

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Rolle von Lymphozyten, myeloiden Zellen und des  
Zytokins Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Olga Rung  
aus Orsk (Russland)

Datum der Promotion: 02.03.2018

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1. Einleitung</b> .....  | <b>12</b> |
| 1.1 Bakterielle Meningitis .....  | 12        |
| 1.1.1 Pneumokokkenmeningitis .....  | 13        |
| 1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....   | 13        |
| 1.3 Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis .....  | 15        |
| 1.3.1 Bakterielle Invasion .....  | 15        |
| 1.3.2 Induktion der Immunantwort über Pattern-Recognition-Rezeptoren .....  | 16        |
| 1.4 Rolle von TPO bei der bakteriellen Meningitis .....   | 19        |
| 1.5 Zelluläre Immunität in der bakteriellen Meningitis .....  | 20        |
| 1.6 Ziele der Arbeit und zugehörige Hypothesen .....  | 21        |
| 1.6.1 Rolle des Thrombopoietin-Signalweges in der bakteriellen Meningitis .....   | 21        |
| 1.6.2 Rolle von Lymphozyten in der bakteriellen Meningitis .....  | 22        |
| 1.6.3 Rolle von Granulozyten und Monozyten in der Induktion und Regulation der<br>Entzündung in der Akutphase der bakteriellen Meningitis ..... | 23        |
| <b>2. Materialien</b> .....   | <b>25</b> |
| 2.1 Reagentien .....  | 25        |
| 2.2 Kommerzielle Puffer und Kits .....  | 27        |
| 2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial .....   | 27        |
| 2.4 FACS- Antikörper sekundäre Farbstoffe .....   | 29        |
| 2.5 Immunhistologische Antikörper .....   | 29        |
| 2.6 Angesetzte Lösungen und Medien .....  | 30        |
| 2.7 Bakterienstämme .....   | 32        |
| 2.8 Versuchstiere .....   | 32        |
| <b>3. Methoden</b> .....  | <b>33</b> |
| 3.1 Versuchstiere .....   | 33        |
| 3.2 Immunrekonstitution .....   | 33        |
| 3.3 <i>In vivo</i> -Modell der bakteriellen Meningitis .....  | 33        |
| 3.3.1 Tight-rope-Test .....   | 34        |
| 3.3.2 Liquor- und Gehirnentnahme .....  | 34        |
| 3.3.3 Bestimmung der Leukozytengesamtkonzentration .....  | 35        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration im Liquor .....  | 35        |
| 3.4 Präparation von Leukozyten aus Geweben.....  | 35        |
| 3.4.1 Isolation von Leukozyten aus Gehirngewebe.....   | 35        |
| 3.4.2 Gewinnung von Splenozyten .....  | 36        |
| 3.5 Aufreinigung von Zellpopulationen mit MACS .....   | 36        |
| 3.5.1 Magnetic labeling .....  | 37        |
| 3.6 Quantifizierung von Zellpopulationen mittels fluoreszenzaktivierter Zellanalyse (FACS) .....                 | 38        |
| 3.6.1 Überprüfen der Populationsreinheit nach der MACS-Aufreinigung mittels FACS.....                            | 39        |
| 3.6.2 FACS-Analyse von aktivierte Mikroglia bzw. Makrophagen aus Hirngewebe.....                                 | 39        |
| 3.6.3 FACS-Analyse von Zellen aus dem Liquor .....   | 40        |
| 3.7 Etablierung des <i>ex vivo</i> -Stimulationsprotokolls für Splenozyten .....                                 | 40        |
| 3.7.1 Aktivitätsmessung der Phagozytenoxidase (NBT-Test) .....   | 41        |
| 3.7.2 Überprüfen der Viabilität der Zellen mit Hilfe des MTT-Tests.....  | 41        |
| 3.7.3 Endgültiges Protokoll zur <i>ex vivo</i> -Stimulation nach Leukozytenisolation und MACS-Aufreinigung.....  | 42        |
| 3.8 Bakterienanzucht.....  | 42        |
| 3.8.1 Herstellung von bakterienkonditioniertem Medium .....  | 43        |
| 3.9 Zellkulturen.....  | 43        |
| 3.10 Real Time PCR .....   | 44        |
| 3.10.1 qPCR von <i>Tpo</i> mRNA Expression aus der Mikroglia/Astrozyten Zellkultur .....                         | 44        |
| 3.10.2 Quantitative PCR aus Hirngewebe und Liquor.....   | 46        |
