

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Mayatepek

Vergleich der Invasionsfähigkeit verschiedener *Klebsiella*-
Stämme im Hühnerembryonen-Modell und Etablierung des in-
vivo-Modells

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Shueb Mussa

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Schroten
Korreferent: Prof. Dr. med. MacKenzie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1 Hühnerembryonen-Modelle	2
1.2 Die Chorioallantoismembran (CAM)	6
1.2.1 Entwicklungsstadien und Morphologie der Chorioallantoismembran	7
1.3 Die Physiologie der CAM	12
1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
1.4.1 Einführung	14
1.4.2 Die Biologie von <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
1.4.3 Adhäsion und Invasion	25
1.5 Das Zytoskelettsystem	32
1.5.1 Das Aktinfilamentsystem	32
1.5.2 Aufbau des Aktinfilamentsystems	33
1.5.3 Das Mikrotubuli-System der Zelle	35
1.5.4 Interaktion von Mikrotubulus und Aktinfilamentsystem	39
1.5.5 Toxine, die in die Regulation des Mikrotubuli-Systems eingreifen	42
1.5.6 Toxine, die in die Regulation des Mikrofilamentsystems eingreifen	43
1.5.7 Einfluss von N-Acetylglucosamin auf die Infektion der <i>Klebsiella</i>	43
1.6 <i>Escherichia coli</i>	44
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	45
2. Material und Methoden	46
2.1 Die Lagerung	46
2.2 Die Bebrütung	46
2.3 Die Präparation	47
2.3.1 Platzierung der Kanüle zur Probenentnahme	50
2.4 Ergebnisse der CAM nach Präparation	52
2.4.1 Integritätstest mit inerten Testsubstanzen	52
2.4.2 Bakteriologische Kontrollen der CAM-Integrität	54
2.5 Bakterienstämme	55
2.5.1 Bakterienkultivierung und Keimzahlbestimmung	57
2.5.2 Die Inokulation der CAM	57
2.6 Inokulation in Anwesenheit von Inhibitoren des Wirtszytoskeletts	61
2.6.2 Statistik	62
3. Ergebnisse	63
3.1 Bebrütung	63
3.2 Funktionelle Überprüfung der CAM-Integrität	63
3.2.1 Überprüfung der Integrität mit inerten Testsubstanzen	63

3.2.2	Bakteriologische Kontrollen zur Überprüfung der CAM-Integrität	64
3.3	Bakterienaufzucht	66
3.3.1	Dosisfindung	66
3.4	Invasion von <i>Klebsiella pneumoniae</i> und <i>E.coli</i>	66
3.5	Mortalität im Vergleich zur Invasion	67
3.6	Elektronenmikroskopie	70
3.7	Simultane monotope und ditope Inkubation der CAM	72
3.8	Invasion in Anwesenheit der Inhibitoren	73
3.8.1	Beteiligung des Zytoskeletts des Wirtes am Internalisierungsprozess von <i>Klebsiella pneumoniae</i>	73
4.	Diskussion	77
4.1	Etablierung des Infektionsmodelles	77
4.2	Integrität der Chorioallantoismembran (CAM)	78
4.3	Bakterielle Invasion	80
4.4	Invasionsprozess in Anwesenheit von Zytoskelettinhibitoren	84
5.	Zusammenfassung.....	87
6.	Literatur	89
7.	Anhang	103
7.1	EM-Aufnahmen	103
7.2	Publikation	104
7.3	Danksagung	104

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Entwicklungsstadien des Embryos	5
Abb.2: Schematisierter Längsschnitt eines Hühnerembryos in ovo am 6. Bruttag	6
Abb.3: Aufbau der CAM (vereinfacht)	11
Abb.4: LM-Aufnahme der CAM am 10. Entwicklungstag	11
Abb.5: Schematisierter Ausschnitt eines 12 Tage alten Hühnerembryos	13
Abb.6: Die Invasion von <i>Shigella flexneri</i> , Trigger-Mechanismus	27
Abb.7: Die Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> , Zipper-Mechanismus	28
Abb.8: Die Invasomen-vermittelte Invasion am Beispiel von <i>Bartonella henselae</i>	29-30
Abb.9: Zipper-Mechanismus	31
Abb.10: F-Aktin-assoziierte Proteine	34
Abb.11: Schematische Darstellung der Polymerisation	38
Abb.12-14: Präparation der CAM, Bilderfolge	48-49
Abb.15: In der Allantoisflüssigkeit platzierte Kanüle	51
Abb.16: Abkleben der eröffneten Fläche zur Vorbereitung für die Versuchsreihe	51
Abb.17: CAM mit inoculierten Latexpartikel, REM-Aufnahme	53
Abb.18: Internalisierung der Latexpartikel vom Epithel, TEM-Aufnahme	53
Abb.19: Aspiration von Allantoisflüssigkeit (AF)	58
Abb.20: Simultane monotope Inokulation mit <i>K. pneumoniae</i> und <i>E.coli</i> (A+ B)	60
Abb.21: Simultane ditope Inokulation mit A= <i>K. pneumoniae</i> und B= <i>E.coli</i>	60
Abb.22: Chorionepithel am 10. Entwicklungstag, Rasterelektronenmikroskopie	65
Abb.23-27: Mortalität in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zur Invasion	67-69
Abb.28: Beginn der Internalisierung von <i>Klebsiella pneumoniae</i> durch die CAM (TEM)	71
Abb.29: Fortgeschrittene Internalisierung von <i>K. pneumoniae</i>	72
Abb.30: Invasionsrate in Anwesenheit der jeweiligen „Inhibitoren	74
Abb.31: Mortalitätsrate in Anwesenheit der „Inhibitoren	76
Abb.32: Allantoisepithel am 10. Entwicklungstag, Rasterelektronenmikroskopie	103

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme	56
Tab. 2: Verwendete Inhibitoren.....	61

Abkürzungsverzeichnis

AF	Allantoisflüssigkeit
AR	Allantoisraum
Abb.	Abbildung
CAM	Chorioallantoismembran
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOh	Ethanol
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
HEM	Hühnerembryonenmodelle
HET	Hühner-Ei-Test
KBE	Kolonie Bildende Einheiten
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Kleb.</i>	<i>Klebsiella</i>
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro-
m	mili-
MaP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MT	Mikrotubuli
Mort.	Mortalität
n	Anzahl
NANA	N-Acetylneuramin
NAST	Natural-air-sac-technique
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
pi	post inoculationem
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

1. Einleitung

1.1 Hühnerembryonen-Modelle

Aufgrund zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen gehört die Chorioallantoismembran des Hühnerembryos zu den wichtigsten tierischen Organen. Seit den Arbeiten von Fülleborn (1895) sowie Goodpasture und Woodroff (1931) ist die Eignung dieses Organs für verschiedene Untersuchungen mit Viren allgemein anerkannt. In den 50er und 60er Jahren des letzten Jahrhunderts war die Chorioallantoismembran ein sehr gutes Testobjekt für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen infektionsassoziierter, zellulärer und geweblicher Veränderungen (Bang 1952; Sweeny & Bather 1968). Außerdem lassen sich auf ihr Transplantate von auto-, iso-, homo- oder heterologen Organanlagen und Organen züchten, die auf diesem Wege gezielt untersucht werden können (Ebert 1959, Dunkel und Groupe 1965). Auch die Histomorphologie der Tumore im Frühstadium lässt sich im CAM-Assay gut darstellen. Die Chorioallantoismembran kann zudem zur qualitativen Analyse des Invasionsverhaltens von malignen Tumorzellen verwendet werden (Laurin et al., 2004). In der Dermatologie sowie in der Tumorforschung ist die Chorioallantoismembran des Hühnerembryos heute eine Standardarbeitsmethode zur Untersuchung und Beeinflussung der Angiogenese. Sie ist eine echte Alternative zu angiogenetischen in vivo-Versuchen auf der Kornea des Hasens (Ribatti et al., 1996, Staton et al., 2004). Zur Beantwortung pharmakologischer und toxikologischer Fragen hat sie auch einen festen Platz als in vivo-Modell in der Pharmakologie gefunden (Rosenbruch, 1993, Lüpke, 1986).

Zur Klärung infektiologischer, onkologischer sowie pharmakologischer Fragen werden seit Jahren auch Tierversuche durchgeführt, die erhebliche ethische, moralische und auch gesetzliche Hindernisse beinhalten. Der Forschung steht mit der Verwendung von Hühnerembryonen eine Vielzahl an Modellen zur Verfügung. Zur Standardisierung von außen eingebrachter Substanzen und deren Einflüsse auf den Organismus hat

sich der HET (Hühner-Ei-Test) (Kemper, 1962, Lüpke, 1982, 1986) durchgesetzt. Dieser Test ermöglicht Aussagen über die embryonale Letalität, Teratogenität und systemische Toxizität von Agenzien (Kemper & Lüpke, 1986) zu treffen. Eine in vivo-Alternative zu dem kontrovers diskutierten Augen-Irritations-Test an Kaninchen bietet die Erweiterung des Hühner-Ei-Tests im Sinne eines standardisierten HET-CAM-Tests. Hierbei wird die Chorioallantoismembran exponiert und die zu untersuchenden Materialien bzw. Substanzen von oben auf diese Membran aufgetragen. Man untersucht die irritativen Effekte nach einer definierten Einwirkzeit. Es lässt sich eine insgesamt gute Korrelation zwischen der HET-CAM und dem Kaninchen-Augen-Irritationstest nachweislich bestätigen (Staton et al., 2004).

Die Hühnerembryonen-Modelle sind in ihrer Handhabung zwar sehr komplex, stellen aber im Vergleich zu Tierversuchen ein kostengünstigeres und in der Durchführung einfaches Testsystem dar. Sie nehmen eine Zwischenstellung in den beiden experimentellen Systemen, der Zelllinien auf der einen und der Tierversuche auf der anderen Seite, ein. In Zukunft wird man durch den Einsatz der Hühnerembryonen-Modelle die Anzahl der Tierversuche reduzieren können.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Inokulum in das Ei hineinzubringen, um infektiologische Fragen zu klären. Es haben sich, wie im Folgenden beschrieben, verschiedene Methoden herauskristallisiert, den Embryo außerhalb der Schale, also in schalenloser Kultur bzw. den Embryo im Ganzen innerhalb des Eies, zu beobachten. Die Eröffnung der Kalkschale ist Bestandteil in allen Techniken. Die so genannte „cover-slip-technique“ hat sich als eine nützliche Technik erwiesen, um Veränderungen zu beobachten, die auf ein infektiöses Agens oder auf ein toxisches Material zurückzuführen sind. Hierbei wird ein kleines fensterähnliches Areal aus der Eierschale entfernt. Anschließend kann die CAM dargestellt werden. Die Stelle, wo die harte Eierschale und die

Schalenmembran direkt aufeinander liegen, wird dargestellt und die weiche Schalenmembran vorsichtig abgetragen. Das fensterähnliche Areal deckt man anschließend mit einem klaren Deckglas über eine dünne Wand von Vaseline ab. Durch das Deckgläschen können nun entstandene Läsionen, die durch das Inokulum entstanden sind, beobachtet werden (Goodpasture, 1935). Die „shell-flap-technique“ wird für die Kultivierung und Isolierung von inokulierten Mikroorganismen, insbesondere Viren, häufig angewandt. Auch hierbei wird die Kalkschale eröffnet und die CAM nach Präparation der darüber liegenden Schichten freigelegt. Nach der Inokulation klappt man die Schichten über der CAM wie ein Schwenklappen in das aufgebohrte Areal wieder zurück und verschließt sie bis zur nächsten Untersuchung mit Parafin (Goodpasture, 1935). Die „false-air-sac-technique“ verwendet man für großflächige Darstellungen der CAM. Hierbei wird zunächst ein „Fenster“ auf der langen Seite des Eies präpariert und anschließend ein kleiner Schlitz in die darunter liegende Schalenmembran geschnitten. Durch ein winziges Bohrloch auf der Seite der natürlichen Luftkammer wird ein sanfter Sog ausgeübt, so dass sich die CAM von der anliegenden Schalenmembran löst und der Inhalt des Eies auf die bisher luftgefüllte, natürliche Luftkammer verschiebt. Es entwickelt sich nun ein künstlicher Luftraum, dessen Begrenzung die CAM bildet. Anschließend kann der nun neu entstandene Luftraum für die folgenden Inokulationsversuche verwendet werden (Rous, 1911, Burnet, 1933). Daneben gibt es die so genannte „Zwilling-technique“ (Zwilling, 1959), die eine Multiplikation der „false-air-sac-technique“ ist. Hier werden mögliche traumatische Schädigungen, die während der CAM-Lösung entstehen könnten, verhindert. Am 4. Entwicklungstag, bevor sich die CAM formieren kann, wird eine kleine Menge Albumin des Eies aspiriert und so ein künstlicher Luftraum geschaffen, in dem die CAM sich über der Flüssigkeitsschicht oberhalb des Embryos weiter entwickeln kann. Ohne Kontakt zu der Schalenmembran kann sie nun weiter wachsen, so dass später eine Trennung der beiden Membranen in der oben beschriebenen Weise nicht notwendig wird.

Eine weitere Methode zur Darstellung der CAM, die sich „natural-air-sac-technique“ (NAST) nennt, hat sich basierend auf den Arbeiten von Kemper (Kemper, 1958) und Lüpke (Lüpke, 1986) entwickelt. Hierbei wird durch die natürlich entstandene Luftkammer die Schalenmembran von der physiologisch entwickelten CAM entfernt.

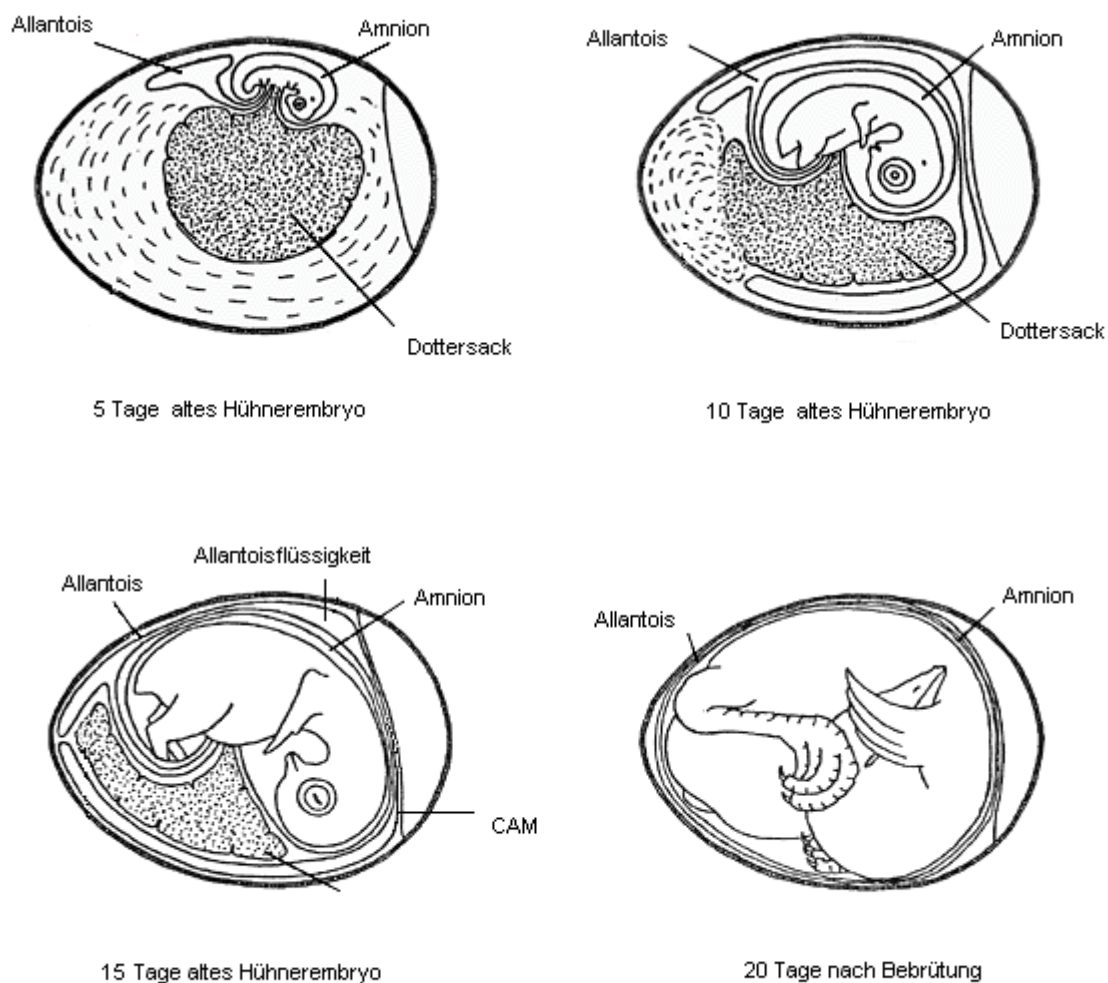


Abb.1: Entwicklungsstadien des Embryos (schematisiert).
(Modifikation nach Romanoff, 1949).

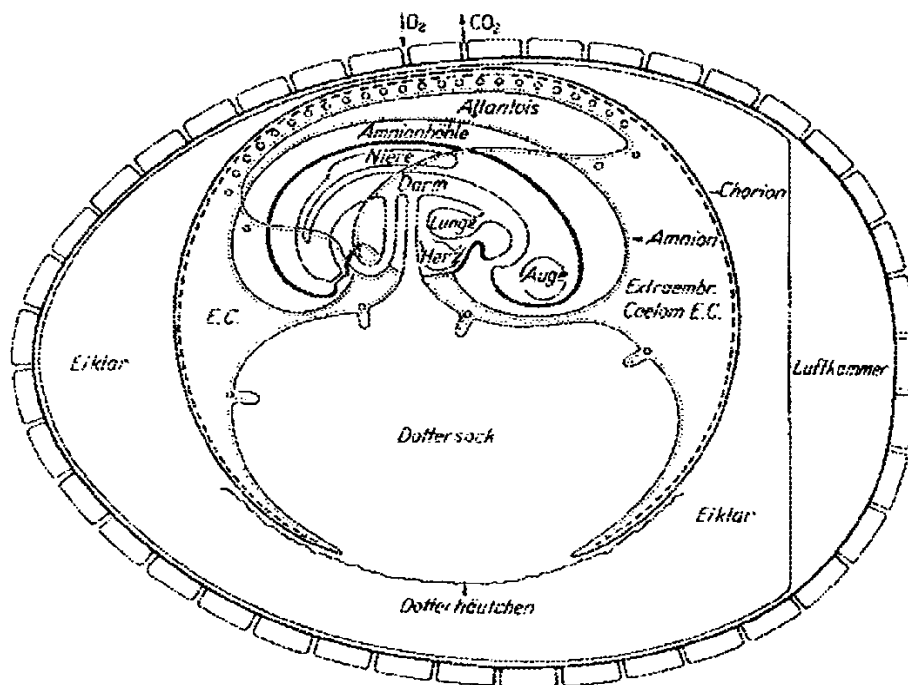


Abb.2: Schematisierter Längsschnitt eines Hühnerembryos in ovo am 6. Bruttag (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Peter Lemburg).

1.2 Die Chorioallantoismembran (CAM)

Die Chorioallantoismembran entwickelt sich zwischen dem 5. und dem 6. Tag der Bebrütung. Es kommt zu einer Fusion des somatischen Mesoderms des Chorions mit dem vaskularisierten Splanchnikusmesoderm der Allantois. Sie besteht so aus einer äußeren Schicht des Chorion-Ektoderms, einer mittleren Schicht in Form des Mesenchyms und einer inneren des Allantois-Entoderms. Die Allantoisblutgefäße wachsen zu weiten Sinusoiden heran, die das starke Bestreben haben, nach außen in Richtung Schalenmembran zu wandern (Ribatti et al., 1996).

1.2.1 Entwicklungsstadien und Morphologie der Chorioallantoismembran

1.2.1.1 Aufbau des Chorions

Das Chorion besteht vor seiner Fusion mit der Allantois, d. h. vor dem 5. Bebrütungstag, aus einem ein- bis zweischichtigen Epithel. Flache Zellen mit runden, ovalen oder gelappten Kernen verzahnen sich mit langen Fortsätzen und sind durch Desmosomen miteinander verbunden. Mikrovilli durchsetzen entstandene größere interzelluläre Räume des Epithels. Das Zytoplasma der Chorionepithelzellen besitzt einen typischen Zellorganellenbestand mit zahlreichen Polyribosomen, Mitochondrien, Golgi-Apparat, vereinzelt raues endoplasmatisches Retikulum, glattes ER und ein Bündel von zytoplasmatischen Filamenten, die zum Teil in Desmosomen einstrahlen. Unter der beschriebenen Zellschicht befindet sich eine Stützgewebsschicht, die sich aus ein- bis mehreren Lagen langgestreckter Zellen aufbaut. Am unmittelbaren Übergang der Schichten bilden die Stützzellen einen zusammenhängenden Verband, welche sich im Inneren locker verteilen. Das Stützgewebe wird vom Chorionepithel durch eine kontinuierliche Basalmembran, von der aus Bündel feinsten Filamente in die Grundsubstanz ziehen, getrennt. In der Grundsubstanz finden sich kollagene Fibrillen (Fitze-Gschwindt, 1973, McCormick, et al, 1984).

1.2.1.2 Aufbau der Allantois

An der Oberfläche des kubischen einschichtigen Epithels der Allantois befinden sich zahlreiche kurze Mikrovilli. Zum einen Teil verbinden Desmosomen die Zellen, zum anderen sind diese von Mikrovilli durchsetzenden Interzellulärräume getrennt. Das Allantoisepithel wird durch eine kontinuierliche Basalmembran vom darüber befindlichen Stützgewebe abgegrenzt. Dieses Stützwerk ähnelt dem des Chorions. Der

Unterschied liegt darin, dass es vielschichtiger und wesentlich zellreicher ist. Kollagene Fibrillen sowie ein feinflockiges Material bilden die Grundsubstanz. Die durchsetzenden Blutgefäße werden ebenfalls von einer Basalmembran umgeben. Das Gefäßendothel wird von langstreckigen, sich überlappenden flachen Zellen gebildet. Die endotheliale Zellmembran wird sowohl gegen das Lumen als auch gegen die Basalmembran von Mikropinocytosebläschen eingebuchtet (McCormick, et al, 1984).

1.2.1.3 Verschmelzung von Chorion und Allantois

Die Verschmelzung von Chorion und Allantois beginnt zwischen dem 4. und 5. Bebrütungstag. Es kommt im Bereich der Fusionsstelle zu einer Auflockerung des vielschichtigen allantoidalen Stützgewebes. Die epithelialen Zellverbände verändern sich dergestalt, dass sie die Morphologie eines weitmaschigen, flüssigkeitsreichen und von Gefäßen durchsetzten Gewebes darstellen. Bis zu diesem Entwicklungsstadium ist die ursprüngliche Schichtung beider Anteile noch deutlich erkennbar (McCormick, et al, 1984, Ribatti et al., 1996).

1.2.1.4 Die dreischichtige CAM

Ab dem 6. Tag nach Fusion von Chorion und Allantois wird das Chorion von der Schalenhaut durch eine feinflockige Masse getrennt. Am 8. Tag verbindet sich das Chorion an einigen Stellen mit der darüber liegenden Schalenhaut und ist über eine kurze Distanz mit ihr verbunden. Erste enge Beziehungen zwischen diesen beiden Elementen bestehen vom 10. Tag an. Im Chorionepithel erkennt man zwei Zelltypen mit unterschiedlichen Zellorganellenbestandteilen. Nach dem 12. Bebrütungstag sind solche Unterschiede nicht mehr sichtbar. An den Chorionepithelzellen treten vom 12. Tag an zahlreiche

Membraneinstülpungen, Fortsätze und Mikrovilli auf, so dass den Zytoplasmabezirken unter der Schalenhaut ein labyrinthähnliches Bild verliehen wird. Das Chorionepithel bildet einen ein- bis vierschichtigen Verband. Mit zunehmendem Entwicklungsalter nimmt auch die Zahl der zunächst noch seltenen Desmosomen zu (Mc Cormick, et al, 1984). Um den 16. Bebrütungstag bilden sich zwischen den Chorionepithelzellen ganze Ketten von Maculae densae. Vom 8. bis zum 9. Entwicklungstag breiten sich Sinusbildende Kapillaren subepithelial aus, und nachfolgend kommt es aufgrund der Aufnahme der Kapillaren zwischen den flachen Epithelzellen zu einer Verdrängung der epithelialen Zytoplasmaabschnitte, die sich direkt unter der Schalenhaut befinden. Der Blutsinus liegt jetzt intraepithelial. Nach Eindringen der Kapillaren in das Epithel verändern die Chorionepithelzellen ihre Morphologie. Sie erscheinen nun tropfenförmig, die Kerne liegen häufig in tieferen Schichten als die Blutgefäße, während sich ihre aufsteigenden Fortsätze unmittelbar unter der Schalenhaut ausbreiten (Romanoff, 1960). Unter dem sinusoidalen Pool befinden sich vom 12. Tag an ein bis drei Lagen von polymorphen Epithelzellen. Eine Basalmembran umzieht das Kapillarendothel sowie die umgebenen Perizyten. Bei der Wanderung der Blutgefäße aus dem Stützgewebe in das Epithel verschmelzen die Basalmembranen der Endothelien und der Chorionepithelzellen miteinander (Fitze-Gschwindt, 1973).

1.2.1.5 Stützgewebe

Von den Zellen des Stützgewebes mit ihren filigranen Fortsätzen wird eine Art dreidimensionales Netzwerk aufgebaut. Das Gewebe stellt sich zunächst als eine heterogene, flüssigkeitsreiche Substanz dar. Bis zum 10. Bebrütungstag sind vermehrt Zellen des Stützgewebes an der allantoidalen Seite zu finden. Anfangs enthält die Grundsubstanz relativ wenig kollagene Fibrillen, in späteren Entwicklungsphasen vermehrt sich jedoch das Kollagen. Die Zellen des Stützgewebes erkennt man an ihrer unregelmäßigen Form sowie an ihren zum Teil langen Fortsätzen. Dieses

Gewebe zwischen Chorion und Allantois wird von größeren und kleinen Blutgefäßen durchzogen, deren zahlreiche kapilläre Verzweigungen den Chorionblutsinus speisen. Lymphgefäße sind ab dem 8. Bebrütungstag zu erkennen (Fitze-Gschwindt, 1973).

1.2.1.6 Allantois

Das Allantoisepithel besteht nach der Verschmelzung mit dem Chorion aus ein bis drei Lagen kubischer bis flacher Zellen. Das Epithel wird erst zum Entwicklungsende hin mehrschichtig. Die Interzellulärräume weiten sich aus, so dass das anfangs dichte Geflecht aufgelockert wird, in dem die Räume von Mikrovilli durchsetzt werden. Schließlich stehen die Zellen nur noch über Desmosomen in Kontakt. Die mit der Allantoisflüssigkeit in Berührung stehenden Zellen sind an ihrer Oberfläche mit Mikrovilli besetzt, die zum Ende hin keulenförmig aufgetrieben sind. Eine dicke Basalmembran bildet die Grenze zwischen Allantoisepithel und Stützgewebe in die kollagene Fibrillen einstrahlen. Vom 12. Entwicklungstag an kommt es zu Veränderungen der intraepithelialen Zellen. Die lumenwärts angeordneten Zellen, die bereits vom 8. bis 10. Tag rundliche Einschlüsse aufweisen, werden höher. Sie bilden ab dem 17. Bebrütungstag eine Lage kubischer Zellen. Die Zellen der darunter befindlichen Schichten werden flacher. Die Körperchen werden nun größer und zahlreicher und füllen den größten Teil des Zytoplasma aus (Fitze-Gschwind, 1973, Fancsi & Feher 1979, Feher, 1984).

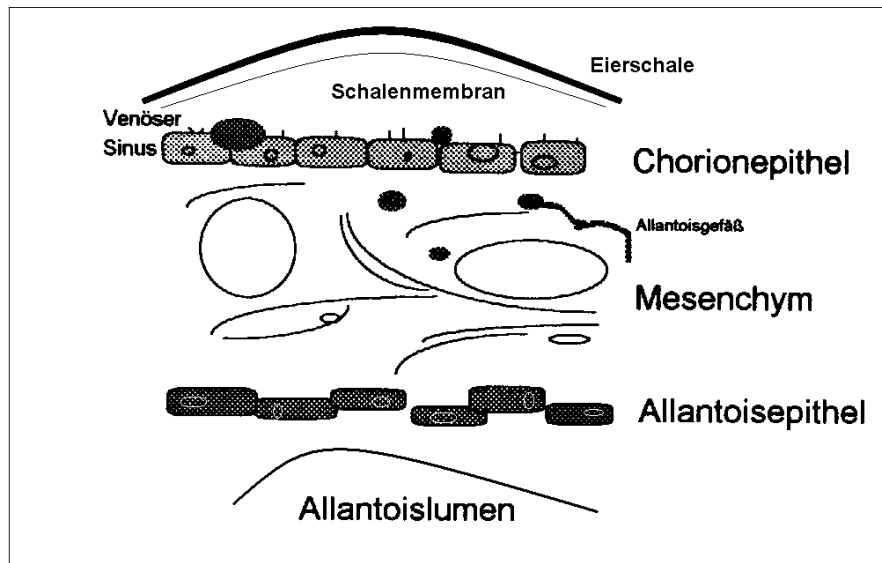


Abb. 3: Aufbau der CAM (vereinfacht)

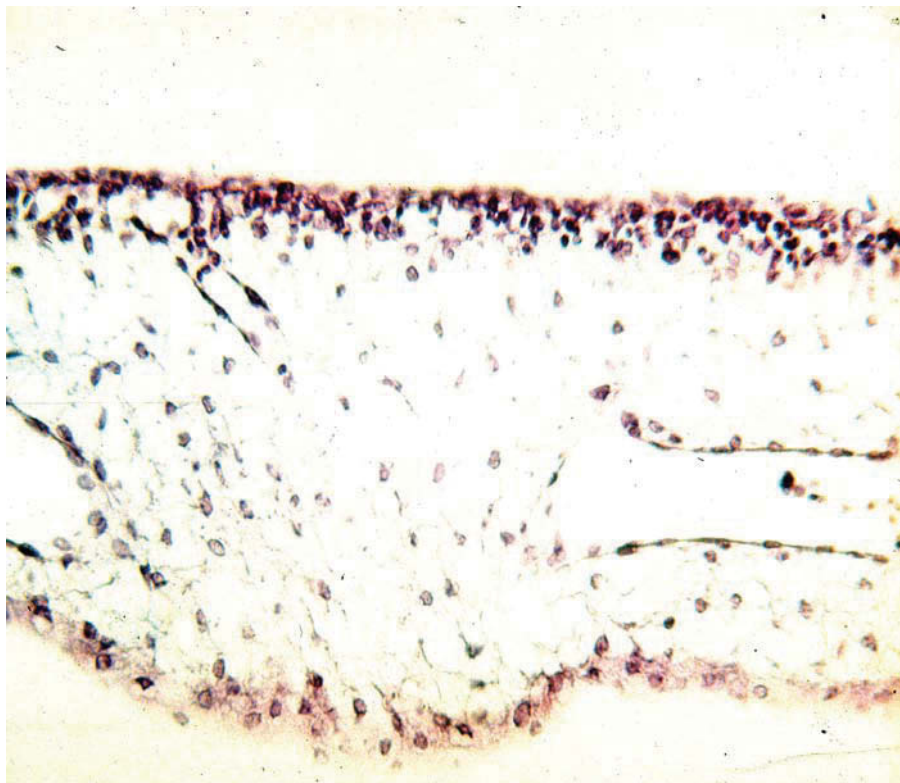


Abb. 4: LM-Aufnahme der CAM am 10. Entwicklungstag (40-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin Färbung)

1.3 Die Physiologie der CAM

Man kann die CAM als eine Art Plazenta des Hühnchens bezeichnen. Primär hat die Chorioallantoismembran die Aufgabe, dem Hühnchenembryo als Respirationsorgan zu dienen. Eine bedeutende Rolle spielt ein kapillärer Plexus im embryonalen Gasaustausch. Bereits früh entwickelt sich ein komplexes Netzwerk an Blutgefäßen, das in engem Kontakt zur chorionalen Epithelschicht steht. Die Sauerstoffmoleküle diffundieren durch die kalkhaltige Eierschale, die miteinander verbundenen Fasern der inneren Schalenmembran und durch die Chorionepithelschicht. Von den zirkulierenden Erythrozyten wird der Sauerstoff schließlich innerhalb der Kapillaren aufgenommen und weitergeleitet.

