedlung erreicht werden. Nach ein bis zwei Jahren war bei den meisten Probanden kein Bakterium mehr nachweisbar (Hoppe et al., 2003; Hoppe et al., 2005a).

Bei der Evaluation dieser Therapieoption mit *Oxalobacter f.* ist primär der qualitative Nachweis des Bakteriums wichtig. Die RTQ-PCR bietet hier Vorteile durch die Zeitersparnis, einfachere Aufbereitung, Wegfall des für eine Kultivierung notwendigen Zeitaufwandes und speziell die oben beschriebene niedrige Nachweisgrenze mit der auch geringe Mengen an *Oxalobacter f.* nachgewiesen werden können. Ein zweiter Therapieansatz versucht durch direkte Applikation des Oxalat-abbauenden Enzyms Oxalyl-CoA-Decarboxylase (*oxc*) die Steinbildung zu verringern, auch hier konnte eine Reduktion der renalen Oxalat-Exkretion nachgewiesen werden (Hoppe et al., 2005a). Eine Überprüfung der Oxalat-Besiedlung ist hierfür nicht notwendig. Zur Ermittlung des Therapieerfolges ist die Messung der Oxalat-Ausscheidung vor und nach Applikation ausreichend.

Die RTQ-PCR ist ein gutes Verfahren zum quantitativen und qualitativen Nachweis von geringsten Spuren an DNA. Faeces ist allerdings ein eingeschränkt verwertbares Trägermaterial. Der qualitative Nachweis von Bakterien-DNA aus Stuhlproben ist aufgrund der Inhomogenität

der Proben nur schwierig durchführbar. DNA-Spuren aus anderen Trägermaterialien mit konstanter Dichte und Zusammensetzung eignen sich besser für diese Nachweismethode.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Menge an *Oxalobacter f.* und der Oxalat-Exkretion sowie der Häufigkeit relevanter CaOx-Harnstein-Episoden hin. Probanden bei denen größere Mengen des Bakteriums (>100 pg/200ngDNA_{ges}) nachgewiesen werden konnten, zeigten eine geringere Oxalat-Ausscheidung als Probanden mit weniger als 100 pg/200ngDNA_{ges} *Oxalobacter f.*-DNA (siehe 6.5.2, Seite 69). Patienten mit mehr als fünf CaOx-Harnstein-Episoden wiesen sehr geringe *Oxalobacter f.*-DNA-Konzentrationen auf; hohe Werte zeigten sich hingegen bei Patienten mit weniger als vier Episoden (siehe Abbildung 22, Seite 57). Dies lässt eine protektive Wirkung von *Oxalobacter f.* vermuten. Nur bei der Oxalat-Absorption fanden sich abweichende Werte, da auch bei den stark besiedelten Probanden eine Hyperabsorption vorlag. Bei Betrachtung der Auswertung, insbesondere der Standardabweichung, zeigt sich, dass die Ergebnisse nicht hinreichend sind um einen Patienten anhand der nachgewiesenen Menge *Oxalobacter f.* sicher einer der Risikogruppen, bezüglich Oxalat-Exkretion oder Häufigkeit der CaOx-Harnstein-Episoden, zuzuordnen. Hierfür ist eine weitere Abklärung durch erneute Messungen, eventuell an einem größeren Patientenkollektiv und mit genaueren Methoden notwendig.

Diese Studie zeigt eine positive Korrelation zwischen der *Oxalobacter f.*-Konzentration und der Rezidivhäufigkeit der CaOx-Urolithiasis. Um genauere Aussagen über langfristige Ansiedlungsmöglichkeiten von *Oxalobacter f.* treffen zu können sind jedoch weitere Studien notwendig. Mögliche Therapien mithilfe von *Oxalobacter f.* stellen wichtige Aspekte zur Reduktion der Morbidität der CaOx-Harnsteinpatienten dar und könnten zusätzlich kostenintensive stationäre Behandlungen reduzieren.

8. Anhang8.1 *Detaillierte Ergebnisse***Tabelle 11:** Ergebnisse der RTQ-PCR für 16SrRNA und *Oxalobacter f.* in [pg/200 µg DNAs] sowie die Ergebnisse der Oxalat-Ausscheidung und Oxalat-Absorption. Zusätzlich wird zu jeder Probe die Lagerungsart angegeben.