| 3.11 Immunhistologie .....   | 47        |
| 3.11.1 TUNEL- Färbung (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) .....                       | 47        |
| 3.11.2 Mikrogliafärbung (F4/80).....   | 48        |
| 3.11.3 Mikrogliafärbung (CD11b).....   | 48        |
| 3.12 Statistische Analysen .....   | 48        |
| <b>4. Ergebnisse .....</b>   | <b>50</b> |
| 4.1 Projekt 1: Rolle von Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis .....                                     | 50        |
| 4.1.1 Phänotyp der Thrombopoietin-Rezeptor-defizienten Mäuse in der experimentellen bakteriellen Meningitis..... | 50        |
| 4.1.2 Effekte von rekombinantem Thrombopoietin.....  | 53        |
| 4.1.3 Aktivierung von Mikroglia.....   | 54        |
| 4.1.4 Regulierung von <i>Tpo</i> mRNA in Makrophagen durch bakterielle Faktoren.....                             | 56        |
| 4.1.5 Regulierung von <i>Tpo</i> mRNA in Mikroglia durch Pam <sub>3</sub> CysSK <sub>4</sub> .....               | 57        |
| 4.1.6 Proinflammatorischer Effekt von Thrombopoietin auf Mikroglia.....  | 57        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.2 Projekt 2: Rolle der Lymphozyten in der bakteriellen Meningitis .....  | 59         |
| 4.2.1 Effekt fehlender reifer Lymphozyten auf die Entzündungsreaktion im Liquorraum ....   | 59         |
| 4.2.2 Effekt der Rag-1-Defizienz auf die klinische Erkrankungsschwere und den neuronalen Schaden <sup>61</sup>                             |            |
| 4.2.3 Immunologische Effekte im Hirngewebe .....   | 62         |
| 4.2.4 Rekonstitutionsexperimente .....   | 66         |
| 4.3 Projekt 3: Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Rolle myeloider Zellen in der bakteriellen Meningitis .....              | 68         |
| 4.3.1 Kultur und Aktivierung unfractionierter Splenozyten.....   | 68         |
| 4.3.2 Gewinnung und Aktivierung von Granulozyten .....   | 71         |
| 4.3.3 Gewinnung und Aktivierung von Monozyten.....   | 74         |
| 4.3.4 <i>In vivo</i> Experimente .....   | 76         |
| <b>5. Diskussion .....</b>   | <b>81</b>  |
| 5.1 Rolle von Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis .....  | 81         |
| 5.1.1 Proapoptotische Effekte von TPO.....   | 81         |
| 5.1.2 Wo wird TPO während der bakteriellen Meningitis gebildet? .....  | 82         |
| 5.1.3 Einfluss von TPO auf die Aktivierung von Mikroglia .....   | 83         |
| 5.1.4 Limitationen .....   | 84         |
| 5.2 Die Rolle der Lymphozyten in der experimentellen Meningitis .....  | 86         |
| 5.2.1 Effekte auf die Entzündungsreaktion im Liquorraum und im Hirngewebe .....  | 86         |
| 5.2.2 Effekt der RAG-1-Defizienz auf den neuronalen Schaden und die klinische Erkrankungsschwere .....                                     | 88         |
| 5.2.3 Einfluss der Lymphozytenabwesenheit auf Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen  | 89         |
| 5.2.4 Limitationen .....   | 91         |
| 5.3 Rolle von Granulozyten und Monozyten bei der Induktion und Regulation der Entzündung in der Akutphase der bakteriellen Meningitis..... | 92         |
| 5.3.1 Kultur und Aktivierung unfractionierter Splenozyten.....   | 92         |
| 5.3.2 Gewinnung und Aktivierung von Granulozyten und Monozyten .....   | 94         |
| 5.3.3 Pilot-Experimente zu <i>in vivo</i> -Untersuchungen .....  | 95         |
| <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>7. Anhang .....</b>   | <b>112</b> |
| 7.1 L929 TNF- $\alpha$ Bioassay.....   | 112        |
| 7.2 Zusammensetzung des C + Y- Mediums .....   | 114        |
| <b>8. Eidesstattliche Versicherung .....</b>   | <b>116</b> |
| <b>9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen .....</b>  | <b>117</b> |
| <b>10. Lebenslauf.....</b>   | <b>118</b> |