Für den Abtransport von Kohlendioxid ist diese Blut-/Luftschanke ebenfalls von großer Bedeutung. Die CAM spielt auch eine wichtige Rolle im Prozess der Exkretion, wobei diese in die Allantoisflüssigkeit gelangt (Burton, 1989, McCormick, 1984). Für die Entwicklung des Embryos ist Kalzium enorm wichtig. Es gibt sehr viele Untersuchungen zur Klärung des Kalziummetabolismus und des Kalziumtransportes. Als Kalziumquellen dienen dem Embryo während seiner Entwicklung der Dottersack und die Eierschale. Während die Kalziumvorräte primär aus dem Dottersack mobilisiert werden, ist im späteren Verlauf der embryonalen Entwicklung die Eierschale die Hauptquelle für die Kalziumgewinnung.

Die Kalzium-Transportfunktion der Eierschale beginnt um den 12.-13. Inkubationstag und erreicht ein Maximum um den 18.-19. Tag der Entwicklung (Terepka et al., 1976, Tuan et al., 1986, 1987). Für die Translokation von über 140 mg Eierschalen-Kalzium in die embryonale Blutzirkulation wird die Chorioallantoismembran verantwortlich gemacht (Terepka et al., 1976). Die Angiogenese der Chorioallantoismembran ist ein sehr gut untersuchter Prozess. Sie bietet durch die kontinuierliche Neubildung und Umstrukturierung des kapillären Netzwerkes ein sehr gutes Testobjekt für verschiedene Testsubstanzen, welche durch den

Einfluss von Umweltfaktoren wie pathogene Keime bzw. Toxine entstanden sind, beobachtet werden (Staton et al., 2004, Ribatti et al., 1991, 1996).

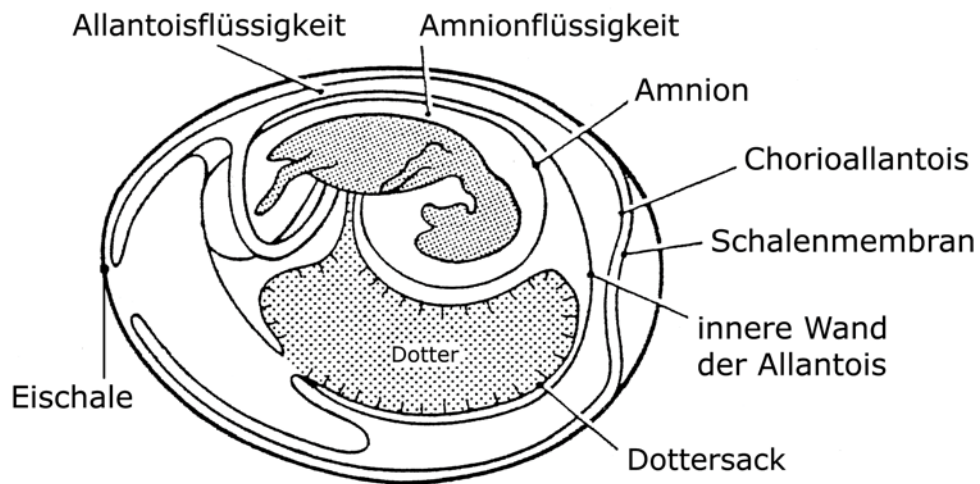


Abb. 5: Schematisierter Ausschnitt eines 12 Tage alten Hühnerembryos. Hier wird die Lagebeziehung des Eies zur CAM und Schale sehr deutlich (modifiziert nach nach Hamilton, 1952).

1.4 *Klebsiella pneumoniae*

1.4.1 Einführung

Die Gattung *Klebsiella*, benannt nach dem Mikrobiologen Edwin Klebs, gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. *Klebsiella pneumoniae* ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges und unbewegliches Bakterium. Der Keim ist besser bekannt als ein opportunistischer und nosokomialer Krankheitserreger. Dieser wird für immunsupprimierte oder hospitalisierte Menschen besonders gefährlich. *Klebsiella pneumoniae* besiedelt nicht nur das Gastrointestinal- und das Urogenitaltrakt, sondern auch den Nasen-Rachenraum. *Klebsiella pneumoniae* kann Pneumonie und Sepsis hervorzurufen. Nach den Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS; Geffers et al., 2002) ruft *K. pneumoniae* auf deutschen Intensivstationen als sechsthäufigster Erreger 9,1% aller nosokomialen Infektionen hervor und steht bei der beatmungsassoziierten Pneumonie mit 12,4% der Infektionen nach *S. aureus* und *P. aeruginosa* an dritter Stelle. Das rasche Fortschreiten einer Infektion mit schnellem Befallen eines bzw. mehrerer Lungenlappen, die zu einem Lungenabszess führen können, bedarf einer zügigen Entscheidung über die adäquate antibiotische Therapie (Cortés, 2002).

Die Fähigkeit von *Klebsiella* spp. zur schnellen Ausbreitung (Kühn et al., 1993) führt häufig zu nosokomialen Ausbrüchen. Das wichtigste Reservoir für Ausbruchsstämme ist der Gastrointestinaltrakt.

Die Eintrittspforte für Infektionen bietet meistens das Urogenitalsystem. Die Klebsiellen sind gegenüber Penicillin G und Aminopenicillinen resistent. In den letzten Jahren ist die Behandlung dieser Infektion zunehmend durch multiple Antibiotikaresistenzen schwerer geworden (Arlet et al., 1994). Man hat beobachten können, dass eine Harnwegsinfektion mit einer herkömmlichen Antibiotika-Therapie oft rezidivierend mit dem gleichen *Klebsiella pneumoniae*-Stamm auftritt (Donovan et al., 1999).

Umso wichtiger ist somit das Wissen über die Pathomechanismen der Keime geworden, damit neue Antibiotika-unabhängige Therapien entwickelt werden können.

Der Wirt verfügt über natürliche Abwehrmechanismen wie z.B. Harnfluss oder Schleimsekretion, welche die meisten Bakterien eliminieren können. Dennoch müssen die Bakterien bestimmte Virulenzfaktoren aufweisen, die diese Abwehrmechanismen umgehen, um den Wirt kolonisieren zu können. Das Bakterium muss am Epithel des Wirtes haften bleiben und der Immunantwort entgehen können. Die Adhäsine ermöglichen dem Bakterium das Anheften an die Wirtszelle. Alle *Klebsiella*-Isolate verfügen darüber. Somit ist der erste Schritt einer Infektion getan. Eine häufig vorkommende Kapsel unterstützt weiterhin den Keim vor Phagozytose und anderen Abwehrmechanismen. *Klebsiella pneumoniae* ist wie alle anderen gram-negativen Bakterien in der Lage, Lipopolysaccharide zu bilden und besitzt die Fähigkeit, über Siderophore Eisen in die Zelle zu transportieren, zudem können die Keime über Urease-Aktivität den pH-Wert der Umgebung anheben, um das eigene Überleben zu verbessern. Ein neuer Pathogenitätsfaktor ist die Invasivität von *Klebsiella pneumoniae*. Man ging lange Zeit davon aus, dass *Klebsiella pneumoniae* extrazellulär gelegene Krankheitserreger seien, die aktuellen Studien hingegen haben gezeigt, dass das Bakterium von Epithelzellen internalisiert wird und humane Epithelzellen invadieren kann (Oelschlaeger & Tall, 1997, Sahly et al., 2000). Die intrazelluläre Lage des Erregers könnte die Ursache für die immer wiederkehrenden Harnwegsinfektionen sein und die unzureichende Wirksamkeit der Antibiotika-Therapie erklären. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich die klinischen Bakterien-Isolate nicht von den natürlich vorkommenden Klebsiellen-Stämmen bezüglich der Virulenz unterscheiden lassen. Struve hat 2004 bei seinen Experimenten zur Beurteilung der Adhäsion und Invasion vergleichbare Ergebnisse erzielt.

1.4.2 Die Biologie von *Klebsiella pneumoniae*

Es lassen sich hauptsächlich vier Arten von Klebsiellen unterscheiden. Klinisch relevant sind hier die *Klebsiella pneumoniae* mit den Subspezies *Klebsiella subsp. pneumoniae*, *subsp. Ozaenae* und *subsp. Rhinoscleromatis* sowie *Klebsiella oxytoca*. *Klebsiella terrigena* und *Klebsiella planticola* sind weniger bedeutsam für die Humanmedizin. Die stäbchenförmigen, unbeweglichen Keime wachsen relativ anspruchslos auf glucosehaltigen Nährböden. Der größte Teil von *Klebsiella*-Isolaten vermehrt sich in Form von großen schleimigen Kolonien. Als alleinige Kohlenstoffquelle werden Zitrat und Glucose von den meisten Arten verwertet, wobei Glucose unter Säure- und Gasbildung abgebaut wird. Die meisten klinischen *Klebsiella*-Isolate sind bekapselt und verfügen damit über einen guten Schutz vor der Immunantwort des Wirtes. Weiterhin kann die Kapsel als Barriere gegen Antikörper oder Komponenten des Komplementsystems wirken und damit der Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile entgehen (van Oss, 1978). Die in vitro Experimente konnten diese Erkenntnisse widerspiegeln (Podschun et al., 1992). Man unterscheidet mehr als 77 K-Antigentypen (Ørskov & Fife-Asbury, 1979). Kein Kapseltyp kann einem bestimmten Krankheitsbild zugeordnet werden (Podschun et al., 1993, Tarkkanen et al., 1992). Zudem gibt es keinen Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Kapseltyp (Smith et al., 1982). Bei der Pathogenese von Harnwegsinfektionen ist die Bedeutung der Kapsel bei *Klebsiella pneumoniae* noch unklar, sie scheint jedoch nicht essentiell zu sein (Camprubi, 1993, Favre-Bonte et al., 1999).

Die Klebsiellen-Stämme besitzen wie *E.coli* O- und K-Antigene. Die O-Antigene spielen in der serologischen Diagnostik nur eine untergeordnete Rolle, da das Kapselantigen die Agglutinabilität des O-Antigens verhindert. Die meisten nosokomialen Infektionen durch Klebsiellen werden in der Regel durch die Vielzahl anzutreffender K-Antigentypen verursacht. Bezüglich der Virulenz spielt dieser Antigentyp eine entscheidende Rolle

(Cortés, 2002). Die K-Antigene sind saure Polysaccharide von unterschiedlicher Größe und Verkettung. Infektionsquellen können durch die Typisierung erkannt werden. In epidemiologischen Studien wurden lediglich 25 der 77 verschiedenen Serotypen als Ursache für 70% der Bakteriämien, bei denen Klebsiellen isoliert werden, nachgewiesen (Cryz et al., 1986). Die Existenz einer Kapsel ist für die Adhäsion und Internalisierung von *Klebsiella pneumoniae* in nicht phagozytierende Zellen, wie z.B. Epithelzellen, von entscheidender Bedeutung. Es zeigte sich, dass an Darm- und Harnblasenepithelien die Adhäsions- und Internalisierungsrate der kapseltragenden *Klebsiella pneumoniae*-Stämme im Gegensatz zu kapsellosen Bakterien deutlich geringer ist (Sahly et al., 2000). An Lungenepithelzellen konnte dieser Unterschied ebenfalls in Invasionsversuchen demonstriert werden. Dabei invadierten die bekapselten Stämme die Lungenzellen weniger effektiv als die wenig bekapselten und kapsellosen Bakterien (Cortés, 2002). In vielen in vitro Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein der Kapsel die Möglichkeit von *Klebsiella pneumoniae*, sich an epitheliale Zellen zu binden und in diese einzudringen, deutlich einschränkt. Demgegenüber haben kapsellose *Klebsiella pneumoniae*-Stämme im Gastrointestinaltrakt keine Vorteile. In der Kolonisation des Gastrointestinaltraktes von Mäusen, die mit Streptomycin vorbehandelt wurden, gab es keine Unterschiede in der Kolonisation von kapseltragenden bzw. kapsellosen Bakterien. Im Urogenitaltrakt stellt die Kapsel immer noch einen bedeutsamen Virulenzfaktor dar. In den Mäuseexperimenten konnte eine höhere Keimzahl von kapseltragenden *Klebsiella*-Isolaten nach urogenitaler Infektion mit Klebsiellen als von kapsellosen Bakterien nachgewiesen werden (Struve et al., 2003).

Klebsiella pneumoniae trifft man im Gegensatz zu vielen anderen Bakterienarten überall in der Umwelt an. Sie kommen neben der klinischen Umgebung wie des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes, der Respirationsorgane oder auch in sämtlichen Schleimhäuten des Menschen

und der Tiere auch in der Vegetation, in der Erde und auch im Wasser vor (Bagley, 1985). Die aktuellen Untersuchungen zeigen, dass sich natürlich vorkommende Klebsiellen-Stämme bezüglich der Virulenz nicht von den klinischen Isolaten unterscheiden lassen. Die Experimente haben vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Adhäsion und Invasion ergeben (Struve et al., 2004).

1.4.2.1 Adhäsine

Die Internalisation der Bakterien kann durch eine Vielzahl von Adhäsinen ausgelöst werden. Hierbei werden verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle aktiviert, die zu einer Rearrangierung des Aktinzytoskeletts führen und die Bildung von pseudopodienähnlichen Ausläufern bzw. Membranfalten induzieren (Oelschlaeger, 2001; Cossart & Sansonetti, 2004).

Die Fähigkeit eines Bakteriums zur Adhärenz ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Sie bildet den ersten Kontakt mit der Wirtszelle eines invasiven Bakteriums. Für *Klebsiella pneumoniae* sind bisher vier verschiedene Adhäsine beschrieben worden. Die mannosespezifischen Typ 1 Fimbrien werden von mehr als 75% der *Klebsiella*-Harnwegs isolate exprimiert (Duguid, 1959, Podschun et al., 1993). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Typ 1 Fimbrien in der Blase, aber nicht in der Niere einen Selektionsvorteil vermitteln (Mayaan, 1985). Die Typ 1 Fimbrien stellen einen Virulenzfaktor für Infektionen der unteren Harnwege dar, die mit den Erkenntnissen über Harnwegsinfekte mit *E.coli* übereinstimmen (Connell et al., 1996, Schaeffer et al., 1987). In neuen Untersuchungen wird die unbedeutende Rolle der Fimbrien in Bezug auf die Infektion des Gastrointestinaltraktes beschrieben (Struve & Krogfelt, 2003). Diese demonstrierten, dass die Typ 1 Fimbrien tragenden *Klebsiella pneumoniae*-Stämme bei Infektion des Urogenitaltraktes bedeutsam sind. Diese spielen bei der Kolonisation des Gastrointestinaltraktes aber eine untergeordnete Rolle (Struve & Krogfelt, 2003).

Die mannoseresistenten Fimbrien (mrk), die als Typ 3 Fimbrien bezeichnet werden, verursachen die nosokomialen Infektionen und Entzündungen im Bereich der ableitenden Harnwege. Es werden sechs mrk-Gene für die Synthese der Typ 3 fimbriellen Filamente gebraucht. Man unterscheidet die plasmidkodierte und die chromosomalkodierte Form. Als erstes wurden diese beiden Varianten bei *Klebsiella pneumoniae* IA565 beschrieben (Hornick et al., 1995). Bei der chromosomalkodierten Form fehlt die Fähigkeit zur Hämagglutination. Die plasmidkodierte Variante kann an die basolaterale Oberfläche von Lungenepithelien und Nierenkanalzellen binden, hier findet sich der Typ 5 Kollagen (Tarkkanen et al., 1990). Dieses wurde in vielen in vitro Experimenten gezeigt (Hornick, 1995, Schurtz et al., 1994). Über die Bindungseigenschaften der chromosomalkodierten Variante ist bislang wenig bekannt. Die Anheftung von Typ 3 Fimbrien exprimierenden *Klebsiella*-Isolaten ist häufig an intakten Epithelien nicht möglich. Die Oberfläche des Urothels muss beispielsweise von einem Katheter verletzt werden, damit *Klebsiella* über Typ 3 Fimbrien adhären kann (Collins & D’Orazio, 1996). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der *Klebsiella pneumoniae*-Stämme in der Lage ist, Typ 1 sowie auch Typ 3 Fimbrien zu bilden (Podschun et al., 1993, Hornick & Tomandru, 1995, Tarkkanen et al., 1992). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die nicht kapseltragenden *Klebsiella*-Stämme ein höheres Potential besitzen, Typ 1 Fimbrien auszubilden als die kapsellosen Isolate (Matatov et al., 1999).

Ein weiteres fimbrielles Adhäsins, welches in β -Lactamase bildenden *Klebsiella*-Isolaten beschrieben wird, bezeichnet man als KPF-28 (Di Martino et al., 1996).

Das nicht fimbrielle CF29K ist ein zusätzlicher Adhärenzfaktor, das auf einem R-Plasmid kodiert wird (Darfeuille-Michaud, 1992). Dieses ist fast identisch mit dem Adhäsins von CS31A, einem Adhärenzfaktor von schweinepathogenen *E.coli*-Stämmen. Die Ausbildung des CF29K-Adhäsins hängt vor allem von einer das Bakterium umgebenden Kapsel

ab. Beim Vorhandensein einer Kapsel wird das Adhäsion in seiner Entwicklung reduziert (Favre-Bonte et al., 1999).

Mit dem Anheften von *Klebsiella pneumoniae* an die Wirtszelle beginnt der eigentliche Adhäsionsprozess. Ausgehend von der Wirtszelle heften sich Strukturen des Zytoskeletts an die Mikrokolonien von *Klebsiella pneumoniae*. Weiterhin treten netzartige Ausbildungen auf, die wahrscheinlich bakteriellen Ursprünge sind. Von diesem Gefüge umspannt werden die Bakterien mit der Wirtszelle verknüpft. Man nimmt an, dass Fimbrien eine Komponente dieser netzartigen Strukturen bilden. Zu einem späteren Zeitpunkt werden die Bakterien wahrscheinlich durch ein Verschmelzen der Mikrovilli netzartig umwoben. Hierbei könnte es sich um „Invasomen“ ähnliche Formen handeln, die beim Invasionsprozess von Bartonellen beschrieben sind (Dehio et al., 1997). Die Membran der Wirtszelle wölbt sich schließlich um das sogenannte Invasom (s. auch Abb. 7). Es kommt letztendlich zur vollständigen Aufnahme in die Zelle (Fumagalli, 1997).

1.4.2.2 Eisen-Aufnahme

Die meisten pathogenen Bakterien benötigen Eisen zum Wachstum. Bei Mangel können die Bakterien mit Hilfe von Siderophoren Eisen aus dem Milieu aufnehmen. Fast alle klinischen *Klebsiella*-Isolate bilden das Siderophor Enterochelin, nur einige bilden Aerobaktin (Tarkkanen et al., 1992, Podschun et al., 1993, Nassif & Sansonetti 1986).

1.4.2.3 Das Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien. Wie bei allen anderen gram-negativen Bakterien ist das LPS das „Ziel“ des Komplementsystems. Die doppelschichtige Lipidmembran bildet die Zellhülle der Bakterien. Es weist bei verschiedenen

Bakterienspezies das gleiche Aufbauprinzip auf. So besteht das klassische LPS immer aus einem O-Antigen, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A (Raetz 1990; Rietschel et al., 1994). Bei dem außen liegenden O-Antigen handelt es sich um ein Polymer aus sich wiederholenden Oligosacchariden. Letzteres ist entscheidend für die Funktion der äußeren Membran. Es besitzt antigenen Charakter und ist bei jeder Bakterienspezies unterschiedlich. Deshalb dient es der Differenzierung verschiedener Serotypen, was z.B. bei der epidemiologischen Untersuchung von Salmonellen-Infektionen genutzt wird (Popoff et al., 1998). Das O-Antigen kann auch vollständig fehlen. Diese LPS-Art wird „rough-LPS“ (R-LPS) genannt. Im Gegensatz dazu spricht man bei Anwesenheit eines O-Antigens von „smooth LPS“ (S-LPS) (Raetz 1990).

Es besteht aus einem nach außen ragenden Zuckeranteil, der bei den verschiedenen Bakterienspezies stark variiert oder gänzlich fehlen kann und einem Lipidanteil, dem Lipid A, welches der Verankerung des Lipopolysaccharids in der Bakterienmembran dient. Der Polysaccharidanteil besteht aus dem inneren und dem äußeren Kern, sowie dem O-Antigen. Die Variabilität der Zuckerstrukturen nimmt vom inneren Kern zum O-Antigen zu. Lipid A ist für die meisten pathophysiologischen Eigenschaften des LPS verantwortlich (Wiese et al., 1999).

Für die Aktivität des Lipid A Moleküls sind die beiden Phosphatgruppen, die Anzahl, Länge und Verzweigung der Lipidketten wichtig.

Das Kernpolysaccharid liegt proximal des O-Antigens und wird in einen äußeren und einen inneren Kern unterteilt. Das Kernpolysaccharid des LPS ist, im Gegensatz zum O-Antigen, bei vielen Gram-negativen Bakterien gleichartig aufgebaut. Im inneren Kern des Kernpolysaccharides befindet sich immer Keto-desoxy-oktonat. Es ist für die Funktion der äußeren Zellmembran unerlässlich. Sein Verlust ist mit dem Leben Gramnegativer Bakterien nicht vereinbar (Raetz 1990). Das Lipid A ist der kovalent gebundene Lipidanteil des LPS und dient als sein Membrananker. Es ist ein amphiphiles Molekül. Die hydrophile Kopfgruppe besteht aus zwei β -1-6-glykosidisch verknüpften N-acetyl-Glucosamin-Molekülen, welche

zusätzlich mindestens zwei Phosphatreste und gegebenenfalls weitere polare Gruppen enthalten.

Der hydrophobe Teil des Lipid A besteht aus vier-Hydroxy-Fettsäureketten (Raetz 1990). Es ist in vielen Arbeiten gezeigt worden, daß Lipid A für die meisten pathophysiologischen Wirkungen des LPS verantwortlich ist (Loppnow et al., 1986; Rietschel et al., 1994).

Es dient der Interaktion zwischen LPS und dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein (LBP) und der Interaktion mit Lipoproteinen sowie der Aktivierung des Komplementsystems. Die klinischen Auswirkungen werden nicht direkt durch die toxische Wirkung der LPS verursacht. Das beim Zerfall der gramnegativen Bakterien freigesetzte LPS hat vielmehr eine Signalfunktion für das Immunsystem. Es dient als Trigger für die nachfolgende patho-physiologische Kaskade (Ulevitch & Tobias 1999).

Von großer Bedeutung ist hierbei die Bindung von LPS an spezifische Plasmaproteine. Minimale Konzentrationen von LPS sind in Verbindung mit LBP (lipopolysaccharide-binding protein) und CD14 in der Lage, die Zellen des Immunsystems zu einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu veranlassen. Es wird angenommen, dass LPS zunächst von LBP gebunden wird. Der so entstandene LPS/LBP-Komplex wird im Plasma vorhandenem s(soluble)CD14 sowie membranständigem mCD14 präsentiert und weiter an die Monozyten/Makrophagen gebunden (Ulevitch & Tobias 1999). Da CD14 entweder in gelöster Form im Plasma oder als membran-ständiger Rezeptor vorliegt, postulierten Ulevitch und Tobias das Vorhandensein eines transmembranären Co-Rezeptors, der das vermittelte Signal, durch LPS/LBP an das Zellinnere weitergibt.

Schließlich kommt es über den intrazellulären Transmitter NFkB zu einer vermehrten Expression und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. LPS und LBP haben alleine keinen Effekt auf das Komplementsystem. Erst das Vorhandensein von toll-like receptor (TLR) bewirkt, dass LPS gemeinsam mit LBP und CD14 eine messbare, vermehrte Expression von NFkB in den Immunozyten hervorrufen (Yang

et al., 1998). Yang et al., folgerten draus, dass für die Wirkung von LPS die Bindung an LBP sowie an CD14 nötig ist und dass TLR2 als Transmembranprotein die Signaltransduktion in das Zytoplasma bewirkt. Andere Arbeiten zeigen, dass nicht TLR 2, sondern eher TLR4, ein anderes Mitglied der Familie der Toll-like receptors, als Signalprotein für Lipopolysaccharide dient (Heine et al. 2001). Es erscheint, dass der Gruppe der Toll-like receptors und besonders TLR2 und TLR4 eine sehr wichtige Bedeutung bei der durch bakterielle Toxine ausgelösten Immunreaktion zukommt.

Kommt es in Folge der Immunabwehr oder einer Antibiotika-Therapie zum Absterben der Bakterien, kann das im Wirt zu einer überschießenden Immunantwort führen, die schließlich eine Sepsis nach sich ziehen kann. Das LPS wirkt dabei als Endotoxin. Durch das freigesetzte LPS kann die Komplementaktivierung ausgelöst werden, diese bildet den alternativen Aktivierungsweg unter Umgehung einer Antikörperwirkung. Es ist möglich, dass die Interaktion durch die Modifikation in der Struktur, z.B. Variation der O-Seitenkettenlänge, beeinflusst bzw. verhindert wird. Als serumresistent werden Bakterien bezeichnet, die den Angriff des Komplementsystems überstehen (Ciurana, 1987, Camprubi, 1993).

1.4.2.4 Urease

Fast alle *Klebsiella*-Isolate aus Harnwegsinfektionen sind ureasepositiv (Podschun et al., 1993). Das Enzym Urease katalysiert die Umwandlung von Harnstoff zu Carbamat unter Bildung von Ammoniumionen (Griffith, 1976). Diese Kationen verursachen das Ansteigen des pH-Wertes im Urin, was die Entstehung von Harnsteinen fördern, zu Harnstau führen und somit schädliche Folgen haben kann (Lerner et al., 1989, Mobley & Warren, 1987). Die Harnsteine erhöhen das Risiko für eingeschlossene Bakterien, die sich einer antibiotischen Behandlung entziehen können (Fowler, 1984).

1.4.2.5 Antibiotikaresistenz

Die Resistenz von Mikroorganismen gegenüber den meisten klassischen Antibiotika nimmt ständig zu. Die Anzahl der antibiotikaresistenten *Klebsiella*-Isolaten ist in den letzten Jahren drastisch angestiegen (Arlet, 1994, Petit et al., 1988, Sirot et al., 1987). Es wird angenommen, dass die Resistenz durch R-Plasmide übertragen wird. Im Vergleich zu den ambulant erworbenen Infektionserregern zeigen die nosokomialen Isolate multiple Resistenzen (Ashkenazi, 1991). Es werden sogar bereits Resistenzen gegenüber Cephalosporine der 3. Generation beschrieben (Shannon et al., 1998, Verma et al., 2001). Bei hospitalisierten Patienten kommt es im Gastrointestinaltrakt zur Besiedlung mit resistenten *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten, die zu rezidivierenden Harnwegsinfektionen führen können (Selden et al., 1971, De Champs et al., 1989, Donovan et al., 1990).

Dies zeigt, dass zur Bekämpfung von multiresistenten Bakterien eine neue Klasse von Wirkstoffen notwendig wird. Bei der Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe muss darauf geachtet werden, dass das Endotoxin wie das LPS unschädlich gemacht wird. Die Wirkstoffe sollten in der Lage sein, nicht nur die Bakterien abzutöten, sondern darüber hinaus das Endotoxin zu binden und schließlich zu einer Entgiftung zu führen (Wiese, 1999, Gutschmann, 2001). Bei einer großen Anzahl der Infektionen spielt die äußere Membran der Bakterienwand eine entscheidende Rolle, da diese wichtige Membranproteine, die sogenannten Porine, beinhaltet. Dabei handelt es sich um Kanäle, die die passive Diffusion von wasserlöslichen Stoffen durch die äußere Membran erlauben.

Häufig wird zur Behandlung von *Klebsiella pneumoniae* induzierten Infektionen β -Laktamase-Antibiotika eingesetzt. Diese Antibiotika penetrieren die äußere Membran vieler gram-negativer Bakterien durch die Porine. Untersuchungen hierzu zeigen, dass eine Reduktion oder ein Verlust der Porine die Ursache für die Antibiotikaresistenz sind

(Domenech-Sanchez et al., 1999). Die natürlich vorkommenden *Klebsiella pneumoniae*-Stämme sind weniger multi-resistent als die klinischen Isolate (Podschun et al., 1986). Aktuelle Experimente haben gezeigt, dass alle untersuchten natürlichen Stämme mit Ausnahme von Ampicillin sonst keine Resistenzen aufwiesen (Struve et al., 2004). Die Ampicillin-Resistenz ist verständlich, da Ampicillin ein β -Laktamase-Antibiotikum ist und die Klebsiellen zu den β -Laktamase-Bildnern gehören. Prinzipiell besitzen Stämme aus Umwelt-Habitaten die gleiche Virulenz und das gleiche Potential zur Adhäsion an menschliche Epithelzellen wie klinische Isolate (Podschun et al., 2001; Struve et al., 2004).

1.4.3 Adhäsion und Invasion

Die Fähigkeit von Bakterien, in Wirtszellen einzudringen, wird als Invasion bezeichnet. Eukaryontische Zellen können von Erregern invadiert werden, wobei es im Zellinneren zu einer Erregerreplikation kommt. Mittels Adhäsion binden zunächst die Bakterien an der Wirtszelle, wobei es zur Aktivierung der Signale beim Kontakt kommt, die direkt oder indirekt die Erregeraufnahme zur Folge haben (Bliska, 1993, Rosenshine & Finlay, 1993).

Ein oder mehrere Liganden auf bakterieller Seite, die Adhäsine und Integrine, binden dabei an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Die An- oder Abwesenheit dieser Rezeptoren in bestimmten Geweben oder Organen kann den Gewebetropismus des Erregers bestimmen (Meyer, 1999). Anschließend kommt es zur Signalübertragung und zur Reorganisation des Wirtszytoskeletts (Tang et al., 1993).

Viele Arbeiten haben gezeigt, dass auch *Klebsiella pneumoniae* die Fähigkeit haben, in humane Epithelzellen einzudringen (Oelschlaeger, 1997, Favre-Bonte et al., 1999). Die Ursache für rezidivierende Harnwegsinfektionen mit dem gleichen Stamm ist möglicherweise auf die intrazelluläre Lokalisation von *Klebsiella* zurückzuführen. Das Eindringen von *Klebsiella pneumoniae* in humane Epithelzellen könnte als

Schutzmechanismus vor der Wirkung von Antibiotika und vor Zellen des wirtseigenen Abwehrsystems gesehen werden, da es sich nicht um eine erworbene Antibiotikaresistenz handelt. Die verursachten Urosepsitiden und Bakteriämien könnten durch einen transzytotischen Prozess der *Klebsiella pneumoniae* erklärt werden (Menon & Tan, 1992). Somit wird die Fähigkeit zur Invasion als ein Pathogenitätsmechanismus von *Klebsiella pneumoniae* gesehen.

Die Invasion kann entweder durch direktes oder indirektes Binden von Wirtszellrezeptoren oder durch die Translokation von bakteriellen Faktoren in das Wirtszytosol und die dadurch jeweils ausgelöste Rearrangierung des Aktinzytoskeletts ausgelöst werden (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006).

Die invasiven Bakterien scheinen zwei Hauptarten von Aufnahmemechanismen entwickelt zu haben. Es gibt neben dem „zipper“-Mechanismus ein „trigger“-Mechanismus. In der Abb. 6 wird am Beispiel von *Shigella* der „trigger“-Mechanismus und in der Abb. 7 am Beispiel von *Listeria monocytogenes* sowie Abbildung 9 am Beispiel von *Yersinia* der „zipper“-Mechanismus dar-gestellt. Beim „zipper“-Mechanismus wird aufgrund der Interaktion des bakteriellen Liganden mit dem eukaryontischen Rezeptor ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle hergestellt, wobei der Erreger umzirkelt wird. Diese Art der Aufnahme findet man z.B. bei *Yersinia* und *Listeria* (Isberg, 1990, 1991, Mengaud et al., 1996). Fumagalli zeigte in REM-Studien, dass bakterielle und eukaryontische Strukturen an der Adhärenz beteiligt sind. Hierbei konnte der Moment der Aufnahme des Bakteriums in die Epithelzelle festgehalten werden. Dabei scheint es sich um einen ähnlichen Prozess wie der Endozytose zu handeln (Fumagalli, 1997).

Salmonella und *Shigella* sind Beispiele für die „trigger“-Aufnahme. Im Gegensatz zum „zipper“-Mechanismus ist eine räumliche Distanz zwischen Bakterium und Zelle beim Aufnahmeprozess möglich. Ein bakterielles Signal führt zu einer extremen Oberflächenveränderung („membrane

ruffling“) und Zytoskelettorganisation (Adam, 1995, Finlay und Falkow, 1989, Finlay et al., 1991, Nhieu et al., 2005).