Probe	16SrRNA [pg/200µg DNA]	<i>Oxalobacter</i> [pg/200µg DNA]	<i>Oxalobacter</i> positiv	Oxalat- Ausscheidung [mmol/24h]	Oxalat- Absorption [%]	Lagerung
1	1048000			1,144	31,7	nativ 1
2	1066000	165,4	+	0,414	15,6	nativ 1
3	1959000			0,389	2,9	nativ 1
4	1344000	90,7	+	0,402	3,6	nativ 1
5	1832000			2,060	2,4	nativ 1
6	851200	577,8	+	0,236	21,0	nativ 1
7	213100			0,426	15,0	nativ 1
8	1437000					nativ 1
9	958400			0,184	3,9	nativ 1
10	392800	43,9	+	0,374	12,6	nativ 1
11	586100			0,333	11,0	nativ 1
12	236400			0,472		nativ 1
13	1359000	2,9	+	0,307	8,7	nativ 1
14	1137000			0,440	25,2	nativ 1
15	1973000			0,287	4,9	nativ 1
16	885100					nativ 1
17	1082000	0,6	+	0,309	4,6	nativ 1
18	437000			0,410	15,9	nativ 1
19	167800			1,196	34,0	nativ 1
20	979200			0,382	11,1	nativ 1
21	1264000			0,389	7,5	nativ 1
22	415600			0,456	19,5	nativ 1
23	1308000			0,432	11,8	nativ 1
24	395100			0,423	13,4	nativ 1
25	422100			0,360	5,1	nativ 1
26	839600			0,336	10,6	nativ 1
27	1592000	30,4	+	0,289	4,2	nativ 1
28	1450245			1,037	42,8	nativ 1
29						nativ 1
30	1002000	48,2	+	0,311	6,4	nativ 1

Probe	16SrRNA [pg/200µg DNA]	Oxalobacter [pg/200µg DNA]	Oxalobacter positiv	Oxalat- Ausscheidung [mmol/24h]	Oxalat- Absorption [%]	Lagerung
31	955400			0,516	7,2	nativ 1
32	1485991			0,660	14,3	nativ 1
33	317000			0,361	18,7	nativ 1
34	2033000			0,482	23,1	nativ 1
35	1624000	503,6	+	0,265	3,4	nativ 1
36	949300			0,365	6,8	nativ 1
37	1731000			0,363	8,5	nativ 1
38	226800			0,416	19,0	nativ 1
39	365800			0,404		nativ 1
40	4634375	11,3	+			nativ 1
41	384559	4,9	+			Gel
42	4613750			0,538	11,9	Gel
43	13380357	16,1	+	0,718	20,0	Gel
44	944776	119,1	+	0,358	6,2	Gel
45	19392857	9435,7	+	0,545	6,1	Gel
46	334769	5819,4	+	0,304	7,3	Flüssig
47	6744643	35,5	+	0,233	2,0	Flüssig
48	356250	30578,1	+	0,515	15,8	Flüssig
49	53875000	35,0	+	0,271	5,7	Flüssig
50	104375000	7444642,9	+	0,299	8,0	Flüssig
51	13494318	7,4	+	0,369	8,9	Flüssig
52	74887500			0,378	14,3	Gel
53	4662500			0,329	9,9	Gel
54	457083			0,843		Gel
55	136145833			1,065		Gel
56	56125000	104,4	+	0,339		Gel
57	25291667	2668,8	+	0,290		Gel
58	2285398			0,368	6,7	nativ 1
59	4776000			0,396	15,9	nativ 1
60	2667000			0,671	9,2	nativ 1
61	1551000					nativ 1
62	16350	9,6	+	0,286	6,3	nativ 2
63	81430	6,3	+	0,477	6,5	nativ 2
64	47330			0,451	20,4	nativ 2
65	156000	19,3	+	0,508	6,9	nativ 2
66	7482	28,8	+	0,421	9,7	nativ 2
67	59830			0,626	14,3	nativ 2
68	109900	1,0	+	0,327	5,8	nativ 2
69	20750			0,321	4,8	nativ 2
70	110400			0,212	1,8	nativ 2

Probe	16SrRNA [pg/200µg DNA]	Oxalobacter [pg/200µg DNA]	Oxalobacter positiv	Oxalat- Ausscheidung [mmol/24h]	Oxalat- Absorption [%]	Lagerung
71	72050	0,6387	+	0,320	5,1	nativ 2
72	98000			0,289	9,2	nativ 2
73	23360			0,310	3,5	nativ 2
74	148400			0,323	3,6	nativ 2
75	269000			0,399	7,7	nativ 2
76	18380	0,0078	+	0,387	12,4	nativ 2
77	202000	0,0050	+	0,334	13,8	nativ 2
78	41220			0,107	8,7	nativ 2
79	78940			0,213	6,6	nativ 2
80	64330			0,400	18,0	nativ 2

8.2 Anleitung zur Probenentnahme

Anleitung zur Probenentnahme

Sehr geehrte/r Frau/Herr

vielen Dank, dass Sie sich dazu bereit erklärt haben an unserer Studie teilzunehmen.