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>11. Publikationsliste .....</b> | <b>119</b> |
| <b>12. Danksagung .....</b>        | <b>120</b> |

## Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Rolle von myeloiden Zellen und die Rolle des Zytokins Thrombopoetin in der bakteriellen Meningitis untersucht. Wesentliche Befunde wurden in einem Mausmodell der bakteriellen Meningitis erhoben. Mit Hilfe dieses Modells können Mechanismen der Inflammation auf zellulärer und Zytokinebene sowie der neuronale Schaden untersucht werden. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden zur Auslösung der Meningitis lebende Pneumokokken, das synthetische bakterielle Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (ein spezifischer Agonist am Toll-Like-Rezeptor 2) oder aktivierte Spenderleukozyten verwendet.

In Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit homozygoter Ablation des Thrombopoietin-Rezeptors (c-Mpl<sup>-/-</sup>) zeigte sich 24 h nach der Meningitis-Induktion mit *Streptokokkus pneumoniae* in den c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen eine geringere Dichte apoptotischer Zellkerne in Körnerzellschicht des Gyrus dentatus als bei Wildtyp-Mäusen. Die zusätzliche intrathekale Applikation von rekombinanten Thrombopoietin (TPO) führte in infizierten Wildtyp-Mäusen zu einer Zunahme apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus. Diese Befunde deuten auf eine proapoptotische Wirkung von TPO während der bakteriellen Meningitis hin. Ergänzende Zellkulturuntersuchungen an primärer ZNS-Mikroglia und einer Makrophagen-Zelllinie deuteten auf eine wichtige Rolle der bakteriellen Toxine Pneumolysin (Pln) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bei der Induktion von TPO in diesen Zellen hin.

RAG-1-defiziente Mäuse, denen reife T- und B-Lymphozyten fehlen, zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen 24 h nach der Meningitis-Induktion mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, schwerere klinische Krankheitszeichen und eine verstärkte neutrophile Liquorpleozytose, jedoch einen geringer ausgeprägten neuronalen Gewebeschaden. Eine differentielle Regulierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Hirngewebe und in den Leukozyten im Subarachnoidalraum deutete auf Kompartiment-spezifische Effekte der Lymphozyten während akuter Meningitis hin, darunter eine Abschwächung der meningealen Inflammation und die Förderung neurotoxischer Eigenschaften aktivierter Mikroglia.

Des Weiteren wurde eine Methodik entwickelt, mit der die direkte Aktivierung immunkompetenter Zellen im Subarachnoidalraum durch bakterielle Liganden auf spezifische Zellpopulationen limitiert werden kann. Das Verfahren beruhte auf der Aufreinigung der jeweiligen Zellpopulation aus Wildtyp-Spendermäusen mittels geeigneter Antikörpermarkierung und Isolation nach dem MACS-Prinzip. Nach Stimulation mit dem spezifischen TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> wurden die Zellen in den Subarachnoidalraum von TLR2-defizienten Mäusen eingebracht. Direkte proinflammatorische Wirkungen des Liganden im Empfänger waren auf diese Weise ausgeschlossen.

Nach Methodenetablierung wurden erste Pilotversuche mit aufgereinigten Splenozytenfraktionen durchgeführt. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen lösten mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimulierte Ly6G-positiv selektierte Neutrophile keine wirtsseitige Inflamationsreaktion aus, während ein robuster Einstrom von Leukozyten des Empfängertiers durch die negativ selektierte Population oder die wiedervereinigten Fraktionen ausgelöst wurde. Diese präliminären Befunde legen nahe, dass monozytäre Zellen und nicht neutrophile Granulozyten im Subarachnoidalraum eine Wächterfunktion gegenüber invadierenden grampositiven Bakterien ausüben.

## Abstract

The present paper reports on investigations of the role of myeloid cells and of the cytokine thrombopoietin in bacterial meningitis. Central results were gathered in a mouse model of bacterial meningitis which allows to investigate mechanisms of inflammation at the cellular and cytokine level as well as neuronal damage. Depending on the question, meningitis was induced using live pneumococci, the synthetic bacterial lipopeptide Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (a specific toll-like receptor 2 agonist), or stimulated splenocyte fractions.

In experiments on wild-type mice and mice with homozygous ablation of the thrombopoietin receptor (c-Mpl<sup>-/-</sup>), a lower density of apoptotic neurons in the granular cell layer of the dentate gyrus 24 hours after meningitis induction with *Streptococcus pneumoniae* was found in the c-Mpl<sup>-/-</sup> mice when compared to wild-type mice. Intrathecal application of recombinant thrombopoietin (TPO) led to an increase in apoptotic neurons in the dentate gyrus in infected wild-type mice. These findings suggested a proapoptotic effect of TPO during bacterial meningitis. Further studies on primary CNS microglia and a macrophage cell line revealed an important role of the bacterial toxins pneumolysin (Pln) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in inducing TPO expression by these cells.