Trigger-Mechanismus

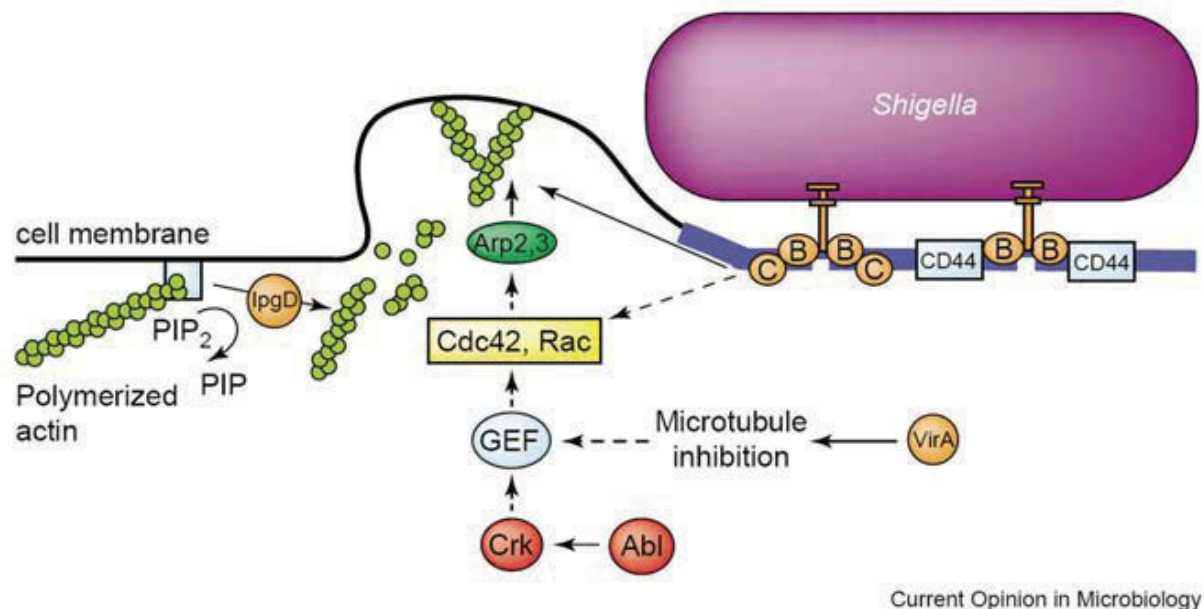


Abb.6: Die Invasion von *Shigella flexneri* wird über den Trigger-Mechanismus vermittelt. Seine Aufnahme induziert *Shigella flexneri* in die Wirtszelle über die Abgabe von Virulenzfaktoren (Typ III Sekretionssystem) in das Wirtszytoplasma s. IpaC (C) löst die Aktinpolymerisation direkt oder in einer Rho-GTPase-abhängigen Weise aus. VirA und die Abl/Arg-Kinasen vermitteln höchstwahrscheinlich die Aktivierung von GEFs für Cdc42 und Rac. IpgD hydrolysiert PIP₂ und unterstützt die *de novo* Aktinpolymerisation durch Ablösen des kortikalen Aktins von der Membran (aus Nhieu et al., 2005).

Am besten ist der Aufnahmeprozess von *Yersinia* untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass für *Yersinia*-Pseudotuberculosis und *Yersinia*-Enterocolitica das Invasin, ein chromosomal kodiertes Protein für die äußere Membran, die Anheftung und Invasion in nicht phagozytische Zellen vermittelt (s. Abb. 9). β 1-Integrine wurden als Invasionsrezeptoren identifiziert. Integrine sind Transportmembrane der Wirtszelle, die über die Aktin-Bindeproteine Talin und α -Aktinin mit dem Zytoskelett interagieren. Durch den engen Kontakt mit der Epithelzelle wird die

Bildung von Pseudopodien induziert, die den „zipper“-Mechanismus einleitet. Anschließend erfolgt der Vorgang ähnlich der klassischen Phagozytose.

Abbildung 7 zeigt diesen Vorgang auch am Beispiel von *Listeria monocytogenes*.

Zipper-Mechanismus

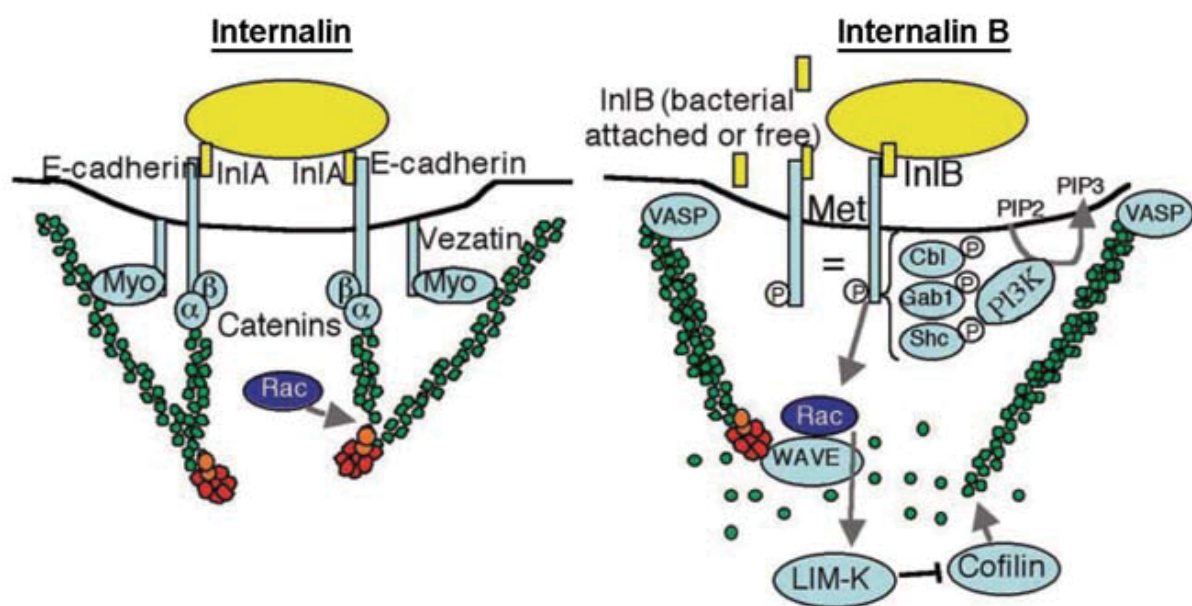
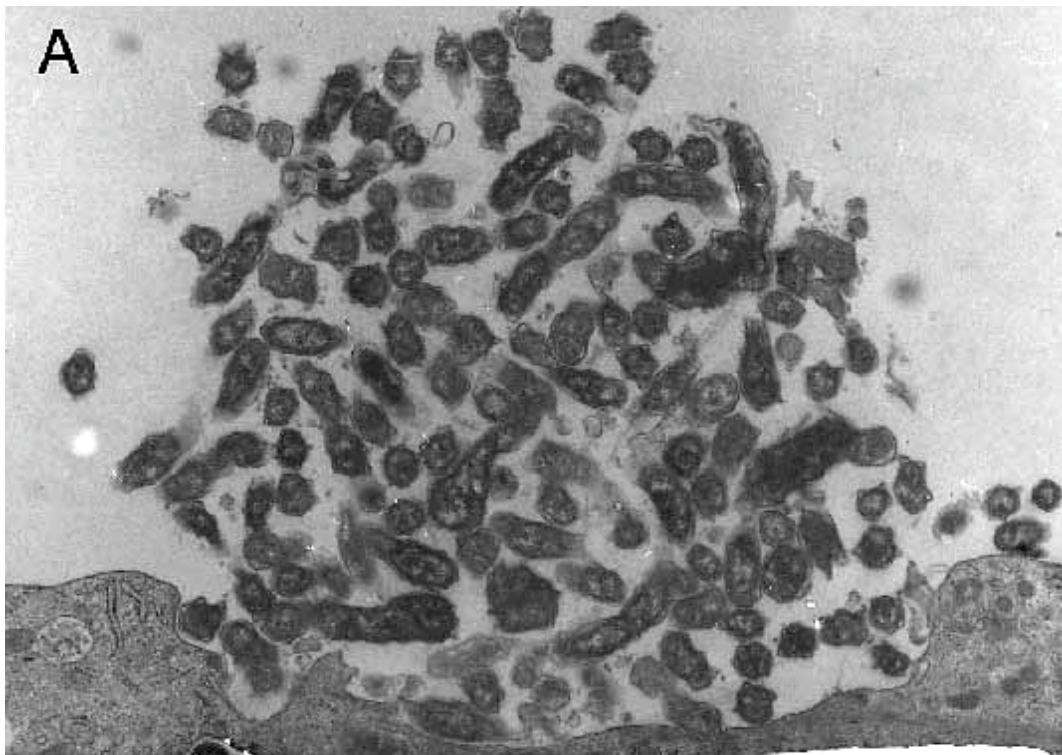


Abb.7: Die Invasion von *Listeria monocytogenes* wird über den Zipper-Mechanismus vermittelt. *Listeria monocytogenes* kann seine Invasion in nicht-phagozytotische Zellen durch zwei separate, aber kooperierende Mechanismen vermitteln. Internalin (InIA), das bakterielle Oberflächenprotein, bindet an den Zell-Rezeptor E-Cadherin. Dabei wird die Akkumulation von Proteinen, die üblicherweise bei der Bildung von zellulären Adhäsionskontakten involviert sind, induziert. Internalin B (InIB) interagiert mit der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met sowie Glucosaminoglykanen und induziert so eine Signalkaskade, die die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) auslöst und zur Aktivierung der Rho-GTPase Rac führt. Schließlich kommt es zu Aktinreorganisation an der Aufnahmestelle des Bakteriums (gelb: *Listeria* / Internaline, grün: Aktin, rot: Arp2/3-Komplex) (aus Cossart & Sansonetti, 2004).

Die Invasionsfähigkeit, die mit Invasin vermittelt wurde, ist so effektiv, dass mit Invasin überzogene Partikel von den Wirtszellen aufgenommen werden. Bei diesem Prozess wird das Aktinfilamentnetzwerk der Wirtszelle

in Anspruch genommen. Eine Zerstörung oder Beeinflussung der Mikrofilamente hätte Schwierigkeiten oder sogar das Ausbleiben der Bakterienaufnahme in die Wirtszelle zur Folge. Die Adhärenz bleibt unbeeinflusst (Tang et al., 1993).

Nach der Aufnahme befinden sich die Bakterien in einer Vakuole. In einer Arbeit von Dehio wird die Invasomen-vermittelte Invasion von Bakterien beschrieben (Dehio et al., 1997). Dieser Aufnahmeprozess wird in der Abb.8 dargestellt.



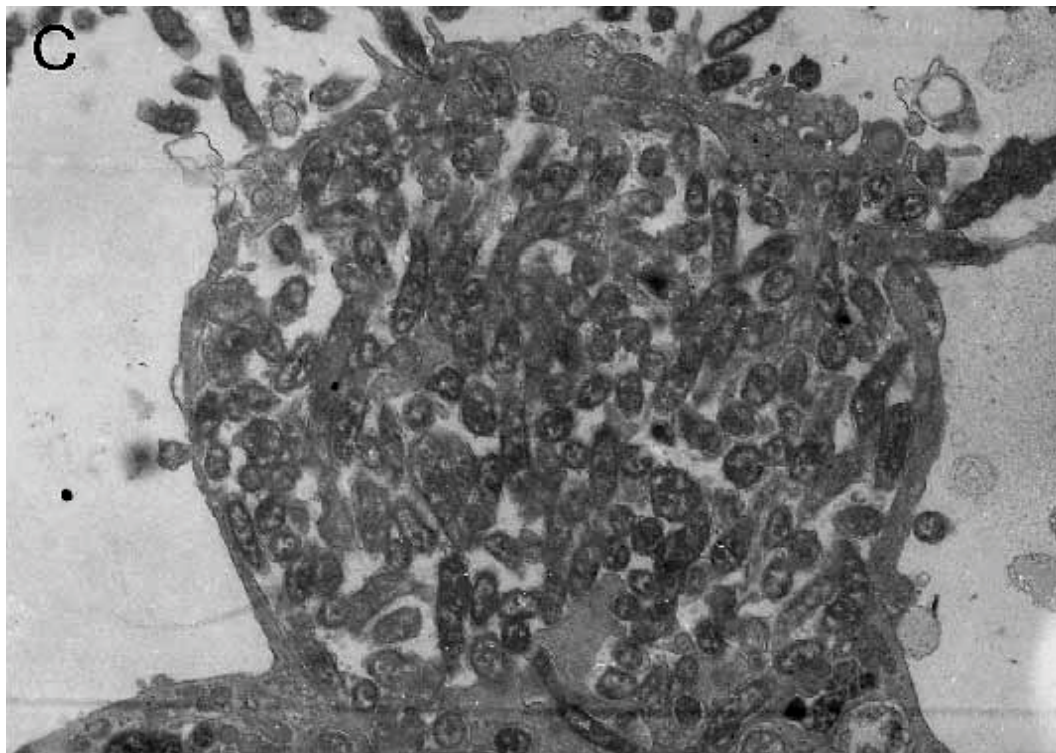
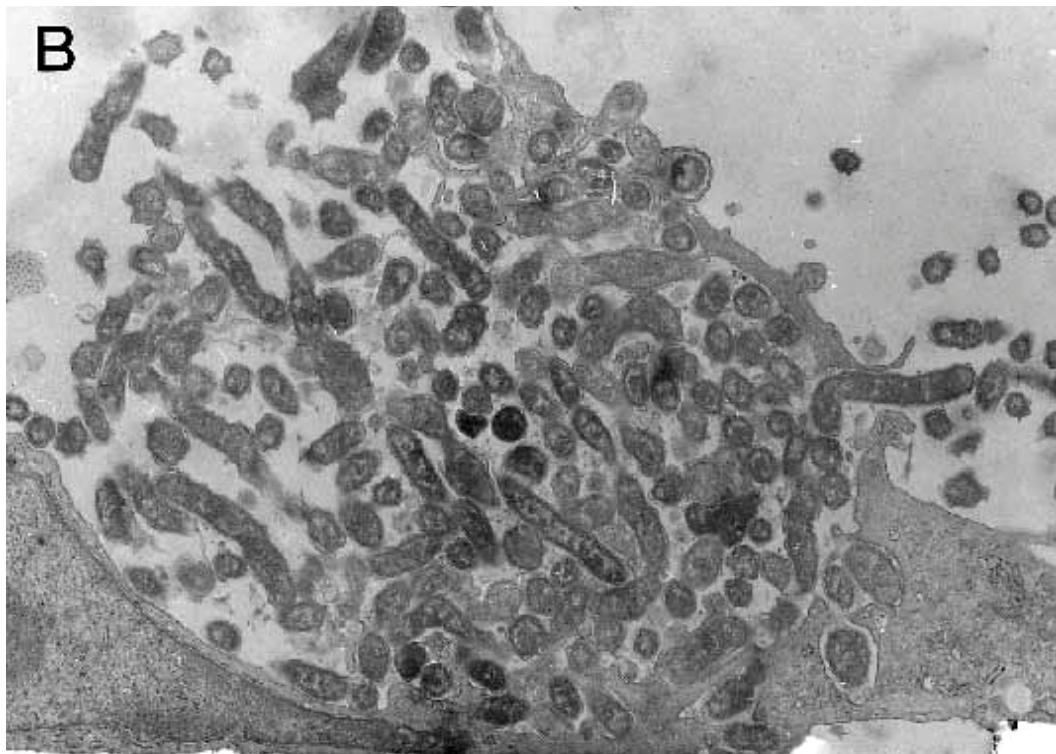


Abb.8 : Am Beispiel von *Bartonella henselae*, die Invasomen-vermittelte Invasion von Bakterien eine Wirtszelle (aus C. Dehio et al., 1997)

Die Abbildungen A bis C zeigen, dargestellt in der Transelektronenmikroskopie, ein Invasomen-vermitteltes Eindringen von Bakterien in die Wirtszelle. Die Invasion wird hier am Beispiel von *Bartonella henselae* demonstriert. Es werden sequentielle Stadien der Internalisation gezeigt. Zunächst kommt es zu einer bakteriellen Ansammlung an die Wirtszelle. Die äußere Membran der penetrierenden Zelle scheint sich vorzuwölben und direkt mit den Bakterien zu interagieren. Die Bakterienaggregate werden von der sich ausdünnenden Membran der Wirtszelle zunehmend umschlungen. Schließlich befindet sich der Erreger innerhalb der Zelle.

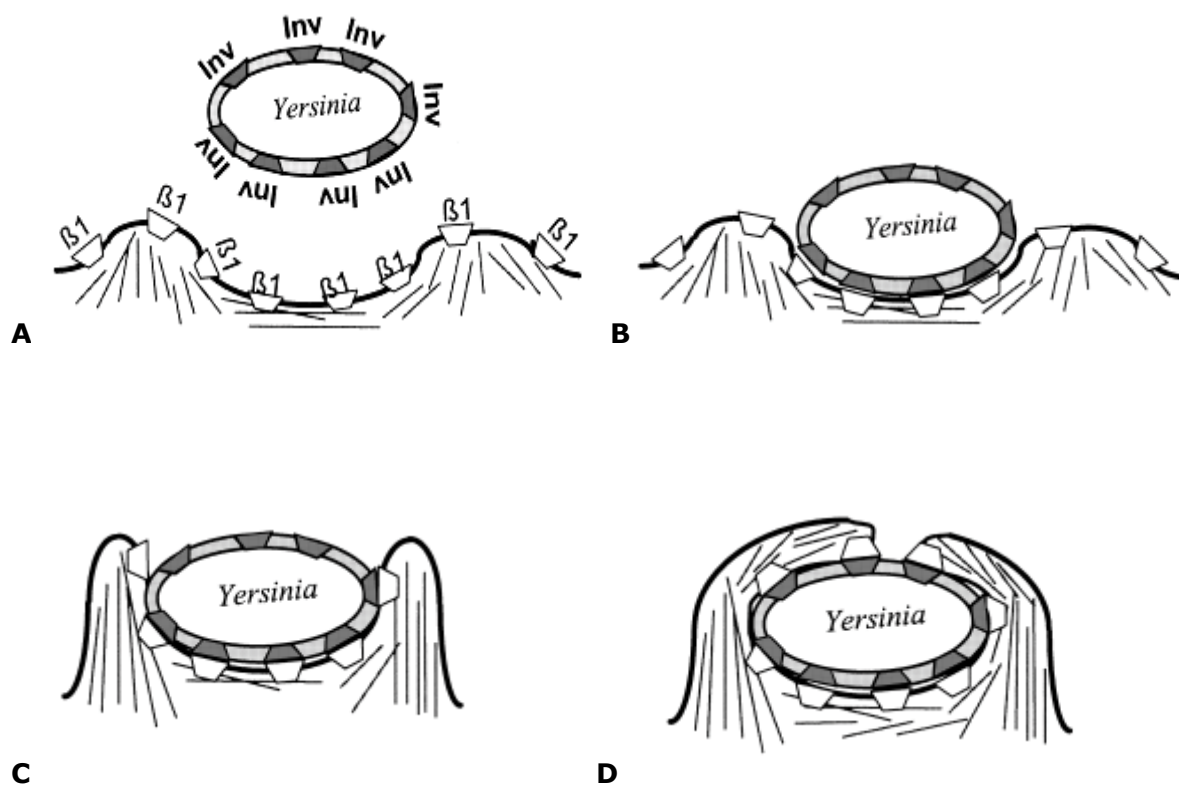


Abb.9: Zipper-Mechanismus. Schematische Darstellung der Aufnahme von Yersinien. A und B: Invasin, das Außenmembranprotein, interagiert mit den β_1 -

Integrin-Rezeptoren der Wirtszelle.

C und D: Pseudopodien umwandern das Bakterium sowie weitere Rezeptoren werden rekrutiert, bis es zur völligen Umschließung und Aufnahme kommt (aus Oelschlaeger, 2001)

1.5 Das Zytoskelettsystem

In eukaryontischen Zellen können Mikrofilamente (MF) wie auch Mikrotubuli (MT) am Internalisierungsprozess von Bakterien beteiligt sein (Finlay and Falkow, 1989 , 1997, Oelschlaeger et al., 1997, Favre-Bonte et al., 1999). Fumagalli hat in Monolayern die Effektivität von Kolchizin und Zytochalasin D belegt (Fumagalli, 1997, Favre-Bonte et al., 1999). Die Beteiligung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli am Aufnahmeprozess von *Klebsiella pneumoniae* konnte durch den Einsatz der Inhibitoren gezeigt werden. Weiterhin wurde die Notwendigkeit zur bakteriellen Internalisierung durch eine Reorganisation des Zytoskeletts belegt. Für eine Internalisierung sind intakte Mikrotubuli sowie Mikrofilamente nötig, wobei es sich um einen komplexen Aufnahmemechanismus handelt und nicht um zwei separate Aufnahmewege (Mikrofilament-abhängig und Mikrotubuli-abhängig) (Fumagalli, 1997).

1.5.1 Das Aktinfilamentsystem

In Muskelzellen führen Aktinfilamente im kontrollierten Zusammenspiel mit Myosin zu einem geordneten Kontraktionsablauf. Aktin ist mit 5% in vielen eukaryonten Zellen das häufigste Zellprotein. Der Anteil dieses Proteins in Endothelzellen beträgt 10,1% oder mehr im Vergleich zu den anderen Nicht-Muskelzellen (Drenckhahn & Ness, 1997). Die aktiv kraftauslösende Komponente ist in Verbindung mit Mikrofilamenten Myosin. In Gegenwart von Kalzium (Ca^{2+}) und Calmodulin wird nach Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosin-Proteins durch die Myosin leichten Kettenkinase die Kontraktion in Verbindung mit F-Aktin reguliert. Der Hauptanteil des filamentären Aktins findet sich in der ruhigen Endothelzelle in der Zellperipherie. Dort bildet sie in engem Kontakt zur Zellmembran ein dichtes Netzwerk („peripheral dense band“). Dieses verleiht der Zelle eine mechanische Stabilität und hält über

spezifische Bindeproteine den Kontakt zu Nachbarzellen und zu der extrazellulären Matrix aufrecht (Gottlieb et al., 1991).

1.5.2 Aufbau des Aktinfilamentsystems

Aktinfilamente (F-Aktin) setzen sich aus polymerisierten Aktinmonomeren (G-Aktin) zusammen. Sie sind mit einem Durchmesser von etwa 7 nm die dünnste filamentäre Struktur des Zytoskeletts und werden daher auch Mikrofilamente (MF) genannt. Aktinfilamente sind dynamische Strukturen, das heißt, sie befinden sich in einem permanenten Auf- und Abbauprozess. Man unterscheidet drei verschiedene Gruppen filamentären Aktins in Endothelzellen, die unterschiedliche zelluläre Aufgaben erfüllen. Das F-Aktin-Netz des Zellkortex trägt unter anderem zur mechanischen Stabilisierung der Zelle bei, welches an der Umformung der Plasmamembran beteiligt ist und die Prozesse der Endo- und Exocytose steuert. Weiterhin ist hier das F-Aktin des Adhäsionsgürtels und der Fokalkontrakte sowie das F-Aktin der Stressfasen. Die unterschiedlichen Aufgaben werden über eine große Zahl von Aktin bindender Proteine gesteuert.

Durch Polymerisation von glomerulären Aktinmolekülen (G-Aktin) entsteht das filamentäre Aktin. Die G-Aktinmoleküle liegen als Monomere im Zytoplasma vor. An jedes G-Aktinmonomer sind ein Kalzium- und ein ATP-Molekül gebunden. Diese können sich sehr schnell zusammenlagern und wieder trennen. Durch Hydrolyse von ATP zu ADP erfolgt die Anlagerung an das sogenannte „barbed“-Ende (Plus-Ende eines Aktinfilaments). Der erste Schritt zur Polymerisation ist durch Bildung eines Dimers aus zwei G-Aktinmonomeren und anschließender Verknüpfung zu einem Trimer (Nukleation) getan. Mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit verläuft die weitere Verlängerung (Elongation) zu einem Polymerfaden, der ein konstantes Polymerisationsplateau

entwickelt, sobald eine kritische Konzentration an Aktinmonomeren erreicht wird (Korn, 1982). Aktinfilamente besitzen eine strukturelle Polarität, obwohl grundsätzlich beide Enden zur Polymerisation fähig sind, besteht jeweils eine unterschiedliche Polymerisationskinetik und eine entsprechend unterschiedliche kritische Konzentration der beiden Filament-Enden. Am „barbed-end“ (Plus-Ende) polymerisieren die monomeren Aktinmoleküle schneller bei einer niedrigen G-Aktin-Konzentration als am „pointed-end“ (Minus-Ende). Unter physiologischen Voraussetzungen liegt die G-Aktin-Konzentration zwischen den kritischen Konzentrationen im Bereich der beiden Filamentenden. Diese führt am „barbed-end“ zur Polymerisation und am „pointed-end“ zur Abdissoziation.

Es herrscht ein Fließgleichgewicht, an dem in gleichem Maße Aktinmonomere an einem Ende angelagert und am anderen Ende abgespalten werden, so dass das Nettowachstum der Filamente gleich 0 ist. Man bezeichnet diesen Vorgang als „treadmilling“ (Alberts et al., 2001).

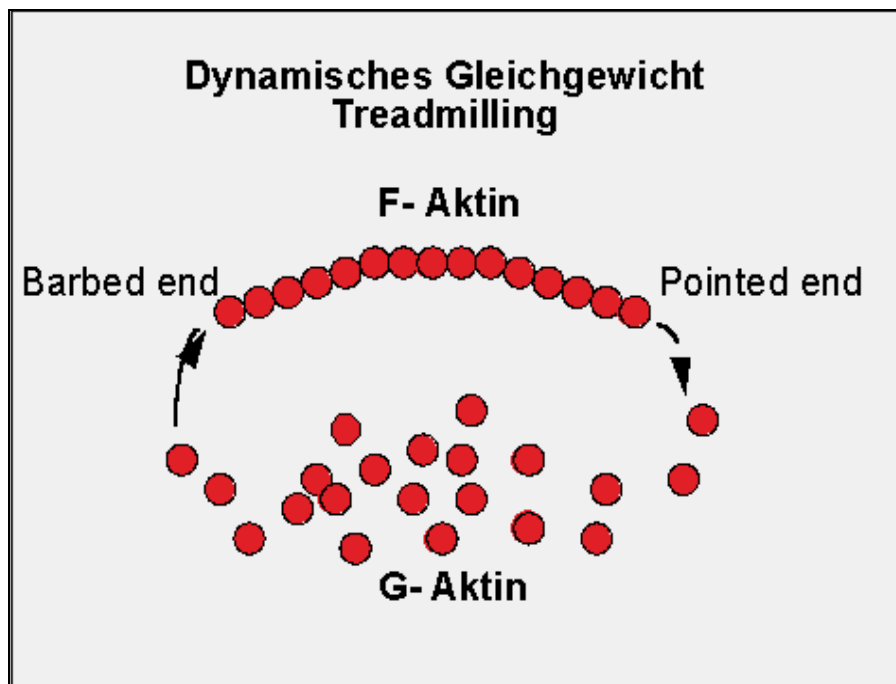


Abb.10 : F-Aktin-assoziierte Proteine (aus Mühle, 2004)

Die Modellvorstellung nach Abbildung 10 ist sehr vereinfacht, denn es gibt eine Reihe von Aktin bindender Proteine, die den dynamischen Umsatz des Aktins kontrollieren sowie über die Aktivierung und Abbruch der Aktinpolymerisation bestimmen (Alberts et al., 2001). In Untersuchungen konnten unterschiedliche spezifische Funktionen der verschiedenen F-Aktin assoziierten Proteinen zugeordnet werden. Das Protein Profilin führt durch Bindung von G-Aktinmonomeren zu einer Aktivierung der Polymerisation neuer Aktinfilamente. Sogenannte „capping“-Proteine, wie das Kalzium-abhängige Gelsolin, konnten Aktinfilamente durchtrennen und sich anschließend selektiv an das „barbed-end“ des Filamentbruchstücks binden. Eine weitere Anlagerung von G-Aktinmonomeren wurde dadurch gehemmt. Propomyosin schützt dagegen die Filamente durch Längsstabilisierung vor Fragmentierung und moduliert die Aktinmyosin-Interaktion. Weitere Proteine der Myosinfamilie dienen als molekulare Transporter oder bilden zelluläre, kontraktile Einheiten und sind vermutlich für die Bildung von intrazellulären, gelartigen Netzwerken verantwortlich (Alberts et al., 2001, Bashur et al., 1997)

1.5.3 Das Mikrotubuli-System der Zelle

1.5.3.1 Funktion des Mikrotubulus-Systems

MT sind als Komponente des dreidimensionalen zytoskelettären Netzwerkes filamentärer Strukturen am Aufbau und Erhalt der Zellform und der Zellpolarität beteiligt. Eine Hauptfunktion von MT-Systemen besteht in der Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität von Zytoskelett und Zellform. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der inneren und äußeren Organisation eukaryontischer Zellen. Innerhalb zellulärer Austauschprozesse wie Sekretion, Endozytose und Transzytose liefert dieser Filamenttyp die Basis für gezielten Transport zytoplasmatischer Bestandteile (Lodish et al., 1996). Ein stabiles, flexibles

und effektives Leit- und Transportsystem entsteht durch die langen und steifen Röhren, die sich zellkernnah in die Peripherie erstrecken. Diese werden von prädisponierten Capping-Proteinen in der Zellmembran fixiert. Entlang dieser dynamischen Schienen entehen Klassen unterschiedlicher Organellen (z.B. Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien, variierende Typen von sekretorischen Vesikeln). Mit Hilfe von Motorproteinen werden diese in anterograde oder retrograde Zielrichtungen bewegt. MT beeinflussen die Zellpolarität einer Zelle (Alberts et al., 2001, Lodish et al., 1996). Durch die Ausrichtung der Zellorganellen und die Ausspannung der Intermediärfilamente sind sie in die Veränderung bzw. Regulation der Zellform involviert.

1.5.3.2 Aufbau des Mikrotubuli-Systems

Mikrotubuli (MT) bilden zylindrische Strukturen, die sternförmig vom paranuklear lokalisierten Zentrosom (MT-Keimbildungszentrum) in die Zellperipherie ausstrahlen. Sie sind mit einem Durchmesser von 25 nm der dickste Zytoskelettäre Filamenttyp. Ein Mikrotubulus setzt sich aus 13 Protofilamenten zusammen, die jeweils aus mehreren polymerisierten Dimeren aufgebaut sind. Ein Dimer besteht aus zwei ähnlich strukturierten globulären Proteinen, dem α - und β -Tubulin. Die eukaryonte Zelle besitzt verschiedene Isoformen von α - und β -Tubulin. Im Zentrosom sind zusätzlich γ -Tubuline lokalisiert. Diese werden als Ausgangspunkt des Wachstums der mikrotubulären Filamente beschrieben. Die Protofilamente sind mit der gleichen α - β -Ausrichtung parallel aneinander gelagert. Durch diese Anordnung der Protofilamente erhält jedes Mikrotubulusfilament eine Polarität mit einem „Plus- und einem „Minus-Ende“ (Alberts et al., 2001). Während das Plus-Ende vom Zellkern in Richtung Zellmembran zeigt, weist das Minus-Ende in die entgegengesetzte Richtung und ist im Zentrosom verankert.

Unter Aggregation von globulären Tubuli-Untereinheiten bei GTP-Nukleotid-Hydrolyse erfolgt die Polymerisation am Plus-Ende von Mikrotubulusfilamenten. Ein schnelles Filamentwachstum führt zu einer „GTP-Kappe“, die wiederum eine höhere Affinität zu Tubulin-Untereinheiten besitzt als GDP. Dies wiederum führt zur beschleunigten Anlagerung weiterer Tubulinmoleküle und zum schnelleren Wachstum des Filamentes. Ein langsames Filamentwachstum hat umgekehrt den Verlust der „GTP-Kappe“ zur Folge. Aufgrund ihrer niedrigen Affinität zu Tubulus-Untereinheiten dissoziieren die GDP-Tubuline leichter vom Mikrotubulusfilament ab. Mit der „GDP-Kappe“ verliert das Mikrotubulusende schneller die Untereinheiten. Dies hat wiederum zur Folge, dass eine beschleunigte D-Polymerisation mit einem rasanten Zerfall der Mikrotubulusfasern zustande kommt. Man bezeichnet diese charakteristische Mikrotubuluskinetik als „dynamische Instabilität“ (Lodish et al., 1996, MacRae, 1992). Der schnelle Zerfall bzw. stetige Wachstum bewirkt, dass die Ausrichtung der vom Zentrosom aus wachsenden Mikrotubuli-Systeme in der Zelle sich ständig ändern können. Der rasche Abbau eines wachsenden Mikrotubulus kann durch das schnell wachsende Plus-Ende des Filamentes durch „capping“-Proteine fixiert werden. An der Zellmembran kann z.B. durch die Verknüpfung des Mikrotubulusfilamentendes eine Fixierung und Stabilisierung des Mikrotubulussystems bewegt werden. Eine Art selektive Auswahl von Mikrotubuli kann auf diese Weise von bestimmten Zellstrukturen, z.B. der „capping“-Proteine der Zellmembran, erfolgen.

Durch die Lageänderung von Mikrotubuli innerhalb der Zelle wird die Ausrichtung von Zellorganellen neu strukturiert und die Zellpolarität verändert (Alberts et al., 2001). Dieser Vorgang ist bei intrazellulären, polarisierten Prozessen essentiell. Besondere Bedeutung hat dieser Vorgang bei gerichteten Zellbewegungen, Aufstellung der methodischen Spindel oder der Ausrichtung von Zellkernen zum Antigen (Alberts et al., 2001, Fukata et al., 2002).