Wie wir schon besprochen haben, benötigen wir eine Stuhlprobe von Ihnen. Sie haben dazu ein Probenröhrchen erhalten, welches aus einem Plastikbehälter und einem Deckel mit integriertem Löffelchen besteht. Mit diesem Löffel sollen Sie direkt die Probe nehmen. Zusätzlich erhalten Sie eine Pappschale.

Bitte beachten Sie hierbei:

- Entnehmen Sie die Probe maximal einen Tag vor Ihrem Arztbesuch
- Entnehmen Sie an sechs Stellen eine insgesamt etwa haselnussgroße Portion
- Um die Probe nicht mit Toiletten-Spülwasser oder Urin zu verunreinigen benutzen Sie bitte die mitgegebene Schale zum Auffangen des Stuhls.

Vielen Dank für Ihre Mühe

Falls noch Fragen bestehen wenden Sie sich bitte an:
 Barbara Pfingsten oder Dr. M. Schmidt
 Tel.: 0228-910688 Tel.:0228-6236



9. Literatur

Allison MJ, Dawson KA, Mayberry WR and Foss JG. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch Microbiol.* 1985; 141: 1-7.

Baggio B. Prevalence of hyperoxaluria in idiopathic calcium oxalate kidney stone disease. *Nephron Physiol.* 1983; 35: 11-14.

Berg W. Bedeutung von Magnesium und Ballaststoffen. *TW Urologie Nephrologie.* 1994; 6: 338-344.

Curhan G. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med.* 1993; 328: 833-838.

Dawson KA, Allison MJ and Hartman PA. Isolation and some characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria from the rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1980; 40: 833-839.

Day C. SYBRGreen-Detektion. In: Hrsg. PCR Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum akademischer Verlag, 2000: 44-46.

Doane L, Caldwell. microbial oxalate degradation : Effects on oxalate and calcium balance in humans. *nutrition research.* 1989; 9: 957-964.

Hammer. Probiotika und Präbiotika: Grundlagen, Einsatz und Wirkungen beim gesunden und kranken Menschen. *J Ernährungsmed.* 2003; 5 : 16-25.

Hesse A. Intestinal Hyperabsorption of oxalate in calcium oxalate stone formers: application of a new test with [¹³C₂]oxalate. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 329-333.

Holmes RP, Goodman HO and Assimios DG. Dietary oxalate and its intestinal absorption. *Scanning Microsc.* 1995; 9: 1109-1118; discussion 1118-1120.

Hoppe B, Leumann E, von Unruh G, Laube N and Hesse A. Diagnostic and therapeutic approaches in patients with secondary hyperoxaluria. *Front Biosci.* 2003; 8: e437-443.

Hoppe B, von Unruh G, Laube N, Hesse A and Sidhu H. Oxalate degrading bacteria: new treatment option for patients with primary and secondary hyperoxaluria? *Urol Res.* 2005a; 33: 372-375.

Hoppe B, von Unruh GE, Blank G, Rietschel E, Sidhu H, Laube N and Hesse A. Absorptive hyperoxaluria leads to an increased risk for urolithiasis or nephrocalcinosis in cystic fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 2005b; 46: 440-445.

Kleinschmidt K, Mahlmann A and Hautmann R. Microbial degradation of dietary oxalate in the human gut and urinary oxalate concentrations in patients with calcium oxalate urolithiasis and control persons. *Investig Urol (Berl)*. 1994; 5: 222-224.

Kodama T, Akakura K, Mikami K and Ito H. Detection and identification of oxalate-degrading bacteria in human feces. *Int J Urol*. 2002; 9: 392-397.

Kumar R, Mukherjee M, Bhandari M, Kumar A, Sidhu H and Mittal RD. Role of *Oxalobacter formigenes* in calcium oxalate stone disease: a study from North India. *Eur Urol*. 2002; 41: 318-322.