RAG-1-deficient mice lacking mature T and B lymphocytes showed more severe clinical impairment and increased neutrophil concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) compared to wild-type mice 24 h after meningitis induction with Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. However, neuronal tissue damage was less pronounced. A differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines in brain tissue and in the leukocytes in the subarachnoid space indicated a compartment-specific effect during acute meningitis. Specifically, an attenuation of meningeal inflammation and the promotion of neurotoxic properties of activated microglia were observed.

Furthermore, a methodology was developed to limit the direct activation of immunocompetent cells by bacterial ligands to specific leukocyte populations in the subarachnoid space. The method is based on the purification of the respective cell population from wild-type donors, using magnetic cell sorting (MACS) after appropriate

immunolabeling of the target cells. After stimulation with the specific TLR2 agonist Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, the cells were injected into the subarachnoid space of TLR2-deficient mice, thereby excluding direct proinflammatory effects of the ligand in the recipient. After establishing the method, pilot experiments were conducted using purified splenocyte fractions. Compared to unstimulated cells, Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-stimulated Ly6G positive-selected neutrophils did not induce an inflammation reaction. Conversely, a robust inflow of host leukocytes was triggered by the negatively selected population or the combined fractions. These preliminary findings suggest that monocytic cells rather than neutrophil granulocytes exert a sentinel function against invading gram-positive bacteria in the subarachnoid space.

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| $\Delta pln$ -  | Pneumolysin-defiziente Mutante von <i>S. pneumoniae</i>                                 |
| $\Delta spxB$ - | Peroxidase-defiziente Mutante von <i>S. pneumoniae</i>                                  |
| AIF             | Apoptose-induzierender Faktor   |
| AK              | Antikörper  |
| APC             | Allophycocyanin   |
| BLP             | Bakterielle Lipopeptide   |
| bp              | Basenpaare  |
| BSA             | Bovines Serumalbumin  |
| CbpA            | Cholin-bindende Protein A   |
| CCL2            | CC Chemokin-Ligand 2  |
| CCR2            | CC Chemokin-Rezeptor Typ 2  |
| CD              | <i>Clusters of Differentiation</i>  |
| cDNA            | Komplementäre DNA   |
| c-Mpl           | Zelluläres Homolog des myeloproliferativen Leukämie-Proteins;<br>Thrombopoietinrezeptor |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid   |
| CXCL            | Chemokine (C-X-C Motif) Ligand ( <i>Melanoma Growth Stimulating Activity, Alpha</i> )   |
| C+Y-Medium      | Casein+Yeast (Hefe)-Medium  |
| DAPI            | 4',6 -Diamidin-2-phenylindol  |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP            | Desoxyribonukleosidtriphosphate   |
| DTT             | Dithiothreitol  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| ERK             | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>  |
| EGFP            | <i>Enhanced green fluorescent protein</i>   |
| FACS            | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>  |
| FBS             | Fetales bovine Serum  |
| FEM             | Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin                                      |
| Foxp3           | <i>Forkhead-Box-Protein P3</i>  |
| Gr1             | <i>Myeloid differentiation protein</i>  |
| HSP60           | 60 kD-Hitzeschockprotein  |
| IgG             | Immunglobulin G   |
| IL              | Interleukin   |
| IFN- $\gamma$   | Interferon-gamma  |
| IRAK            | IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase  |
| KBE             | Koloniebildende Einheiten   |
| kD              | Kilodalton  |
| LaGeSo          | Landesamt für Gesundheit und Soziales   |
| LPS             | Lipopolysaccharid   |
| LTS             | Lipoteichonsäure  |
| Ly6G            | <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>  |
| MACS            | <i>Magnetic activated cell sorting</i>  |
| MAP             | <i>Mitogen-activated protein</i>  |
| MMLV-RT         | <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>                              |

