

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Hirnparenchymveränderungen bei der Pneumokokkenmeningitis:
Induktion von Zytokin-mRNA (TNF- α und IL-1 β) und Reduktion
von Myelin-mRNA (PLP und MOG)**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Kaywan Izadpanah Zargandeh
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J.S. Braun

2. Prof. Dr. med. H.-W. Pfister

3. Prof. Dr. med. R.R. Schumann

Datum der Promotion: 29.01.2010

Zusammenfassung

Trotz potenter Antibiotika und moderner Intensivmedizin verursacht die bakteriell-eitrige Meningitis immer noch viele neurologische Spätschäden. Es gibt viele Ursachen, welche zur Hirnschädigung beitragen, wie beispielsweise die massive Inflammation, bakterielle Faktoren oder das Hirnödem und der Hirndruck. Die intrathekale Entzündung ist bereits gut erforscht. Die Entzündungskaskaden im Gehirn und die Myelinsynthesestörung sind bei der Pneumokokkenmeningitis bislang wenig untersucht. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des leukozytären Infiltrates, von TNF- α und Metallo matrix Proteasen sowie wichtiger bakterieller Virulenzfaktoren (Pneumolysin, Wasserstoffperoxid und aufgereinigte Zellwandfragmente) und stoffwechsellaktiver Pneumokokken auf die Myelinsynthese und die Initiierung einer parenchymatösen Entzündungsreaktion im Gehirn untersucht.

Mittels der molekularbiologischen Detektionsmethoden der semiquantitativen Real-Time-PCR sowie der in situ Hybridisierung konnten wir zeigen, dass lebende Pneumokokken zeitabhängig eine starke parenchymatöse Entzündungsreaktion (TNF- α - und IL-1 β -mRNA) induzieren. Die genetische Inaktivierung der Pneumokokktoxine Pneumolysin und Wasserstoffperoxid oder die Inhibition der leukozytären Infiltration des Liquorraums hatten keinen signifikanten Einfluss auf die TNF- α - und IL-1 β -mRNA Induktion im Gehirn. Hitzeinaktivierung der Pneumokokken bewirkte jedoch eine massive Reduktion dieser Entzündungsreaktion. Pneumokokkenzellwandfragmente hingegen waren genau so potente Entzündungsinduktoren wie intakte, lebende Pneumokokken, was auf deren wichtige proinflammatorische Wirkung auf das Gehirnparenchym hinweist.

Die Infektion mit vitalen Pneumokokken führte zu einer signifikanten Synthesestörung der myelinspezifischen MOG- und PLP-mRNA. Weder die Inhibition der Liquorpleozytose noch die Inaktivierung der bakteriellen Wasserstoffperoxid- und Pneumolysin-Produktion hatten einen protektiven Effekt auf diese Myelin-mRNA-Synthesestörung. Hitzeinaktivierte Pneumokokken bewirkten kaum noch eine Myelin-mRNA-Synthesestörung, während Pneumokokkenzellwandfragmente die MOG- und PLP-mRNA stark reduzierten. Durch Inhibition der TNF- α -Freisetzung und MMPasen konnte die Myelin-mRNA-Synthesestörung jedoch signifikant reduziert werden.

Diese Ergebnisse sind von klinischer Relevanz, da es insbesondere bei fortgeschrittenen Stadien der Pneumokokkenmeningitis durch Autolyse von *S. pneumoniae* und iatrogen induziert durch bakterizide Antibiotika zu einer hohen Konzentration von löslichen Zellwandfragmenten im Liquor cerebrospinalis kommt. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit der Entwicklung adjuvanter Therapiestrategien.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die bakterielle Meningitis	1
1.2	Myelin.....	10
1.3	Herleitung der Aufgabenstellung und Hypothese der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Tierexperimente.....	17
2.2	In situ Hybridisierung.....	21
2.3	Isolierung und Quantifizierung der mRNA aus den Geweben.....	24
2.4	Immunhistologie.....	30
3	ERGEBNISSE.....	32
3.1	In situ Produktion proinflammatorischer Mediatoren während der Pneumokokkenmeningitis.....	32
3.2	Räumliche und zeitliche Charakterisierung der Entzündungsreaktion im Hirnparenchym	37
3.3	Auslöser der hirnparenchymatösen Entzündungsreaktion.....	42
3.4	Einfluss der parenchymatösen Entzündungsreaktion auf die Oligodendrozyten	49
3.5	Synthesestörung der mRNA Oligodendrozyten-spezifischer Proteine in der Pneumokokkenmeningitis.....	50
3.6	Identifikation von Auslösern der Myelinsynthesestörung.....	53
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Zielsetzung.....	59
4.2	Spatiotemporale Veränderungen der Synthese inflammatorischer Mediatoren und des Myelins während der Pneumokokkenmeningitis	60
4.3	Kriterien zur Identifizierung der Ursachen der Zytokin-Induktion sowie der Myelin-Suppression	67
4.4	Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse.....	80
4.5	Klinische Relevanz	82
4.6	Ausblick.....	83
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	84
6	ANHANG.....	92

1 Einleitung

1.1 Die bakterielle Meningitis

Bakterielle Meningitiden sind Infektionen der weichen Hirnhäute, der Pia mater und der Arachnoidea sowie des Subarachnoidalraumes. Der Subarachnoidalraum erstreckt sich kontinuierlich entlang des Gehirns, des Rückenmarks und der Nervi optici. Gelingt es einem Erreger hier einzudringen, stellen sich ihm keine weiteren Abwehrmechanismen entgegen. Es folgt die ungehemmte Vermehrung dieser Erreger. Als Reaktion kommt es zu einer massiven Infiltration von Leukozyten in den Liquorraum. Das Erkrankungsbild einer eitrigen Meningitis entsteht.

1.1.1 Epidemiologie

Die häufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis sind *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) und *Neisseria meningitidis*. Bis zur Einführung der Schutzimpfung bildeten kindliche Meningitiden, hervorgerufen durch *Haemophilus influenzae* den größten Anteil aller bakteriellen Entzündungen der Hirnhäute. Heute sind in der westlichen Zivilisation hauptsächlich Erwachsene betroffen und *Streptococcus pneumoniae* ist der Haupterreger. In einer niederländischen 5-Jahres-Studie konnten 696 Patienten eingeschlossen werden, bei denen eine ambulant erworbene bakterielle Meningitis diagnostiziert wurde. Bei 51% dieser Gruppe wurde *Streptococcus pneumoniae* und in 37% *Neisseria meningitidis* als Auslöser identifiziert (van de Beek et al. 2002).

Nur etwa 50% der Erkrankten können nach durchgemachter bakterieller Meningitis wieder an ihren Arbeitsplatz zurückkehren, woraus die sozioökonomische Bedeutung der Erkrankung deutlich wird (Bohr et al. 1983).

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Klassisches Zeichen der bakteriellen Meningitis ist das meningeale Syndrom, welches durch Kopfschmerzen, Fieber und Nackensteifigkeit (Meningismus) charakterisiert ist. Bei etwa 80% der Patienten besteht diese Trias beim ersten Arztkontakt. Diese Symptome werden im Verlauf häufig von Lichtscheu, Übelkeit und Erbrechen ergänzt. Später entwickeln sich Bewusstseinsstörungen und fokale-neurologische Ausfälle. Ohne adäquate Therapie verstirbt der Patient. Bei Kindern unter zwei Jahren, alten oder immunsupprimierten Patienten können Fieber und längere Zeit auch Bewusstseins- und Persönlichkeitsveränderungen nur sehr schwach ausgeprägt sein. Im Allgemeinen korreliert die Bewusstseinsstörung als klinischer

Verlaufsparameter gut mit der Erkrankungsschwere und damit auch dem Outcome der Patienten (Kaplan 1999).

1.1.3 Komplikationen und Prognose der Erkrankung

Die besondere Bedeutung von *Streptococcus pneumoniae* im Rahmen der bakteriellen Meningitiden begründet sich durch die hohe Inzidenz verbunden mit einer hohen Letalitätsrate bzw. einer hohen Rate an neurologischen Defektzuständen. Außerdem konnten in den vergangenen Jahren zunehmend Penizillin-resistente Stämme isoliert werden.

Bereits 1945, vier Jahre nach Einführung des Penizillins, wurden in vitro erste resistente Stämme entdeckt. In den 1960er Jahren konnten aus Patientenliquor, resistente Stämme isoliert werden. Die Zahl der Resistenzen nimmt seither kontinuierlich zu. In den USA und Afrika sind multiresistente Stämme beschrieben (de Gans et al. 2002). Die Letalität der Pneumokokkenmeningitis wird mit 21 - 30% beziffert. Die Sterblichkeitsrate von Meningitiden, hervorgerufen durch *Neisseria meningitidis* liegt zwischen 3 - 15% und die von *Haemophilus influenzae* bei 11 - 28% (Schuchat et al. 1997; van de Beek et al. 2002).

Besonders Kinder leiden häufig an neuropsychologischen Defiziten. Die von Bedford und Mitarbeitern nachuntersuchten Kinder hatten fünf Jahre nach einer im ersten Lebensjahr erlittenen Pneumokokkenmeningitis in 26% Hörstörungen, 12% zeigten eine Verhaltensauffälligkeit, 8% eine motorische Behinderung und 8% eine Lernbehinderung (Bedford et al. 2001). Kastenbauer und Pfister beschrieben 2003 bei knapp 75% ihrer nachuntersuchten Patienten während der Erkrankung eine zentralneurologische Störung. 27,6% erlitten Krampfanfälle, 21,8% arterielle und 9% venöse zerebrovaskuläre Ereignisse. Nach Therapie der Erkrankung zeigten 19,5% eine Hörminderung, 4,6% eine Hirnnervenlähmung und 2,4% eine Myelitis (Kastenbauer et al. 2003). Komplizierte Verläufe oder der Tod von Patienten sind nach aktueller Lehrmeinung in der Mehrzahl die Folge einer starken intrazerebralen Drucksteigerung (Durand et al. 1993). Dies beginnt mit der Entwicklung eines kombinierten vasogenen und zytotoxischen Hirnödems und kann in der Ausbildung eines akuten Hydrozephalus bis zur Herniation des Hirngewebes führen. Dies bedeutet meist den frühen Tod der Patienten. Störungen der komplexneurologischen Funktionen, wie Lern- oder Aufmerksamkeitsstörungen, sind hierdurch jedoch nicht ausreichend zu erklären.

1.1.4 Behandlungsstrategien

Akut eitrige Meningitiden stellen immer einen Notfall dar und bedürfen einer schnellen Therapieeinleitung. Aktueller Goldstandard der Therapie akut eitriges Meningitiden ist die intensivmedizinische Überwachung und Behandlung auftretender Komplikationen sowie die Einleitung einer erregerspezifischen und resistenzgerechten Antibiose.

Vor Einführung der antibiotischen Therapie hatten die akut eitriges Meningitiden stets einen tödlichen Verlauf. Mit Einführung der Antibiotikatherapie vor 50 Jahren konnte ein großer Erfolg durch Senkung von Letalität und Morbidität der Erkrankung erzielt werden. Seither konnten, trotz der Entwicklung neuer Therapieschemata und Antibiotika mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften, nur geringe Therapieerfolge erreicht werden (Schuchat et al. 1997; Kastenbauer et al. 2003). Allein die Reduktion der Erregerzahl ist kein ausreichendes Mittel zur weiteren Verbesserung der Therapieergebnisse. Im Laufe der letzten Jahre konnten Tiermodelle der Erkrankung aber auch in vitro Arbeiten zur Erforschung der Pathophysiologie und Pathogenese beitragen. Hieraus stammen zunehmend Erkenntnisse über komplexe Entzündungskaskaden im Hirnparenchym als Reaktion auf die Entzündung im Liquorraum. Eine Senkung der Letalität und Morbidität ist durch den therapeutischen Eingriff in diese Inflammationsreaktion möglich. So wurde bereits der Weg für die adjuvante Kortisontherapie in die Klinik gebahnt.

1.1.5 Pathogenese und Pathophysiologie der Erkrankung

Streptococcus pneumoniae ist ein Gram-positiver, fakultativ anaerober Diplokokkus. Bei etwa 30% der Menschen treten sie transient im Nasopharynx auf, ohne dass es zur Ausbildung klinischer Symptome kommt. Gemessen an der hohen Expressions- und Kolonisationsrate führt *S. pneumoniae* in nur sehr seltenen Fällen zur invasiven Erkrankung. Über noch größten Teils unverstandene Mechanismen kann *S. pneumoniae* jedoch das Epithel des Nasopharynx durchwandern und zu schweren Infektionserkrankungen führen, am häufigsten Pneumonie, Otitis, Sepsis oder Meningitis.

1.1.5.1 Ausbildung einer Meningitis: Der Weg vom Nasopharynx bis in das zentrale Nervensystem

Endothelzellen zwischen dem Hirnparenchym und dem Blut bzw. dem Liquor cerebrospinalis bilden eine physiologische Barriere. Sie verhindern die freie Diffusion von Stoffen zwischen den Kompartimenten. Deshalb werden sie auch als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. Blut-

Liquor-Schranke (BLS) bezeichnet. Die Meningen werden zudem vom knöchernen Schädel umgeben.

Die Voraussetzung für die Ausbildung einer bakteriellen Meningitis ist der Defekt oder die Durchwanderung dieser Barrieren. Eintrittspforten entstehen im Rahmen von eitrigen Mastoitiden bzw. Sinusitiden nach offenen Schädelhirntraumen bzw. postoperativen Dauerlecks oder per contiguitatem bei Bakteriämien und Störung der BHS bzw. BLS.

Ausgangspunkt der bakteriellen Meningitis ist meist eine nasopharyngeale Kolonisation der verantwortlichen Erreger. Die Bildung von H_2O_2 verschafft *S. pneumoniae* einen Vorteil gegenüber konkurrierenden Erregern (Koedel et al. 2002). Dem Keim gelingt es unter Usurpation wirtseigener Moleküle die natürliche Barriere der Mukosa zu durchbrechen und ins Blutorgan einzudringen. Nach der Vermehrung im Blut durchbricht der Keim die Blut-Hirn-Schranke und dringt in den Subarachnoidalraum ein. Die Eintrittspforte in den Liquorraum bzw. in das zentrale Nervensystem ist noch nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden die intrazerebralen Kapillaren, dünnwandige piale Venulen und auch der Plexus choroideus. CbpA können sich an den Plättchen-aktivierenden-Faktor-Rezeptor (PAF-R) binden und so durch Transzytose die Endothelschicht der Kapillaren durchqueren (Ring et al. 1998). Die Überwindung der Endothelbarriere von *S. pneumoniae* ist auch parazellulär denkbar, elektronenmikroskopisch gibt es aber keinen Anhalt für eine parazelluläre Transmigration der Pneumokokken, die mit einer Veränderung der Tight-Junctions einhergehen müsste. Der Plexus choroideus konnte als Eintrittspforte von *Haemophilus influenzae* in den Liquorraum identifiziert werden (Ostrow et al. 1979).

Weitere Virulenzfaktoren, wie das Pneumolysin oder die Hyaluronidase, sind an der Penetration von *Streptococcus pneumoniae* durch Gewebe beteiligt. Pneumolysin kann durch Induktion von Apoptose in Endo- und Epithelzellen zur Störung in der Integrität der Mukosaschicht des Nasopharyngealraumes und der BHS führen (Cockeran et al. 2002). Die Hyaluronidase fördert durch Degradierung der Extrazellulärmatrix die Durchwanderung der Bakterien eines Gewebes.

1.1.5.2 Inflammation des Liquorraums und Mechanismen der Hirnschädigung

Nach Eintritt in den Liquorraum kann sich *Streptococcus pneumoniae* durch Fehlen von natürlichen Abwehrmechanismen und aufgrund seiner Kapsel fast ungestört vermehren. Im Vollbild der Erkrankung werden bis zu 10^9 Kolonie-bildende Einheiten (KBE) pro ml Liquor erreicht.

Durch Autolyse im Liquor cerebrospinalis freigesetzte Zellwandbestandteile (Lipoteichonsäuren) und Endotoxine (Pneumolysin, H_2O_2 etc.) aktivieren primär anwesende meningeale Makrophagen und Mastzellen und stimulieren sie zur Bildung endogener Entzündungsmediatoren (TNF- α , TNF- β , IL-1, IL-4, IL-6 etc.) (Koedel et al. 2002). Diese aktivieren die zerebrovaskulären Endothelien und induzieren die Bildung von Adhäsionsmolekülen (z. B. ICAM-1) (Freyer et al. 1999) und führen so zur Migration von Leukozyten in den CSF. Die aktivierten Zellen bilden vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Diese wirken stark chemotaktisch und es entsteht eine ausgeprägte granulozytäre Entzündung des Liquorraums (Movat et al. 1987). Die Entwicklung der eitrigen Meningitis ist jetzt klinisch manifest (siehe oben). Die gelösten Bakterienbestandteile und endogenen Zytokine führen zur Störung der Blut-Hirn-Schranke und Autoregulation der Hirndurchblutung. Folge sind die Entwicklung eines Hirnödems, die Steigerung des intrakraniellen Drucks sowie lokale Ischämien des Hirnparenchyms (Niemoller et al. 1989). Entzündliche Gefäßveränderungen können diese pathophysiologische Entwicklung durch fokale Vasospasmen und folgender Reduktion der Durchblutung verstärken. Symptomatisch kann dies in Form von fokal-neurologischen Defiziten, Paresen, epileptischen Anfällen oder kortikaler Blindheit werden.

Untherapiert oder ein verspäteter Therapiebeginn der eitrigen Meningitis führt zum Tod. Die Störung der Liquorzirkulation und das starke Hirnödem münden in einer Herniation des Hirngewebes.

Auch bei adäquater Therapie kommt es aber zur Ausbildung alternativer Schadensmechanismen. Auslöser sind sowohl die wirtseigene Entzündungsreaktion als auch eine direkt toxische Wirkung bakterieller Faktoren. Komplexe Entzündungskaskaden bilden sich im Hirngewebe aus. Die genauen Abläufe dieser Kaskaden sind noch Gegenstand der Forschung. Die häufig zu beobachtende Hörschädigung entsteht z. B. durch Entzündung der Perilymphe im Innenohr und die degenerative Veränderung der Haarzellen. Zysk und Mitarbeiter beobachteten eine vermehrte neuronale Apoptose im Gyrus dentatus meningitiskrankter Mäuse, die durch Inhibition der TNF- α -Freisetzung reduziert werden konnte (Zysk et al. 1996). Der Hippokampus ist eine zentrale Struktur für die Funktion des Gedächtnisses und dem Neuerlernen von Wissensinhalten. Im Tiermodell konnte eine positive Korrelation zwischen Quantität des neuronalen Untergangs und dem Ausmaß einer Lernbehinderung festgestellt werden (Loeffler et al. 2001). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die häufig beobachtete Intelligenz- und Lernfähigkeitsminderung nach durchlebter Meningitis bei Kindern dar. Entzündungskaskaden spielen wahrscheinlich auch

eine Rolle in der Entwicklung anderer Defektzustände und Komplikationen im Verlauf der Erkrankung. Deswegen ist das Verständnis von Funktion und Interaktionen der einzelnen Mediatoren ein Schlüssel in der Senkung von Morbidität und Letalität der Erkrankung.

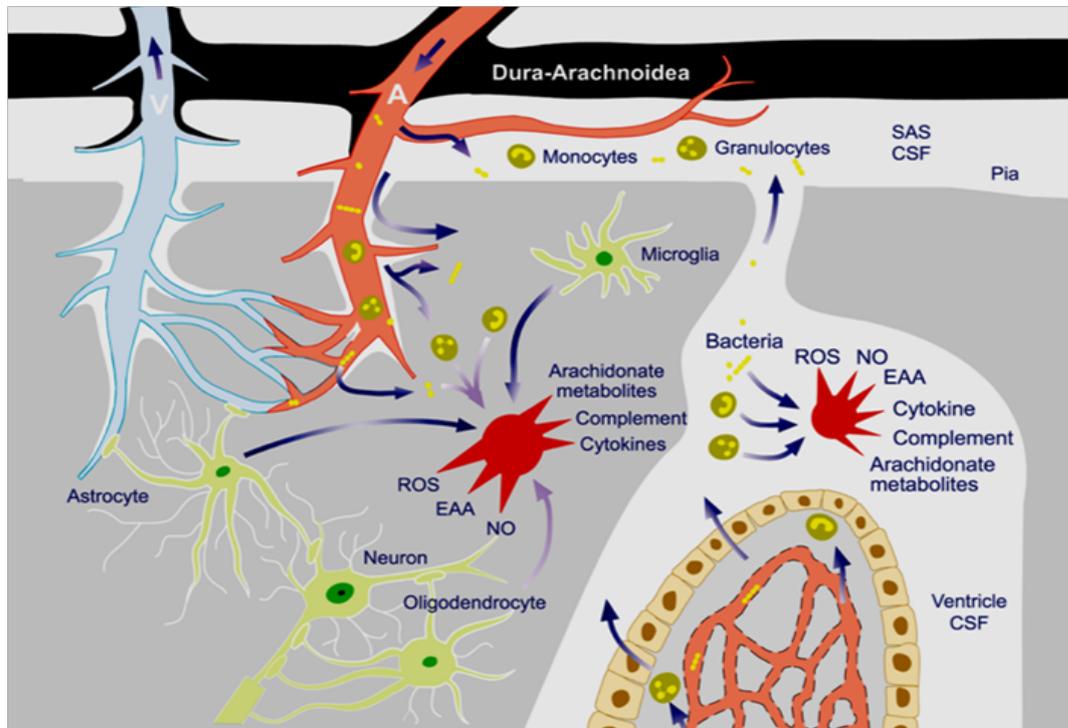


Abbildung 1 (Braun et al. 1999): Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis. Mögliche Invasionswege der Bakterien sind die dünnwandigen Venen (Venulen) der Pia mater oder des Dura-Arachnoidea-Komplexes im Bereich der meningealen Blut-Liquor-Schranke, das Epithel des Plexus choroideus oder die Gehirnkapillaren im Bereich der Blut-Hirn-Schranke. Sobald die Bakterien eine dieser Schranken überwunden haben und sich im Liquorraum vermehren, wird eine massive Entzündungskaskade angestoßen und eine Vielzahl potentiell neurotoxischer Mediatoren produziert, wie z. B. ROS (reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffradikale), NO (Nitritoxid), EAA (excitatory amino acids, exzitatorische Aminosäuren), Arachidonsäure, Komplementfaktoren und Zytokine.

1.1.5.3 Entzündungsmediatoren in der Meningitis

Der Organismus reagiert auf eine Infektion mit der Ausbildung einer Immunreaktion. Die Interaktion der beteiligten Zellpopulationen wird zum einen über direkten Zell-Zellkontakt, aber auch durch sog. Entzündungsmediatoren gesteuert. Im Folgenden sollen die Hauptgruppen der beteiligten Faktoren während der Meningitis kurz erläutert und entscheidende Funktionen ihrer Hauptvertreter erläutert werden.

Zytokine:

Bei Untersuchungen des bakteriell infizierten Liquors wurden folgende Zytokine vermehrt nachgewiesen: Interleukin-1, -3, -4, -6, -8, -10 und -12, Interferon- γ , das Makrophagen-Inflammas-Protein (MIP), der Transforming-Growth-Factor beta (TGF- β) und der Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- α) (Smith et al. 1996; Diab et al. 1997). Diese Zytokine werden hauptsächlich durch einwandernde Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und

Granulozyten synthetisiert. In geringeren Mengen werden sie auch durch ortsständige Mikrogliazellen und Endothelzellen der Kapillaren produziert. Es entsteht ein komplexes Interaktionsnetzwerk zwischen den einzelnen Zellpopulationen, die pro- und antiinflammatorisch wirken können.

Freies TNF- α im Liquor cerebrospinalis wird wesentlich von infiltrierenden Leukozyten gebildet (Bitsch et al. 1997). Durch intrathekale Injektion von TNF- α und durch Untersuchungen an genetisch modifizierten und TNF- α -überproduzierenden Mäusen konnte eine lymphozytäre Inflammation der Meningen erreicht werden (Probert et al. 1997). Nach kombinierter intrathekaler Injektion von Pneumokokkenzellwänden und TNF- α bildete sich eine verstärkte Liquorleukozytose und ein stärkerer Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) aus, verglichen mit der alleinigen Injektion von Pneumokokkenzellwänden (Probert et al. 1997). Die intrathekale Injektion von IL-1 β induziert ebenfalls eine Pleozytose; außerdem führt es zur Entwicklung einer Blut-Hirn-Schrankenstörung (Quagliarello et al. 1991). In der Klinik besteht eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von IL-1 β im Liquor und der Entwicklung von Defektzuständen. IL-1 β dient daher als prognostischer Faktor (Mustafa et al. 1989).

IL-10 und TGF- β werden zu den entzündungshemmenden Interleukinen gezählt. Bei systemischer Gabe sind sie in der Lage auch komplexe pathophysiologische Prozesse wie die Ausbildung eines Hirnödems den Anstieg des intrakraniellen Drucks und eine Liquorleukozytose zu inhibieren. TGF- β inhibiert zudem die Migration von Granulozyten über die Endothelien und deaktiviert Makrophagen (Bogdan et al. 1991).

Chemokine:

Chemokine sind eine Unterfamilie der Zytokine. Sie wirken chemotaktisch und werden vermehrt bei Entzündungsreaktionen gebildet. Lipopolysaccharide aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien sind ein starker Trigger für ihre Produktion und Freisetzung (Spanaus et al. 1997). Chemokine werden entsprechend ihrem molekularen Aufbau in zwei Untergruppen unterschieden. Die C-X-C wirken hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten und die C-C hauptsächlich auf Monozyten (Horuk et al. 1994). Die experimentelle Injektion von Chemokinen in den Liquorraum führt zur Liquorpleozytose und Erhöhung des intrakraniellen Drucks.

1.1.6 *Streptococcus pneumoniae*

Louis Pasteur und George Steinberg gelang bereits 1881 die Isolation von *Streptococcus pneumoniae*. Seither gehört *S. pneumoniae* zu den meist untersuchten Bakterien. Es handelt

sich hierbei um lanzettenförmige, hämolysierende Diplokokken, die aufgrund der Zusammensetzung ihrer Polysaccharidkapsel in über 90 verschiedene Serotypen unterschieden werden können. Hiervon ist für eine manifeste Infektionen nur eine kleine Auswahl relevant (Kalin 1998).

Es werden außerdem eine opaque, eine semitransparente und eine transparente Form unterschieden. Das opaque Bakterium besitzt mehr Kapselpolysaccharid und eine verminderte Phosphorylcholin-Komponente der Zellwand. Die transparente Variante der Pneumokokken besiedelt im Gegensatz zur opaquen Variante den Nasopharynx. Sie kann sich dort vermehren und anschließend auch die Mukosa durchwandern und eine Bakteriämie auslösen (Cundell et al. 1995). Die opaque Form besiedelt den Nasopharynx nicht. Nach intraperitonealer Gabe sind beide Varianten in der Lage, eine Sepsis auszulösen. Pneumokokken sind in der Lage, zwischen den verschiedenen Phänotypen zu wechseln (Weiser et al. 1994).

1.1.6.1 Zellwandgebundene Virulenzfaktoren

Die bedeutendsten Virulenzfaktoren für die Auslösung einer invasiven Erkrankung und dem Überleben in der Blutbahn von *S. pneumoniae* sind die Polysaccharidkapsel und die darunter gelegene Zellwand. Die Polysaccharidkapsel ist aus komplexen Kohlenhydraten aufgebaut. Sie bildet eine physiologische Barriere, so dass gebundene Komplementfaktoren nur vermindert von Phagozyten erkannt werden (Winkelstein 1984). Zudem behindern sie die Bindung zirkulierender Wirtsantikörper (Bohnsack et al. 1992).

Isolierte und aufgereinigte Zellwandbestandteile konnten experimentell eine inflammatorische Wirtsantwort und das klinische Bild einer Meningitis oder Otitis media auslösen (Tuomanen et al. 1985). Vermittelt wurden diese Reaktionen durch Aktivierung der Komplementkaskade und der Bindung an wirtseigene Rezeptoren. Der Peptidoglykan-Teichonsäure-Komplex kann nach Bildung eines Komplexes mit CD-14-Toll-Like-Rezeptoren immunkompetente Zellen binden. Dies führt zur Produktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Verstärkt wird dieser Effekt noch durch das Lipoteichonsäure-bindende Protein (LBP). Eine weitere Gruppe der zellwandgebundenen Virulenzfaktoren stellen die Cholin-bindende Proteine (CBP) dar. Sie werden in LytA, LytB und LytC, PspA und CbpA unterteilt. LytA vermittelt die Autolyse von *Streptococcus pneumoniae*. LytB nimmt Anteil an der Zellteilung und LytC hat Lysozym-ähnliche Eigenschaften. PspA behindert die Opsonierung von Komplementen (Jedrzejak 2001). Hyaluronidase und Neuraminidase wirken durch Spaltung von Molekülen der Extrazellulärmatrix und ermöglichen somit eine Penetration von Geweben (Paton et al. 1993).

1.1.6.2 Intrazelluläre Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

Pneumolysin und H_2O_2 sind zwei bedeutende zytoplasmatische Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*. Hydrogenperoxid wird von intakten Pneumokokken freigesetzt. Pneumolysin wird während der Lyse und während des Wachstums freigesetzt. Iatrogen können sie nach Anwendung bakterizider Antibiotika verstärkt wirken, da es zur vermehrten Freisetzung durch Lyse der Bakterien kommt.

Pneumolysin ist ein intrazelluläres Protein, welches zur Gruppe der Thiol-aktivierten Toxine gehört (Boulnois 1992). Die Virulenz von pneumolysindefizienten Bakterienstämmen liegt in der Maus nach intranasaler Infektion um den Faktor 100 niedriger (Hirst et al. 2002). Pneumolysin bildet transmembranöse Poren in den Wirtszellen und ist so teilweise für deren Lyse verantwortlich (Boulnois 1992). Darüber hinaus kann es direkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie TNF- α und IL-1 β , wahrscheinlich nach Bindung von TLR-4 und TLR-9 induzieren (Malley et al. 2003). Es hemmt den Zilienschlag des respiratorischen Epithels und wirkt toxisch auf die Zellen des respiratorischen Epithels. Auf Lymphozyten und Monozyten wirkt es antiproliferativ und vermindert die Produktion von Antikörpern (Hirst et al. 2002). Außerdem wirkt es stimulierend auf die klassische Komplementkaskade (Paton et al. 1993).

Aufgrund eines Katalasemangels sezerniert *S. pneumoniae* das anfallende Wasserstoffperoxid aus seinem Stoffwechsel. Dies stellt eine weitere Sonderstellung des Erregers dar. Alle übrigen invasiven Erreger bauen diese über eine Katalase selbstständig ab. H_2O_2 entsteht unter anaeroben Bedingungen vor allem durch die bakterielle Pyruvatoxidase. Unter aeroben Bedingungen entsteht es durch die NADH-Oxidase. H_2O_2 schädigt die Zellmembran und wirkt so direkt zytotoxisch. Außerdem inhibiert es das Wachstum konkurrierender Bakterien (Pericone et al. 2000). Beide genannten intrazellulären Virulenzfaktoren führen unter experimentellen Bedingungen in vivo und in vitro zu Apoptose in Mikroglia- und Hippokampuszellen (Braun et al. 2002).

1.2 Myelin

Die Axone des zentralen Nervensystems (ZNS) und die schnell leitenden Axone des peripheren Nervensystems (PNS) werden von einer Myelinschicht umhüllt. Sie wird im PNS aus den Fortsätzen von Schwannzellen und im ZNS von Oligodendrozyten aufgebaut. Die Oligodendrozyten zählen historisch zu den Gliazellen. Der Fortsatz eines Oligodendrozyten wickelt sich mehrfach um ein Nervenaxon und die einzelnen Fortsätze eines Oligodendrozyten verbinden mehrere Neurone. Ein komplexes System myelinspezifischer Proteine (siehe unten) ermöglicht einen hohen Kompaktierungsgrad der einzelnen Zellschichten (Martini et al. 1997). Gleichzeitig erlaubt es ein hohes Maß an Funktionalität. Die Ausbildung sog. Internodi befähigt zur saltatorischen Erregungsleitung der Aktionspotentiale in den Axonen (Dyer 1993). Die Ausbildung von Elektrolyt- und Flüssigkeitspumpen ermöglicht die Regulation des periaxonalen Raums (Dyer 2002). Das Wissen um die Beteiligung dieser Zellgruppe in der Pathologie erworbener Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Schädelhirntraumen, dementiellen Erkrankungen, wie dem M. Alzheimer oder inflammatorischer Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose) hat in den letzten Jahren die Erforschung von Glia und Myelin intensiviert.

