

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Fachrichtung Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saarg
Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier

Beobachtungen der Bakterien-Wirts-Interaktion in der Mäuselunge
- Eine Untersuchung *in vivo*

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von Liselotte Preu
geboren am 07. April 1990 in Bonn

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1	Summary	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Die Pneumonie.....	5
2.2	Modelle zur Intravitalmikroskopie	6
2.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.6	Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe	12
2.7	Fragestellungen.....	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Versuchstiere	15
3.2	Bakterienstämme und Kultivierung.....	15
3.2.1	Bakterienstämme	15
3.2.2	Stammhaltung.....	16
3.2.3	Verwendete Materialien	17
3.2.4	Kultivierung und Färbung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
3.2.5	Kultivierung und Färbung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
3.2.6	Kultivierung und Färbung von <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.3	Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie.....	23
3.3.1	Technischer Geräteaufbau	23
3.3.2	Lagerung der Versuchstiere	25
3.4	Anästhesie und Lungenpräparation	26
3.4.1	Applikation der Fremdpartikel und Farbstoffe.....	28
3.5	Versuchsgruppen	29
3.5.1	Versuchsgruppe I.....	30
3.5.2	Versuchsgruppe II	31
3.6	Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen	32
3.6.1	Auswertung Versuchsgruppe I.....	32

3.6.2	Auswertung Versuchsgruppe II.....	35
3.7	Histologie.....	36
3.8	Statische Auswertung	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Ergebnisse der Versuchsgruppe I	37
4.1.1	Quantifizierung von Zellen mit $D \geq 10,5 \mu\text{m}$	37
4.1.2	Quantifizierung von Zellen mit $D < 10,5 \mu\text{m}$	38
4.1.3	Quantifizierung von Bakterien	41
4.2	Ergebnisse der Versuchsgruppe II	42
4.3	Morphologie	45
5	Diskussion.....	51
5.1	Diskussion der Methodik.....	51
5.2	Diskussion der Ergebnisse	53
6	Literaturverzeichnis	59
7	Publikationen	68
8	Danksagung	69

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1 :	Bakterienkultivierung/-färbung: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
Tab. 2 :	Verwendete Puffer, Lösungen und Nährmedien	18
Abb. 3 :	Technischer Geräteaufbau	23
Tab. 4 :	Intravitalmikroskopie: Verwendete Geräte	24
Abb. 5 :	Lagerung des Versuchstiers während der Mikroskopie	25
Abb. 6 :	Rechte Lunge nach Präparation.....	27
Abb. 7 :	Positionierung des Deckgläschens auf der Lungenoberfläche	28
Abb. 8 :	Zeitlicher Versuchsablauf Gruppen Ia, Ib, Ic	30
Abb. 9 :	Zeitlicher Versuchsablauf Gruppe II.....	31
Abb. 10 :	Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	33
Abb. 11 :	Intravitalmikroskopische Aufnahme, nach Auswertung	34
Abb. 12 :	Ergebnisse Ia, Ib, Ic : Makrophagen pro mm ²	37
Abb. 13 :	Ergebnisse Ia, Ib, Ic : Neutrophile Granulozyten pro mm ²	38
Abb. 14 :	Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit 6A.....	39
Abb. 15 :	Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit Newman	39
Abb. 16 :	Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit PA14	40
Abb. 17 :	Intrapulmonale Blutgefäße nach Infektion mit 6A.....	40
Abb. 18 :	Ergebnisse Ia, Ib, Ic : Bakterien/-konglomerate pro mm ²	41
Abb. 19 :	Auswertung Versuchsgruppe II: Aufnahme unter dem Blaufilter	43
Abb. 20 :	Auswertung Versuchsgruppe II: Aufnahme unter dem Grünfilter.....	43
Abb. 21 :	Auswertung Versuchsgruppe II: verschmolzene Aufnahme.....	44
Abb. 22 :	Aufnahme eines Lungenabschnitts nach Infektion mit 6A	46
Abb. 23 :	Aufnahme eines Lungenabschnitts nach Infektion mit 6A	46
Abb. 24 :	Aufnahme eines Lungenabschnitts nach Infektion mit PA14.....	47
Abb. 25 :	EM-Bild: Pneumokokken im Alveolarraum	47
Abb. 26 :	EM-Aufnahme des Alveolarraums nach Infektion mit 6A	48
Abb. 27 :	EM-Bild: <i>P. aeruginosa</i> im Alveolarraum.....	48
Abb. 28 :	EM-Aufnahme: Alveolarepithelzelle Typ II	49
Abb. 29 :	EM-Bild des Alveolarraums nach Infektion mit PA14.....	49
Abb. 30 :	EM-Bild: Alveolarmakrophage nach Infektion mit <i>S. aureus</i>	50

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Arteria
Abb	Abbildung
Abk	Abkürzung
Abs	Absatz
AEC II	Alveolarepithelzellen vom Typ II
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bzw	Beziehungsweise
ca	circa
CAP	community acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
CCD	charged coupled device
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFSE	Carboxylfluoresceyl succinyl ester
CFU	Colony Forming Unit = koloniebildende Einheit
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
D	Durchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
Eap	Extrazelluläres Adhärenz Protein
EM	Elektronenmikroskopie
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FnBP	Fibronectin bindendes Protein
g	Gramm
G	Gravitationskonstante
h	Stunde
HAP	Hospital acquired pneumonia = im Krankenhaus erworbene Pneumonie
HE	Hämatoxylin-Eosin
IVM	Intravitalmikroskopie
M	Molarität, mol pro liter
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NET	neutrophil extracellular trap
nm	Nanometer

OD	optical density = optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600nm
p	Prozentuale Angabe des Signifikanzniveaus
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA 14	Abkürzung des verwendeten Pseudomonadenstamms
PBS	phosphate buffered saline
PEEP	positive end-expiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PLY	Pneumolysin
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
S2	Labor der Schutzstufe 2 nach Biostoffverordnung
SD	Standardabweichung
Sec	Sekunde
SP-A	Surfactant-Protein A
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TLR	Toll-like Rezeptor
TSB	Tryptic Soy Broth
Upm	Umdrehungen pro Minute
W	Watt
\bar{x}_{arithm}	Arithmetisches Mittel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen der unteren Atemwege stellen ein ernstzunehmendes Krankheitsbild dar und können zum Tode führen. Der Verlauf einer Pneumonie hängt dabei wesentlich von der Immunantwort des Patienten ab, wobei Alveolarmakrophagen, Monozyten und Granulozyten hier eine zentrale Rolle bei der Phagozytose der Invasoren spielen. Die Abwehrmechanismen in der Alveole sind bisher nicht vollständig bekannt und nur vereinzelt *in vivo* beobachtet worden. Ziel der vorliegenden Studie war es, mithilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Aufnahme von vitalen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Bakterien in C57BL/6-Mäusen zu untersuchen. *Streptococcus pneumoniae* als häufigster Erreger der „community acquired pneumonia“ sowie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* als häufige Pathogene der „hospital acquired pneumonia“ stehen in dieser Arbeit im Fokus [Pletz *et al.*, 2012].

Einer Gruppe von Versuchstieren wurde eine Bakteriensuspension des jeweiligen Stammes intratracheal verabreicht. Die Tiere wurden zuvor narkotisiert, tracheotomiert und beatmet. Dreißig Minuten nach Instillation der Bakterien erfolgte eine Hemithorakotomie nach dem Homburger Modell und die freipräparierte rechte Lunge wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem für die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes geeigneten Filter gefilmt. Es konnten Zellen unterschiedlicher Größe beobachtet werden, die durch die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Bakterien unter dem Mikroskop sichtbar wurden. Mithilfe der CapImage-Software wurden die Zellen vermessen, nach Durchmesser differenziert und Zellreihen zugeordnet. Die Zellen wurden quantifiziert und die erhobenen Daten in Microsoft Excel überführt. Bei der Beobachtung der äußeren Alveolen konnten unterschiedlich viele kleine, als residente beziehungsweise rekrutierte Monozyten und neutrophile Granulozyten gewertete Zellen sowie große, als Alveolarmakrophagen gewertete Zellen pro Flächeneinheit detektiert werden. In den Lungen der mit Pneumokokken infizierten Mäuse wurden hierbei im Vergleich zu den anderen Bakterienspezies wesentlich mehr kleine als große fluoreszierende Zellen beobachtet, wohingegen nach der *Pseudomonas aeruginosa*-Inokulation überwiegend große Zellen in den äußeren Alveolen detektiert wurden. Bei der Infektion mit Staphylokokken konnte insgesamt die höchste Zahl an markierten Zellen beobachtet werden. Zusammenfassend beurteilt weisen unsere Untersuchungen darauf hin, dass die hier getesteten Bakterienspezies unter *in vivo* Bedingungen durch die in der murinen Lunge präsenten Phagozytenpopulationen unterschiedlich aufgenommen werden.

Die Mechanismen, die diesen oben genannten Phänomenen zugrunde liegen sowie deren Bedeutung für die Fähigkeit dieser Bakterienspezies, Pneumonien auszulösen, müssen noch näher untersucht werden. Weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen zu diesen Fragestellungen sind mit dem Homburger Modell realisierbar.

Mithilfe einer zweiten Gruppe von Versuchstieren wurde der Frage nachgegangen, ob die Phagozytose von Bakterien durch aus dem Blutgefäßsystem eingewanderte Leukozyten *in vivo* beobachtet werden kann. In tiefer Anästhesie wurde den Tieren ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, welcher in Leukozyten akkumuliert, in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Anschließend folgte der Versuchsablauf dem gleichen Protokoll wie in der ersten Versuchsgruppe. Bei den intratracheal instillierten Erregern handelte es sich um fluoreszenzmarkierte Pneumokokken. Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgten unter 2 verschiedenen Filtern, die für die Detektion der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe geeignet waren. Es wurden Aufnahmen der gleichen Lungenabschnitte unter beiden Filtern angefertigt. Anschließend wurden fluoreszenzmarkierte Zellen mithilfe der CapImage-Software vermessen und quantifiziert. Die entstandenen Bildpaare wurden in das Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.8. überführt und unter Berücksichtigung alveolärer und interstitieller Strukturen deckungsgleich übereinander gelegt und miteinander zu einem Bild verschmolzen. Nun wurde bewertet, ob Zellen eine Markierung mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen zeigten. Es stellte sich heraus, dass sowohl einzelne große als auch kleine Zellen eine Doppelmarkierung aufwiesen. Demnach können in dieser frühen Phase der Infektion Leukozyten nachgewiesen werden, die aus dem Blutgefäßsystem in pulmonale Strukturen eingewandert sind und bereits Einschlüsse mit fluoreszenzmarkierten Bakterien aufweisen.

Die vorliegende Arbeit berichtet über ein Verfahren, mit dem es möglich ist, die Initialphase einer durch Bakterien verursachten Infektion zu beobachten, Bakterien-Phagozyten-Interaktionen zu beurteilen und Unterschiede zwischen verschiedenen Erregern zu quantifizieren sowie die Phagozytose von Erregern durch eingewanderte Leukozyten nachzuweisen. Langfristig soll diese Technik genutzt werden, um die Einflüsse von erregerspezifischen Virulenzfaktoren und molekularen Mechanismen der Immunabwehr im murinen *in vivo*-Modell zu untersuchen. Dies soll dazu beitragen, den Verlauf einer Infektion besser zu verstehen und auf neue Ansatzpunkte für Therapien hinweisen.

1 Summary

Visualisation of initial host response to bacteria in the lung of living mice

In developed countries infections of lower respiratory tract are still one of the most frequently infectious diseases and are a major cause of mortality. Community acquired pneumonia is often caused by *Streptococcus pneumoniae* whereas *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* play an important role as pathogens in hospital acquired pneumonia [Pletz *et al.*, 2012]. Clinical course and prognosis are affected by initial immune response including cellular host defense. Phagocytes like alveolar macrophages and neutrophils are involved in pathogen clearance. In several *in vitro* models phagocytosis has been analysed, but *in vivo* in the alveoli mechanisms aren't enough investigated and directly observed.

Here, we investigated phagocytosis of different bacteria species by using intravital microscopy of murine lung. That followed a large thoracotomy with observing the alveolar surface for 30 minutes. C57BL/6-Mice were anesthetized, intubated via tracheotomy and ventilated. 100 µl suspensions of fluorescence labelled *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were injected into the inspiration limb of respirator. Afterwards a large thoracotomy removing the complete anterior part of right hemithorax was performed. Half an hour after application of bacteria imaging was commenced for 30 minutes, using a filter suitable to detect fluorescent dye. The whole surface of the right lung could be investigated.

Microscopic images were recorded by a charge-couple device video camera and a video recorder for off-line analysis. Images of each animal were analysed by using capimage software. Next to small bacterias phagocytes appeared in intravital microscopy as bright, large, round structures because of containing intracellular fluorescent bacteria. Based on electron microscopy studies and preliminary studies we differentiate for further evaluation between small and large phagocytes by measuring cellular diameter. Fluorescence labelled cells were ranged. Smaller phagocytes were ranked among neutrophils, larger phagocytes among alveolar macrophages.

Animals, infected by *P. aeruginosa* PA14, showed in contrast to animals infected with *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, an increasing number of fluorescent alveolar macrophages, whereas most smaller phagocytes were observed in mice contaminated with *Streptococcus pneumoniae*. In mice infected with *Staphylococcus aureus* we found the highest number of fluorescent phagocytes. In conclusion several bacteria species were internalized by pulmonary phagocytes in different ways. Partly significant differences were shown. Focusing one bacteria species and observing bacteria mutants unable to express single

virulence factors could be enlightening to understand molecular mechanisms of cellular host defense in mice.

In other studies we focused on phagocytosis by leucocytes invaded from bloodstream. A fluorescent dye, labelling leucocytes, was injected in retrobulbar blood vessels. Following the same test procedure as before fluorescent labelled bacteria were instilled intratracheally and a preparation was performed. We observed that some labelled leucocytes in pulmonary pneumococci infection could be recorded by the filter set detecting bacterial fluorescent dye.

Therefore we could draw the conclusion, that already 30 minutes after infection leucocytes invade pulmonary tissue and contain fluorescent bacteria intracellular. Mechanism explaining these observations must be investigated in further experiments.

In this dissertation we report on a method, which has enabled us to observe early cellular host defense in mice *in vivo*. It offers an promising possibility to investigate and understand molecular mechanisms in pathogen host interaction and can contribute to find new targets for therapy.

2 Einleitung

2.1 Die Pneumonie

Pneumonien stellen nach wie vor weltweit eine der wichtigsten Infektionskrankheiten dar. Die Einteilung der Pneumonien in verschiedene Gruppen liefert dabei Hinweise auf die Ätiologie, die zielführende Diagnostik und Therapie der Erkrankung. Man unterscheidet die Gruppe der ambulant erworbenen Pneumonien (engl. Community-acquired pneumonia, CAP), die Gruppe der nosokomialen Pneumonien (engl. Hospital-acquired pneumonia, HAP) und die Gruppe der Pneumonien unter Immunsuppression [Pletz *et al.*, 2012].

Das Überleben der Pneumoniepatienten konnte in den vergangenen Jahrzehnten weder durch die Neuentwicklung antiinfektiver Substanzen noch durch die Weiterentwicklung von in die Immunmodulation eingreifender Therapieprinzipien wesentlich positiv beeinflusst werden [Pletz *et al.*, 2012]. Immer häufiger wird beobachtet, dass Erreger multiple Resistenzen gegen Standardantibiotika entwickeln und dadurch bedingt das Infektionsmanagement erheblich erschwert ist. Dies führt dazu, dass die CAP in den USA und in Europa nach wie vor die häufigste infektiöse Todesursache darstellt [Blasi *et al.*, 2012].

In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Patientenalter sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität der CAP stark ansteigt [Fung und Monteagudo-Chu, 2010]. Somit ist angesichts der demographischen Entwicklung und der alternden europäischen Bevölkerung in den nächsten Jahrzehnten ein bedeutender Anstieg der stationären Aufnahmen bei Pneumonie und der hierdurch entstehenden Kosten zu erwarten [Trotter *et al.*, 2008].

Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, im ambulanten und klinischen Alltag den Schweregrad und Mortalitätsrisiko einer Pneumonie abschätzen zu können sowie die Frage zu klären, ob eine ambulante oder stationäre Therapie vonnöten ist. Zur Risikostratifizierung wurden daher verschiedene Score-Systeme etabliert.

Im Praxis- und Klinikalltag findet vor allen Dingen der CRB-65-Score (C = Confusion = Verwirrtheit, R = Respiratory Rate = Atemfrequenz, B = blood pressure = Blutdruck, 65 = Patientenalter \geq 65 Jahre) Anwendung. Er ist einfach zu erheben und ermöglicht es, Patienten mit erhöhtem Sterblichkeitsrisiko zu identifizieren und gegebenenfalls rechtzeitig einer stationären Therapie zuzuführen [Bauer *et al.*, 2006].

Einen weiteren bedeutenden Faktor stellt dar, durch welchen bzw. welche Erreger die Pneumonie verursacht wird. Der *Streptococcus pneumoniae* stellt hier das am häufigsten bei der CAP nachgewiesene Pathogen dar, gefolgt vom *Staphylococcus aureus* als zweithäufigster

identifizierter Erreger [Aliberti und Kaye, 2013]. Bei Pneumokokkenpneumonien treten im Vergleich zur Infektion mit anderen Erregern häufiger Verwirrtheit, Luftnot, Fieber und Thoraxschmerzen auf. Außerdem werden im Vergleich höhere Werte für C-reaktives Protein, Harnstoff und Leukozyten erhoben. [Pletz *et al.*, 2011]

Ferner stellt der *Streptococcus pneumoniae* neben dem Influenzavirus gegenwärtig den einzigen Erreger der CAP dar, für den Impfstoffe zugelassen sind [Pletz *et al.*, 2010].

Neben Infektionen durch grampositive Bakterien stellen auch die Infektionen durch den gramnegativen, opportunistischen Krankheitserreger *Pseudomonas aeruginosa* ein ernstzunehmendes Problem dar. Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* treten vor allen Dingen in bestimmten Syndromen auf. Die CAP durch diesen Keim wird häufig durch eine Kolonisation der oberen Atemwege bedingt. Betroffen sind in erster Linie Kinder mit Cystischer Fibrose sowie Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen [Arancibia *et al.*, 2002]. Häufiger ist jedoch die durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachte HAP, ebenfalls bei Patienten mit chronischer Lungenerkrankung. Wesentliche Punkte in der Pathogenese sind die Aspiration von kontaminierten Verneblerflüssigkeiten und eine mechanische Beatmung. Die bakteriämische *Pseudomonas aeruginosa*-Pneumonie, bei der die Lunge durch hämatogene Streuung infiziert wird, spielt vor allen Dingen bei immunsupprimierten Patienten eine Rolle. [Schimpff *et al.*, 1971, Hilf *et al.*, 1989]

Alle Formen der Pneumonien haben gemeinsam, dass der Verlauf einer Infektion vor allem durch die Immunantwort des Patienten bestimmt wird. Das Immunsystem hält zum Schutz des Respirationstrakts zahlreiche Abwehrsysteme bereit. Das angeborene Immunsystem umfasst unter anderem die erregerunspezifische zelluläre Immunantwort, bestehend aus Alveolarmakrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten.

2.2 Modelle zur Intravitalmikroskopie

Informationen über die frühe Bakterien-Wirts-Interaktion in der Lunge sind sehr begrenzt. Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten haben sich bisher auf die Untersuchung der Phagozytoseaktivität im *in vitro*-Modell fokussiert. Ein murines *in vivo*-Modell zur Darstellung der Interaktion zwischen Pathogenen und Phagozyten in der Lunge wurde von Nils T. Veith, Institut für Anatomie, Homburg, Deutschland etabliert [Veith, 2014].

Nach Kenntnisstand des Verfassers ist diese Methodik bisher die einzige, bei der die multifokale Beobachtung der Wirts-Erreger-Interaktion in der Lunge durch Intravitalmikroskopie im Fokus steht.

Andere intravitalmikroskopische Ansätze dienten bei der Entwicklung des Homburger Modells als Orientierung. Sie ermöglichen jedoch nur die Beobachtung eines kleinen pulmonalen Ausschnittes. Diese Modelle fokussieren sich auf die Untersuchung der Mikrozirkulation und Leukozytenadhäsion in Gefäßen in der murinen Lunge.

Zur Darstellung der pulmonalen Mikrozirkulation wurde das Modell nach Tabuchi entwickelt. Hierbei wird über dem rechten Oberlappen durch chirurgische Teilexzision der 3.-5. Rippe ein 7-10 mm großes Fenster geschaffen, auf das eine transparente Polyvinylidene-Membran aufgebracht wird. Über einen transdiaphragmalen Katheter im rechten Pleuraspalt wird die intrathorakale Luft abgesaugt, die Polyvinylidene-Membran lagert sich der Lungenoberfläche an und der Lungenabschnitt steht der Intravitalmikroskopie zur Verfügung. Die restliche Lunge kann relativ unbeeinflusst ventiliert werden. Auf diese Art und Weise wird eine Observationszeit von knapp 2 Stunden ermöglicht [Tabuchi *et al.*, 2008].

Das Modell nach Looney zur Untersuchung der Leukozytenadhäsion verwendet ebenfalls ein Thoraxfenster zur *in vivo*-Beobachtung. Auch bei diesem Modell werden 3 Rippen teilweise reseziert. Ein Stahlring wird als starre Abstützung auf das Thoraxfenster aufgebracht. Über eine Vakuumpumpe wird ein Sog von 20-25 mmHg auf die darunterliegende Lungenoberfläche ausgeübt. Dadurch wird die Lunge während der gesamten Ventilation im Fenster stabilisiert und ein Bereich mit 4 mm Durchmesser steht nun für mindestens 3 Stunden zur Mikroskopie der Lungen zur Verfügung. [Looney *et al.*, 2011].