|                        |  |
|------------------------|--|
| MTT                    | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid                             |
| MyD88                  | <i>Myloid differentiation primary response gene 88</i>                                 |
| NADP(H)                | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat   |
| NBT                    | Nitroblau-Tetrazolium  |
| NF-κB                  | <i>Nuclear factor kappa-B</i> (Transkriptionsfaktor)                                   |
| NGS                    | Normal Goat Serum  |
| OD                     | Optische Dichte  |
| PI                     | Propidiumjodid   |
| P                      | Tage nach Geburt   |
| PAMP                   | <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>  |
| PamsCysSK <sub>4</sub> | N-palmitoyl-S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl)-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-Lysin |
| PBS                    | Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )                     |
| PCR                    | Polymerase-Kettenreaktion  |
| PECAM-1                | <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>                                   |
| PFA                    | Paraformaldehyd  |
| PG                     | Peptidoglykane   |
| Pln                    | Pneumolysin  |
| PMA                    | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat  |
| qPCR                   | Quantitative <i>real time</i> PCR  |
| PRR                    | <i>Pattern-Recognition-Rezeptoren</i>  |
| RAG1                   | <i>V(D)J recombination-activating protein 1</i>  |
| RAW 264.7              | Immortalisierte Mausmakrophagen-Zelllinie  |
| RPMI 1640              | <i>Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium</i> für Leukozyten                 |
| rTPO                   | Rekombinantes Thrombopoietin   |
| SDS                    | Natrium ( <i>Sodium</i> )- Dodecylsulfat   |
| TdT                    | Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase   |
| TGFβ                   | <i>Transforming Growth Faktor beta</i>   |
| TLR                    | Toll-like Rezeptor   |
| TNFα                   | Tumornekrosefaktor alpha   |
| TPO                    | Thrombopoietin   |
| TRAIL                  | <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>                         |
| TUNEL                  | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling U</i>                  |
| WT                     | Wildtyp  |
| ZNS                    | Zentrales Nervensystem   |

Für Abkürzungen von physikalischen und chemischen Einheiten werden die IUPAC Empfehlungen verwendet.

## 1. Einleitung

### 1.1 Bakterielle Meningitis

Als Meningitis wird eine Entzündung der Hirn- und Rückenmarkshäute (Arachnoidea, Pia und Dura mater) bezeichnet, die das zentrale Nervensystem umgeben. Neben einer Vielzahl seltenerer nicht-infektiöser Ursachen (Tumorzellen, autoimmunologische oder vaskuläre Erkrankungen, chemische Reizstoffe) stellen Infektionen die häufigste Ursache der Meningitis dar. Als Krankheitserreger überwiegen Viren und Bakterien, wohingegen Pilze und Parasiten eine untergeordnete Rolle spielen.

Bei immunkompetenten Patienten sind virale Meningitiden in der Regel durch einen günstigen Spontanverlauf gekennzeichnet. Dagegen stellen bakterielle Meningitiden auch bei zuvor Gesunden stets eine schwerwiegende Erkrankung dar. Noch vor ca. 60 Jahren endete eine bakterielle Meningitis fast immer tödlich, und auch heute erreicht die Mortalität trotz Verfügbarkeit wirksamer Antibiotika und verbesserter supportiver Therapie weiterhin 10 bis 30 % [1-3].

Das Erregerspektrum der bakteriellen Meningitis variiert nach Altersgruppe, geographischer Region und Begleitumständen wie der Immunkompetenz, Impfstatus oder vorangegangenen neurochirurgischen Operationen oder Traumata. Als wichtigste Erreger ambulant erworbener Meningitiden bei Erwachsenen sind Meningokokken (*Neisseria meningitidis*) und Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) zu nennen, die zusammen mindestens 80 % der Erkrankungen verursachen. Daneben sind vor allem bei Älteren und Immungeschwächten auch *Listeria monocytogenes*, bei Neugeborenen Gruppe-B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) sowie bei Kindern *Haemophilus influenzae* anzutreffen.

Die Inzidenz bakterieller Meningitiden ist nicht genau bekannt und wird in Industrieländern mit jährlich ca. 2,5-4,5 Erkrankungen je 100000 Einwohner angegeben [4, 5]. Im Zeitraum von 1996 bis 2008 traten in Schweden 1,1 Meningitisfälle durch Pneumokokken je 100000 Einwohner und Jahr auf [6]. Der Vergleich zu anderen Ländern ist mit Blick auf möglicherweise abweichenden Falldefinitionen, kulturellen Nachweisstrategien und Meldeverfahren erschwert [7]. In Deutschland weist die Gesundheitsberichterstattung des Bundes für das Jahr 2000 3525 stationäre Behandlungsfälle mit der ICD-10-Diagnose einer bakteriellen Meningitis aus. Soweit ein

spezifischer Erreger gesichert wurde, traten 483 Fälle einer gesicherten Pneumokokkenmeningitis und 521 Meningokokkenmeningitiden auf. Im Jahr 2015 waren dies 1556 Meningitiden, 461 Pneumokokkenmeningitiden und 129 Meningokokkenmeningitiden [8].