1.2.1 Funktion der ausgewählten Proteine aus der zentralen Myelinschicht

1.2.1.1 Proteolipid Protein (PLP)

PLP macht den größten Teil der Proteine des zentralen Myelins aus. Es besitzt eine Vielzahl biologischer Funktionen. PLP-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte Adhäsion und Kompaktierung der einzelnen Schichten einer Myelinscheide (Greer et al. 2002). Helynk und Mitarbeiter 1983 konnten eine diffuse Schwellung der Axone PLP-defizienter Versuchstiere identifizieren. PLP scheint auch zum Erhalt der axonalen Integrität beizutragen (Helynck et al. 1983). Klinisch äußert sich eine Mutation des PLP-Gens im Menschen als Pelizaeus-Merzbacher-Syndrom, eine mit dem Leben vereinbare Leukodystrophie. Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei ca. 40 Jahren. Alle betroffenen Patienten leiden an einer arteriellen Hypotonie und fast ausnahmslos an motorischen Bewegungsstörungen, die bereits im ersten Lebensjahr beginnen. Zu diesen gehören choreatische Bewegungen des Kopfes und Rumpfes sowie spastische Paraparesen.

1.2.1.2 Claudin-11/OSP

Claudin-11/OSP ist ein oligodendrozyten- und sertolizellspezifisches transmembranöses Protein. Es ist am Aufbau von Tight-Junctions beteiligt und trägt damit wesentlich zum Strukturerehalt und vor allem zur Belastbarkeit der Myelinschicht bei (Gow et al. 1999). Neben den intrazellulären Verbindungen sind Tight-Junctions auch an dem Aufbau und der Stabilität von interzellulären Kontakten verantwortlich. Claudin-11/OSP trägt somit zur interlaminären Stabilität der gesamten weißen Substanz bei. Tight-Junctions sind besonders stabile interzelluläre Verbindungen. Durch enzymatische Regulation besteht jedoch die Möglichkeit für die Oligodendrozyten diese Bindungsstärke zu regulieren. Auf diese Weise scheinen sie den parazellulären Transport in der weißen Substanz zu regulieren. Claudin-11 gehört zu einer Gruppe porenformender Proteine. Dyer stellte die Hypothese auf, dass Claudin-11 am Aufbau einer Ionenpumpe beteiligt sei (Dyer 2002). Diese ermöglicht den Austausch von Elektrolyten und Flüssigkeit des periaxonalen Raums und der extrazellulären Matrix.

1.2.1.3 Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)

MOG gehört zu den membranständigen Glykoproteinen der zentralen Myelinschicht und ist oligodendrozytenspezifisch. Es wird lediglich in geringen Mengen synthetisiert und auf der Außenseite in der Myelinmembran eingebaut. Die Funktion von MOG ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird eine Funktion als Adhäsionsprotein, welches die Interaktion zwischen benachbarten Myelinschichten zweier Oligodendrozyten reguliert. Außerdem kann nach extrazellulärer Bindung eines weiteren Liganden modifizierend auf die MBP/Mikrotubulistabilität Einfluss genommen werden und so die Adhärenz der einzelnen Myelinschichten reguliert werden. Zudem wird auch eine immunmodulierende Funktion diskutiert. Anhalt hierzu gibt die Fähigkeit von MOG C1q-s Komplement zu binden, dies weist auf eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung des Komplementsystems hin. Außerdem ist die Beteiligung an der Pathogenese der Multiplen Sklerose hinweisend für eine Assoziation mit dem Immunsystem. Im Tiermodell dieser Erkrankung gelang der Nachweis von MOG-spezifischen Antikörpern und T-Zellen (Iglesias et al. 2001; von Budingen et al. 2001).

1.2.2 Schadensmechanismen von zentralem Myelin und Oligodendrozyten in erworbenen Erkrankungen des ZNS

Schädigungen der weißen Hirnsubstanz bzw. des Myelins wurden in vielen Erkrankungen des zentralen Nervensystems beschrieben. Angeborene Krankheiten bzw. genetisch manifestierte Krankheiten werden als Leukodystrophien zusammengefasst. Unterschiedlichste Erkrankungen des ZNS führen zu Myelinschädigungen, beispielsweise Ischämien, Traumata, Intoxikationen oder inflammatorische Erkrankungen. Entsprechend der Vielzahl auslösender Erkrankungen wirken unterschiedliche Schadensmechanismen auf die Oligodendrozyten bzw. das Myelin. Persistierende Defekte sind häufig mit Zelluntergang von Oligodendrozyten oder Neuronen assoziiert. Die am besten untersuchten Formen des Zelltodes sind die Nekrose und der programmierte Zelltod. Zellnekrose ist von einer lokalen Entzündungsantwort begleitet. Ausgelöst wird die Nekrose beispielsweise durch freie Radikale, Hypoxie, Toxine oder Enzyme. Der programmierte Zelltod, auch als Apoptose bezeichnet, ist ein gerichteter, aktiver Prozess, der keine Entzündungsreaktion induziert. Neben Zelltod in den Oligodendrozyten beschrieben Soliven und Mitarbeiter 1994 eine temporäre, TNF- α -abhängige Störung des Oligodendrozytenstoffwechsel. Dieser führt zeitweise zur Schädigung von Myelinscheiden im zentralen Nervensystem. Sie bezeichneten dies als „molecular crippling“, welches sich nach Entfernung der Noxe wieder rückbilden kann.

Im Folgenden sollen nun exemplarisch die häufigsten Schadensmechanismen erläutert werden.

1.2.2.1 Myelinschädigung durch Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia

In vitro konnten viele Effekte von aktivierten Leukozyten auf Oligodendrozytenkulturen beobachtet werden. Für viele Beobachtungen fehlt bisher die Bestätigung in vivo. Sowohl aktivierte Lymphozyten als auch aktivierte Makrophagen und Mikrogliazellen können den Zelltod in Oligodendrozyten induzieren (Ludwin 1997).

Aktivierte T-Zellen induzieren Perforine in die Zellmembran der Oligodendrozytenmembranen. Daraufhin kommt es zum Einstrom von Kalziumionen in das Zytoplasma und zum Zelltod (Jones et al. 1991). Die quantitative Bedeutung des zytokininduzierten Zelltodes durch Lymphozyten ist nicht geklärt und wird von einigen Autoren gänzlich in Frage gestellt. Die Schädigung von Oligodendrozyten durch Makrophagen und Mikrogliazellen wurde wesentlich an Tiermodellen der Multiplen Sklerose untersucht. Hier induzierten sie Zelltod und lokale Dysmyelinisierung. In vivo konnte eine Protektion von Myelin und Oligodendrozyten nach Inaktivierung von Makrophagen und

Mikroglia nachgewiesen werden (Dhib-Jalbut 2007). Als Mediatoren der Zytotoxizität von Makrophagen und Mikroglia wurden TNF- α , IL-1 β , freie Radikale, Nitroverbindungen und Komplementaktivatoren nachgewiesen (Rus et al. 2006).

1.2.2.2 Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von Proteinen, die zur Gruppe der Gewebshormone zählen. Sie dienen der Interaktion unterschiedlicher Zellpopulationen, besonders im Rahmen pathologischer Prozesse. Sie sind aber auch wesentlich an der phylogenetischen Entwicklung der Organismen beteiligt. Die am besten untersuchten Zytokine im Rahmen entzündlicher Erkrankungen sind IL-1 β und TNF- α . Ihre Wirkung auf die zentrale Myelinsynthese und die Oligodendrozyten stammt zu großen Teilen aus der MS-Forschung. Im Rahmen infektiöser Hirnerkrankungen sind Makrophagen und Mikrogliazellen hauptsächliche Produzenten dieser Zytokine (Dhib-Jalbut 2007). In Oligodendrozytenkulturen induzierten sie Apoptose und Dysmyelinisierung. Eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von De- bzw. Dysmyelinisierung hat TNF- α . Untersuchungen an TNF- α Knock-Out-Mäusen *in vivo* zeigten einen vermehrten Myelinschaden im Rahmen einer experimentellen Multiplen Sklerose (Probert et al. 1997). Neuere Untersuchungen konnten daher zeigen, dass nicht das Zytokin allein, sondern der gebundene Rezeptor bzw. die Verteilung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche entscheidend für ihre Wirkung sind. So vermittelt der TNF- α -Rezeptor 1 (p55) eine Dysmyelinisierung und der TNF- α -Rezeptor 2 (p75) eine Myelinisierung (Probert et al. 2000).

1.2.2.3 Freie Radikale

Im Verlauf einer Meningitis kommt es zum vermehrten Anfall freier Radikale im Hirngewebe. Die vergleichsweise hohe Anfälligkeit von Oligodendrozyten und Neuronen gegenüber freien Radikalen, NO und Bildung von Lipidperoxiden sind durch den Stoffwechsel dieser Zellen bedingt (Smith et al. 1999). *In vitro* konnte zudem beobachtet werden, dass Oligodendrozyten empfindlich gegenüber NO-Exposition sind (Jana et al. 2007). Nach einer Virusinfektion von Neuronen wurde in einer neuroglialen Zellkultur die NO-Produktion in Astrozyten und Mikroglia induziert. Dies führte nur in Oligodendrozyten zur Apoptose, nicht jedoch in den übrigen Zellen der Mischkultur. Interessanterweise war dieser Effekt durch Gabe von TNF- α -Antikörpern blockierbar (Griot-Wenk et al. 1991).

1.3 Herleitung der Aufgabenstellung und Hypothese der Arbeit

Die Einführung der Antibiotikatherapie zur Behandlung der bakteriellen Meningitiden führte eine drastische Senkung von Mortalität und Morbidität der bis dahin tödlichen Erkrankung herbei. Durch die Weiterentwicklung von Antibiotika und die Ausarbeitung neuer Behandlungsschemata, wie der intensivmedizinischen Betreuung und Einführung von Kortikosteroiden in die medikamentöse Therapie, wurde eine weitere Senkung der Letalität erreicht. Nach wie vor entstehen jedoch bei bis zu 50% der Betroffenen Defektheilungen bzw. Folgeschäden.

Das Studium der tierexperimentellen Meningitis deckte den Ablauf stark schädigender Entzündungskaskaden im Hirnparenchym auf. Die Bedeutung dieser Kaskaden auf die Prognose der Erkrankung ist unbestritten. Sie induzieren beispielsweise neuronale Apoptose im Hippokampus meningitiskranker Versuchstiere.

Dem Hippokampus wird eine tragende Rolle beim Neuerlernen von Wissensinhalten und der Gedächtnisbildung zugeschrieben. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß des neuronalen Untergangs und dem Ausmaß der Lernbehinderung besteht. Insbesondere Kinder sind häufig von Lernbehinderungen nach durchgemachter Erkrankung betroffen. Im Tierexperiment konnte durch antiinflammatorische Manipulation dieser Kaskaden eine Reduktion von Folgeschäden und eine Verbesserung der Prognose erreicht werden. Daher ergibt sich die große klinische Bedeutung, diese Kaskaden zu studieren und aufzuschlüsseln. Es scheint, dass durch zunehmendes Verständnis dieser Entzündungskaskaden neue Therapeutika entwickelt werden können, durch die sich eine Senkung der Morbidität und Mortalität der Erkrankung auch im Menschen erreichen ließe.

Die Initiierung einer Entzündungsreaktion entsteht durch direkten Kontakt von Abwehrzellen mit einer entsprechenden Noxe. Während einer Entzündung entsteht ein verwickeltes Zusammenspiel sog. Entzündungszellen, vorerst lokal; im Verlauf kann auch eine systemische Reaktion des Organismus entstehen. Die Zellen kommunizieren dann durch Zell-Zellkontakte, Sekretion von Gewebshormonen und einer Vielzahl weiterer Faktoren.

Die Ausbreitung der Entzündung entsteht durch körpereigene Mediatoren. Im Rahmen der Meningitis kommt es zur lokalen Reaktion auf bakterielle Virulenzfaktoren im Liquor cerebrospinalis. Die Inflammation beginnt nach Bindung von bakteriellen Virulenzfaktoren an den Meningozyten. Diese produzieren TNF- α und es kommt zur Invasion von Leukozyten und sukzessive zur selbstverstärkenden Inflammation. Hierdurch entstehen innerhalb von

Stunden hohe Konzentrationen sowohl von bakteriellen Virulenzfaktoren als auch von wirtseigenen Entzündungsmediatoren.

Die starke Schädigung des liquornah gelegenen Hippokampus deutet auf einen Einfluss von Faktoren aus dem Liquor cerebrospinalis auf das Hirnparenchym hin. Der Übertritt von intakten Bakterien geschieht jedoch erst in der terminalen Phase der Erkrankung. In Zellkulturexperimenten konnte sowohl die Beimpfung mit bakteriellen Virulenzfaktoren als auch mit wirtseigenen Entzündungsmediatoren eine Synthese von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Faktoren in Gliazellen, Oligodendrozyten und Neuronen beobachtet werden. Entsprechende Untersuchungen zur Auslösung *in vivo* fehlen jedoch noch.

Zur Entwicklung neuer Therapiestrategien ist es notwendig auslösende Noxen zu identifizieren, um frühzeitig, vielleicht sogar präventiv, in den Entzündungsprozess eingreifen zu können. Deshalb untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung einzelner Faktoren des infektiösen Liquors auf die hirnparenchymatöse Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β . Zur Untersuchung der intrinsischen Faktoren richteten wir unser Augenmerk auf die Wirkung des leukozytären Infiltrats, des TNF- α und der Metallo matrix Proteasen auf das Hirnparenchym. Darüber hinaus untersuchten wir den Einfluss des intakten Bakteriums, den Einfluss der Pneumokokkenzellwände und des Pneumolysins sowie H₂O₂ als Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* auf das Hirnparenchym.

Im Rahmen der bakteriellen Meningitis wurden in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen Veränderungen in der Protein-Synthese beschrieben. Der Einfluss der bakteriellen Meningitis auf die Oligodendrozyten, insbesondere auch der Myelinsynthese, ist bisher nicht beschrieben. Diese Arbeit will deshalb den Einfluss der bakteriellen Meningitis auf die Myelinsynthese untersuchen.

Ausgehend von der Hypothese, dass proinflammatorische Mediatoren nicht nur im Liquorraum sondern auch im Hirnparenchym induziert werden, haben wir in der vorliegenden Arbeit:

1. die räumliche Verteilung und den zeitlichen Verlauf der hirnparenchymatösen Entzündungsreaktion beschrieben.
2. den Einfluss einzelner Faktoren des infizierten Liquor cerebrospinalis auf die hirnparenchymatöse Inflammationsreaktion untersucht. Dies könnte die Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze im Rahmen der bakteriellen Meningitis bilden.
3. die Auswirkung der Entzündungskaskade im Hirnparenchym auf die Myelinsynthese und den Stoffwechsel der Oligodendrozyten charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimente

Im folgenden Kapitel sind sämtliche Schritte von der Durchführung der Tierexperimente bis zur Aufarbeitung der Gehirne zur Weiterverarbeitung beschrieben.

2.1.1 Chemikalien

- Erythromycin (Biochrom, Deutschland)
- Chloramphenicol (Biochrom, Deutschland)
- pyogenfreies dest. Wasser (Delta Pharma)
- PBS 0,1 M, pH 7,4 (InvitrogenLife Technologies, Karlsruhe)
- Chloroform (J. T. Baker)
- Blutagarplatten (Merckoplate®, Merck, Deutschland)
- Ethanol 100%, 96%, 80%, 70% (J. T. Baker, Deutschland)
- Natriumhydrogencarbonat-Plättchen (NaOH, Merck, Deutschland)
- Paraformaldehyd-Pulver, pH 7,4 (Sigma, Deutschland)
- Paraplast (Sigma, Deutschland)

2.1.2 Lösungen und Medien

C+Y Medium

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| - 400 ml Prä C Medium | - 10 ml Adams III Lösung |
| - 13 ml Ergänzungsmedium | - 10 ml Hefe (5 %) |
| - 5 ml Pyruvat (2 %) | - 10 ml Glutamin (1 mg/ml) |
| - 15 ml Kaliumphosphatpuffer (1M) | |

Prä C Medium (pH 7,4)

- 1,45 g Natriumacetat
- 6 mg L-Tryptophan
- 60 mg L-Cystein
- 6 g Casamino Acids
- 1,2 l H₂O

3-fach-Salzlösung

- 10 g MgCl₂
- 50 mg CaCl₂
- 20 µl MnSO₄
- 100 ml H₂O

Ergänzungsmedium

- 60 ml 3-fach Salzlösung
- 120 ml Glukose (20 %)
- 6 ml Sukrose (50 %)
- 120 ml Adenosin (2 mg/ml)
- 120 ml Uridin (2 mg/ml)

Adams I Lösung

- 60 µl Biotin (0.5 mg/ml)
- 30 mg Nikotinsäure
- 35 mg Pyridoxin
- 120 mg Kalzium-Pantothenat
- 32 mg Thiamin
- 14 mg Riboflavin

Adams II Lösung

- 64 ml Adams I Lösung
- 16 ml Adams III Lösung
- 800 mg Asparagin
- 80 mg Cholin
- 0,64 ml CaCl₂ (1%)
- 400 ml H₂O

Adams III Lösung

- 50 mg FeSO₄
- 50 mg CuSO₄
- 50 mg ZnSO₄
- 20 mg MgCl₂
- 1 ml HCl
- 100 ml H₂O

Fixationslösung

- 50 g Paraformaldehyd (Sigma)
- 250 ml DEPC-Wasser (Millipore)

2.1.3 Bakterienstämme (*S. pneumoniae*)

- D39 Kapseltyp 2 (Rockefeller University, New York, USA)
- *PlnA*⁻/*SpxB*⁻, Pyruvatoxidase- und Pneumolysin-negative Doppelmutante von D39 (E. Tuomanen, Memphis, USA; Braun *et al.*, 2002)
- R6, unbekapseltes Derivat von D39 (Rockefeller University, New York, USA)

2.1.4 Medikamente/Inhibitoren

- Game-46: Anti-CD-18 Antikörper, zur Hemmung der leukozytären Infiltration (BD Pharmingen™)
- GM 6001: TACE-Inhibitor, zur Hemmung der Freisetzung von TNF-α aus der membranösen in die lösliche Form und der Metallo matrix Proteasen (Calbiochem)

2.1.5 Bakterienanzucht

Entsprechend dem Protokoll von Braun und Mitarbeiter 2002 beimpften wir ein Zentrifugenröhrchen mit 4 ml C+Y Medium (Lacks et al. 1960) mit den entsprechenden Bakterienstämmen (bei -80 °C in 15% Glycerol gelagert). Über Nacht inkubierten wir diesen Ansatz bei 37 °C und 4% CO₂. Die isolierte Anzucht der Doppelmutanten (*plnA⁻/spxB⁻*) gewährleisteten wir durch Zugabe von Chloramphenicol und Erythromycin (jeweils in einer Konzentration von 2 µg/ml) zu dem C+Y Medium, da bei der Herstellung dieser Mutanten durch Insertions-Duplikations-Mutagenese ein Chloramphenicol- und Erythromycin-Gen kointegriert wurde. Dies führt zu Resistenzentwicklung der Bakterien gegen diese Antibiotika. Am folgenden Morgen verdünnten wir die Bakterienkulturen mit C+Y Medium soweit rück, dass die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension unter 0,2 lag, bei einer Wellenlänge von 620 nm (Helios Σ Spectrometer von Thermospectronic). Anschließend wurden die Bakterien erneut bei 37 °C und 4% CO₂ inkubiert. Nachdem die Suspension eine optische Dichte von 0,5 – 0,6 erreichte, entnahmen wir 2 ml der Bakteriensuspension und überführten diese in ein steriles Eppendorfgefäß. Dies zentrifugierten wir 3 Minuten bei 8000 U/min. Das Bakterienpellet resuspendierten wir anschließend in 1 ml sterilem PBS.

Die optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht der Bakterienkonzentration von 10⁸ Koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml. Unsere Suspension wurde nun auf eine Endkonzentration von 10⁷ KBE/ml verdünnt. Zur Kontrolle der Bakterienkonzentration und zum Nachweis der Bakterienviabilität züchteten wir eine Probe auf einer Blutagarplatte an. Diese wurde am Folgetag durch Auszählen der KBE ausgewertet.

2.1.6 Infektion der Tiere

Für die Tierversuche wurden CD1-Mäuse (Fa. Charles River, Deutschland GmbH/ Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 25 g verwendet. Vor Versuchsbeginn teilten wir die Tiere jeweils in Gruppen auf (Kontrolltiere und Infektionstiere). Durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (35 mg/kg) und Xylazine (5 mg/kg) versetzten wir die Versuchstiere in eine tiefe Narkose. Über einen kleinen Hautschnitt präparierten wir den Bereich der Lendenwirbelsäule und injizierten mit einer 30 Gauge-Kanüle 30 µl der angesetzten Bakteriensuspension bzw. des sterilen PBS langsam in den Liquorraum. Der Wundverschluss erfolgte mittels Metallklammerung.

2.1.7 Opferung der Tiere

Die Opferung der Tiere führten wir dem Versuchsprotokoll entsprechend nach 6, 12, 18 oder 24 Stunden durch. Wir versetzten die Versuchstiere erneut über eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (35 mg/kg) und Xylazine (5 mg/kg) in Narkose. Vor der Perfusionsfixierung der Versuchstiere gewannen wir Liquor cerebrospinalis durch eine Punktion aus der Cisterna cerebromedullaris. Die Versuchstiere fixierten wir hierzu entsprechend der Beschreibung von Meyding-Lamade und Mitarbeitern in Bauchlage. Nun präparierten wir über einen Hautschnitt die Cisterna cerebromedullaris (Meyding-Lamade et al. 1996). Die Liquorpunktion wurde zur Vermeidung von Blutkontamination unter mikroskopischer Kontrolle und mit einer 27 G Butterfly-Kanüle (Yvcon) durchgeführt. Nach erfolgreicher Punktion verdünnten wir den Liquor cerebrospinalis (5 µl) seriell (mit sterilem PBS bis 10⁴-fach) und strichen die Verdünnung auf Blutagarplatten aus. Nach 24 Stunden Inkubation (37 °C und 4% CO₂) zählten wir die Bakterienkolonien auf den Blutagarplatten aus. In einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Poly-Optik, Bad Blankenburg) fand die Quantifizierung der Liquorpleozytose statt.

Nach der Zisternalpunktion erfolgte die transkardiale Perfusionsfixierung der Tiere in Rückenlage. Dazu eröffneten wir zuerst den Thorax durch beidseitige Durchtrennung der Rippen in der vorderen Axillarlinie und durch Abtrennung des Zwerchfells. Dann eröffneten wir das rechte Atrium und brachten an der Herzspitze in den linken Ventrikel eine Butterflykanüle ein. Durch diese infundierten wir PBS, um das Gefäßsystem blutfrei zu spülen. Bei den Mäusen, deren Gehirne für die Immunhistochemie oder für die in situ Hybridisierung aufgearbeitet wurden, erfolgte zur Fixierung die Infusion von 4% PFA (in PBS). Tiere, deren Gehirne für PCR-Aufarbeitung bestimmt waren, wurden nicht fixiert. Nun dekapitierten wir die Tiere und entnahmen die Gehirne. Zur Entfernung der Hirnhäute und des leukozytären Infiltrats wurden die entnommenen Gehirne in PBS gewaschen und auf Löschpapier gerollt (Berpohl et al. 2005). Die weitere Aufarbeitung der Hirngewebe wird im Folgenden beschrieben.

2.1.8 Aufarbeitung der Gehirne

Für die Herstellung von Gewebeschnitten für die in situ Hybridisierung und Immunhistochemie wurden die Gehirne 8 Stunden in PBS mit 4% PFA nachfixiert. Am Folgetag durchschnitten wir die Gehirne auf der Höhe des Chiasma opticums in der koronaren Ebene und trennten die Kleinhirne ab. Als nächstes entwässerten wir die Gehirne, um sie dann in Paraffin einbetten zu können. Hierzu wurde jedes Gehirn in einem Falconröhrchen mit

70% Ethanol behandelt. Nach Ablauf einer Stunde wurden die Gehirne in Röhrchen mit 80% Ethanol überführt und über Nacht belassen. Am Folgetag wurden die Gehirne jeweils zwei Stunden in 96%-igem und 100%-igem Ethanol gelagert. Daraufhin erfolgten 25-minütige Behandlungen mit Gemischen aus 100%-igem Ethanol und Chloroform (I. Ethanol: Chloroform 2:1, II. 1:1, III. 1:2). Im Anschluss wurden die Gehirne dreimal mit Chloroform für jeweils 60, 40 und 20 Minuten behandelt. Alle Arbeitsschritte führten wir bei Raumtemperatur durch.

Zur Paraffineinbettung wurden die Gehirne nun in flüssiges Paraplast überführt und darin bei 60°C für 2 x 20 Minuten und in einem dritten Schritt für weitere 16 Stunden gelagert. Bei jeder Behandlung verwendeten wir frisches Paraplast. Abschließend wurden die Gewebe mit dem Paraffin in Edelstahlformen ausgegossen. Um die Gewebeblöcke später fassen zu können, legten wir auf das noch flüssige Paraplast ein Kunststoffgitter, welches in das Mikrotom eingespannt werden konnte.

Nachdem die Blöcke ausgehärtet waren, fertigten wir 10 µm dicke Schnitte an und brachten sie auf Objektträger auf. Diese waren vorab bei 120°C für fünf Stunden inkubiert worden, um jegliche Kontamination mit RNAsen zu eliminieren.

2.1.9 Herstellung von Matrizen für die quantitative Echtzeit-PCR

Nach der Entfernung der Meningen und dem Abwaschen des leukozytären Infiltrats wurden der Neokortex, der Hippokampus und das Striatum präpariert und in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden in flüssigen Stickstoff eingetaucht, um die Präparate einzufrieren. Bis zur Isolierung der gesamten RNA mittels Trizol-Reagent lagerten wir die Gehirne bei -80 °C. Die Aufarbeitung der Gehirne erfolgte entsprechend dem Protokoll zur Isolation von RNA aus Geweben (siehe unten).

2.2 In situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung wurden nach einem modifizierten Protokoll von Roche Applied Science durchgeführt.

2.2.1 Chemikalien

- Chloroform (J. T. Baker, Deutschland)
- Isopropanol 99,5% (Sigma Aldrich, Deutschland)
- Ethanol 100% (J. T. Baker, Deutschland)
- Trizol (Gibco, Deutschland)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Invitrogen, Ultrapure)
- HCl 1 M (J. T. Baker, Deutschland)

2.2.2 Lösungen, Puffer und Medien

- NBT/BCIP-Puffer (Roche Applied Science)
Toluidin in 67% DMSO
- 20 x SSC
3,0 M NaCl 0,3 M Na-Zitrat
- Blockierungs-Reagenz (Roche Applied Science)
100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl
- TBS-Puffer
50 mM TRIS 150 mM NaCl
- EDTA (0,5 M)
186,1 g Äthylendiamintetraessigsäure mit 20 g NaOH-Pellets auf pH 8 einstellen, mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen und autoklavieren
- Tris-HCl 1 M
121,1 g Tris-Base in 800 ml DEPC-H₂O lösen, Volumen auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Proteinase K
- 50 µg/ml in Tris-HCl

2.2.3 Hybridisierungssonde

- Oligo TNF- α -Sonde (sense): 5'-CATGACCCGCGACGTGGAACTGGCAGAAG (Gene Synthesis, Köpen, Sweden)
- Oligo TNF- α -Sonde (anti-sense): 5'-CTTCTGCCAGTTCCACGTCGCGGGTCATG (Gene Synthesis, Köpen, Sweden)
- mRNA-PLP-Sonde (sense und anti-sense): Freundlich überlassen von Professor Wolfgang Brück, Institut für Neuropathologie, Charité Berlin

2.2.4 Prozess der *in situ* Hybridisierung

2.2.4.1 Vorbehandlung der Hirnschnitte auf den Objektträgern

Die Vorbehandlung der Gewebeschnitte sollte mögliche Störfaktoren im Gewebe reduzieren (z.B. Kationen, Proteinwechselwirkungen der RNA) und damit der Ausbildung von Mismatches (Fehlbindung der cRNA-Sonden/Oligonukleotiden) vorbeugen. Alle verwendeten Materialien erfüllten einen hohen Reinheitsgrad und wurden vom Hersteller als RNase-frei ausgewiesen. Verwendete Gebrauchsmaterialien wurden vor Verwendung sechs Stunden bei 120 °C erhitzt, um eine Hitzeinaktivierung von RNAsen zu erreichen. Die Überführung der Hirnschnitte von einem Behälter in einen anderen erfolgte mit gleichfalls behandelten Pinzetten, um eine Kontamination zu vermeiden. Die Inkubation der Hirnschnitte erfolgte jeweils in einer handelsüblichen 100 ml Glasküvette für Gewebeschnitte.

Die 10 µm dicken Gewebeschnitte wurden zweimal 10 Minuten in Xylene (Gibco) zur Entparaffinierung inkubiert. Anschließend wurden sie zur Hydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50%, H₂O-DEPC) für jeweils 2 x 3 Minuten geführt. Zur Fixierung der RNA erfolgte eine erneute Gewebefixierung in 4%-igem Paraformaldehyd für 20 Minuten. Um das Eindringen der Sonden in die Zellen zu ermöglichen, wurde im folgenden Schritt eine chemische Permeabilisierung mittels Proteinase K (100 µg/ml TBS 2 mM CaCl₂) für 20 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Diese Reaktion wurde durch dreimaliges Auswaschen mit TBS bei Raumtemperatur für 5 Minuten und im Anschluss für 10 Minuten bei 4 °C gestoppt. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte auf dem Schüttler für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Acetanhydrid (0,5% Acetanhydrid in 0,1 M TRIS pH 8,0) inkubiert und danach für 10 Minuten in ein Gefäß mit 0,2 M HCl für 10 Minuten überführt und in TBS für 3 x 5 Minuten gespült. In den nächsten Schritten wurden die Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 100%,) für jeweils 3 Minuten geführt und nach Inkubation in Chloroform (Gibco) an der Luft getrocknet. Die Rehydrierung der Gewebe erfolgte durch Inkubation für 30 Minuten bei 60 °C in einer feuchten Kammer, welche mit H₂O-DEPC gefüllt wurde. Ziel war es, eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Gewebes zu erreichen, ohne dass sich ein Wasserspiegel auf den Objektträgern bildete.

2.2.4.2 Hybridisierungsreaktion

Durch die vorher beschriebene Prozedur sollte eine Verdünnung der 20 - 25 µl des aufgetragenen Hybridisierungsmixes minimiert werden. Der Hybridisierungsmix bestand aus Formamid 55%, 5 - 20 ng der jeweils verwendeten Sonde: markierte TNF- α Oligonukleotide, DIG-markierte PLP-Sonde, DIG-markierte IL-1 β -Sonde, 5 x SSC, 5% Dextran, 2% SDS sowie Lachs-Sperma-DNA. Um ein Austrocknen im Verlauf zu verhindern, wurden die Gewebe mit einem Glasplättchen abgedeckt. Zur Denaturierung der Sonden und der Ziel-mRNA wurden die Objektträger auf einer Heizplatte für 4 Minuten auf 95 °C erhitzt und danach in einer feuchten Kammer bei 60 °C für 14 Stunden inkubiert.

2.2.4.3 Posthybridisierungswaschungen

Zur Entfernung des Hybridisierungsmixes wurden die Gewebeschnitte in ein Gefäß mit TBS überführt. Nachdem die Glasplättchen von den Objektträgern abgeschwommen waren, wurden sie in ein neues Gefäß mit 20 x SSC für 20 Minuten überführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Dann wurden die Schnitte zweimal für 10 Minuten in 10 x SSC und darauf in 5 x SSC gespült, um Mismatches (d. h. fehlerhaft gebundenen Sonden) oder nicht gebundene Sonden zu entfernen. In den nächsten Schritten wurden die Gewebe für den Nachweis der gebundenen Sonden vorbereitet. Hierzu wurden sie dreimal 5 Minuten lang in TBS gespült und mit Blockierungs-Reagenz für 15 Minuten inkubiert.

2.2.4.4 Nachweis der Hybride

Es folgte eine einstündige Inkubation der Gewebe mit einem anti-DIG-Antikörper (1:1000), verdünnt in Blockierungs-Reagenz. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper in TBS für 3 x 10 Minuten erfolgte die enzymatische NBT/BCIP Farbentwicklung. Hierfür wurden 225 µl NBT und 175 µl BCIP in 50 ml NBT/BCIP-Puffer (siehe oben) gelöst. Die Farbentwicklung erfolgte unter Kontrolle am Mikroskop.