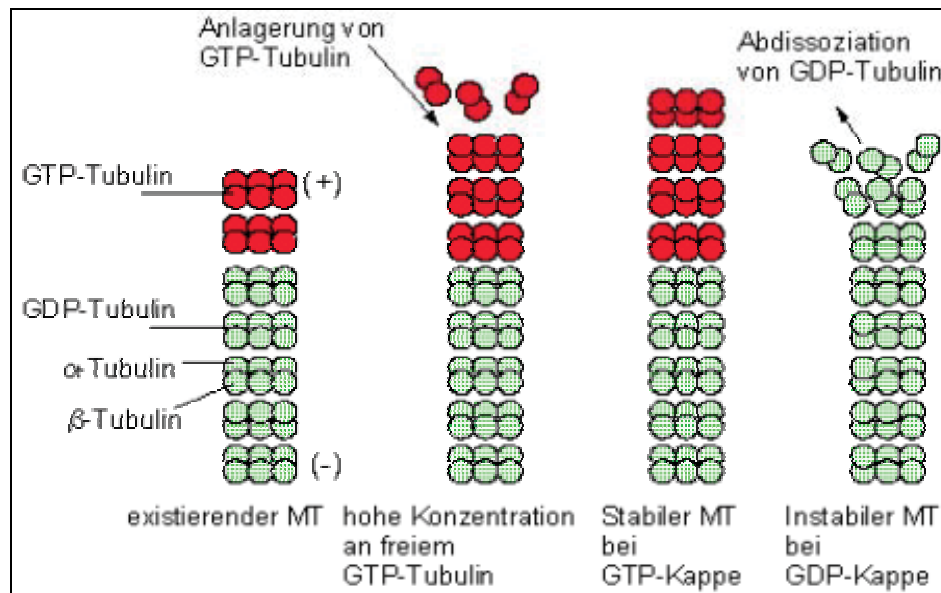


Abb. 11: Schematische Darstellung der Polymerisation und der Depolymerisation von MT-Systemen (aus Mühle, 2004)

An die Plus-Enden existierender MT lagern sich GTP-gebundene Tubulin-Dimere an. Nach dem Einbau erfolgt die GTP-Hydrolyse zu GDP. MT, die eine GTP-Kappe tragen, sind stabiler und können weitere GTP-Tubuline anlagern. Instabil sind die MT, die eine GDP-Kappe tragen. Diese können rasch depolymerisiert werden (Fukata et al., 2002).

1.5.3.3 Mikrotubulus-assoziierte Proteine

Eine Vielzahl von MT-assoziierten Proteinen (MaP) tragen zur Ausbildung und Organisation der Mikrotubuli-Struktur in der Zelle bei (Alberts et al., 2001, Lodish et al., 1996). Die MaP regulieren den Transport Membran-gebundener Vesikel in antero- oder retrograder Richtung über die als Leitschienen fungierenden MT-Filamente. MaP sind weiterhin an der Verbindung von Mikrotubuli und Zytoplasmatischen Organellen beteiligt. Die Proteine injizieren Tubulin-Polymerisation und stabilisieren das MT-System. Es konnte gezeigt werden, dass MaP bei der mikrotubulären Verbindung mit Intermediärfilamenten und Mikrofilamenten beteiligt sind

und zur Ausbildung der dynamischen dreidimensionalen Form des Zytoskeletts beitragen. Es werden zwei Hauptgruppen von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen unterschieden, auf der einen Seite die strukturellen und auf der anderen Seite die dynamischen MaP. Die Hochmolekularproteine MaP 1 und MaP 2 und die niedermolekularen Tauproteine zählen zu den strukturellen MaP, die zur Polymerisation von Tubulinmolekülen und zur Stabilisierung des Mikrotubulus-Systems beitragen (Alberts et al., 2001). Zu den dynamischen MaP-Familien gehören die Motorproteingruppe Kinesine und Dyneine. Diese binden spezifisch an MT und werden als „Carrier“ bezeichnet. Ihre wesentliche Aufgabe besteht im Zytoplasmatischen Membranverkehr, Endo- und Exocytose und der Organellen-Ausrichtung. Die Entdeckung von Kinesin und Dynein als dynamische Mikrotubulus-assoziierte Proteine führte erstmalig zu der Hypothese, dass Motorproteine Zellkomponente entlang der Mikrotubuli bewegen können (Alberts et al., 2001). Die Studien zeigten, dass Kinesin Membran-gebundene Vesikel in Richtung der Zellmembran (Plus-Ende der Mikrotubulusstränge) und Dynein in die entgegengesetzte Richtung zum Minus-Ende fördern (Lodish et al., 1996). Für die Aktivierung der Motorproteine Kinesin und Dynein wurden in anderen Arbeiten weitere Proteine gefunden, die Membran-gebundene Komponente entlang der Mikrotubuli bewegen.

1.5.4 Interaktion von Mikrotubulus und Aktinfilamentsystem

Die isolierte Analyse von Einzelsubstanzen reicht für die Verständigung der Funktion des Zytoskeletts in Zellen und Geweben nicht aus. Man muss vielmehr das globale Verständnis in ihrer gegenseitigen Verknüpfung betrachten. Auf der Basis von inneren Zugspannungen und Druckkräften bilden MT und MF die Komponente einer ausbalancierten, „höheren“ molekularen Architektur (Ingber, 1993). Die MT-Interaktion mit Intermediärfilamenten und mit Mikrofilamenten ist seit längerer Zeit bekannt. Trotz ihrer unterschiedlichen Grundfunktionen und

unterschiedlichen molekularen Zusammensetzung sowie der differierenden zellulären Lokalisation scheinen die zytoskelettären Systeme miteinander verbunden zu sein und zu kooperieren. MT-assoziierte Proteine können mit Aktinfilamenten Verbindungen eingehen, Brücken aufbauen und Aktinfilamente bündeln. In in vitro Versuchen konnten Interaktionen von MaP und Aktinfilamenten durch Phosphorylierung der MaP reguliert werden. Griffith und Pollard belegten 1978 biochemisch die Interaktionen zwischen Mikrotubulus- und Aktinfilamentsystemen (Griffith & Pollard, 1978, 1982). Sie zeigten, dass Mixturen von gereinigten Aktin- und Mikrotubulusfilamenten eine höhere Viskosität aufwiesen als die individuellen Komponenten. Die Feststellung, dass Mixturen von MaP, Aktin- und MT-Filamenten gelartige Netzwerke bilden, führte zu der Vermutung, dass MaP mindestens zwei Bindungsregionen, eine Mikrotubulus- und eine Aktin-Domäne, aufweisen sollen, die räumlich getrennt auf dem Molekül lokalisiert sein müssen (Sattillaro, 1986). Auch innerhalb des intrazellulären Membranverkehrs sind Interaktionen zwischen MT und MF beschrieben worden. Beide Systeme verfügen über Motorproteine, die den Membrantransport entlang der Filamente regulieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass membranöse Vesikel sowohl über MT- als auch über Aktin-Filamente gesteuert werden. Dieses setzt voraus, dass eine gemeinsame Leitschiene mit gemeinsamen Aktin-, Myosin- und MT-Motorproteinen (Dynein, Kinesin) auf der Vesikeloberfläche existiert (Goldstein, 1992). Auch im Bereich der Zell/Zell- und Zell/Matrix-Verbindungen gibt es filamentäre Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen MT und MF.

Inwieweit direkte MT-MF-Verknüpfungen in Zell/Zell- und Zell/Matrix-Verbindungen zur Aufrechterhaltung von Adhäsionsverbindungen und Barrierefunktion bestehen, ist derzeit noch nicht klar. Von Rinnerthaler beschreibt eine Ko-Lokalisation zwischen MT und Stressfasern im Bereich fokaler Kontakte in Fibroblasten (Rinnerthaler et al., 1988).

1.5.4.1 In-vitro Versuche

Es lassen sich verschiedene Inhibitoren von Mikrofilamenten und Mikrotubuli einsetzen, um die spezifische Interaktion von *Klebsiella pneumoniae* mit den Zytoskelettkomponenten zu untersuchen (Fumagalli, 1997). Zytochalasin D hemmt die Mikrofilament-Polymerisierung der Epithelzellen (Cooper, 1987). Dies sollte nur Einfluss auf die Invasions-, aber nicht auf die Adhärenzraten haben. Wenn die Wirtszellen mit Zytochalasin D vorbehandelt werden, werden die Internalisierungsraten drastisch bei Klebsiellen-Stämmen inhibiert. Auch beim Kontrollstamm *Salmonella typhimurium* C17 tritt eine erwartete Inhibition ein (Finlay and Falkow, 1988, Meier et al., 1996). Bei keinem Stamm wird dabei die Adhärenz reduziert, es kommt im Gegenteil zu einer Steigerung der Aufnahme. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass durch die Inhibition des Internalisierungsmechanismus Bakterien an der Oberfläche der Wirtszelle haften bleiben, die sonst internalisiert worden wären. Es lässt sich somit eine Invasion in die humane Epithelzelle nachweisen. Am Aufnahmeprozess können bei einigen fakultativ intrazellulären Bakterien auch Mikrotubuli beteiligt sein. In Analogie zum Inhibitionsversuch mit Zytochalasin D wird der Inhibitor der MT-Polymeration, Kolchizin, auf die Mikrotubuli entscheidenden Einfluss nehmen. In Experimenten mit Zelllinien konnte ein solcher Effekt lediglich auf die Invasion, nicht aber auf die Adhärenz nachgewiesen werden. Dies wurde für das *Klebsiella pneumoniae*-Isolat 3091 in den Arbeiten von Oelschlaeger gezeigt (Oelschlaeger, 1997). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass bei *Klebsiella*-Isolaten die Invasionsrate drastisch reduziert wird, bei *Salmonella typhimurium* C17 aber nicht. Dies war damit zu erklären, dass die Invasion bei *Salmonella* strikt Mikrofilament-abhängig war. Auf Adhärenzraten hatte Kolchizin keinen Einfluss (Fumagalli, 1997).

Als Bestandteil des eukaryontischen Rezeptors an der Invasion von Bakterien in die Wirtszelle schien N-Glucosamin (GlcNac) beteiligt zu sein,

was in Inhibitionsversuchen von Fumagalli nachgewiesen wurde. Die Invasionsfähigkeit verringerte sich durch die Behandlung der Bakterien mit GlcNac. Die *Klebsiella pneumoniae*-Isolate wurden mit GlcNac vorinkubiert, dies führte zu einer signifikanten Minderung der Invasion.

Weitere Kohlenhydrate wurden untersucht, um den spezifischen, inhibitorischen Effekt von N-Glucosamin zu belegen, insbesondere solche Zucker, die in Glycoproteinen oder -lipiden eukaryontischer Membranen vorkommen, wie Glucose, Galaktose, Fucose und NANA.

Einen deutlich inhibitorischen Effekt zeigte nur Chitinhydrolysat, welches aus GlcNac-Monomeren besteht (Fumagalli, 1997).

1.5.5 Toxine, die in die Regulation des Mikrotubuli-Systems eingreifen

Für die Regulation des MT-Systems kann man Spindelgifte einsetzen. Diese Substanzen hemmen die MT-Synthese und führen zu einer Störung der Spindelbildung in der Mitose. Unter anderem gehören zu dieser Gruppe Kolchizin, die Finkeralkaloide und Paclitaxel. Kolchizin wird seit Jahrhunderten als antiinflammatorisches Medikament verwendet. Sie ist ein aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) gewonnenes Alkaloid. Der Haupteffekt dieser Substanz besteht in der Hemmung der Mikrotubulus-Synthese. Durch eine spezifische Bindung an Tubulin („site-specific-binding“) wird die Polymerisation zu Multimeren verhindert. Die Depolymerisation bleibt unbeeinflusst, was zu einem verstärkten Mikrotubulusabbau führt (Alberts et al., 2001). Kolchizin wird therapeutisch in niedriger Dosierung zur prophylaktischen und in höherer Dosierung zur therapeutischen Behandlung des akuten Gichtanfalls eingesetzt. Wahrscheinlich kommt es zur Hemmung der Leukozytenbeweglichkeit und zu einer Hemmung der Phagozytose von

Urat. Neuere Studien zeigen eine Intervention der Substanz auch in die Neutrophilen-Endothel-Interaktion (Cronstein et al., 1995)

1.5.6 Toxine, die in die Regulation des Mikrofilamentsystems eingreifen

Verschiedene Toxine und Substanzen zeigen teils direkte (z.B. Zytochalasin D, *Clostridium difficile*, teils indirekte Wirkung (*Staphylococcus aureus* α -Toxin, H_2O_2) auf das Zytoskelett. Der Pilzmetabolit Zytochalasin D gehört zu der Gruppe der Zytochalasine. Er wurde mit Erfolg zur Erforschung des Mikrofilamentsystems eingesetzt. Die Zytochalasin-Moleküle binden mit hoher Affinität an das „barbed-end“ der Aktinfilamente und hemmen somit die Polymerisation wie auch die D-Polymerisation des Proteins. Zytochalasin D kann am entgegengesetzten „pointed-end“ nicht binden. Weiterhin führt Zytochalasin D reversibel zu einer passiven Zellretraktion und Zerteilung von Mikrofilamenten in kürzere Abschnitte (Brenner et Korn, 1980).

In Studien führten alle Substanzen zu einer signifikanten Barrierestörung der Zelle (Mühle, 2004).

1.5.7 Einfluss von N-Acetylglucosamin auf die Infektion der *Klebsiella*

Fumagalli et al. konnten zeigen, dass eine Präinkubation der Bakterien mit 100 mmol GlcNac bei allen *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten eine Beeinträchtigung der Invasion von 35-62% verursachte. Beim Kontrollstamm *Salmonella* wurde weder die Invasions- noch die Adhärenzrate durch GlcNac reduziert. Bei *Klebsiella* blieb die Fähigkeit zur Adhärenz erhalten, während nur die Internalisierungseffizienz beeinträchtigt wurde (Fumagalli et al., 1998).

1.6 *Escherichia coli*

E.coli ist ein gram-negativer, stäbchenförmiger und fakultativ anaerober Keim und kolonisiert physiologischerweise das Intestinaltrakt. *E.coli* ist durch eine nicht obligatorische Begeißelung beweglich. Er wächst auf einfachen Nährmedien, Glukose und Laktose werden dabei gespalten. *E.coli* kann als fakultativ pathogener Erreger intestinale wie auch extraintestinale Infektionen verursachen. Die intestinalen pathogenen *E.coli* Stämme unterscheiden sich durch ihre Virulenzeigenschaften sowie durch das verursachte klinische Bild in folgende Stämme: *Enterotoxische E.coli* Stämme (ETEC), *enteropathogene E.coli* (EPEC), *enteroinvasive E.coli* (EIEC), *enterohämorrhagische E.coli* Stämme (EHEC) und *enteroadhärente E.coli* (EAEC) (Ullmann, 1994). Außerhalb des Gastrointestinaltraktes verursachen *E.coli* Stämme häufig Harnwegsinfektionen (Hultgren et al., 1985). Weiterhin sind *E.coli* Stämme verantwortlich für Gallenblasen- und Gallengangsentzündungen, die Appendizitis, Peritonitis, Wundinfektionen, Septitiden und die Neugeborenen-/Säuglingsmeningitis. *E.coli* lässt sich mit Hilfe von vier Antigenstrukturen einteilen. Diese sind die somatischen (O-) Antigene, Kapsel- (K-) Antigene, Geißel- (H-) Antigene und Fimbrien- (F-) Antigene (Meier et al., 1996). *E.coli* Varianten, die hauptsächlich das K-Antigen K2 exprimieren, verursachen häufig die Sepsis und die Neugeborenenmeningitis (Scott & Kaper, 1994, Schmidt, H. et al.1994).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Prüfung der Anwendbarkeit der dreischichtigen Chorioallantoismembran der Hühnerembryonen als in-vivo Modell für Invasion- b.zw. Adhäsionsversuche durch Austestung von Bakterienstämmen in einem in vivo Kontext. Dabei sollte ein System etabliert werden, welches sich enger an in vivo Bedingungen orientiert als Zelllinien und zudem kostengünstiger und einfacher in der Handhabung im Vergleich zu Tierversuchen ist. In dieser Arbeit wird das Hühnerembryonenmodell in der sogenannten „natural-air-sac-technique“ (NAST) beschrieben. Mit dieser Methode ist es möglich, sequentielle Extraktionen aus dem Allantoisraum (AR) unterhalb der CAM vom lebenden Embryo vorzunehmen. Diese Technik hat das Ziel, eine möglichst genaue Vergleichbarkeit der Invasionsfähigkeit und Pathogenität verschiedener Bakterienstämme zu ermöglichen, indem Kinetik von bakterieller Invasion erstellt werden kann.

Bislang wurde die Invasivität von *Klebsiella pneumoniae* an Zellkultur-Systemen beschrieben und vorgenommen (Fumagalli, 1997, 1998, Favre-Bonte et al., 1999).

Um Unterschiede in der Pathogenität und Invasionsfähigkeit herauszuarbeiten, wurden in Anlehnung an die Studie von Fumagalli identische Bakterienstämme verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Eigenschaften der verschiedenen Stämme im Voraus nicht bekannt waren, das gleiche gilt auch für das Bakterium *E.coli* DH5α. Fumagalli konnte zeigen, dass bei der Verwendung von Inhibitoren an Zellkulturen die Invasivität der Bakterienstämme deutlich reduziert wird. Dies sollte in gleicher Weise in einem in vivo Modell untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Die Lagerung

Es werden befruchtete Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ in spezifisch keimfreier Qualität von einem lokalen Anbieter (Horst Geflügel, Leverkusen) bezogen. Ein ausreichend hoher Fertilitätsdurchschnitt von 80-90 % wird garantiert. In einer Charge befinden sich zwischen 100 und 150 Eier. Aus versuchstechnischen und räumlichen Gründen können nicht alle Eier zeitgleich präpariert werden. Etwa die Hälfte wird zunächst in einem handelsüblichen Kühlschrank bei + 4°C gelagert. Dabei ist zu beachten, dass die Lagerung 14 Tage nicht überschreitet, da sich danach die Eier nicht mehr bebrüten lassen, und so die ganze Charge unbrauchbar wird.

2.2 Die Bebrütung

Die Eier werden in longitudinaler Position mit dem spitz zulaufenden Ende nach unten in einem Brutschrank (Motorbrüter 126/ EM, Bruja, Hammelburg, Deutschland) bei 37 Grad Celsius und einer relativen Luftfeuchtigkeit von circa 60% bei atmosphärischem Druck inkubiert.

Eine eingebaute Drehmechanik ermöglicht eine zur physiologischen Entwicklung der Embryonen kontinuierliche Seitenverlagerung der Eier (12x120°/d). Der elfte Tag der Inkubation, Stadium 37 nach Übereinstimmung mit Hamburger und Hamilton (Hamburger & Hamilton, 1951), ist der Tag der Präparation. Die Eier werden mit Hilfe einer speziellen Leuchte, der Schierlampe, auf Befruchtung und adäquate Entwicklung untersucht. Alle nicht befruchteten Eier und toten Embryonen werden ausgesondert. Wenn der Durchschnitt nicht brauchbarer Eier, verursacht durch äußere Umstände wie mangelhafte Brutqualität oder extreme klimatische Verhältnisse, beispielsweise zu hohe

Umgebungstemperatur, über 25 % liegt, wird das gesamte Kollektiv in den Versuchen nicht verwendet.

2.3 Die Präparation

Die Präparation der Eier beginnt am 11. Bebrütungstag, da zu diesem Zeitpunkt die CAM technisch relativ einfach präpariert werden kann und vor allen Dingen die Entwicklung des dreidimensionalen Gefüges der Membran abgeschlossen ist. Von diesem Moment an wird die CAM dreischichtig.

Der während der Inkubationszeit entstehende Luftraum an der stumpfen Seite der Eier lässt sich nach Durchleuchtung mittels Schierlampe mit einem Bleistift markieren. Dieser Bereich wird anschließend mit 70%igen Ethanol zur Desinfektion abgewischt.

Nun trennt man mit einem konventionellen Zahnarztbohrer mit Rundschleifblatt die Schale zirkulär von der stumpfen Seite oberhalb der unteren Luftgrenze vom übrigen Ei (s. Abb. 12).

Um einen freien Blick auf die innere Eischale zu erhalten, gilt es, vorsichtig das abgeschliffene Schalenstück zu entfernen, ohne dass die innere Eihaut oder die darunter befindliche Chorioallantoismembran rupturieren. Mit Hilfe von 2-3 Tropfen PBS-Pufferlösung (ph 7,3, Serag Wiessner, Naila, Deutschland), die durch Schwenken des Eies über die gesamte innere Eihaut verteilt wird, gelingt es, die CAM transparent und die in ihr verlaufenden Gefäße sichtbar zu machen. Das Innere des Eies kann zur weiteren Präparation mit Hilfe der Aufsichtlampe ausgeleuchtet werden (s. Abb. 13).

An einer peripher gelegenen gefäßarmen Stelle wird die innere Eihaut mit einer G1-Kanüle „angeritzt“, so dass ein zipfelförmiges Segment in die Höhe ragt. Dieses Segment wird mit einer hinreichend spitzen Pinzette gefasst, woraufhin die gesamte Eihaut von der CAM abgezogen werden kann (s. Abb. 14).

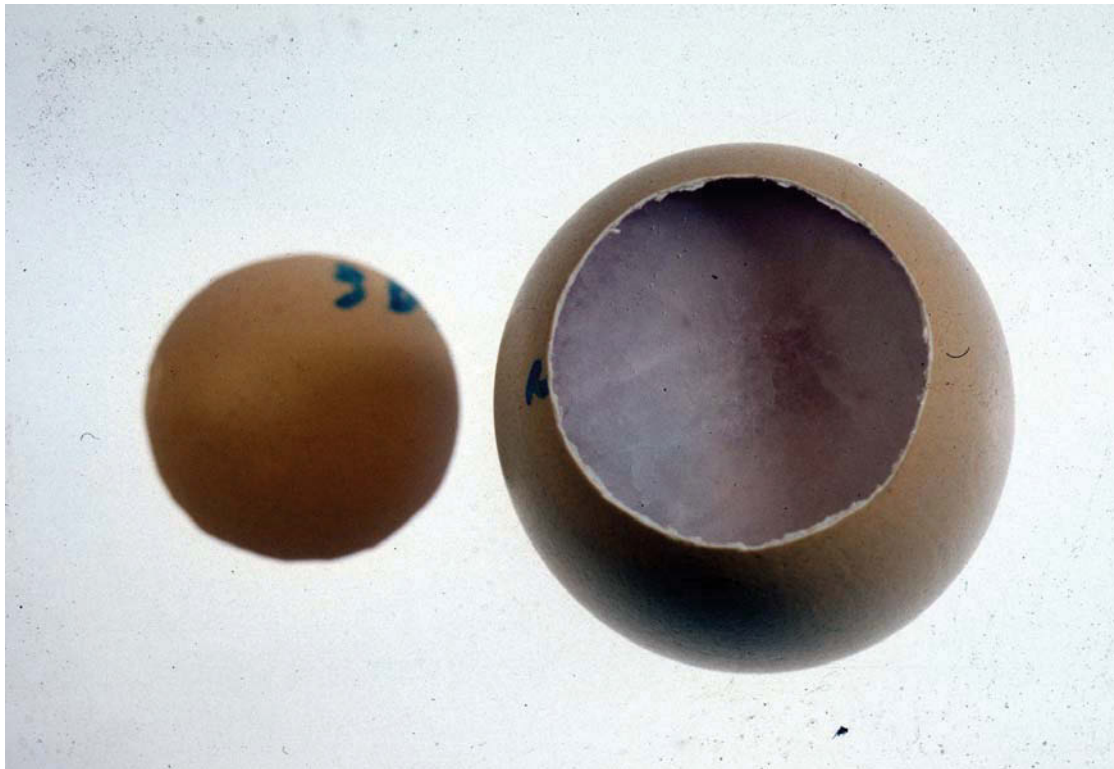


Abb. 12 : Blick auf die innere Eihaut nach Entfernen der Eierschale

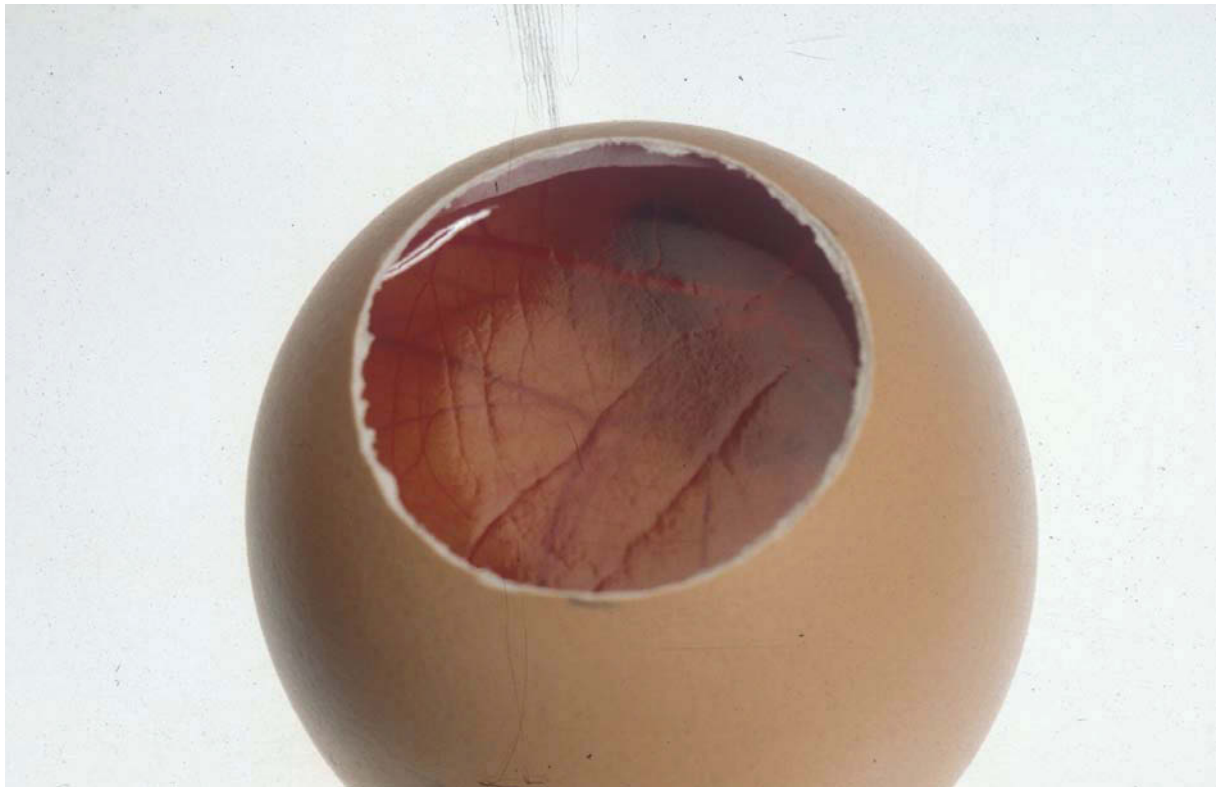


Abb. 13: Sicht auf die innere Eihaut nach Auftragen und Aspiration von 2-3 Tropfen PBS-Pufferlösung

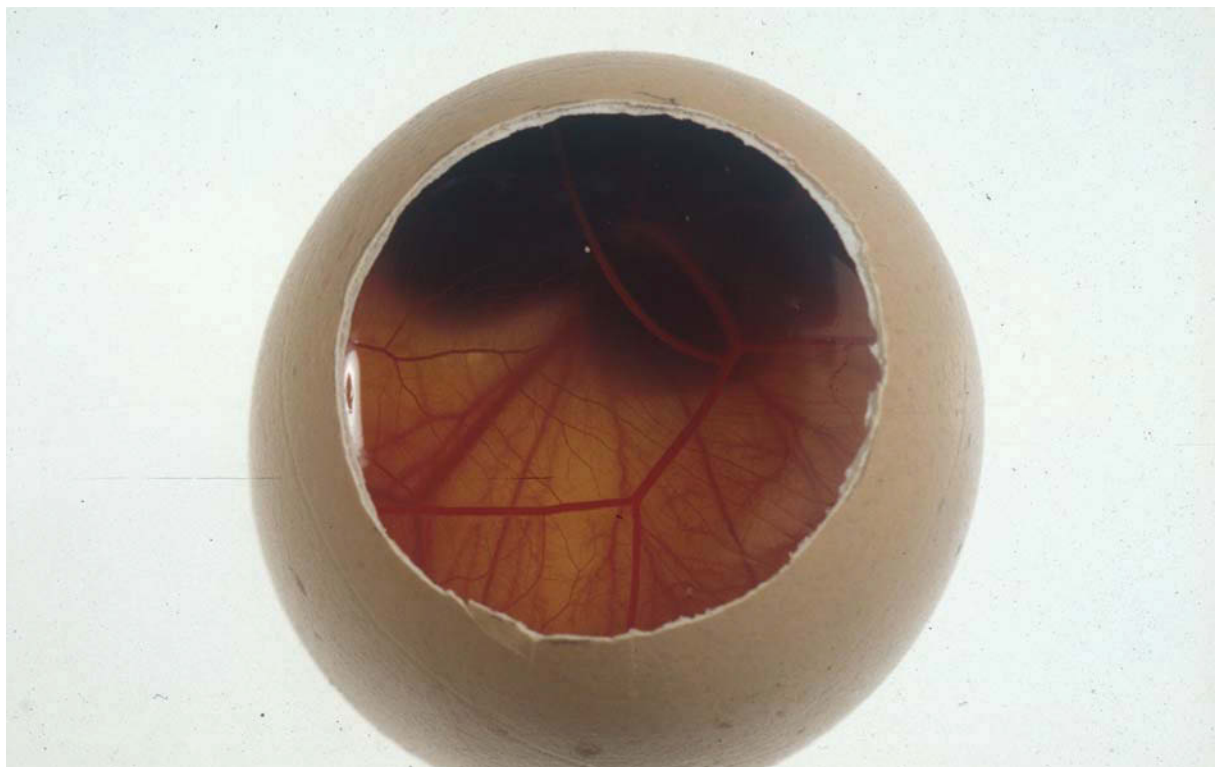


Abb. 14: Blick auf die frei präparierte CAM mit dem typischen Verlauf der Gefäße

2.3.1 Platzierung der Kanüle zur Probenentnahme

Der nächste Schritt stellt die atraumatische Platzierung einer Kanüle unterhalb der CAM dar. Ist die CAM transparent, so lässt sich unter Sichtkontrolle eine Hohnadel zwischen Membran, Dottersack und Embryo innerhalb des Allantoisraums verschieben.

Ein Zugangsweg wird von außen an der Schale mit einem Bleistift strichförmig markiert. Die bereits durch das abgeschliffene Schalenstück vorhandene Öffnung wird an der stumpfen Seite des Eies mit einer elastischen Plastikfolie (Parafilm-M, "American National Can", London, England) überdeckt, damit durch den folgenden Bohrvorgang an der besagten bleistiftmarkierten Stelle keinerlei Schalenstaub auf die CAM fällt. Die bleistiftmarkierte Stelle wird mit einem rotierenden Schleifblatt behandelt. Durch die leicht angebohrte äußere Schalenwand kann bei intakt gebliebener innerer Eihaut eine 0,5 x 16 mm große Kanüle in das Innere des Eies in die unterhalb der CAM befindlichen Allantoisflüssigkeit eingeführt werden.

Der äußere Defekt wird mit erhitztem und somit verflüssigtem Paraffin (Paraffin-Blockform, Firma Merck, Deutschland) abgedichtet und die Kanüle nach optimaler Platzierung der Kanülenspitze innerhalb der Allantoisflüssigkeit ohne Kontakt zur CAM und Amnionhöhle des Embryos mit angewärmter Knetmasse (Fun Clay, Northhampton, England) an der Außenwand fixiert (s. Abb. 15)

Zur Verhinderung von Zelltraumata dürfen weder der in der Nähe befindliche Dottersack noch die lokalen Gefäße tangiert werden. Die Kanüle wird nach außen hin mit einem Verschluss abgedichtet. Um die Embryonen vor dem Austrocknen zu bewahren, überspannt man den eröffneten stumpfen Bereich des Eies mit einem breiten Tesafilmstreifen. Zur Verhinderung zu starker Auskühlung werden die Eier anschließend in den Brutschrank zurückgestellt (s. Abb.16).