### **1.1.1 Pneumokokkenmeningitis**

Weltweit und bei Betrachtung aller Altersgruppen stellen Pneumokokken den häufigsten nachgewiesenen Erreger der bakteriellen Meningitis dar. Im Vergleich zu anderen Erregern ist die Pneumokokkenmeningitis auch bei erfolgreicher antibiotischer Therapie durch eine besonders hohe Letalität von bis zu 34 % und eine höhere Prävalenz von Folgeschäden bei Überlebenden gekennzeichnet [9, 2, 3]. Zu den akuten und subakuten Schädigungsmechanismen gehören die intrakranielle Drucksteigerung durch Ödembildung oder Abszedierung, Störungen der Liquorzirkulation und –resorption sowie zerebrovaskuläre Komplikationen [10, 11]. Außerdem bleiben bei bis zu einem Drittel der überlebenden Patienten neuropsychologische Defizite bestehen [12-14], darunter Störungen von Lernvorgängen, Gedächtnis und räumlicher Orientierung. Hierfür wird ein neuronaler Zellverlust verantwortlich gemacht, der schwerpunktmäßig hippokampale Strukturen betrifft und sowohl tierexperimentell als auch bei Patienten gezeigt wurde [15, 16]. Im Ergebnis können nur etwa die Hälfte der Überlebenden an den Arbeitsplatz zurückkehren [17], während nach kindlicher bakterieller Meningitis neuromotorische Störungen, Hörbehinderungen, Lernstörungen und Verhaltensstörungen als Folgeschäden beobachtet werden [18].

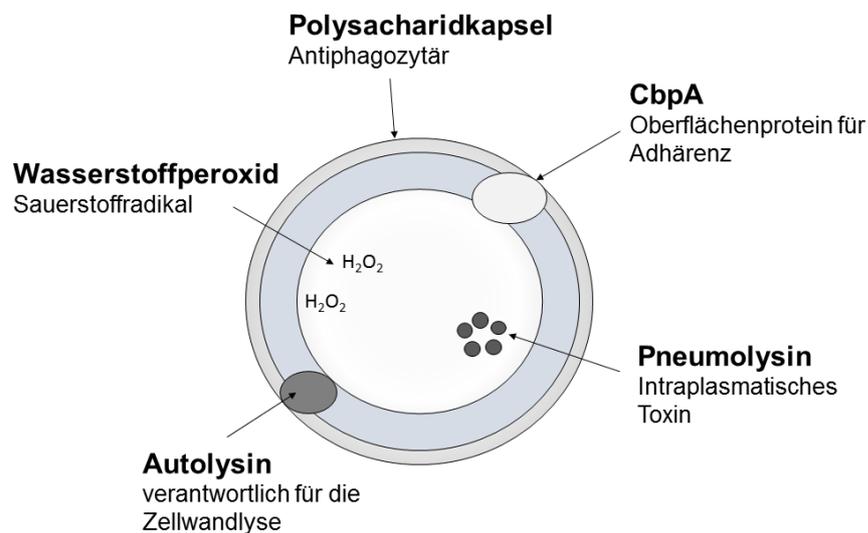
### **1.2 *Streptococcus pneumoniae***

Pneumokokken (Abb. 1) sind fakultativ anaerobe grampositive Bakterien, die zur Gattung der Streptokokken gehören. Meist sind sie paarweise aneinander gebunden (Diplokokken), können aber auch als längere Ketten vorkommen.

Pneumokokken führen bei Menschen in erster Linie zu einer transienten und asymptomatischen Besiedlung der Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raumes (Nasopharynx), wobei die Verbreitung vorwiegend aerogen als Tröpfcheninfektion erfolgt. Träger und Überträger von Pneumokokken sind hauptsächlich Kinder in den ersten 2 Lebensjahren. Nur etwa 5 % der Erwachsenen, die keinen Kontakt zu kleinen

Kinder haben, sind besiedelt. Die Prävalenz der Kolonisation nimmt mit steigendem Alter (ab 65) und bei geschwächtem Immunsystem zu.

Von der asymptomatischen Kolonisation sind invasive Infektionen abzugrenzen. Pneumokokken können die Mukosabarriere überwinden und in die Blutbahn eindringen. Pneumokokkenmeningitiden sind überwiegend Folge einer hämatogenen Aussaat, während die Ausbreitung *per continuitatem* aus Nasennebenhöhlen, Mastoid oder Mittelohr seltener die Ursache bildet. Bei der Entstehung invasiver Infektionen spielen sowohl gestörte Barrierefunktionen der Schleimhaut z.B. bei Austrocknung oder nach viraler Infektion als auch Virulenzfaktoren der Pneumokokken eine wesentliche Rolle.