Auf Basis beider Modelle wurde das Homburger Modell entwickelt. Es handelt sich hierbei um eine schnelle Operationstechnik, die es durch eine große Thorakotomie ermöglicht, große Teile der Lungenoberfläche zu mikroskopieren. Bewegungsartefakte durch Herzschlag und Atmung werden durch Anlage eines positiven endexpiratorischen Drucks (engl. positive end-expiratory pressure, PEEP) sowie kurze Beatmungspausen während der Videoaufnahme reduziert.

Das Modell ermöglicht die Beurteilung der Bakterien-Wirts-Interaktion nach intratrachealer Instillation von Erregern im murinen *in vivo*-Modell. Aufgrund der oben beschriebenen Ätiologie und Epidemiologie der Pneumonien sowie der klinischen Bedeutsamkeit einzelner Erreger konzentrierten sich die Infektionsversuche auf *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3 *Streptococcus pneumoniae*

Der *Streptococcus pneumoniae* ist ein hoch invasives, grampositives, extrazellulär lebendes Bakterium. Er gehört zur Gruppe der α -hämolyisierenden Streptokokken und verursacht ein breites Spektrum von Erkrankungen, von milden Atemwegsinfektionen wie Sinusitiden und Mittelohrentzündungen bis hin zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie Pneumonie, Sepsis und Meningitis [Henriques-NormarkTuomanen EI, 2013].

Durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren wird die Pathogenität des *S. pneumoniae* in der Lunge bedingt. Im Folgenden sind einige Faktoren beschrieben.

Die Oberfläche der Pneumokokken ist von einer Polysaccharidkapsel umgeben, welche das Bakterium vor Phagozytose schützt [Henriques-NormarkTuomanen EI, 2013]. Es existieren 92 verschiedene Serotypen der Polysaccharidkapsel. Die Kapsel verhindert unter anderem, dass Komplementproteine wie das iC3b und der Fc-Teil von Immunglobulinen auf der Bakterienoberfläche mit dem dazugehörigen Rezeptor auf der Phagozytenoberfläche interagieren kann [Musher, 1992]. Zudem kommt der Kapsel eine wichtige Funktion bei der Kolonisation zu. Sie verhindert die mechanische Elimination des Erregers durch Mucus und reduziert den Kontakt mit Antibiotika [Nelson *et al.*, 2007, van der Poll und Opal, 2009].

Die Mehrzahl der Pneumokokken produziert zudem das Protein Pneumolysin (PLY). Das Toxin gehört zur Familie der Poren-bildenden Toxine. Es bindet an Membrancholesterol, formt große Poren und führt auf diese Weise zur Autolyse der Zelle. Zudem ist PLY in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren [Mitchell und Mitchell, 2010] und durch Interaktion mit dem Toll-like-Rezeptor 4 eine proinflammatorische Antwort zu induzieren [Malley *et al.*, 2003]. In Studien konnte gezeigt werden, dass PLY-defiziente Pneumokokkenstämme in der Lunge im Vergleich zu Wildtypstämmen weniger Inflammation verursachen und zu einem verspäteten und reduzierten Zellrecruitment führen. Die Antwort von neutrophilen Granulozyten ist hierbei am stärksten beeinträchtigt [Mitchell und Mitchell, 2010].

Ein Teil der Pneumokokkenstämme bildet zudem Pili aus, die die Bindung der Pneumokokken an Epithelzellen ermöglichen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine stimulieren [Barocchi *et al.*, 2006].

Einen weiteren Virulenzfaktor stellt das Adhesin „PsrP“ (Abk. für Pneumococcal serine-rich repeat protein) dar, das die Bindung der Pneumokokken an das Lungenepithel vermittelt und eine wichtige Rolle bei der Aggregation von Bakterien und der Ausbildung von Biofilmen spielt [Sanchez *et al.*, 2010].

Für die tierexperimentellen Versuche wurde ein Pneumokokkenstamm vom Serotyp 6A verwendet. In Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Serotyp im Vergleich zu anderen Stämmen (Referenzstamm Serotyp 14) mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko bei einer bakteriämischen Pneumonie einhergeht [Weinberger *et al.*, 2010]. Allerdings neigt der Serotyp 6A seltener als andere Stämme dazu, eine invasive Pneumokokkenerkrankung (engl. invasive pneumococcal disease, IPD) auszulösen [Dockrell *et al.*, 2012]. Er gilt als Kolonisationskeim und weist eine hohe Resistenz gegen die Tötung durch neutrophile Granulozyten auf [Weinberger *et al.*, 2009]. Die Ingestion durch Alveolarmakrophagen sowie die Anfälligkeit der Kapsel gegen Angriffe durch das Komplementsystem sind bei diesem Serotyp gegenüber invasiven Serotypen wie Serotyp 4 und 7 F erhöht [Hyams *et al.*, 2010, Sanchez *et al.*, 2011].

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein bevorzugt in Böden und Wasser vorkommendes, gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, das ein breites Spektrum von akuten und chronischen Infektionen verursachen kann. Aufgrund der intrinsischen Resistenz des *P. aeruginosa* gegen quartäre Amine sowie weitere Microbizide stellt die Eradikation dieses Keims von Equipment und Oberflächen in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen eine besondere Herausforderung dar [Lavoie *et al.*, 2011].

P. aeruginosa verfügt zur Motilität und Adhäsion in biotischer und abiotischer Umgebung über verschiedene Virulenzfaktoren.

Das Bakterium besitzt ein polares, monotriches Flagellum, das dem Bakterium Mobilität verleiht und vor allen Dingen in der Initialphase einer pulmonalen Infektion von Bedeutung ist. Es aktiviert durch Bindung an TLR5 auf Atemwegsepithelzellen die IL-8-Produktion. IL-8 zeichnet sich vor allen Dingen durch chemotaktische Effekte auf B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Granulozyten aus und kann so eine protektive Immunantwort auf die *P. aeruginosa*-Infektion bewirken. [Murphy *et al.*, 2000]. Nach Kolonisation der Lunge wird die Flagellenexpression eingestellt [Adamo *et al.*, 2004].

Für die Anlagerung an eukaryotische Zellen weist *P. aeruginosa* zudem polare Pili auf, die indirekt über einen Rezeptorkomplex, bestehend aus TLR-2 und anderen Komponenten, NF- κ B und weitere proinflammatorische Gene aktivieren [Soong *et al.*, 2004].

P. aeruginosa bildet außerdem Stoffe, die Immunzellen entweder direkt inhibieren oder eine zytotoxische Wirkung entfalten. *P. aeruginosa* verfügt über zwei wichtige Sekretionssysteme, Typ II und Typ III. Während das Sekretionssystem Typ II vor allen Dingen die extrazelluläre

Sekretion von Proteasen, Lipasen und Toxinen vermittelt, ermöglicht das Typ III-Sekretionssystem die Translokation von pathogenen Proteinen in das Zytosol eukaryontischer Zellen. *P. aeruginosa* sezerniert über das Typ III-System folgende, bisher entdeckte Proteine: ExoS, ExoT, ExoU und ExoY. Diese Exotoxine induzieren unter anderem TNF- α und wirken zytotoxisch [Sadikot *et al.*, 2005].

Pyocyanin, ein redoxaktives Phenazin, kann die Apoptose von neutrophilen Granulozyten *in vitro* [Prince *et al.*, 2008] und *in vivo* [Allen *et al.*, 2005] triggern. In Studien konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa*-Stämme, die kein Pyocyanin bilden können, in der murinen Lunge sowohl bei einer akuten Infektion als auch bei persistierender Kolonisation eine höhere Clearance aufweisen als Wildtyp-Stämme [Lau *et al.*, 2004, Allen *et al.*, 2005, Caldwell *et al.*, 2009].

P. aeruginosa sezerniert zudem sogenannte Rhamnolipide, die zur Lyse verschiedenener zellulärer Komponenten des menschlichen Immunsystems führen. Es konnte im murinen Modell gezeigt werden, dass bei persistierender Kolonisation Rhamnolipidsynthese-defiziente Bakterien schneller als Wildtypstämme aus der Lunge eliminiert wurden [Van Gennip *et al.*, 2009].

Für die tierexperimentellen Versuche wurde der *P. aeruginosa*-Stamm PA14 (ATCC 27853) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen häufig in Tiermodellen verwendeten, hochvirulenten Stamm, der unter anderem in der Lage ist, Pyocyanin zu produzieren.

2.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein gram-positives, fakultativ anaerobes Bakterium, das durch eine Polysaccharidkapsel vor Phagozytose geschützt wird.

Im Respirationstrakt kann es ein breites Spektrum von Infektionen hervorrufen, von der asymptomatischen Kolonisation bis hin zur fulminanten, nekrotisierenden Pneumonie [Parker und Prince, 2012].

Staphylokokken bilden im Vergleich zu Streptokokken das Enzym Katalase. Diese Eigenschaft kann zum Nachweis des Erregers getestet werden. *S. aureus* verfügt zudem über die Eigenschaft, die Gerinnung von Fibrinogen zu induzieren. Daher wird er zu den Koagulase-positiven Staphylokokken gezählt. Die Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken umfasst Erreger wie *S. epidermidis*, *S. hominis* und *S. lugdunensis*, die weit weniger virulent sind [Lowy, 1998].

Die Pathogenität von *S. aureus* wird durch eine Vielzahl von verschiedenen Virulenzfaktoren bedingt, die auf eine bisher noch unzureichend verstandene Art und Weise interagieren und eine Anpassung an den Wirtsorganismus erlauben. Im Folgenden sind exemplarisch einige Faktoren beschrieben, die für die Pathogenese einer Pneumonie, verursacht durch *S. aureus*, relevant sind.

Zahlreiche Adhäsionsproteine vermitteln die Bindung und Interaktion von *S. aureus* mit Wirtszellen und der extrazellulären Matrix. Man unterscheidet sezernierte Adhäsionsproteine (engl. secretable expanded repertoire adhesive molecules, SERAMs) von auf der Bakterienoberfläche gebundenen Adhäsionsproteinen (engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs). Die MSCRAMMs umfassen eine Gruppe von Adhäsinen, die die initiale Anlagerung an Wirtszellen und zum Teil die Invasion in diese ermöglichen [Parker und Prince, 2012]. *S. aureus* verfügt über Fibronectin-bindende Proteine (FnbA und FnbB), die die Internalisierung in nicht-professionelle Phagozyten wie Epithelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Keratinozyten vermitteln [Schaffer *et al.*, 2006, Fraunholz und Sinha, 2012]. Die Clumping-Faktoren A und B besitzen die Fähigkeit, an Fibrinogen zu binden. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass für die Entwicklung pulmonaler Infektionen der Clumping-Faktor B von besonderer Bedeutung ist, da er die Bindung an Zytokeratine nasaler Epithelzellen und somit die Kolonisation der Nasenhöhle möglich macht [Parker und Prince, 2012].

Zur Gruppe der sezernierten Exoproteine gehört unter anderem das α -Toxin (syn. α -Hämolysin, kodiert durch *hla*). Es handelt sich hierbei um ein sezerniertes Toxin, das einerseits durch Bildung kleiner Poren in der Zellmembran und andererseits durch Interaktion mit der Metalloproteinase ADAM10 zytotoxisch wirken kann. In *in vitro*- und *in vivo*-Modellen konnte die Virulenz von Hla in der Lunge nachgewiesen werden. In murinen Pneumoniemodellen konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *hla*-defizienten Stämmen im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Stämmen mit einer signifikant verminderten Mortalität, pulmonalen Inflammation sowie einem verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten einhergeht [Parker und Prince, 2012].

Das „extrazelluläre Adhärenzprotein“ (Eap) gehört ebenfalls zur Gruppe der SERAMs. Es trägt unter anderem zur Internalisierung der Erreger in Wirtszellen bei. Dadurch sind diese vor dem Immunsystem geschützt [Fraunholz und Sinha, 2012]. Zudem interagiert Eap mit ICAM-1, einem Oberflächenprotein auf Endothelzellen, und verhindert auf diesem Wege die Diapedese von Leukozyten aus dem Blut ins entzündete Gewebe. Dies konnte *in vitro* gezeigt werden [Chavakis *et al.*, 2002]. Andererseits bindet das vom Wirt insbesondere in der Lunge

produzierte Surfactant-Protein A (Sp-A) an Eap und steigert so die Opsonierung, Phagozytose und Tötung der Erreger [Sever-Chroneos *et al.*, 2010].

In Interaktion mit der zellulären Immunantwort steht auch das Panton-Valentine-Leukozidin. Es stellt ein porenbildendes Toxin dar, das die Apoptose von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen beim Menschen und Kaninchen, nicht aber bei Mäusen und nicht-menschlichen Primaten, hervorruft. In Pneumoniemodellen mit Kaninchen konnte gezeigt werden, dass PVL-positive *S. aureus*-Stämme nekrotisierende Pneumonien induzieren können [Labandeira-Rey *et al.*, 2007, Parker und Prince, 2012].

Die Behandlung von *S. aureus* – Infektionen mit Antibiotika wird zudem durch β -Lactamasen eingeschränkt, die Penicilline inaktivieren. Hinzu kommt die Bildung von Penicillin-bindenden Proteinen, die die Resistenzentwicklung gegenüber β -Lactamase-stabilen Penicillinen und Cephalosporinen begünstigen [Lowy, 1998].

In den tierexperimentellen Versuchen wurde ein Staphylokokken-Stamm vom Typ Newman verwendet, der häufig in Tiermodellen zum Einsatz kommt. Es handelt sich um ein klinisches Isolat aus dem Jahr 1952. Er besitzt kein Flagellum, produziert aber großen Mengen freier Koagulase [Duthie und Lorenz, 1952]. Zellen des *S. aureus* Stammes Newman verfügen über nicht funktionsfähige FnBPs, da diese aufgrund einer C-terminalen Verkürzung nicht kovalent an die Zellwand des Bakteriums binden können. Jedoch produziert dieser Stamm im Vergleich zu anderen *S. aureus* Stämmen große Menge Eap [Harraghy *et al.*, 2003].

2.6 Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe

Zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie muriner Lungen wurde das Homburger Modell etabliert, welches unter 2.2 genauer erläutert wird.

In Vorarbeiten wurden Arterioldurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit bestimmt und mit bereits publizierten Daten anderer Intravitalmikroskopiemodelle verglichen. Es zeigten sich ähnliche Werte. Zudem wurden Blutgasanalysen 15, 30 und 45 min nach Präparation durchgeführt, um abschätzen zu können, inwiefern die invasive Operationstechnik die pulmonale Mikrozirkulation beeinflusst. Im zeitlichen Verlauf konnten keine signifikanten Veränderungen des pH-Werts, Sauerstoffpartialdrucks und Kohlendioxidpartialdrucks festgestellt werden [Veith, 2014].

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter dem Fluoreszenzmikroskop sowohl intratracheal verabreichte als auch intravenös injizierte fluoreszierende Partikel mit einer Größe

von bis 100 nm in der Lungenperipherie detektierbar waren [Roller *et al.*, 2011]. Diese Beobachtung stellte die Grundlage für weiterführende Versuche dar.

Neben den einzelnen kleinen, freien Partikeln konnten nach intratrachealer Instillation fluoreszenzmarkierter Latex-Beads außerdem hell leuchtende, große, runde Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach intratrachealer Instillation von Bakterien. Zur Identifizierung dieser großen, fluoreszierenden Strukturen wurden bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt sowie nach Versuchsende histologische Schnitte angefertigt. Daraus ergab sich, dass es sich bei den fluoreszierenden Strukturen um phagozytoseaktive Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten handelte, die Einschlüsse von Latex-Beads bzw. Bakterien enthielten [Veith, 2014].

Basierend auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde als diskriminierender Wert zur Unterscheidung der unterschiedlichen Phagozyten unter dem Mikroskop ein Durchmesser von 10,5 μm festgelegt [Brinkmann *et al.*, 2004]. Mithilfe der CapImage-Software wurden die Zellen vermessen und fluoreszierende Zellen mit einem Durchmesser größer-gleich als $D = 10,5 \mu\text{m}$ wurden als Makrophagen, Zellen mit einem Durchmesser kleiner als $D = 10,5 \mu\text{m}$ als neutrophile Granulozyten gewertet [Veith, 2014].

In weiterführenden Versuchen stand die Auswirkung von Tabakrauch auf die Phagozytoseaktivität im Fokus. In einem Kurzzeitrauchmodell über 3 Tage wurden C57BL/6-Mäuse Zigarettenrauch exponiert und anschließend nach Applikation von Latex-Beads über den Inspirationsschenkel des Beatmungsgerätes für die Intravitalmikroskopie vorbereitet. Nach Auswertung der Aufnahmen zeigte sich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten sowie eine tendenziell geringere Anzahl an freien Latex-Beads. Die Quantifizierung der Alveolarmakrophagen ergab keine signifikanten Veränderungen. Abschließend konnte von einer tendenziell höheren Phagozytoseaktivität nach Tabakrauchexposition ausgegangen werden [Veith *et al.*, 2013].

In Vorbereitung auf die vorliegende Arbeit wurden anstatt der Latex-Beads auch Bakterien intratracheal appliziert. Nach Infektion mit zwei unterschiedlichen *S. aureus* Stämmen Newman und LS1 wurde die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen bestimmt. In beiden Versuchsgruppen zeigte sich im Laufe der 60-minütigen Beobachtungszeit ein Anstieg der phagozytoseaktiven Zellen pro Flächeneinheit. Bei Infektion mit dem Stamm LS1 konnte eine signifikant, niedrigere Dichte phagozytoseaktiver Zellen sowie ein tendenziell langsamerer Anstieg im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Es ist demnach möglich, die Initialphase einer durch Bakterien verursachten Infektion anhand des Homburger Modells in der Mäuselunge zu beobachten [Veith, 2014].

2.7 Fragestellungen

Die ersten Schritte des Immunsystems gegen eindringende Pathogene *in vivo* sind bisher nur unzureichend erklärt.

Anhand des Homburger Modells ist es möglich, die Initialphase einer durch Bakterien verursachten pulmonalen Entzündung im murinen *in vivo*-Modell zu beobachten.

Neben *S. aureus* stehen nun in dieser Arbeit auch Bakterienstämme der Spezies *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* im Fokus. Diese Erregerauswahl wird unter 2.1 genauer erläutert.

Ziel war es, mithilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Erreger-Wirts-Interaktion am Beispiel dieser 3 pneumologisch relevanten Bakterienstämme zu untersuchen und folgende Fragen zu beantworten:

1. Gibt es quantifizierbare Unterschiede zwischen den Infektionen mit unterschiedlichen Bakterienspezies?
2. Kann die Phagozytose von Bakterien durch eingewanderte Leukozyten beobachtet werden?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Überprüfung durch die zuständige Tierschutzkommission vom Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes aufgrund des §9 Abs.1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes sowie des Artikel 1 § 2 Abs. 2 des Gesetzes Nr. 1728 in Verbindung mit §1 Abs.3, §2 Abs.1 des Saarländischen Gesetzes über das öffentliche Veterinärwesen und die amtliche Lebensmittelüberwachung genehmigt.

Für die Versuche wurden C57BL/6-Mäuse von der Charles River GmbH in Sulzfeld bezogen. Männliche und weibliche Tiere mit einem Gewicht von 25-30 g und einem Alter von 12-26 Wochen wurden untersucht.

Die Tiere wurden bis zum Zeitpunkt des Experiments im Institut für Klinische und Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland untergebracht.

Die Mäuse hatten freien Zugang zu Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) sowie zu Trinkwasser.

3.2 Bakterienstämme und Kultivierung

Die Herstellung der Bakteriensuspensionen für die tierexperimentellen Versuche wurde im S2-Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland unter der Betreuung von PD Dr. Markus Bischoff vorgenommen.

3.2.1 Bakterienstämme

Für die Infektionsversuche wurden drei verschiedene Bakterienstämme ausgewählt.

Pseudomonas aeruginosa PA14; ATCC 27853

Streptococcus pneumoniae Typ 6A, klinisches Isolat

Staphylococcus aureus Newman; NCTC 8178

3.2.2 Stammhaltung

Zur Stammhaltung von *P. aeruginosa* PA14 und *S. aureus* Newman wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Hierfür wurden entsprechende Einzelkolonien in 10 ml TSB Medium inokuliert und anschließend über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler bebrütet. Aufgrund der hohen autolytischen Aktivität von *S. pneumoniae* in den späteren Wachstumsphasen einer *in vitro* Kultur wurden für das Isolat 6A Starterkulturen hergestellt. Hierzu wurde 400 µl einer *S. pneumoniae* 6A Gefrierkultur langsam auf Eis aufgetaut, anschließend in 10 ml TSB überführt und für 4 Stunden bei 37 °C und 150 rpm im Schüttler inkubiert. Danach wurde die Bakterienlösung zentrifugiert (3800 G, 4200 rpm, 25 °C) und mit 10 ml TSB gewaschen. Zuletzt wurde der Überstand nach der Zentrifugation abgekippt und das Bakterienpellet in 3,5 ml einer 20 %igen Glycerin-Lösung auf TSB-Basis gelöst. Jeweils 400 µl wurden in Cryoröhrchen überführt und bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert

3.2.3 Verwendete Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Einweg-Stabpipetten "Costar Stripette" (1-25 ml)	Corning (New York, USA)
Elektrische Pipettiergeräte (Pipetboy plus)	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Magnetrührer Combimag RCT	IKA (Staufen, Deutschland)
GeneQuant 1300 Spectrophotometer Classic	GE Healthcare Bio-Sciences (Solingen, Deutschland)
Glaswaren	Fisher; Schott
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallgerät Labsonic 1510	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Vortex Reagenzglas mischer (neoLab 7-2020)	NeoLab Migge Laborbedarf (Heidelberg, Deutschland)
Sterilbank Hera Safe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Sigma Laboratory Centrifuges 4 K 15	Fischer Scientific (Schwerte, Deutschland)

Tab. 1 : Bakterienkultivierung/-färbung: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Puffer, Lösungen und Nährmedien

Blutplatten	5% Schafsblut in TSA (Becton Dickinson)
5(6)-CFDA-SE; mixed isomers	Invitrogen TM, Life Technologies (Carlsbad, USA)
DMSO	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Stocklösung 5mM/ml in Aqua dest.
Glycerin	20%ige Glycerinlösung in TSB
PBS (pH 7,4)	1 l Aqua dest. 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,27 g KH ₂ PO ₄ Die Lösung wurde angesetzt und anschließend autoklaviert.
PBS (pH 8)	1 l Aqua dest. 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,27 g KH ₂ PO ₄ Titriert mit Na ₂ HPO ₄ bis pH = 8, anschließende Autoklavierung
TSB	30,0 g Bacto Tryptic Soy Broth (Difco) ad 1 l H ₂ O, bestehend aus : 17,0 g pankreatisch abgebautes Casein 3,0 g peptisch abgebautes Sojabohnenmehl 2,5 g Glucose 5,0 g NaCl 2,5 g Dikaliumhydrogenphosphat 1 l Aqua dest. Die Lösung wurde angesetzt und anschließend autoklaviert.