2.3 Isolierung und Quantifizierung der mRNA aus den Geweben

2.3.1 Chemikalien

- Chloroform (J. T. Baker, Deutschland)
- Isopropanol 99,5% (Sigma Aldrich, Deutschland)
- Ethanol 100% (J. T. Baker, Deutschland)
- Trizol (Gibco, Deutschland)

2.3.2 Puffer und Lösungen

- RNAsin 40 U/μl (Promega)
- RQ1-DNase (Promega)
- dNTP je 2,5 mM (Roche Applied Science)
- RNAsin (Promega)
- 5 x Transkriptionspuffer (Promega)
- M-MLV-RT (Promega)

2.3.3 Primer

Alle Primer wurden mit Hilfe der Software PrimerPremier 5 geplant und von der Firma BioTez Berlin bezogen:

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
IL-1β	ctc aac tgt gaa atg cca cc tgt cct cat cct gga agg t	BioTez Berlin
PLP	tac agc cga cca ggc aaa c gaccgc aac ggt aac agg g	BioTez Berlin
TNF-α	agg cgg tgc ttg ttc ctc a agg cga gaa gat gat ctg act gcc	BioTez Berlin
Claudin-11	cgc cga ggt gct gta aat g caa tgg aat gcc cga gga a	BioTez Berlin
MOG	aaa tgg caa gga cca aga cca aga aca ggc ata ac	BioTez Berlin
β-Actin	ctc aac tgt gaa atg cca cc gcc aca gga ttc cat acc ca	BioTez Berlin

2.3.4 Geräte

- Tischzentrifugen, Qualitron, Korea
- Spektralphotometer, Shimadzu, Duisburg
- Schüttelinkubator, Johanna Otto GmbH
- Polarographische Elektrode, Licox pO₂GMS, Kiel
- PCR-Maschine, Thermocycler Trio Thermoblock Biometra GmbH
- Zentrifugen, Sigma, Osterode; Eppendorf GmbH, Hamburg

- Autoklav, H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim
- pH-Meter, WTW, Weilheim
- Gelscanner, Typhoon 8600 Amersham Biosciences, Freiburg
- Heizblöcke, Eppendorf GmbH, Hamburg
- LightCycler, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Magnetrührer mit Heizplatte IKA Labortechnik, Staufen
- Rosenthal-Kammer, Poly-Optik, Bad Blankenburg
- Helios Σ Spectrometer Thermospectronic
- Tischschüttler, IKA Labortechnik, Staufen
- Spannungsquelle, Sartorius AG, Göttingen
- Reinstwasseranlage, Millipore GmbH, Schwalbach
- Elektroporationsgerät, Bio-Rad GmbH, München
- PCR-Maschine, PCRexpress Hybaid, England
- Wasserbad, Köttermann GmbH, Uetze/ Hänigsen
- Elektrophoresesystem für Agarose-Gele, Bio-Rad GmbH, München
- Flussmeter, Cole Parmer, Illinois, USA
- Homogenisierer, VWR International GmbH, Darmstadt
- Inkubator, Fa. Mehmert
- Mikrowelle, Braun GmbH, Kronberg

2.3.5 Verwendete Kits

- Invitrogen Topo TA Cloning Kit (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)
- QIA Quick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- Plasmid Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- Qia Quick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- Light-Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2.3.6 Software

- Light-Cycler Software V 3.5.3, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Typhoon 8600 V 1.0, Amersham Biosciences, Freiburg
- Software PrimerPremier 5
- Microsoft Excel XP, Microsoft GmbH, Unterschleißheim
- SigmaStat 3.11, Systat Software GmbH

2.3.7 Durchführung

2.3.7.1 Isolierung der RNA und Umschreibung in eine cDNA

Die aus den Tierexperimenten gewonnenen Hirnpräparate wurden in gefrorenem Zustand dem Eppendorfgefäß entnommen und in einen Homogenisierkolben überführt, der mit 1 ml Trizol (Gibco) gefüllt war. Nach mechanischer Homogenisierung des Gewebes inkubierten wir das Homogenisat 5 Minuten. Nun fügten wir 200 µl Chloroform hinzu und mischten den Ansatz auf dem Tischschüttler. Anschliessend wurde der Ansatz bei 4 °C für 15 Minuten mit 12000 g zentrifugiert. Während der Zentrifugation geht die RNA in die wässrige Phase über. Diese pipettierten wir zusammen mit 0,5 ml Isopropanol (Aldrich 99,5 %) in ein weiteres Eppendorf-Tube und inkubierten diese 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde für 15 Minuten mit 12000 g bei 4 °C zentrifugiert, wobei die RNA ausfällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und erneut mit 12000 g bei 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet für 5 - 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Um DNA-Kontamination in den RNA-Extrakten auszuschließen, führten wir einen DNase-Verdau durch. Hierfür gaben wir 3 µl RQ1 DNase (1 U/µl) und je 3,5 µl RQ1 DNase-Puffer und RNasin (40 U/µl) in die Eppendorf-Gefäße. Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt, für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Zur Entfernung der Proteine fügten wir 165 µl H₂O und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzu. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten mit 14000 U/min und 4 °C. Die in der wässrigen Phase gelöste RNA wurde abgenommen und in ein neues RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde gründlich gevortext. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten mit 14000 U/min bei 4 °C. Die ca. 200 µl wässrige Phase wurde mit der Pipette abgenommen und gemeinsam mit 6 µl Ammonium-Acetat und 550 µl Ethanol bei -70 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der Zentrifugation für 30 Minuten mit 14000 U/min und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das entstandene Pellet mit 600 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und für weitere 30 Minuten mit 14000 U/min bei 4 °C erneut zentrifugiert. Als letzten Schritt wurde das Pellet luftgetrocknet und in 15 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentration der gewonnenen mRNA wurde durch Photometrie (Eppendorf GmbH, Hamburg) bestimmt.

Im Folgenden wurde zur Umschreibung der Gesamt-mRNA in die komplementäre DNA (cDNA) eine reverse Transkription durchgeführt. Wir verwendeten Random Hexamers (total

RNA) und Oligo-dT-Primer. In einem 0,5 ml Eppendorf-Tube pipettierten wir 15 µl RNA/Primer-Ansatz mit der gereinigten RNA mit 1 - 5 µg Primer (0,1 µmol/µl) und DEPC-H₂O. Den Ansatz inkubierten wir bei 70 °C für 10 Minuten (Thermocycler Trio Thermoblock, Biometra). Anschliessend fügten wir 5 x Transkriptionspuffer 5 µl, dNTP (je 2,5 mM) 1,5 µl, RNAsin (40 U/µl) 0,6 µl, M-MLV-RT 15 µl, DEPC-H₂O 1,4 µl hinzu und inkubierten diesen Ansatz eine Stunde bei 37 °C. Die so entstandene cDNA wurde in einen Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und dann mittels der semi-quantitativen Echtzeit-PCR quantifiziert.

2.3.7.2 Semi-quantitative Echtzeit-PCR

Die semi-quantitative Echtzeit-PCR wurde mittels Light-Cycler-Fast-Start DNA Master SYBR Green I Roche Diagnostics, Mannheim durchgeführt. Insgesamt pipettierten wir einen Ansatz von 20 µl. Alle Versuchsproben wurden als Doppelproben angesetzt.

PCR – Ansatz	
1 µl (je)	Plus-und Minusprimer (10 pmol/µl)
2,4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	FastStart Reaction Mix mit Enzym
11,6 µl	H ₂ O
2 µl	cDNA (in entsprechender Verdünnung)

PCR - Programmablauf			
Erste Denaturierung der gesamten DNA	10 min	95 °C	1 x
Denaturierungsschritt im Rahmen des PCR-Zyklus	15 sec	95 °C	45 x
<i>Annealing</i> (Primeranlagerung)	10 sec	60 °C	
Elongation	12 sec	72 °C	
Einzelfluoreszenzmessung	individuell		
Entwicklung der Schmelzkurve bei kontinuierlicher Temperatursteigerung und Fluoreszenzmessung	Steigung 0,1°C/s	65 -95°C	1 x
Abkühlen	20°C/s	40°C	1 x

2.3.8 Quantifizierung der vorhandenen DNA

Die Sonden in dem Light-Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) sind mit zwei Farbstoffen versehen. Einer ist an das 5'-Ende (einem

Reporterfarbstoff) und einer an das 3'-Ende (Löschfarbe) gebunden. Ist die Sonde intakt, wird durch Fluoreszenz-Energietransfer(FRET) die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs von der Löschfarbe absorbiert. Durch die PCR wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten und damit die Absorption unterbrochen. Somit kann nun eine Fluoreszenz gemessen werden. Die entstehende Fluoreszenzstärke ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA während eines PCR-Laufes. Crossing points (CP) sind Zeitpunkte, zu denen die detektierte Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet. Die Bestimmung dieser CP wurde mit der Second Derivative Maximum Method der Light Cycler Software (Roche Diagnostics) durchgeführt. Zur Bestimmung des relativen Expressionsniveaus des Zielgens im Vergleich zum Standardgen wurde folgende Formel (Pfaffl 2001) verwendet:

$$\mathbf{Ratio (AU)} = 2^{-(\text{delta CP Zielgen} - \text{delta CP Standardgen})}$$

Als Standardgen wurde in unseren Experimenten das β -Actin verwendet. Dies gilt als Housekeeping-Gen und wird im Rahmen der Meningitis nicht reguliert. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels der SSPS 17 Software (Chicago, Illinois). Für die Signifikanzanalyse verwendeten wir den U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney für unabhängige Stichproben.

Die Säulendiagramme wurden in Excel erstellt. Die Standardabweichungen der Einzelwerte wurden in Excel berechnet und als Fehlerindikator eingefügt.

2.4 Immunhistologie

2.4.1 Verwendete Kits

VECTASTAIN® ABC (Vector, USA)

2.4.2 Chemikalien/ Puffer

- H₂O₂ (J. T. Baker, Deutschland)
- Ethanol 100%, 96%, 80%, 70% (J. T. Baker, Deutschland)
- Xylol (J. T. Baker, Deutschland)
- PBS 0,1 M, pH 7,4 (Invitrogen, Karlsruhe)

2.4.3 Geräte

Objektträger (Super Frost ® Plus, Menzel GmbH & Co. KG /Braunschweig)

2.4.4 Antikörper

Astroglialer Marker anti-GFAP (DAKO GmbH, Hamburg)

2.4.5 Durchführung

Im Folgenden soll das verwendete Protokoll zur Durchführung einer immunhistochemischen Gewebefärbung aufgelistet werden.

1. Entparaffinierung der Gewebe: Die Gewebeschnitte wurden durch die folgende Behandlung entparaffiniert: Xylol für 5 Minuten, Xylol für 5 Minuten, 100 % Ethanol für 5 Minuten, 100 % Ethanol für 5 Minuten, 96 % Ethanol für 5 Minuten, 80 % Ethanol für 5 Minuten, 70 % Ethanol für 5 Minuten, 3 x Spülen in PBS für 5 Minuten
2. Inaktivierung von endogenen Peroxidaseaktivitäten: Die Gewebeschnitte wurden in einer 0,3%-igen Wasserstoffperoxidlösung in PBS 10 Minuten lang inkubiert.
3. Spülschritt: Die Objektträger werden dreimal für 5 Minuten in PBS gespült.
4. Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen: Die Gewebeschnitte wurden in der Blockierungslösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Bindung des primären Antikörpers: Es erfolgte die Verdünnung des Antikörpers in der Blockierungslösung. Die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem verdünnten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C.
6. Spülschritt: Die Objektträger wurden dreimal für 5 Minuten in PBS gespült.
7. Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper: Der mit Biotin konjugierte

- Ziege-Anti-Kaninchen-Ig Antikörper wurde mit 1:250 verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden mit diesem verdünnten Antikörper für 60 Minuten bei RT inkubiert.
8. Spülschritt: Die Objektträger wurden dreimal für 5 Minuten in PBS gespült.
 9. Bindung des Complexes aus Avidin und Biotinylierter Meerrettichperoxidase (ABC) an den biotinylierten Sekundäantikörper:
 - ABC wurde wie folgt hergestellt: zu 1 ml PBS wurden 8 µl biotinylierte Meerrettichperoxidase (engl. biotynlated horse radish peroxidase, biot-HRP) und 8 µl Avidin gegeben.
 - Innerhalb von 30 Minuten präformierte sich der Komplex aus Avidin und biot-HRP.
 - Die Gewebeschnitte wurden mit dem präformierten ABC für 30 Minuten bei RT inkubiert.
 10. Spülschritt: Die Objektträger wurden dreimal für 5 Minuten in PBS gespült.
 11. Farbreaktion: Zunächst wurden die Gewebeschnitte im Färbepuffer (0,05 M Trispuffer, pH 7,6) für 5 Minuten äquilibriert. Dann erfolgte die Herstellung der Färbelösung durch Zugabe von 5 mg Diaminobenzidin (vorgelöst in 250 µl, c=20mg/ml) und 5 µl Wasserstoffperoxid zu 10 ml Färbepuffer und damit die kontrollierte Färbung der Gewebeschnitte. Die Sichtkontrolle des Färbeergebnisses erfolgte unter dem Mikroskop. Die Farbreaktion wurde durch Spülen in TBS beendet.
 12. Spülschritt: Die Objektträger wurden dreimal für 5 Minuten mit TBS und anschließend dreimal für 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült.
 13. Eindeckeln: Die Gewebsschnitte auf den Objektträgern wurden mit Lösungsmittel (Xylol) äquilibriert, anschließend mit Entellan bedeckt und mit Deckgläschen verschlossen.

3 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich wie folgt:

1. Nachweis der hirnparenchymatösen Synthese proinflammatorischer Zytokine während der murinen Pneumokokkenmeningitis
2. Zeitliche und räumliche Charakterisierung der hirnparenchymatösen Entzündungsreaktion sowie Identifikation zellulärer Quellen von TNF- α
3. Untersuchung des Einflusses bakterieller und wirtseigener Faktoren auf die parenchymatöse Entzündung
4. Auswirkungen der Pneumokokkenmeningitis auf die Oligodendrozyten und die Myelinsynthese
5. Untersuchung des Einflusses bakterieller und wirtseigener Faktoren auf die Myelinsynthesestörung

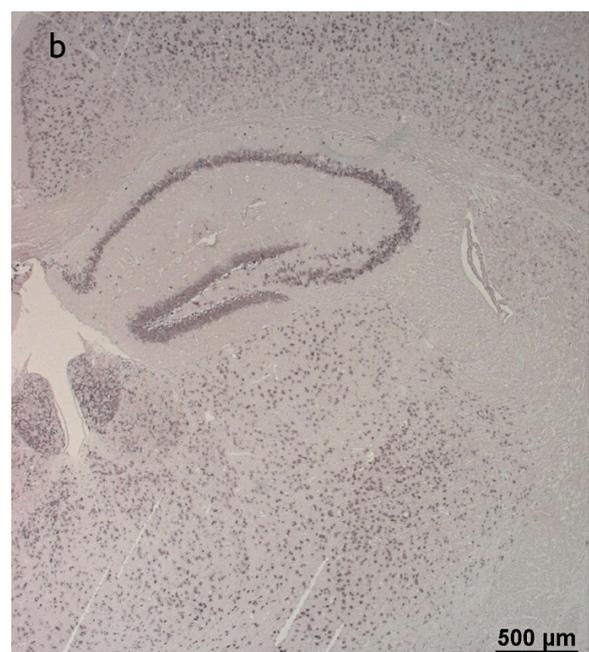
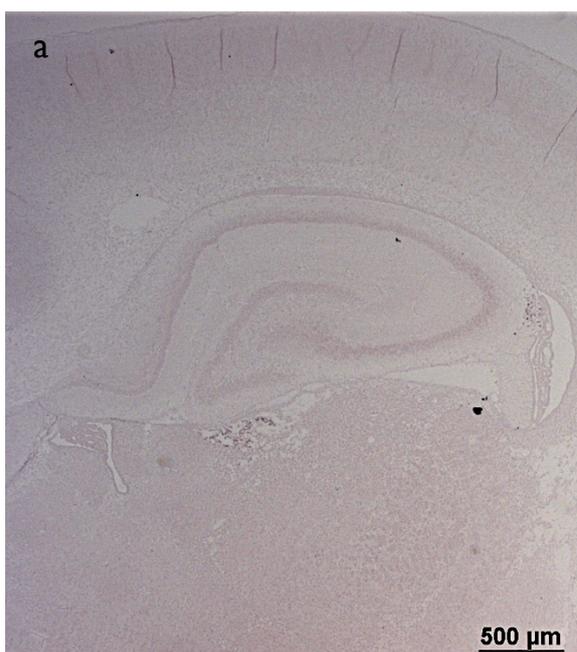
3.1 In situ Produktion proinflammatorischer Mediatoren während der Pneumokokkenmeningitis

TNF- α und IL-1 β werden als hochwirksame Zytokine nur in geringen Mengen intrazellulär produziert. Anschließend erfolgt die Sekretion von TNF- α und IL-1 β in die Interzellularräume, jeweils über eine membrangebundene Zwischenform. Der immunhistochemische Nachweis dieser beiden Proteine ist daher anfällig für Fehlbestimmungen. Zum einen können durch einen fehlenden Nachweis, nach abgeschlossener Sekretion, falschnegative Darstellungen bzw. durch Darstellung Rezeptorgebundener Moleküle an einer Effektorzelle falschpositive Darstellungen entstehen. Hingegen kann der Nachweis der mRNA dieser Proteine mittels molekularbiologischer Verfahren auch nach abgelaufener Sekretion ohne nennenswerte Interferenzen an den tatsächlichen Synthesorten erfolgen. Molekularbiologische Verfahren ermöglichen ausserdem eine Detektion wesentlich geringerer Molekülmengen. Der Nachweis von TNF- α und IL-1 β wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Kombination von zwei Methoden durchgeführt. Die Identifizierung und Lokalisierung zellulärer Quellen erfolgte mittels in situ Hybridisierung (ISH) und die Quantifikation der mRNA-Synthese von TNF- α und IL-1 β erfolgte mittels Real-Time-PCR. Während der bakteriellen Meningitis besteht eine positive Korrelation der Liquorkonzentrationen von IL-1 β und TNF- α mit der Klinik. Mit dem Schweregrad bzw. Stadium der Erkrankung nehmen die Konzentrationen dieser Zytokine im Liquor cerebrospinalis deutlich zu.

Wir führten den Nachweis der intraparenchymatösen Synthese dieser Zytokine während der Pneumokokkenmeningitis zuerst an Versuchstieren in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium durch. Die untersuchten Tiere waren 24 Stunden zuvor durch Lumbalpunktion und intrathekale Injektion von 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* infiziert worden. Komplikationen, wie Schlaganfälle oder Krampfanfällen, beobachteten wir nicht. Den Nachweis von TNF- α -mRNA führten wir mittels in situ Hybridisierung durch. Eine Blau-Violett-färbung von Zellplasma wies die mRNA nach (Abbildung 2, Abbildung 3). Bei Vergrößerung kann man in den Gewebeschnitten meningitiskranker Tiere eine ausgedehnte Farbreaktion nach ISH von TNF- α -mRNA beobachten. In den mit PBS behandelten Kontrollmäusen war diese Reaktion nicht zu erkennen. Sowohl in kortikalen als auch in subkortikalen Hirnschichten waren Zellen positiv für TNF- α -mRNA gefärbt. Eine besonders intensive und frühzeitige Anfärbung war im Hippokampus der meningitiskranken Versuchstiere nachweisbar (Abbildung 3).

Bei Vergrößerung erkannten wir einen Polymorphismus der mit der TNF- α -mRNA-Sonde positiv markierten Zellkörper. Im Kortex und im Bereich des Hippokampus waren viele Zellen angefärbt, welche eine neuronentypische Morphologie und Verteilung aufwiesen.

Auch im leukozytären Infiltrat des Liquor cerebrospinalis und in den Meningen gelang der positive Nachweis von TNF- α -mRNA (Abbildung 3 d + e). In den PBS-behandelten Tieren hingegen sahen wir auch unter stärkerer Vergrößerung keine Anfärbung von Zellen (Abbildung 3 f + g).



Ergebnisse

Abbildung 2: Hirnschnitte (koronare Schnittführung durch Kortex und Hippokampus) meningitiskranker und PBS-behandelter Versuchstiere nach in situ Hybridisierung mit TNF- α -Sonden. Abbildung a zeigt Hirngewebe eines PBS-behandelten Kontrolltieres. Abbildung b zeigt Hirngewebe eines 24 Stunden zuvor intrathekal mit 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* infizierten Tieres. Dies führt zu einer starken TNF- α -Synthese sowohl in kortikalen als auch in subkortikalen Regionen des Hirnparenchyms.

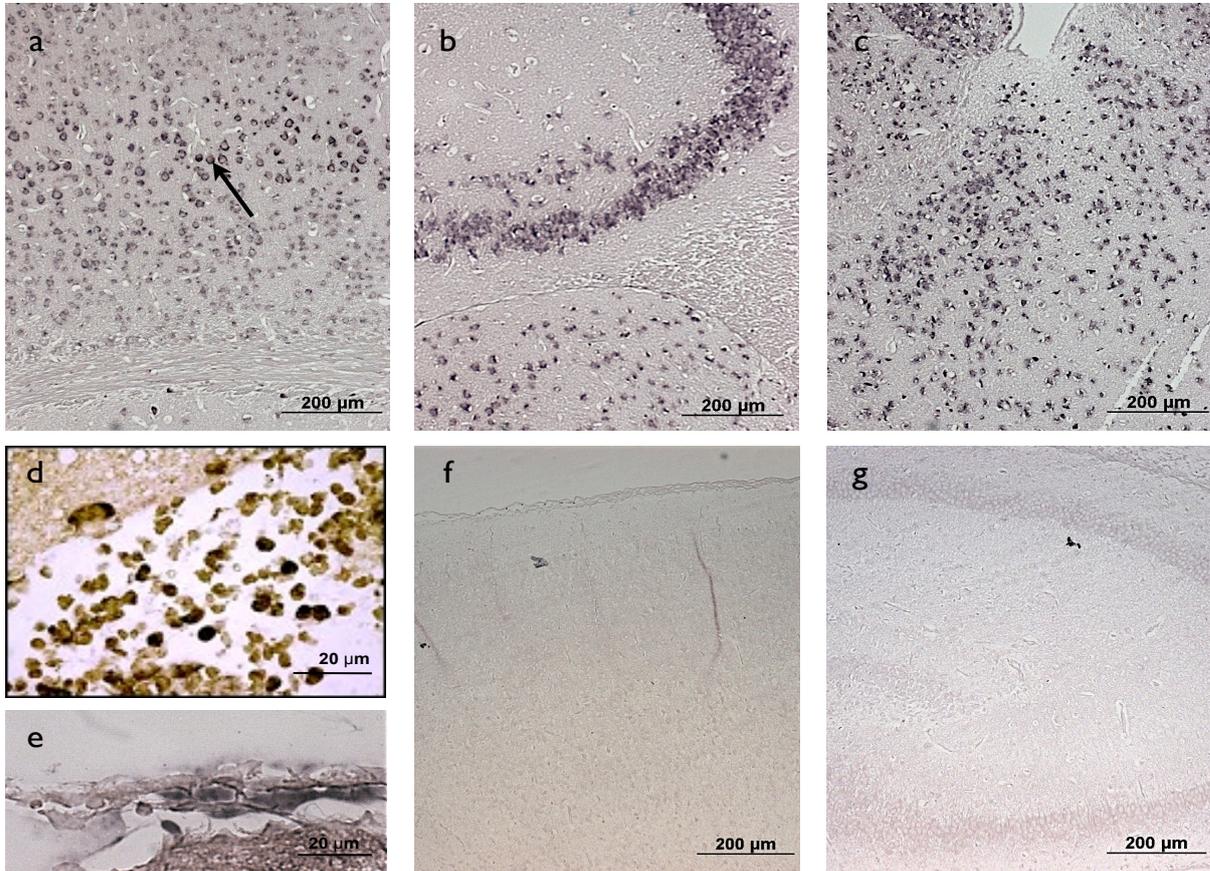


Abbildung 3: Nachweis der TNF- α Synthese im Hirnparenchym bei der Pneumokokkenmeningitis. Mittels in situ Hybridisierung konnte 24 Stunden nach Infektion mit lebenden D39-Wildtyp Pneumokokken im Hippokampus (b) eine besonders intensive TNF- α -Synthese nachgewiesen werden. Sowohl im Kortex (a) als auch im Hippokampus (b) der untersuchten Tiere sind Neuronen ebenfalls an der TNF- α -Produktion beteiligt. Auch im Bereich des Striatums (c) der infizierten Tiere ist 24 Stunden nach Infektion eine ausgedehnte Synthese darstellbar. Ebenfalls meningealen Zellen (d) und im leukozytären Infiltrat (e) waren Zellen positiv für die mRNA von TNF- α . In den PBS-behandelten Tieren konnte auch unter Vergrößerung keine TNF- α -mRNA-Synthese nachgewiesen werden (Kortex (g) und des Hippokampus (h)).

Die Identifikation einzelner Hirnzellen erfolgte anhand morphologischer Kriterien und Doppelfärbungen. Zur Durchführung der Doppelfärbungen wurden nach erfolgreicher in situ Hybridisierung immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen zellspezifische Proteine ortsständiger Zellpopulationen angeschlossen. Um eine farbliche Unterscheidung zu gewährleisten, wurden diese mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen. Für den Nachweis aktivierter Astrozyten verwendeten wir einen monoklonalen Antikörper gegen das glial fibrillary acidic protein (GFAP-Ak). Die Anfärbung aktivierter Mikrogliazellen

gelang in den hybridisierten Geweben nicht. In der kombinierten lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der doppelt gefärbten Gewebeschnitte beobachteten wir eine Kolokalisation von TNF- α -mRNA positiven Zellen und GFAP-exprimierenden Zellen (Abbildung 4).

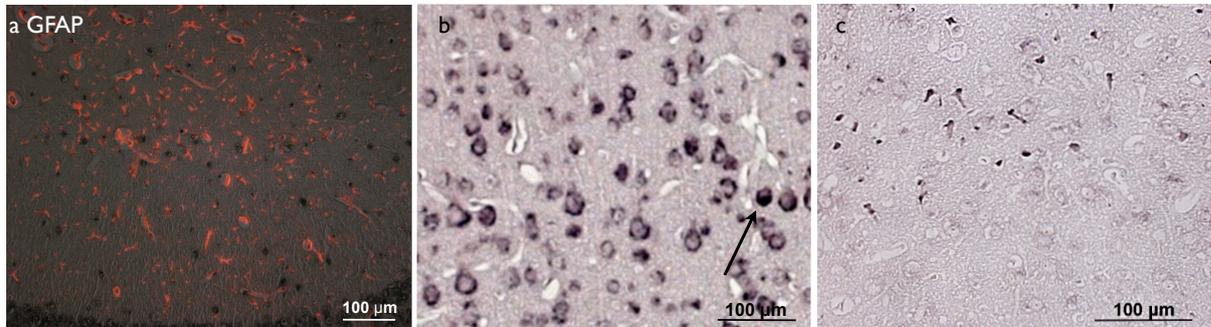


Abbildung 4: Identifikation von zellulären Quellen der TNF- α -Synthese bei der Pneumokokkenmeningitis. Die TNF- α -mRNA wurde mittels in situ Hybridisierung markiert. Zellspezifische Antigene von Astrozyten wurden mit monoklonalen Antikörpern (GFAP-Ak) (a) doppelt gefärbt. Morphologisch konnte ebenfalls in Neuronen nach 24 Stunden Infektionszeit bei Vergrößerung der Nachweis einer neuronalen TNF- α -mRNA geführt werden (b). Die Gewebe entstammen Versuchstieren, denen 24 Stunden (a, b) bzw. 12 Stunden (c) zuvor 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* intrathekal injiziert wurden. Sowohl Astrozyten als auch Neurone konnten damit als zelluläre Quellen von TNF- α im Rahmen der murinen Pneumokokkenmeningitis identifiziert werden. Eine Gruppe TNF- α -mRNA-positiver Zellen imponierte morphologisch als Mikrogliazellen (c).

Somit konnten wir die Synthese von TNF- α in Astrozyten nachweisen. Die Synthese von TNF- α beobachteten wir zum Zeitpunkt 6 und 12 Stunden nach Infektion außerdem noch in Zellen, die nicht mit GFAP doppelt gefärbt werden konnten. Diese Zellen ähnelten in der Struktur aktivierten Mikrogliazellen, so dass wir auch von einer TNF- α -Produktion durch Mikrogliazellen im Rahmen der murinen Pneumokokkenmeningitis ausgehen. Nach 18 Stunden wurden zudem Neurone im Kortex positiv durch die in situ Hybridisierung gefärbt. Somit gelang es uns, auch in Neuronen eine TNF- α Synthese nachzuweisen. Die enzymatische Farbentwicklung der hybridisierten Gewebeschnitte führten wir unter lichtmikroskopischer Kontrolle durch. Im Hippokampus der meningitiskranken Tieren war - im Vergleich mit allen übrigen Hirnarealen - bereits früh und eine besonders intensive Anfärbung der TNF- α -ISH zu beobachten. Hieraus leiteten wir die Hypothese unterschiedlicher TNF- α -Syntheseraten in einzelnen Hirnarealen ab. Zur Belegung dieser These führten wir eine semiquantitative Real-Time-PCR von TNF- α durch. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine selektive Regulation von TNF- α oder um eine veränderte Synthese anderer proinflammatorischer Zytokine im Sinne einer Entzündungsreaktion des gesamten Hirngewebes handelt, führten wir außerdem eine quantifizierende Real-Time-PCR der IL-1 β -mRNA durch. Wir untersuchten die Produktion der beiden Zytokine getrennt im Kortex, Hippokampus und Striatum.

Die vergleichenden Messungen zwischen Meningitis- und Kontrolltieren zeigten - sowohl für IL-1 β als auch für TNF- α - 24 Stunden nach der Infektion der Tiere mit *Streptococcus pneumoniae* eine signifikante Erhöhung der Syntheseraten in allen untersuchten Abschnitten des Hirnparenchyms ($p < 0,001$, Abbildung 5). Somit konnten wir auch mittels Real-Time-PCR eine holoparenchymatöse Gewebereaktion auf die Infektion des Liquor cerebrospinalis mit lebenden Pneumokokken nachweisen. Diese war in den untersuchten Hirnarealen (Kortex, Hippokampus und Striatum) unterschiedlich stark ausgeprägt.

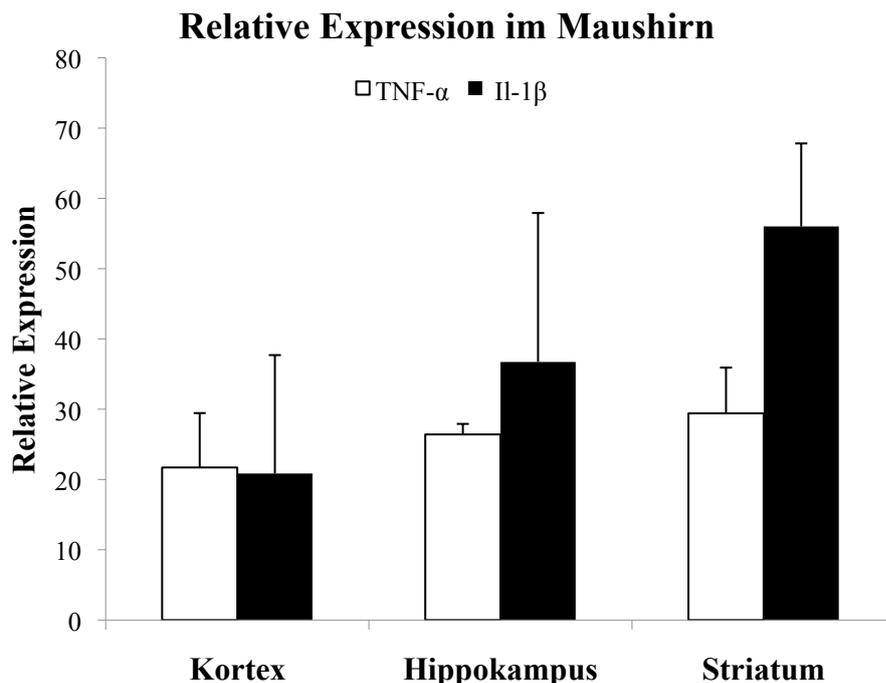


Abbildung 5: Relative Expression von TNF- α und IL-1 β im Hirnparenchym während der Pneumokokkenmeningitis. Dargestellt in dem Säulendiagramm ist die TNF- α -mRNA- (weiß) und IL-1 β -mRNA- (schwarz) Synthese im Kortex, Striatum und Hippokampus nach 24-stündiger Pneumokokkenmeningitis. Quantifiziert wurde die relative Expression der mRNA-Synthese mittels Real-Time-PCR. Dabei wurde die mRNA-Synthese der PBS-behandelten Kontrolltiere gleich 1 gesetzt. Sämtliche Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0,001$).