**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung von *Streptococcus pneumoniae*. Adaptiert nach [19].

Als bedeutsamer Virulenzfaktor pathogener Pneumokokkenstämme ist die Bildung einer Schleimkapsel aus Polysacchariden zu nennen, die Schutz gegen Phagozytose bietet. Die Kolonisation des Nasopharynx und die Invasion werden durch spezifische Adhäsine ermöglicht [20, 21], deren wichtigster Vertreter das Cholin-bindende Protein A (CbpA) ist. Im Zytoplasma der Bakterien findet sich das Exotoxin Pneumolysin [22], welches Wirtszellen lysiert und das Komplementsystem über die Bindung an Immunglobulin G (IgG) aktiviert. Als Catalase-negative Bakterien akkumulieren Pneumokokken aus ihrem oxidativen Stoffwechsel außerdem hohe Konzentrationen von Wasserstoffperoxid, welches nach Freisetzung das Wachstum anderer Bakterien hemmt und oxidative Schädigung und Apoptose eukaryoter Zellen induzieren kann [23, 24]. In der Pneumokokkenmeningitis sind Pneumolysin und bakterielles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maßgeblich an der Induktion eines neuronalen Zellunterganges beteiligt, wobei eine mitochondriale Schädigung mit Freisetzung des Apoptoseinduzierenden Faktors (AIF) eine wichtige Rolle spielt [25, 26]. Pneumokokken bilden außerdem Autolysin [27], dessen physiologische Funktion nicht vollständig bekannt ist. Unter anderem wird eine fraterizide Funktion gegenüber nicht-kompetenten Pneumokokken diskutiert [28]. Dieses als LytA bezeichnete Autolysin degradiert die Peptidoglykane der Zellwand, wodurch die intrazellulären Toxine freigesetzt werden [29]. In der experimentellen bakteriellen Meningitis wirkt es virulenzsteigernd [30].

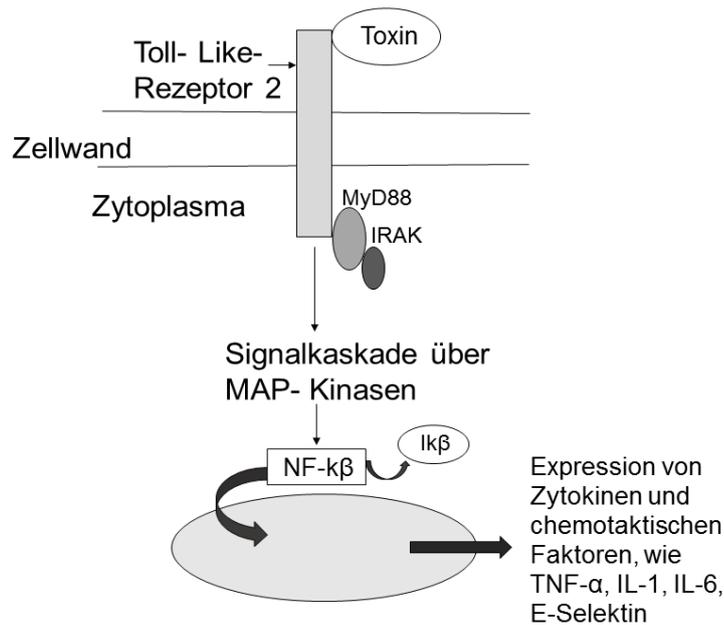
### **1.3 Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis**

#### **1.3.1 Bakterielle Invasion**

Bei Vorliegen einer Bakteriämie können Pneumokokken durch aktive oder passive Invasionsmechanismen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Pneumokokken binden an zerebrovaskuläre Endothelzellen durch Interaktion von CbpA (Oberflächenprotein für Adhärenz) mit dem Lamininrezeptor [31] bzw. von Neuraminidase A mit dem Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1) [32, 33]. Anschließend wird durch Bindung von bakteriellem Phosphorylcholin an den PAF-Rezeptor (Plättchenaktivierender Faktor) ein Clathrin-vermittelter Transzytosevorgang ausgelöst [34]. Außerdem können Pneumolysin und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) die Apoptose von Endothelzellen induzieren, so dass eine parazelluläre Invasion ermöglicht wird.

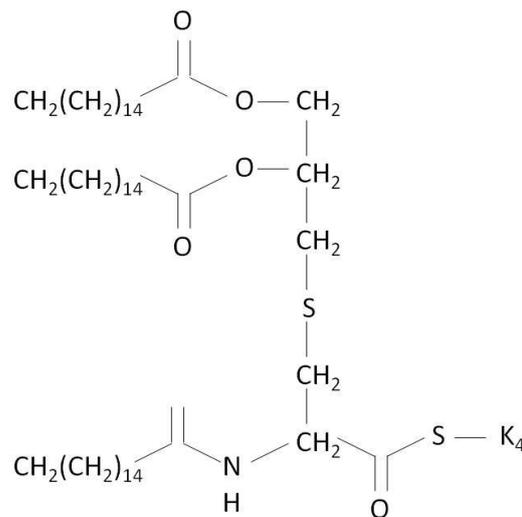
### 1.3.2 Induktion der Immunantwort über Pattern-Recognition-Rezeptoren