Tab. 2 : Verwendete Puffer, Lösungen und Nährmedien

CFDA-SE

Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE) ist ein Farbstoff, der über eine Diacetat- und eine Succinimidylester-Gruppe verfügt. CFDA-SE diffundiert in die Zelle. Die Zellfunktionen bleiben dabei erhalten. Intrazellulär wird die Diacetat-Gruppe von unspezifischen Esterasen hydrolysiert, so dass ein hoch fluoreszierendes, Amin-bindendes Produkt, das CFSE, entsteht [Haugland *et al.*, 2002].

In der Vergangenheit konnte am Beispiel der Pneumokokken gezeigt werden, dass CFDA-SE in lebende Bakterien eindringen kann, in der Zelle stabil verbleibt und selbst bei Zellteilung nicht aus den Zellen entweicht. Diese Erkenntnisse stellen wichtige Voraussetzungen für die Verwendung von lebenden Bakterien in *in vivo*-Experimenten dar [Vander Top *et al.*, 2006].

Für die Versuche wurden 10 mM CFDA-SE in DMSO gelöst verwendet.

Rhodamin 6G

Bei Rhodamin 6G handelt es sich um einen fluoreszierenden, zellpermeablen Farbstoff, der in Mitochondrien akkumuliert und bei intravenöser Injektion Leukozyten markiert. Das Exzitationsmaximum des Farbstoffes liegt bei 530 nm, die Emissionswellenlänge bei 590 nm. Der narkotisierten Maus wurden 100 µl 0,1% Rhodamin 6G, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Das Rhodamin 6G wurde von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA bezogen.

3.2.4 Kultivierung und Färbung von *Streptococcus pneumoniae*

Eine 400 µl Starterkultur des *S. pneumoniae* Isolats 6A wurde langsam auf Eis aufgetaut, in 10 ml TSB aufgenommen und in ein 12 ml Glasröhrchen mit fest verschließbarem Deckel gefüllt, um die für das *in vitro* Wachstum von *S. pneumoniae* benötigten anaeroben Wachstumsbedingungen zu induzieren.

Anschließend wurde die Kultur für 4 Stunden bei 37 °C im Inkubationsschüttler bei 150 Upm kultiviert. Im Folgenden wurde zur Abschätzung der Zelldichte in der Bakterienkultur die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) im Photometer bestimmt. Hierfür wurden 100 µl Bakteriensuspension, verdünnt mit 900 µl TSB, gegen 1 ml reines TSB als Referenz gemessen.

Die OD_{600} wurde auf einen Wert zwischen 0,4 und 0,6 eingestellt, die Bakteriensuspension wurde bei einer Drehzahl von 4200 Upm (entsprechend 3747 G) für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand an Nährmedium wurde abgekippt und das Bakterienpellet in 1 ml PBS aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 2 min 12.000 Upm und bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut abgekippt und das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen. Daraufhin wurden 2,5 µl einer 10 mM CFDA-SE-Lösung hinzugegeben und die Bakteriensuspension für 15 min bei 500 Upm und 37 °C auf dem abgedunkelten Thermomixer inkubiert.

Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 2 min erneut bei 12.000 Upm zentrifugiert und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.

Zuletzt wurde das gefärbte Bakterienpellet in 130 µl PBS aufgenommen.

Die OD_{600} einer Lösung mit 980 µl PBS und 20 µl der gefärbten, bereits verdünnten Bakteriensuspension wurde bestimmt. Zielbereich war ein OD_{600} -Wert zwischen 15 und 18,5. In Vorversuchen zeigte sich, dass bei Einstellung der OD_{600} zwischen 15,0 und 18,5 90,9 % der Bakteriensuspensionen im angestrebten Zielbereich von $6,5 \times 10^9$ - 2×10^{10} pro 1 ml PBS lagen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe begonnen und die Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-8} auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 5% CO_2 und 37 °C wurden die Blutagarplatten ausgezählt und aus den Ergebnissen die CFU gemittelt.

3.2.5 Kultivierung und Färbung von *Pseudomonas aeruginosa*

Von einer gefrorenen Stockkultur des *P. aeruginosa* (ATCC 27853) wurde mit einer Einmalimpföse etwas Eis abgelöst und nach Auftauen auf einer Blutagarplatte ein fraktionierter Verdünnungsausstrich angefertigt.

Nach 24 h Inkubation bei 37 °C waren deutlich Kolonien des Erregers auf der Blutagarplatte sichtbar. 10 ml TSB wurden nun mit einer Einzelkolonie *P. aeruginosa* beimpft und 10-12 Stunden im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 150 Upm kultiviert.

Aus dieser Vorkultur wurden 100 µl in 10 ml TSB inokuliert. Nach ungefähr 2 Stunden Wachstum bei 37 °C und 150 Upm wurden 2 ml Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 10.000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Anschließend wurden die Bakterien zweimal mit 1 ml PBS (pH 8) gewaschen. Schließlich wurden die Bakterien in 500 µl PBS (pH 8) resuspendiert. Um die Permeabilität der Zellmembranen für die Esterase-Substrate zu erhöhen, wurde die Bakteriensuspension durch 0,5 mM EDTA (Zielkonzentration) ergänzt [Hoefel *et al.*, 2003].

Es wurden 7,5 µl 10 mM CFDA-SE (in DMSO) hinzugefügt und die Suspension 30 min bei 35 °C und 500 Upm in Dunkelheit inkubiert.

Daraufhin wurde die Bakteriensuspension für 2 min erneut bei 10.000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert und zweimal mit 1 ml PBS (pH 8) gewaschen.

Das gefärbte Bakterienpellet wurde in 130 µl PBS aufgenommen. Die Bakterien wurden mit Ultraschall aufgeschlossen.

Eine Verdünnungsreihe wurde durchgeführt. Die Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-8} auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und aeroben Bedingungen wurden die Blutagarplatten ausgezählt und aus den Ergebnissen die CFU gemittelt.

In Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzmarkierung von *P. aeruginosa* mit CFDA-SE der oben genannten Modifikationen mit PBS (pH 8) und EDTA im Färbeprotokoll bedurfte. Zur Überprüfung der Fluoreszenzmarkierung wurden daher die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-5} auf eine Mikrotitrierplatte aufgetragen und mithilfe des Wallac 1420 VICTOR2™ die Stärke der Markierung gemessen. Ohne diese Modifikationen konnte sowohl makroskopisch als auch im Fluorometer eine deutlich reduzierte Markierung festgestellt werden.

3.2.6 Kultivierung und Färbung von *Staphylococcus aureus*

Für die tierexperimentellen Versuche wurde der *S. aureus* Stamm vom Typ Newman (NCTC 8178) verwendet.

Die Bakterien wurden uns bereits CFSE-markiert vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes am jeweiligen Versuchstag zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden nach folgendem Protokoll vorbereitet und gefärbt:

Von einer gefrorenen Stockkultur wurde mit einer Einmalimpföse etwas Eis abgelöst und nach Auftauen auf einer Blutagarplatte ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden 10 ml TSB mit einer Einzelkolonie *S. aureus* beimpft und anschließend über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 150 Upm kultiviert.

Aus dieser Vorkultur wurden 100 µl in 10 ml TSB inokuliert. Die Kultur wurde ca. 4 Stunden bei 37 °C und 150 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 3-4 inkubiert. Danach wurde die gesamte Kultur 10 min bei 4000 G zentrifugiert.

Das Bakterienpellet wurde in 10 ml PBS gelöst, die OD₆₀₀ wurde bestimmt und anschließend die Bakteriensuspension erneut bei 4000 G zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in PBS aufgenommen. Dabei sollte eine OD₆₀₀ von ca. 12 eingestellt werden.

Ein Milliliter dieser Bakteriensuspension wurde nun in ein Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 25 µl der 10 mM CFSE-Lösung zugegeben. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 15 min bei 37 °C und 500 Upm in Dunkelheit inkubiert.

Das Gemisch wurde für 2 min bei 12.000 G und Raumtemperatur zentrifugiert und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.

Das gefärbte Bakterienpellet wurde in 350 µl PBS aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die optische Dichte bei 600 nm wurde erneut bestimmt und die Bakteriensuspension auf eine OD₆₀₀ von ca. 22 eingestellt.

Eine Verdünnungsreihe wurde durchgeführt. Die Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und aeroben Bedingungen wurden die Blutagarplatten ausgezählt und aus den Ergebnissen die CFU gemittelt.

Die Konzentration betrug dabei ca. 6,5 x 10⁹ Bakterien pro 1 ml. Den Mäusen wurde somit ungefähr eine Menge von 6,5 x 10⁸ Bakterien in 100 µl PBS intratracheal appliziert.

3.3 Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie

Die tierexperimentellen Versuche wurden unter S2-Bedingungen im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland durchgeführt.

3.3.1 Technischer Geräteaufbau

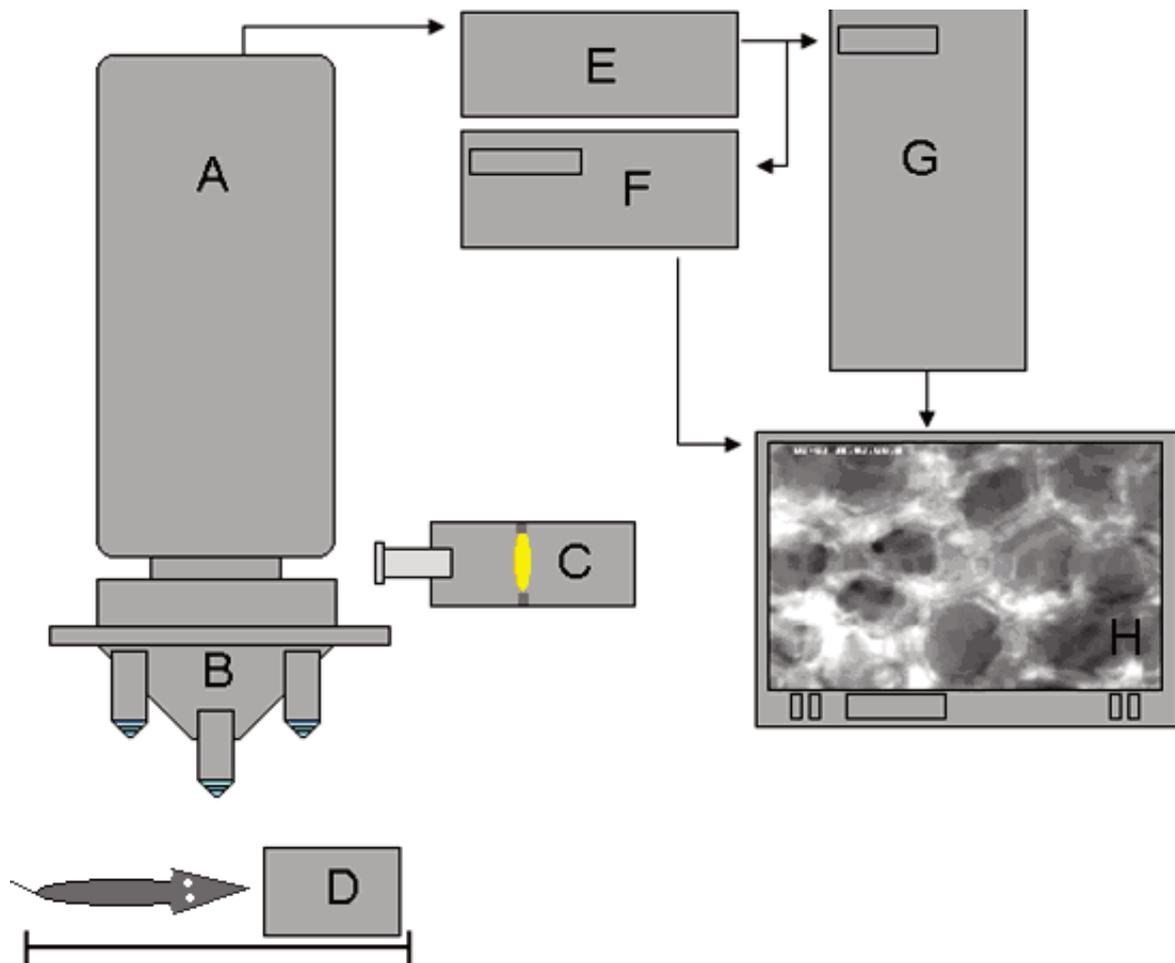


Abb. 3 : Technischer Geräteaufbau

Die Abbildung zeigt den technischen Geräteaufbau. A = CCD-Kamera, B = Auflichtmikroskop, C = Quecksilberlampe, D = Beatmungsgerät, E = Timer, F = Videorekorder, G = Digitales Bildanalyse-System, H = Monitor. Die Abbildung wurde aus der wissenschaftlichen Arbeit „Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge – Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktion in vivo „, von Nils T. Veith übernommen [Veith, 2014].

Die Mikroskopie erfolgte mit dem Auflichtmikroskop Zeiss Axiotech und mit einer charged-coupled-device Kamera. Verschiedene Filter standen zur Verfügung: ein Rotfilter (330-390 nm, Emissionswellenlänge > 430 nm), ein Blaufilter (450-492 nm, Emissionswellenlänge > 250 nm) und ein Grünfilter (530-560 nm, Emissionswellenlänge > 580 nm).

Die Aufnahme wurde über ein digitales Bildanalyse-System auf den Monitor übertragen. Ein digitaler Videorecorder zeichnete das Bildmaterial auf und speicherte es auf DVD. Die zeitliche Zuordnung wurde durch einen Timer gewährleistet.

Zur Bildstabilisierung während der Aufnahme wurde zusätzlich zur Beatmung mit einem PEEP von 5 cm H₂O die Ventilation für ca. 10 sec unterbrochen. So konnten die Bewegungsartefakte erheblich reduziert werden.

Die Tiere wurden danach unverzüglich wieder beatmet.

Auflichtmikroskop	Zeiss Axiotech, Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Beatmungsgerät	Minivent, Hugo Sachs/Harvard Apparatus (March-Hugstetten, Deutschland)
CCD-Kamera	FK 6990, Pieper (Schwerte, Deutschland)
Monitor	PVM 1371-QM, Sony Corp (Tokio, Japan)
Timer	VTG 33, FOR-A Company Limited (Tokyo, Japan)
Videorekorder	Panasonic AG-7350-S-VHS, Matsushita (Tokyo, Japan)

Tab. 4 : Intravitalmikroskopie: Verwendete Geräte

3.3.2 Lagerung der Versuchstiere

In der Werkstatt des Institutes für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar wurde durch Herrn Sauerbaum eine an die Versuchsbedingungen angepasste Operationsplatte hergestellt.

Die OP-Platte bot eine Befestigungsmöglichkeit für eine Halteklemme, die während der Mikroskopie das benötigte Deckgläschen in Position hielt.

Die narkotisierten Versuchstiere wurden auf der OP-Platte mit Pflasterstreifen in Rückenlage fixiert. Durch Unterlage eines Kompressionskissens wurde die Präparation der Trachea in reklinierter Haltung erleichtert.

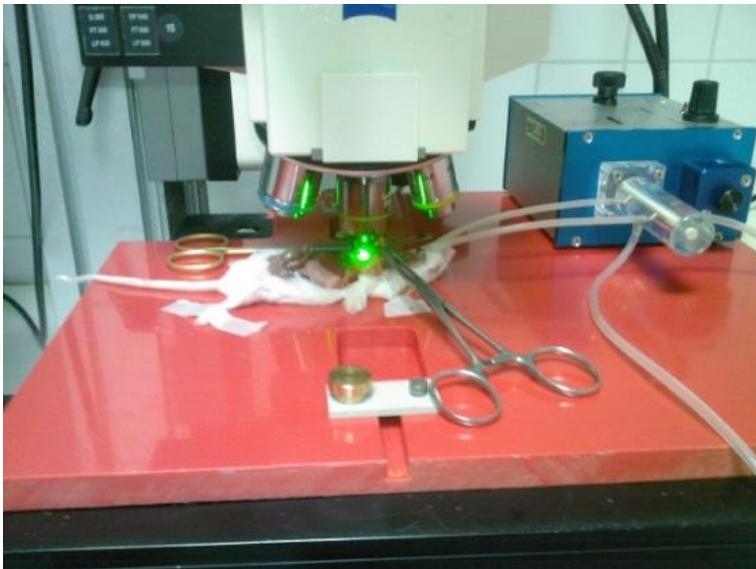


Abb. 5 : Lagerung des Versuchstiers während der Mikroskopie

Nach Präparation der rechten Lunge und Anbringung eines Deckgläschen auf der Lungenoberfläche konnte 30 min nach Infektion mit der Mikroskopie begonnen werden. Die Abbildung zeigt die Lagerung der Maus während der Mikroskopie sowie die Beatmung über die Minivent, Sachs/Harvard Apparatus.

Die Abbildung wurde aus der wissenschaftlichen Arbeit „Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge – Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktion *in vivo*“, von Nils T. Veith übernommen [Veith, 2014].

3.4 Anästhesie und Lungenpräparation

Die C57BL/6-Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 7,5 mg Ketamin-Hydrochlorid (Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 2,5 mg Xylazinhydrochlorid (Bayer, Leverkusen, Deutschland) pro 100 mg Körpergewicht anästhesiert. Während des gesamten Eingriffs wurden die Tiere mit einer Wärmelampe bestrahlt, um ein Auskühlen zu vermeiden. Eine ausreichende Narkosetiefe während des gesamten Versuchs wurde durch intermittierende Prüfung des Zwischenzehenreflexes gewährleistet. Der Zwischenzehenreflex gilt als sensitivster Körperreflex für die Beurteilung des Schmerzempfindens bei der Maus [Arras *et al.*, 2001].

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Tiere in Rückenlage auf der OP-Platte fixiert. Der Kopf der Maus wurde für die Tracheotomie rekliniert. Zunächst wurde die Trachea unter der Glandula submaxillaris freigelegt und anschließend im unteren Teil der Trachea ein transversaler Schnitt zwischen 2 Knorpelspannen gesetzt. Es wurde eine 15 mm lange Trachealkanüle mit einem Durchmesser von 1 mm in die Trachea eingeführt.

Die Beatmung erfolgte mit einer Minivent. Es wurde eine Atemfrequenz von 150/min, ein Hubvolumen von 200 μ l und eine FiO_2 von 100% gewählt.

Daraufhin wurden 100 μ l Bakteriensuspension über den inspiratorischen Schenkel des Beatmungsschlauchs intratracheal injiziert und die Maus anschließend weiterbeatmet.

Nach einer Wartezeit von 20 min wurde die Lungenpräparation begonnen.

Zunächst wurde die Haut auf dem Thorax abpräpariert. In Vorversuchen war aufgefallen, dass die Mäuse bei einer Thorakotomie mit höheren Blutverlusten zu kämpfen hatten. Daher wurde vor Eröffnung des Thorax in Höhe der 1.-3. Rippe eine Umstechungsligatur der Aa.thoracicae internaе (Prolene 2-0, Ethicon, Livingston, Scotland) vorgenommen. Anschließend erfolgte ausgehend vom Xiphoid die mediane Thorakotomie Richtung Manubrium sterni. Hierbei wurden die Rippen bis zum 2.-3. Interkostalraum durchtrennt und der Schnitt anschließend zur rechten Brustwand hin erweitert.

Unter dem Rippenbogen wurde das Diaphragma von den Rippen abgelöst und der Thoraxdeckel über der rechten Lunge anschließend entfernt.

Blutungen aus Hautgefäßen, Interkostalgefäßen und epigastrischen Gefäßen wurden koaguliert. Die Bauchorgane wurden mit einer in physiologischer Kochsalzlösung getränkten, 37° C warmen, sterilen Kompresse bedeckt. Die Lungenoberfläche wurde mit einer Kochsalzlösung gespült. Der rechte Lungenober- und Lungenmittellappen konnten mikroskopiert werden.

Zur Bildstabilisierung und Verminderung der Bewegungsartefakte durch Atmung und Herzschlag wurde das Tier fortan mit einem positiv endexpiratorischen Druck (PEEP) von 5 cm H₂O beatmet.

Für die Mikroskopie wurde anschließend ein Deckgläschen vorsichtig auf der Lungenoberfläche angebracht. Dieses wurde mittels einer Halteklemme an der OP-Platte fixiert.