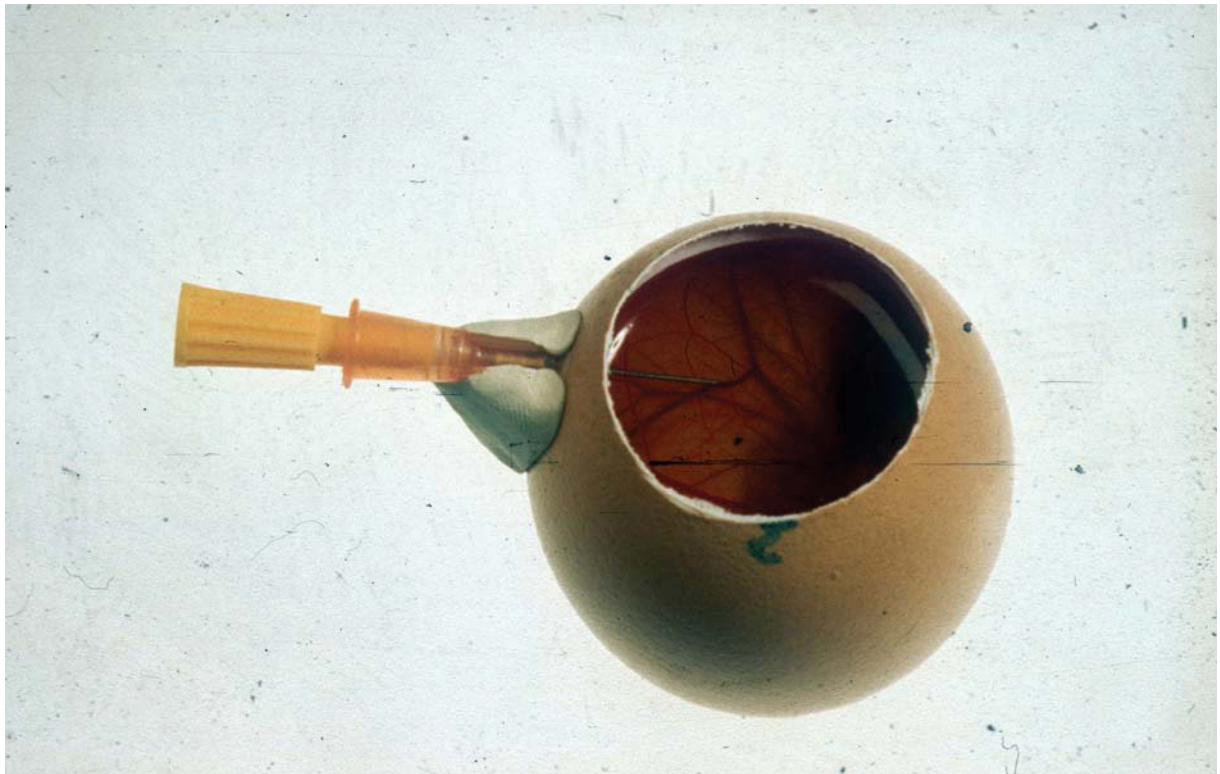


Abb. 15: In der Allantoisflüssigkeit platzierte Kanüle

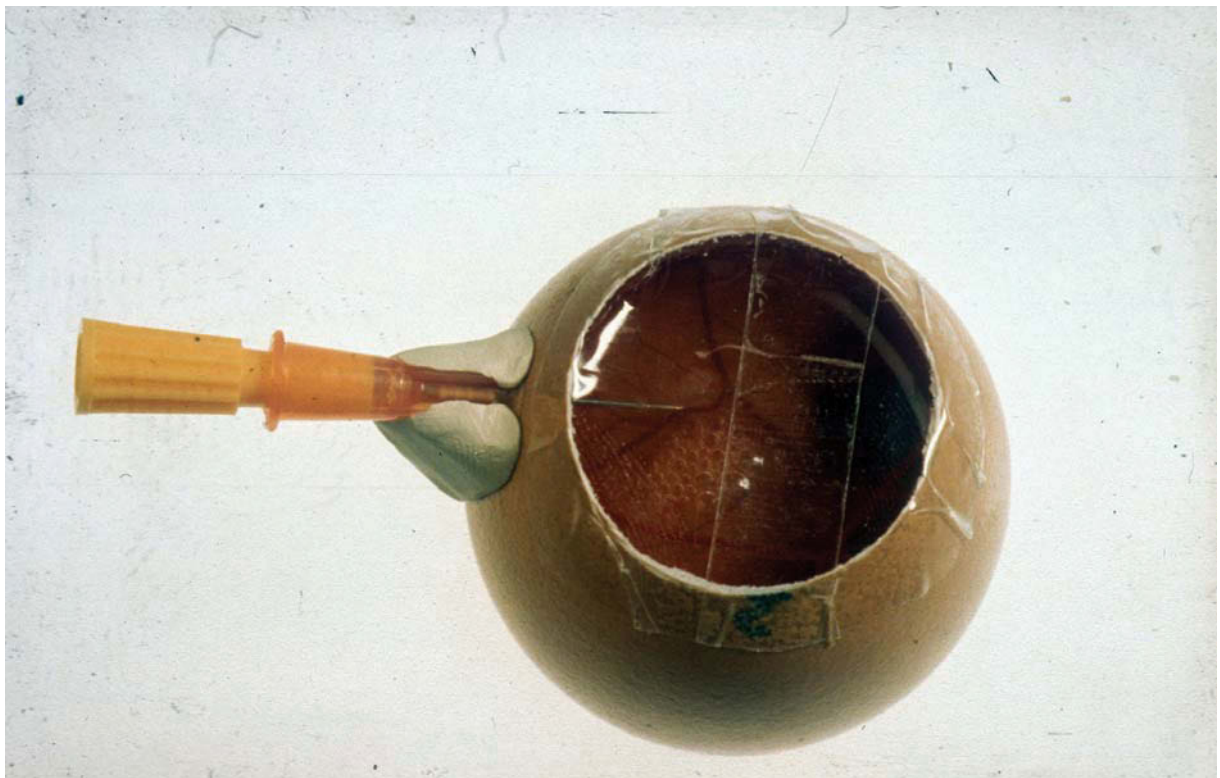


Abb. 16: Abkleben der eröffneten Fläche zur Vorbereitung für die Versuchsreihe

2.4 Ergebnisse der CAM nach Präparation

2.4.1 Integritätstest mit inerten Testsubstanzen

Um die während der Präparation der CAM eventuell entstandenen Mikroläsionen näher beurteilen zu können, werden mehrere Permeabilitätsprüfungen durchgeführt.

2.4.1.1 Trypanblau

Nach einer 24-stündigen Rekonstitutionszeit der CAM wird Trypanblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), ein niedermolekularer Farbstoff, der nicht von lebenden Zellen aufgenommen wird, auf die in der „natural-air-sac“ Technik exponierte CAM aufgetragen. Danach wird die Allantoisflüssigkeit nach zwei, sechs und zwölf Stunden extrahiert und photometrisch bei 575 nm gegen extrahierte AF aus Eiern ohne Trypanblau-Einwirkung gemessen.

Parallel dazu werden in entsprechender Weise Experimente mit dem roten Farbstoff Eosin durchgeführt. Eosin (Gibco, Eggenstein, Deutschland) wird aus Steinkohleteer gewonnen und kann zum Färben von Textilien und Papier verwendet werden. die Medizin und Biologie sind Hauptanwendungsgebiete. Hier wird der Farbstoff häufig in Form von Eosin-Methylenblau für die Färbung von Blutaussstriche gebraucht.

2.4.1.2 Latexpartikel

Latexpartikel beschichtet mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und einem Durchmesser von 6 µm (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) werden auf die CAM aufgebracht. Man extrahiert die gesamte Allantoisflüssigkeit (AF) aus dem Ei, um eine mögliche Penetration durch die Membranschichten zu

bestimmen. 30 Stunden nach Inokulation untersucht man dies unter einem Fluoreszenzmikroskop.

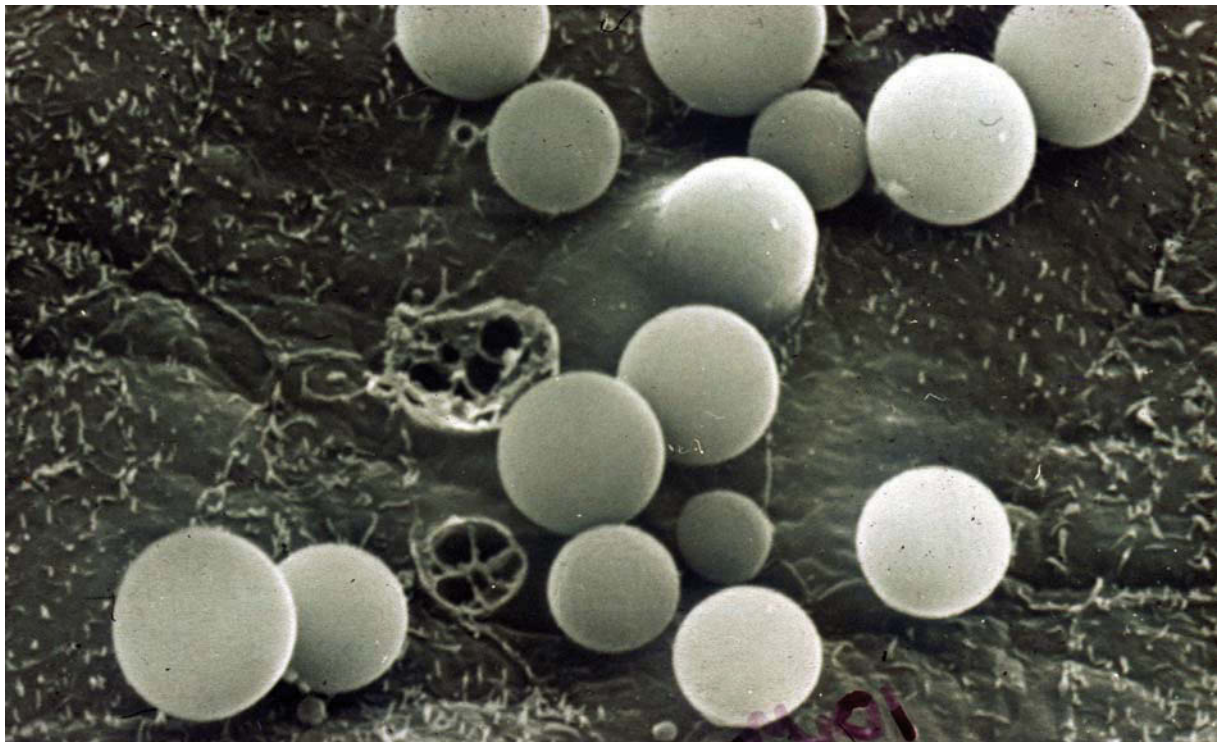


Abb. 17: CAM mit inoculierten Latexpartikel, REM-Aufnahme. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Schroten)

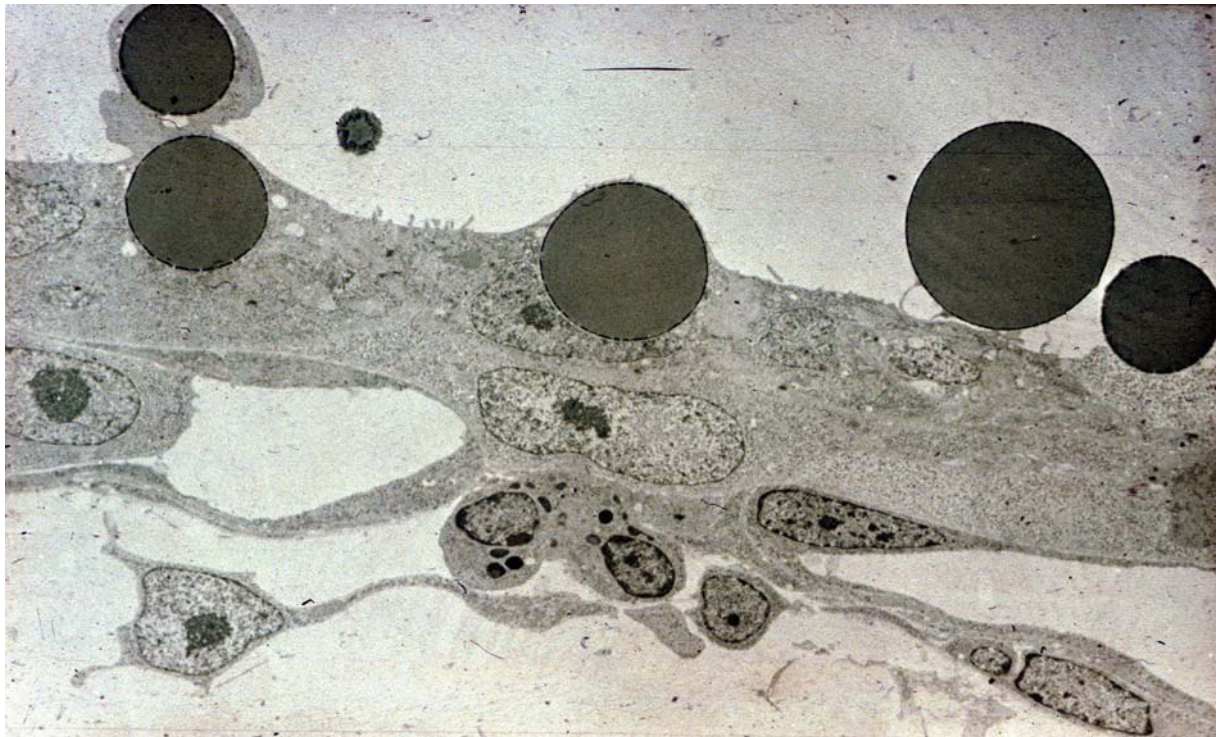


Abb. 18: Internalisierung der Latexpartikel vom Epithel, TEM-Aufnahme. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Schroten)

2.4.2 Bakteriologische Kontrollen der CAM-Integrität

In jedem bakteriologischen Experiment werden zwei Stunden nach Inokulation der Mikroorganismen 20 µl der AF auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Dieses Verfahren dient der Detektion möglicher Schäden an der Chorioallantoismembran, die insbesondere im Rahmen des Präparationsvorganges entstehen können. Der Nachweis einer extrem frühen Durchwanderung der Bakterien durch die CAM wird als ein solcher unspezifischer Schaden gewertet und nicht spezifischen Penetrationsmechanismen zugesprochen.

Wenn solche frühen positiven Bakterienkulturen auffallen, werden diese betroffenen Eier mit der offensichtlich technisch bedingt beschädigten CAM aus den Versuchen herausgenommen.

Wir führten außerdem TEM-Aufnahmen zur Untersuchung der Adhäsion und Invasion der Bakterien durch. Die zu untersuchende Membran wird wie im Abschnitt 2.3 beschrieben, präpariert. Das Präparat darf für die anschließende Bearbeitung kein Wasser enthalten. Das zu untersuchende Gewebe wird durch 4%-iges Glutaraldehyd (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Es erfolgen eine Entwässerung durch Aceton und eine Einbettung in Harz. Für die Herstellung von Ultradünnschichten werden besondere Mikrotome benötigt. Die optimale Schichtdicke der Dünnschnitte liegt bei 60-70 nm. Die Schnitte werden auf kleine Kupferringe aufgelegt, die mit einer besonderen, hauchdünnen Folie bezogen sind. Um die Elektronenbeugung und damit den Kontrast zu verstärken, werden Schwermetallionen an die Schnitte gebunden. Sie binden an bestimmte Molekülarten in den Schnitten, die dann im elektronenmikroskopischen Bild deutlich dunkler erscheinen. Diese werden über eine im Elektronenmikroskop eingebaute Kamera erfasst.

2.5 Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme *K. pneumoniae* 3091 und IA 565 wurden von der Abteilung für bakterielle Immunologie, „Department of Bacterial Immunology, Walter Reed Institute of Research“ in Washington, D. C., USA zur Verfügung gestellt. Der Stamm 3091 ist das klinische Isolat eines Patienten mit Harnwegsinfektion. Der Stamm IA 565, der ursprünglich von der University of Iowa Hospitals and Clinics Special Microbiology Laboratory kam, wurde ebenfalls aus infizierten Urogenitalwegen isoliert. Auch die anderen *Klebsiella pneumoniae* Stämme, wie 375, 625, 706 und 747 sind klinische Isolate von Patienten mit Infektionen der harnableitenden Wege, die uns von Herrn Dr. Tobias Oelschlaeger, AOR, aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Bakterienstämme wurden entweder von Dauerkathetern oder von Kulturen aus Nierenpunktionen gewonnen.

Alle Stämme wurden bereits in vitro an Zelllinien in Hinblick auf ihre Invasivität untersucht. Die in den Invasionsstudien verwendeten Zellen wurden ursprünglich aus der menschlichen Harnblase (T24) und aus dem menschlichen Ileocoecum (HCT8) isoliert (Fumagalli et al., 1997, Oelschlaeger, 1997).

Bakterielle Charakteristika und ihr Potential zur Wirtszelleninvasion blieben unserer Studiengruppe bis zum Ende der Arbeit unbekannt.

E.coli mit bekannter schwacher Invasionsfähigkeit wird in den Versuchen als Negativkontrolle verwendet. Die Tabelle 1 zeigt einige Charakteristika der genannten Bakterien.

Spezies	Stamm	Charakteristika	Herkunft
<i>K.pneumoniae</i>	3091	Harntrakt-Isolat, K16, fimA ⁺ , mrkA ⁻ , mrkD ⁻	Walter Reed Institute of Research, Washington, D.C., USA, (Oelschlaeger, 1997)
<i>K.pneumoniae</i>	IA565	Harntrakt-Isolat, fimA ⁺ , mrkA ⁺ , mrkD ⁺	Allen, 1991
<i>K.pneumoniae</i>	375	Nierenpunktat-Isolat, K26, fimA ⁺ , mrkA ⁻ , mrkD ⁻	Institut für Hygiene und Med.Mikrobiologie, Universität Würzburg
<i>K.pneumoniae</i>	625	Patient mit Dauerkatheter, K16, fimA ⁺ , mrkA ⁻ , mrkD ⁻	Institut für Hygiene und Med.Mikrobiologie, Universität Würzburg
<i>K.pneumoniae</i>	706	Nierenpunktat-Isolat, unbekapselt, fimA ⁺ , mrkA ⁻ , mrkD ⁻	Institut für Hygiene und Med.Mikrobiologie, Universität Würzburg
<i>K.pneumoniae</i>	747	Patient mit Dauerkatheter, bekapselt, fimA ⁺ , mrkA ⁺ , mrkD ⁻	Institut für Hygiene und Med.Mikrobiologie, Universität Würzburg
<i>E.coli</i>	DH5a	K-12, F ⁻ , endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, (argF-lac), U1691-, 80d/lacZΔM15	Bethesda Research Laboratories, 1986

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

2.5.1 Bakterienkultivierung und Keimzahlbestimmung

Die gefrorene Stammkultur der verschiedenen Bakterienstämme und -arten wird bis zur Verwendung im Experiment bei -70°C gelagert.

40 µl der aufgetauten Stammkultur werden dann in 5 ml LB-Medium (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) überführt und für 24 Stunden bei 37°C in einem Schüttelbad inkubiert. Dann werden 40 µl dieser Übernachtskultur in 2 ml frischem LB-Medium resuspendiert und für weitere 2 Stunden bei 37°C im Schüttelbad gelassen.

Diese Bakteriensuspension wird am Photometer mit LB-Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm auf eine Extinktion von 0,05 bei *Klebsiella pneumoniae* und von 0,1 bei *E.coli* eingestellt. Durch Ausplattieren von mehreren seriellen 1:10 Dilutionen überprüft man die eingestellten Konzentrationen.

Um Invasions- und Mortalitätskinetiken erstellen zu können, gilt es eine optimale Bakteriendosis zu finden. Dazu werden die 1:10 Dilutionen erstellt und letztendlich in Konzentrationen von 4×10^6 – 2×10^7 /100µl bis 4×10^1 – 2×10^2 /100µl eingesetzt.

Die Verdünnungsreihen werden allesamt mit dem *Klebsiella pneumoniae* Stamm 3091 durchgeführt. Parallel dazu erfolgen jeweils zwei Versuche mit *E.coli*.

2.5.2 Die Inokulation der CAM

Es werden 100 µl der oben beschriebenen Bakteriensuspension möglichst zentral auf die Chorioallantoismembran aufgetragen.

Zu festgesetzten Zeitpunkten nach der Inokulation (2h, 14h, 24h und 42h) werden jeweils 20 µl der unterhalb der CAM befindlichen AF durch Aspiration über die in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen, in typischer Lokalisation befindlichen Kanüle extrahiert und auf Agarplatten kultiviert, um bakterielle Penetration bis in die AF nachzuweisen (Abb. 19).

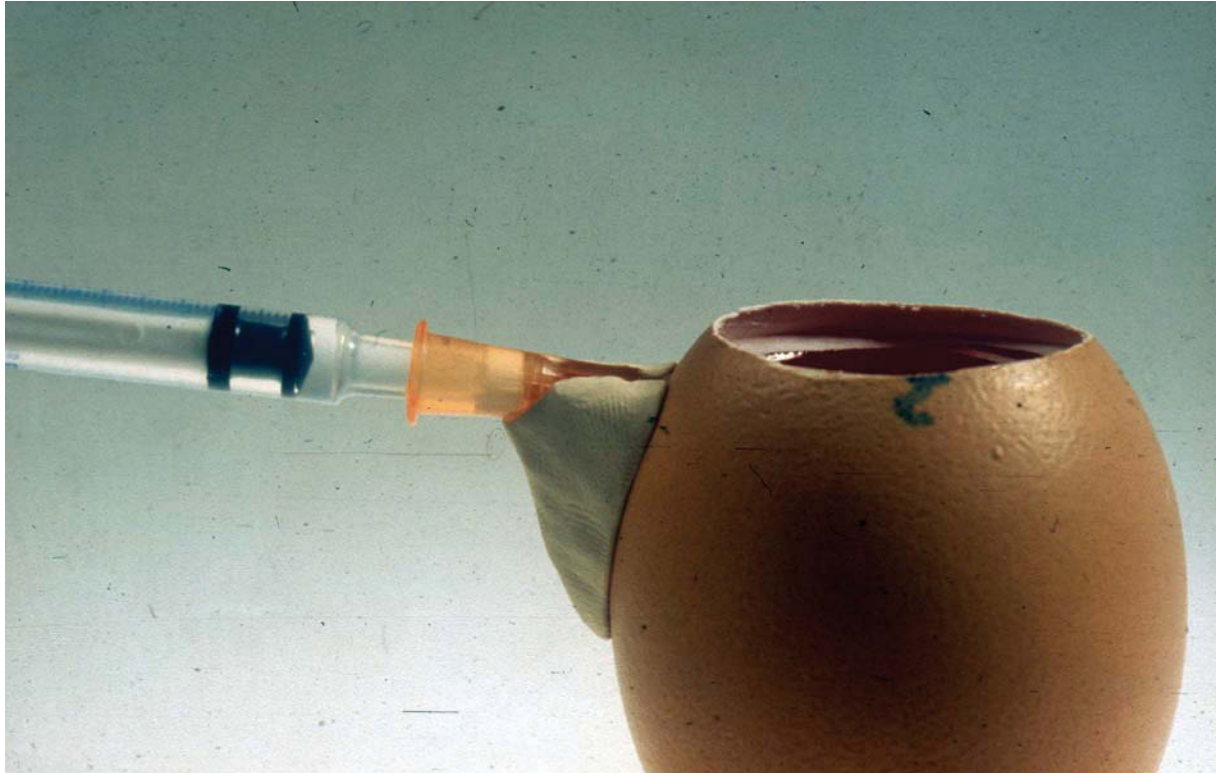


Abb. 19: Aspiration von Allantoisflüssigkeit (AF)

Die Kulturen werden als positiv bewertet, sobald man Bakterienkolonien zählen kann. Zur Bestimmung eines relevanten Zeitfensters werden nach Inokulation der Eier mit dem *Klebsiella pneumoniae* Stamm 3091 gehäuft Extraktionen aus der Allantoisflüssigkeit vorgenommen. Das Ziel ist es herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt eine Penetration der CAM stattfindet.

2.5.2.1 Simultane mono- und ditope Inokulation mit *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli*

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli* bei simultaner, monotoper Anbringung einen Anstieg der Penetrationsrate des niedrig invasiven *E.coli* zur Folge hat oder nicht. Dieser permissive Effekt ist bereits bei *Shigella* und *Salmonella* beschrieben worden (Galan, 1999; Sansonetti, 2000).

Das inokulierte Volumen wird verringert, damit bei der Applikation der sonst eingesetzten Menge von 100 µl die beiden verschiedenen Bakterien-suspensionen nicht ineinander laufen und so das Ergebnis der ditopen Inokulation verfälschen könnten. Das Volumen wird auch wegen der Vergleichbarkeit auf 100 µl begrenzt.

Im Gegensatz zur monotopen Inokulation mit einem Keim werden bei Versuchen mit gleichzeitiger Beimpfung der Eier mit *K. pneumoniae* und *E.coli* nur die Hälfte des bisher verwendeten Volumens bei dennoch identischer Bakterienkonzentration benötigt.

Die Bakteriensuspensionen wurden zunächst wie beschrieben hergestellt. Der Unterschied liegt in einer 10-minütigen Zentrifugation der Suspension bei einer Temperatur von 4°C mit 4000 Umdrehungen pro Minute.

Der nach dieser Zeit erreichte Überstand wird abgekippt und durch die Hälfte des Volumens mit frischem LB-Medium ersetzt. Auf diese Weise werden Bakterienmengen in der beschriebenen Konzentration von 4×10^6 bis $2 \times 10^7/50\mu\text{l}$ erstellt.

Bei simultaner monotoper Lokalisation platziert man jeweils 50 µl Bakteriensuspension *E.coli* und *Klebsiella pneumoniae* auf das gleiche Areal der CAM. Bei ditoper Platzierung werden die gleichen Volumina getrennt an peripherer Stelle auf die Membran gebracht (Abb. 20 und Abb. 21).

Die simultane Inokulation mit *K. pneumoniae* und *E.coli* ditop und monotop auf die Chorionallantoismembran hat den Nachteil, dass die Auswertung gleichzeitig wachsender dichter Kolonien auf den Agarplatten schwierig wird. Aus diesem Grund werden antibiotikahaltige Selektivplatten verwendet. *Klebsiella pneumoniae* Stämme sind resistent gegenüber Ampicillin und sensibel auf Streptomycin, bei *E.coli* ist es umgekehrt. Durch Kultivierung der Keime auf entsprechende Medien ist somit eine Differenzierung problemlos möglich. *K. pneumoniae* wachsen auf ampicillinhaltigen und *E.coli* auf streptomycinhaltigen Agarplatten.

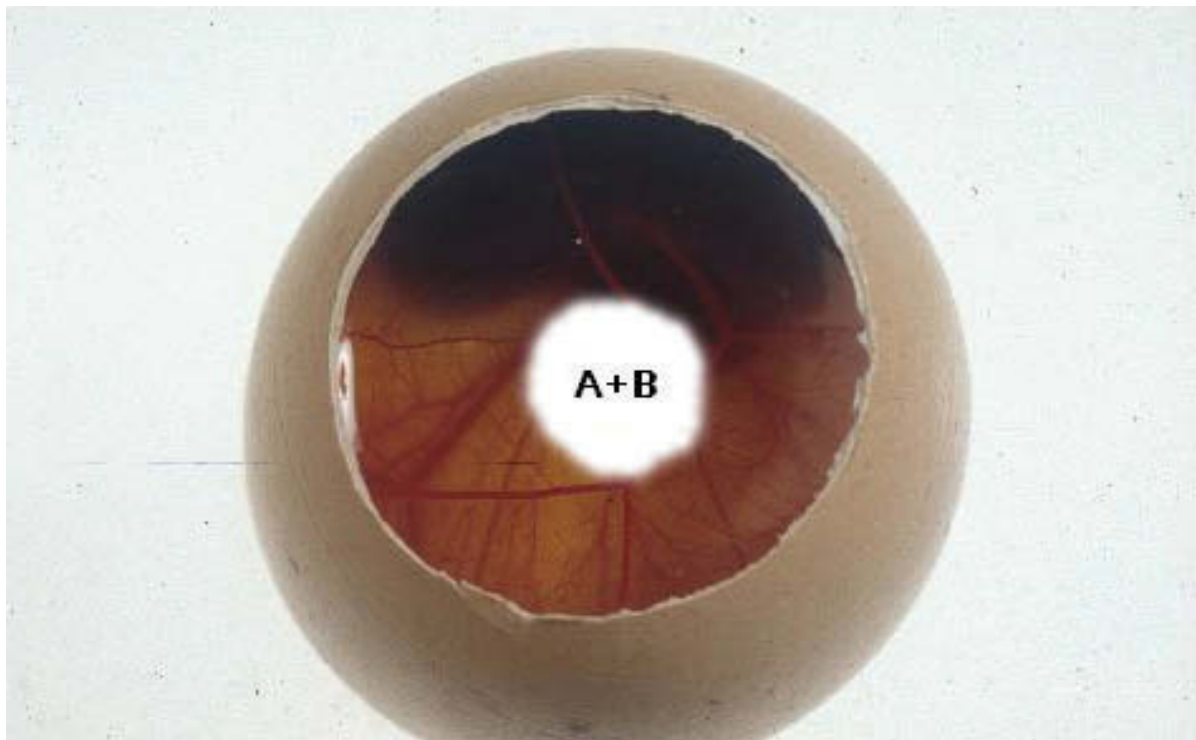


Abb. 20: Simultane monotope Inokulation mit *K. pneumoniae* und *E.coli* (A+ B).

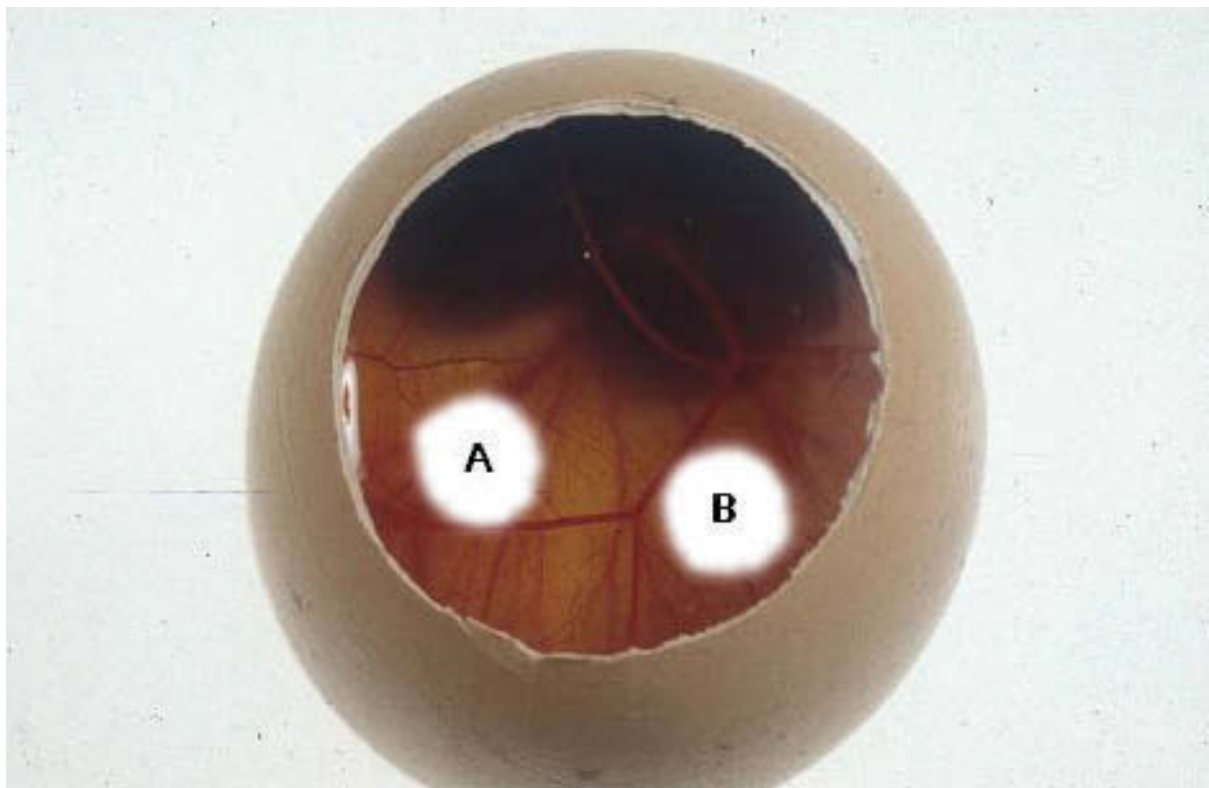


Abb. 21 : Simultane ditope Inokulation mit A= *K. pneumoniae* und B= *E.coli*.

2.6 Inokulation in Anwesenheit von Inhibitoren des Wirtszytoskeletts

2.6.1.1 Inhibitoren

Die Chorioallantoismembran wird mit entsprechendem Inhibitor des Zytoskeletts bei 37°C inokuliert. Während des gesamten Versuchs sind die Inhibitoren präsent. Der Versuch wird wie ein Standard-Assay weitergeführt. Hierbei wird geachtet, dass der Bakterientiter im Inokulum sowie das Volumen des Inokulums vergleichbar bleiben. Der Bakterientiter wird durch geeignetes Verdünnen so bestimmt, dass dieser sich in den Ansätzen mit oder ohne Inhibitoren nicht unterscheidet.