	TNF- α -mRNA			IL-1 β -mRNA		
	Kortex	Hippokampus	Striatum	Kortex	Hippokampus	Striatum
MW	21,71	26,41	29,41	20,85	36,72	56,01
SD	7,74	1,5	6,51	16,85	21,2	11,81
SN	($p < 0,001$)	($p < 0,001$)	($p < 0,001$)	($p < 0,001$)	($p < 0,001$)	($p < 0,001$)

Tabelle 1: Relative Expression der mRNA von IL-1 β und TNF- α im Kortex, Hippokampus und Striatum von meningitiskranken Mäusen. Das Verhältnis der Expression wurde zu PBS-behandelten, gesunden Kontrolltieren gebildet (MW= Mittelwert der relativen Expression; SD= Standardabweichung der Mittelwerte; SN = Signifikanzniveau).

3.2 Räumliche und zeitliche Charakterisierung der Entzündungsreaktion im Hirnparenchym

Im vorangestellten Kapitel konnten wir nachweisen, dass im Hirnparenchym meningitiskranker Mäuse die mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β induziert wird. 24 Stunden nach der Infektion beobachteten wir eine holoparenchymatöse Reaktion. Im Folgenden untersuchten wir die zeitliche und räumliche Entwicklung dieser Gewebereaktion im Verlauf der Erkrankung näher.

3.2.1 Zeitlicher Verlauf der TNF- α - und IL-1 β -mRNA-Synthese

Wir bildeten drei Gruppen von Versuchstieren. Diese Tiere infizierten wir intrathekal mit jeweils 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae*. Die Opferung der Gruppe 1 erfolgte nach 6 Stunden, die der Gruppe 2 nach 12 Stunden und die der dritten Gruppe nach 18 Stunden Infektionszeit. Den Kontrolltieren injizierten wir eine äquivalente Menge PBS. Nach Perfusion entnahmen wir den Tieren die Hirne und arbeiteten diese sowohl zur Durchführung einer Real-Time-PCR als auch einer in situ Hybridisierung auf. Die quantitativen Messungen der TNF- α - und IL-1 β -mRNA-Synthese zeigte, dass bereits 6 Stunden nach der Infektion im Kortex, Striatum und im Hippokampus eine lokale Steigerung der Zytokin-mRNA-Synthese begonnen hat (Abbildung 6). In sämtlichen untersuchten Gehirnabschnitten nahm die mRNA-Synthese von IL-1 β und TNF- α mit Voranschreiten der Erkrankung signifikant zu. In unserem Versuch wurden nur je 3 Versuchstiere 6 und 12 Stunden nach der Infektion geopfert, so dass hier keine statistische Signifikanz berechnet werden konnte (Abbildung 6). Die höchsten mRNA-Syntheseraten von TNF- α und IL-1 β waren im Striatum zu beobachten. Die Expression von TNF- α war um den Faktor 30 höher als in den PBS-behandelten Tieren. Die Synthese von IL-1 β lag um den Faktor 45 signifikant erhöht.

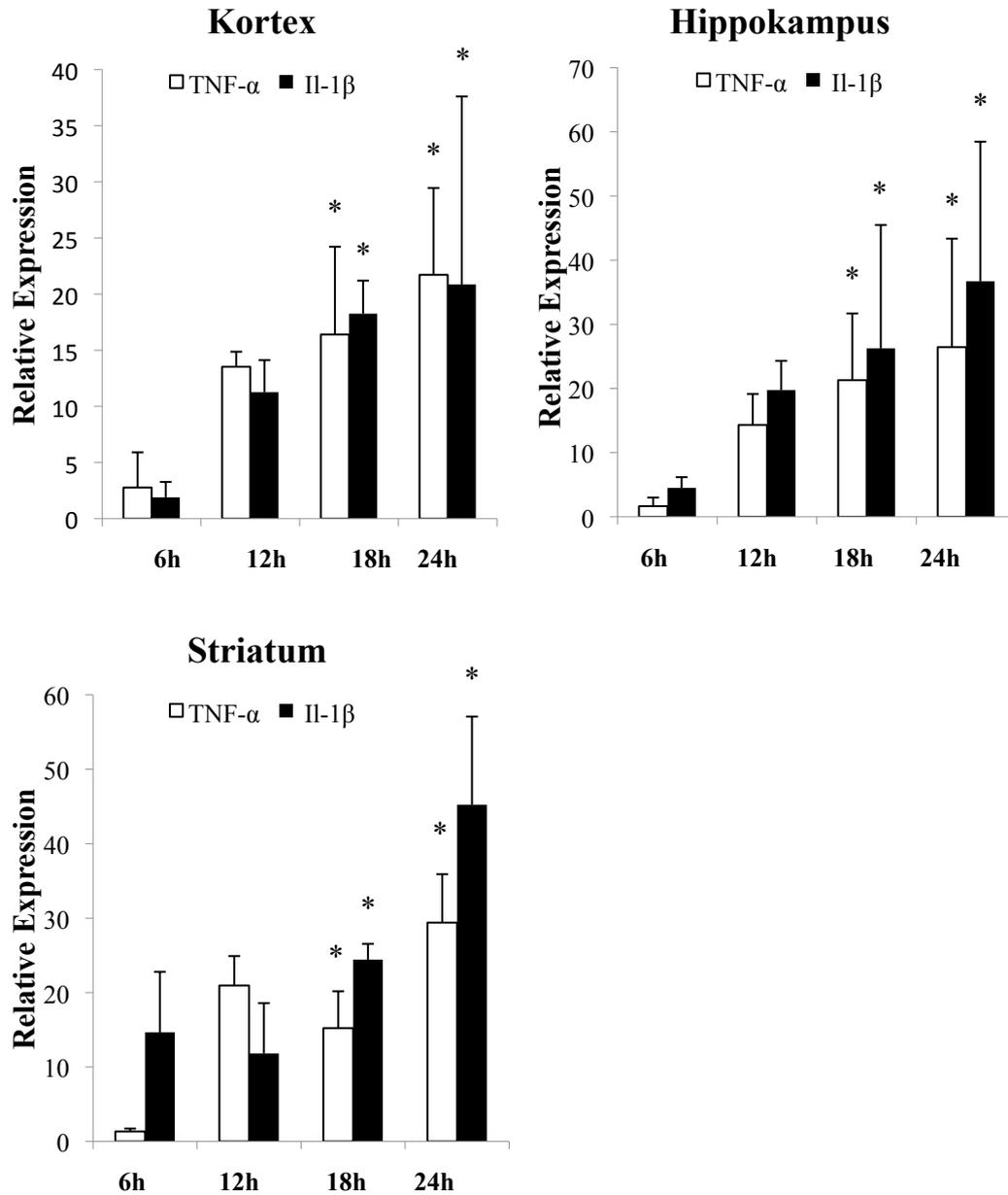


Abbildung 6: Zeitlicher Expressionsverlauf der TNF- α - und IL1- β -mRNA Induktion im Hirnparenchym bei der Pneumokokkenmeningitis. Entwicklung der TNF- α - (weiß) und IL-1 β - (schwarz)-mRNA-Synthese im Kortex, Striatum und im Hippokampus 6, 12 und 18 Stunden nach der intrathekalen Infektion der Versuchstiere mit 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae*. Quantifiziert wurde die Steigerung der mRNA-Synthese mittels Real-Time-PCR, dabei wurde die Synthese der Kontrolltiere (PBS) gleich 1 gesetzt. Bereits 6 Stunden nach der Infektion kann eine Synthesesteigerung von TNF α - und IL1- β -mRNA im Kortex, Striatum und Hippokampus beobachtet werden. Diese nimmt mit Fortschreiten der Erkrankung zu. Nach 24 Stunden war im Kortex die Synthese der TNF- α -mRNA um den Faktor 22 und der IL-1 β -mRNA um den Faktor 21 jeweils signifikant erhöht. Im Striatum beobachteten wir den stärksten Anstieg der mRNA-Synthese beider Zytokine (29 bzw. 45 ($p < 0,001$)). Im Hippokampus war eine Steigerung bis um den Faktor 26 bzw. 37 zu beobachten (* = $p < 0,001$ vs. PBS behandeltes Tier).

Kortex		TNF- α			IL-1 β		
Infektionsdauer	n=	MW	SD	SN (p)	MW	SD	SN (p)
6h	3	2,77	3,13	xx	1,90	1,38	xx
12h	3	13,52	1,34	xx	11,26	2,86	xx
18h	5	16,41	7,81	< 0,001	18,25	2,94	< 0,001
24h	5	21,71	7,74	< 0,001	20,85	16,74	< 0,001

Hippokampus		TNF- α			IL-1 β		
Infektionsdauer	n=	MW	SD	SN (p)	MW	SD	SN (p)
6h	3	1,65	1,34	xx	4,50	1,67	xx
12h	3	14,30	4,83	xx	19,74	4,56	xx
18h	5	21,30	10,39	< 0,001	26,25	19,24	< 0,001
24h	5	26,45	16,90	< 0,001	36,72	21,75	< 0,001

Striatum		TNF- α			IL-1 β		
Infektionsdauer	n=	MW	SD	SN (p)	MW	SD	SN (p)
6h	3	1,34	0,39	xx	14,67	8,13	xx
12h	3	20,96	3,95	xx	11,83	6,76	xx
18h	5	15,23	4,95	< 0,001	24,44	2,12	< 0,001
24h	5	29,41	6,51	< 0,001	45,23	11,85	< 0,001

Tabelle 2 : Datentabelle der zeitlichen Expression von TNF- α - und IL-1 β -mRNA während der Meningitis. Relative Expression der mRNA-Synthese von IL-1 β und TNF- α im Kortex, Hippokampus und Striatum an meningitiskranken Mäusen 6, 12 bzw. 18 Stunden nach Infektion. Das Verhältnis der Expression wurde zu PBS-behandelten, gesunden Kontrolltieren gebildet. (MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung der Mittelwerte, SN= Signifikanzniveau, xx= Signifikanzberechnung nicht möglich, da die Fallzahl 3 war).

3.2.2 Räumliche Ausbreitung der Entzündungsreaktion und zelluläre Synthesequellen von TNF- α im Verlauf der Pneumokokkenmeningitis

Im vorherigen Kapitel stellten wir mittels Real-Time-PCR bereits 6 Stunden nach Infektion der Versuchstiere einen Anstieg der TNF- α -Synthese im Hirnparenchym fest. Im Folgenden interessierte uns, in welchen Hirnregionen und von welchen Zellen zu den Zeitpunkten 6, 12 und 18 Stunden post infectionem die TNF- α -mRNA hoch reguliert wird. Zur Lokalisation der Zellen führten wir zu diesen Zeitpunkten in situ Hybridisierungen und Doppelfärbungen an Hirnschnitten durch.

6 Stunden nach der Infektion färbten sich mittels in situ Hybridisierung die Zellen in der Nachbarschaft der Liquorräume positiv für TNF- α -mRNA (Abbildung 7). Die Zellkörper zeigten in der lichtmikroskopischen Vergrößerung eine gleichmäßige Morphologie. In den

angeschlossenen Doppelfärbungen erreichten wir keine Kollokalisierung mit GFAP-Antikörpern. Deshalb und aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika schlossen wir auf aktivierte Mikrogliazellen als primäre Syntheseorte.

12 Stunden nach der Infektion der Tiere wurden vermehrt Zellen angefärbt, die nun auch in der ferneren Nachbarschaft der Liquorräume lokalisiert waren. Regelmäßig konnten wir während der enzymatischen Farbentwicklung der in situ Hybridisierung der TNF- α -mRNA eine starke Anfärbung des Hippokampus beobachten. In den angeschlossenen Doppelfärbungen beobachteten wir Kollokalisierung von TNF- α -mRNA- und GFAP in einigen Zellen. Darüber hinaus beobachteten wir Zellen, in denen keine Kollokalisierung nachgewiesen werden konnte. Diese imponierten im Hippokampus morphologisch wie Neurone. In den übrigen Abschnitten färbten sich Zellen positiv für die TNF- α -mRNA, die morphologisch wie Mikroglia imponierten. Zwölf Stunden nach der Infektion identifizierten wir somit Astrozyten und - aufgrund morphologischer Kriterien – Mikroglia und Neurone als zelluläre Quellen von TNF- α -mRNA.

In der Versuchsgruppe 3 beobachteten wir 18 Stunden nach der Infektion auch in den liquorfernen, tieferen Hirnregionen eine in situ Synthese von TNF- α -mRNA. Wie auch 24 Stunden nach der Infektion waren nun in der in situ Hybridisierung sowohl im Kortex als auch im Hippokampus morphologisch unterschiedliche Zelltypen positiv für TNF- α -mRNA. In den Doppelfärbungen identifizierten wir hier erneut Astrozyten. In den kortikalen Hirnregionen konnten wir erneut anhand morphologischer Kriterien Neurone als zelluläre Quellen von TNF- α erkennen (Abbildung 7).

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mikrogliazellen aus der Nachbarschaft des Liquorraums initiale Quellen der hirnparenchymatösen Inflammationsreaktion sind. Mit Voranschreiten der Erkrankung bilden auch Astrozyten im Kortex und Neurone im Hippokampus mRNA des proinflammatorischen Zytokins TNF- α . Nach 18 Stunden Infektionszeit kommt es zur Ausbreitung der Entzündungsreaktion auf das gesamte Hirngewebe.

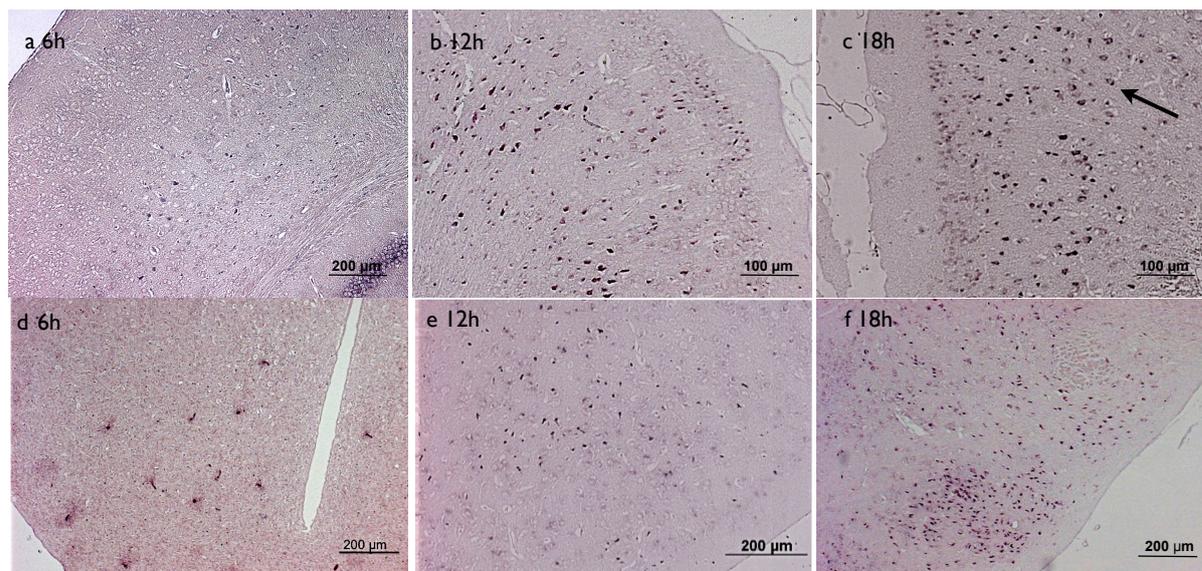


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung der in situ Hybridisierung von TNF- α -mRNA in Maushirnen 6, 12 und 18 Stunden nach intrathekaler Infektion mit 5×10^5 CFU *Streptococcus pneumoniae*. 6 Stunden nach Infektionsbeginn produzieren einzelne Zellen mit Mikroglia-typischer Morphologie im Kortex TNF- α -mRNA (a). Mit Voranschreiten der Erkrankung breitet sich die Induktion der TNF- α -mRNA über das Parenchym aus (b). Nach 18 Stunden produzieren auch Neurone TNF- α (Pfeil in c). Auch in den subkortialen Hirnregionen produzieren vorerst einzelne mikrogliäähnliche Zellen TNF- α (d). Mit Voranschreiten der Erkrankung kann auch hier eine rasche Zunahme der TNF- α produzierenden Zellen festgestellt werden (e-f) (In situ Hybridisierung von Maushirnen mit einer DIG-gelabelten TNF- α -Sonde).

3.3 Auslöser der hirnparenchymatösen Entzündungsreaktion

Während der Entwicklung einer bakteriellen Meningitis kommt es zur Produktion und Hochregulierung vieler Faktoren im Liquor cerebrospinalis, die proinflammatorisch wirken (Tuomanen 1994; Rooney et al. 1995). Diese Faktoren können in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen, die vom Wirt selbst gebildeten Mediatoren und zum anderen, die bakteriellen Komponenten. Letztere werden als Virulenzfaktoren bezeichnet.

Im Folgenden untersuchten wir den Einfluss dieser Faktoren auf die parenchymatöse Entzündungsreaktion. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels richteten wir unser Augenmerk auf den Einfluss der wirtseigenen Faktoren, im zweiten Abschnitt auf den der bakteriellen Komponenten.

3.3.1 Bedeutung der wirtseigenen Immunantwort auf die Zytokinproduktion

Die im Liquor cerebrospinalis gelösten wirtseigenen Mediatoren werden wesentlich durch das leukozytäre Infiltrat gebildet. Für die Initiierung der leukozytären Migration ist TNF- α ein Schlüsselprotein (Probert et al. 1997). Die leukozytäre Migration in den Liquorraum wird über den Rezeptor CD-18 vermittelt (Tuomanen et al. 1989). Um den Einfluss des leukozytären Infiltrates auf die parenchymatöse Synthese von TNF- α und IL-1 β zu

untersuchen, induzierten wir eine Pneumokokkenmeningitis und behandelten die Versuchstiere mit dem anti-CD18 Antikörper Game 46. Dieser bindet an Adhäsionsrezeptoren und verhindert so die Invasion der Leukozyten in den Liquorraum. In einer zweiten Gruppe wurden den meningitiserkrankten Versuchstieren mit dem GM 6001 TACE- und MMP-Inhibitor injiziert. Auf diese Weise konnten wir den Einfluss von löslichem TNF- α und den MMPasen auf die Entzündungsreaktion untersuchen. Die TACE-Inhibition hemmt die Sekretion von TNF- α in den Interzellularraum durch Blockierung der enzymatische Spaltung von TNF- α aus seiner membrangebundenen „pro“-Form, mittels des TNF Alpha Converting Enzyme. TNF- α -Produktion und Bioverfügbarkeit seines Zelloberflächenrezeptors sind durch TACE reguliert. Ausserdem bewirkt der verwendete GM 6001-Inhibitor auch eine Inhibition von Metallo matrix Proteasen.

Die Applikation des GM 6001 bzw. des Game 46-Antikörpers erfolgte intravenös zum Zeitpunkt der Infektion sowie 6 und 12 Stunden nach der Infektion. Die Opferung und Aufarbeitung der Tiere erfolgte ca. 18 Stunden nach der Infektion. Die Quantifizierung der TNF- α - und der IL-1 β -mRNA erfolgte mittels semiquantitativer Real-Time-PCR.

Durch Applikation des anti-CD18 Antikörpers konnte im Vergleich zu unbehandelten Meningitistieren nur eine geringe Reduktion der TNF- α -Induktion beobachtet werden. Diese war weder im Hippokampus noch im Kortex der Versuchstiere signifikant ($p > 0,05$). Die Synthese von IL-1 β war im Kortex leicht erhöht ($p > 0,05$), im Hippokampus leicht vermindert ($p > 0,05$) (Abbildung 8 und Tabelle 3).

Die Reduktion des löslichen TNF- α mit dem TACE-Inhibitor und der MMPs führte, sowohl im Kortex als auch im Hippokampus der untersuchten Tiere zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -mRNA Synthese. Dabei sank die Synthese im Kortex um ca. 59% ($p < 0,05$) und im Hippokampus um 41% ($p < 0,05$). Die Synthese von IL-1 β -mRNA verstärkte sich dagegen in den untersuchten Abschnitten; dies erreichte jedoch nur im Hippokampus Signifikanz. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das leukozytäre Infiltrat keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinsynthese von IL-1 β und TNF- α im Hirnparenchym nimmt. Durch Reduktion des löslichen TNF- α konnten wir eine signifikante Reduktion der parenchymatösen TNF- α -mRNA Synthese beobachten. Gleichzeitig zeigt sich eine verstärkte Synthese von IL- 1 β , welche jedoch nur im Hippokampus statistische Signifikanz erreichte ($p > 0,05$).

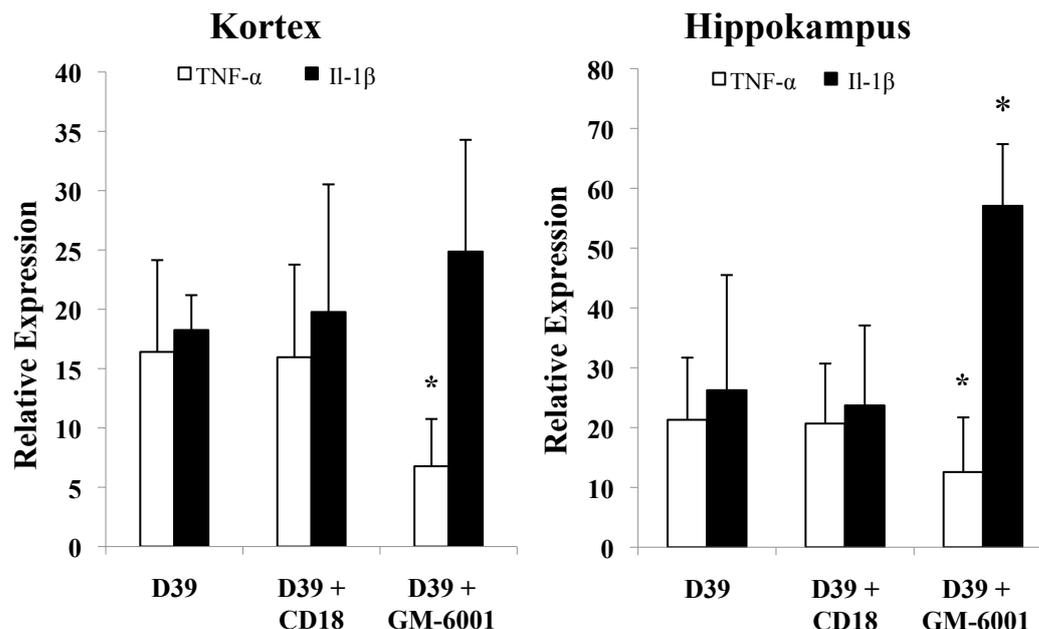


Abbildung 8: TNF- α - (weiß) und IL-1 β - (schwarz) mRNA-Synthese im Kortex und Hippokampus nach Inhibition der Liquorpleozytose bzw. Inhibition der Freisetzung von TNF- α aus seiner membrangebundenen Form und Inhibition der Metallo matrix Proteasen während der murinen Pneumokokkenmeningitis.

Die Versuchstiere wurden durch intrathekale Injektion von 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* infiziert. Die Inhibition der leukozytären Infiltration erfolgte durch anti-CD18 Antikörper und führte zu keiner signifikanten Veränderung in der hirnparenchymatösen Synthese von IL-1 β oder TNF- α . Die Verminderung des löslichen TNF- α durch GM-6001 hingegen, führt zu einer signifikant verminderten TNF- α -Synthese. Gleichzeitig ist eine gesteigerte IL-1 β -Synthese zu beobachten, diese war nur im Hippokampus signifikant unterschiedlich von nicht mit GM-6001 behandelten D39-Meningitistieren (* = $p < 0,05$). Sämtliche Ergebnisse sind statistisch signifikant unterschiedlich von PBS-behandelten Kontrolltieren ($p < 0,001$).

Kortex		TNF- α			IL-1 β		
18h	n=	MW	SD	SN (p)	MW	SD	SN (p)
D39	5	16,41	7,81	PBS: < 0,001	18,25	2,94	PBS: < 0,001
D39 + CD18	4	15,96	3,99	PBS: < 0,001 18h: > 0,05	19,77	10,76	PBS: < 0,001 18h: > 0,05
D39 + iTACE	5	6,77	2,11	PBS: < 0,007 18h: < 0,05	24,87	9,42	PBS: < 0,001 18h: > 0,05

Hippokampus		TNF- α			IL-1 β		
18h	n=	MW	SD	SN (p)	MW	SD	SN (p)
D39	5	21,30	10,39	PBS: < 0,001	26,25	19,24	PBS: < 0,001
D39 + CD18	4	20,67	10,02	PBS: < 0,001 18h: > 0,05	23,70	13,36	PBS: < 0,001 18h: > 0,05
D39 + iTACE	5	12,57	9,13	PBS: < 0,05 18h: < 0,05	57,06	10,31	PBS: < 0,001 18h: < 0,05

Tabelle 3: Relative Expression der mRNA von IL-1 β und TNF- α im Kortex und Hippokampus an meningitiskranken Mäuse nach Inhibition der leukozytären Infiltration (mit anti-CD18 Antikörper) bzw. nach Anwendung des TACE- und MMP-Inhibitors. Das Verhältnis der Expression wurde zu PBS-behandelten, gesunden Kontrolltieren gebildet. (MW= Mittelwert der relativen Expression; SD= Standardabweichung der Mittelwerte; SN = Signifikanzniveau).

3.3.2 Einfluss bakterieller Komponenten auf die Entzündungsreaktion

Während der Pneumokokkenmeningitis kommt es durch die Autolyse von *Streptococcus pneumoniae* zu einer kontinuierlichen Zunahme von bakteriellen Abbau- und Stoffwechselprodukten im Liquor cerebrospinalis. Viele der bakteriellen Stoffwechselprodukte und Zellwandfragmente wirken proinflammatorisch oder direkt toxisch auf das Hirnparenchym. Besonders gut untersucht sind die Eigenschaften und Auswirkungen von H₂O₂, Pneumolysin und der Lipoteichonsäure (LTA) der Pneumokokkenzellwand in ihrer Fähigkeit, Inflammationskaskaden auszulösen oder Zelltod zu induzieren (Braun et al. 2002; Bermpohl et al. 2005). Um den Einfluss dieser Faktoren auf die parenchymatöse Synthese von TNF- α und IL-1 β zu untersuchen, wurden vier Versuchsgruppen gebildet, die je nach 18 h geopfert wurden.

In der Versuchsgruppe 1 wurde die Meningitis durch intrathekale Injektion von aufgereinigten und Amidase-behandelten Pneumokokken-Zellwandfragmenten (PZW) induziert. Gleichzeitig wurde die leukozytäre Infiltration in den Liquorraum mittels anti-CD18 Antikörpern geblockt, um die Effekte der Zellwandfragmente im Hirnparenchym unabhängig von der Liquorpleozytose zu untersuchen.

In Versuchsgruppe 2 wurde eine Meningitis mit 5 x 10⁵ KBE D39 Wildtyp-Pneumokokken (D39) bzw. mit *plnA*⁻/*spxB*⁻ Bakterienmutanten induziert. Die *plnA*⁻/*spxB*⁻ Pneumokokkenmutanten haben durch genetische Mutation die Fähigkeit zur Bildung von Pneumolysin und H₂O₂ verloren.

In der Versuchsgruppe 3 wurden die Tiere mit 5 x 10⁵ KBE hitzeinaktivierten unbekapselten R6-Pneumokokken infiziert. Die hitzeinaktivierten R6-Pneumokokken autolysieren aufgrund ihres fehlenden Stoffwechsels nicht. Somit konnten die Auswirkungen bakterieller Virulenzfaktoren im Liquor cerebrospinalis - unabhängig vom bakteriellen Stoffwechsel, von der Kapsel und von Zellwandfragmenten aber abhängig von der intakten bakteriellen Zellwand - untersucht werden.

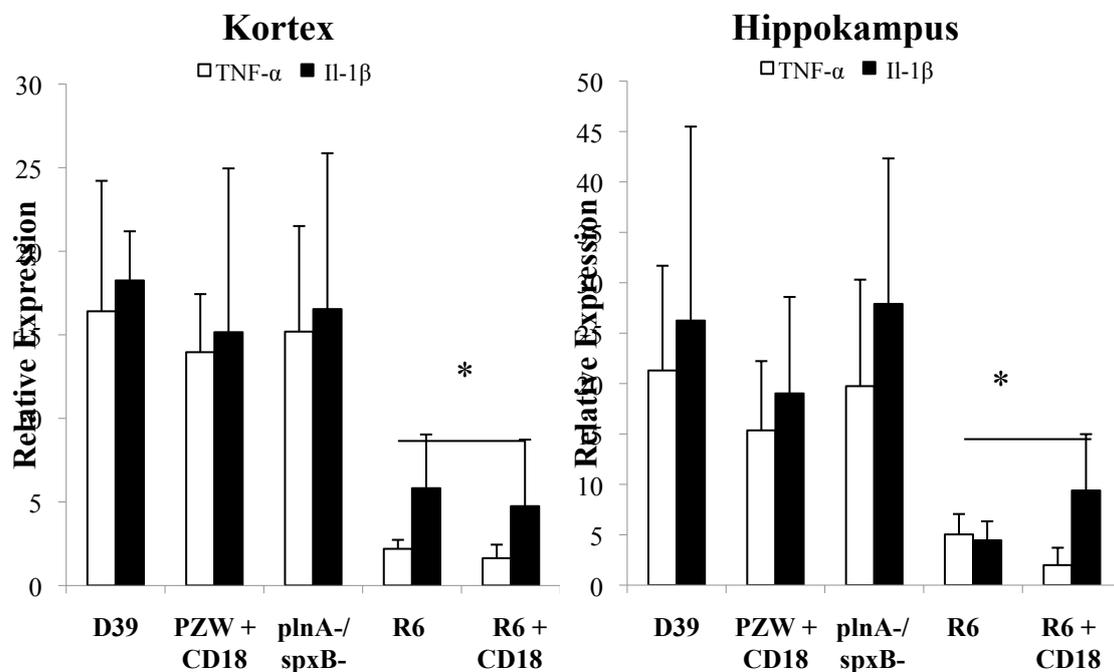
In der Versuchsgruppe 4 untersuchten wir den Einfluss der Liquorpleozytose auf die parenchymatöse Reaktion durch Inhibition der leukozytären Invasion nach Infektion mit den R6-hitzeinaktivierten Bakterien.

In allen Versuchsgruppen (1 - 4) konnten wir - im Vergleich mit den PBS-behandelten Kontrolltieren – mittels Real-Time-PCR eine statistisch signifikante Synthesesteigerung der TNF- α - und der IL-1 β -mRNA feststellen (siehe Abbildung 9, Tabelle 4).

Verglichen mit der durch Wildtyp-Pneumokokken (D39) induzierten Meningitis führte die Infektion der Versuchstiere mit den Pneumolysin- und H₂O₂-defizienten Pneumokokkenmutanten (*plnA*/*spxB*) zu einer geringgradigen, nicht signifikanten Änderung (Zu- bzw. Abnahmen) der Zytokin-mRNA-Syntheseproduktion (p jeweils > 0,05, Abbildung 9, Tabelle 4).

Die Instillation von PZW in den Liquorraum bei gleichzeitiger Inhibition der Liquorleukozytose mittels anti-CD18 Antikörpern induzierte eine Synthese von TNF- α - und IL-1 β -mRNA im Hippokampus, Kortex und Striatum. Diese Zytokininduktion war in allen untersuchten Hirnabschnitten etwas geringer ausgeprägt als die durch lebende Wildtyp-Pneumokokken (D39) induzierte TNF- α - und IL-1 β -mRNA-Synthese. (Abbildung 9, Tabelle 4).