Dreißig Minuten *post infectionem* konnte mit der Mikroskopie begonnen werden. Es wurde versucht, die oberflächlichen alveolären Strukturen des rechten Ober- und Mittellappens darzustellen. Um das Bild weiter zu stabilisieren wurde zudem die Beatmung für eine Dauer von maximal 10 Sekunden unterbrochen.

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels Herzschnitt nach 30 min Videoaufnahme.

Als Grundlage für die histologischen Präparate wurde anschließend dem Tier das Herz-Lungen-Paket entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung konserviert.



Abb. 6 : Rechte Lunge nach Präparation

Die Abbildung zeigt den rechten Ober- und Mittellappen nach Entfernung des Thoraxdeckels. Zuvor wurde eine Umstechungsligatur der Aa. thoracicae internae vorgenommen, um größeren Blutverlusten vorzubeugen. Die Abbildung wurde aus der wissenschaftlichen Arbeit „Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge – Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktion *in vivo*“, von Nils T. Veith übernommen [Veith, 2014].



Abb. 7 : Positionierung des Deckgläschens auf der Lungenoberfläche

Nach Abpräparation des Thoraxdeckels und Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde das Deckgläschen mithilfe einer Halteklemme auf der Lungenoberfläche stabilisiert. Die Halteklemme ist an der OP-Platte fixiert. Zudem zeigt das Bild die Umstechungsligatur der Aa.thoraciae internaee auf Höhe der 1. – 3. Rippe. Die Abbildung wurde aus der wissenschaftlichen Arbeit „Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge – Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktion *in vivo*“, von Nils T. Veith übernommen [Veith, 2014].

3.4.1 Applikation der Fremdpartikel und Farbstoffe

Bei den tierexperimentellen Versuchen wurden verschiedene Fremdpartikel eingesetzt.

CFSE-markierte Bakterien wurden über den inspiratorischen Schenkel des Beatmungsschlauches in die Trachea der Tiere instilliert.

Rhodamin 6G wurde zur Darstellung der leukozytären Entzündungsreaktion genutzt und den Versuchstieren einseitig in den retrobulbären Venenplexus injiziert.

3.5 Versuchsgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden 2 Versuchsgruppen (I und II) gebildet und untersucht.

In der ersten Versuchsgruppe wurde die zelluläre Aufnahme von vitalen, CFSE-markierten Bakterien in der murinen Lunge bei drei verschiedenen Bakterienstämmen (*S. aureus* Stamm Newman, *S. pneumoniae* Stamm 6A, *P. aeruginosa* Stamm PA14) untersucht.

Hierzu wurden die Bakterien CFSE-markiert, in 100 µl PBS aufgenommen und dem narkotisierten Tier nach vorangegangener Narkose und Präparation intratracheal appliziert.

In der zweiten Versuchsgruppe wurde die Leukozyteneinwanderung in das infizierte Lungengewebe beobachtet. Den narkotisierten Tieren wurde zunächst Rhodamin 6G retrobulbär injiziert. Dieses kumuliert in Leukozyten und ermöglichte so die Darstellung dieser Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Anschließend wurden CFSE-markierte Pneumokokken vom Typ 6A intratracheal appliziert. Mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern konnten die markierten Zellen unter dem Mikroskop dargestellt werden. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob es einwandernde, mit Rhodamin 6G markierte Leukozyten gab, die CFSE-markierte Bakterien in der murinen Lunge phagozytiert hatten.

3.5.1 Versuchgruppe I

Die Versuchsgruppe I unterteilt sich in 3 Untergruppen (Ia, Ib, Ic) und untersucht die Aufnahme von markierten Bakterien durch die zelluläre Immunabwehr in der murinen Lunge.

Den Tieren der Gruppe Ia (n = 8) wurden CFSE-markierte Pneumokokken vom Typ 6A intratracheal appliziert. Bei Gruppe Ib (n = 6) wurden CFSE-markierte Zellen des *S. aureus* Stammes Newman und bei Gruppe Ic (n = 8) CFSE-markierte Zellen des *P. aeruginosa* Isolats PA14 verwendet. Nach erfolgreicher Thorakotomie konnte 30 Minuten *post infectionem* die Mikroskopie und Videoaufnahme der äußeren Alveolenschichten gestartet werden. Zur Detektion der CFSE-markierten Zellen wurde ein Blaufilter (450-492 nm, Emissionswellenlänge > 250 nm) verwendet.

Nach weiteren 30 Minuten wurden die narkotisierten Tiere durch einen Herzschnitt getötet.

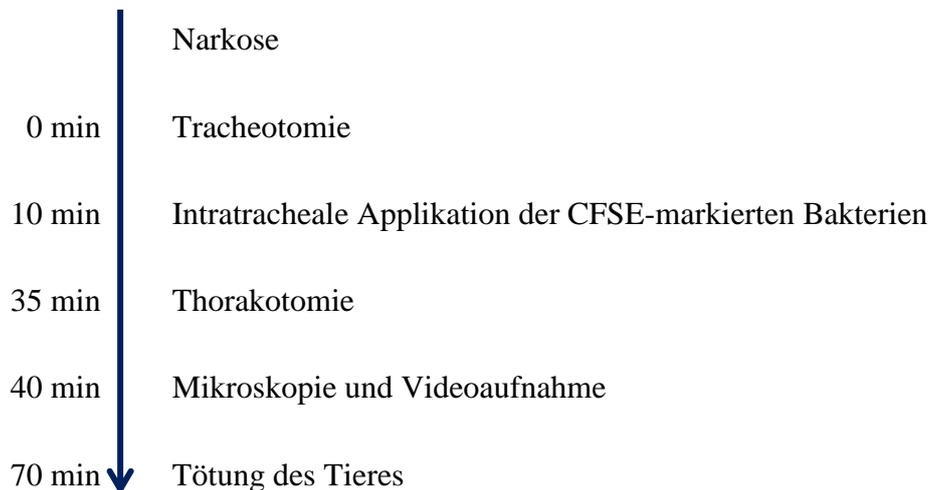


Abb. 8 : Zeitlicher Versuchsablauf Gruppen Ia, Ib, Ic

3.5.2 Versuchsgruppe II

Die Versuchsgruppe II umfasst 4 Tiere. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Leukozytenmigration in pulmonales Gewebe sowie die Phagozytose von Bakterien durch einwandernde Leukozyten zu beobachten. Es wurde mit 2 Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet. Im Vergleich zu Versuchsgruppe I unterschied sich der Versuchsablauf in der retrobulbären Injektion von Rhodamin 6G. Die Narkosetiefe wurde zunächst mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft und anschließend wurden 100 µl 0,1% Rhodamin 6G retrobulbär injiziert. Durch Rhodamin 6G wurden die Leukozyten in der Blutbahn fluoreszenzmarkiert. Nach erfolgreicher Tracheotomie wurden den Tieren CFSE-markierte Pneumokokken vom Serotyp 6A instilliert. Die Lungenpräparation wurde wie unter 3.4 beschrieben vorgenommen.

Die Mikroskopie des rechten Ober- und Mittellappens erfolgte unter Verwendung eines Blaufilters (450-492 nm, Emissionswellenlänge > 250 nm) und eines Grünfilter (530-560 nm, Emissionswellenlänge > 580 nm). Der Blaufilter diente der Detektion CFSE-markierter Zellen, der Grünfilter der Detektion mit Rhodamin-6G-markierter Leukozyten. Durch Pausieren der Beatmung für maximal 10 Sekunden und Anlage eines PEEP konnten Bewegungsartefakte durch die Atmung reduziert werden. In diesem kurzen Zeitraum wurden Lungenausschnitte zunächst unter dem Blau- und anschließend unter dem Grünfilter betrachtet und auf Video aufgenommen.

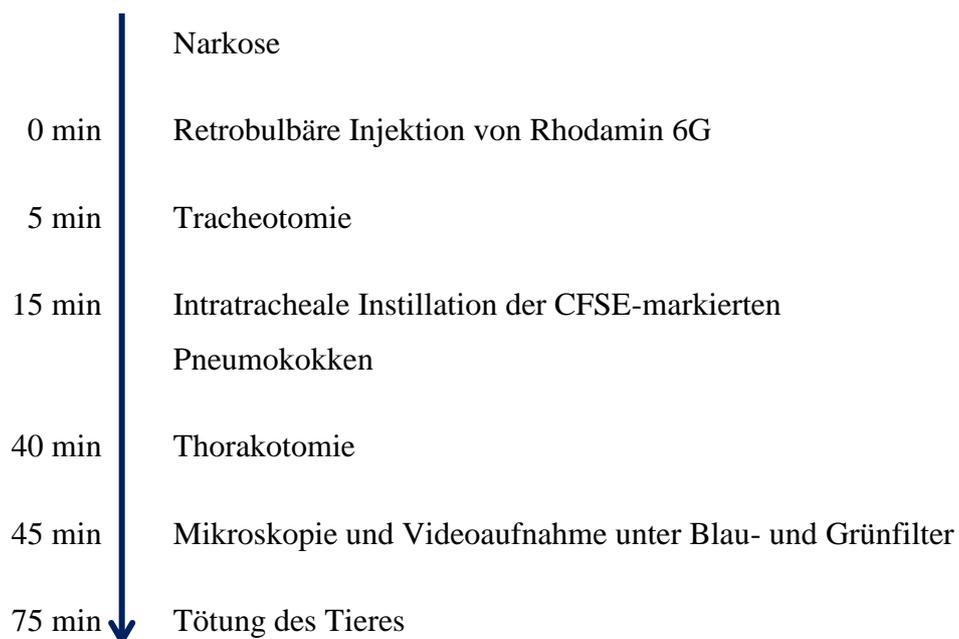


Abb. 9 : Zeitlicher Versuchsablauf Gruppe II

3.6 Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen

Die Auswertung der Videodateien erfolgte im Institut für klinische und experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland.

An einem Computer mit einem S-VHS-Videorekorder (AG-7350, Panasonic, Ratingen) und einem Monitor (36cm Bildschirmdiagonale, PVM 2130 QM, Sony, München) wurde mithilfe der CapImage-Software Version 5.03 (Zeintl Software Engineering, Heidelberg) das Videomaterial ausgewertet.

3.6.1 Auswertung Versuchsgruppe I

Die Auswertung erfolgte mithilfe der CapImage-Software Version 5.03 an einer computergestützten Einheit.

Hierzu wurden für jedes Tier randomisiert 5 Gesichtsfelder ausgewertet. Die Untersuchungen waren vor allen Dingen auf die Quantifizierung und Vermessung fluoreszierender Zellen ausgerichtet. Darüber hinaus konnten auch intrapulmonale Blutgefäße dargestellt werden. Die erhobenen Daten wurden anschließend in Microsoft Excel (Microsoft Corporation Deutschland, Unterschleißheim) überführt.

Quantifizierung von Phagozyten

Basierend auf Ergebnissen von Nils T. Veith in seiner Dissertation „Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge - Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktionen *in vivo*“ sowie Erkenntnissen aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde als diskriminierender Wert zur Unterscheidung zwischen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ein Zelldurchmesser von $10,5 \mu\text{m}$ festgelegt [Veith, 2014, Brinkmann *et al.*, 2004]. Mithilfe der CapImage-Software wurden die fluoreszierenden Zellen vermessen und quantifiziert. Zellen mit einem Durchmesser größer-gleich als $D = 10,5 \mu\text{m}$ wurden als Makrophagen, Zellen mit einem Durchmesser kleiner als $D = 10,5 \mu\text{m}$ als neutrophile Granulozyten gewertet.

Quantifizierung von Bakterien

Die Quantifizierung der CFSE-markierten Bakterien am mikroskopischen Bild diente vorrangig der Untersuchung, ob alle Bakterienspezies in ähnlichem Maße bis in die Lungenperipherie gelangen. Pro Tier wurden mehrere Gesichtsfelder randomisiert ausgewertet.

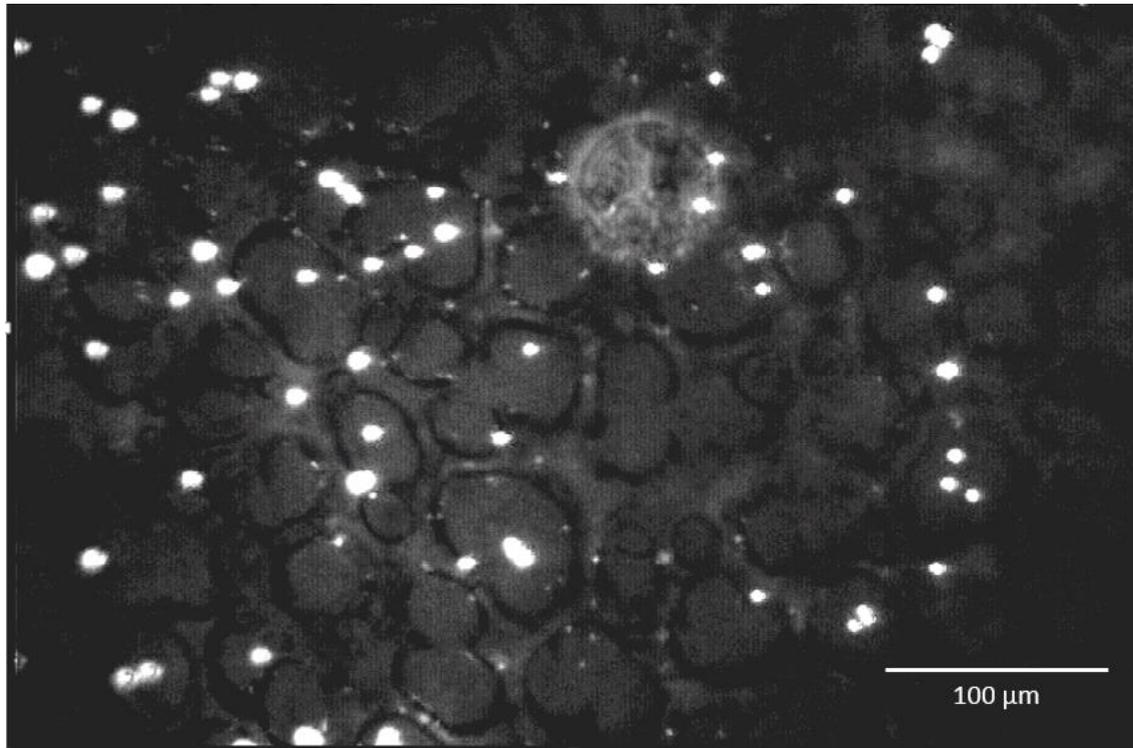


Abb. 10 : Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit *S. pneumoniae*
Die Aufnahme erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Blaufilter (450-492 nm, Emissionswellenlänge > 430 nm). Neben alveolären und interstitiellen Strukturen sind fluoreszierende Zellen zu erkennen. Zuvor wurde dem Versuchstier eine Bakteriensuspension mit CFSE-markierten Bakterien intratracheal verabreicht.

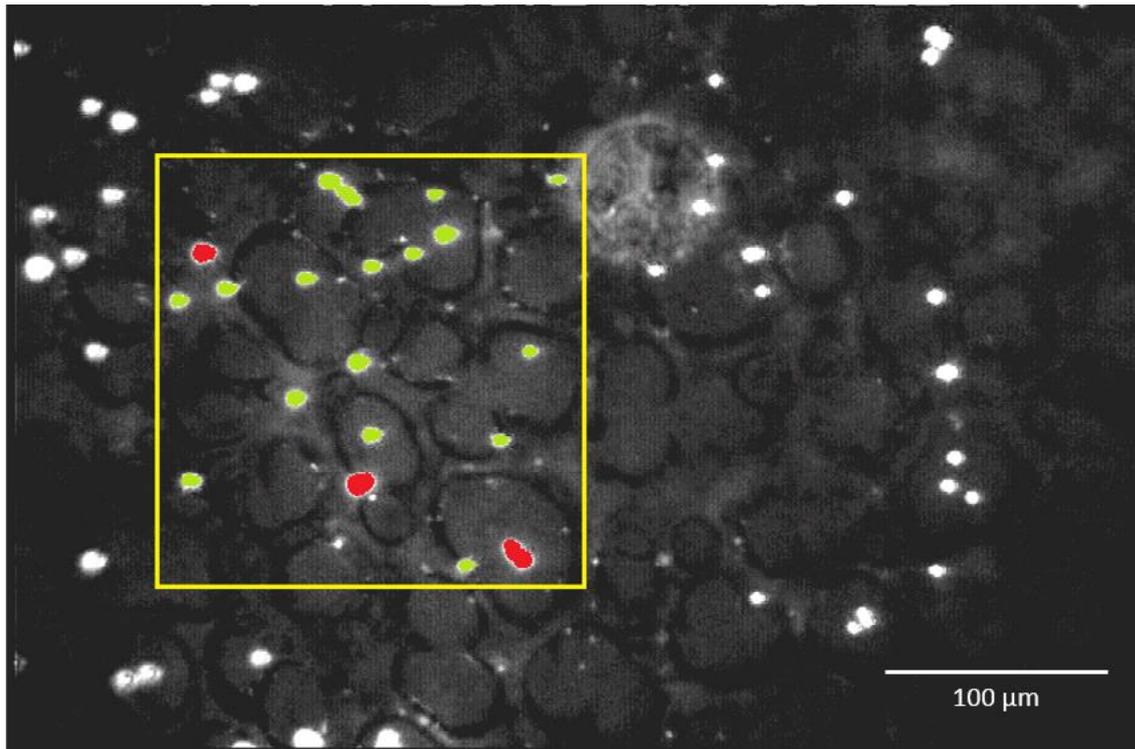


Abb. 11 : Intravitalmikroskopische Aufnahme, nach Auswertung

Die Aufnahme zeigt den gleichen Lungenausschnitt wie Abbildung 10. Die Auswertung erfolgte mit der CapImage-Software. Die fluoreszierenden Zellen wurden vermessen und je nach Durchmesser verschiedenen Zellreihen zugeordnet. Zur besseren Übersicht wurden Zellen mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$ mithilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP rot und Zellen mit einem Durchmesser $D < 10,5 \mu\text{m}$ grün markiert. Anschließend wurden die Bakterien im Bildausschnitt quantifiziert. Diese sind als deutlich kleinere, fluoreszierende Zellen zu erkennen. Die Fläche des ausgewerteten Bereichs wurde bestimmt.

3.6.2 Auswertung Versuchsgruppe II

Aus dem gewonnenen Bildmaterial wurden im Anschluss an die Versuche mithilfe der CapImage-Software 4-5 Bildpaare pro Tier zusammengestellt. Es wurde einer Blaufilter-Aufnahme ein Bild des gleichen Lungenabschnitts unter dem Grünfilter zugeordnet. Mithilfe der CapImage-Software wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen bei jedem einzelnen Bild vermessen und markiert.

Bei Bildausschnitten, die unter dem Blaufilter aufgenommen wurden, wurden Zellen mit einem Durchmesser größer-gleich $D = 10,5 \mu\text{m}$ als Makrophagen, Zellen mit einem Durchmesser kleiner als $D = 10,5 \mu\text{m}$ als neutrophile Granulozyten gewertet. Dies entsprach dem Procedere in Versuchsgruppe I.

Rhodamin-6G-markierte Zellen sollten unter dem Grünfilter detektiert, ebenfalls vermessen und markiert werden.

3.7 Histologie

Für die Anfertigung von lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde den Versuchstieren nach Eintritt des Todes das Herz-Lungenpaket entnommen und in 4% Formaldehydlösung fixiert. Im Anschluss erfolgte die Paraffineinbettung und die Herstellung von mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten histologischen Präparaten.

Die rechte Lunge wurde für lichtmikroskopische Aufnahmen und die linke Lunge für elektronenmikroskopische Aufnahmen verwendet.

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte durch Herrn PD Dr. Dirk Theegarten, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Prof. Dr. Martin Rosenbruch, Bayer HealthCare AG, Wuppertal erstellt.

3.8 Statische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden zur weiteren Auswertung in Microsoft Excel (Microsoft Corporation Deutschland, Unterschleißheim) überführt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2013.

Mithilfe der Statistik-Software Stata Version 12.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) wurden die Daten ausgewertet.

Um die quantifizierten Zellzahlen der drei Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen, wurden für jeden quantifizierten Zelltyp je drei Regressionsmodelle geschätzt. Hierbei wurde die hierarchische Struktur der Daten berücksichtigt (Ebene 1 = einzelnes Versuchstier; Ebene 2 = ausgewertetes einzelnes Bild), indem für jedes Versuchstier ein Cluster gebildet wurde. Die resultierenden Standardfehler sind daher robuster und konsistenter, als wenn die Struktur der Daten unberücksichtigt geblieben wäre. Aus den Regressionsoutputs wurden die T- und die korrespondierenden p-Werte abgelesen, anhand welcher bewertet wurde, ob die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen statistisch signifikant von 0 sind. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0.000$.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Versuchsgruppe I

4.1.1 Quantifizierung von Zellen mit $D \geq 10,5 \mu\text{m}$

Als phagozytoseaktive Makrophagen wurden alle fluoreszierenden Zellen mit einem Durchmesser größer-gleich als $D = 10,5 \mu\text{m}$ gewertet. In der Versuchsgruppe Ia (Infektion mit *S. pneumoniae* Typ 6A) wurden im Mittel 51,3 Makrophagen pro mm^2 ($\text{SD} = 59,5 / \text{mm}^2$; $n = 8$) gezählt. Im Vergleich dazu wurden in Versuchsgruppe Ib (Infektion mit *S. aureus* Stamm Newman) im Mittel 176,5 Makrophagen pro mm^2 ($\text{SD} = 97,4 / \text{mm}^2$; $n = 6$) quantifiziert. In Versuchsgruppe Ic (Infektion mit *P. aeruginosa* PA14) konnte mit im Mittel 261,3 Makrophagen pro mm^2 ($\text{SD} = 95,5 / \text{mm}^2$; $n = 8$) die höchste Anzahl von phagozytoseaktiven Makrophagen festgestellt werden, während bei die Infektion mit Pneumokokken vom Typ 6A die wenigsten Makrophagen pro mm^2 gezählt werden konnten.