Im Kontrollversuch wird der Inhibitor in der eingesetzten Konzentration ohne Bakterienzusatz auf die CAM gebracht, um die Lebensfähigkeit der Hühnerembryonen zu überprüfen.

Inhibitor	Wirkung	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Zytochalasin D	Depolymerisierung der Mikrofilamente	2mM (1mg/ ml) in DMSO	2µM (1ml)
Kolchizin	Depolymerisierung der Mikrotubuli	1mM (4mg/ml) in 70% EtOH	10µM (10µl)

Tab. 2: Verwendete Inhibitoren

2.6.1.2 Invasionsassay in Anwesenheit von Chitinhydrolysat

Die Arbeitskonzentration beträgt 0,6 mg/100 µl. Die Bakterienkultur wird nach der photometrischen Einstellung (*Klebsiella*-Stämme OD von 0,5) zentrifugiert.

Es werden 4 ml Bakteriensuspension für 10 min. mit 4500 U/min. zentrifugiert. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatur der Zentrifuge etwa 0 °C beträgt, damit ein Wachstum der Bakterienkultur verhindert wird. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und der Rest mit LB auf 2 ml aufgefüllt. Chitinhydrolysat wird 1:2,5 mit LB verdünnt. Aus dieser Verdünnung werden 2ml entnommen und mit 2ml zentrifugierter Bakteriensuspension für 1h auf Eis vorinkubiert. Danach wird der Versuch wie ein Standardassay fortgeführt.

Im gleichen Ansatz wird im Kontrollexperiment die Lebensfähigkeit der Hühnerembryonen überprüft.

2.6.1.3 Mortalität

Der zu verschiedenen Zeitpunkten eingetretene, durch die inokulierten Bakterien verursachte Tod der Embryonen wird mit der beschriebenen Durchleuchtungstechnik (Schierlampe) beurteilt. Mortalitätskriterien sind das Fehlen spontaner Bewegungen des Embryos, der Mangel an von außen sichtbaren Blutgefäßen, atypische Wendung des Embryos bei Drehungen des Eies und Trübung der Eierflüssigkeit.

2.6.2 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests und des Wilcoxon Tests (zweiseitig) mit Bonferroni-Holm Adjustierung vorgenommen (Herr Dr. Willers, Institut für Medizinische Informatik, Universität Düsseldorf).

3. Ergebnisse

3.1 Bebrütung

Ein Verlust von 5-10% initial bebrüteter Hühnerembryonen muss durchschnittlich während der Inkubationsperiode in Kauf genommen werden. Es ist zu beachten, dass die Mortalität der Embryonen von keiner saisonalen Veränderung abhängig ist. In Abhängigkeit von klimatischen Bedingungen ist allerdings die Fertilität beeinträchtigt. So kommt es in heißen Sommertagen zeitweise zu einem Ausschluss ganzer Eierchargen. Die Lagerung der Eier darf bei 4°C in einem konventionellen Kühlschrank maximal 14 Tage betragen, eine Überschreitung der Zeit ist nicht erlaubt. Werden diese Bedingungen nicht eingehalten, kann es zu einem Verlust eines ganzen Kollektivs führen.

3.2 Funktionelle Überprüfung der CAM-Integrität

3.2.1 Überprüfung der Integrität mit inerten Testsubstanzen

3.2.1.1 Trypanblau

Der Farbstoff Trypanblau wird auf die CAM vorsichtig aufgetragen, danach wird eine photometrische Messung der sequentiell extrahierten AF nach 2, 6 und 12 Stunden vorgenommen. Diese zeigen in der photometrischen Messung eine minimale passive Passage des Farbstoffes durch die CAM, wenn diese gegen reine AF der Eier ohne applizierten Farbstoff gemessen wird. Wird dagegen die Chorioallantoismembran unvorsichtig präpariert bzw. wird die 24-Stunden-Grenze, die post praeparationem zur Regeneration erforderlich ist, nicht eingehalten, steigt die gemessene Extinktion deutlich an. Man kann auf diese Weise Schäden, die durch die präparative Technik verursacht werden, nachweisen.

3.2.1.2 Latexpartikel

FITC-markierte Latexpartikel mit einem Durchmesser von 6 µm werden auf die CAM appliziert, die Allantoisflüssigkeit wird nach 30 Stunden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es lassen sich keine Kügelchen nach diesem Zeitraum innerhalb der AF nachweisen. Dies bestätigt die Unversehrtheit der CAM nach durchgeführter Präparation.

3.2.2 Bakteriologische Kontrollen zur Überprüfung der CAM-Integrität

Bakteriologische Kontrollversuche dienen zur weiteren Überprüfung der CAM-Integrität. Hierbei wird zwei Stunden nach Inokulation der Eier mit einer definierten Bakterienkonzentration ein geringer Teil der Allantoisflüssigkeit über eine liegende Kanüle aspiriert und auf Agarplatten ausplattiert. Wachsen auf den Platten nach 24-stündiger Bebrütung Bakterienkolonien heran, so werden die Eier aus dem Versuch genommen, da diese vermutlich fehlerhaft präpariert wurden. Es muss davon ausgegangen werden, dass in diesen Fällen bei der Präparation erhebliche Läsionen an der Membran entstanden sind, die sich auch durch eine 24-stündige Rekonstitutionszeit nicht beheben lassen. Nachdem dies herausgefunden worden war, ging die Anzahl der fehlerhaft präparierten Eier gegen Null. Ein Maß für die Intaktheit der Chorioallantoismembran ist der fehlende Bakteriennachweis in der AF zwei Stunden post inoculationem.

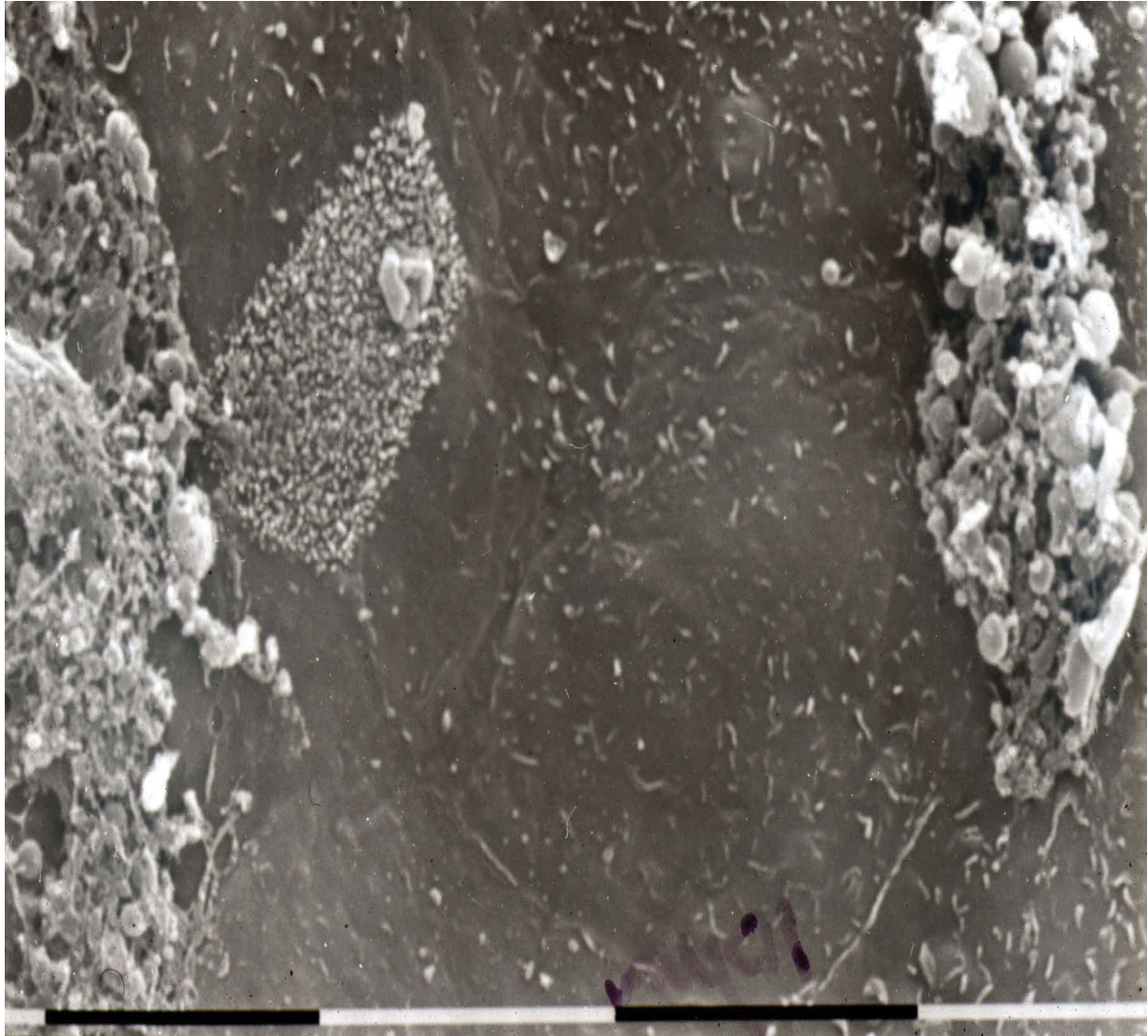


Abb. 22: Chorionepithel am 10. Entwicklungstag, Rasterelektronenmikroskopie, der Balken entspricht 10 μ m. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Schroten)

Gut zu erkennen ist das Chorionepithel mit den großen polygonalen Zellen nach der Präparation, die sich als eine glatte Oberfläche ohne Rupturen darstellt. Sehr gut sichtbar zellulärer Detritus als Rückstand der Präparation .

3.3 Bakterienaufzucht

3.3.1 Dosisfindung

Mit Hilfe serieller 1:10 Dilutionen lässt sich eine optimale Bakteriendosis der Invasionskinetik erstellen. Die Verdünnungsreihen werden allesamt mit dem *Klebsiella pneumoniae*-Stamm 3091 durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Invasionsraten einen dosisabhängigen Verlauf haben. Alle folgenden Versuche werden mit einer Keimkonzentration von 4×10^6 - 2×10^7 /100µl durchgeführt. Zur Definition relevanter Extraktionszeiten werden aufgrund der Vorversuche in den folgenden Versuchen die Zeitpunkte 14, 24 und 42 Stunden post inoculationem ausgewählt. Zur Findung des relevanten Zeitfensters wurden die Ergebnisse der Vorversuche am Beispiel von *Klebsiella pneumoniae*-Stamm 3091 in einer Konzentration von 4×10^6 - 2×10^7 /100µl zusammengefasst. Es zeigte sich, dass es erst 14 Stunden nach Inokulation zu einem signifikanten Anstieg der positiven AF-Kulturen kommt.

Es lässt sich somit zeigen, dass die Invasion der CAM dosisabhängig ist und einer zeitlichen Kinetik folgt.

3.4 Invasion von *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli*

Die Invasion der Bakterien durch die CAM ist abhängig von der verwendeten Bakterienart und der verschiedenen klinischen *Klebsiella*-Isolate.

Je nach Bakterienstamm kann man nach 14 Stunden p.i. in 15% (*Klebsiella pneumoniae* IA 565) bis 70% (*Klebsiella pneumoniae* 747) positive AF-Kulturen nachweisen (Lindemann, 2005).

3.5 Mortalität im Vergleich zur Invasion

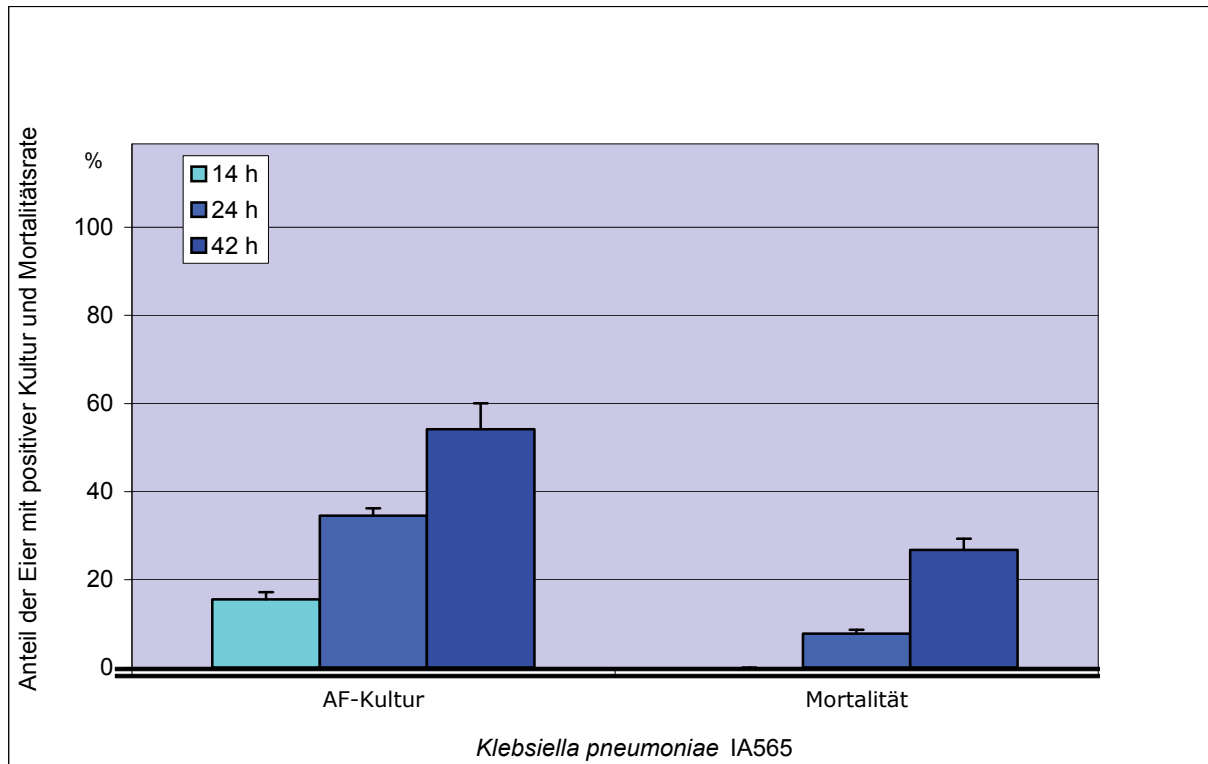


Abb. 23: Mortalität in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zur Invasion bei *Kleb. Pneumoniae* IA565

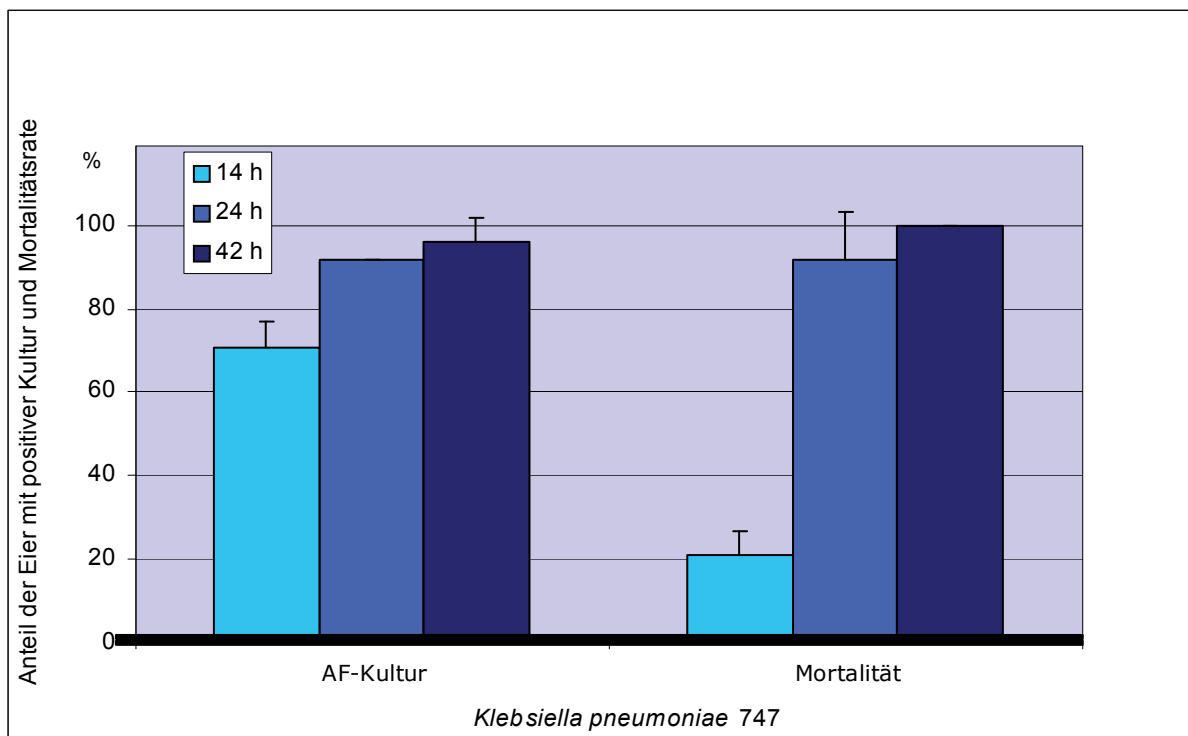


Abb. 24: Mortalität in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zur Invasion bei *Kleb. Pneumoniae* 747

Sehr niedrige Mortalitätsraten konnten für den *Klebsiella pneumoniae*-Stamm IA565 dargestellt werden. Dies korrelierte sehr gut zur Inavsiionsfähigkeit. 24h nach der Inokulation betrug die positive AF-Kultur 34,5% ($\pm 1,68$). Die Mortalität betrug 7,72 % ($\pm 0,85$). Dies zeigt, dass dieses Stamm nicht so virulent ist.

Bei *Klebsiella pneumoniae* 747 bestanden nach 24h sehr hohe Invasions- und Mortalitätsraten (jeweils 91,56%).

Nach 42 h bestand eine 100% (± 0) Mortalität bei 95,4% ($\pm 5,89$) pos. Kulturen. Dies zeigt, dass der Stamm 747 ein sehr invasives Potential hat und somit im Vergleich zu den anderen Stämmen deutlich virulenter ist.

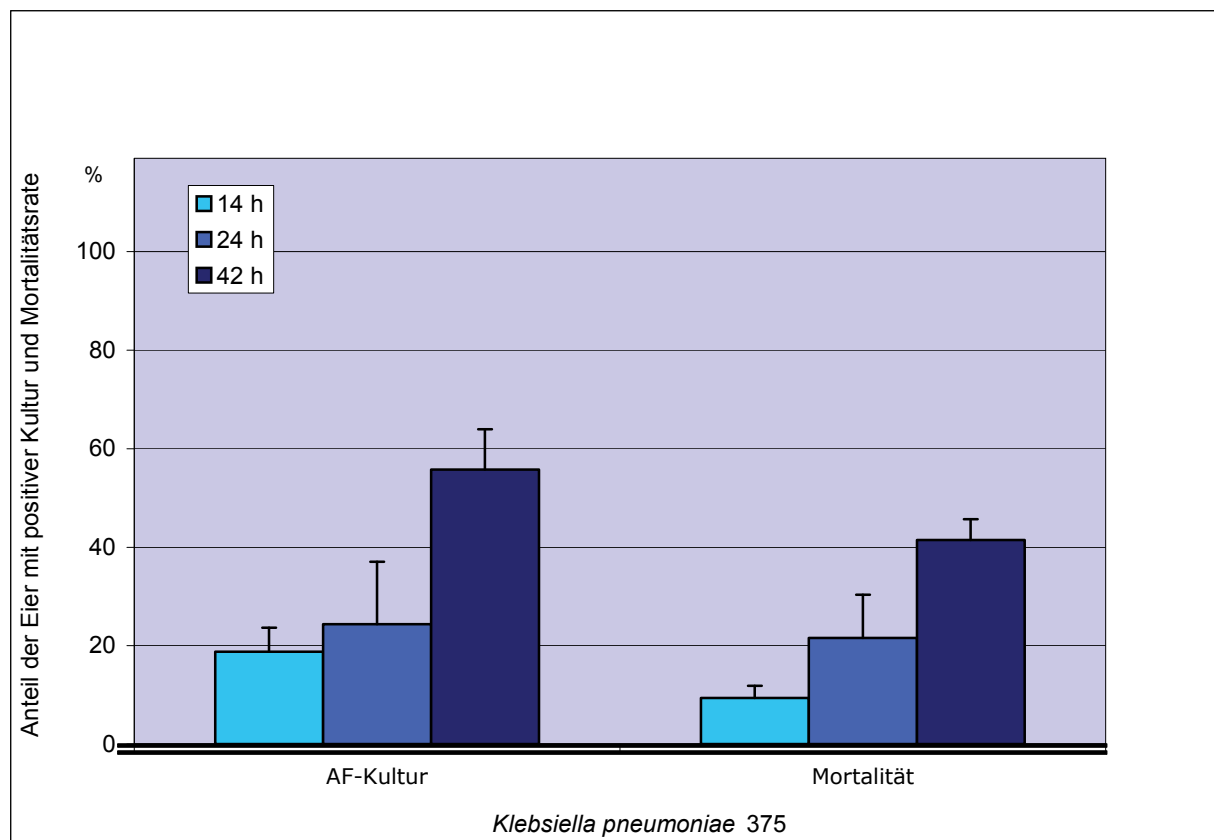


Abb. 25: Mortalität im Vergleich zur Invasion bei *Kleb. pneumoniae* 375

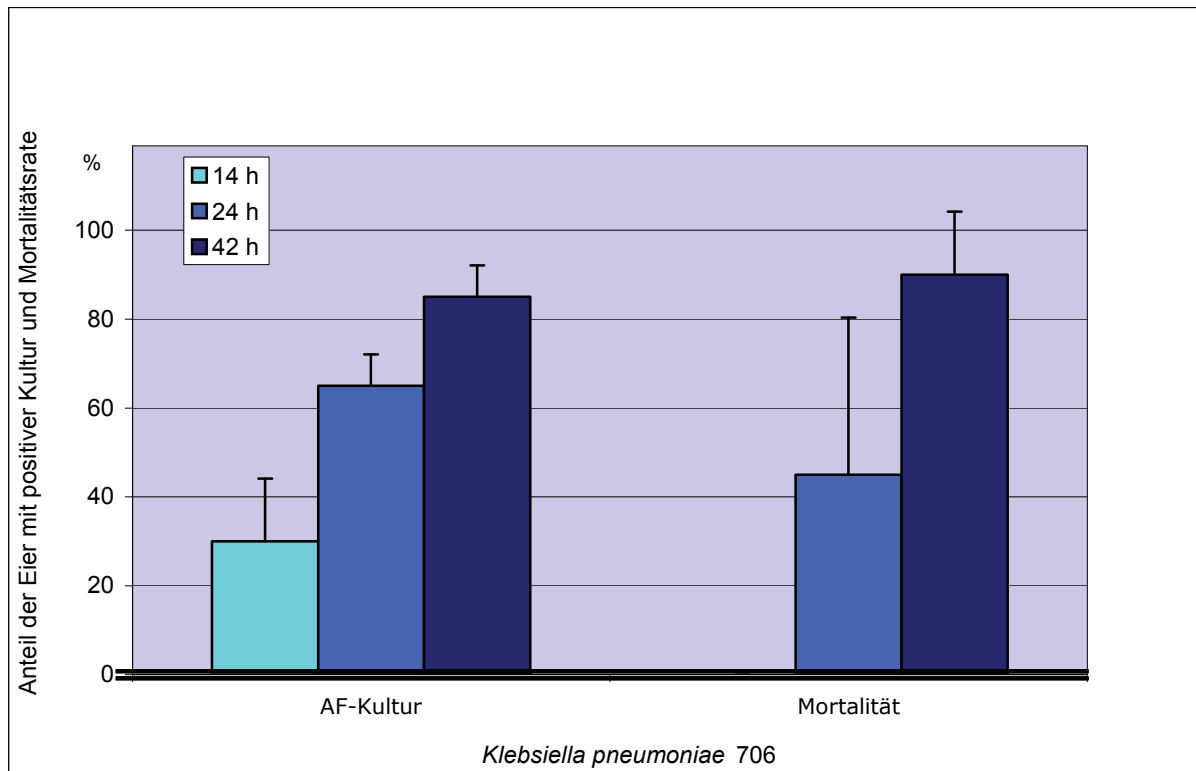


Abb. 26: Mortalität im Vergleich zur Invasion bei *Kleb. pneumoniae* 706

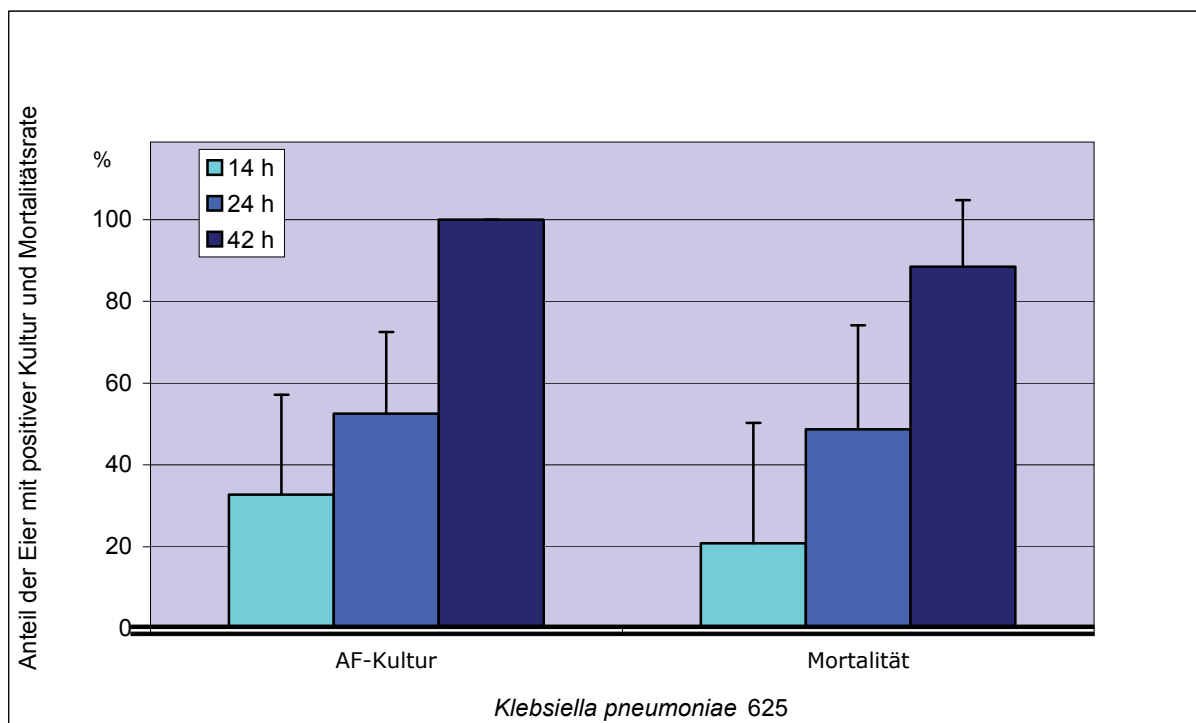


Abb. 27: Mortalität im Vergleich zur Invasion bei *Kleb. pneumoniae* 625

Die Abb. 23-27 zeigen die Mortalitätsraten im Vergleich zu den Invasionsraten, (14, 24 und 42 Stunden p.i., Bakterienkonzentration von 4×10^6 - 2×10^8)

$10^7/100\mu\text{l}$) die sowohl dosis- als auch bakterienart- und stammabhängig sind. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen aus jeweils 2-3 Experimenten mit den entsprechenden Bakterienstämmen. Die parallel zu den Experimenten durchgeführten Kontrollversuche, blieben nach Beimpfung mit einem sterilen Medium steril b.z.w. vital.

3.6 Elektronenmikroskopie

Klebsiella pneumoniae kann man in TEM-Untersuchungen während der Invasionsperiode innerhalb des Chorioallantoisepithels nachweisen. Die Abb. zeigt den Beginn des Internalisierungsprozesses. Beim Kontakt zwischen *Klebsiella pneumoniae* und der Wirtszelle kommt es zu einer Oberflächenveränderung des Epithels, wobei sich die Epithelzellen der CAM um das Bakterium wie beim invasomen-vermittelten Aufnahmemechanismus stülpen. Dieser Aufnahmemechanismus konnte an Endothelzellen bei *Bartonella henselae* gezeigt werden (Dehio et al., 1997). Die Zellen der CAM nehmen die Klebsiellen in sich auf (s. Abb. 28).

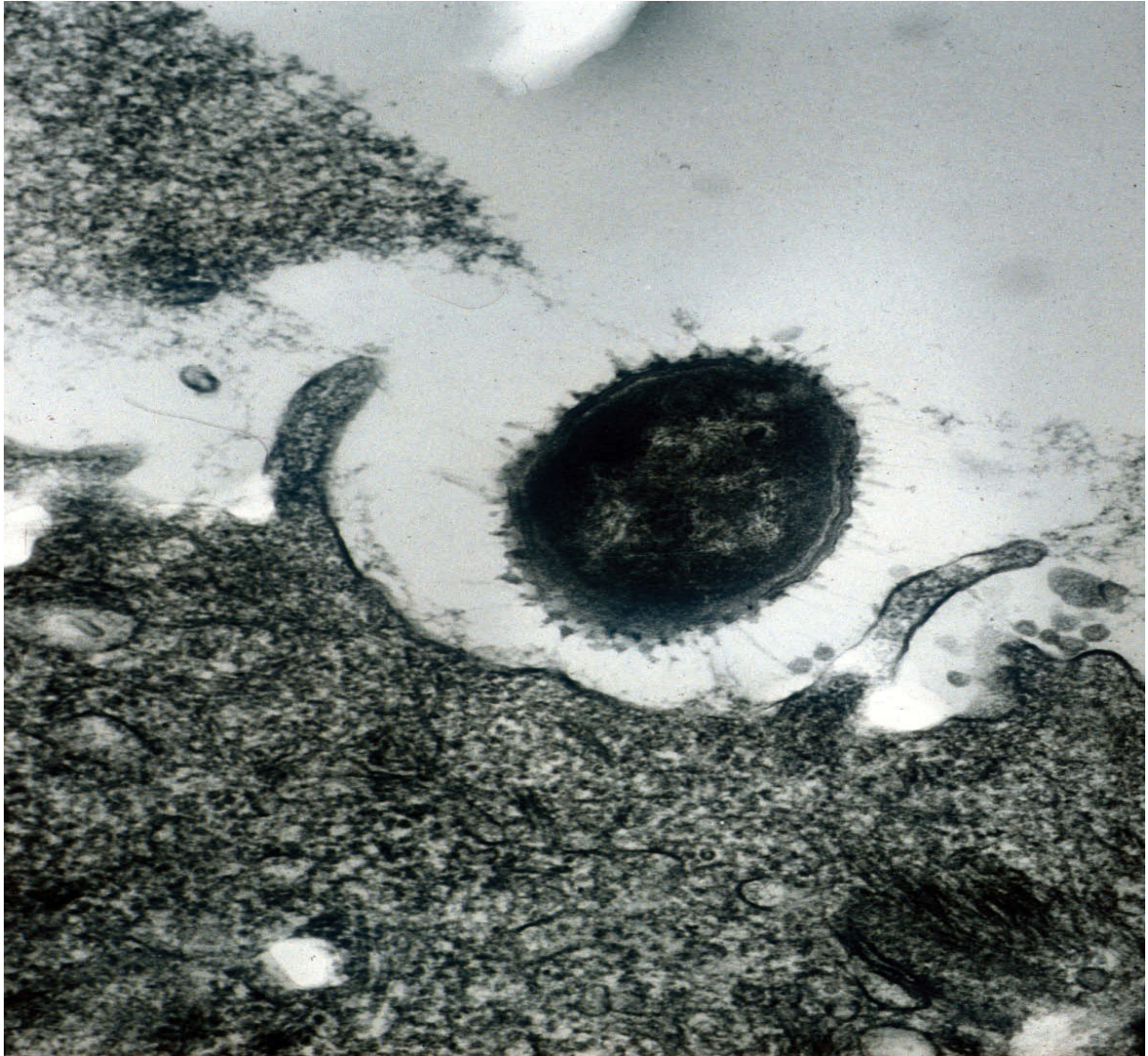


Abb. 28: Beginn der Internalisierung von *Klebsiella pneumoniae* durch die CAM (TEM). Hier wird die Adhäsion des Erregers an das Epithel gezeigt. Es kommt zu einer Oberflächenveränderung der Wirtszelle. *Klebsiella pneumoniae* wird von Pseudopodien des Chorionepithels umschlossen und aufgenommen. Gut zu erkennen sind die filamentöse Strukturen, die Bakterium und Wirtszelle verbinden.



Abb. 29: Fortgeschrittene Internalisierung von *K. pneumoniae* durch das Chorionepithel (TEM)

Zu größeren Zelleinschlüssen von internalisierten Klebsiellen kommt es zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Internalisierung. Teilweise haben die Bakterien das Chorionepithel bereits invadiert, wie hier zu sehen.

