

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Uwe Ullmann)

im Zentrum Klinisch-Theoretische Medizin I

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Seroepidemiologische und zellbiologische Untersuchungen zur Rolle
von *Klebsiella*-Serotypen in der
HLA-B27-assoziierten Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew)**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Von Dr. med. Hany Sahly

aus Haifa/ Israel

Kiel 2000

Schriften des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und
Virologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Band 5

Hany Sahly

**Seroepidemiologische und zellbiologische
Untersuchungen zur Rolle von *Klebsiella*-Serotypen
in der HLA-B27-assoziierten Spondylitis ankylosans
(Morbus Bechterew)**

Shaker Verlag
Aachen 2003

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Sahly, Hany:

Seroepidemiologische und zellbiologische Untersuchungen zur Rolle von *Klebsiella*-Serotypen in der HLA-B27-assoziierten Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew)/Hany Sahly.

Aachen: Shaker, 2003

(Schriften des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Bd. 5)

Zugl.: Kiel, Univ., Habil.-Schr., 2000

ISBN3-8322-1655-3

Copyright Shaker Verlag 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1655-3

ISSN 0948-7840

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
A. Einleitung	7
1. Vorbemerkung	7
2. Stand der Forschung	8
2.1 Klinische, genetische und epidemiologische Aspekte von HLA-B27 bei der Spondylitis ankylosans	8
2.2 Tiermodelle der Spondylitis ankylosans	15
2.2.1 HLA-B27-transgene Mäuse	15
2.2.2 HLA-B27-transgene Ratten	16
2.3 Die Rolle von Infektionen bei der Spondylitis ankylosans	17
2.3.1 Tiermodelle zur Rolle von Bakterien bei der Sondylitis ankylosans	17
2.3.2 HLA-B27 und die Zellinvasion gramnegativer Bakterien	18
2.4 Die Rolle von <i>Klebsiella</i> bei der Spondylitis ankylosans	19
2.4.1 <i>Klebsiella</i> als Infektionserreger	19
2.4.2 <i>Klebsiella</i> , HLA-B27 und Spondylitis ankylosans	21
2.4.3 Theoretische Modelle zur HLA-B27-assoziierten Rolle von <i>Klebsiella</i> bei der Spondylitis ankylosans	22
2.4.4 <i>Klebsiella</i> , HLA-B27 und Uveitis anterior	27
B. Problemstellung, Arbeitshypothese und Fragestellung	28
1. Problemstellung	28
2. Arbeitshypothese	30
3. Die Fragestellungen im einzelnen	32

C.	Material und Methoden	35
1.	Patienten	35
2.	Nährmedien und Chemikalien	38
3.	Bakterien	41
4.	Methoden	41
4.1	Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)	41
4.1.1	Präparation der Kapselantigene	42
4.1.2	Herstellung der kapsellosen Varianten und Kapseltypisierung	44
5.	Austausch der Kapselgene zwischen verschiedenen Serotypen und Herstellung der Kapselgentransformante	45
5.1	Herstellung des histidinauxotrophen K2-Empfängerstammes und des argininauxotrophen K36-Spenderstammes mittels Nitrosoguanidinmutagenese	45
5.2	Erzeugung von Nalidixinsäureresistenz beim argininauxotrophen K36-Spenderstamm	47
5.3	Erzeugung von Kanamycinresistenz beim argininauxotrophen K36-Spenderstamm	47
5.4	Verfahren zum Austausch von Kapselgenen zwischen K36- Spender- und K2-Empfängerstämmen	48
6.	Charakterisierung mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE)	52
7.	Analyse der Kapselpolysaccharide mittels Kern-Magnet- Resonanz-Spektroskopie	52
8.	Visualisierung der Kapsel mittels Elektronenmikroskopie	53
9.	Quantitative Kapselbestimmung mittels Glucuronsäurenachweis	54
10.	Bakteriozintypisierung	54
11.	Lipopolysaccharidanalyse	55

12.	Hämagglutinationstest	56
13.	Invasionsverhalten der Bakterien gegenüber Epithelzellen	57
13.1	Zellen und Kulturbedingungen	57
13.2	Untersuchung der Invasionsfähigkeit der Bakterien in Epithelzellen	57
13.3	Untersuchung der Adhärenzfähigkeit der Bakterien an Epithelzellen	58
13.4	Untersuchung der Persistenzfähigkeit der Bakterien in Epithelzellen	59
14.	Interaktion der Bakterien mit polymorphkernigen Granulozyten	60
14.1	Granulozytenpräparation	60
14.2	Serumgewinnung	61
14.3	Chemilumineszenztest	61
14.4	IgG-Bindung an die Bakterien	62
14.5	Bindung des Komplementproteins C3b an die Bakterien	64
15.	Statistische Analyse	65
D.	Ergebnisse	66
1.	Serologische Befunde	66
1.1	Häufigkeit reaktiver Seren	66
1.2	Titerhöhe reaktiver Seren	69
1.3	Nachweis der Immunglobulinklassen	72
1.4	Titer spezifischer IgG-Antikörper	72
2.	Zellbiologische Untersuchungen	76
2.1	Genetische und phänotypische Charakterisierung der bekapselten Elternstämme, deren unbekapselter Varianten und der Kapselgentransformante	76

2.2	Adhärenz-, Invasions- und Persistenzfähigkeit der <i>Klebsiella</i> -Serotypen gegenüber Epithelzellen	84
2.3	Interaktion zwischen polymorphkernigen Granulozyten und <i>Klebsiella</i> -Serotypen	92
2.3.1	Stimulierbarkeit von Granulozyten gesunder Personen	92
2.3.2	Bindung von humanem Komplementprotein C3b und humanen IgG-Antikörpern an die Bakterien	93
2.4	Stimulierbarkeit von Granulozyten HLA-B27-positiver Spondylitis-ankylosans-Patienten	96
2.4.1	Stimulierbarkeit der Granulozyten durch Zymosan	96
2.4.2	Stimulierbarkeit der Granulozyten durch <i>Klebsiella</i> -Serotypen	98
E.	Diskussion	102
1.	Serologische Befunde	103
1.1	Methodische und konzeptionelle Aspekte	104
1.2	Antikörperantwort gegen <i>Klebsiella</i> -Serotypen bei Patienten mit Spondylitis ankylosans	108
1.3	Antikörperantwort gegen <i>Klebsiella</i> -Serotypen bei Patienten mit Uveitis anterior	112
2.	Interaktion mit Epithelzellen	114
3.	Interaktion mit Granulozyten	121
F.	Schlußfolgerungen und Ausblick	126
G.	Zusammenfassung	130
H.	Literaturverzeichnis	133
I.	Danksagung	155