Die statistische Auswertung zeigte dabei zwischen allen drei Gruppen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,000$).

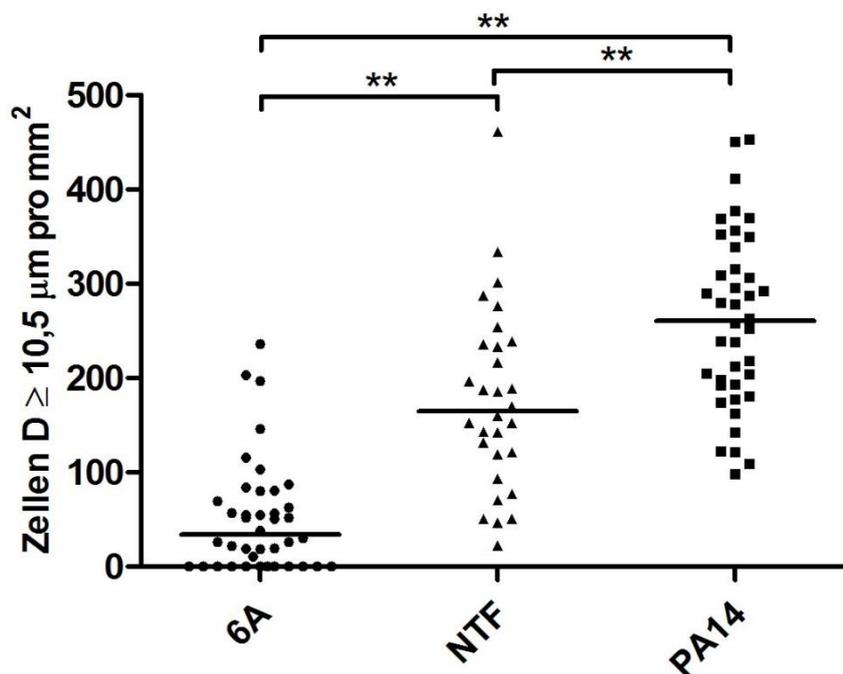


Abb. 12 : Ergebnisse Ia, Ib, Ic : Makrophagen pro mm^2

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Makrophagen-Quantifizierung. Jede Markierung steht hierfür für ein ausgewertetes Bild. Es konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen Ia-Ic bestehen. In Versuchsgruppe Ic ($n = 8$) (Infektion mit *P. aeruginosa*) wurden die meisten Zellen pro mm^2 mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$ nachgewiesen, in Versuchsgruppe Ia die wenigsten. Signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,000$ sind gekennzeichnet mit **.

4.1.2 Quantifizierung von Zellen mit $D < 10,5 \mu\text{m}$

Alle fluoreszierenden Zellen mit einem Durchmesser kleiner als $D = 10,5 \mu\text{m}$ wurden als neutrophile Granulozyten gewertet. In Versuchsgruppe Ia konnte mit gemittelt 401,9 neutrophile Granulozyten pro mm^2 ($\text{SD} = 253,6 / \text{mm}^2$; $n = 8$) die höchste Anzahl von phagozytoseaktiven neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. In der Versuchsgruppe Ib wurden im Mittel 305,4 neutrophile Granulozyten pro mm^2 ($\text{SD} = 197,4 / \text{mm}^2$; $n = 6$) bestimmt. Im Vergleich dazu wurden in Versuchsgruppe Ic die neutrophilen Granulozyten mit einem mittleren Dichte von 138,3 pro mm^2 ($\text{SD} = 164,0 / \text{mm}^2$; $n = 8$) quantifiziert.

Es stellte sich zwischen Versuchsgruppe Ia und Ic ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,000$) heraus. Zwischen Versuchsgruppe Ib und Ic konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) festgestellt werden, wohingegen zwischen Versuchsgruppe Ia und Ib kein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte ($p = 0,204$).

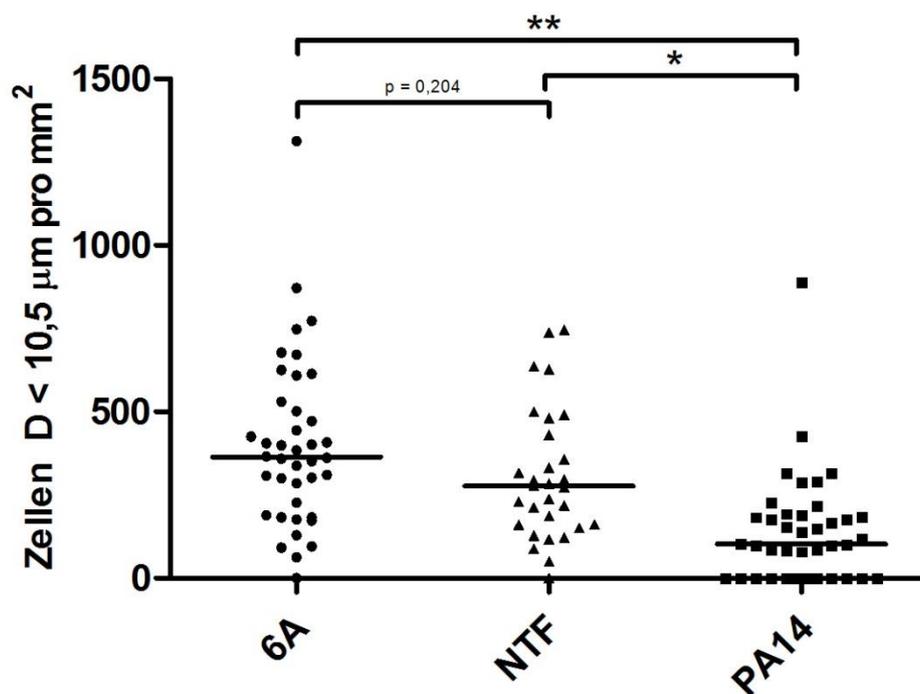


Abb. 13 : Ergebnisse Ia, Ib, Ic : Neutrophile Granulozyten pro mm^2

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten. Jede Markierung steht hierbei für ein ausgewertetes Bild. Es konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppe Ia ($n = 8$) und Ic ($n = 8$) und zwischen Versuchsgruppe Ib ($n = 6$) und Ic ($n = 8$) bestehen. In Versuchsgruppe Ia (Infektion mit *S. pneumoniae*) wurden die meisten Zellen pro mm^2 mit einem Durchmesser $D < 10,5 \mu\text{m}$ nachgewiesen, in Versuchsgruppe Ic die wenigsten. Signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,05$ sind gekennzeichnet mit *, signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,000$ mit **.

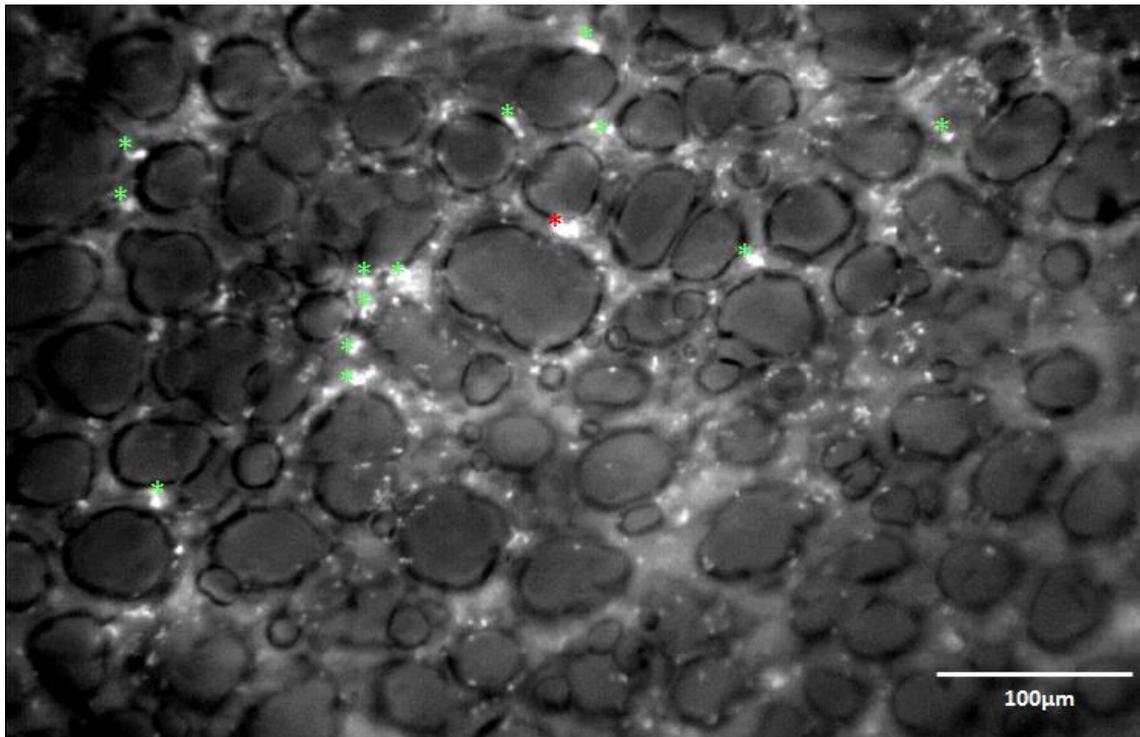


Abb. 14 : Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit 6A
CFSE-markierte neutrophile Granulozyten sind mit grünen Sternen, CFSE-markierte Alveolarmakrophagen mit roten Sternen markiert.

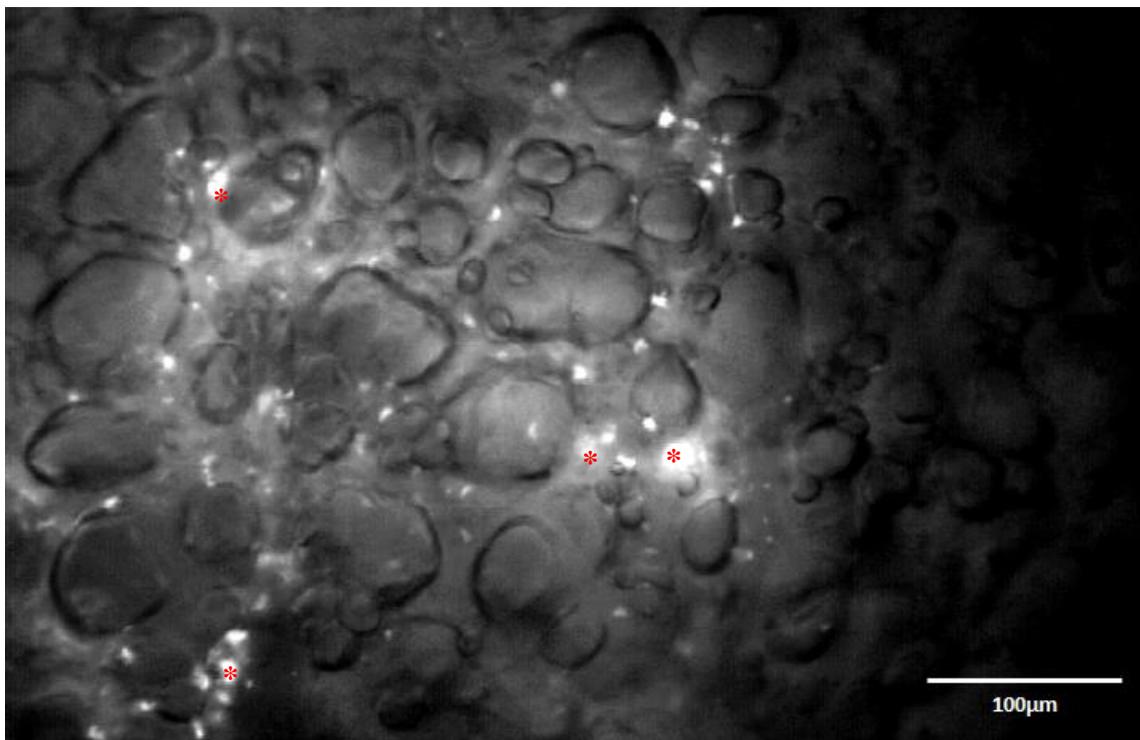


Abb. 15 : Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit Newman
CFSE-markierte Alveolarmakrophagen sind mit roten Sternen markiert.

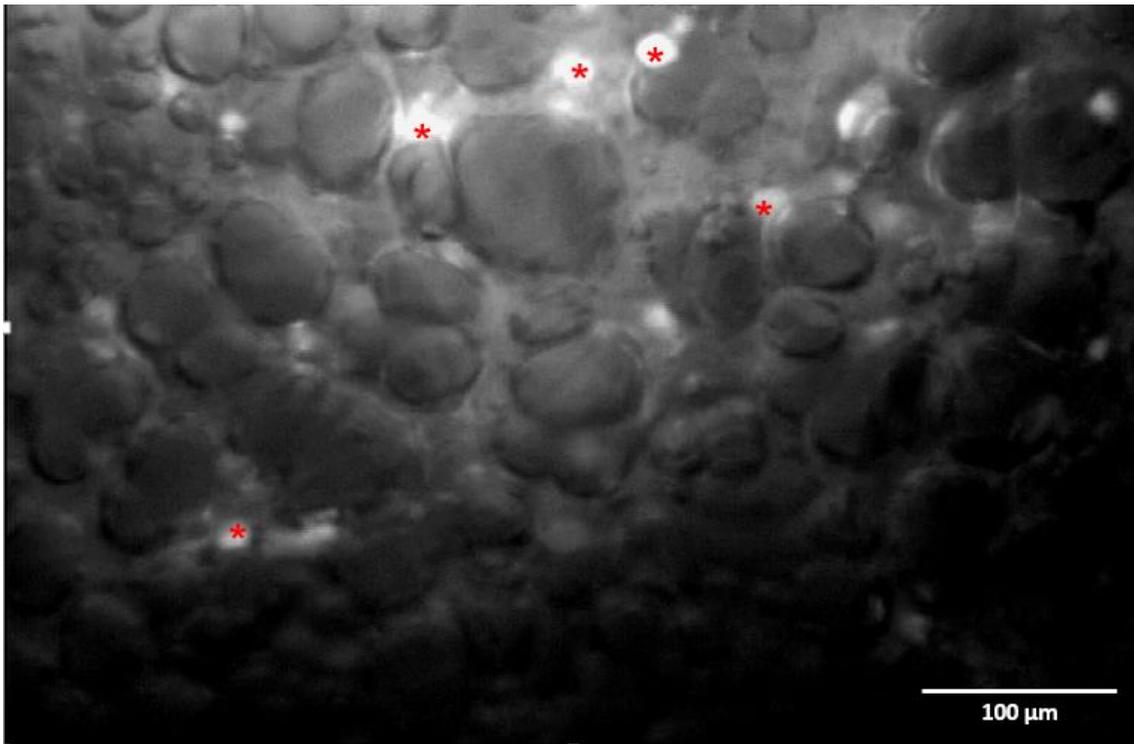


Abb. 16 : Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Infektion mit PA14
CFSE-markierte Alveolarmakrophagen sind mit roten Sternen markiert.

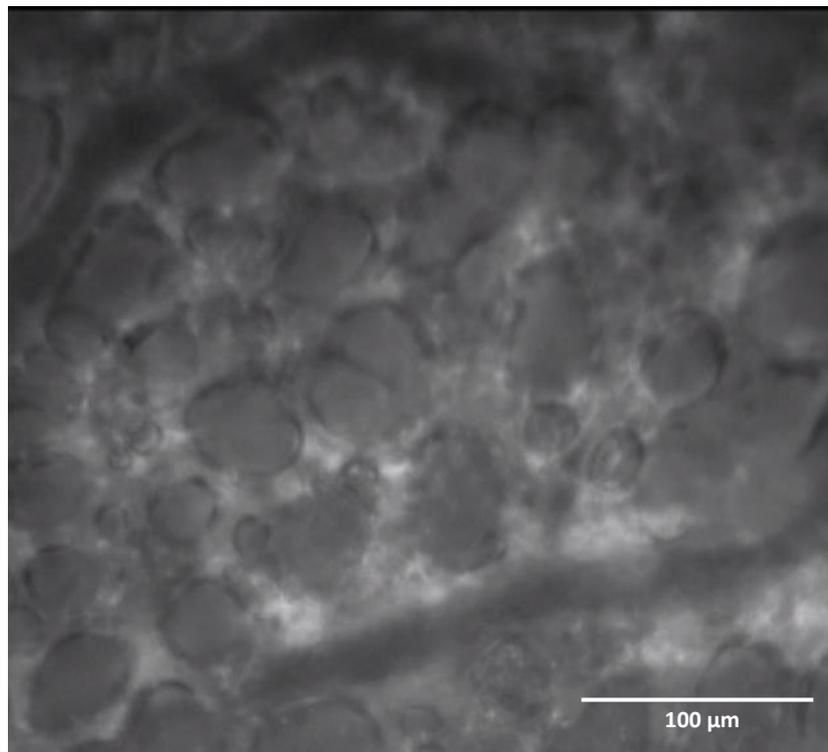


Abb. 17 : Intrapulmonale Blutgefäße nach Infektion mit 6A
Die intravitalmikroskopische Aufnahme zeigt zwei große Gefäße zwischen alveolären und interstitiellen Strukturen. Obwohl die Erforschung der Mikrozirkulation in der Lunge nicht im Fokus dieser wissenschaftlichen Studie stand, zeigt diese Aufnahme, dass mit dem Homburger Modell solche Untersuchungen möglich sind.

4.1.3 Quantifizierung von Bakterien

Um vergleichbare Bedingungen zwischen den einzelnen Infektionsversuchen zu schaffen, wurde mithilfe von Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf Blutagarplatten nachträglich die CFU der instillierten Bakteriensuspensionen ermittelt. Darüber hinaus wurden die Bakterien anhand der intravitalmikroskopischen Bilder unter Verwendung der CapImage-Software quantifiziert.

In der Versuchsgruppe Ia wurden im Mittel 1997,8 Bakterien-/konglomerate pro mm^2 ($\text{SD} = 1114,8 / \text{mm}^2$; $n = 8$) bestimmt. Im Vergleich dazu wurden in Versuchsgruppe Ib die Bakterien-/konglomerate mit einem Mittelwert von 2119,4 pro mm^2 ($\text{SD} = 873,1 / \text{mm}^2$; $n = 6$) quantifiziert. In Versuchsgruppe Ic konnte mit einem Mittelwert von 2752,9 pro mm^2 ($\text{SD} = 1088,1 / \text{mm}^2$; $n = 8$) die höchste Anzahl Bakterien-/konglomeraten festgestellt werden.

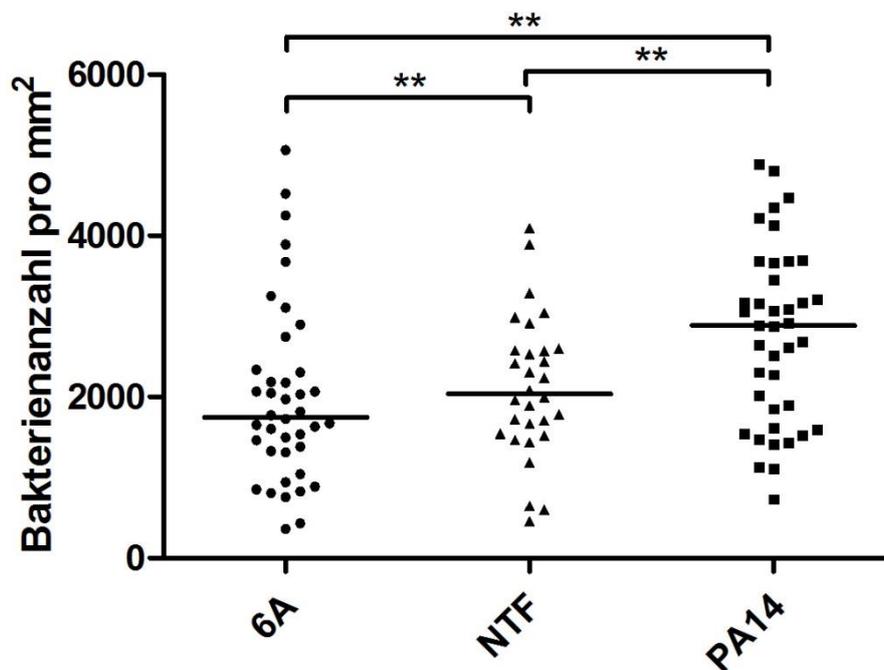


Abb. 18 : Ergebnisse Ia, Ib, Ic : Bakterien-/konglomerate pro mm^2

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von Bakterien und Bakterienkonglomeraten. Jede Markierung steht hierbei für eine ausgewertete Aufnahme. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen allen drei Versuchsgruppen. Signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,000$ sind gekennzeichnet mit **.

4.2 Ergebnisse der Versuchsgruppe II

In diesem Teil der Arbeit stand die Fragestellung, ob eine Leukozytenmigration in pulmonales Gewebe sowie die Phagozytose von Bakterien durch einwandernde Leukozyten beobachtet werden kann, im Mittelpunkt.

Hierfür wurden 2 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Zur Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten in der Blutbahn wurden 100 μl 0,1% Rhodamin 6G in den retrobulbären Venenplexus injiziert. CFSE-markierte Pneumokokken vom Typ 6A wurden anschließend intratracheal appliziert.