3.7 Simultane monotope und ditope Inkubation der CAM

Es lassen sich deutliche Unterschiede zwischen monotoper und ditoper Inokulation mit Koinkubation der CAM mit *Klebsiella pneumoniae*-Stamm 3091 und *E.coli* DH5a feststellen. Bei Aufbringen der Bakteriensuspension an unterschiedlichen Stellen, also ditope Lage der Bakterien auf der CAM, kann eine geringe Invasivität von *E.coli* nachgewiesen werden, während

die simultane Applikation beider Stämme an gleicher Lokalisation auf der CAM, monotope Lage, ein höheres Invasionsverhalten von *E.coli* zeigt. Erst nach 42 Stunden lässt sich bei ditoper Inokulation *E.coli* in der Allantoisflüssigkeit nachweisen. Bei der monotopen Inokulation werden bereits nach 14 Stunden positive Kulturen bei *E.coli* vorgefunden (Lindemann, 2005)

3.8 Invasion in Anwesenheit der Inhibitoren

3.8.1 Beteiligung des Zytoskeletts des Wirtes am Internalisierungsprozess von *Klebsiella pneumoniae*

Es ist bekannt, dass Mikrofilamente (MF) wie auch Mikrotubuli (MT) am Internalisierungsprozess von Bakterien in eukaryontischen Zellen beteiligt sind (Oelschlaeger et al., 1993, Cossart & Sansonetti, 2004).

Es wurden verschiedene Inhibitoren von Mikrofilamenten und Mikrotubuli im Hühnerembryonenmodell eingesetzt, um die Interaktion von *Klebsiella pneumoniae* mit den Zytoskelettkomponenten zu untersuchen. Zytochalasin D verhindert die Aktinpolymerisation und gibt Aufschluss über die Beteiligung der MF am Aufnahmeprozess. In Zellreihen konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung der Epithelzellen die Fähigkeit zur Invasion bei den untersuchten *Klebsiella*-Isolaten um 99% reduzierte (Fumagalli, 1997, Favre-Bonte et al., 1999). Kolchizin wurde angewandt, um die Beteiligung der MT am Aufnahmeprozess nachzuweisen. Kolchizin depolymerisiert die MT. Die Experimente der Zellreihe zeigten bei der Präinkubation des Monolayers mit Kolchizin eine Reduktion der Invasionsrate um 80-90% bei *Klebsiella* (Oelschlaeger et al., 1993).

Weiterhin konnte in Versuchen mit den Zellreihen durch den Einsatz von Inhibitoren des eukaryontischen Wirtzytoskeletts die Beteiligung von

Mikrofilamenten und Mikrotubuli am Aufnahmeprozess von *Klebsiella pneumoniae* gezeigt werden. Demnach ist eine Reorganisation des Zytoskeletts für die bakterielle Internalisierung notwendig. Es scheint, dass es sich um einen komplexen Aufnahmemechanismus handelt, welcher nicht Mikrofilament-abhängig bzw. Mikrotubuli-abhängig ist, sondern das intakte Mikrotubuli als auch Mikrofilamente benötigt werden. Dabei handelt es sich nicht um zwei separate Aufnahmewege (Fumagalli, 1997).

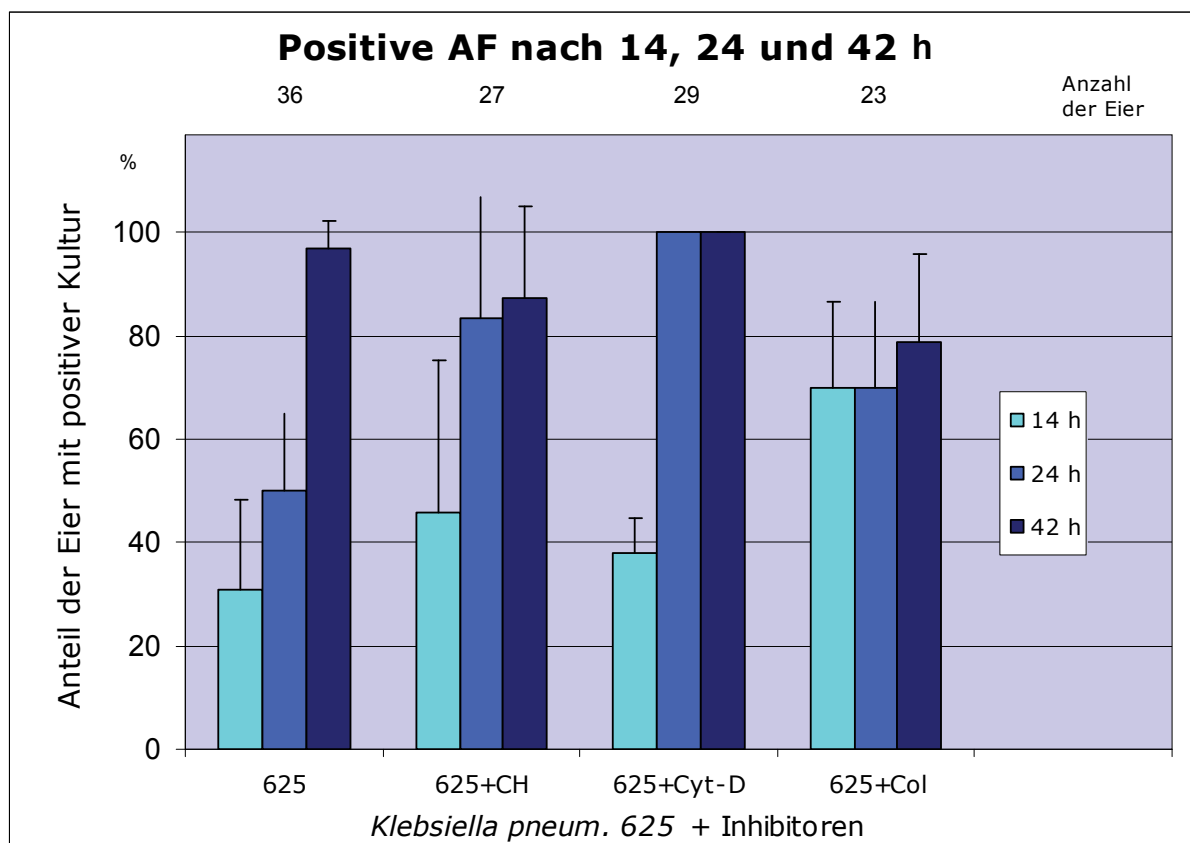


Abb. 30: Invasionsrate am Beispiel der *Klebsiella* 625- Stamm ohne sowie im Vgl. in Anwesenheit der jeweiligen „Inhibitoren“.

Die Abb. 30 zeigt die Invasionsrate von *Klebsiella pneumoniae* 625 ohne sowie mit den „Inhibitoren“ (14, 24 und 42 Stunden p.i., Bakterienkonzentration von 4×10^6 - 2×10^7 /100µl). Die Invasion, gemessen in pos. AF-Kultur ist abhängig vom „Inhibitor“. In Anwesenheit von

Zytochalsin D steigt die Invasion auf 100% innerhalb von 24 Stunden. Man kann aus dieser Versuchsreihe den Schluss ziehen, dass die Inhibitoren nicht das gewünschte Ziel, die Inhibition der Invasion, zeigen. Alle gemeinsam haben sie auf der CAM eher eine Promotor Funktion eingenommen. Die inhibierende Funktion bleibt hier aus.

Die Diagramme (Abb. 30 und Abb. 31) zeigen die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen aus jeweils 2-3 Experimenten mit den entsprechenden Bakterienstämmen. Die Kontrollversuche, die parallel zu den Experimenten durchgeführt wurden, blieben nach Beimpfung mit einem sterilen Medium steril.

Jedoch konnte bei den Kontrollen eine deutliche Mortalitätsrate von 60-80% 42h p.i. unter Kolchizingabe verzeichnet werden. Die AF blieb steril.

Weiterhin ist festzustellen, dass die Mortalitätsrate auch beim *Klebsiella*-Stamm 625 in Anwesenheit der „Inhibitoren“ ansteigt. Unter allen „Inhibitoren“ ist nach spätestens 42h eine 100% Mortalität erreicht (siehe Abbildung 31).

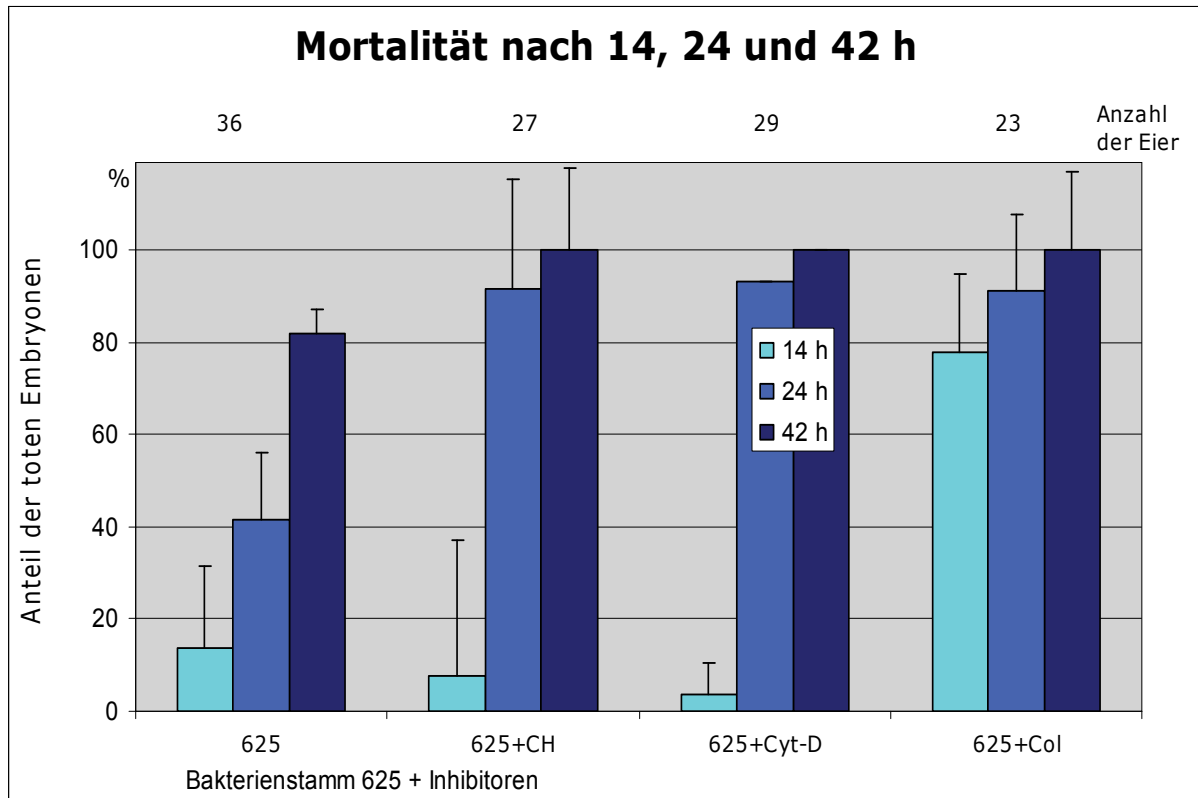


Abb. 31: Mortalitätsrate von *Klebsiella* 625-Stamm sowie in Anwesenheit der „Inhibitoren“

4. Diskussion

4.1 Etablierung des Infektionsmodelles

Die Freilegung der Chorioallantoismembran erfordert eine sorgfältige und vorsichtige Präparation des fragilen Eies mit seiner zarten Schale. Aufwendige Vorarbeiten, die in späteren Präparationsschritten, wie das Platzieren der Kanüle innerhalb der Allantoisflüssigkeit und die Darstellung der CAM mit den venösen Gefäßen, mussten gut trainiert werden. Wurden größere Fissuren beim zirkulären Herausschleifen der Schale bzw. beim Herausbohren von rechteckigen Fenstern verursacht oder wurden die Eihäute verletzt, waren die Eier unbrauchbar und wurden von vorneherein aus der Versuchsreihe genommen. Die atraumatische Präparation der Chorionallantoismembran war Bedingung für diese Arbeit. Durch Einsatz feiner Instrumente wurden größere Schädigungen der Membran, z.B. makroskopisch sichtbare Läsionen oder die Zerstörung der Gefäße, minimiert und ermöglichten eine zufrieden stellende Präparation.

Im Hinblick auf die Befruchtung der Eier gab es saisonale Unterschiede, die über das gesamte Jahr gesehen Einschränkungen der Experimente mit sich brachten. So gelang in den heißen Sommermonaten nur bei einem geringen Anteil der Eier die Bebrütung, wofür die mangelnde Befruchtung beim Züchter verantwortlich war. Es muss hinzufügen werden, dass natürlich auch eine falsche Lagerung oder der ungenügend gekühlte Transport ebenso in Frage kommen könnten. Der Transport der Eier unter hohen Umgebungstemperaturen war ein weiterer möglicher Grund. Diese beeinflussenden Faktoren wurden in den kühlen Monaten minimiert.

4.2 Integrität der Chorioallantoismembran (CAM)

Die Integritätsversuche haben gezeigt, dass die zellulären epithelialen Schichten nach der Präparation der CAM in der NAST-Technik intakt blieben. Der geringe Nachweis von Trypanblau wie auch von Eosin in der AF war auf eine passive Diffusion zurückzuführen. Wenn durch die Präparation Läsionen innerhalb der Chorioallantoismembran verursacht wurden, wurden die entsprechenden Eier aus der Versuchsreihe genommen. Zur Rekonstitution der epithelialen Integrität mussten 24 Stunden eingehalten werden. Wurde dieser Zeitraum unterschritten, ließ sich eine höhere Penetrationsrate von Trypanblau bzw. Eosin in der Allantoisflüssigkeit nachweisen.

Weiterhin wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Überprüfung der CAM-Integrität in der Vergangenheit vorgenommen und die Validität der hier vorgestellten standardisierten Präparationstechnik bestätigt. Mögliche Desintegrationen der zellulären Schichten wurden visualisiert. Es konnten jedoch keine gröberen Schäden weder in den chorionalen noch in den Allantois-Epithelschichten nachgewiesen werden. Das Chorionepithel stellte sich als eine glatte Oberfläche ohne Rupturen dar. Es wurden große polygonale Zellen, die dicht nebeneinander angeordnet waren, dargestellt. Nur wenige kleinere Zellen mit vielen Mikrovilli, die in Richtung der Schalenmembran vorsprangen, kamen innerhalb der homogenen Zellschichten zur Darstellung. Weiterhin war als Rückstand der Präparation etwas zellulärer Detritus sichtbar (siehe Abb. 22). Die Epithelzellen auf der Seite der Allantois waren häufig mit einigen Mikrovilli ausgestattet und zeigten kleine Furchen zwischen benachbarten Zellen. Diese wiesen jedoch keine Zeichen einer gröberen Verletzung der Epithelschicht auf (siehe Abb. 22).

Die Internalisierung von Latexpartikeln durch die Chorionepithelzellen zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen. Hierzu wurden Latexpartikel in einer Größe von 6 µm auf die CAM ausgesät und nach 12 und 24 Stunden erfolgte die elektronenmikroskopische Untersuchung. Die

REM-Untersuchungen zeigten die Endozytose inerter Substanzen durch die CAM. Die Kügelchen befanden sich auf bzw. innerhalb der oberen Schichten der Chorionepithelzellen, diese sind zu einer unspezifischen Phagozytose fähig. Weiterhin sind in den REM-Aufnahmen kraterähnliche Läsionen erkennbar. Diese Stellen sind entweder die Penetrationsstellen der Latexpartikel oder die Stellen, wo die Latexpartikel aufgekommen sind. Die Zellen konnten sonst in ihrer Intaktheit bestätigt werden. Weiterhin zeigten die REM-Aufnahmen unterschiedliche Penetrationsstadien der Latexpartikel. Nirgends ließ sich ein parazellulärer Durchtritt darstellen (siehe Abb. 17 und 18).

Die Tatsache, dass die Latexpartikel durch eine unspezifische Phagozytose in den Zellen aufgenommen werden, hat für die Ergebnisse in der hier vorgestellten Arbeit keine weitere Relevanz, da die unspezifische Phagozytose im gesamten Versuchssystem immer gleichermaßen vorhanden war, die Ergebnisse in den vorgestellten bakteriellen Invasionsexperimenten aber deutlich unterschiedlich ausfielen. Ein parazelluläres Durchwandern der untersuchten Keime durch das Allantoisepithel war in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht nachzuweisen.

Sobald innerhalb der AF ein Bakteriennachweis gelang, wurde die Kultur als positiv gewertet. Zur Kultivierung der Kolonien wurden, wie bereits beschrieben, lediglich 20 µl Allantoisflüssigkeit zu bestimmten Zeitpunkten auf Agarplatten aufgetragen. In den vorliegenden Experimenten schien eine Quantifizierung der Bakterienkolonien nicht sinnvoll, da die Anzahl der Kolonien nicht nur auf den Effekt der Penetrationsrate der Bakterien durch die CAM zurückzuführen war, sondern ebenso vom Wachstumspotential bzw. der Replikationsrate der einzelnen *Klebsiella pneumoniae*-Stämme und der *E.coli* abhing.

4.3 Bakterielle Invasion

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Invasionsfähigkeit von *Klebsiella pneumoniae* in einem in-vivo-System (CAM) dargestellt werden. Ferner wurde untersucht, in wieweit Klebsiellen die komplexe Struktur der CAM durchdringen können und ob bestimmte Substanzen, wie Kolchizin oder Zytochalasin D in der Lage sind, die Invasion zu inhibieren. Verschiedene *Klebsiella*-Isolate wurden auf ihre Fähigkeit zur Invasion in eukaryonten Zellen untersucht. Es ließen sich Invasionskinetiken in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis und Zeit nach Infizierung der Embryonen mit den klinischen Isolaten von *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli* erstellen. Weiterhin konnte die Mortalität abhängig von der Invasionskinetik und Inokulationsdosis erstellt werden. Die Mortalität war abhängig von der Invasionsfähigkeit des Keimes. Die optimale Inokulationsdosis von 4×10^6 bis 2×10^7 CFU/100µl wurde für die Experimente festgelegt.

Auch wenn die Chorionepithelzellen nicht zur Phagozytose fähig sind, konnte die Elektronenmikroskopie eine Penetration der Mikroben auf transzellulärem Weg zeigen. Filamentöse Oberflächenstrukturen wie Pili und Fimbrien als auch afimbriäre Oberflächenstrukturen, die als Adhäsine bezeichnet werden, sind in der Lage, direkt an Zellmoleküle wie Membranrezeptoren oder Strukturen der extra- zellulären Matrix zu binden. Eine Vielzahl von Adhäsinen kann zudem die Internalisation der Bakterien auslösen. In diesem Fall werden verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle aktiviert, die zu einer Rearrangierung des Aktinzytoskeletts führen (siehe Abbildung 28) und die Bildung von pseudopodienähnlichen Ausläufern bzw. Membranfalten induzieren (Oelschlaeger, 2001; Cossart & Sansonetti, 2004).

Über die Interaktion bakterieller Liganden und eukaryonter Zellen folgte ein Prozess der Endozytose.

Das NAST-CAM-System eignet sich insbesondere für die Beurteilung der Invasionsfähigkeit und der Mortalität verschiedener *Klebsiella pneumoniae*-Stämme im Vergleich zu *E.coli*. Alle *Klebsiella pneumoniae*-Isolate haben ein invasives Potential, welches signifikant stammesabhängig variiert. Ein unterschiedliches Invasionsverhalten ließ sich ableiten. Die Invasionsfähigkeit korrelierte mit der Mortalitätsrate. Ein aggressiver Invasor hatte eine deutlich erhöhte Mortalität der Embryonen zur Folge (z.B. *Klebsiella pneumoniae* 747). Die hier untersuchten Klebsiellen-Stämme exprimieren Typ 1 Fimbrien. Als einziger exprimiert der *Klebsiella pneumoniae*-Stamm IA565 die vollständigen Typ 3 Fimbrien (Fumagalli, 1997). Zwischen der Invasionsfähigkeit und diesem Fimbrientyp lässt sich eine direkte Korrelation herleiten. Bei diesem klinischen Isolat handelt es sich um einen schlechten Invasor mit einer deutlich niedrigen Mortalitätsrate (s. Abb. 23).

Als einziges Mitglied der *Enterobacteriaceae* produziert *K. pneumoniae* große Mengen von Kapselpolysacchariden und somit stellt diese Kapsel den wichtigsten Pathogenitätsfaktor der Spezies dar. Sie schützt die Keime vor der Phagozytose (Kabha et al., 1995), vor dem Komplementsystem der menschlichen Immunabwehr und vor antimikrobiellen Peptiden der angeborenen Immunantwort (Campos et al., 2004).

Stämme aus Umwelt-Habitaten besitzen in der Regel die gleiche Virulenz und das gleiche Potential zur Adhäsion an menschliche Epithelzellen wie klinische Isolate (Podschun et al., 2001; Struve & Krogfelt, 2004).

Die Fähigkeit zur Invasion für *Klebsiella pneumoniae* ist ein allgemeines Virulenzprinzip und sollte bei Infektionen berücksichtigt werden. Die Internalisierungseffizienz dieser Keime wurde in mehreren humanen epithelialen Zelllinien untersucht und verglichen. Man erhielt die höchsten Invasionsraten mit Blasen- (T24) und Darmzelllinien (HCT8). In Lungenepithelzellen (A549) wurde eine niedrige Internalisierungseffizienz

ermittelt und es wurde keine Internalisierungseffizienz in embryonalen Intestinalzellen detektiert (Fumagalli et al., 1998).

Es ist nicht gelungen, von den über 77 Kapseltypen von *Klebsiella pneumoniae* einen definierten Typ mit einem bestimmten Krankheitsbild in Einklang zu bringen (Podschun et al., 1993). Untersuchungen haben jedoch eine vermehrte Isolation der Serotypen K2, K21 und K7 bei Infektionen des Respirations- und Urogenitaltraktes gezeigt (Podschun et al., 1986; Held, 2000). In Versuchen mit Zelllinien war auffällig, dass das kapsellose *Klebsiella pneumoniae*-Isolat 706 eine höhere Internalisationseffizienz aufwies als all die anderen Stämme (Fumagalli, 1997, Oelschlaeger et al., 1996). In anderen Arbeiten wurden die Invasionsraten von kapsellosen und kapseltragenden isogenen Paaren verglichen. Es zeigte sich, dass der kapsellose *Klebsiella pneumoniae*-Stamm immer eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Invasion besaß als die kapseltragenden Isostämme (Fumagalli et al., 1998, Sahly et al., 2000). Cortés konnte dieses Verhalten auch an Lungenepithelzellen zeigen. Die bekapselten *Klebsiella pneumoniae*-Stämme invadierten deutlich weniger die Lungenepithelzellen als die wenig bzw. kapsellosen Bakterien (Cortés, 2002). Im Gastrointestinaltrakt haben kapsellose Klebsiellen-Stämme keinen Vorteil. Es zeigte sich, dass es bei mit Streptomycin vorbehandelten Mäusen in der Kolonisation des Intestinaltraktes zwischen kapseltragenden und kapsellosen Bakterien keine Unterschiede gab. Bei der Infektion des Urogenitaltraktes aber spielt die Kapsel eine große Rolle und sie ist damit als ein bedeutsamer Virulenzfaktor anzusehen. Struve et al. konnten zeigen, dass sich bei Mäusen nach urogenitaler Infektion später im Urin eine höhere Keimzahl von kapseltragenden *Klebsiella*-Isolaten nachweisen ließ als von kapsellosen Bakterien (Struve & Krogfelt, 2003). Die hier vorliegende Arbeit konnte keinen Unterschied zwischen kapseltragenden und kapsellosen Stämmen feststellen. Der kapsellose *Klebsiella pneumoniae*-Stamm 706 besitzt eine mittlere Invasionsfähigkeit und Morbiditätsrate. In den hier durchgeführten Experimenten konnte kein hohes Invasionspotential der Kapsel zugeordnet werden. Es gibt

kapseltragende Isolate mit niedrigerem und höherem Potential der Invasion der Chorioallantoismembran. Offenbar spielen andere Virulenzfaktoren wie z.B. das LPS in unserem Modell eine sehr wichtige Rolle.

Im tierexperimentellen Modell konnte gezeigt werden, dass während der Wachstumsphase der *Klebsiellen* sich das KPS mit dem Lipopolysaccharid (LPS) sowie Proteinen verbindet und so einen toxischen Komplex formt, der für die durch *Klebsiella* typischerweise verursachten Nekrosen bei Pneumonien verantwortlich gemacht wird. Diese führte später zu Sepsis (Held, 2000).

Die Chorioallantoismembran ist in der Lage, zwischen zwei verschiedenen Bakterienarten zu differenzieren. In diesen Experimenten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen *Klebsiella pneumoniae*-Stämmen und *E.coli* bezüglich ihrer Internalisierungseffizienz.

Die simultane, monotope Inokulation von *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli*, das heißt die Bakterien wurden auf die gleiche Stelle der CAM aufgetragen, zeigte einen deutlichen Anstieg der Penetrationseffizienz des niedrig invasiven *E.coli*-Stammes (DH5a) ($p < 0,001$). Hierbei ist möglich, dass *Klebsiella pneumoniae* die Rolle eines Promotors übernimmt (Lindemann, 2005). Der niedrig invasive *E.coli* erreicht höchstwahrscheinlich durch den Epithelschaden, hervorgerufen durch die *Klebsiella pneumoniae*, eine höhere Penetrationseffizienz. Bei Shigella und Salmonella ist dieser permissive Effekt bereits beschrieben worden (Galan, 1999, Sansonetti & Egile, 1998, Niebuhr & Sansonetti, 2000). Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass die von *Klebsiella*-Stämmen induzierte Internalisierung zur Aufnahme von *E.coli* gemischten Mikrokolonien führen könnte und so die hohe Penetrationsrate zu erklären wäre.

In der Vergangenheit wurden ebenfalls Co-Infektionsstudien zwischen *E.coli* und *Klebsiella pneumoniae* sowie zwischen *Salmonella typhimurium* und *Klebsiella pneumoniae* an humanen Epithelzellen durchgeführt. Es

stellte sich jedoch heraus, dass die Co-Infektion zu keiner Steigerung der Internalisierung von *E.coli* in humane Epithelzellen führt. Auch die Co-Infektionsstudie mit *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella typhimurium* zeigte keine gegenseitige Beeinflussung in den Zellreihenuntersuchungen (Fumagalli, 1997). Hier muss betont werden, dass die Zeiten für die Anwesenheit der Bakterien sich deutlich unterscheiden. Auf der CAM waren die Bakterien bis zu 42h präsent. Während die Monolayer nur 3h der Bakterien ausgesetzt waren. Dies könnte ein wichtiger Faktor für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

4.4 Invasionsprozess in Anwesenheit von Zytoskeletthinhibitoren

In der Vergangenheit wurde in zahlreichen Arbeiten die inhibitorische Fähigkeit von Zytocalasin und Kolchizin an humanen Epithelzellen belegt (Adam et al., 1995, Fumagalli et al., 1998). Die meisten fakultativ intrazellulären Bakterien benötigen für die Aufnahme in Wirtszellen intakte Mikrofilamente. Es ist auch bekannt, dass am Internalisierungsprozess in humane Epithelzellen sowohl Mikrofilamente als auch Mikrotubuli beteiligt sind (Oelschlaeger et al., 1994, Sansonetti & Egile, 1998). In Anlehnung an die Arbeit von Fumagalli mit humanen Epithelzellen (T24, HCT8) wurden die gleichen Konzentrationen der Inhibitoren benutzt. Während bei der Arbeit mit dem Monolayer eine signifikante Inhibition erreicht wurde, konnte in dieser Arbeit keine Inhibition gezeigt werden. Vielmehr stiegen die Invasionsraten und somit auch die Mortalität der Hühnerembryonen an. Auch die Mortalitätsrate in den Kontrollgruppen, z.B. unter Gabe von Kolchizin, erhöhte sich erheblich. Die Präinkubation der Bakterien mit Chitinhydrolysat, welche eine Verringerung der Invasionsrate in den Zellreihen hervorgerufen hatte, konnte in dieser Arbeit nicht widerspiegelt werden.

Folgende Ursachen sind möglicherweise hierfür verantwortlich: Die Konzentration der Inhibitoren waren zu hoch gewählt und wirkten toxisch

auf der CAM, die zur Zerstörung des Organs und letztendlich zum Tod des Embryos führte. In den Zellreihen waren die genannten Inhibitoren während der Invasionsperiode von 3 Stunden präsent, bis diese durch frisches Gentamycin-haltiges Zellkulturmedium ersetzt wurden. Zytochalasin D und Kolchizin waren bis zu 42 Stunden auf der CAM lokalisiert. Es zeichnete sich bereits nach 12 Stunden eine Erhöhung der Invasionsrate ab. In Versuchsreihen mit Endothelzellen der Lunge zeigte sich in der Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie, dass eine MT Depolymerisation durch Kolchizin zu einer F-Aktin-Umverteilung führt. Dies hat vermehrte Stressfaserbildung und Zellretraktion mit ausgeprägter parazellulärer Lückenbildung zur Folge. Letztendlich konnte demonstriert werden, dass MT-Systeme an der Regulation der endothelialen Barriere beteiligt sind. Darüber hinaus verdeutlichte sich, dass eine enge Bindung von MT und Aktinfilamenten innerhalb der zellulären Adhäsionskontakte besteht und durch die Destabilisierung des Mikrotubulus bzw. Mikrofilamentsystems zur Folge hat, dass die Permeabilität der pulmonalen Endothelzellen deutlich ansteigt (Mühle, 2004). Die Gabe von Kolchizin in den Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 100 μM zeigte eine Erhöhung der hydraulischen Konduktivität der Endothelzellmonolayer, welche zeit- und dosisabhängig war. Dies führte in vitro zu einer endothelialen Barrierestörung. Die Endothelzellen zeigten eine allgemeine Retraktion und eine großflächige Auflösung von Zell-Zell-Kontakten (Mühle, 2004).

Diese neuen Tatsachen könnten eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Penetrationsrate des *Klebsiella*-Isolats 625 sowie die Mortalitätsrate der Hühnerembryonen drastisch unter der Gabe von Kolchizin und Zytochalasin D ansteigen.

Hier sind weitere Experimente, insbesondere elektronenmikroskopische Untersuchungen, erforderlich, um mehr Aufschluss über die Veränderung des Chorionepithels in Anwesenheit von Kolchizin und Zytochalasin D zu geben. Höchstwahrscheinlich ist die Barrierestörung der Zellen, im Sinne

der Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte für die hohe Invasions- und Mortalitätsrate verantwortlich.

Zusammenfassend kommt man in der hier vorliegenden Arbeit zu dem Ergebnis, dass sich *Klebsiella pneumoniae*-Stämme aufgrund ihrer Invasionsfähigkeit untereinander deutlich unterscheiden. Analog zu den Untersuchungen mit humanen epithelialen Zelllinien gibt es *Klebsiella pneumoniae*-Stämme mit hoher Invasionsfähigkeit und solche mit nur geringer Invasionsbereitschaft. Ferner konnten in den durchgeführten Experimenten die *Klebsiella*-Isolate im Hinblick auf Virulenz und damit auf die Mortalität untersucht werden. Es wurde dargestellt, dass höchstwahrscheinlich weitere wichtige Virulenzfaktoren, außer der Kapsel, wie z.B. das LPS einem ebenso wichtigen Virulenzfaktor darstellt und nicht außer Acht gelassen werden sollte. Weiterhin wurden die Nebeneffekte der Invasionsinhibitoren im Sinne von Barrierestörung der Zellen aufgezeigt, die letztendlich zur Erhöhung der Invasions- und Mortalitätsraten geführt hat. Die hier vorliegende Arbeit zeigt Ergebnisse, die die Chorioallantoismembran des Hühnchenembryos als ein effektives Modell zur Untersuchung von Invasionspotentialen und Pathogenitätsfaktoren verschiedener Bakterienstämme und -arten darlegt. Aufgrund der Speziespezifität können keine direkten Rückschlüsse der hier erhobenen Daten auf die Interaktion zwischen den beschriebenen Bakterienstämmen und dem Menschen getroffen werden. Es ließ sich jedoch zeigen, dass das NAST-CAM-Modell eine Zwischenstellung zwischen den humanen Zelllinien auf der einen Seite und Versuchstieren auf der anderen Seite einnimmt.

Letztendlich wurde in dieser Arbeit ein in-vivo-System validiert, welches ein kostengünstigeres Modell mit geringer Reproduktionsperiode und unkomplizierter Kultivation darstellt.

5. Zusammenfassung

Die CAM, die embryonale Chorioallantoismembran, wurde in „natural-air-sac“-Technik präpariert, um eine komplexe physiologische Barriere für Invasionsexperimente zur Verfügung zu haben. Zur Untersuchung der Invasivität und Mortalität verschiedener bakterieller Spezies und Stämme wurde in dieser Arbeit ein Hühnerembryonen-Modell etabliert.