Die Infektion mit hitzeinaktivierten Pneumokokken führt in Ab- und Anwesenheit des leukozytären Infiltrates zu einer signifikant schwächeren Induktion der mRNA- Synthese von IL-1 β und TNF- α , verglichen mit den Syntheseraten bei der Wildtypenmeningitis (ca. 80 - 90% reduziert, p < 0,05, Abbildung 9, Tabelle 4).



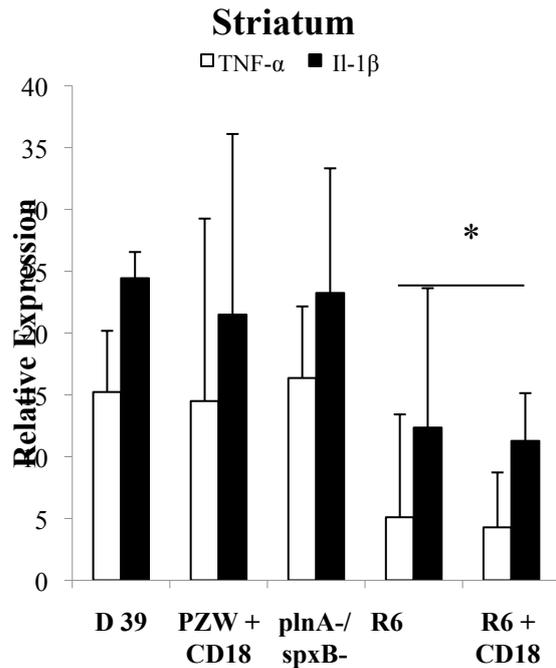


Abbildung 9: Einfluss bakterieller Faktoren im Liquorraum auf die Inflammation im Hirnparenchym. Die Abbildung zeigt die mittels Real-Time-PCR gemessene mRNA-Synthese von TNF- α (weiß) und IL-1 β (schwarz) im Kortex, Striatum und Hippokampus meningitiskranker Versuchstiere im Verhältnis zu PBS-behandelten Tieren. Verglichen mit den D39-Wildtyp-infizierten Mäusen war nach der Infektion der Versuchstiere durch die *plnA*/*spxB* Bakterienmutanten die TNF- α - und die IL-1 β -mRNA-Synthese leicht, jedoch nicht statistisch signifikant reduziert ($p > 0,05$). Die Infektion mit den aufgereinigten Zellwandfragmenten war verglichen mit D39-Wildtyp-infizierten Mäusen ebenfalls nicht signifikant vermindert ($p > 0,05$). Die Induktion einer Meningitis mit den hitzeinaktivierten R6-Bakterien führt zwar zu einer signifikanten Synthesesteigerung der parenchymatösen TNF- α - bzw. IL-1 β -mRNA, diese ist aber im Vergleich zu der Synthesesteigerung bei den mit Wildtypneumokokken (D39) infizierten Mäusen signifikant vermindert. Die gleichzeitige Hemmung der leukozytären Invasion nach Infektion mit den hitzeaktivierten R6-Bakterien führt zu einer weiteren Reduktion der TNF- α -Synthese. (* = $p < 0,05$ jeweils verglichen mit D 39 infizierten Tieren).

Kortex		TNF- α			IL-1 β		
18h	n=	SD	MW	SN (p)	SD	MW	SN (p)
D39	5	16,41	7,81	PBS: < 0,001	18,25	2,94	PBS:< 0,001
PCW + CD18	6	13,96	3,48	PBS: < 0,001	15,16	9,80	PBS:< 0,001
<i>plnA</i> / <i>spxB</i>	6	15,19	6,32	PBS: < 0,001	16,54	9,33	PBS:< 0,001
R6	5	2,20	0,54	PBS: < 0,05 D39: < 0,05	5,82	3,21	PBS:< 0,05 D39: < 0,05
R6 + CD18	4	1,63	0,81	PBS: < 0,05 D39: < 0,05	4,75	3,98	PBS: < 0,05 D39: < 0,05

Ergebnisse

Hippokampus		TNF- α			IL-1 β		
18h	n=	SD	MW	SN (p)	SD	MW	SN (p)
D39	5	21,30	10,39	PBS:< 0,05	26,25	19,24	PBS:< 0,05
PCW+ CD18	6	15,36	6,87	PBS:< 0,05 D39: > 0,05	19,02	9,57	PBS:< 0,05 D39: > 0,05
<i>plnA</i> ⁻ / <i>spxB</i> ⁻	6	19,74	10,56	PBS:< 0,05 D39: > 0,05	27,90	14,43	PBS:< 0,05 D39: > 0,05
R6	5	5,03	2,02	PBS:< 0,05 D39: <0,05	4,45	1,89	PBS:< 0,05 D39: < 0,05
R6 + CD18	4	1,99	1,72	PBS:< 0,05 D39: < 0,05	9,39	5,59	PBS:< 0,05 D39: < 0,05

Striatum		TNF- α			IL-1 β		
18h	n=	SD	MW	SN (p)	SD	MW	SN (p)
D39	5	15,23	4,95	PBS: < 0,001	24,44	2,12	PBS: < 0,001
PCW + D18	6	14,50	14,76	PBS:< 0,001	21,49	14,61	PBS:< 0,001
<i>plnA</i> ⁻ / <i>spxB</i> ⁻	6	16,36	5,79	PBS:< 0,001	23,24	10,08	PBS: < 0,05
R6	5	5,10	8,32	PBS:< 0,05 D39:< 0,05	12,35	11,28	PBS: < 0,05 D39: < 0,05
R6 + CD18	4	4,28	3,57	PBS:< 0,05 D39:< 0,05	11,28	3,86	PBS: < 0,05 D39: < 0,05

Tabelle 4: Relative Expression der mRNA von IL-1 β und TNF- α im Kortex, Hippokampus und Striatum der meningitiskranken Mäuse. Die Meningitis wurde auf unterschiedliche Weise induziert: mit Wildtyp-Pneumokokken (D39), mit Pneumolysin- und H₂O₂-defizienten Pneumokokkenmutanten (*plnA*⁻/*spxB*⁻), Pneumokokken-Zellwandfragmenten (PZW), hitzeinaktivierten Pneumokokken (R6) mit und ohne Inhibition der Liquorleukozytose (durch anti-CD18 Antikörper). Das Verhältnis der Expression wurde zu PBS-behandelten, gesunden Kontrolltieren gebildet (MW= Mittelwert der relativen Expression; SD = Standardabweichung der Mittelwerte, SN= Signifikanzniveau).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Beobachtungen aus dem vorangehenden Kapitel. Hier kam es nach der Inhibition der Liquorpleozytose ebenfalls nur zu einer geringen Reduktion der Zytokinproduktion im Hirnparenchym. Dies lässt auf eine Schlüsselrolle der bakteriellen Faktoren in der Auslösung der parenchymatösen Inflammation schließen. In der Tat konnten wir zeigen, dass durch Inhibition des Stoffwechsels und durch Inhibition der Zelllyse eine signifikante und ausgeprägte Reduktion der Expression der TNF- α - und IL-1 β -mRNA erzielt werden konnte. Insbesondere den aufgereinigten Zellwandfragmenten muss somit eine starke proinflammatorische Potenz im Hirnparenchym zugeschrieben werden.

3.4 Einfluss der parenchymatösen Entzündungsreaktion auf die Oligodendrozyten

Störungen des Metabolismus myelinbildender Zellen sind in akut- und in chronisch-infektiösen Erkrankungen beschrieben. Ähnlich den neuronalen Schadensmechanismen in der Meningitis werden TNF- α und IL-1 β eine tragende Rolle in der Vermittlung dieser Prozesse zugeschrieben (Hauw et al. 1992). Wir hatten den Nachweis einer parenchymatösen Synthese von IL-1 β und TNF- α als Reaktion auf die Infektion des Liquors mit *Streptococcus pneumoniae* in den vorangehenden Kapiteln erbracht. Im folgenden Kapitel untersuchten wir die Auswirkungen dieser Gewebereaktion auf die Myelinsynthese bzw. die Vitalität der Oligodendrozyten.

Hierzu verglichen wir die Synthese der myelinbildenden Proteine Proteolipid Protein (PLP) und Myelin-assoziierten Glykoprotein (MOG) sowie des Strukturproteins der Oligodendrozytenmembran Claudin-11 in Meningitistieren und gesunden Kontrolltieren.

Die Induktion der Meningitis erfolgte entsprechend der vorangestellten Kapitel durch intrathekale Injektion von 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae*. Kontrolltieren wurde nur PBS injiziert. Die Opferung aller Tiere erfolgte 18 Stunden nach der Infektion.

3.4.1 Lokale Syntheseänderung der mRNA myelinbildender Proteine

Das Proteolipid Protein bildet den Hauptbestandteil des Myelins und ist ein oligodendrozytenspezifisches Protein (Norton 1984). Aus diesem Grund eignet sich PLP sehr gut zur Untersuchung des Oligodendrozytenmetabolismus. Zuerst untersuchten wir die lokale Synthese von PLP während der Pneumokokkenmeningitis mittels in situ Hybridisierung (ISH). Im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren war in Hirnschnitten von Meningitistieren die enzymatische Farbentwicklung des PLP-Myelins deutlich verzögert und in ihrer Intensität schwächer. Eine signifikante Reduktion der Anzahl positiv gefärbter Zellkörper war jedoch nicht zu beobachten. Wir schlossen daher auf eine veränderte Synthese von PLP während der Pneumokokkenmeningitis (Abbildung 10).

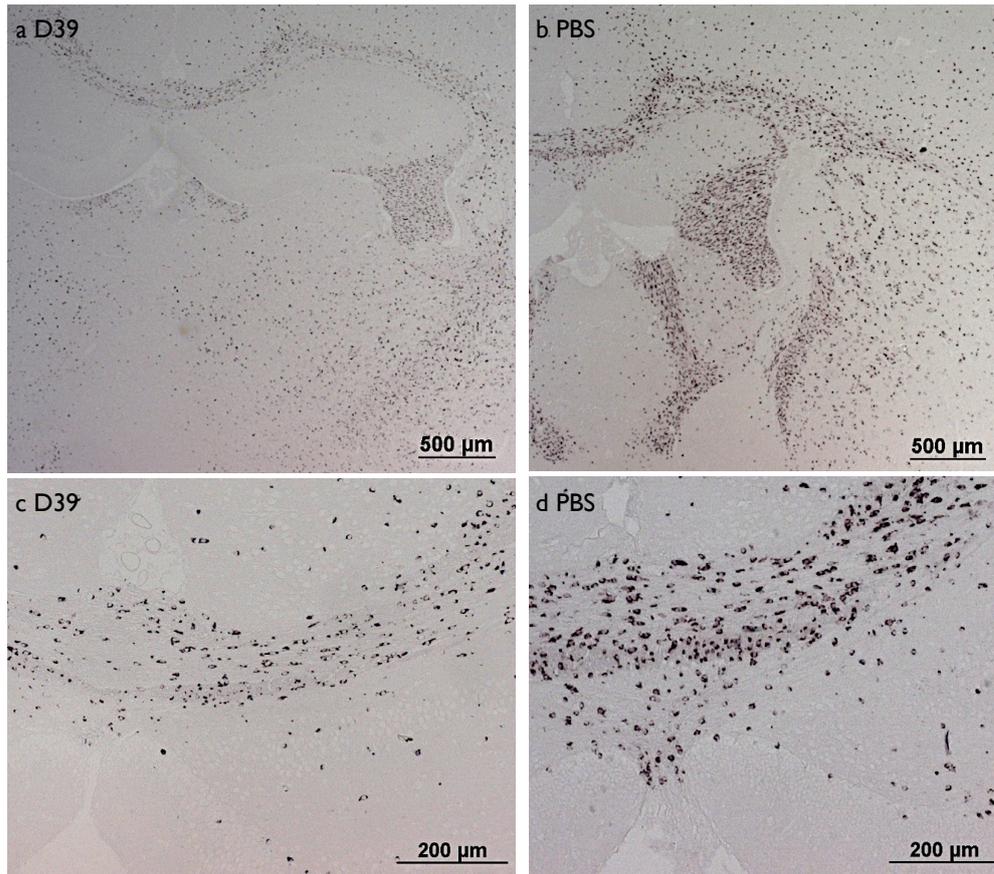


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung der PLP-mRNA in situ Hybridisierung im Gehirn von Meningitismäusen. Die Versuchstiere wurden mit 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* intrathekal infiziert (18 Stunden). Die Abbildungen der Reihe 1 stellt die Übersichtsaufnahmen (Kortex und Marklager) von PBS-behandelten (rechts) mit *Streptococcus pneumoniae* (D39) infizierten Tieren gegenüber (links). Deutlich ist die geringere Anfärbung in den Geweben der erkrankten Tiere. Reihe 2 zeigt in stärkerer Vergrößerung Kortex und Corpus callosum, links nach Infektion mit *S. pneumoniae* (D39) und rechts in den PBS-behandelten Tieren

3.5 Synthesestörung der mRNA Oligodendrozyten-spezifischer Proteine in der Pneumokokkenmeningitis

Im Folgenden wollten wir die Hypothese einer verminderten Synthese des myelinspezifischen Proteins PLP während der Pneumokokkenmeningitis mittels Real-Time-PCR bestätigen und deren Ausmaß quantifizieren. Außerdem untersuchten wir, ob dieser Effekt durch eine globale Reduktion des Oligodendrozytenmetabolismus entsteht oder spezifisch die Myelin-assoziierten Proteine betrifft.

Hierzu quantifizierten wir mittels Real-Time-PCR die mRNA-Synthese von PLP, MOG und Claudin-11 in Meningitistieren und PBS-behandelten gesunden Kontrolltieren. MOG ist an der korrekten Fältelung, Assoziation und Zusammenlagerung der Myelinscheide beteiligt (Quarles 2002). Claudin-11 ist ein spezifisches Protein der Oligodendrozyten, welches zur Integrität der Zellmembran und dem Erhalt der interzellulären Kontakte beiträgt (Tsukita et al. 2000). Die Versuchstiere wurden wie oben beschrieben infiziert und nach 18 Stunden

geopfert. Anschließend wurden die Gehirne entnommen, unterschiedliche Hirnregionen (Kortex, Hippokampus und Striatum) präpariert und für die Durchführung einer Real-Time-PCR aufgearbeitet (siehe Methoden).

Die Infektion des Liquor cerebrospinalis mit den lebenden Pneumokokken führte 18 Stunden nach Beginn der Meningitis zu einer signifikanten Reduktion der Synthese von PLP und MOG im Kortex, im Striatum und im Hippokampus der untersuchten Tiere ($p < 0,05$). Die mRNA des Strukturproteins Claudin-11 wurde hingegen nicht signifikant in seiner Synthese reguliert (Abbildung 11).

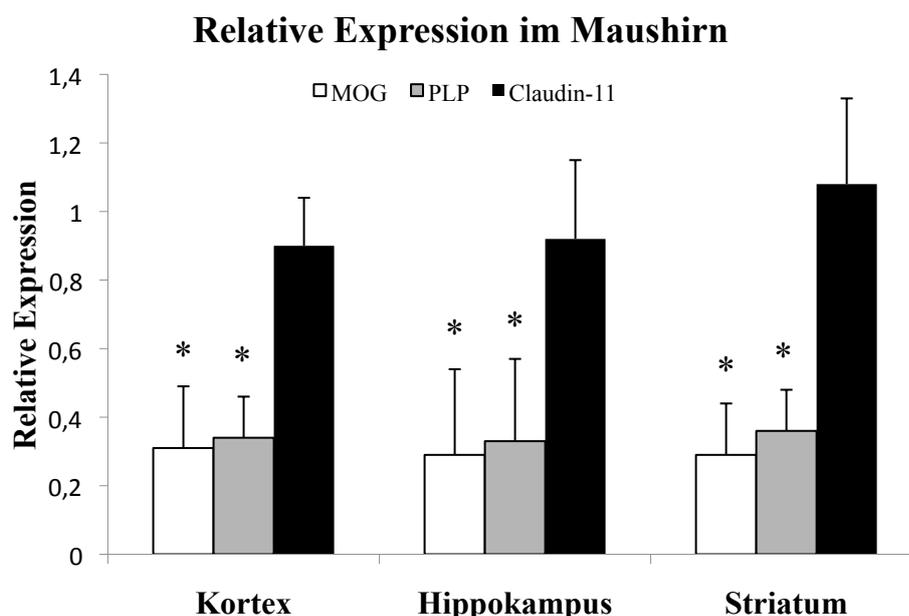


Abbildung 11: Infektion des Liquors mit lebenden Pneumokokken führt zu einer Synthesestörung myelinspezifischer Proteine im Hirnparenchym. 18 Stunden nach intrathekaler Infektion der Versuchsmäuse mit 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* kommt es im Kortex, Striatum und Hippokampus der untersuchten Tiere zu einer signifikanten Niederregulation der Synthese von PLP und MOG (* $p < 0,05$) im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren. Claudin-11 hingegen wird nicht signifikant reguliert.

	Kortex			Hippokampus			Striatum		
	PLP	MOG	Claudin-11	PLP	MOG	Claudin-11	PLP	MOG	Claudin-11
MW	0,34	0,31	0,90	0,33	0,29	0,92	0,36	0,29	1,08
SD	0,12	0,18	0,14	0,24	0,25	0,23	0,12	0,15	0,25
SN(p)	0,001	0,009	> 0,05	0,023	0,029	> 0,05	0,025	0,029	> 0,05

Tabelle 5: Relative Expression der mRNA von PLP, MOG und Claudin-11 im Kortex, Hippokampus und Striatum von Meningitismäusen. Das Verhältnis der Expression wurde zu PBS-behandelten, gesunden Kontrolltieren gebildet (MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung der Mittelwert, SN = Signifikanzniveau).

3.5.1 Zeitkinetik der Oligodendrozytenreaktion

Zur Charakterisierung der zeitlichen und räumlichen Entwicklung des Effektes untersuchten wir die mRNA-Synthese von PLP, MOG und Claudin-11 mittels Real-Time-PCR jeweils 6, 12 und 18 Stunden nach Beginn der experimentellen Meningitis. In Anlehnung an die Experimente aus 3.2.1 wurden Versuchstiere mit 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* intrathekal infiziert und zu denselben Zeitpunkten geopfert. Als Referenz galt die mRNA-Synthese der entsprechenden Proteine in den PBS-behandelten Kontrolltieren. 6 Stunden nach Beginn der Meningitis war bereits ein leichter Rückgang der mRNA-Synthese von PLP im Kortex und im Hippokampus zu beobachten. Im weiteren Verlauf der Meningitis (18 und 24 Stunden) entwickelte sich eine signifikante Reduktion der Synthese der MOG- und PLP-mRNA-Synthese ($p < 0,05$). Eine signifikante Regulation der Claudin-11-mRNA-Synthese fand zu keinem der untersuchten Zeitpunkte statt (Abbildung 11).

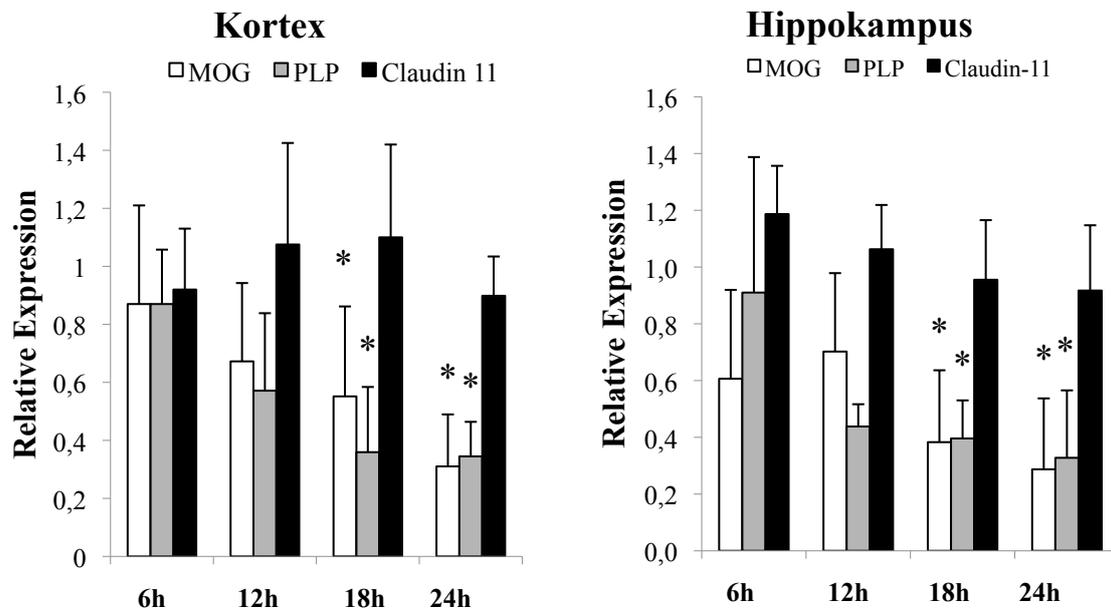


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der mRNA-Synthese von Myelinproteinen bei der Pneumokokkenmeningitis. Bereits 6 Stunden nach Beginn der Meningitis kommt es zu einer Reduktion der mRNA-Synthese von MOG (weiß) und PLP (grau) im Kortex und Hippokampus der Versuchstiere. Mit Voranschreiten der Erkrankung entwickelte sich ein weiterer Syntheseabfall der MOG- und PLP-mRNA, der nach 18 Stunden statistisch signifikant war (* = $p < 0,05$). Eine Regulation der Claudin-11-mRNA-Synthese (schwarz) konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Quantifiziert wurde die Dynamik der mRNA-Synthese mittels Real-Time-PCR, dabei wurde die Synthese der PBS-behandelten Tiere gleich 1 gesetzt. Die Infektion der Versuchstiere erfolgte durch intrathekale Instillation von 5×10^5 KBE *Streptococcus pneumoniae* intrazisternal.

Kortex	n=	PLP			Claudin-11			MOG		
		MW	SD	SN	MW	SD	SN	MW	SD	SN
6h (D39)	3	0,87	0,19	xx	0,92	0,21	xx	0,87	0,34	xx
12h (D39)	3	0,57	0,27	xx	1,08	0,35	xx	0,67	0,27	xx
18h (D39)	5	0,36	0,22	< 0,05	1,10	0,32	> 0,05	0,55	0,31	< 0,05
24h (D39)	5	0,34	0,12	< 0,05	0,90	0,14	> 0,05	0,31	0,18	< 0,05

Hippokampus	n=	PLP			Claudin-11			MOG		
		MW	SD	SN	MW	SD	SN	MW	SD	SN
6h (D39)	3	0,91	0,48	xx	1,19	0,17	xx	0,61	0,31	xx
12h (D39)	3	0,44	0,08	xx	1,06	0,16	xx	0,70	0,28	xx
18h (D39)	5	0,40	0,13	< 0,05	0,96	0,21	> 0,05	0,38	0,25	< 0,05
24h (D39)	5	0,33	0,24	< 0,05	0,92	0,23	> 0,05	0,29	0,25	< 0,05

Tabelle 5: Relative Expression der mRNA von PLP, MOG und Claudin-11 im Kortex und Hippokampus 6, 12 bzw. 18 Stunden nach Beginn der Meningitis. Das Verhältnis der Expression wurde zu PBS-behandelten, gesunden Kontrolltieren gebildet. (MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung des Mittelwerts, SN= Signifikanzniveau, xx= Signifikanzberechnung nicht möglich, da die Fallzahl zu klein ist)

3.6 Identifikation von Auslösern der Myelinsynthesestörung

3.6.1 Einfluss bakterieller Virulenzfaktoren auf die Myelinsynthese im Maushirn

Auf der Basis der Experimente aus Kapitel 3.3 untersuchten wir im Folgenden den Einfluss definierter bakterieller Faktoren auf die Änderung der Myelinsynthese im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis.

Zur Untersuchung des Einfluss der zellmembrangebundenen Lipoteichonsäure auf die Synthesestörung der myelinspezifischen Proteine instillierten wir den Versuchstieren intrathekal Amidase-verdaute und aufgereinigte Pneumokokken-Zellwandfragmente. Durch die Infektion mit Pneumolysin/H₂O₂-defizienten Bakterienmutanten (*plnA*/*spxB*) untersuchten wir den Einfluss dieser Stoffwechselprodukte auf die Synthese von PLP und MOG im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis. Pneumolysin und H₂O₂ sind gut untersuchte Virulenzfaktoren der Pneumokokken. Diese Toxine induzieren sowohl proinflammatorische (Tuomanen 1994) als auch direkt toxische Effekte, z. B. durch Induktion von neuronaler Apoptose (Braun et al. 2002).

Unbekapselte R6-hitzeinaktivierte Pneumokokken autolysieren durch den fehlenden Metabolismus nicht. Die Infektion der Versuchstiere mit diesen hitzeinaktivierten Bakterien ermöglichte den Einfluss des aktiven Stoffwechsels der Pneumokokken auf die Myelinsynthese zu beurteilen.

Im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollmäusen kam nach Induktion einer Meningitis durch die Pneumolysin-/H₂O₂-defizienten Bakterienmutanten im Kortex, Striatum und Hippokampus zu einer signifikanten Suppression der Synthese von PLP ($p < 0,05$). Im Vergleich zu den mit Wildtyp-Pneumokokken (D39) behandelten Mäusen war die durch diese Bakterienmutanten induzierte Suppression der PLP-mRNA-Synthese statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$). Die Synthese von Claudin-11 hingegen war sowohl in der Wildtyp-Bakterien-Meningitis als auch in der Mutanten-Bakterien-Meningitis statistisch nicht signifikant reduziert.

Im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollmäusen führte die Induktion einer Meningitis durch die aufgereinigten Pneumokokken-Zellwandfragmente (PZW) nach 18 Stunden zu einer signifikanten Herabregulation der PLP-mRNA-Synthese. Die PZW induzierte Suppression der PLP-mRNA-Synthese war statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$), verglichen mit der Wildtyp-Pneumokokken (D39) Meningitis (Abbildung 13, Tabelle 6). Pneumokokken-Zellwandfragmente induzieren eine leukozytäre Infiltration des Liquor cerebrospinalis. Um die Auswirkungen der Pneumokokkenzellwandfragmente unabhängig von der Liquorleukozytose zu beurteilen, wurde die Invasion der Leukozyten in den Liquorraum durch anti-CD18 Antikörper inhibiert. Die effektive Hemmung der zellulären Infiltration wurde durch Bestimmung der Zellzahl im Liquor kontrolliert.

Die intrathekale Instillation von PZW allein oder von PZW zusammen mit anti-CD18 Antikörpern bewirkte jeweils eine ähnliche (statistisch nicht signifikant unterschiedliche) Inhibition der PLP-mRNA-Synthese in allen untersuchten Hirnabschnitten. Die Liquorleukozytose beeinflusst somit nicht die PZW-induzierte Myelin-mRNA-Synthesestörung.

Die Infektion des Liquor cerebrospinalis mit hitzeinaktivierten R6 *Streptococcus pneumoniae* führt zur Ausbildung einer Meningitis mit einer leukozytären Infiltration des Liquorraums. Um die Auswirkungen der hitzeinaktivierten Pneumokokken (R6) unabhängig von der Liquorleukozytose zu beurteilen, wurde die Invasion der Leukozyten in den Liquorraum durch anti-CD18 Antikörper inhibiert. 18 Stunden nach der Infektion der Versuchstiere mit den hitzeinaktivierten R6 *Streptococcus pneumoniae* konnten wir im Kortex und Hippokampus der infizierten Tiere keine signifikante Reduktion der mRNA-Synthese von PLP oder Claudin-11 im Vergleich zu den PBS-infizierten Kontrolltieren feststellen (Abbildung 13).

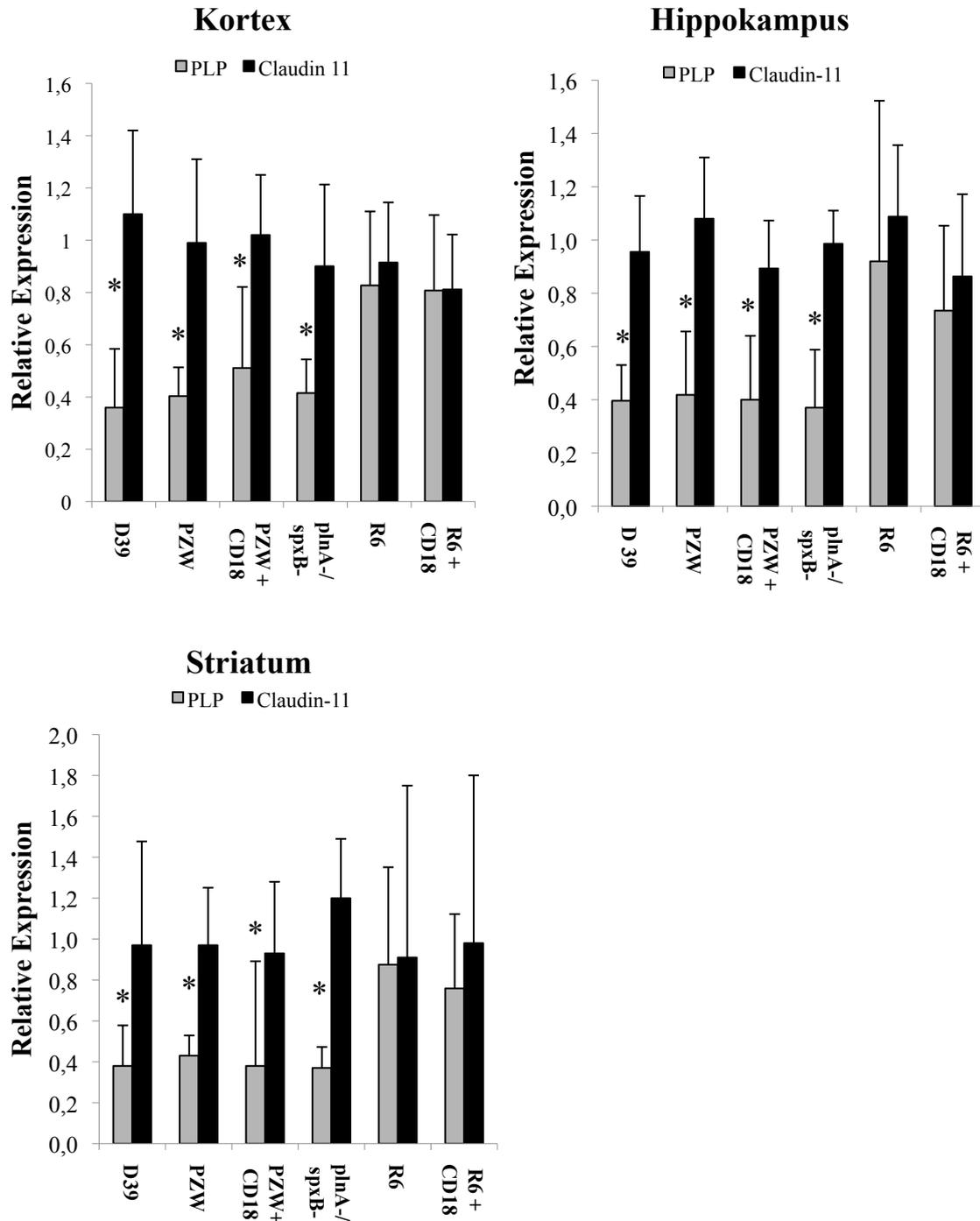


Abbildung 13: Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* bewirken eine mRNA-Synthesestörung myelinbildender Proteine im Hirnparenchym. Die graphische Darstellung zeigt die Real-Time-PCR-Bestimmungen der kortikalen, striatalen und hippokampalen mRNA-Synthese von PLP und Claudin-11, jeweils 18 Stunden nach der intrathekalen Infektion der Versuchstiere mit Wildtyp-Pneumokokken (D39), Pneumolysin-/H₂O₂-defizienten Mutanten (*plnA*/*spxB*), aufgereinigten Pneumokokken-Zellwandfragmenten (PZW); aufgereinigten Pneumokokken-Zellwandfragmenten bei gleichzeitiger Inhibition der Liquorpleozytose mit anti-CD18 Antikörpern, hitzeinaktivierten R6-Pneumokokken, hitzeinaktivierten R6-Pneumokokken bei gleichzeitiger Inhibition der Liquorpleozytose mit anti-CD18 Antikörpern. PZW führen in Anwesenheit und Abwesenheit des leukozytären Infiltrates gleich wie die Infektion mit der *plnA*/*spxB* Mutanten zu einer signifikanten PLP-mRNA-Synthesestörung (* p < 0,05). Durch Infektion mit hitzeinaktivierten Bakterien (R6) konnten wir keine signifikante PLP-mRNA-Synthesestörung feststellen.