Zur Detektion beider Farbstoffe wurden Aufnahmen der Lungenabschnitte zunächst unter dem Grün- und anschließend unter dem Blaufilter angefertigt. Einer Blaufilter-Aufnahme (siehe Abbildung 19) wurde dabei ein Bild des gleichen Lungenabschnitts unter dem Grünfilter (siehe Abbildung 20) zugeordnet.

Unter beiden Filtern konnten fluoreszenzmarkierte Zellen unterschiedlicher Größe beobachtet werden. Diese wurden nach Versuchsende mithilfe der CapImage-Software einzeln vermessen und markiert. Wie in Versuchsgruppe I wurde anhand des ermittelten Zelldurchmessers zwischen kleinen und großen Zellen unterschieden.

Anschließend wurden die Bildpaare in das Bildbearbeitungsprogramm GIMP Version 2.8 überführt. Es wurden die zuvor vermessenen, fluoreszenzmarkierten Zellen in den Bildern farblich markiert. Zellen mit einem Durchmesser $D < 10,5 \mu\text{m}$ wurden mit kleinen Punktmarkierungen und Zellen mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$ mit großen Punktmarkierungen versehen. Gelbe Punkte zeigten CFSE-markierte Zellen, rote Punkte Rhodamin-6G-markierte Zellen an. Mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms wurden anhand alveolärer und interstitieller Strukturen die beiden Aufnahmen der Bildpaare deckungsgleich übereinander gelegt und miteinander verschmolzen (siehe Abbildung 21).

Nun konnte beurteilt werden, ob Zellen sowohl mit Rhodamin 6G als auch mit CFSE markiert waren. Eine Zelle wurde als doppelmarkiert gewertet, sobald sich die rote und gelbe Markierung um mindestens 50% überlagerten. Die Zellen wurden quantifiziert und mit weißen Pfeilen markiert.

In Versuchsgruppe II ($n = 4$) wurden pro Versuchstier 4-5 Bildpaare zusammengestellt, sodass insgesamt 19 Bildpaare in die Auswertung miteinfließen.

In 19 Bildpaaren wurden von 49 CFSE-markierten Zellen mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$ 27 Zellen gezählt, die zusätzlich eine Rhodaminmarkierung aufwiesen. Dies entspricht einem Prozentsatz von 55,1%.

Die Anzahl CFSE-markierter Zellen mit einem Durchmesser $D < 10,5\mu\text{m}$ beträgt 218. Bei 54 Zellen, also 24,8%, konnte zusätzlich ein Signal unter dem Grünfilter beobachtet werden, sodass sie als doppelmarkiert gewertet wurden.

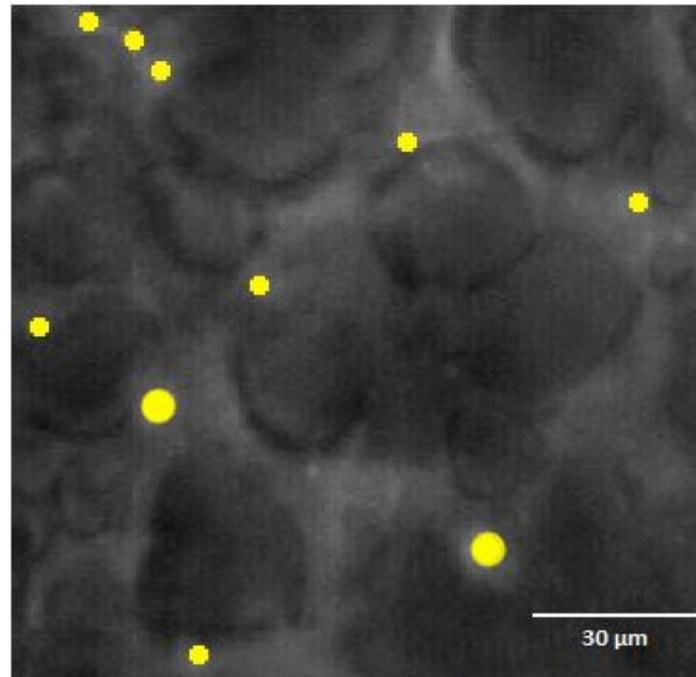


Abb. 19 : Auswertung Versuchsgruppe II: Aufnahme unter dem Blaufilter
Der Bildausschnitt zeigt CFSE-markierte Phagozyten. Die großen gelben Punkte markieren Zellen mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$, die kleinen gelben Punkte Zellen mit einem Durchmesser $D < 10,5 \mu\text{m}$.

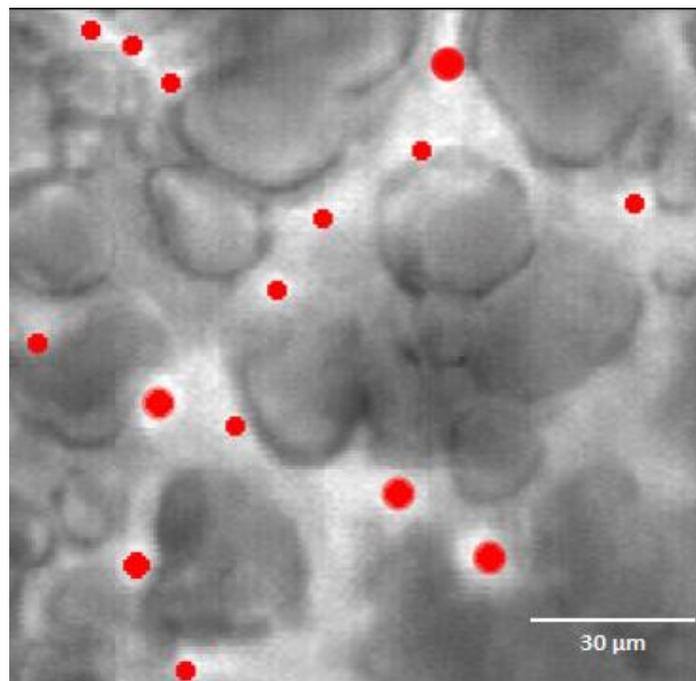


Abb. 20 : Auswertung Versuchsgruppe II: Aufnahme unter dem Grünfilter
Der Bildausschnitt zeigt Rhodamin-6G-markierte Zellen. Die großen roten Punkte markieren Zellen mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$, die kleinen roten Punkte Zellen mit einem Durchmesser $D < 10,5 \mu\text{m}$.

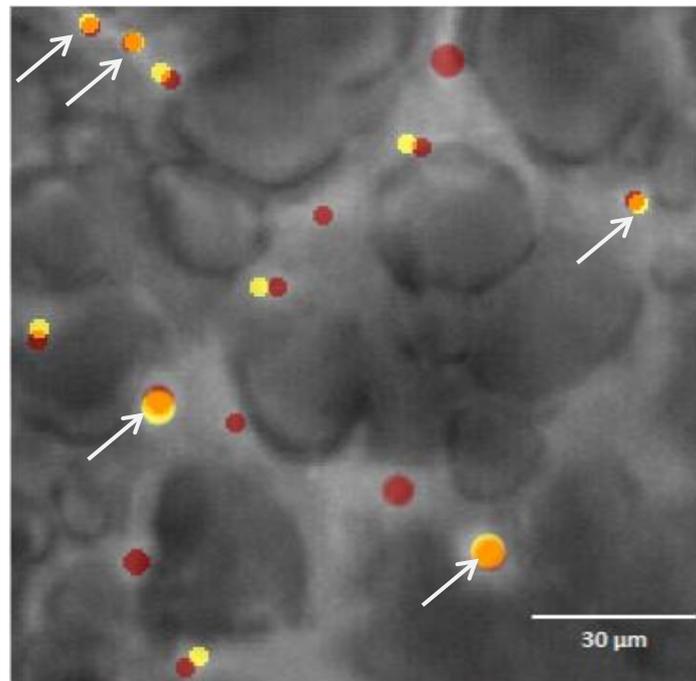


Abb. 21 : Auswertung Versuchsgruppe II: verschmolzene Aufnahme

Mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms GIMP Version 2.8. wurden die in Abbildung 19 und 20 dargestellten Aufnahmen deckungsgleich übereinandergelegt und verschmolzen. Als Orientierung dienten alveoläre und interstitielle Strukturen. Die roten Punkte stellen die Rhodamin-6G-markierten Zellen, die gelben Punkte die CFSE-markierten Zellen dar. Die markierten Zellen wurden quantifiziert und doppelmarkierte Zellen mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

4.3 Morphologie

Die elektronenmikroskopischen und lichtmikroskopischen Aufnahmen konnten die Erkenntnisse aus den intravitalmikroskopischen Aufnahmen bestätigen und ergänzen.

Essentielle Voraussetzung für die *in vivo*-Mikroskopie war, dass Bakterien bis in peripher gelegene Alveolen vordringen und so durch die Mikroskopie der Lungenoberfläche erfasst werden können. In den licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte bestätigt werden, dass die instillierten Bakterien bei den tierexperimentellen Infektionsversuchen bis in den Alveolarraum vorgedrungen sind. EM-Bilder von mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren zeigten ferner, dass die Pneumokokken in der Regel als Diplokokken im Alveolarraum vorlagen.

Zudem zeigte sich in lichtmikroskopischen Aufnahmen, dass sich bei Infektion mit *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* bereits eine Stunde *post infectionem* große, entzündliche Infiltrate im Interstitium und Alveolarraum gebildet hatten, bestehend aus Bakterien, Leukozyten und Erythrozyten. Diese Beobachtung stützt die Erkenntnisse aus der *in vivo*-Mikroskopie, dass in dieser frühen Phase der Infektion Leukozyten in das Lungengewebe einwandern und sich in enger räumlicher Nähe zu Bakteriennestern ansammeln.

EM-Bilder zeigten Bakterien aller verwendeten Spezies in Alveolarmakrophagen. Einzelne Alveolarmakrophagen wiesen dabei mehrere Bakterien intrazellulär auf.

Bei der Infektion mit *P. aeruginosa* konnte außerdem eine Alveolarepithelzelle Typ II beobachtet werden, die ebenfalls Bakterieneinschlüsse in ihrem Zytoplasma aufwies.

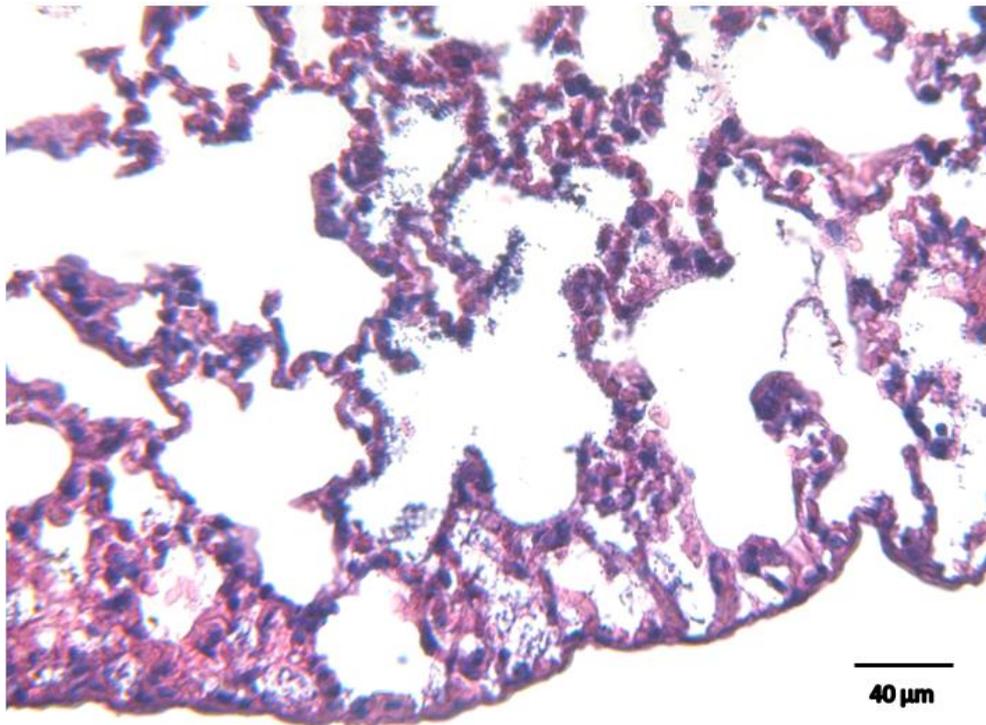


Abb. 22 : Aufnahme eines Lungenabschnitts nach Infektion mit 6A

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der rechten Lunge. Der Ausschnitt zeigt zahlreiche Bakterien im Alveolarraum. Ungefähr 1,5 Stunden nach Infektion mit dem Bakterium wurde dem getöteten Tier die rechte Lunge entnommen und anschließend in 4% Formaldehydlösung fixiert.

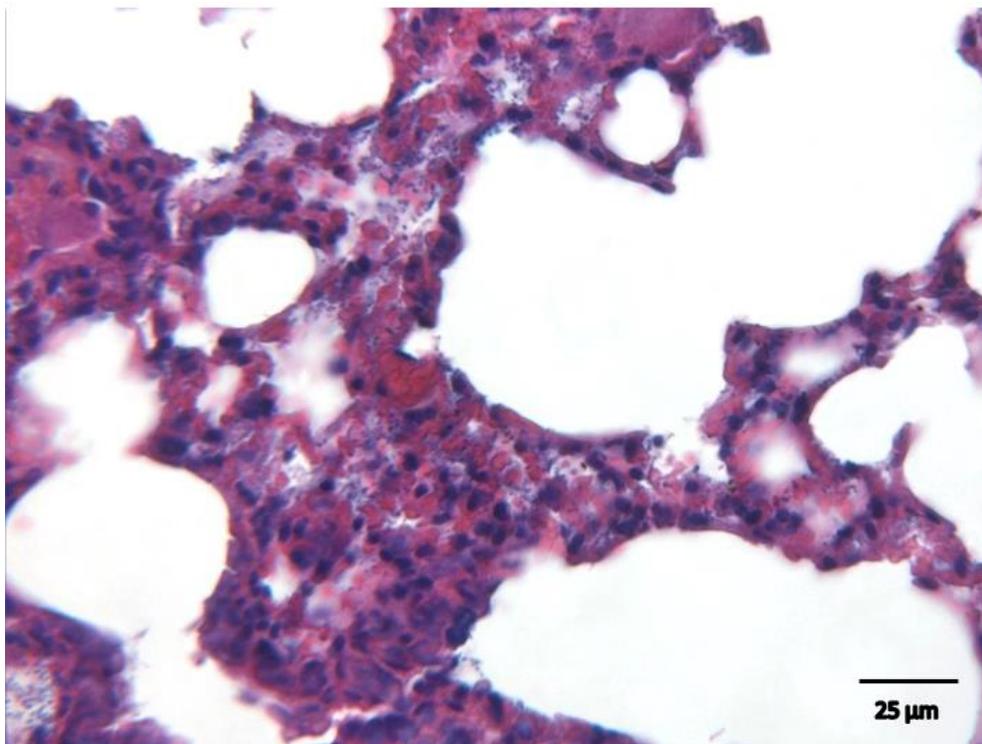


Abb. 23 : Aufnahme eines Lungenabschnitts nach Infektion mit 6A

Die Abbildung zeigt einen Lungenabschnitt nach *Streptococcus pneumoniae*-Infektion mit einem großen entzündlichen Infiltrat, bestehend aus Leukozyten, Erythrozyten und Bakterien.



Abb. 24 : Aufnahme eines Lungenabschnitts nach Infektion mit PA14

Die Abbildung zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Bronchiolus (Br) mit angrenzendem leukozytären Infiltrat (LI) im Alveolarraum nach Infektion mit PA14. Zudem sind mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße (BG) dargestellt.

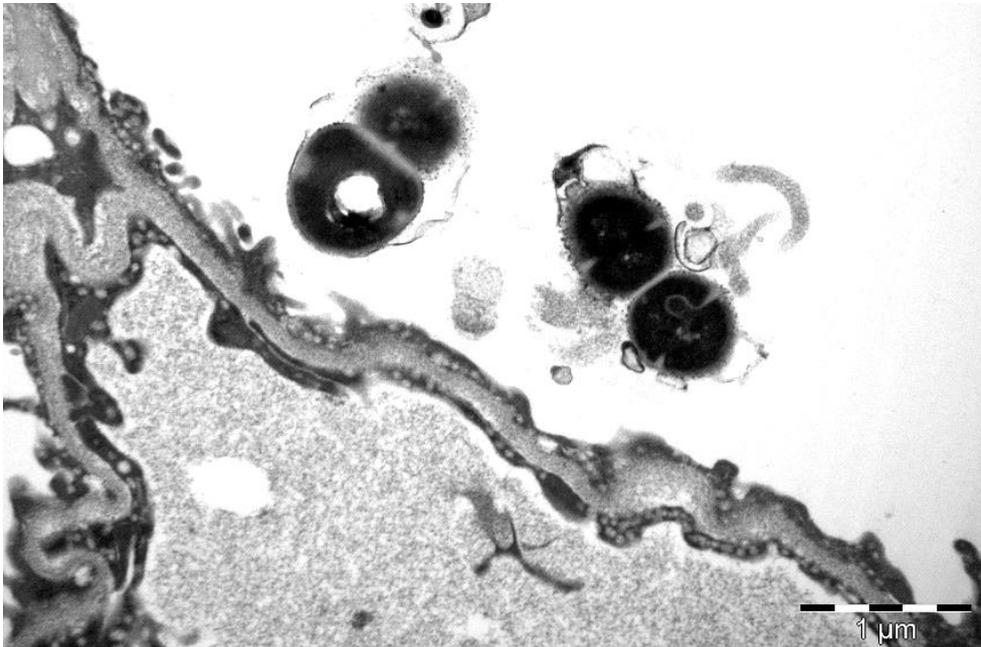


Abb. 25 : EM-Bild: Pneumokokken im Alveolarraum

Das elektronenmikroskopische Bild zeigt Pneumokokken, die als Diplokokken vorliegen. Es liefert korrespondierend zu den intravitalmikroskopischen Aufnahmen den Beweis, dass Pneumokokken bei den Infektionsversuchen mit 6A bis in den Alveolarraum vorgedrungen sind.

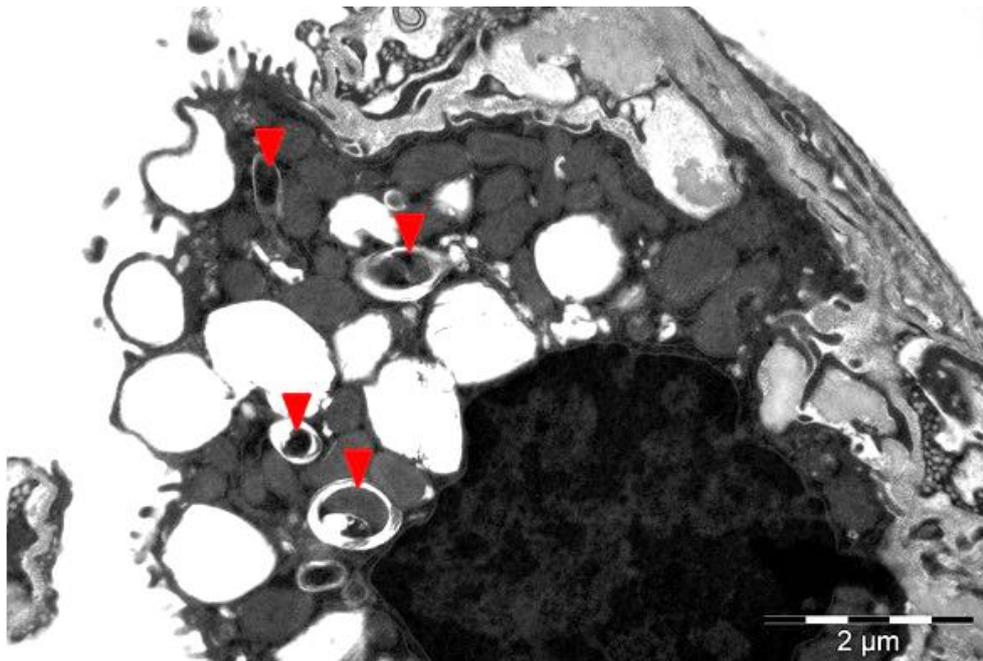


Abb. 26 : EM-Aufnahme des Alveolarraums nach Infektion mit 6A

Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Alveolarmakrophagen mit Bakterieneinschlüssen. Im Zytoplasma des Alveolarmakrophagen sind zahlreiche Lysosomen mit teilweise verdauten Pneumokokken (mit Pfeilen markiert) zu erkennen. Ungefähr 90 min nach Instillation der Bakterien in die Mäuselunge wurde das Lungen-Herz-Paket entnommen und formaldehydfixiert. Durch Herrn PD. Dr. med. Dirk Theegarten, Essen wurden anschließend die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstellt.