Kwak C, Jeong BC, Lee JH, Kim HK, Kim EC and Kim HH. Molecular identification of *Oxalobacter formigenes* with the polymerase chain reaction in fresh or frozen fecal samples. *BJU Int*. 2001; 88: 627-632.

Kwak C, Kim HK, Kim EC, Choi MS and Kim HH. Urinary oxalate levels and the enteric bacterium *Oxalobacter formigenes* in patients with calcium oxalate urolithiasis. *Eur Urol*. 2003; 44: 475-481.

Lung HY, Baetz AL and Peck AB. Molecular cloning, DNA sequence, and gene expression of the oxalyl-coenzyme A decarboxylase gene, *oxc*, from the bacterium *Oxalobacter formigenes*. *J Bacteriol*. 1994; 176: 2468-2472.

Mai V, Katki HA, Harmsen H, Gallaher D, Schatzkin A, Baer DJ and Clevidence B. Effects of a controlled diet and black tea drinking on the fecal microflora composition and the fecal bile acid profile of human volunteers in a double-blinded randomized feeding study. *J Nutr*. 2004; 134: 473-478.

Maloney PC, Anantharam V and Allison MJ. Measurement of the substrate dissociation constant of a solubilized membrane carrier. Substrate stabilization of OxIT, the anion exchange protein of *Oxalobacter formigenes*. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10531-10536.

Mühlhardt C. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR). In: spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Hrsg. *Molekularbiologie/Genomics*. Berlin: 2002: 71-103.

Pochart P, Lemann F, Flourie B, Pellier P, Goderel I and Rambaud JC. Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology*. 1993; 105: 1281-1285.

Riede UNF, N. ; Wehner, H. Uropoetisches System. In: Riede, UN ; Schaefer, HE, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 1999: 834-839.

Robertson WG. Importance of mild hyperoxaluria in the pathogenesis of urolithiasis--new evidence from studies in the Arabian peninsula. *Scanning Microsc*. 1993; 7: 391-401.

Robertson WG. Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *J Urol*. 1978; 50: 449-454.

Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P and Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 2263-2266.

Sidhu H, Allison M and Peck AB. Identification and classification of *Oxalobacter formigenes* strains by using oligonucleotide probes and primers. *J Clin Microbiol.* 1997a; 35: 350-353.

Sidhu H, Enatska L, Ogden S, Williams WN, Allison MJ and Peck AB. Evaluating Children in the Ukraine for Colonization With the Intestinal Bacterium *Oxalobacter formigenes*, Using a Polymerase Chain Reaction-based Detection System. *Mol Diagn.* 1997b; 2: 89-97.

Sidhu H, Holmes RP, Allison MJ and Peck AB. Direct quantification of the enteric bacterium *Oxalobacter formigenes* in human fecal samples by quantitative competitive-template PCR. *J Clin Microbiol.* 1999a; 37: 1503-1509.

Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, Tenbrock K, Bromme S, Rietschel E and Peck AB. Absence of *Oxalobacter formigenes* in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria. *Lancet.* 1998; 352: 1026-1029.

Sidhu H, Schmidt ME, Cornelius JG, Thamilselvan S, Khan SR, Hesse A and Peck AB. Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy. *J Am Soc Nephrol.* 1999b; 10 Suppl 14: S334-340.

Silbernagel S. Die Funktion der Nieren. In: Silbernagel, S.; Klinker, R., Hrsg. *Lehrbuch der Physiologie.* Stuttgart, New York: Thieme, 2000: 283-325.

von Unruh G. Experience with the [¹³C₂]oxalate absorption test. *Isotopes Environ health Stud.* 2000; 36: 11-20.

von Unruh G. Mass spectrometric-selected ion monitoring assay for an oxalate absorption test applying [¹³C₂]oxalate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 716: 343-349.

Zimmermann D. Studie zur Wirkung von Laktobakterien auf die intestinale Oxalat-Absorption. *Hohe Landwirtschaftliche Fakultät. Bonn, 2004: 1-146.*

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor S.C. Müller bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Doktor N. Laube danke ich für die vielen Anregungen, Diskussionen und Treffen. Er verstand es immer mir neue Motivation zu geben und mir so über Hindernisse hinweg zu helfen.

Für die Vergabe dieses Promotionsthemas möchte ich mich bei Herrn Doktor M. Schmidt bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau D. Schmidt, die mich in die wunderbare Welt des Labors eingeführt hat und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.