Ergebnisse

Kortex		PLP			Claudin-11		
18h	n =	MW	SD	SN	MW	SD	SN
D39	5	0,36	0,22	< 0,05	1,10	0,32	< 0,05
PZW	6	0,40	0,11	< 0,05	0,99	0,32	< 0,05
PZW + CD18	6	0,51	0,31	< 0,05	1,02	0,23	< 0,05
<i>plnA</i> ⁻ / <i>spxB</i> ⁻	6	0,42	0,13	< 0,05	0,90	0,31	< 0,05
R6	5	0,83	0,28	> 0,05	0,91	0,23	> 0,05
R6 + CD18	4	0,81	0,29	> 0,05	0,81	0,21	> 0,05

Hippokampus		PLP			Claudin-11		
18h	n =	MW	SD	SN	MW	SD	SN
D39	5	0,40	0,13	< 0,05	0,96	0,21	< 0,05
PZW	6	0,42	0,24	< 0,05	1,08	0,23	< 0,05
PZW + CD18	6	0,40	0,24	< 0,05	0,89	0,18	< 0,05
<i>plnA</i> ⁻ / <i>spxB</i> ⁻	6	0,37	0,22	< 0,05	0,99	0,12	< 0,05
R6	5	0,92	0,60	> 0,05	1,09	0,27	> 0,05
R6 + CD18	4	0,73	0,32	> 0,05	0,86	0,31	> 0,05

Striatum		PLP			Claudin-11		
18h	n =	MW	SD	SN	MW	SD	SN
D39	5	0,38	0,20	< 0,05	0,97	0,51	< 0,05
PZW	6	0,43	0,10	< 0,05	0,97	0,28	< 0,05
PZW + CD18	6	0,38	0,51	< 0,05	0,93	0,35	< 0,05
<i>plnA</i> ⁻ / <i>spxB</i> ⁻	6	0,37	0,10	< 0,05	1,20	0,29	< 0,05
R6	5	0,88	0,48	> 0,05	0,91	0,84	> 0,05
R6 + CD18	4	0,76	0,36	> 0,05	0,98	0,82	> 0,05

Tabelle 6: Datentabelle der semiquantitativen Real-Time-PCR-Bestimmungen der kortikalen, striatalen und hippokampalen mRNA-Synthese von PLP und Claudin-11 jeweils 18 Stunden nach der intrathekalen Injektion von D39, PZW, PZW + anti-CD18 AK, *plnA*⁻/*spxB*⁻ Pneumokokken, hitzeinaktivierter R6 oder R6 + anti-CD18 (siehe auch Abbildung 12).

3.6.2 Einfluss wirtseigener Faktoren auf die Myelinsynthese im Maushirn

Nachdem wir im vorangegangenen Kapitel die Bedeutung bakterieller Virulenzfaktoren bei der Suppression der mRNA-Synthese der Oligodendrozyten-Myelinproteine belegt haben, untersuchten wir in einem nächsten Schritt den Einfluss der wirtseigenen Immunantwort auf die Myelinsynthese.

TNF- α gilt als Schlüsselenzym in der immunologisch vermittelten Oligodendrozytenschädigung. Um eine differenzierte Betrachtung des Einflusses des

parenchymatösen und im Liquorraum gebildeten TNF- α zu erlangen, infizierten wir Versuchstiere mit D39-Wildtypbakterien. Bei 4 Versuchstieren inhibierten wir die leukozytäre Invasion in den Liquorraum mit intravenös injizierten anti-CD-18 Antikörpern. Das leukozytäre Infiltrat gilt als wesentliche Quelle von TNF- α im Liquorraum. In der zweiten Versuchsgruppe wurde der TACE- und MMP-Inhibitor GM-6001 intravenös injiziert. Die Daten unserer Arbeit haben gezeigt, dass GM 6001 die mRNA-Synthese von TNF- α im Hirnparenchym meningitiskranker Tiere vermindert.

In dieser Versuchsreihe bewirkte die Applikation von anti-CD18 Antikörpern bei den D39-Wildtyp-Meningitismäusen keine signifikante Reduktion der PLP- und MOG-mRNA-Synthesestörung im Hippokampus und Kortex (Abbildung 14). Das leukozytäre Infiltrat sowie die daraus resultierenden wirtseigenen Entzündungsmediatoren im Liquorraum sind daher keine relevanten Auslöser für die Myelinbildungsstörung.

Im Gegensatz dazu verminderte die Applikation des GM-6001 (statistisch signifikant) bei D39-Wildtyp-Meningitismäusen die Myelinsynthesestörung. Im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren war keine statistisch signifikante Myelinsynthesestörung mehr nachweisbar. Somit konnten wir zeigen, dass das parenchymatös gebildete lösliche TNF- α und Metallo matrix Proteasen während der Pneumokokkenmeningitis einen wesentlichen Einfluss auf die Myelinsynthesestörung haben.

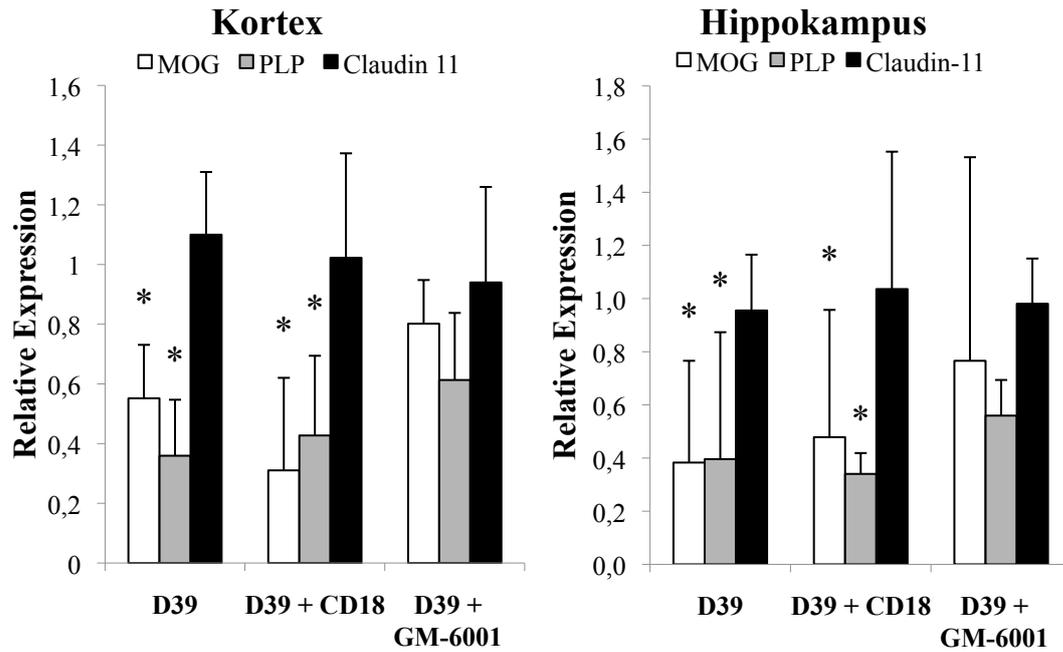


Abbildung 14: Einfluss von Wirtsfaktoren auf die Myelin-mRNA-Synthesestörung im Hirnparenchym während der Pneumokokkenmeningitis. Die graphische Darstellung zeigt die Real-Time-PCR-Ergebnisse der kortikalen und hippokampalen mRNA-Synthese von MOG, PLP und Claudin-11, jeweils 18 Stunden nach der intrathekalen Infektion der Versuchstiere mit Wildtyp-Pneumokokken (D39) allein bzw. von D39 und intravenösen anti-CD18 Antikörpern oder von D39 und intravenösen TACE- und MMPs-Inhibitor. Eine Inhibition der leukozytären Infiltration in den Liquorraum führt - wie in der unbehandelten Meningitis - zu einer signifikanten Reduktion der Myelinsynthesestörung im Kortex und im Hippokampus (* $p < 0,05$). Die Inhibition von TACE und Matrix-Metallo matrix Proteasen führt nicht zu einer signifikanten Myelinsynthesestörung, im Vergleich zu den allein mit PBS-behandelten Versuchstieren.

Kortex		PLP			Claudin-11			MOG		
18h	n=	MW	SD	SN	MW	SD	SN	MW	SD	SN
D39	5	0,36	0,22	<0,05	1,10	0,32	>0,05	0,55	0,31	<0,05
D39 + CD18	4	0,43	0,19	<0,05	1,02	0,30	>0,05	0,31	0,15	<0,05
D39 + GM-6001	5	0,61	0,07	>0,05	0,94	0,61	>0,05	0,80	0,37	>0,05

Hippokampus		PLP			Claudin-11			MOG		
18h	n=	MW	SD	SN	MW	SD	SN	MW	SD	SN
D39	5	0,40	0,13	<0,05	0,96	0,21	>0,05	0,38	0,25	<0,05
D39 + CD18	4	0,34	0,16	<0,05	1,04	0,52	>0,05	0,48	0,18	<0,05
D39 + GM-6001	5	0,56	0,15	>0,05	0,98	0,17	>0,05	0,77	0,66	>0,05

Tabelle 7: Datentabelle der semiquantitativen Real-Time-PCR-Bestimmungen der kortikalen und hippokampalen mRNA-Synthese von PLP und Claudin-11 und MOG jeweils 18 Stunden nach der intrathekalen Infektion D39 Pneumokokken, D39 Pneumokokken und Behandlung mit einem anti-CD-18 Antikörper bzw. D39 Pneumokokken und Behandlung mit dem TACE und MMP Inhibitor GM 6001 (siehe auch Abbildung 14). ist

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung

Mit Einführung der Antibiotika zur Therapie der bakteriellen Meningitis wurde eine drastische Senkung der krankheitsbezogenen Mortalität erreicht. Angesichts der hohen Raten von Defektheilungen (bis zu 50%) und der immer noch ca. 30%-igen Mortalität stehen wir weiterhin großen therapeutischen Herausforderungen gegenüber. Die Entwicklung neuer Antibiotika und die intensivmedizinische Therapie der Patienten brachten zwar eine Besserung, aber keinen Durchbruch in der Krankheitsprognose. Lange Zeit richteten sich die wissenschaftlichen Bemühungen auf die Erforschung der Entzündungsreaktion im Liquorraum. Daher ist vieles bekannt über die intrathekalen Veränderungen bei der akuten bakteriellen Meningitis. Nach der Infektion des Liquorraumes und der dortigen Vermehrung der Bakterien kommt es zunächst zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren durch ortständige meningeale Zellen, gefolgt von einer massiven Invasion von Makrophagen und Granulozyten in den Liquorraum. Es entsteht eine selbsterhaltende Entzündungskaskade. Im Liquor cerebrospinalis entstehen so innerhalb von Stunden hohe Konzentrationen von bakteriellen Virulenzfaktoren und wirtseigenen Entzündungsmediatoren aus dem leukozytären Infiltrat. Unbehandelt kommt es zur Ausbildung eines schweren Hirnödems und Steigerung des intrakraniellen Drucks, welches zum Tode des Patienten führt.

Die Arbeit mit tierexperimentellen Modellen identifizierte aber auch intraparenchymatöse Entzündungskaskaden. Diese scheinen maßgeblich für die Entstehung von Defektzuständen verantwortlich zu sein.

Zum Beispiel konnte der neuronale Zelluntergang im Hippokampus als Mechanismus zur Entwicklung von Folgeschäden im Lern- und Aufmerksamkeitsverhalten der Patienten identifiziert werden (Meli et al. 2002). Bei der neuronalen Schädigung kommt sowohl bakteriellen Faktoren (z. B. Pneumolysin) als auch Wirtsfaktoren (z. B. TNF- α und IL-1 β) eine Schlüsselrolle in der Exekution des Schadensmechanismus zu (Meli et al. 2002). Um effiziente und protektive Strategien zu entwickeln, ist es daher von besonderer Bedeutung, die intraparenchymatösen Veränderungen zu verstehen und die auslösenden Faktoren zu kennen. Bislang ist darüber kaum etwas publiziert und die Ergebnisse sind nicht einheitlich. So wurde beispielsweise im Rattenmodell eine TNF- α -Produktion nur im meningealen Infiltrat nachgewiesen, nicht jedoch im Hirnparenchym (Bitsch et al. 1997). Im Mausmodell hingegen gelang es Gliazellen als Synthesequellen zu identifizieren (Diab et al. 1997). Aufgrund der

großen Relevanz der uneinheitlichen Forschungsergebnisse über die intraparenchymatösen Veränderungen, die zum Teil sogar widersprüchlich sind und generell auch zu wenig über die Auslöser dieser Entzündungsreaktion bekannt ist, haben wir Veränderungen im Hirnparenchym bei einer Infektion des Liquorraums mit lebenden Pneumokokken untersucht. Besonderes Augenmerk richteten wir auf die hirnparenchymatöse Produktion löslicher Entzündungsmediatoren und auf die Veränderungen der Myelinsynthese als zentrales Strukturprotein des Hirngewebes.

Zur Beschreibung der Entzündungsreaktion im Hirnparenchym wurden exemplarisch die Syntheseverläufe von TNF- α und IL-1 β bestimmt. Beides sind wichtige Aktivitätsmarker der bakteriellen Meningitis. Als Parameter der Myelinsynthese und des Oligodendrozytenmetabolismus wurden die Syntheseverläufe von PLP, MOG und Claudin-11 bestimmt.

Die Arbeitshypothesen der vorliegenden Arbeit lauteten:

1. Die pathophysiologischen Veränderungen bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis sind nicht auf die Meningen und den Liquorraum beschränkt.
2. Wichtige intrathekale Schlüsselzytokine sind auch im Hirnparenchym nachweisbar.
3. TNF- α und IL-1 β werden bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis auch von Gliazellen produziert.
4. Bakterielle Komponenten triggern die intraparenchymale Entzündungsreaktion.
5. Die hirnparenchymatöse Synthese von TNF- α und IL-1 β ist in seiner Lokalisation und seinem Ausmaß bedingt durch das Krankheitsstadium der Meningitis.
6. Die Myelinsynthese ist im Verlauf der experimentellen Pneumokokkenmeningitis beeinträchtigt.
7. Verantwortliche Faktoren für die alterierte Myelinsynthese sind bakterielle Toxine, die Liquorinflammation oder die parenchymatöse Inflammationsreaktion.

4.2 Spatiotemporale Veränderungen der Synthese inflammatorischer Mediatoren und des Myelins während der Pneumokokkenmeningitis

4.2.1 Induktion der Inflammationsmediatoren TNF- α und IL-1 β im Hirnparenchym

Die zellulären Quellen und die zeitliche Dynamik der Expression von TNF- α und IL-1 β sind im Liquor cerebrospinalis gut erforscht. Hingegen sind die Erkenntnisse des Ursprungs und des Expressionsverlaufes dieser Entzündungsmediatoren im Hirnparenchym noch unvollständig und auch widersprüchlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir eine Synthese von IL-1 β und TNF- α im Hirnparenchym an Meningitis erkrankten Mäusen beobachten. Bereits 6 Stunden nach Infektion des Liquorraumes mit lebenden Pneumokokken beobachteten wir die Synthese von IL-1 β und TNF- α sowohl durch Auswertung von Gewebeschnitten mittels in situ Hybridisierung als auch in unabhängigen Versuchen durch die Real-Time-PCR. Übereinstimmend konnten wir in beiden Untersuchungsmethoden einen ausgeprägten Anstieg der mRNA-Synthese von IL-1 β und TNF- α zwischen den Zeitpunkten 12, 18 und 24 Stunden post infectionem mit lebenden Pneumokokken beobachten.

Diab und Mitarbeiter beobachteten ebenfalls eine Synthese von TNF- α und IL-1 β im Rattenhirn während der experimentellen Meningitis mit *Streptococcus pneumoniae* und mit *Haemophilus influenzae* (Diab et al. 1997). Die Induktion der Meningitis erfolgte durch intracisternale Injektion des Erregers. Zum Nachweis der aktiven Synthese von TNF- α und IL-1 β markierten sie die mRNA durch in situ Hybridisierung in Gewebeschnitten der Tiere, die 2, 8 und 18 Stunden nach der Infektion geopfert wurden. Darüber hinaus führten die Autoren immunhistochemische Färbungen durch, um die Proteinsynthese nachzuweisen. Mit Voranschreiten der Erkrankung beobachteten sie eine steigende Anzahl an TNF- α und IL-1 β positiven Zellkörpern und schlossen auf eine steigende Syntheserate im Verlauf der Krankheit zurück. Eine Quantifizierung der mRNA-Synthese und deren Verteilung im Hirnparenchym erfolgte jedoch nicht. Durch den positiven Nachweis von TNF- α und IL-1 β im Hirnparenchym bereits 8 Stunden nach Infektion der Tiere schlossen sie auf eine Produktion durch ortsständige Zellen. Sie führten jedoch keine Typisierung der Zellen durch. Außerdem beschrieben die Autoren ein unterschiedliches Synthesemuster beider Zytokine in den von *S. pneumoniae* und *H. influenzae* infizierten Tieren. Hieraus schlossen sie auf eine spezifische Reaktion des Hirnparenchyms auf die Erreger bedingt durch eine unterschiedliche Antigenität der Bakterien, jedoch ohne diese weiter zu untersuchen.

Kim und Mitarbeiter hatten nach Induktion einer Gruppe B Streptokokkenmeningitis in einem neonatalen Rattenmodell ebenfalls eine parenchymatöse Synthese von TNF- α - und IL-1 β -mRNA im Hirnparenchym feststellen können (Kim et al. 2004). In dem verwendeten Tiermodell wurde die Meningitis durch intrathekale Injektion ausgelöst. Zur Auswertung verwendeten sie die Methode der in situ Hybridisierung und führten Northernblots der TNF- α - und IL-1 β -mRNA durch. Die Autoren beschrieben in dieser Arbeit bereits 4 Stunden nach Induktion einer Meningitis eine positive Anfärbung von Zellkörpern in den Meningen. Nach 12 Stunden färbten sich auch Zellkörper im Subarachnoidalraum und im Parenchym der

meningitiskranken Tiere an. Diese positiven Zellkörper lagen unweit der Ventrikelräume. Auch sie bezeichneten diese als ortsständige Zellen, ohne eine Identifikation der Zellen durchzuführen.

Dem hingegen hatten Bitsch und Mitarbeiter im Kaninchen keine intraparenchymatösen Quellen von TNF- α bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis identifiziert (Bitsch et al. 1997). Auch sie verwendeten die *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von TNF- α -mRNA. Sie konnten jedoch nur eine intrathekale TNF- α -Produktion im leukozytären Infiltrat nachweisen. Inwieweit diese unterschiedlichen Ergebnisse auf die Verwendung differenter Tierspezies in der Untersuchung zurückzuführen sind, muss diskutiert werden.

Wir führten unsere Untersuchungen an einem *in vivo* Modell durch, weil die komplexe Interaktion der einzelnen Zellgruppen an einem *in vitro* Modell simuliert werden kann. Der Nachweis von TNF- α und IL-1 β erfolgte erstmals unter kombinierter Verwendung von den molekularbiologischen Methoden der *in situ* Hybridisierung und der Real-Time-PCR. Durch Kombination der beiden Verfahren war es möglich gleichzeitig eine zeitliche und eine räumliche Charakterisierung der Entzündungsreaktion durchzuführen. Außerdem konnten wir die Zytokinsynthese quantifizieren und durch Kombination der *in situ* Hybridisierung mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung die zellulären Synthesequellen im Hirnparenchym identifizieren.

6 Stunden nach Infektion des Liquorraums mit lebenden Pneumokokken haben wir eine gesteigerte Synthese von TNF- α und IL-1 β im Kortex und Hippokampus mit der Real-Time-PCR nachgewiesen. Mikroskopisch beobachteten wir in den hybridisierten Gewebeschnitten eine TNF- α -mRNA-Synthese in der Nachbarschaft der Liquorräume. Mit Voranschreiten der Erkrankung (12 und 18 Stunden nach Beginn der experimentellen Meningitis) war eine Ausbreitung der TNF- α -mRNA-Synthese in liquorferne Abschnitte des Hirnparenchyms in den Gewebeschnitten nachweisbar. Mittels Real-Time-PCR sahen wir 12 und 18 Stunden nach der Infektion auch eine Zunahme der Synthese von TNF- α und IL-1 β im Hippokampus, im Kortex und im Striatum der untersuchten Tiere. Nadeau und Rivest beobachteten nach der Infektion mit Zellwandbestandteilen Gram-negativer Bakterien (LPS), dass Gliazellen unweit der Liquorräume zuerst TNF- α synthetisierten (Nadeau et al. 2000). Im Verlauf breitete sich die Entzündungsreaktion in periphere Hirnregionen. Dabei führten sie jedoch keine immunhistochemische Charakterisierung der Zellen durch, sondern ordneten die Zellen entsprechend ihrer Morphologie in einer H&E-Färbung den Gliazellen zu. Mit den von uns durchgeführten immunhistochemischen Doppelfärbungen von GFAP und TNF- α konnten wir

Astrozyten und in der H&E-Färbung Zellen mit den morphologischen Charakteristika von Mikroglia in den ersten 18 Stunden als Synthesequellen von TNF- α identifizieren. Vereinzelt nach 18 Stunden, ausgeprägt jedoch noch 24 Stunden Infektionszeit, konnten wir auch Neurone als primäre Synthesequellen von TNF- α -mRNA nachweisen. Oligodendrozyten synthetisierten zu keinem Zeitpunkt TNF- α .

Der Nachweis einer neuronalen TNF- α -mRNA-Synthese führte zu einem starken Anstieg positiv markierter Zellen in den Gewebeschnitte; parallel hierzu entwickelte sich ein Anstieg der TNF- α -mRNA-Synthese gemessen durch die Real-Time-PCR. Diese Beobachtung konnten wir sowohl im Kortex als auch besonders im Hippokampus der untersuchten Tiere machen. Der Hippokampus stellt einen Ort besonderen Interesses bei der Erforschung von Folgeschäden der bakteriellen Meningitis dar, denn hier kommt es zur erhöhten Induktion neuronaler Apoptose. Im Tiermodell besteht ein Zusammenhang zwischen dem hippokampalen Neuronenuntergang und der Lernbehinderung erkrankter Tiere (Loeffler et al. 2001).

In vitro wurde die Produktion von TNF- α und IL1- β in allen ortsständigen Zellengruppen des zentralen Nervensystems nachgewiesen (Klassen et al. 2003). In vivo wurde darüber hinaus in zahlreichen Arbeiten die Produktion proinflammatorischer Mediatoren durch Astrozyten und Mikroglia festgestellt (Nadeau et al. 1999; Kim et al. 2004). Die Astrozyten und Mikroglia werden daher zu den immunologisch kompetenten Zellen des zentralen Nervensystems gezählt. Die Stimulation durch Zytokine und Bakterienbestandteile lösen in diesen Zellen eine Produktion von TNF- α und IL-1 β aus (Freyer et al. 1999; Nakagawa et al. 2004).

Die Synthese von neuronalem TNF- α konnte bisher in vivo nach globaler Ischämie und auch im Rahmen der amyotrophen Lateralsklerose beobachtet werden (Sairanen et al. 2001; Kiaei et al. 2007). Als Auslöser wurde in diesen Arbeiten ein Sauerstoffmangel bzw. die Entstehung von freien Radikalen als oxidativer Stress diskutiert. In Neuronenkulturen lösten wirtseigene Entzündungsmediatoren und oxidativer Stress eine TNF- α -Synthese aus; die Stimulation mit Bakterienkomponenten jedoch nicht. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Fehlen von Toll-Like-Rezeptoren an den Neuronen sein.

Die neuronale Synthese von TNF- α ist im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis noch nicht erforscht. Wir konnten diese jedoch in drei unabhängigen Versuchen beobachten. Weitere Unterstützung findet unsere Beobachtung in der Tatsache, dass wir zeitgleich zum Beginn der neuronalen TNF- α -mRNA-Synthese in den - mit der Real-Time-PCR untersuchten Geweben -

einen deutlichen Anstieg der TNF- α -mRNA-Synthese bei der Pneumokokkenmeningitis beobachten konnten.

Die Versuchstiere befinden sich 18 Stunden nach der Infektion in unserem Modell in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung ist von einem beginnenden Hirnödem und der Ausbildung einer globalen zerebralen Hypoxie auszugehen. Außerdem konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass es im Verlauf der Erkrankung zu hohen Syntheseraten von TNF- α kommt. Dieses stellt ebenfalls einen möglichen Stimulus zur Induktion der neuronalen TNF- α -mRNA-Synthese dar.

Eine ausführliche Untersuchung und Betrachtung von Auslösern der parenchymatösen Entzündungsreaktion im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis soll jedoch erst in späteren Abschnitten erfolgen. Zusammenfassend beobachteten wir, dass die Infektion des Liquors mit lebenden Pneumokokken zu einer ausgedehnten Entzündungsreaktion im Hirnparenchym führt. Beachtlich sind hohe Syntheseraten von IL-1 β und TNF- α im Hippokampus.

4.2.2 Suppression der Myelinproteine PLP und MOG

Mittels Real-Time-PCR konnten wir 18 und 24 Stunden nach Beginn der Pneumokokkenmeningitis eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des Proteolipid Proteins (PLP) und Myelin Oligodendrozyten Glykoproteins (MOG) im Hippokampus, im Kortex und im Striatum feststellen. Beide Proteine bilden einen spezifischen Bestandteil beim Aufbau der Myelinschicht. Mit der in situ Hybridisierung zeigte sich auf zellulärem Niveau eine reduzierte Signalstärke der Oligodendrozyten für die PLP-mRNA. Im Rahmen nicht-infektiöser, inflammatorischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems werden durch fehlgesteuerte Immunreaktionen körpereigene Epitope als fremd und potentiell schädigend bewertet. Reaktiv bilden sich Entzündungskaskaden aus, welche - entweder direkt durch Zell-Zellkontakte oder durch lösliche Mediatoren vermittelt - schädigend wirken. Die Multiple Sklerose ist hierfür ein charakteristisches und häufiges Beispiel. Proteine des zentralen Myelins (PLP, MOG, MBP) und die Oligodendrozyten selber sind primäre Ziele der ablaufenden Entzündungsreaktion (Akassoglou et al. 1998).

Während infektiös-inflammatorischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems richtet sich die Entzündungsreaktion primär gegen körperfremde und schädigende Epitope bzw. Antigene. Die Schädigung der Myelinschicht bzw. der Oligodendrozyten entsteht zum einen durch den Erreger selbst bzw. seiner Stoffwechselprodukte (Vardhini et al. 2004). Zum anderen können Fehlregulationen oder überschießende Immunreaktionen zu mediatorvermittelten Schäden des Wirtes führen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die

Waterhouse-Friedrichsen-Reaktion. Alternativ entstehen durch die Ausbildung eines Hirnödems oder einer Ischämie Schäden des Myelins und der Oligodendrozyten. María Dominguez-Punaro und Mitarbeiter konnten durch in situ Hybridisierung nach intraperitonealer Infektion von Mäusen mit *Streptococcus suis*, eine verminderte PLP-mRNA-Synthese im Corpus callosum beobachten (Dominguez-Punaro et al. 2007). Durch Gegenfärben mit Sudan Black B (SBB) stellten sie eine Demyelinisierung fest. Jorens und Mitarbeiter berichteten über vier klinische Fälle von Demyelinisierung bei der Pneumokokkenmeningitis (Jorens et al. 2008). Die Diagnose der Meningitis wurde in dieser Arbeit durch eine Liquordiagnostik gestellt. Der gewonnene Liquor war positiv für Marker einer Myelinschädigung. Im MRT dieser Patienten fanden sich über das gesamte Hirnparenchym verteilt Demyelinisierungsherde.

Der Einfluss der Pneumokokkenmeningitis auf die Oligodendrozyten ist noch wenig erforscht, obgleich die Oligodendrozyten sowohl morphologisch als auch funktionell in besonders enger Beziehung zu den Neuronen stehen und die neuronale Apoptose wesentlicher Bestandteil der Forschung zur Pathophysiologie der Erkrankung ist. Nau und Mitarbeiter berichteten über eine axonale Schädigung von Neuronen während der murinen Pneumokokkenmeningitis (Nau et al. 2004). Zu einem großen Teil wurde diese auf eine ischämische Schädigung nach der Ausbildung eines globalen Hirnödems oder vaskulärer Komplikationen zurückgeführt. Jedoch können Ischämien allein das Schädigungsmuster nicht erklären, so dass zusätzliche bzw. andere Auslöser zu diskutieren sind. Oligodendrozyten sind insbesondere durch ihre enge räumliche Beziehung zu Neuronen sowohl denselben Noxen und Zytokinen als auch metabolischem Stress ausgesetzt. Nach neuronaler Apoptose verlieren sie einen wichtigen Interaktionspartner. Deshalb untersuchten wir den Einfluss der Pneumokokkenmeningitis auf die Oligodendrozyten und die Synthese des zentralen Myelins. Wir stellten mittels Real-Time-PCR eine signifikante Reduktion der PLP- und MOG-Synthese fest. In der in situ Hybridisierung der PLP-mRNA hingegen reduzierte sich die Anzahl der PLP-synthetisierenden Zellen nicht. Deswegen schlossen wir auf eine verminderte Expression von PLP des einzelnen Oligodendrozyten im Rahmen der Meningitis. Zur weiteren Untersuchung des Stoffwechsels der Oligodendrozyten quantifizierten wir deshalb die Synthese der oligodendrozytenspezifischen Proteine Claudin-11 und des Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) mittels Real-Time-PCR. Hier zeigte sich, dass neben der PLP- auch die MOG-Synthese während der Pneumokokkenmeningitis reguliert wird. Die mRNA-Synthese von Claudin-11 blieb jedoch auf konstantem Niveau. Damit konnten wir zeigen, dass es nicht zu einer generellen Beeinträchtigung der mRNA-Synthese der

Oligodendrozyten kommt. Claudin-11 trägt als Strukturprotein wesentlich zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und des interzellulären Kontaktes der Oligodendrozyten untereinander bei (Gow et al. 1999). Sowohl PLP als auch MOG hingegen sind Funktionsproteine der Myelinschicht (Greer et al. 2002; Quarles 2002). Diese differenzierte Inhibition der mRNA-Synthese weist darauf hin, dass bei der bakteriellen Meningitis funktionelle Eigenschaften des Myelins beeinträchtigt werden, während die Myelinstruktur noch intakt ist. In Zusammenschau der Ergebnisse aus der *in situ* Hybridisierung und der spezifischen Regulation in der RT-PCR besteht keine globale, sondern eine spezifische Störung des Zellstoffwechsels.

Nau und Mitarbeiter beschrieben während der humanen und auch der experimentellen Pneumokokkenmeningitis eine Auftreibung von Axonen mit Schwellung des periaxonalen Raumes. In PLP-defizienten Mäusen kann eine periaxonale Auftreibung der Myelinschicht und der Axonmembran beobachtet werden. PLP wird daher auch eine Protektion der Axone *in vivo* zugeschrieben (Griffiths et al. 1995). Zur weiteren Charakterisierung der Myelinsynthese während der Meningitis untersuchten wir die Zeitkinetik der PLP-, MOG- und Claudin-11-mRNA-Synthese 6, 12 und 18 Stunden nach Beginn der Meningitis. Hier konnten wir feststellen, dass bereits 6 Stunden nach der Infektion der Tiere eine Depression der PLP- und MOG-mRNA-Synthese begann. Diese Entwicklung verstärkte sich zeitabhängig im Verlauf der Erkrankung kontinuierlich. Claudin-11 hingegen wurde zu keinem Zeitpunkt der Pneumokokkenmeningitis signifikant reguliert. Beachtlich war dabei die homogene Entwicklung der verminderten Expression beider myelinbildender Gene PLP und MOG. Diese bestand sowohl zeitlich innerhalb der untersuchten Hirnregionen als auch im Vergleich zwischen Kortex und Hippokampus.

Wizniewski und Mitarbeiter (Wisniewski et al. 1975) hatten im Meerschweinchen die Entwicklung eines Hirnödems bzw. eine metabolische Stresssituation der Oligodendrozyten für eine Dysmyelinisierung verantwortlich gemacht. Die Entwicklung der Synthesestörung innerhalb der ersten 6 Stunden in unserem Infektionsmodell ist hinweisend für eine spezifische Gewebereaktion, da metabolische Entgleisungen im Hirnparenchym zu diesem Zeitpunkt nicht vorhanden waren. Darüber hinaus bestand auch kein ausgeprägtes Hirnödem zu diesem Zeitpunkt. Wir stellten deshalb die Arbeitshypothese auf, dass spezifische Stimuli diese Reaktion der Oligodendrozyten triggern.