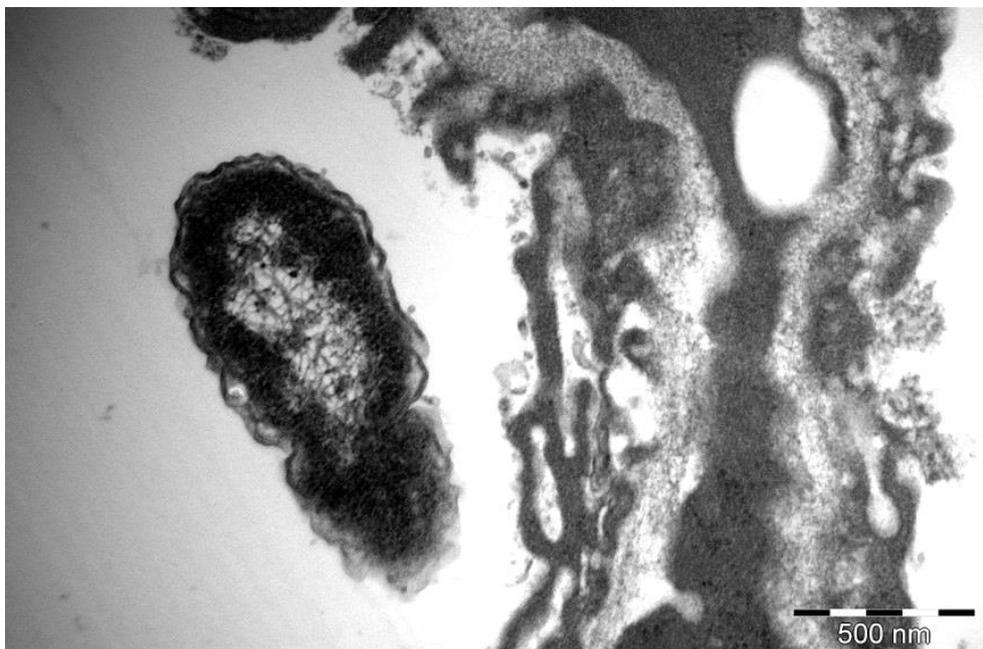


Abb. 27 : EM-Bild: *P. aeruginosa* im Alveolarraum

Das elektronenmikroskopische Bild zeigt ein Bakterium der Spezies *P. aeruginosa* im Alveolarraum. Die Aufnahme beweist, dass Bakterien bei den Versuchen bis in die Alveolen vorgedrungen sind. Die gleiche Beobachtung konnte auch schon bei den intravitalmikroskopischen Aufnahmen gemacht werden.

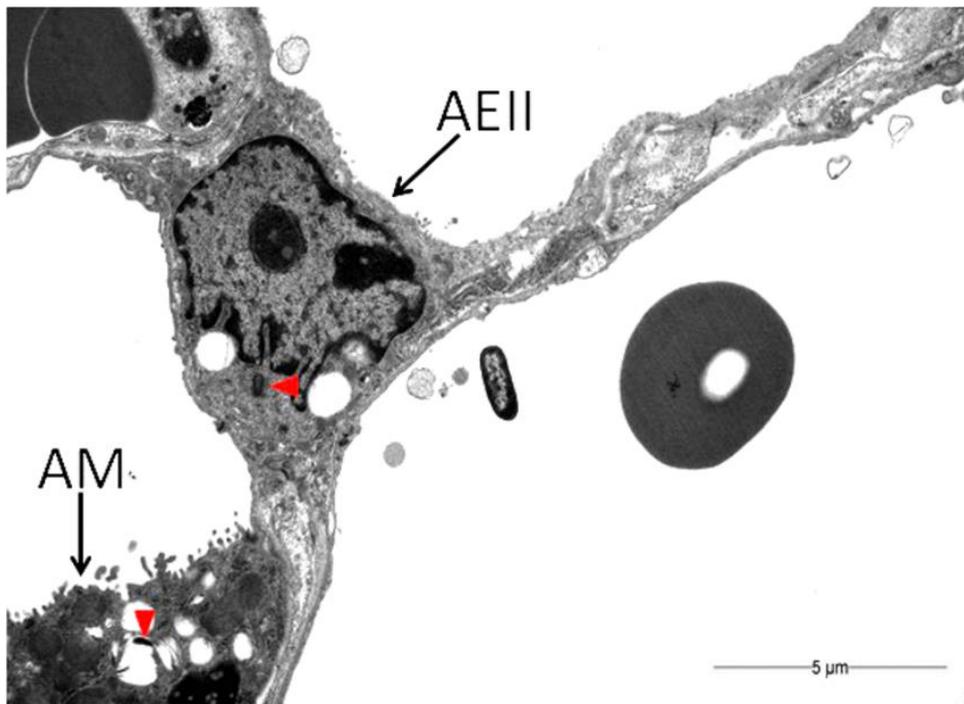


Abb. 28 : EM-Aufnahme: Alveolarepithelzelle Typ II

Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Alveolarepithelzelle Typ II (AEII) mit Bakterieneinschlüssen (mit rotem Pfeil markiert) im Zytoplasma. Zudem ist ein Alveolarmakrophage (AM) im Bildausschnitt zu sehen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn PD. Dr. med. Dirk Theegarten, Essen angefertigt.

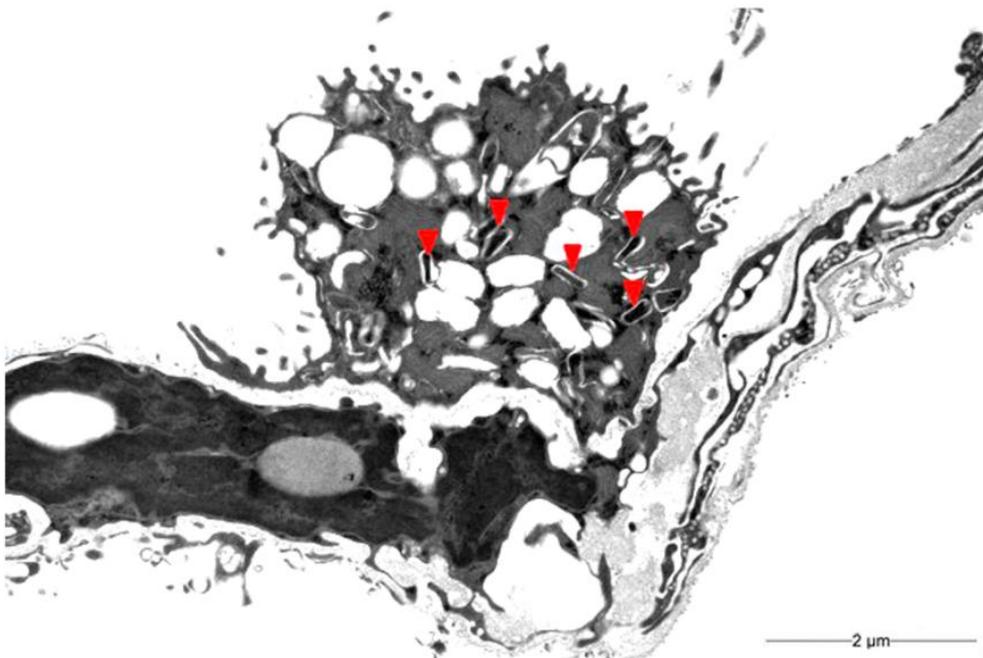


Abb. 29 : EM-Bild des Alveolarraums nach Infektion mit PA14

Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Alveolarmakrophagen mit Bakterieneinschlüssen. Im Zytoplasma des Alveolarmakrophagen sind zahlreiche Lysosomen mit teilweise verdauten Pseudomonaden (mit roten Pfeilen markiert) zu erkennen.

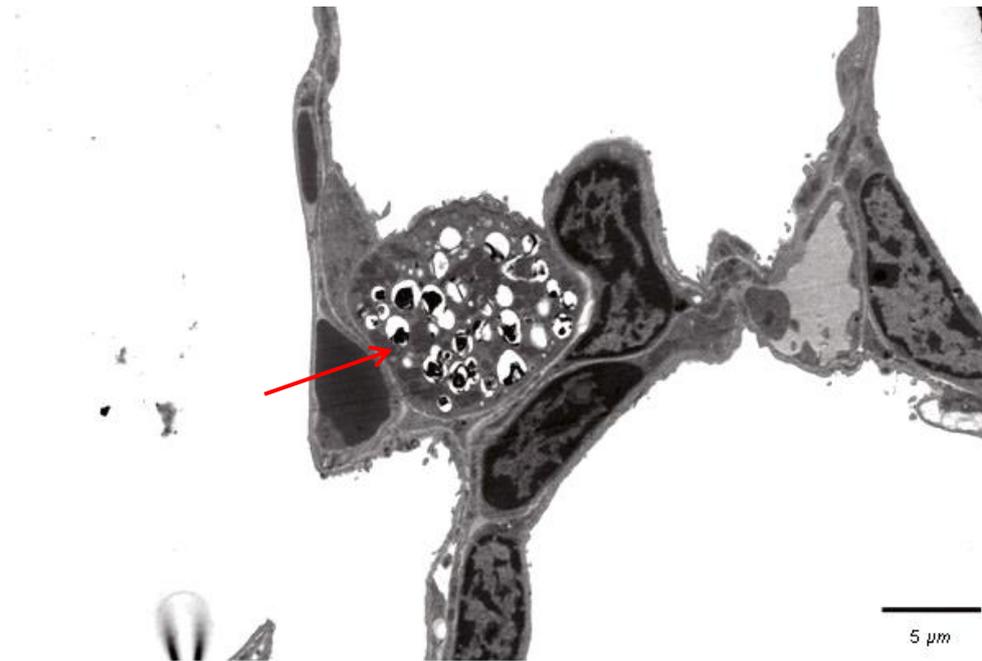


Abb. 30 : EM-Bild: Alveolarmakrophage nach Infektion mit *S. aureus*

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Alveolarmakrophagen aus einer Mäuselunge, die zuvor mit fluoreszenzmarkierten Bakterien vom Typ Newman infiziert wurde. Auf der Aufnahme ist zu erkennen, dass der Alveolarmakrophage mit Bakterien gefüllt ist. Ein Bakterium ist exemplarisch mit einem roten Pfeil markiert.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Ziel dieser Arbeit war es, die Bakterien-Phagozyten-Interaktion im murinen *in vivo*-Modell darzustellen sowie Unterschiede bei Infektionsversuchen mit verschiedenen Erregern zu erkennen und zu quantifizieren.

Ferner sollte geklärt werden, ob die Phagozytose von Erregern durch eingewanderte Leukozyten beobachtet werden kann.

Die Markierung der Bakterien mit CFSE-DA machte Zellen, die Bakterieneinschlüsse aufwiesen, unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierbar. Die Färbung und Kultivierung konnte nach einigen Vorversuchen schnell und zuverlässig nach einem festen Protokoll erfolgen. Allerdings galt es zu berücksichtigen, dass die Bakterien unmittelbar vor Versuchsbeginn bereitgestellt werden mussten, da andernfalls die Qualität der Bakteriensuspension und der Färbung deutlich nachlässt.

Die Durchführung einer Tracheotomie am narkotisierten Tier ermöglichte die direkte Instillation größerer Mengen an Bakteriensuspension intratracheal. Da in dieser Arbeit die Beobachtung der pulmonalen Bakterien-Wirts-Interaktion im Vordergrund stand, konnte so der obere Atemwegstrakt umgangen werden. Diese Methodik lässt allerdings außer Acht, dass die Aufnahme der Erreger zumeist über die oberen Atemwege erfolgt und hier bereits der erste Kontakt zum Immunsystem des Wirts stattfindet. Dennoch ist dies eine zuverlässige Technik, um eine hohe Erregerlast in den Alveolen zu erreichen.

Bei der anschließender chirurgischen Präparation der Lunge nach dem Homburger Modell steht im Vergleich zu den Modellen nach Tabuchi und Looney, die lediglich die Mikroskopie kleiner Lungenabschnitte durch ein Thoraxfenster erlauben, die gesamte ventrale Oberfläche der rechten Lunge oder wahlweise auch der linken Lunge zur Verfügung. Dies ermöglicht eine umfassendere Beurteilung der subpleural gelegenen pulmonalen Strukturen. Allerdings handelt es sich hierbei, verglichen mit den oben genannten Verfahren, um das invasivste Verfahren. Daher wurde besonders viel Wert auf eine effektive Blutstillung gelegt. Die Blutverluste während der Hemithorakotomie wurden durch Ligatur großer Blutgefäße und Koagulation kleinerer Gefäße erheblich reduziert. Offene Wundflächen und für den Moment nicht mikroskopierte Lungenoberflächen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Kompressen bedeckt, die zuvor in physiologischer Kochsalzlösung getränkt wurden.

Die Bildstabilisierung während der Videoaufnahme stellte eine der größten Herausforderungen dar. Bewegungsartefakte durch die maschinelle Ventilation und die Herzkontraktionen wurden

durch den Einsatz eines PEEPs von 5 cm H₂O minimiert. Durch den daraus resultierenden kontinuierlich hohen intrathorakalen Druck kommt es zu einer Verminderung des venösen Rückstroms zum Herzen. Somit wird kein physiologischer Blutkreislauf erreicht. Darüber hinaus war die Unterbrechung der Beatmung für max. 10 sec von Nöten, um ein stabiles Bild zu erzeugen. Diese Pausierung der Atmung kann eine hypoxische pulmonale Vasokonstriktion bedingen, deren Effekt allerdings aufgrund der kurzen Dauer der Hypoxie und der Aufsättigung der Alveolen mit reinem Sauerstoff während der Beatmung als gering einzuschätzen ist. Im Vergleich dazu arbeiten die Modelle nach Looney und Tabuchi zur Bildstabilisierung mit der Anlage eines negativen Druck im Pleuraspalt. Dies ist im Homburger Modell durch die vollständige Eröffnung der Pleurahöhle nicht möglich.

Einen Nachteil aller 3 Modelle stellt sicherlich die Tatsache dar, dass es sich jeweils um einen finalen Versuch handelt. Es ist keine Mikroskopie und Reevaluation über einen längeren Beobachtungszeitraum möglich. Hierfür bietet auch das Homburger Modell keinen Lösungsansatz. Die Beobachtungszeit ist limitiert. Eine Stabilisierung der Tiere ist für ca. 1 Stunde nach OP-Beginn möglich. Im Vergleich zu den Modellen von Tabuchi und Looney hat das Homburger Modell eine kürzere Beobachtungszeit. Vermutlich ist dies das Ergebnis der invasiven Operationstechnik und systemischen Reaktion auf die pulmonale Entzündung. Blutgasanalysen sowie eine Überwachung der Vitalparameter könnten dazu beitragen, die respiratorische und systemische Beeinträchtigung durch die Infektion genauer zu beurteilen. Eine Reduktion der verabreichten Erregerlast könnte ebenfalls die Überlebenszeit verlängern. Die Durchführung Bronchoalveolärer Lavagen könnte sinnvoll sein und die Erkenntnisse aus der Intravitalmikroskopie ergänzen. Auf diese Weise würden auch die Prozesse in zentraler gelegenen Atemwegen miterfasst werden, denn alle drei Modelle ermöglichen nur die Beurteilung subpleural gelegener Lungenabschnitte. Atemwege können unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht beobachtet werden.

Neben der Bakterien-Phagozyten-Interaktion kommen in den intravitalmikroskopischen Aufnahmen auch Blutgefäße zur Darstellung (siehe Abbildung 17). Untersuchungen zur Blutflussgeschwindigkeit und Struktur subpleural gelegener Gefäße wurden anhand des Homburger Modells in der Vergangenheit bereits durchgeführt [Veith, 2014].

Durch Injektion der Farbstoffs Rhodamin 6G in den retrobulbären Venenplexus konnten Leukozyten in der Blutbahn markiert werden. Durch Arbeit mit zwei unterschiedlichen Farbfiltern während der Intravitalmikroskopie konnten sowohl Rhodamin-6-G-positive als auch CFSE-positive Zellen am gleichen Versuchstier erfasst werden. Diese einfache Technik ermöglichte es, Zellen zu identifizieren, die beide Farbstoffe aufgenommen hatte. In Zukunft

könnte die Diapedese von Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem durch umfassendere Darstellung der pulmonale Mikrozirkulation näher untersucht werden.

Zusammenfassend beurteilt stellt das Homburger Modell für die in dieser Arbeit relevanten Fragestellungen ein gut anwendbares und zeitsparendes Modell dar.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im murinen Modell mittels Intravitalmikroskopie die Initialphase einer bakteriellen Infektion dargestellt werden kann. Phagozytoseaktive Zellen konnten durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Bakterien beobachtet werden.

Im I. Teil der Arbeit wurden Infektionsversuche mit 3 unterschiedlichen Bakterienspezies durchgeführt. Es wurde die Initialphase einer Infektion mit *S. pneumoniae*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* untersucht. Dafür wurde den Tieren 100 µl Bakteriensuspension in den inspiratorischen Schenkel des Beatmungsschlauchs appliziert und anschließend eine offene Thorakotomie durchgeführt. Es wurden Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht und auf Video aufgenommen. Anschließend wurden pro Versuchstier 5 Bilder mit der CapImage-Software ausgewertet. Die fluoreszierenden Zellen wurden vermessen und gezählt. Es konnten quantifizierbare Unterschiede sowohl zwischen den verschiedenen Bakterienspezies als auch den phagozytierenden Immunzellen festgestellt werden. So ermittelten wir, dass bei Infektion mit *P. aeruginosa* PA14 die höchste Anzahl an fluoreszierenden Zellen mit $D \geq 10,5 \mu\text{m}$ festgestellt werden konnte ($\bar{x}_{\text{arithm}} = 261,3 / \text{mm}^2$; $\text{SD} = 95,5 / \text{mm}^2$; $n = 8$). Die niedrigste Anzahl dieser Zellen wurde bei Infektion mit *S. pneumoniae* beobachtet ($\bar{x}_{\text{arithm}} = 51,3 / \text{mm}^2$; $\text{SD} = 59,5 / \text{mm}^2$; $n = 8$). Zwischen allen drei Bakterienspezies zeigten sich in Bezug auf die Zellen mit $D \geq 10,5 \mu\text{m}$ signifikante Unterschiede mit $p \leq 0,000$. Im Gegensatz dazu wiesen mit *S. pneumoniae* infizierte Mäuse die meisten Zellen pro mm^2 mit einem Durchmesser von $D < 10,5 \mu\text{m}$ auf ($\bar{x}_{\text{arithm}} = 401,9 / \text{mm}^2$; $\text{SD} = 253,6 / \text{mm}^2$; $n = 8$). In mit PA14 infizierten Lungen wurde dahingegen die geringste Zahl dieser Zellen beobachtet ($\bar{x}_{\text{arithm}} = 138,3 / \text{mm}^2$; $\text{SD} = 164,0 / \text{mm}^2$; $n = 8$). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier zwischen den mit *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* infizierten Versuchsgruppen Ia und Ic ($p \leq 0,000$) sowie zwischen mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* infizierten Versuchsgruppen Ib und Ic ($p \leq 0,05$). Tendenziell konnten bei Infektion mit *S. pneumoniae* 6A mehr Zellen dieser Größe als bei Infektion mit dem *S. aureus* Isolat Newman beobachtet werden.

Worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht feststellen. Zudem gibt es nach Kenntnisstand des Verfassers keine Studien, die die Phagozytose dieser Bakterienspezies durch die verschiedenen Immunzellen im murinen *in vivo*-Modell miteinander vergleichen.

Es gibt allerdings Hinweise aus der Literatur, die die initiale Phase einer Infektion durch bestimmte Bakterienspezies beschreiben.

Zum Beispiel ist bekannt, dass residente Alveolarmakrophagen vor allem initial zur Detektion einer Infektion mit *P. aeruginosa* verantwortlich sind und daraufhin Chemokine sezernieren, die Leukozyten anlocken. Ein massives Recruitment von neutrophilen Granulozyten ist die Folge. Sie sind hauptverantwortlich für die Elimination des Erregers [Lavoie *et al.*, 2011].

Vor allen Dingen neutropene Mäuse sind daher anfällig für dieses Pathogen. Die Bedeutsamkeit der Alveolarmakrophagen auf Bakterien clearance wird gegenwärtig noch kontrovers diskutiert. Sicher ist jedoch, dass sie während einer pulmonalen Infektion abgestorbene Neutrophile phagozytieren und Reparationsvorgänge initiieren.

Unsere Ergebnisse zeigen bei Infektion mit PA14 in der initialen Entzündungsphase hohe Zahlen von Zellen mit $D \geq 10,5 \mu\text{m}$, wohingegen im Vergleich zu Infektionsversuchen mit anderen Bakterienspezies relativ wenig Zellen mit $D < 10,5 \mu\text{m}$, neutrophilen Granulozyten entsprechend, nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass wir die Infektion zu einem Zeitpunkt aufgezeichnet haben, an dem die Alveolarmakrophagen die Erreger bereits detektiert und internalisiert haben, aber noch keine umfangreiche Granulozyten-Rekrutierung stattgefunden hat. Aus der Literatur wissen wir, dass Alveolarmakrophagen abgestorbene Neutrophile phagozytieren. Insofern ist es anhand unseres Setups nicht zweifelsfrei nachzuvollziehen, ob das CFSE-Signal der Alveolarmakrophagen durch die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Bakterien oder Granulozyten bedingt ist. In histologischen Bildern konnten wir allerdings keine Alveolarmakrophagen erkennen, die abgestorbene neutrophile Granulozyten in sich einschlossen.

Bei der Infektion mit *P. aeruginosa* konnte zusätzlich im elektronenmikroskopischen Bild eine Alveolarepithelzelle Typ II (AEC II) beobachtet werden, die ebenfalls Bakterieneinschlüsse in ihrem Zytoplasma aufwies. Diese Beobachtung wurde bereits in einer anderen Arbeit beschrieben. In EM-Aufnahmen wurden AEC II mit intrazellulären Bakterien eine Stunde nach Infektion beobachtet. 4 Stunden nach Infektion konnten diese nicht mehr nachgewiesen werden [Schmiedl *et al.*, 2010]. Es erscheint bisher unklar, ob die Bakterien aktiv in die Alveolarepithelzellen Typ II einwandern oder ob sie durch Phagozytose

aufgenommen werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Alveolarepithelzellen vom Typ II die Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen aktivieren können [Kannan *et al.*, 2009]. Hauptaufgaben der Alveolarepithelzellen vom Typ II sind vor allen Dingen die Produktion und Sekretion von Surfactant. Zudem reparieren sie verletzte Alveolarepithelzellen vom Typ I. [Fehrenbach, 2000].