Elf Tage lang wurden befruchtete Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ in einem Inkubator bebrütet. An der Stelle des natürlich entstandenen Luftraumes wurde mit der atraumatischen Präparation der dreischichtigen CAM begonnen. Unterhalb der CAM wird zur sequenziellen Probeentnahme der Allantoisflüssigkeit (AF) eine Kanüle eingebracht. Zur Überprüfung der Integrität des Membransystems folgten Penetrationsstudien mit inerten Substanzen, bakteriologische Tests sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Nach Sicherstellung der adäquaten Integrität wurde die CAM mit je einem von fünf verschiedenen *Klebsiella pneumoniae*-Stämmen und einem *E.coli*-Stamm (DH5α) entweder isoliert oder in Kombinationen inkubiert. Weiterhin wurde der *Klebsiella pneumoniae*-Stamm 625 in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren auf die CAM eingebracht. Bestimmte, zuvor festgelgte Mengen der AF, wurden zu definierten Zeitpunkten extrahiert und kultiviert. Man konnte nun Kinetiken über die Invasionsfähigkeit der verschiedenen Bakterien erstellen. In der folgenden Arbeit wurden außerdem untersucht, inwieweit Substanzen, die in die Regulation des Mikrotubulus- bzw. Mikrofilamentsystems eingreifen, die *Klebsiella pneumoniae* am Aufnahmeprozess hindern können.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich Erreger mit hohem Invasionspotential von Bakterien mit mittlerer und niedriger Penetrationsfähigkeit unterscheiden. Die Invasionsraten waren von den verwendeten Bakterienspezies und -stämmen abhängig. Eine signifikante Inhibition der

Invasion durch Kolchizin, Zytochalasin D b.z.w. Chitinhydrolysat konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Vielmehr stiegen die Invasions- sowie die Mortalitätsraten unter den vermeintlichen Inhibitoren.

Die Resultate zeigten in der vorliegenden Arbeit letztendlich, dass die CAM ein nützliches Modell zwischen Zellkultur und Tierversuch darstellt. Es lassen sich in in-vivo-Studien eindeutige Aussagen über die Invasionsfähigkeit und Pathogenität der inokulierten Keime machen.

6. Literatur

1. **Adam** T., Arpin M., Prevost M. C., Gouno P. and Sansonetti P. J.. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. J. Cell Biol. 129, 367-381, 1995.
2. **Alberts** B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Das Zytoskelett. In: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie 2. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. 734-812, 2001
3. **Arlet** G., Rouveau M., Casin I., M. Bouvet P. J., Lagrange P. H. and Philippon A.. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. J. Clin. Microbiol. 32, 2553-2558, 1994.
4. **Ashkenazi** S., Even-Tov S., Samra and G. Dinari Z. Uropathogens of various childhood populations and their antibiotic susceptibility. Pediatr. Infect. Dis. J. 10, 742-746, 1991
5. **Bagley** S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. Infect. Control 6: 52-58, 1985
6. **Bang**, F. B. Development of Newcastle disease virus in chick embryo. A study with the electron microscope. Federation Proc.,11, 408, 1952
7. **Bashur** A.M., Fullerton A.T., Hart M.J., Bloom G.S. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. J. Cell Biol. 13: 1555-1566, 1997
8. **Bliska** J. B., Galan E.and Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. Cell. 73, 903-920, 1993
9. **Brenner** S.L. and Korn E.D. The effects of Zytochalasins on actin polymerisation and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerisation. J. Biol. Chem. 255: 841-844, 1980.
10. **Buddingh** G. J.. Experimental meningococcus infection of the chick embryo. J. Exp. Med: 485-497. 8/1939.

11. **Buddingh** G.J. Production and Use of Smallpox Vaccine Virus Cultivated in the Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryos. Am J Public Health Nations Health. Nov;27(11):1135-40, 1937
12. **Buddingh** G. J. and A. Polk. Meningokoccus infection of the chick embryo, Science 86, 20-21, 1937.
13. **Burnet** F. M. A virus disease of the canary of the fowl-pox group. J. Pathol. Bacteriol. 37: 107-122, 1933.
14. **Campos** M. A., Vargas M. A., Requeiro V., Llompart C. M., Alberti S., Bengoechea J. A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. 72(12):7107-14, 2004.
15. **Camprubi** S., Merino S., Benedi V.-J., Tomas J. M. The role of the O-antigen lipopolysaccharide and capsule on an experimental *Klebsiella pneumoniae* infection of the rat urinary tract. FEMS Microbiol. Lett. 111, 9-14, 1993.
16. **Ciurana** B. and Tomas J. M. Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. Infect. Immun. 55, 2741-2746, 1987.
17. **Collins** C. M. and S. E. F. D'Orazio. Virulence determinants of uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (ed.), Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1996.
18. **Connell** I., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S. and Svanborg C.. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 9827-9832, 1996.
19. **Cooper** J. A.. Effects of Zytocalsin and phalloidin on actin. J. Cell. Biol. 105, 1473-1478, 1987.
20. **Cortés** G., Álvarez D., Saus C. and Albertí S.. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae*, Infection and Immunity, 1075-1080, 2002.

21. **Cossart** P., Sansonetti, P.J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304: 242-8, 2004
22. **Cronstein**, B.N., Molad, Y., Reibmann, J., Balakhane, E., Levine, R.I., Weissmann, G. *Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. J. Clin. Invest.* 96: 994-1002, 1995.
23. **Cryz** S. J., Mortimer P. M., Mansfield V. and Germanier R.. Seroepidemiology of *Klebsiella* bacteremic isolates and implications for vaccine development, *J. Clin. Microbiol.*, 23, 687-690, 1986.
24. **De Champs** C., P. Sauvant M., Chanal C., Sirot D., Gazui N., Malhuret R., Baguet J. C. and Sirot J.. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2887-2890, 1989.
25. **Dehio** C., Meyer M., Berger J., Schwarz H. and Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J. Cell Science* 110, 2141-2154, 1997.
26. **Di Martino** P., Livrelli V., Sirot D., Joly B. and Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* 64, 2266-2273, 1996.
27. **Domenech-Sanchez** A., Hernandez-Alles S., Martinez-Martinez L., Benedi V. J. and Alberti S. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 181, 9, 2726-2732, 1999.
28. **Donovan** W. H., Hull R., Cifu D. X., Brown H. D. and Smith N. J. Use of plasmid analysis to determine the source of bacterial invasion of the urinary tract. *Paraplegia* 28, 573-582, 1990.
29. **Drenckhahn** D. and Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. In: *Vascular endothelium: Physiology, pathology, and*

- therapeutic opportunities. Editors: Born, G.V.R., and C.V. Schwartz. F.K. Schattauer, Stuttgart, Germany. 1-26, 1997
30. **Duguid** J. P. Fimbriae and adhesive properties of *Klebsiella* strains. J. Gen. Microbiol. 21, 271-286, 1959.
31. **Dunkel** V. C., Groupe V. Effects of rous sarcoma virus on chicken-embryo limb buds grafted onto the chorioallantoic membrane. J Natl Cancer Inst. 1965 Feb;34:201-15.
32. **Ebert** J. D. The formation of muscle and muscle-like elements in the choriollantoic membrane following inoculation of a mixture of cardiac microsomes and Rous sarcoma virus. J Exp Zool. 142:587-621. 1959
33. **Fancsi** T. and Feher G. Ultrastructural studies of chicken embryo chorioallantoic membrane during incubation. Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol. 8, 151-159, 1979.
34. **Favre-Bonte** S., Joly B. and Forestier C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. Infect. Immun. 67, 554-561, 1999.
35. **Feher** G. The structure of the shell membrane, the development and structural change of the amnion and chorioallantoic membrane hatching in the goose. Anat. Histol. Embryol. 13 (4), 285-299, 1984.
36. **Finlay** B. B. and Falkow S. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. Biochemie. 70, 1089-1099, 1988.
37. **Finlay** B. B. and Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev. 53, 210-230, 1989.
38. **Finlay** B. B. and Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 136-169, 1997.
39. **Finlay** B. B. and Cossart P. Exploitation of mammalian host cell function by bacterial pathogens. Science 276, 718-725, 1997

40. **Finlay** B. B., Ruschkowski S. and Dedhar S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 99, 283-296, 1991.
41. **Fitze-Gschwind** V. Zur Entwicklung der Chorioallantois-membran des Hühnchens. Inaugural-Dissertation (Teil I), Zürich, *Ergeb. Anatomie*, 47, 1, 7-34, 1973.
42. **Fowler** jr. J. E. Bacteriology of branched renal calculi and accompanying urinary tract infection. *J. Urol.* 131, 213-215, 1984.
43. **Fukata**, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., Kaibuchi, K. *Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170* *Cell* 109: 873-885, 2002.
44. **Fülleborn** F. Beiträge zur Entwicklung der Allantois der Vögel. Inaugural-Dissertation, Berlin, 1885.
45. **Fumagalli** O., Tall B. D., Schnipper C. and Oelschlaeger T. A.. N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* 65: 4445-4451, 1997.
46. **Fumagalli** O., Charakterisierung des Invasionsprozesses von *Klebsiella pneumoniae* in humane Epithelzellen. 1998.
47. **Galan** J. E. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 46-50, 1999.
48. **Geffers** C, Gastmeier P, Rüden H. Nosokomiale Infektionen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8. Verlag Robert-Koch-Institut, Berlin. 2002.
49. **Griffith** D. P., Musher D. M. and Itin C. Urease: the primary cause of infection-induced urinary stones. *Invest. Urol.* 13, 346-350, 1976.
50. **Griffith** L. M., Pollard, T.D. *Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins.* *J. Cell Biol.* 78: 958-965, 1978.

51. **Griffith** L. M., Pollard, T.D. *The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. J. Biol. Chem.* 257: 9143-9151, 1982.
52. **Goldstein** L.S.B., Vale, R.D. New cytoskeletal lesions. *Nature* 359: 193-194, 1992
53. **Goodpasture** E. W., Woodruff A. M. and Buddingh G. J.. Vaccinal infection of the chorio-allantoic membrane of the chick embryos. *Science* 74: 371-372, 1931.
54. **Goodpasture** E. W. and Buddingh G. J. The praparation of antismallpox vaccine by culture of the virus in the chorioallantoic membrane of the chick embryos, and its use in human immunization. *Am. J. Hyg.* 21: 319-360, 1935.
55. **Gottlieb** A.I., Lowell Langille B., Wong M.K.K., Kim D.W., Structure and function of endothelial cytoskeleton. *Lab. Invest.* 65: 123-136, 1991
56. **Gutsmann** T., Haberer N., Carroll S. F., Seydel U. and Wiese A.. Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP) and planar membranes. *Biol. Chem.* 382, 425-434, 2001.
57. **Hamburger** V., Hamilton H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92, 1951.
58. **Heine** H., Rietschel E.T., Ulmer A.J. The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol* 19:279-296, 2001
59. **Hornick** D. B., Thommandru J., Smits W. and Clegg S. Adherence properties of an *mrkD*-negative mutant for *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63, 2026-2032, 1995.
60. **Hultgren** S. J., Porter T. N., Schaeffer A. J. and Duncan J. L. Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50, 370-377, 1985.
61. **Ingber** D.E., Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 104: 613-627, 1993

62. **Isberg** R. R., D. L. Voorhis and S. Falkow. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 58: 769-778, 1987.
63. **Isberg** R. R. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 252: 934-938, 1991.
64. **Isberg** R. R. and. Leong J. M. Multiple $\beta 1$ chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871, 1990.
65. **Kabha** K., Nassimov L., Athamna A., Keisari Y., Parolis H., Parolis L. A., Grue R. M., Schlepper-Schafer J., Ezekowitz A. R., Ohmann D. E. *Infect Immun.* 63(3):847-52. 1995.
66. **Kemper** F. H. Studien zur Wirkung von Chlorophyll. *Fette Seifen Anstrich Mittel* 60: 830-835, 1958.
67. **Kemper** F. H. Thalidomid und Entwicklung von Hühnerembryonen. *Arzneimittel-Forschung*, 12, 640, 1962.
68. **Kemper** F. H. and N. P. Lüpke. Phthalsäuredialkylester-Pharmakologische und toxikologische Aspekte, VKE-Schriftreihe, Frankfurt, 1983.
69. **Korn** E.D., Actin polymerisation and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* 62: 672-737, 1982.
70. **Laurin** T., Schmitz U., Riediger D., Frank H. G. and Stoll C.. Die Chorioallantoismembran befruchteter Vogeleier als Substrat zur Testung der Invasivität von Karzinomen. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 8: 223-228, 2004.
71. **Lemburg** P.. Histophysiologische Untersuchungen zum Problem der Flüssigkeits- und Stofftransportes in der frühen Embryonalentwicklung. *Zeitschrift für Zellforschung* 57, 737-765, 1965.
72. **Lerner** S. P., Gleeson M. J. and Griffith D. P. Infection stones. *J. Urol.* 141, 753-759, 1989.
73. **Lindemann D.**, Etablierung eines Hühnerembryonen-Modells als ein in vivo-System für bakterielle Invasionsversuche, Inaugural – Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2005

74. **Lodish** H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J., Mikrotubuli und Intermediärfilamente. In: Molekulare Zellbiologie. Hrsg. d. Übersetzung: de Gruyter, W., 2. Auflage, Berlin, New York. 1079-1147, 1996
75. **Loppnow** H., Brade L., Brade H., Rietschel ET., Kusumoto S., Shiba T., Flad HD. Induction of human interleukin 1 by bacterial and synthetic lipid A. Eur JImmunol 16:1263-1267, 1986
76. **Lüpke** N. P. Embryotoxicity-testing by HET. Nannyn-Schmiedeberg´s Archives of Pharmacology, 319(Suppl.R24), 1982.
77. **Lüpke** N. P. The hen´s egg test (HET) – an alternative toxicity test. Br. J. Derm 115: 133-135, 1986.
78. **Kühn** I., Ayling-Smith B., Tullus K., Burman LG. The use of colonization rate and epidemic index astools to illustrate the epidemiology of faecal *Enterobacteriaceae* strains in Swedish neonatal wards. J. Hosp.Infect. 23:287-297, 1993
79. **MacRae** T.H. *Towards an understanding of microtubule function and cell organisation: an overview. Biochem. Cell Biol.* 70: 835-841, 1992.
80. **Matatov** R., Goldhar J., Skutelsky E., Sechter I., Perry R., Podschun R., Sahly R., Thankavel K., Abraham S. N. and Ofek I.. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. FEMS Microbiol Lett., 179, 123-130, 1999.
81. **Mc Cormick** J. F., Nassauer J., Bielunas J. and Leighton J. Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay systems. Scan. Electron. Microsc. 4, 2023-2030, 1984.
82. **Meier** C., Oelschlaeger T. A., Merkert H., Korhonen T. K. and Hacker J. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. Infect. Immun. 64, 2391-2399, 1996.
83. **Mengaud** J., Ohayon H., Gounon P., Mege R. M., and Cossart. P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. Cell 84, 923-932, 1996.

84. **Menon** E. B. and Tan E. S. Urinary tract infection in acute spinal cord injury. Singapore Med. J. 33, 359-361, 1992.
85. **Mobley** H. L. T. and Warren J. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. J. Clin. Microbiol. 25, 2216-2217, 1987.
86. **Mühle** H-W.: Das Zytoskelett der Endothelzelle: Bedeutung des Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystems für die Regulation der Endothelpermeabilität, HTML-Version 29.01.2004
87. **Nassif** X. and Sansonetti P. J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect. Immun. 54, 603-608, 1986.
88. **Nhieu** G.T., Enninga J., Sansonetti P., Grompone G. Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating Shigella invasion. *Curr Opin Microbiol*, 8, 16-20. 2005
89. **Niebuhr** K. and Sansonetti P. J. Invasion of epithelial cells by bacterial pathogens: the paradigm of Shigella. Subcell Biochem. 33: 251-287, 2000.
90. **Oelschlaeger** T. A. and Tall B. D. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. Infect. Immun. 65, 2950-2958, 1997.
91. **Oelschlaeger** T. A. Adhesins as invasins. Int J Med Microbiol. Apr;291(1):7-14, 2001
92. **Ørskov** I. and Fife-Asbury M. A. New Klebsiella capsular antigen, K82, and the deletion of five previously assigned. Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 386-387, 1979.
93. **Petit** A., Sirot D., Chanal C., Sirot J., Labia R., Gerbaud G. and Cluzel R.. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 626-630, 1988.
94. **Pizarro-Cerda** J., Cossart, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell 124: 715-27, 2006

95. **Podschn** R., A. Fisher and U. Ullmann. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. 276, 481-486, 1992.
96. **Podschn** R., Heineken P., Ullmann U. und Sonntag, H.-G. Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes, Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene Abteilung A 262, Seite 335-345, 1986
97. **Podschn** R., Penner I. and Ullmann U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 of human polymorphonuclear leucocytes. Microb. Pathog. 13, 371-379, 1992
98. **Podschn** R., Sivers D., Fisher A. and Ullmann U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. J. Infect. Dis. 168, 1415-1421, 1993
99. **Podschn R.**, Pietsch S., Hoeller C., Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Appl Environ Microbiol. 67(7):3325-7. 2001
100. **Ribatti** D., Loria M. P. and Tursi A. Lymphocyte-induced angiogenesis: A morphometric study in the chick embryo chorioallantoic membrane. Acta Anat. 142, 334-338, 1991.
101. **Ribatti** D., Vacca A., Roncali L. and Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. Int. J. Dev. Biol. 40, 1189-1197, 1996.
102. **Rietschel** ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seidel U, Di Padova F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB 217-225, 1994
103. **Rinnerthaler** G., Geiger B., Small J.V.. Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membran ruffles and microtubules. J. Cell Biol. 106: 747-760, 1988

104. **Romanoff** A. L. The avian embryo. Structural and functional development. The Macmillan Company, New York, 1960.
105. **Rosenbruch** M., Kniepen J. and Weishaupt C. The early chick embryo as a model to evaluate cardiovascular effects of adrenaline and nicotine. Toxic in vitro 7: 541-545, 1993.
106. **Rosenshine** I. and Finlay B. B. Exploitation of host signal transduction pathway and cytoskeletal function by invasive bacteria. BioEssays. 15, 17-24, 1993.
107. **Rous** P., Murphy J. B. Tumor implantations in the developing embryo. J. Am. Med. Assoc. 56, 741-742, 1911.
108. **Sahly** H., Podschun R., Oelschlaeger T.A., Greiwe M., Parolis H., Hasty D., Kekow J., Ullmann U., Ofek I. and Sela S.. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klesiella pneumoniae*. Infect. Immun. 68, 6744-6749, 2000.
109. **Sansonetti** P. J. and Egile C. Molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella flexneri*. Antonie Van Leeuwenhoek 74, 191-197, 1998.
110. **Sansonetti** P. J. Microbial pathogenesis: new paths into a new millennium. Trends Microbiol. 8(5):196-7, 2000
111. **Sansonetti** P. J. War and peace at mucosal surfaces. Nat Rev Immunol. 4(12):953-64. 2004
112. **Sattillaro** R.F. Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. Biochemistry 25: 2003-2009, 1986
113. **Schroten** H., Deadman M. and Moxon E. R. Entwicklung von Hühner-Embryonen-Modellen zur Untersuchung bakterieller Virulenzfaktoren. Paediatr. Grenzgeb. 34, 319-324, 1995.
114. **Schaeffer** A. J., Schwan W. R., Hultgren S. J. and Duncan J. L. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* in ascending urinary tract infections in mice. Infect. Immun. 55, 373-380, 1987.
115. **Schmidt**, H., Ruessmann H., Schwarzkopf A. , Aleksic S., Heesemann J., Karch H. Prevalence of attaching and effacing

- Escherichia coli* instool samples from patients and controls. Zentralbl Bakteriologie, 281:201–13, 1994.
116. **Schurtz** T. A., Hornick D. B., Korhonen T. K. and Clegg S. The type 3 fimbrial adhesine gene (mrkD) is not conserved among all fimbriate strains. Infect. Immun. 62, 4168-4191, 1994.
 117. **Scott**, D.A. and Kaper J.B.: Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. Infect Immun, 62(1):244–51, 1994
 118. **Selden** R., Lee S., Wang W. L. L., Bennet J. V. and Eickhoff T. C. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. Ann. Intern. Med. 74, 657-664, 1971.
 119. **Shannon** K., Stapleton P., Xiang X., Johnson A., Beattie H., El Bakri F., Cookson B. and French G. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 36, 3105-3110, 1998.
 120. **Sirot** D., Sirot J., Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille-Michaud A., Perroux R. and Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 20, 323-334, 1987.
 121. **Smith** S. M., Digori J. T. and R. H. K. Eng. Epidemiology of *Klebsiella* antibiotic resistance and serotypes. J. Clin. Microbiol. 16, 868-873, 1982.
 122. **Staton** C. A., Stribbling S. M., Tazzyman S., Hughes R., Brown N. J. and Lewis C. E. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. Int. J. Exp. Path. 85, 233-248, 2004.
 123. **Struve** C., Krogfelt K. A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. Environmental Microbiology. 6, 584-590, 2004.

124. **Struve** C., Krogfelt K. A. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiology Letters. 218, 149-154, 2003
125. **Sweeny** P. R. and Bather R. Chorioallantoic Membrane and Rous Sarcoma Virus. J Cell Biol. 36(2): 299–311, 1968.
126. **Tang** P., Foubister V., Pcciarelli M. G. and Finlay B. B. Methods to study bacterial invasion. J. Microbiol. Met. 18, 227-240, 1993.
127. **Tarkkanen** A.-M., Allen B. L., Westerlund B., Holthofer H., Kuusela P., Ristell L., Clegg S. and Korhonen T. K. Type V collagen as the target for type 3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. Mol. Microbiol. 4, 1353-1361, 1990.
128. **Tarkkanen** A.-M., Allen B. L., Williams P. H., Kauppi M., Haahtela K., Siitonen A., Orskov I., Orskov F., Clegg S. and Korhonen T. K. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infections. Infect. Immun. 60, 1187-1192, 1992.
129. **Terepka** A., Coleman J., Armbrecht H. and Gunter T. Transcellular transport of Kalzium. Symp. Soc. Exp. Biol., 30, 117-140, 1976.
130. **Tuan** R. S., Carson M. J., Jozefiak J. A., Knowles K. A. and Shotewell B. A. Calcium-transport function of the chick embryonic choriollantoic membrane. I. In vivo and in vitro characterization. J. Chell Sci. 82: 73-84, 1986.
131. **Tuan** R. S. Mechanism and regulation of Calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. J. Exp. Zool. Suppl. 1, 1-13, 1987.
132. **Ullmann** U. Die Gattungen Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Proteus, Providencia, Morganella, Hafnia und Edwardsiella, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag, 7.Auflage, 1994.
133. **Ulevitch** R.J., Tobias P.S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Immunology 11:19-22, 1999

134. **van Oss** C. J. Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 19-39, 1978.
135. **Verma** A., Desai N., Shannon K., Philpott-Howard J. and Hill R. L. Intra and inter-generic plasmid-mediated spread of cephalosporin and aminoglycoside resistance amongs *Klebsiella aerogenes* K41 and other enterobacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 123-129, 2001.
136. **Wiese** A., Brandenburg K., Ulmer A. J., Seidel U. and Müller-Loennies S. The dual role of lipopolysaccharide as effector and target molecule. *Biol. Chem.* 380,767-784, 1999.
137. **Yang** R.B., Mark M.R., Gray A., Huang A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W.I., Gurney A.L., Godowski P.J. Toll-like receptor - 2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-288, 1998
138. **Zwilling** E. A modified choriallantoic grafting procedure. *Transplant Bull* 6, 115-116, 1959.

7. Anhang

7.1 EM-Aufnahmen

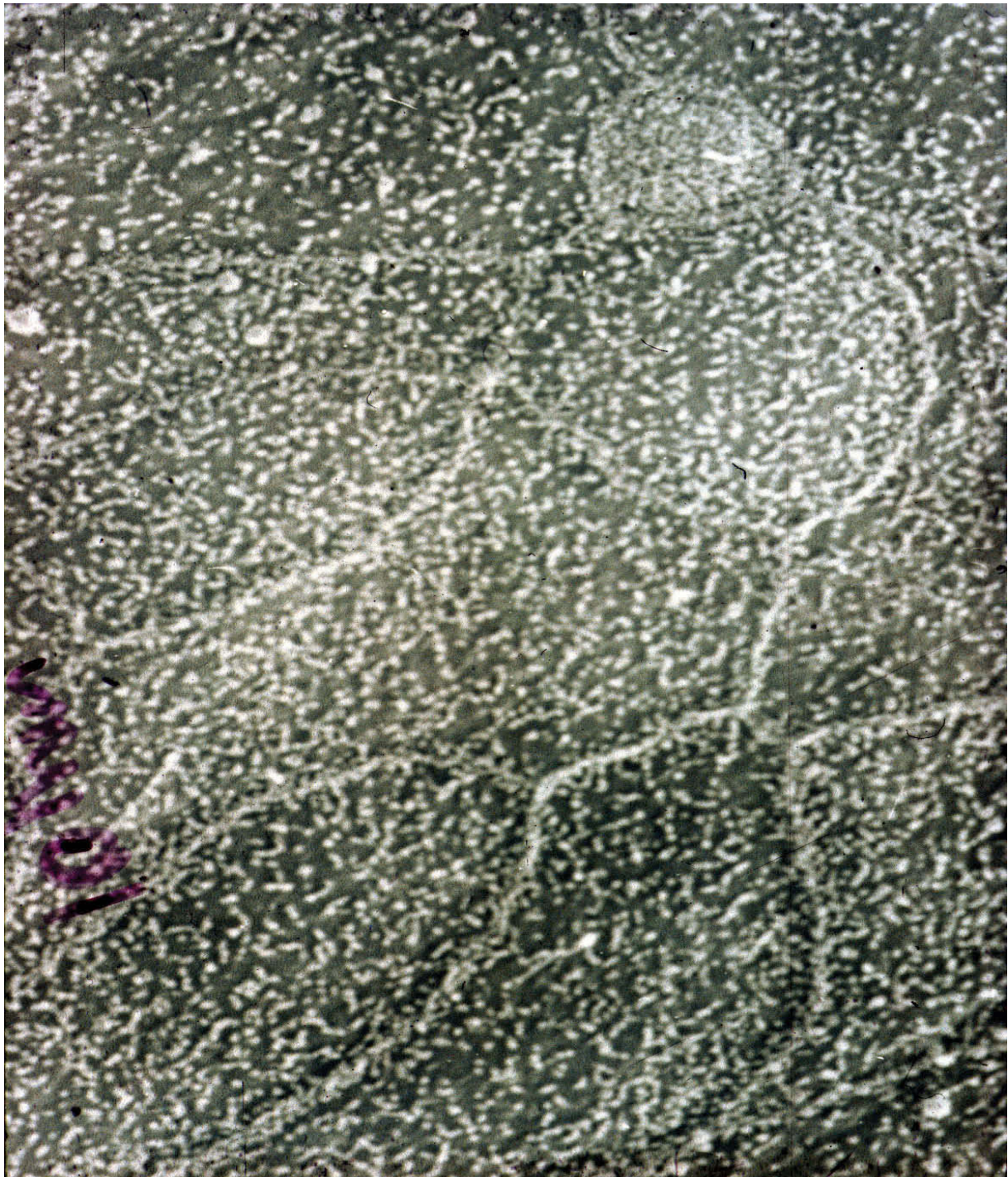


Abb. 32: Allantoisepithel am 10. Entwicklungstag, Rasterelektronenmikroskopie, der Balken entspricht 10µm. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Schroten)

7.2 Publikation

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Int. J. Med. Microbiol veröffentlicht (292 (3-4): 267-275, Sep. 2002).

7.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Schroten, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Dr. R. Adam danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit. Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes, insbesondere des Laborteams möchte ich mich für die Zusammenarbeit in einer optimalen Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Willers für die Hilfestellung und Durchführung der Statistik bedanken.

Das nach vielen Jahren der vielen Versuche und Ergebnisse letztendlich in Form diese Arbeit zusammengestellt wurden, verdanke ich vielen Menschen, die dazu beigetragen haben. Hier an dieser Stelle zu erwähnen Frau Zander für das Korrekturlesen sowie Herr Schmitges für seine Unterstützung beim Drucken der Arbeit.

Meiner lieben Frau danke ich für ihre Geduld und für die motivierenden Worte.

Ganz besonderen Dank gilt auch meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Shueb Mussa
geb. am 05.10.1970
in Kabul (Afghanistan)
verheiratet, 3 Kinder

Schul- und Berufsausbildung

1977 – 1982

Grundschule Kabul und Werther (Westfl.)

1982 – 1988

Carl-Fuhlrott-Schule, Erkrath

1988 – 1991

Heinrich-Hertz-Kollegscheule, Düsseldorf
Ausbildung zum Elektrotech. Assistenten
und gleichzeitiger Erwerb der Allgemeinen
Hochschulreife

Studium

Okt.1991 - Juli 1992

Studium der Elektrotechnik, Bergische
Universität Wuppertal

Okt.1993 - März 2000

Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf
Praktisches Jahr:
Kliniken der Heinrich- Heine-Universität
Düsseldorf

Berufl. Werdegang

Juli 2000- Sept.2005

AIP und Assistenzarzt in der Klinik für
Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
Maria-Hilf-Klinik Mönchengladbach
Rotationsassistent in der Klinik für Unfall-
und Gefäßchirurgie

Sept. 2005 bis Juni 2008

Assistenzarzt in der Klinik für Orthopädie/
Unfallchirurgie Maria-Hilf-Klinik
Mönchengladbach

Seit Juli 2008

Weiterbildungsassistent zum
Viszeralchirurgen in der Klinik für
Allgemein- und Viszeralchirurgie
Maria-Hilf-Klinik Mönchengladbach

Februar 2006

Facharzt für Allgemeinchirurgie

August 2008

Schwerpunkt für Unfallchirurgie

September 2009

Funktionsoberarzt der Klinik für
Allgemein- und Viszeralchirurgie
Maria-Hilf-Klinik Mönchengladbach

Mönchengladbach, den 07.12.2009

Shueb Mussa

Vergleich der Invasionsfähigkeit verschiedener *Klebsiella*-Stämme im Hühnerembryonen-Modell und Etablierung des in-vivo-Modells

Shueb Mussa ¹, Horst Schroten ²

1: Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2: Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Mannheim

Die CAM, die embryonale Chorioallantoismembran, wurde in „natural-air-sac“-Technik präpariert, um eine komplexe physiologische Barriere für Invasionsexperimente zur Verfügung zu haben. Zur Untersuchung der Invasivität und Mortalität verschiedener bakterieller Spezies und Stämme wurde in dieser Arbeit ein Hühnerembryonen-Modell etabliert.

Elf Tage lang wurden befruchtete Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ in einem Inkubator bebrütet. An der Stelle des natürlich entstandenen Luftraumes wurde mit der atraumatischen Präparation der dreischichtigen CAM begonnen. Unterhalb der CAM wird zur sequenziellen Probeentnahme der Allantoisflüssigkeit (AF) eine Kanüle eingebracht. Zur Überprüfung der Integrität des Membransystems folgten Penetrationsstudien mit inerten Substanzen, bakteriologische Tests sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Nach Sicherstellung der adäquaten Integrität wurde die CAM mit je einem von fünf verschiedenen *Klebsiella pneumoniae*-Stämmen und einem *E.coli*-Stamm (DH5a) entweder isoliert oder in Kombinationen inkubiert. Weiterhin wurde der *Klebsiella pneumoniae*-Stamm 625 in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren auf die CAM eingebracht. Bestimmte, zuvor festgelgte Mengen der AF, wurden zu definierten Zeitpunkten extrahiert und kultiviert. Man konnte nun Kinetiken über die Invasionsfähigkeit der verschiedenen Bakterien erstellen. In der folgenden Arbeit wurden außerdem untersucht, inwieweit Substanzen, die in die Regulation des Mikrotubulus- bzw. Mikrofilamentsystems eingreifen, die *Klebsiella pneumoniae* am Aufnahmeprozess hindern können.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich Erreger mit hohem Invasionspotential von Bakterien mit mittlerer und niedriger Penetrationsfähigkeit unterscheiden. Die Invasionsraten waren von den verwendeten Bakterienspezies und -stämmen abhängig. Eine signifikante Inhibition der Invasion durch Kolchizin, Zytocalasin D b.z.w. Chitinhydrolysat konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Vielmehr stiegen die Invasions- sowie die Mortalitätsraten unter den vermeintlichen Inhibitoren.

Die Resultate zeigten in der vorliegenden Arbeit letztendlich, dass die CAM ein nützliches Modell zwischen Zellkultur und Tierversuch darstellt. Es lassen sich in in-vivo-Studien eindeutige Aussagen über die Invasionsfähigkeit und Pathogenität der inokulierten Keime machen.



26.09

KLINIKUM MANNHEIM GmbH
Universitätsklinikum
Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Prof. Dr. H. Schroten
Direktor der Klinik
für Kinder- und Jugendmedizin
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim
e-mail: horst.schroten@klinik.uni-heidelberg.de