Merrill und Mitarbeiter erkannten eine spezifische Regulation des Oligodendrozytenstoffwechsels im Rahmen inflammatorischer ZNS-Erkrankungen, wie bei der Multiplen Sklerose (Merrill 1992). Sie identifizierten TNF- α als zentrales Zytokin zur

Vermittlung einer spezifischen Dysmyelinisierung. Bestätigt wurde dies in TNF- α überproduzierenden Mäusen. In diesen Tieren ist eine Demyelinisierung mit begleitender Oligodendrozytopathie zu beobachten (Akassoglou et al. 1998). Wir beobachteten 18 Stunden nach Beginn der experimentellen Pneumokokkenmeningitis eine starke Expression der TNF- α -mRNA im Hirnparenchym. Aufgrund einer Vielzahl weiterer Faktoren, die sich potentiell störend auf die Myelinsynthese auswirken können, untersuchten wir im Folgenden den Einfluss weiterer essentieller Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* sowie des parenchymatösen und intrathekalen TNF- α und auch anderer Entzündungsmediatoren aus dem Liquor cerebrospinalis auf die Myelinsynthese.

4.3 Kriterien zur Identifizierung der Ursachen der Zytokin-Induktion sowie der Myelin-Suppression

Eine Myelinschädigung ist bei Pneumokokkenmeningitiden sowohl experimentell als auch im Menschen beschrieben (Jorens et al. 2005; Dominguez-Punaro et al. 2007). Durch eine Superinfektion mit *Streptococcus pneumoniae* von Mäusen mit experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis verstärkte sich die Dysmyelinisierung (Herrmann et al. 2006). Dieses geschieht in einem TLR-2 abhängigen Mechanismus, wie an TLR-2 Knock-Out-Mäusen festgestellt werden konnte (Herrmann et al. 2006). Ebenso wurde bei Meningitiden die Induktion inflammatorischer Zytokine im Hirnparenchym beschrieben (Diab et al. 1997). Es ist jedoch nicht bekannt, welche Trigger diese Veränderungen auslösen. Ziel war es nun, den Einfluss einzelner Faktoren aus dem infektiösen Liquor auf die parenchymatöse Synthese von TNF- α bzw. IL-1 β sowie die myelinspezifischen Proteine zu untersuchen. Die besondere Relevanz der Faktoren aus dem infektiösen Liquor cerebrospinalis ergaben sich für uns aus den folgenden Gesichtspunkten: Erstens, in dem von uns verwendeten Tiermodell kommt es primär zu einer Vermehrung der Bakterien im CSF. Die im klinischen Alltag häufig vorangehende Bakteriämie tritt hier allenfalls sekundär auf. Zweitens, bereits 6 Stunden nach Infektion des Liquor cerebrospinalis konnten wir die Synthese von TNF- α und IL-1 β im Hirnparenchym nachweisen. Drittens, lichtmikroskopisch erkannten wir eine Ausbreitung der Entzündungsreaktion von liquornahen zu liquorfernen Parenchymabschnitten. Viertens, es konnte gezeigt werden, dass für Teilchen bis zu einer Größe von 30 Å (3nm) und einem Molekulargewicht von 40.000 μ mol der Austausch aus dem Subarachnoidalraum in das Hirnparenchym als frei bezeichnet werden kann (Rennels et al. 1985; Rennels et al. 1990). Somit scheint die Initiierung der Parenchymreaktion primär aus dem Liquorkompartiment zu stammen und nicht aus dem Blut.

4.3.1 Kriterien zur Auswahl der untersuchten Faktoren

Während der Entwicklung einer Pneumokokkenmeningitis entsteht eine Vielzahl von entzündlichen und toxischen Substanzen im Liquor cerebrospinalis, die eine proinflammatorische Potenz besitzen und auch zur Schädigung der Myelinsynthese führen. Diese werden zum einen vom Wirt produziert, zum anderen sind dies Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*.

Seitens der wirtseigenen Immunreaktion konnte TNF- α bereits eine Schlüsselrolle in der Initiierung der leukozytären Invasion und gleichzeitig auch in der Dysmyelinisierung bei inflammatorischen ZNS-Erkrankungen nachgewiesen werden (Akassoglou et al. 1998). Angstwurm und Mitarbeiter zeigten, dass es durch Injektion von TNF- α in den Liquor cerebrospinalis zu einer parenchymatösen Mehrdurchblutung kommt (Angstwurm et al. 1998). Besonders interessant ist an dieser Arbeit, dass durch gleichzeitige Injektion von TNF- α und Bakterienzellwänden eine verstärkte Wirkung dieses Effektes beobachtet werden konnte. Deshalb wollten wir den Einfluss von TNF- α auf die von uns gemachten Beobachtungen untersuchen.

Tuomanen und Mitarbeiter stellten darüber hinaus fest, dass dem leukozytären Infiltrat eine besonders wichtige Rolle bei der Entwicklung von tödlichen Komplikationen während der experimentellen Meningitis zukommt (Tuomanen et al. 1989). Sie erreichten eine relevante Reduktion der Komplikationen durch Inhibition der Infiltration in den Liquorraum mit einem CD18 Antikörper. Da außerdem die Konzentration von Entzündungsmediatoren im Liquorraum positiv mit der Schwere der Erkrankung und negativ mit der Prognose des Patienten korreliert, sind die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α wichtige Verlaufparameter der bakteriellen Meningitis. Wir haben deshalb den Einfluss des leukozytären Infiltrats auf die Inflammation des Hirnparenchyms und die Wirkung auf die Myelinsynthese untersucht.

Während der Pneumokokkenmeningitis kommt es in der Regel nicht zum Übertritt von Bakterien aus dem Liquorraum ins Hirnparenchym, so dass eine Induktion parenchymatöser Zytokine durch direkten Kontakt mit intakten Bakterien nicht ursächlich sein kann.

Während des Wachstums und der Autolyse sowie der Antibiotika-induzierten Lyse von Bakterien werden dem hingegen eine Vielzahl bakterieller Stoffwechselprodukte, Zellwandbestandteile und Toxine im Liquorraum freigesetzt. Diese haben die Möglichkeit aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften die Liquor-Hirn-Schranke zu überwinden (Rennels et al. 1990). Die Wirkung dieser Faktoren auf den Organismus ist Gegenstand aktueller

Forschung. Die Toxine Pneumolysin und H_2O_2 sowie die Lipoteichonsäure als Bestandteil der Zellwand sind bereits gut untersuchte bakterielle Komponenten (siehe Einleitung). Sie besitzen in vivo und in vitro entsprechend der Zielzelle konzentrationsabhängig proinflammatorische bzw. toxische Eigenschaften. Aufgrund ihrer Molekulargröße ist auch eine Diffusion aus dem paravaskulären Raum in das Hirnparenchym möglich und wahrscheinlich (Rennels et al. 1985; Rennels et al. 1990).

Die physiologische Barriere zwischen Liquor und Hirngewebe wird durch das Ependym, einem einzelligen Epithel an der Oberfläche der intraventrikulären Liquorräume, und durch die Pia mater im extraventrikulären, intrathekalen Liquorraum gebildet.

Ependymzellen leiten sich entwicklungsgeschichtlich von Gliazellen ab. Mit zunehmender Reifung werden epithelspezifische Proteine exprimiert. Der Zellverbund wird mit Ausnahme der zirkumventrikulären Organe (ZVO) durch Tight-Junctions gebildet. Im Bereich der ZVO wird der Zell-Zellkontakt durch Zonula adhärens gefestigt (Brightman et al. 1969). Fossan und Mitarbeiter beschrieben das Ependym als semipermeable Membran, welche die Diffusion von Proteinen aus dem Liquor in das Hirnparenchym einschränkt jedoch nicht verhindert (Fossan et al. 1985). Experimentell gelang es durch Bindung mannosehaltiger Glykoproteine an Lectine der Ependymzelloberfläche eine vermehrte Durchlässigkeit durch Lockerung der Zell-Zellkontakte zu erreichen (Kuchler et al. 1994). Außerdem wurden membranöse Einschlüsse in den Zellkörpern als Zeichen von Pinozytose und sekretorischer Funktion dargestellt (Gee et al. 1993). Bereits 1912 wurde von dem deutschen Anatomen Edwin Goldmann eine Verbindung zwischen dem Hirnparenchym und dem Liquorraum prognostiziert. Er hatte nach intracisternaler Injektion der Trypanblau eine Färbung des gesamten Gehirns beobachtet. In den 1980er Jahren wurde der Transport von Stoffen durch den paravaskulären Raum der hirnversorgenden Arteriolen als Eintrittspforte erkannt (Rennels et al. 1985; Rennels et al. 1990). Tracer bis zu einer Molekülgröße von $40.000 \mu\text{mol. wt. } 30 \text{ \AA}$ radius konnten vom Liquorraum in das Hirnparenchym diffundieren. Allerdings gelang es nicht, eine medikamentöse Wirkung auf das ZNS über den Liquor cerebrospinalis zu erreichen (Aird 1984).

Mit dem TACE- und MMP-Inhibitor GM 6001 hemmten wir den Übergang des membrangebundenen $\text{TNF-}\alpha$ in seine lösliche und damit wirksamere Form (Meli et al. 2004). Da wir den Einfluss wichtiger Entzündungsmediatoren aus dem Liquorraum bereits durch Inhibition der Liquorinflammation (mittels anti-CD18 Antikörper) einschätzen konnten, hatten wir auf diese Art die Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ und den MMPasen während der Pneumokokkenmeningitis zu ziehen. Ausserdem konnten wir die

Wirkung des parenchymatösen TNF- α untersuchen, da dies nach Behandlung der Versuchstiere mit GM 6001 im Parenchym nicht mehr signifikant vermindert gebildet wird. TNF- α gilt sowohl im Rahmen entzündlicher Prozesse in Geweben als auch bei der De- und Dysmyelinisierung als wichtiger Regulator (Holtmann et al. 2004).

Die Pneumokokkenmeningitis entwickelt sich meist nach Invasion der Bakterien aus dem Blut in den Liquorraum. Der Liquorinvasion von Leukozyten geht klinisch in der Regel eine Bakteriämie im Rahmen einer systemischen Infektion voraus. Lange Zeit galt das Gehirn aufgrund der Blut-Hirn-Schranke als immunologisch isoliert. Dies ist angesichts verstärkter Synthese von TNF- α und Toll-Like Rezeptoren auf eine hämatogene Infektion mit LPS kritisch zu beurteilen (Laflamme et al. 2001). Als Auslöser dieser Parenchymreaktion wird der Übertritt von LPS in das Hirnparenchym bzw. die Stimulation immunmodulatorischer Bezirke des Hypothalamus diskutiert (Rivest et al. 2000). Die Invasion von *Streptococcus pneumoniae* erfolgt nach dem aktuellen Wissensstand para- und transzellulärer. Zuerst binden sich die Bakterien an den Platelet-Activating-Factor-Receptor (PAF-R) und gelangen nach Internalisierung dieses Liganden-Rezeptoren-Komplexes in die Endothelzellen der Hirn- und Lungengefäße (Ring et al. 1998). Es kommt auch zur Apoptoseinduktion in den Endothelien (Berpohl et al. 2005) und somit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Der Nachweis transzellulärer Migration oder der Zusammenbruch der Tight-Junctions in vivo gelang jedoch bisher nicht. Während der humanen Meningitis können somit sowohl aus dem Blut als auch aus dem Liquor Faktoren in das Hirnparenchym übertreten. Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Faktoren aus dem Liquorraum in vivo zu untersuchen. Hierzu wurde eine direkte Injektion von *Streptococcus pneumoniae* in den Liquorraum durchgeführt.

4.3.2 Bedeutung ausgewählter bakterieller Virulenzfaktoren auf die parenchymatöse Zytokin- und Myelinsynthese

4.3.2.1 Bedeutung der Pneumokokkentoxine Pneumolysin und Hydrogenperoxid

Pneumolysin und H₂O₂ sind intrazelluläre Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* (Jedrzejak 2001). Zur Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis tragen sie durch ihre proinflammatorische (Tuomanen et al. 1989) und proapoptotische Wirkung auf Neurone und Endothelien des Hirnparenchyms bei (Braun et al. 2002; Berpohl et al. 2005).

Durch Induktion einer Meningitis mit Pneumolysin- und H₂O₂-defizienten Bakterienmutanten, untersuchten wir die Wirkung dieser Toxine auf die parenchymatöse

Synthese von TNF- α und IL-1 β bzw. auf die Synthese der oligodendrozytenspezifischen Proteine PLP, und Claudin-11 während der murinen Pneumokokkenmeningitis.

In der lichtmikroskopischen Auswertung der in situ Hybridisierungen von TNF- α und PLP konnten wir nach der Infektion mit den Pneumolysin- und H₂O₂-defizienten Bakterienmutanten - im Gegensatz zur Infektion mit dem Wildtyp D39-infizierten Tieren - keine signifikante Änderung der räumlichen oder zeitlichen Expression von TNF- α -mRNA oder der Expression von PLP-mRNA feststellen.

Schließlich haben wir quantitative Unterschiede in der TNF- α - und IL-1 β -Synthese sowie der PLP- und Claudin-11-mRNA-Synthese im Hirnparenchym mittels Real-Time-PCR untersucht. Dabei zeigte sich im Kortex und Hippokampus, bei den mit den Pneumolysin- und H₂O₂-defizienten Bakterienmutanten (im Gegensatz zur Infektion mit dem Wildtyp D39-infizierten Tieren) eine geringe (nicht signifikante) Reduktion der TNF- α -mRNA-Synthese. Im Striatum war diese leicht (nicht signifikant) vermehrt. Die Synthese von IL-1 β war im Kortex und Striatum leicht reduziert und im Hippokampus leicht erhöht. Dies weist darauf hin, dass Pneumolysin und Wasserstoffperoxid in vivo nicht zu einer signifikanten Regulation der parenchymatösen Synthese von TNF- α - und IL-1 β -mRNA beitragen.

Die PLP-mRNA-Synthese der mit den Pneumolysin- und H₂O₂-defizienten Bakterienmutanten infizierten Tiere war (im Gegensatz zur Infektion mit dem Wildtyp D39) weniger beeinträchtigt. Statistisch war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Somit tragen Pneumolysin und Wasserstoffperoxid in vivo nicht zu einer signifikanten Regulation der parenchymatösen Synthese von PLP-mRNA bei.

Die proinflammatorische Wirkung von Pneumolysin wird durch die Ausschüttung von TNF- α nach der Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen über den Toll-Like-Rezeptor 4 vermittelt (Malley et al. 2003). Toll-Like-Rezeptoren spielen eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung des Immunsystems durch Pathogene. Toll-Like-Rezeptoren werden im Gehirn insbesondere von Mikrogliazellen und Astrozyten, in geringerem Ausmaß auch von Oligodendrozyten, exprimiert (Bsibsi et al. 2002). Toll-Like-Rezeptoren 4 werden jedoch nur von den Mikrogliazellen präsentiert (Lehnardt et al. 2002). Die proinflammatorische Wirkung von Pneumolysin im Liquor cerebrospinalis konnte in vielen Studien belegt werden (Cockeran et al. 2001). Pneumolysin hat in unseren Untersuchungen allerdings keinen Einfluss auf die parenchymatöse mRNA-Synthese von TNF- α und IL-1 β . Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die verbleibenden proinflammatorischen Faktoren der Pneumolysin-defizienten Pneumokokken das Fehlen des proinflammatorischen Pneumolysins ausgleichen

bzw. ersetzen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass eine Infektion mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken auch nicht zu einer reduzierten Liquorinflammation führt (Hirst et al. 2002). Dies könnte zudem durch eine - verglichen mit den Bakterienzellwandbestandteilen - geringere proinflammatorische Potenz von Pneumolysin mitbegründet sein (Bsibsi et al. 2002). Neben der proinflammatorischen Wirkung besitzt Pneumolysin auch eine direkt toxische Wirkung. Pneumolysin induziert Poren in der Zellmembran als sog. „pore forming protein“ (Hirst et al. 2002). Diese Poren bewirken einen Einstrom von Ca^{2+} und führen zur Depolarisierung der Zelle (Stringaris et al. 2002). Eine Depolarisierung der Oligodendrozytenmembran in Verbindung mit erhöhten $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen verursacht in vivo eine Dysmyelinisierung durch verminderte Phosphorylierung intrazellulärer Botenstoffe (Soliven et al. 1994). Dies kann eine mögliche Erklärung für die - im Vergleich zu den mit Wildtyp-Pneumokokken infizierten Tieren - geringere Störung der PLP-Synthese in den mit den Pneumolysin-defizienten Pneumokokken infizierten Tieren sein. Ein Nachweis dieser Hypothese bleibt jedoch offen. Oligodendrozyten sind außerdem empfindlich gegenüber oxidativem Stress wie durch Wasserstoffperoxid.

4.3.2.2 Bedeutung der Pneumokokkenzellwandfragmente

Aufgereinigte Zellwandfragmente von *Streptococcus pneumoniae* führen nach intrathekaler Injektion ebenso wie die Infektion mit lebenden Bakterien zu einer Inflammationsreaktion im Liquorraum (Tuomanen et al. 1985). Die proinflammatorische Wirkung der Zellwandfragmente beruht wesentlich auf der Lipoteichonsäure (LTS) und den Peptidoglykanen aus den Zellwänden. Diese binden die an die Toll-Like-Rezeptoren 2 der meningealen Makrophagen und der Ependymzellen und induzieren die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ (Koedel et al. 2003).

Wir haben in unseren Experimenten Amidase-verdaute und LPS-aufgereinigte Zellwandfragmente in den Liquorraum injiziert, um eine Meningitis auszulösen. Die enzymatische Amidasebehandlung führt zur Bildung isolierter LTS-enthaltender Zellwandfragmente. Diese entstehen auch während der Autolyse der Bakterien. Aufgrund ihrer Molekülgröße und den weiteren chemischen Eigenschaften können sie die Blut-Liquor-Schranke entlang des osmotischen Gradienten durch Diffusion passieren. Wir beobachteten mittels in situ Hybridisierung in den Versuchstieren nach der Instillation von Pneumokokkenzellwandfragmenten das gleiche Verteilungsmusters $\text{TNF-}\alpha$ positiver Zellen wie nach der Infektion mit lebenden Pneumokokken.

Nach der intrathekalen Instillation von LTS-enhaltenden Zellwandfragmenten beobachteten wir im Kortex und Hippokampus eine deutliche Induktion der TNF- α - und IL-1 β -Synthese. Diese durch Pneumokokkenzellwandfragmente induzierte Synthesesteigerung der Zytokinsynthese betrug im Kortex und Striatum 80 - 90% und im Hippokampus 70% der durch lebende Pneumokokken induzierten Synthesesteigerung. Die Pneumokokkenzellwände scheinen somit eine Schlüsselrolle in der Initiierung der parenchymatösen Zytokinproduktion von TNF- α und IL-1 β einzunehmen.

Bereits in vitro konnte gezeigt werden, dass nach der Stimulation mit aufgereinigten Pneumokokkenzellwandfragmenten Astrozyten, Mikroglia und zerebrale Endothelzellen TNF- α und IL-1 β bilden. Hierfür wurde ein TLR-2 abhängiger Prozess beschrieben (Freyer et al. 1999; Schumann et al. 1998). Im Hirnparenchym werden TLR-2 Rezeptoren von Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikrogliazellen exprimiert (Aloisi 2001; Bsibsi et al. 2002; Bowman et al. 2003). Das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) kann nach Bindung an LTA zur Verstärkung dieses Effektes führen (Weber et al. 2003).

Durch die Inhibition der leukozytären Infiltration nach erfolgter Instillation der PZW in den Liquorraum konnten wir zeigen, dass die leukozytäre Liquorpleozytose zur Auslösung der parenchymatösen Inflammation nicht notwendig ist. Durch Infektion mit den hitzeinaktivierten Bakterien hatten wir hingegen feststellen können, dass die Stoffwechselprodukte der Pneumokokken wesentlich zur Initiierung der hirnparenchymatösen Induktion der Synthese von TNF- α und IL-1 β sind. Wir schlossen deshalb auf eine Diffusion von bakteriellen Zellwandbestandteilen aus dem Liquorraum in das Hirnparenchym. Gestützt wird diese Hypothese durch den Beginn der entzündlichen Veränderungen in der Nachbarschaft der Liquorräume. Astrozyten und Mikroglia - die primären zellulären Quellen der TNF α -Synthese im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis - besitzen TLR-Rezeptoren zur Bindung von Pneumokokkenzellwandfragmenten. Das Molekulargewicht der Zellwandfragmente (mw 7-10.000) erlaubt eine Diffusion bzw. den Transport über die Liquor-Hirn-Schranke (Blewett et al. 2004; Kim et al. 2005).

In vivo kann durch intraparenchymatöse Injektion von LPS die Synthese von TNF- α und IL-1 β durch Mikroglia und Astrozyten ausgelöst werden (Rankine et al. 2006).

Die Injektion von PZW in den Liquorraum führt sowohl in An- und Abwesenheit des leukozytären Infiltrats zu einer signifikanten Verminderung der PLP-Synthese. Bei der Untersuchung der Myelinsynthese haben wir die Reduktion der PLP-mRNA-Synthese bei der durch lebende Pneumokokken induzierten Meningitis mit der durch Pneumokokkenzellwände

induzierten Meningitis verglichen. Die Reduktion der PLP-mRNA-Synthese bei der PZW-Meningitis (in Abwesenheit oder Anwesenheit der Liquorpleozytose) führte im Kortex, Striatum und im Hippokampus zu einer Synthesestörung, die jeweils nur um ca. 10 - 20% schwächer ausgeprägt war als bei der Pneumokokkenmeningitis.

Somit konnten wir in der murinen Pneumokokkenmeningitis bakterielle Zellwandbestandteile als wesentlichen Schlüsselfaktor zur Induktion einer Myelinsynthesestörung *in vivo* identifizieren. Sicher bleibt jedoch zu diskutieren, inwiefern dieser Mechanismus durch eine direkte Interaktion mit den Oligodendrozyten selbst entsteht oder ob die PLP-Synthesestörung auf die Produktion der proinflammatorischen Mediatoren (wie beispielsweise dem TNF- α) zurückzuführen ist. Akassoglou und Mitarbeiter (Akassoglou et al. 1998) zeigten, dass es in TNF- α überproduzierenden Mäusen spontan zu einer Dysmyelinisierung kommt.

In vitro gibt es bisher keine Untersuchung über die Wirkung der Pneumokokkenzellwandfragmente auf die Oligodendrozyten. In Anlehnung an diese Experimente gibt es jedoch Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von Zellwandbestandteilen Gram-negativer Bakterien, dem LPS, auf die Oligodendrozyten. Hier wurde eine toxische Wirkung mit verminderter Myelinsynthese in Mischkulturen mit Mikroglia nachgewiesen (Lehnardt et al. 2002). Der Prozess war abhängig von TLR-4-Rezeptoren und der TNF- α -Bildung durch die Mikrogliazellen.

4.3.2.3 Die Wirkung von stoffwechsellinaktiven Pneumokokken auf das Hirnparenchym

Durch Hitzebehandlung von R6 *Streptococcus pneumoniae* wird der Bakterienmetabolismus zerstört. Die Infektion mit diesen Bakterien führt - gleich der Infektion mit lebenden Bakterien - zur leukozytären Inflammation des Liquorraums (Tuomanen et al. 1985). Aufgrund der fehlenden Autolyse werden keine bakteriellen Stoffwechselprodukte und allenfalls geringe Mengen an Zellwandfragmenten in den Liquor cerebrospinalis freigesetzt. Durch eine kombinierte pharmakologische Blockade der leukozytären Inflammation mit dem CD-18 Antikörper Game-46 hatten wir die Möglichkeit, den Einfluss der hitzeinaktivierten Bakterien auf das Hirnparenchym isoliert zu untersuchen. Außerdem gelang es uns auf diesem Wege, indirekt auch den Einfluss des leukozytären Infiltrats auf das Hirnparenchym zu untersuchen.

Nach intrathekalen Injektionen hitzeinaktivierter Pneumokokken beobachteten wir in Anwesenheit des leukozytären Infiltrats eine signifikante Induktion der Synthese von IL-1 β und TNF- α im Kortex, Striatum und im Hippokampus. Die Synthese betrug jedoch lediglich

etwa 10% - 25% verglichen mit der Induktion dieser Zytokine durch die lebenden Pneumokokken. Wir hatten bereits festgestellt, dass aufgereinigte bakterielle Zellwandbestandteile eine hohe Potenz zur Initiierung einer Entzündungsreaktion im Hirnparenchym besitzen. Entsprechendes gilt jedoch nicht für das hitzeinaktivierte Bakterium. Eine Erklärung hierfür könnte zum einen sein, dass die intakten Bakterien in vivo nicht in den Interstitialraum des Hirnparenchyms übertreten. Darüber hinaus konnte in vitro gezeigt werden, dass intakte Staphylokokken im Vergleich zu isolierten Zellwandbestandteilen keine wesentliche Synthese von TNF- α und IL-1 β in Mikroglia auslösen. Die fehlende Bindungsfähigkeit des intakten Bakteriums an die TLR-2 scheint für diesen Effekt verantwortlich zu sein (Kielian et al. 2005).

Bei der durch die hitzeninaktivierten R6 Pneumokokken induzierten Meningitis beobachteten wir in Anwesenheit des leukozytären Infiltrats eine stärkere Synthese von TNF- α und IL-1 β im Vergleich zur Synthese in den Versuchstieren unter Abwesenheit des leukozytären Infiltrats. Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant. Dies weist darauf hin, dass das leukozytäre Infiltrat nur eine sehr geringe Potenz zur parenchymatösen Induktion von IL-1 β und TNF- α besitzt. Welche Faktoren hier jedoch zur Induktion führen bleibt zu diskutieren.

Die Infektion mit den hitzeinaktivierten Pneumokokken führte in Abwesenheit des leukozytären Infiltrats nicht zu einer signifikanten Reduktion der Synthese der PLP- oder Claudin-11-mRNA im Hirnparenchym. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das intakte Bakterium nicht über die Liquor-Hirn-Schranke in das Hirnparenchym diffundiert. Eine weitere Ursache könnte auch sein, dass die intakten Bakterien eine wesentlich schwächere Potenz in der Entzündungsaktivierung besitzen als die Zellwandfragmente.

Durch die Blockade der leukozytären Infiltration stellten wir eine leicht stärkere Syntheseminderung von PLP im Hippokampus und im Striatum der Versuchstiere fest. Diese war statistisch jedoch nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das leukozytäre Infiltrat durch Phagozytose die Menge der Antigene aus dem Liquor reduziert.

Die Tatsache, dass eine Infektion mit hitzeinaktivierten Pneumokokken zu einer signifikanten Induktion der TNF- α -mRNA-Synthese führt, jedoch nicht zu einer signifikanten PLP-Synthesestörung, weist darauf hin, dass neben TNF- α weitere Faktoren zur Induktion einer PLP-Synthesestörung notwendig sind.

Wir konnten bereits zeigen, dass die intrathekale Injektion von LTS-enthaltenden Zellwandfragmenten (bei gleichzeitiger Inhibition der Liquorleukozytose) eine signifikante

Myelinsynthesestörung induziert. LTS-enhaltende Zellwandfragmente scheinen in einem TNF- α -abhängigen Prozess im Hirnparenchym diese Myelinsynthesestörung zu induzieren. Die genauen Mechanismen müssen jedoch sicher weiter erforscht werden.

4.3.3 Bedeutung der wirtseigenen Entzündungsmediatoren auf die parenchymatöse Zytokin- und Myelinsynthese

Im Folgenden untersuchten wir den Einfluss der wirtseigenen Immunantwort auf die Auslösung einer Inflammationsreaktion im Hirnparenchym bzw. die Störung der Myelinsynthese. Hierzu führten wir eine pharmakologische Inhibition der leukozytären Invasion in den Liquorraum und eine Hemmung der Sekretion von TNF- α im interstitiellen Raum durch.

4.3.3.1 Bedeutung der Liquorpleozytose

Die Meningitis ist definiert als Entzündung der Hirnhäute. Bakterielle Meningitiden gehen mit einer massiven Invasion von Entzündungszellen in den Liquorraum einher. Klinisch wird die Diagnose daher durch eine Punktion des Liquor cerebrospinalis und eine Auszählung der enthaltenen Leukozyten und dem Nachweis von Bakterien diagnostiziert. Das leukozytäre Infiltrat produziert in diesem Kompartiment große Mengen an proinflammatorischen Mediatoren. Die Konzentration dieser Mediatoren im Liquorraum, insbesondere von IL-1 β und TNF- α , können zur Beurteilung des Schweregrades und der Prognose der Erkrankung herangezogen werden, jedoch ist die prognostische Wertigkeit der Liquorpleozytose bei der bakteriellen Meningitis nicht eindeutig geklärt. Das leukozytäre Infiltrat ist maßgeblich für die Entwicklung von schweren Komplikationen im Verlauf der Erkrankung beteiligt (Tuomanen et al. 1989). Die Zellzahl im Liquor korreliert jedoch nicht mit dem Schweregrad und der Prognose der Meningitis.

TNF- α gilt als Auslöser der Invasion in den Liquorraum; in TNF- α -überproduzierenden Mäusen konnte eine Leukozytose im Liquorraum festgestellt werden (Akassoglou et al. 1998). Die Pleozytose wird wahrscheinlich durch TNF- α -Bildung der meningealen Makrophagen und den Ependymzellen initiiert (Kim et al. 2004). TNF- α im Liquor cerebrospinalis induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen, z. B. ICAM-1, auf der Oberfläche der Endothelien und führt sukzessive zur Invasion von Leukozyten (Freyer et al. 1999). Diese Immigration wird durch den CD-18-Rezeptor der Leukozyten vermittelt (Tuomanen et al. 1989). Durch intravenöse Injektion eines anti-CD-18-Antikörpers blockierten wir die Invasion der Leukozyten in den Liquorraum. Zur Kontrolle einer

erfolgreichen Inhibition wurden die Zellzahlen im Liquor der Versuchstiere ausgezählt. Dies bestätigte uns in jedem Fall eine erfolgreiche Inhibition der leukozytären Invasion.

Wir untersuchten den Einfluss der Leukozyten auf die parenchymatöse Entzündungsreaktion sowie auf die Myelinsynthesestörung bei der murinen Pneumokokkenmeningitis. Hierzu quantifizierten wir die Synthese von TNF- α und IL-1 β sowie von Claudin-11 und PLP im Kortex und Hippokampus der mit dem anti-CD-18 Antikörper GAME-46 behandelten Tiere. Diese Ergebnisse verglichen wir mit der Synthese in den unbehandelten meningitiskranken Versuchstieren. Dabei stellten wir - in Abwesenheit der Leukozyten - weder im Kortex noch im Hippokampus einen relevanten Unterschied in der Synthesestörung von TNF- α - und IL-1 β -mRNA fest.

Das leukozytäre Infiltrat und die von ihm gebildeten Entzündungsmediatoren aus dem Liquor in vivo nehmen somit keinen relevanten Einfluss auf die Entzündungsreaktion des Hirnparenchyms. Ähnliches beobachteten auch Rooney und Mitarbeiter (Rooney et al. 1995), die eine zweizeitige Infektion des Liquor cerebrospinalis mit LPS durchführten. Vor der zweiten Infektion blockierten sie die leukozytäre Invasion medikamentös durch eine intravenöse Kortikosteroidgabe. Mittels quantifizierender RT-PCR bestimmten sie die parenchymatöse TNF- α -mRNA-Synthese in An- und Abwesenheit der Leukozyten. Sie stellten keinen Unterschied in der Synthese von TNF- α fest. Hierin könnte eine Ursache für die fehlende Neuroprotektion von Kortikosteroiden im Rahmen von Meningitiden liegen (Zysk et al. 1996).