Abschließend kann man feststellen, dass unsere Beobachtungen bei Infektion mit PA14 noch Fragen offen lassen.

Dies betrifft auch unsere Beobachtungen der anderen Bakterienspezies. Wie unter 2.3. - 2.5. beschrieben weisen die Erreger eine große Bandbreite an Virulenzfaktoren auf, die für den Verlauf einer pulmonalen Infektion von Bedeutung sind. Vermutlich ist ein Zusammenspiel mehrerer Virulenzfaktoren für die Beobachtungen und Unterschiede zwischen den bakteriellen Infektionen ursächlich. Um zu eruieren, welchen Virulenzfaktoren mehr oder weniger Bedeutung bei der Erreger-Phagozyten-Interaktion in der Frühphase einer Infektion zukommt, ist es sinnvoll, sich in künftigen Versuchen auf einen Erreger zu konzentrieren, um einzelne Mechanismen genauer zu beleuchten.

Es ist denkbar, Wildtyp-Bakterien mit Mangelmutanten zu vergleichen. Beispielsweise konnte bisher in murinen Pneumoniemodellen gezeigt werden, dass die Infektion mit *hla*-defizienten Stämmen im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen mit einer signifikant verminderten Mortalität, pulmonalen Inflammation sowie einem verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten einhergeht [Parker und Prince, 2012]. Diese Erkenntnisse beruhen größtenteils auf Beobachtungen der Mäuse, auf den Ergebnissen bronchoalveolärer Lavagen sowie auf histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der entnommenen Lungen [Bubeck-Wardenburg *et al.*, 2007, Bartlett *et al.*, 2008]. Diese Erkenntnisse, insbesondere den Neutrophilen-Einstrom betreffend, könnten möglicherweise anhand des Homburger Modells *in vivo* verifiziert werden.

Im Hinblick auf die Pneumokokkenpneumonie könnte vor allen Dingen die Untersuchung des Virulenzfaktors Pneumolysin (PLY) interessant sein, da bereits in Studien gezeigt werden konnte, dass Pneumolysin-defiziente *S. pneumoniae*-Stämme im Vergleich zu Wildtypstämmen zu einem verzögerten und reduzierten Zellrekrutment führen [Kadioglu *et al.*, 2000]. Hierbei ist Immunantwort durch neutrophile Granulozyten am meisten eingeschränkt. Das Homburger Modell bietet hierfür einen erfolgsversprechenden Ansatz, um diese Erkenntnis im *in vivo* Modell zu bestätigen.

Ein weiterer interessanter Punkt wäre es, mit gentechnisch veränderten Wirtstieren zu arbeiten. So könnten die biologischen Mechanismen der Erregerabwehr genauer untersucht werden. In

einer aktuellen Arbeit von Nils T. Veith und Thomas Tschernig wurde dies bereits durchgeführt. Sie infizierten Surfactant-Protein-A-defiziente C57BL/6-Mäuse mit *S. aureus* Newman und beobachteten die Phagozytose der markierten Bakterien mithilfe des Homburger Modells. Zum Vergleich untersuchten sie auch Wildtyp-C57BL/6-Mäuse. Wie sich herausstellte, zeigten die SP-A-defizienten Mäuse *in vivo* eine signifikant verminderte Aufnahme von Bakterien durch phagozytoseaktive Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen [Veith *et al.*, 2014]. SP-A vermittelt über Eap, das von *S. aureus* produziert wird, die Opsonierung, Phagozytose und Tötung der Erreger [Sever-Chroneos *et al.*, 2010]. Die oben genannte Arbeit zeigt eindrücklich, dass man anhand des Homburger Modells einzelne molekulare Mechanismen im *in vivo* Modell genauer untersuchen kann.

Neben der Quantifizierung von Phagozyten wurden auch die angefärbten Bakterien und Bakterienkonglomerate pro Flächeneinheit ausgezählt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede ($p \leq 0,000$) zwischen allen drei Versuchsgruppe Ia-Ic. In der Auswertung wurden nur Tiere erfasst, die zwischen $6,5 \times 10^8 - 2 \times 10^9$ CFU in 100 μ l PBS intratracheal instilliert bekamen. Verdünnungsstufen der Suspensionen wurden ausplattiert, auf Blutagarplatten kultiviert und am nächsten Tag ausgezählt. Insofern wurde der Einfluss unterschiedlicher Mengen an instillierten Erregern minimiert. Unsere Auszählungen ergaben für das *P. aeruginosa* Isolat PA14 die höchste und für *S. pneumoniae* 6A sowie *S. aureus* Newman deutlich geringere Mengen an frei vorliegenden Bakterien pro Flächeneinheit. Möglich ist, dass Bakterienspezies wie *S. pneumoniae* und *S. aureus* größtenteils in den zentralen Atemwegen verbleiben und nicht bis in die subpleuralen Alveolen vordringen. Ein weiterer Faktor könnte sein, dass die Bakterien bereits in unterschiedlichem Umfang in Phagozyten eingeschlossen sind und nicht mehr einzeln außerhalb von Wirtszellen vorliegen. Es ist auch möglich, dass Teile der Bakterien intrapulmonal absterben und lysieren. Um diesen Erklärungsansätzen genauer nachzugehen, könnte es in zukünftigen Versuchen hilfreich sein, bronchoalveoläre Lavagen durchzuführen und diese zytologisch zu untersuchen.

Im II. Teil der Arbeit stand die Einwanderung von Leukozyten im Fokus. Aus Tierexperimentellen Modellen weiß man, dass es bei einer bakteriellen Infektion der Lunge zu einem massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn kommt. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut kann durch Freisetzung aus dem Knochenmark extrem gesteigert werden. Es kommt zu einer Linksverschiebung. Für einige Bakterienspezies, unter anderem *S. pneumoniae*, konnte nachgewiesen werden, dass eine Neutropenie des Wirtstiers die Beseitigung der Erreger durch das Immunsystem erheblich beeinträchtigt [Craig *et al.*, 2008]. Während einer Infektion interagieren die Erreger zunächst

mit Zellen in den Alveolen, darunter Alveolarepithelzellen und Alveolarmakrophagen. Die Bildung und Sekretion von Chemokinen und Zytokinen wird induziert. Dadurch werden unter anderem zelluläre Adhäsionsmoleküle am Kapillarendothel hochreguliert, sodass die Auswanderung von Neutrophilen aus dem Blutgefäßsystem ins Lungenparenchym ermöglicht wird. Diese Granulozyten produzieren nach Einwanderung Proteasen, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, welche dann den Zelltod infizierter Zellen induzieren. Ein ausgedehnter Lungenparenchymschaden ist die Folge [Craig *et al.*, 2008].

Darüberhinaus bilden aktivierte neutrophile Granulozyten außerhalb der Zelle aus Chromatin und verschiedenen granulären Proteinen netzartige Strukturen, die sogenannten neutrophil extracellular traps (Abk. NETs). Eine hohe lokale Konzentration antimikrobieller Substanzen ist die Folge. NETs sind in der Lage, extrazellulär sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien zu binden, zu töten sowie deren Virulenzfaktoren abzuschwächen. Zudem scheinen NETs eine physikalische Barriere darzustellen [Brinkmann *et al.*, 2004].

In unseren Studien untersuchten wir, ob Rhodamin-6G-markierte Leukozyten aus dem Blutkreislauf in die Lunge einwandern und dort CFSE-markierte Bakterien aufnehmen. Wir konnten im *in vivo* Modell feststellen, dass bereits 30 min nach Infektion mit *S. pneumoniae* Leukozyten in die Lunge eingewandert waren und CFSE-markierte Bakterien in sich trugen. Rhodamin-6G-markiert waren 55,1% der CFSE-markierten Zellen mit einem Durchmesser $D \geq 10,5 \mu\text{m}$. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Zellen um eingewanderte, phagozytoseaktive Monozyten handelt.

Unter den Zellen mit einem Durchmesser $D < 10,5 \mu\text{m}$ wiesen 24,8% zusätzlich zur CFSE-Markierung eine Rhodamin-6G-Markierung auf. Diese Zellen könnten aus der Blutbahn eingewanderte neutrophile Granulozyten sein.

Wir konnten demnach zeigen, dass bereits in dieser frühen Phase der Infektion Zellen aus der Blutstrombahn in das Lungengewebe einwandern und CFSE-markierte Bakterien in sich tragen. In zukünftigen Versuchen könnte es interessant sein, die molekularen Mechanismen der Leukozytendiapedese näher zu beleuchten. Es ist denkbar, mit gentechnisch veränderten Mäusen zu arbeiten, die zum Beispiel nicht in der Lage sind, einzelne Toll-like-Rezeptoren (TLR) wie den TLR2 zu exprimieren. Toll-like-Rezeptoren dienen der Erkennung von Strukturen, die auf oder in Krankheitserregern vorkommen. Sie stehen damit am Anfang der Signalkaskade. Der TLR2 ist in der Lage, spezifische Komponenten verschiedener Bakterien zu erkennen. Dazu gehören Mykobakterien und gram-positive Bakterien [Craig *et al.*, 2008]. Ein anschließender Vergleich mit Wildtyp-Mäusen wäre sinnvoll.

Andererseits ist auch vorstellbar, den Einfluss einzelner Chemo- oder Zytokine und zellulärer Adhäsionsmoleküle auf das Rekrutment der Neutrophilen zu untersuchen.

Insgesamt wäre in diesem Zusammenhang die Durchführung von Laborkontrollen mit Differentialblutbild und von bronchoalveolären Lavagen sinnvoll, um das Recruitment der Zellen genauer beurteilen zu können.

Therapeutische Ansätze könnten gefunden werden, mit denen die Destruktion des Lungengewebes durch neutrophile Granulozyten gemindert und gleichzeitig ihre wichtige Funktion bei der Erregerabwehr gestärkt werden könnte.

Abschließend können wir feststellen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche unsere Fragestellungen zum Teil beantworten konnten. Das Homburger Modell und unsere Beobachtungen geben vielerlei Denkanstöße und inspirieren zu weiteren Versuchen unterschiedlichster Fragestellungen. Es bieten sich spannende Ansätze für die Intravitalmikroskopie bei pulmonalen Infektionen. Die Forschung anhand dieses Modells könnte dazu beitragen Virulenzfaktoren sowie Determinanten und Schlüsselmoleküle der Erreger-Wirts-Interaktion weiter zu entschlüsseln und neue Angriffspunkte für Therapien zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

1. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30: 627-634.
2. Aliberti S, Kaye KS (2013) The changing microbiologic epidemiology of community-acquired pneumonia. *Postgraduate medicine* 125: 31-42.
3. Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK (2005) Pyocyanin production by *pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174: 3643-3649.
4. Arancibia F, Bauer TT, Ewig S, Mensa J, Gonzalez J, Niederman MS, Torres A (2002) Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and *pseudomonas aeruginosa*: Incidence, risk, and prognosis. *Archives of Internal Medicine* 162: 1849-1858.
5. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T (2001) Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: Drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative Medicine* 51: 443-456.
6. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Fernebro J, Moschioni M, Massignani V, Hultenby K, Taddei AR, Beiter K, Wartha F, von Euler A, Covacci A, Holden DW, Normark S, Rappuoli R, Henriques-Normark B (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2857-2862.

7. Bartlett AH, Foster TJ, Hayashida A, Park PW (2008) Alpha-toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in staphylococcus aureus pneumonia. *The Journal of infectious diseases* 198: 1529-1535.
8. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T, The Capnetz Study group (2006) CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia*. *Journal of internal medicine* 260: 93-101.
9. Blasi F, Mantero M, Santus P, Tarsia P (2012) Understanding the burden of pneumococcal disease in adults. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18: 7-14.
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 303: 1532-1535.
11. Bubeck Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O (2007) Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of staphylococcus aureus pneumonia. *Infection and immunity* 75: 1040-1044.
12. Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann HS, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, Young LR, Mavrodi D, Thomashow L, Lau GW (2009) Pseudomonas aeruginosa exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *The American journal of pathology* 175: 2473-2488.
13. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT (2002) Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature medicine* 8: 687-693.

14. Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S (2008) Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and immunity* 77: 568-575.
15. Dockrell DH, Whyte MK, Mitchell TJ (2012) Pneumococcal pneumonia: Mechanisms of infection and resolution. *Chest* 142: 482-491.
16. Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *Journal of general microbiology* 6: 95-107.
17. Fehrenbach H (2000) Alveolar epithelial type II cell: Defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research* 2: 33-46.
18. Fraunholz M, Sinha B (2012) Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 43.
19. Fung HB, Monteagudo-Chu MO (2010) Community-acquired pneumonia in the elderly. *American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* 8: 47-62.
20. Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock J (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional staphylococcus aureus protein eap. *Microbiology* 149: 2701-2707.
21. Haugland RP, Gregory J, Spence MTZ, Johnson ID (2002)- Handbook of fluorescent probes and research products.
22. Henriques-Normark B, Tuomanen EI (2013) The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. doi: 10.1101/cshperspect.a010215.

23. Hilf M, Yu VL, Sharp J, Zuravleff JJ, Korvick JA, Muder RR (1989) Antibiotic therapy for pseudomonas aeruginosa bacteremia: Outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *The American Journal of Medicine* 87: 540-546.
24. Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP (2003) A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of microbiological methods* 52: 379-388.
25. Hyams C, Yuste J, Bax K, Camberlein E, Weiser JN, Brown JS (2010) Streptococcus pneumoniae resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. *Infection and immunity* 78: 716-725.
26. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, Kerr A, Mitchell TJ, Andrew PW (2000) Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infection and immunity* 68: 492-501.
27. Kannan S, Huang H, Seeger D, Audet A, Chen Y, Huang C, Gao H, Li S, Wu M (2009) Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate P. aeruginosa infection. *PLoS ONE* 4: e4891. doi:10.1371/journal.pone.0004891.
28. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Höök M, Etienne J, Vandenesch F, Bowden MG (2007) Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315: 1130-1133.
29. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D (2004) Pseudomonas aeruginosa pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and immunity* 72: 4275-4278.
30. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI (2011) Innate immune responses to pseudomonas aeruginosa infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13: 1133-1145.

31. Looney MR, Thornton EE, Sen D, Lamm WJ, Glenny RW, Krummel MF (2011) Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nature methods* 8: 91-96.
32. Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. *The New England journal of medicine* 339: 520-532.
33. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT (2003) Recognition of pneumolysin by toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1966-1971.
34. Mitchell AM, Mitchell TJ (2010) Streptococcus pneumoniae: Virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection* 16: 411-418.
35. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 52: 145-176.
36. Musher DM (1992) Infections caused by streptococcus pneumoniae: Clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 14: 801-807.
37. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN (2007) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and immunity* 75: 83-90.
38. Parker D, Prince A (2012) Immunopathogenesis of staphylococcus aureus pulmonary infection. *Seminars in immunopathology* 34: 281-297.

39. Pletz MW, Ewig S, Lange C, Welte T, Höffken G (2012) Update pneumonie 2012. Deutsche Medizinische Wochenschrift 137: 2265-2284.
40. Pletz MW, Rohde G, Schütte H, Bals R, von Baum H, Welte T, CAPNETZ-Studiengruppe. (2011) Epidemiology and aetiology of community-acquired pneumonia (CAP). Deutsche Medizinische Wochenschrift 136: 775-780.
41. Pletz MW, Welte T, Ott SR (2010) Advances in the prevention, management, and treatment of community-acquired pneumonia. F1000 medicine reports. doi: 10.3410/M2-53.
42. Prince LR, Bianchi SM, Vaughan KM, Bewley MA, Marriott HM, Walmsley SR, Taylor GW, Buttle DJ, Sabroe I, Dockrell DH, Whyte MK (2008) Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 180: 3502-3511.
43. Roller J, Laschke MW, Tschernig T, Schramm R, Veith NT, Thorlacius H, Menger MD (2011) How to detect a dwarf: In vivo imaging of nanoparticles in the lung. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 7: 753-762.
44. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS (2005) Pathogen-host interactions in pseudomonas aeruginosa pneumonia. American journal of respiratory and critical care medicine 171: 1209-1223.
45. Sanchez CJ, Hinojosa CA, Shivshankar P, Hyams C, Camberlein E, Brown JS, Orihuela CJ (2011) Changes in capsular serotype alter the surface exposure of pneumococcal adhesins and impact virulence. PLoS One 6: e26587. doi: 10.1371/journal.pone.0026587.
46. Sanchez CJ, Shivshankar P, Stol K, Trakhtenbroit S, Sullam PM, Sauer K, Hermans PW, Orihuela CJ (2010) The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial

adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog* 6: e1001044.
doi: 10.1371/journal.ppat.1001044.

47. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiaro J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC (2006) Immunization with staphylococcus aureus clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infection and immunity* 74: 2145-2153.

48. Schimpff S, Satterlee W, Young VM, Serpick A (1971) Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. *The New England journal of medicine* 284: 1061-1065.

49. Schmiedl A, Kerber-Momot T, Munder A, Pabst R, Tschernig T (2010) Bacterial distribution in lung parenchyma early after pulmonary infection with pseudomonas aeruginosa. *Cell and tissue research* 342: 67-73.

50. Sever-Chroneos Z, Krupa A, Davis J, Hasan M, Yang C, Szeliga J, Herrmann M, Hussain M, Geisbrecht BV, Kobzik L, Chroneos ZC (2010) Surfactant protein A (SP-A)-mediated clearance of staphylococcus aureus involves binding of SP-A to the staphylococcal adhesin eap and the macrophage receptors SP-A receptor 210 and scavenger receptor class A. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 4854-4870.

51. Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A (2004) TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *The Journal of clinical investigation* 113: 1482-1489.

52. Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM (2008) Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 104: 338-346.
53. Trotter CL, Stuart JM, George R, Miller E (2008) Increasing hospital admissions for pneumonia, england. *Emerging Infectious Diseases* 14: 727-733.
54. van der Poll T, Opal SM (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374: 1543-1556.
55. Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PO, Christophersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tolker-Nielsen T, Pier GB, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2009) Inactivation of the rhlA gene in pseudomonas aeruginosa prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 117: 537-546.
56. Vander Top EA, Perry GA, Gentry-Nielsen MJ (2006) A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. *BMC microbiology* 6: 61.
57. Veith NT, Hellberg J, Beisswenger C, Laschke MW, Tschernig T (2013) The effects of tobacco smoke on alveolar macrophages - an in vivo mouse lung model for short-term smoking. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 67: 223-227.
58. Veith NT, Tschernig T, Gutbier B, Witzernath M, Meier C, Menger M, Bischoff M (2014) Surfactant protein A mediates pulmonary clearance of staphylococcus aureus. *Respiratory Research* 15: 85-85.
59. Veith NT (2014) Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge: Intrapulmonale Makrophagen/Bakterien-Interaktion in vivo.

60. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EA, Ndiritu M, Klugman KP, Ruckinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M (2010) Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: A meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51: 692-699.

61. Weinberger DM, Trzcinski K, Lu YJ, Bogaert D, Brandes A, Galagan J, Anderson PW, Malley R, Lipsitch M (2009) Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog* 5: e1000476. doi: 10.1371/journal.ppat.1000476.

7 Publikationen

Originalarbeit

Preu L, Bischoff M, Veith NT, Rosenbruch M, Theegarten D, Laschke MW., Meier C, Tschernig T. (2015) *Initial Host Response to Bacteria in the Murine Lung Differs Between Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae*. Inflammation. DOI: 10.1007/s10753-015-0274-2

Abstracts

Preu L, Veith NT, Bischoff M, Menger M, Beisswenger C, Meier C, Tschernig T (2013) *Bakterienspezies werden in der Alveole unterschiedlich phagozytiert – eine Untersuchung in vivo*. Pneumologie 68: A 41 Vortrag bei der Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Personen, die mich auf unterschiedlichste Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig für die Hilfe bei der Auswahl der Thematik, für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien sowie für seine Diskussionsbereitschaft, Ratschläge, konstruktive Kritik, Korrektur und nicht zuletzt für seine großartige Hilfsbereitschaft. Die optimale Betreuung durch ihn ist maßgeblich für den Erfolg dieser Arbeit verantwortlich.

Dr. Nils T. Veith danke ich für die viele Geduld bei der aufwendigen Einarbeitung in OP-Techniken und Auswertung, für die Bereitstellung von Bildmaterial und Daten und für die vielen guten Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD. Dr. Markus Bischoff für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien, Räumlichkeiten sowie insbesondere für die wertvolle Beratung und Hilfestellung bei mikrobiologischen Fragestellungen. Er und sein Team schafften eine angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, hatten stets ein offenes Ohr für aufgetretene Probleme und halfen eine reibungslose Versuchsdurchführung zu gewährleisten.

Bei Frau Prof. Dr. Carola Meier und ihrem Team sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Laschke möchte ich mich für Mitwirkung, Hilfestellung und Unterstützung bedanken.

Von unschätzbarem Wert war die enge Zusammenarbeit bei Korrektur und Statistik mit meiner Schwester Friedrike Preu. Vielen Dank dafür.

Ich danke Frau Sandra Semar sowie den Tierpflegern und –pflegerinnen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für die Versorgung und Bereitstellung der Versuchstiere.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Janine Becker für die Anfertigung und Bearbeitung der histologischen Schnittpräparate bedanken.

Herrn P.D. Dr. Dirk Theegarten vom Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen, und Herrn Prof. Dr. Martin Rosenbruch, Bayer HealthCare AG, Wuppertal gilt mein besonderer Dank für die Anfertigung elektronenmikroskopischer und lichtmikroskopischer Aufnahmen.