In Anbetracht der Ergebnisse aus den vorangehenden Kapiteln können wir konstatieren, dass die Infektion mit lebenden Pneumokokken und die intrathekale Installation aufgereinigter Zellwandfragmente gleichermaßen zur Induktion einer Entzündungsreaktion im Hirngewebe führt. Diese ist auch nach Inhibition der Liquorpleozytose nicht signifikant verändert. Die Infektion mit den Pneumolysin- oder H₂O₂-defizienten Pneumokokkenmutanten hatte nur geringen Einfluss auf das Ausmaß der Entzündungsreaktion. Die Infektion des Liquorraums mit stoffwechsellinaktiven Bakterien hingegen führt trotz unveränderter Liquorpleozytose zu einer deutlich verminderten hirnparenchymatösen Entzündungsreaktion. Daher muss konstatiert werden, dass die zellwandgebundenen Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* und nicht die im Liquorraum gelösten Entzündungsmediatoren oder das leukozytäre Infiltrat entscheidend für die Initiierung und den Erhalt der parenchymatösen Entzündungsreaktion sind. Klinisch findet diese Beobachtung möglicherweise seine Korrespondenz in den gelegentlich zu beobachtenden paradoxen Reaktionen einer

Verschlechterung der Symptome nach Antibiotikagabe und dem protektiven Effekt bakteriostatischer Antibiotika, verglichen mit den bakterioziden Antibiotika (Bottcher et al. 2004) in der Behandlung bakterieller Meningitiden.

Durch die Blockade der leukozytären Invasion veränderte sich 18 Stunden nach Beginn der Meningitis weder im Kortex noch im Hippokampus meningitiskranker Tiere die mRNA-Synthese von PLP, MOG oder Claudin-11 signifikant, im Vergleich zu unbehandelten Meningitistieren. Hier stellten wir im Hippokampus und Kortex - wie in den unbehandelten meningitiskranken Mäusen - eine Verminderung der PLP-, MOG-mRNA-Synthese fest. Vergleichbare Experimente sind in der Literatur bislang nicht beschrieben. Entsprechend unserer Ergebnisse ist die Myelinsynthesestörung wesentlich durch die bakteriellen Virulenzfaktoren der Zellwand induziert. Gleichzeitig ist eine lokale Synthese proinflammatorischer Mediatoren Voraussetzung. Um die Bedeutung der parenchymatösen Entzündungsreaktion, insbesondere die Bedeutung von TNF- α (Holtmann et al. 2002) zu untersuchen, führten wir Versuche mit einem kombinierten TACE- und MMP-Inhibitor durch.

4.3.3.2 Bedeutung des TNF- α Converting Enzyme und der Metallo matrix Proteasen (MMP)

Durch Behandlung der Versuchstiere mit GM 6001 untersuchten wir die Wirkung von löslichem TNF- α und der MMP auf die parenchymatöse Entzündungsreaktion.

TACE-Inhibitoren verhindern die enzymatische Spaltung der membrangebundenen TNF- α Vorform in seine lösliche Form durch das TNF- α Converting Enzyme. Gelöstes TNF- α ist stärker wirksam in Bezug auf die Initiierung einer Entzündungsreaktion und Chemotaxis sowie die Induktion von Zelltod (Holtmann et al. 2004). Metallo matrix Proteasen lösen eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse aus. In der bakteriellen Meningitis führen sie zur Störungen in der Blut-Hirn-Schranke (Paul et al. 1998) außerdem zur direkten Hirnschädigung (Leib et al. 2000).

Den Versuchstieren wurde nach Induktion einer Meningitis intravenös der TACE-Inhibitor GM 6001 injiziert. Bis zur Opferung der Versuchstiere wurde auf diese Weise die Umwandlung in die lösliche Form des TNF- α blockiert. Dadurch erreichten wir eine globale Reduktion der TNF- α -Konzentration im Hirnparenchym. In den TACE-behandelten Tieren kam es zu einer signifikant verminderten Synthese der TNF- α -mRNA, verglichen mit den unbehandelten meningitiskranken Versuchstieren. Wir konnten dabei in allen untersuchten Hirnregionen einen Anstieg der Synthese von IL-1 β beobachten. Ähnliche Beobachtungen

machten auch Probert und Mitarbeiter (Probert et al. 2000). Sie entdeckten sogenannte autokrine Syntheseloops von TNF- α . Dies beschreibt die Fähigkeit, die eigene Synthese zu induzieren und zu verstärken. Die Aufgabe solcher Syntheseloops ist wahrscheinlich eine beginnende Entzündungsreaktion schnell voranzutreiben (Probert et al. 1997). Die systemische Infektion von Mäusen mit LPS führte ebenfalls zu einer Induktion von TNF- α im Hirnparenchym. Ähnliche Beobachtungen, im Sinne der selbstinduzierten Synthese von TNF- α im Hirnparenchym, wurden auch nach der systemischen Infektion mit LPS beschrieben (Nadeau et al. 2000).

Oligodendrozyten exprimieren in vivo TNF- α -1- und TNF- α -2-Rezeptoren. In Oligodendrozytenkulturen führt lösliches TNF- α zu einer verminderten Synthese von myelinassoziierten Proteinen, hochdosiert auch zu einer Schädigung der Zellintegrität (Raine 1997). In Experimenten mit transgenen Mäusen konnte eine Störung der Myelinsynthese durch Überproduktion von TNF- α beobachtet werden. Bei differenzierter Betrachtung der Wirkungsweise konnte in vivo dem TNF- α -1-Rezeptor eine tragende Rolle in der Auslösung von Demyelinisierung zugeschrieben werden. Der TNF- α -2-Rezeptor hingegen scheint wesentlich für die Remyelinisierung verantwortlich zu sein (Probert et al. 2000).

GM 6001 bewirkte in unseren Experimenten eine signifikante Verminderung der TNF- α -mRNA-Synthese, sowie eine signifikante Reduktion der PLP-Synthesestörung, im Vergleich zu unbehandelten Meningitistieren. TNF- α und/oder die MMPsen besitzen somit bei der Pneumokokkenmeningitis eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Myelinsynthesestörung. Darüber hinaus existieren weitere Mechanismen, die eine Störung der Myelinsynthese in vivo auslösen, da trotz TACE- und MMP-Inhibition eine Myelinsynthesestörung zu beobachten war. Soliven und Mitarbeiter (Soliven et al. 1994) beschrieben in vivo einen kombinierten Mechanismus, der zur Demyelinisierung führt. Sie mutmaßten neben dem mikroglären TNF- α einen weiteren die Oligodendrozytenmembran depolarisierenden Faktor. Wir konnten durch die Infektion mit den hitzeinaktivierten Pneumokokken auch beobachten, dass die alleinige Induktion einer TNF- α -mRNA-Synthese im Hirnparenchym nicht zu einer PLP-Synthesestörung führt. Während der Pneumokokkenmeningitis könnte hier zum einen das Pneumolysin diskutiert werden. Durch den Einbau von Poren in die Oligodendrozytenmembran ist ein Ca^{2+} -Einstrom und damit eine Depolarisierung der Zelle zu erwarten. Wir beobachteten eine geringere PLP-Synthesestörung durch die Meningitisinduktion mit *plnA*/*spxB*-Bakterienmutanten. Als wichtigen weiteren Faktor zur Induktion einer TNF- α -induzierten PLP-Synthesestörung müssen jedoch auch die

Pneumokokkenzellwandfragmente diskutiert werden. Wir beobachteten eine ausgeprägte Niederregulation der PLP-Synthese auf die Infektion mit LTS-enhaltenden Zellwandfragmenten. Diese können sich über TLR-2-Rezeptoren auch direkt an die Oligodendrozyten binden (Malley et al. 2003). In vitro gibt es bisher keine veröffentlichten Untersuchungen zur Interaktion von LTS-enhaltenden Zellwandfragmenten in Oligodendrozytenkulturen. In anderen Zellkulturen führt die Bindung an die TLR-2-Rezeptoren zur Modellierung der Transkription in den Effektorzellen.

Zusammenfassend scheint somit die Myelinsynthesestörung multifaktoriell durch mehrere bakterielle Faktoren induziert zu sein. Aufgereinigte Zellwandfragmente besitzen dabei aber eine hohe Potenz zur Induktion einer PLP-Synthesestörung.

4.4 Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse

Die bakterielle Meningitis ist mit einer hohen Letalität assoziiert und ein großer Anteil der Patienten entwickelt neurologische Spät komplikationen. Tuomanen und Mitarbeiter konnten in ihren Inhibitionsversuchen zeigen, dass die massive Liquorpleozytose an der Ausbildung eines Hirnödems mit häufig letaler Folge entscheidend beteiligt ist. Insbesondere für die Entwicklung von Spät komplikationen werden aber auch hirnparenchymatöse Entzündungskaskaden verantwortlich gemacht. Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass nicht das leukozytäre Infiltrat im Liquorraum und die dort gebildeten Faktoren maßgeblich an der Ausbildung dieser hirnparenchymatösen Entzündungskaskaden mitwirken, sondern die bakteriellen Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*.

Der Syntheseverlauf der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im Hirnparenchym stellt sich als Ergebnis unserer Untersuchungen wie folgt dar:

Durch die Entwicklung einer Meningitis mit *Streptococcus pneumoniae* kommt es zur Freisetzung von Virulenzfaktoren (wie dem Pneumolysin, H₂O₂ und den Zellwandfragmenten) in den Liquor cerebrospinalis. Diese werden von ortsständigen Zellen (z. B. meningealen Makrophagen und Ependymzellen) erkannt und triggern dort die Synthese proinflammatorischer Zytokine. Hierauf beginnt die Invasion von Leukozyten und es entsteht ein leukozytäres Infiltrat im Liquorraum. Im Liquor cerebrospinalis steigt die Konzentration der Pneumokokkenfaktoren durch weiteres Wachstum und Autolyse. Gleichzeitig produziert das leukozytäre Infiltrat zunehmend lösliche proinflammatorische Mediatoren.

Im Hirnparenchym kommt es sechs Stunden nach Infektion des Liquorraums zur Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β . Dies beginnt vorerst in der Nähe der Liquorräume und breitet sich dann über das Hirnparenchym aus. Die intraparenchymatöse

mRNA-Synthese proinflammatorischer Zytokine verläuft unabhängig von der Liquorpleozytose, was die Inhibitionsexperimente der Liquorpleozytose mittels anti-CD18 Antikörpern gezeigt haben.

Die Pneumokokkenzellwandfragmente (PZW) könnten einerseits sog. Grenzzennglia binden und somit eine Inflammationsreaktion des Parenchyms auslösen. Wahrscheinlicher scheint uns jedoch eine Diffusion, entweder frei oder über Transporter. Auch andere Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* (wie das Pneumolysin) konnten nach Bindung an hippokampale Neurone im Hirnparenchym nachgewiesen werden (Braun et al., 2002).

Den Nachweis von LTS-enthaltenden Zellwandfragmenten im Hirnparenchym haben wir nicht geführt. Die Synthese von TNF- α beginnt jedoch in den liquornahen Hirnregionen durch Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia). Mit Voranschreiten der Erkrankung kommt es auch zur Ausbreitung in liquorferne Hirnareale. Dies könnte durch Diffusionsprozesse bedingt sein. Im Endstadium der Erkrankung beobachteten wir auch eine TNF- α -mRNA-Synthese durch Neurone. Neurone exprimieren keine Toll-Like-Rezeptoren und sind zur Bindung von LTS nicht fähig. Neurone sind jedoch in der Lage, TNF- α zu bilden, was bei der Ischämie gezeigt wurde. In den fortgeschrittenen Stadien der Meningitis entsteht ein generalisiertes Hirnödem, das die zerebrale Sauerstoffversorgung beeinträchtigt und möglicherweise dadurch die Induktion von TNF- α auch in Neuronen bewirken kann.

Eine De- bzw Demyelinisierung ist klinisch und experimentell eine schwere Komplikation der Pneumokokkenmeningitis. Bekannte Ursachen, die zur fokalen Demyelinisierung führen, sind nekrotisierende Vaskulitiden, Thrombembolien und die septische kortikale Thrombophlebitis. In dieser Arbeit fanden wir heraus, dass die Infektion des Liquors mit *Streptococcus pneumoniae* auch tierexperimentell regelhaft zu einer Myelinsynthesestörung führt.

Die Infektion des Liquor cerebrospinalis mit lebenden Pneumokokken bewirkt eine Störung der PLP- und MOG-mRNA-Synthese. Diese beginnt bereits 6 Stunden nach Infektion der Versuchstiere und entwickelt sich bis zum terminalen Stadium der Erkrankung fort. Dieser Prozess scheint TNF- α und MMP abhängig zu sein, da nach Behandlung der Pneumokokkenmeningitis mit einem TACE- und MMP-Inhibitor keine signifikante Störung der Myelinsynthese mehr festzustellen war, obwohl in diesen Tieren Interleukin-1 β vermehrt produziert wird. Neben dem TNF- α scheint jedoch auch noch ein weiterer Faktor für die Niederregulation der PLP-mRNA-Synthese notwendig, denn die Induktion einer Meningitis mit hitzeinaktivierten Pneumokokken führt zwar zu einer signifikanten TNF- α -mRNA-

Synthese, nicht jedoch zur Reduktion der PLP-mRNA-Synthese. Hingegen zeigt die Infektion der Versuchstiere mit PZW ebenfalls eine signifikante Herabregulation der Myelinsynthese. Inwieweit eine direkte Interaktion zwischen Oligodendrozyten und PZW, beispielsweise durch TLR-2-Rezeptoren, vermittelt wird, ist Gegenstand zukünftiger Forschung.

Resümierend kann aus dieser Arbeit geschlossen werden, dass sich während der murinen Pneumokokkenmeningitis eine Inflammationsreaktion im Hirnparenchym entwickelt. Diese wird entscheidend durch bakterielle Virulenzfaktoren aus dem Liquorraum initiiert und führt zur Störung der ortsständigen Hirnzellen, wie am Beispiel der Oligodendrozyten gezeigt werden konnte.

4.5 Klinische Relevanz

Trotz der Fortschritte in der Antibiotikatherapie und der intensivmedizinischen Betreuung heilt die Pneumokokkenmeningitis in bis zu 50% der Fälle mit neurologischen Defektzuständen aus. An der Entwicklung dieser Folgeschäden haben parenchymatöse Entzündungskaskaden wesentlichen Anteil. Obgleich neue Therapiekonzepte wie die Kortikosteroidgabe bereits diese Tatsachen berücksichtigen, werfen sie auch neue Fragen auf. Warum führt eine Kortikoidtherapie beispielsweise zu einer Verbesserung des Gesamtoutcomes jedoch nicht zu einer Neuroprotektion? Warum beobachten wir eine vermehrte neuronale Apoptose nach Gabe von bakteriziden Antibiotika im Vergleich zu den bakteriostatischen Antibiotika?

Die Ergebnisse dieser Arbeit können erste Konzepte zur Beantwortung einiger dieser Fragen geben. Denn wir zeigten, dass insbesondere die zellwandgebundenen Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* eine hohe Potenz zur Auslösung einer parenchymatösen Entzündungsreaktion besitzen und in Kombination mit diesen Mediatoren zur Störung der Myelinsynthese führen.

Problematisch ist der Einsatz bakterizider Antibiotika in fortgeschrittenen Stadien der Meningitis. Trotzdem sind sie unabdingbar. Die durch Antibiotika verursachte vermehrte Freisetzung von Zellwandfragmenten kann die Hirnschädigung verstärken. Deshalb ist die Erforschung neuer adjuvanter Therapiestrategien essentiell, wie z. B. Zellwand-blockierender Substanzen.

Das leukozytäre Infiltrat ist zwar maßgeblich verantwortlich für die Bildung von proinflammatorischen Mediatoren im Liquorraum und kann zur Ausbildung eines Hirnödems beitragen; ein relevanter Einfluss auf die Bildung parenchymatöser Entzündungsreaktionen kommt der Liquorleukozytose jedoch nicht zu.

Auf der Basis dieses Wissens besteht die Möglichkeit, auch adjuvante Therapeutika zu entwickeln, die vom Wirkprinzip an einem oder mehreren der hier untersuchten Mechanismen ansetzen könnten. Eine Inhibition der parenchymatösen TNF- α -Produktion ist denkbar. Ebenso könnte die Bindung oder die enzymatische Lyse der Zellwandbestandteile bereits im Liquor cerebrospinalis einen therapeutischen Ansatz bieten. Dies gilt es, in entsprechenden in vivo Experimenten zu überprüfen. Unser verwendetes Tiermodell ist einfach und bietet die Möglichkeit, durch die Verwendung von Knock-Out-Mäusen und weiteren Inhibitoren die ablaufenden Mechanismen weiter zu erforschen.

4.6 Ausblick

Im Rahmen der murinen Pneumokokkenmeningitis kommt es zur lokalen Synthese von Entzündungsmediatoren im Hirnparenchym. Diese Synthese beginnt durch Astrozyten und Mikrogliazellen in der Nachbarschaft der Liquorräume. Mit Voranschreiten der Erkrankung werden die proinflammatorischen Mediatoren auch im restlichen Hirngewebe gebildet. Ebenfalls Neurone produzieren TNF- α . Vermittelt wird diese Synthese maßgeblich durch die zellwandgebundenen Virulenzfaktoren der Pneumokokken.

Im Verlauf kommender Projekte sollten nun die Mechanismen untersucht werden, die zur Auslösung dieser Entzündungsreaktion im Hirnparenchym führen. In vitro induzieren Zellwände Gram-positiver Bakterien über Toll-Like-Rezeptoren die Synthese proinflammatorischer Zytokine in Astrozyten und Mikrogliazellen. Dies auch in vivo nachzuweisen sollte das Ziel weitergehender Untersuchungen sein. Darüber hinaus besteht die Frage, ob es zu einem Übertritt der Virulenzfaktoren kommt oder ob lediglich Zellen der Blut-Liquor-Schranke direkten Antigenkontakt haben und die Entzündungsreaktion weiterleiten.

Von besonderem Interesse ist es auch, Auslöser der neuronalen Synthese von TNF- α zu identifizieren, da deren Identifizierung einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung von Inhibitoren zur Neuroprotektion leisten könnte.

Eine weitere Erforschung der Myelinsynthesestörung während der Pneumokokkenmeningitis ist wichtig, da sie einen neuen Beitrag zur Erforschung von Schädigungsmechanismen von *Streptococcus pneumoniae* darstellen.

Ziel der Untersuchungen sollte auch die Dauer und potentielle Reversibilität dieser Störung nach erfolgreicher Therapie einer Meningitis sein.

5 Literaturverzeichnis

Aird RB A study of intrathecal, cerebrospinal fluid-to-brain exchange. *Exp Neurol* 1984;86:342-58.

Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, et al. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendrogliopathy. *Am J Pathol* 1998;153:801-13.

Aloisi F Immune function of microglia. *Glia* 2001;36:165-79.

Angstwurm K, Freyer D, Dirnagl U, et al. Tumour necrosis factor alpha induces only minor inflammatory changes in the central nervous system, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* 1998;86:627-34.

Bedford H, de Louvois J, Halket S, et al. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ* 2001;323:533-6.

Bermppohl D, Halle A, Freyer D, et al. Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest* 2005;115:1607-15.

Bitsch A, Trostdorf F, Bruck W, et al. Central nervous system TNFalpha-mRNA expression during rabbit experimental pneumococcal meningitis. *Neurosci Lett* 1997;237:105-8.

Blewett AM, Lloyd AJ, Echaliier A, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary characterization of uridine 5'-diphospho-N-acetylmuramoyl L-alanyl-D-glutamate:lysine ligase (MurE) from *Streptococcus pneumoniae* 110K/70. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:359-61.

Bogdan C, Vodovotz Y and Nathan C Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991;174:1549-55.

Bohnsack JF, Zhou XN, Gustin JN, et al. Bacterial evasion of the antibody response: human IgG antibodies neutralize soluble but not bacteria-associated group B streptococcal C5a-ase. *J Infect Dis* 1992;165:315-21.

Bohr V, Hansen B, Kjersem H, et al. Sequelae from bacterial meningitis and their relation to the clinical condition during acute illness, based on 667 questionnaire returns. Part II of a three part series. *J Infect* 1983;7:102-10.

Bottcher T, Ren H, Goiny M, et al. Clindamycin is neuroprotective in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis compared with ceftriaxone. *J Neurochem* 2004;91:1450-60.

Boulnois GJ Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1992;138:249-59.

Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, et al. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 2003;43:281-91.

- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, et al. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 2002;109:19-27.
- Brightman MW and Reese TS Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 1969;40:648-77.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, et al. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1013-21.
- Cockeran R, Anderson R and Feldman C The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:235-9.
- Cockeran R, Theron AJ, Steel HC, et al. Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect Dis* 2001;183:604-11.
- Cundell DR, Weiser JN, Shen J, et al. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1995;63:757-61.
- de Gans J and van de Beek D Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2002;347:1549-56.
- Dhib-Jalbut S Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68:S13-21; discussion S43-54.
- Diab A, Zhu J, Lindquist L, et al. *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* induce different intracerebral mRNA cytokine patterns during the course of experimental bacterial meningitis. *Clin Exp Immunol* 1997;109:233-41.
- Dominguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, et al. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 2007;179:1842-54.
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993;328:21-8.
- Dyer CA Novel oligodendrocyte transmembrane signaling systems. Investigations utilizing antibodies as ligands. *Mol Neurobiol* 1993;7:1-22.
- Dyer CA The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. *Neurochem Res* 2002;27:1279-92.
- Fossan G, Cavanagh ME, Evans CA, et al. CSF-brain permeability in the immature sheep fetus: a CSF-brain barrier. *Brain Res* 1985;350:113-24.
- Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, et al. Cerebral endothelial cells release TNF- α after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 1999;163:4308-14.
- Gee P, Rhodes CH, Fricker LD, et al. Expression of neuropeptide processing enzymes and neurosecretory proteins in ependyma and choroid plexus epithelium. *Brain Res* 1993;617:238-48.

- Gow A, Southwood CM, Li JS, et al. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* 1999;99:649-59.
- Greer JM and Lees MB Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:211-5.
- Griffiths IR, Schneider A, Anderson J, et al. Transgenic and natural mouse models of proteolipid protein (PLP)-related dysmyelination and demyelination. *Brain Pathol* 1995;5:275-81.
- Griot-Wenk M, Griot C, Pfister H, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in antimyelin antibody-induced oligodendrocyte damage in vitro. *J Neuroimmunol* 1991;33:145-55.
- Hauw JJ, Delaere P, Seilhean D, et al. Morphology of demyelination in the human central nervous system. *J Neuroimmunol* 1992;40:139-52.
- Helynck G, Luu B, Nussbaum JL, et al. Brain proteolipids. Isolation, purification and effect on ionic permeability of membranes. *Eur J Biochem* 1983;133:689-95.
- Herrmann I, Kellert M, Schmidt H, et al. Streptococcus pneumoniae Infection aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2006;74:4841-8.
- Hirst RA, Yesilkaya H, Clitheroe E, et al. Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infect Immun* 2002;70:1017-22.
- Holtmann MH and Neurath MF Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr Mol Med* 2004;4:439-44.
- Holtmann MH, Schutz M, Galle PR, et al. Functional relevance of soluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. *Z Gastroenterol* 2002;40:587-600.
- Horuk R, Wang ZX, Peiper SC, et al. Identification and characterization of a promiscuous chemokine-binding protein in a human erythroleukemic cell line. *J Biol Chem* 1994;269:17730-3.
- Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, et al. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 2001;36:220-34.
- Jana A and Pahan K Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007;2:184-93.
- Jedrzejewski MJ Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:187-207 ; first page, table of contents.
- Jones J, Frith S, Piddlesden S, et al. Imaging Ca²⁺ changes in individual oligodendrocytes attacked by T-cell perforin. *Immunology* 1991;74:572-7.

Jorens PG, Parizel PM, Demey HE, et al. Meningoencephalitis caused by *Streptococcus pneumoniae*: a diagnostic and therapeutic challenge. Diagnosis with diffusion-weighted MRI leading to treatment with corticosteroids. *Neuroradiology* 2005;47:758-64.

Jorens PG, Parizel PM, Wojciechowski M, et al. *Streptococcus pneumoniae* meningoencephalitis with unusual and widespread white matter lesions. *Eur J Paediatr Neurol* 2008;12:127-32.

Kalin M Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax* 1998;53:159-62.

Kaplan SL Clinical presentations, diagnosis, and prognostic factors of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:579-94, vi-vii.

Kastenbauer S and Pfister HW Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003;126:1015-25.

Kiaei M, Kipiani K, Calingasan NY, et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2007;205:74-81.

Kielian T, Esen N and Bearden ED Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia. *Glia* 2005;49:567-76.

Kim JH, Seo H, Han SH, et al. Monoacyl lipoteichoic acid from pneumococci stimulates human cells but not mouse cells. *Infect Immun* 2005;73:834-40.

Kim YS, Honkaniemi J, Sharp FR, et al. Expression of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in the brain during experimental group B streptococcal meningitis. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;128:95-102.

Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov, II, et al. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* 2003;22:101-6.

Koedel U, Angele B, Rupprecht T, et al. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* 2003;170:438-44.

Koedel U, Scheld WM and Pfister HW Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2002;2:721-36.

Kuchler S, Graff MN, Gobaille S, et al. Mannose dependent tightening of the rat ependymal cell barrier. In vivo and in vitro study using neoglycoproteins. *Neurochem Int* 1994;24:43-55.

Laflamme N, Soucy G and Rivest S Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *J Neurochem* 2001;79:648-57.

Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 2002;22:2478-86.

Leib SL, Leppert D, Clements J, et al. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun* 2000;68:615-20.

- Loeffler JM, Ringer R, Hablutzel M, et al. The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 2001;183:247-252.
- Ludwin SK The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:111-24.
- Malley R, Henneke P, Morse SC, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1966-71.
- Martini R and Schachner M Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 1997;19:298-310.
- Meli DN, Christen S, Leib SL, et al. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:253-7.
- Meli DN, Loeffler JM, Baumann P, et al. In pneumococcal meningitis a novel water-soluble inhibitor of matrix metalloproteinases and TNF-alpha converting enzyme attenuates seizures and injury of the cerebral cortex. *J Neuroimmunol* 2004;151:6-11.
- Merrill JE Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother (1991)* 1992;12:167-70.
- Meyding-Lamade U, Ehrhart K, de Ruiz HL, et al. A new technique: serial puncture of the cisterna magna for obtaining cerebrospinal fluid in the mouse--application in a model of herpes simplex virus encephalitis. *J Exp Anim Sci* 1996;38:77-81.
- Movat HZ and Cybulsky MI Neutrophil emigration and microvascular injury. Role of chemotaxins, endotoxin, interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Pathol Immunopathol Res* 1987;6:153-76.
- Mustafa MM, Lebel MH, Ramilo O, et al. Correlation of interleukin-1 beta and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis. *J Pediatr* 1989;115:208-13.
- Nadeau S and Rivest S Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:61-77.
- Nadeau S and Rivest S Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 2000;20:3456-68.
- Nakagawa T and Schwartz JP Gene expression patterns in in vivo normal adult astrocytes compared with cultured neonatal and normal adult astrocytes. *Neurochem Int* 2004;45:203-42.
- Nau R, Gerber J, Bunkowski S, et al. Axonal injury, a neglected cause of CNS damage in bacterial meningitis. *Neurology* 2004;62:509-11.
- Niemoller UM and Tauber MG Brain edema and increased intracranial pressure in the pathophysiology of bacterial meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:109-17.

- Norton WT Recent advances in myelin biochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1984;436:5-10.
- Ostrow PT, Moxon ER, Vernon N, et al. Pathogenesis of bacterial meningitis. Studies on the route of meningeal invasion following *Hemophilus influenzae* inoculation of infant rats. *Lab Invest* 1979;40:678-85.
- Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, et al. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 1993;47:89-115.
- Paul R, Lorenzl S, Koedel U, et al. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol* 1998;44:592-600.
- Pericone CD, Overweg K, Hermans PW, et al. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:3990-7.
- Pfaffl MW A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- Probert L, Akassoglou K, Kassiotis G, et al. TNF-alpha transgenic and knockout models of CNS inflammation and degeneration. *J Neuroimmunol* 1997;72:137-41.
- Probert L, Eugster HP, Akassoglou K, et al. TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain* 2000;123 (Pt 10):2005-19.
- Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr., et al. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 1991;87:1360-6.
- Quarles RH Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1851-71.
- Raine CS The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 1997;77:135-52.
- Rankine EL, Hughes PM, Botham MS, et al. Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *Eur J Neurosci* 2006;24:77-86.
- Rennels ML, Blaumanis OR and Grady PA Rapid solute transport throughout the brain via paravascular fluid pathways. *Adv Neurol* 1990;52:431-9.
- Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, et al. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Res* 1985;326:47-63.
- Ring A, Weiser JN and Tuomanen EI Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 1998;102:347-60.

Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, et al. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:22-38.

Rooney P, Bilbe G, Zak O, et al. Dexamethasone treatment of lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits that mimics magnification of inflammation following antibiotic therapy. *J Med Microbiol* 1995;43:37-44.

Rus H, Cudrici C, Niculescu F, et al. Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *J Neuroimmunol* 2006;180:9-16.

Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, et al. Differential cellular expression of tumor necrosis factor-alpha and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *J Neurol Sci* 2001;186:87-99.

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 1997;337:970-6.

Smith KJ, Kapoor R and Felts PA Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* 1999;9:69-92.

Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, et al. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol* 1996;157:360-8.

Soliven B, Takeda M and Szuchet S Depolarizing agents and tumor necrosis factor-alpha modulate protein phosphorylation in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1994;38:91-100.

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, et al. Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 2002;11:355-68.

Tsukita S and Furuse M Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000;149:13-6.

Tuomanen E Modulation of inflammation in bacterial meningitis. *Isr J Med Sci* 1994;30:339-41.

Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B, et al. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1985;151:535-40.

Tuomanen EI, Saukkonen K, Sande S, et al. Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* 1989;170:959-69.

van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al. Group a streptococcal meningitis in adults: report of 41 cases and a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2002;34:e32-6.

Vardhini D, Suneetha S, Ahmed N, et al. Comparative proteomics of the *Mycobacterium leprae* binding protein myelin P0: its implication in leprosy and other neurodegenerative diseases. *Infect Genet Evol* 2004;4:21-8.

von Budingen HC, Tanuma N, Villoslada P, et al. Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J Clin Immunol* 2001;21:155-70.

Weber JR, Freyer D, Alexander C, et al. Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 2003;19:269-79.

Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, et al. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 1994;62:2582-9.

Winkelstein JA Complement and the host's defense against the pneumococcus. *Crit Rev Microbiol* 1984;11:187-208.

Wisniewski HM and Bloom BR Primary demyelination as a nonspecific consequence of a cell-mediated immune reaction. *J Exp Med* 1975;141:346-59.

Zysk G, Bruck W, Gerber J, et al. Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:722-8.

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis-induzierender Faktor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Cbp	Cholin-bindendes Protein
CbpA	Cholin-bindendes Protein A
CNPase	2,3-Cyclische Nukleinsäure 3-Phosphohydrolase
CO ₂	Kohlendioxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fötale Kälberserum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICE	Interleukin-1 β konvertierendes Enzym
ICP	Intrakranieller Druck
IL	Interleukin
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierende Protein Kinase
MBP	Myelin basisches Protein
min	Minuten
MIP	Makrophagen-Inflamations-Protein
MOG	Myelinspezifisches Oligodendrozytenglykoprotein
MOSP	Myelinspezifisches Oligodendrozytenprotein
MW	Molekulargewicht

NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NFκB	Nukleus Faktor kappa B
NO	Nitritoxid
OD	Optische Dichte
OD ₆₂₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge $\lambda = 620$ nm
P0	P0 Glycoprotein
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster
PBS	„Phosphate Buffered Saline“ = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PL	Phospholipide
Pln	Pneumolysin
PLP	Proteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
POA	Prooligodendroblastantigen
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SL	Sphingolipide
spxB	Pyruvatoxidase
TACE	TNF- α konvertierendes Enzym
TBE	„Tris-Borat-EDTA“-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Lösung
TGF- β	„Transforming-Growth-Factor“ beta
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Factor- α
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Johann Sebastian Braun und Professor Jörg Weber für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Arbeitsgruppe zu forschen und die Ergebnisse auf Fachkongressen zu präsentieren.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Neurologie, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützt haben, allen voran Cordula Marhofer, Claudia Muselmann und Émilie Dagand. Sie haben durch viele Hilfestellungen und eine gute Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Professor Wolfgang Brück für die freundliche Überlassung der PLP-Sonden zur Durchführung der in situ Hybridisierungen

Ich danke Professor Norbert P. Südkamp, der mir auf dem langen Weg bis zur Fertigstellung dieser Arbeit stets als Vorbild diente und mich motivierte in Bezug auf Sorgfalt und „Liebe zur Arbeit“

Meiner Frau Susanne Izadpanah danke ich für die Korrektur des Manuskripts und ihre liebevolle Unterstützung.

Schließlich möchte ich meiner Mutter und Hans E. Dreher, meiner Schwester und meinen Großeltern danken, deren Unterstützung die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht hat. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kaywan Izadpanah Zargandeh, an Eides statt, dass die vorliegende
Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde.

Die benutzten Hilfsmittel und die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Kaywan Izadpanah Zargandeh