Im Liquor finden die Bakterien ideale Wachstumsbedingungen vor und vermehren sich rapide. Während der Zellteilung werden Bakterienbestandteile freigesetzt, die von Zellen des angeborenen Immunsystems mittels sogenannter *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRR) anhand konservierter molekularer Motive, sogenannter *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) erkannt werden [35]. Von besonderer Bedeutung bei der Detektion grampositiver Erreger ist der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2). TLR2 erkennt die in der Zellwand grampositiver Bakterien enthaltenen Peptidoglykane und Lipoteichonsäure (Abb. 2) [36], sowie bakterielle Lipopeptide [37-39]. Gram-negative Erreger interagieren dagegen hauptsächlich über das von ihnen gebildete Lipopolysaccharid (LPS) mit TLR4 [40]. TLR2 und TLR4 führen zur Aktivierung derselben intrazellulären Signalkaskade. Über das Adaptermolekül MyD88 (*myloid differentiation primary response gene 88*) wird am zytoplasmatischen Abschnitt die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) gebunden und durch Autophosphorylation aktiviert. Im Weiteren führen *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B), der nach Translokation in den Zellkern die Expression der Gene für *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), IL-12 und das endotheliale (E-) Selektin fördert. Die Zytokine führen in Endothelzellen zur Aktivierung und Hochregulation von Adhäsionsmolekülen [41-43]. Als Folge werden zirkulierende Granulozyten und Monozyten aus dem Blutstrom über die Blut-Liquor-Schranke rekrutiert. Im Liquor findet sich eine massive Zunahme der Leukozytenzahl (Pleozytose). Die eingewanderten Leukozyten produzieren ihrerseits Zytokine, die die Inflammation verstärken [44]. Allerdings kann die wirtsseitige Immunantwort bakterielles Wachstum und Toxinproduktion im Liquorraum nicht allein unterbinden, da die Bestandteile des Immunsystems - insbesondere das zur effektiven Phagozytose notwendige Komplementsystem - in diesem Kompartiment keine ausreichenden Konzentrationen erreichen.



**Abbildung 2:** TLR2- Signalkaskadenweg. Durch Bindung von Bakterien bzw. Bakterienbestandteilen an den TLR2 Rezeptor wird ein Kaskadenweg ausgelöst, der zur Produktion von Zytokinen führt. Adaptiert nach [45].

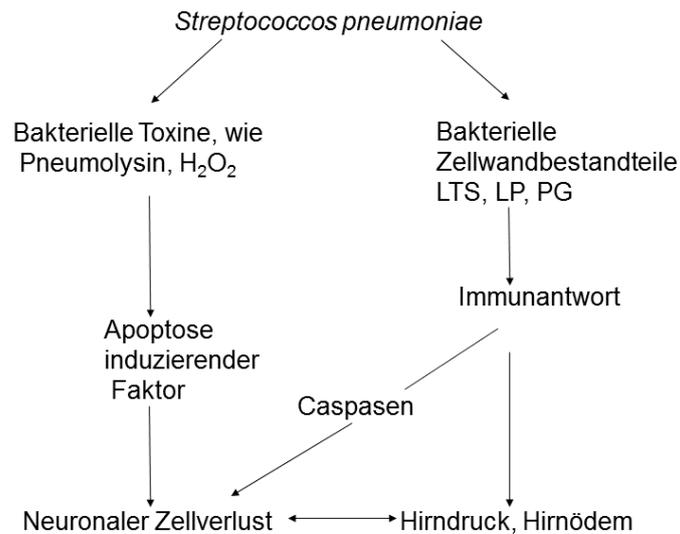
Die zentrale Bedeutung der dargestellten Interaktion von Bakterienbestandteilen mit PRR des innate Immunsystems wurde bereits 1984 herausgearbeitet. Tuomanen und Kollegen konnten damals zeigen, dass die intrathekale Gabe einer sterilen Präparation aus Pneumokokkenzellwänden ausreichend ist, um eine meningeale Inflammation wie bei bakterieller Meningitis auszulösen [46]. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben seitdem gezeigt, dass eine identische meningeale Entzündungsreaktion auch durch die intrathekale Injektion von N-palmitoyl-S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl)-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sup>3</sup>-Lysin (Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>) ausgelöst werden kann [47]. Bei Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (Abb. 3) handelt es sich strukturell um ein bakterielles Lipopeptid, das jedoch vollständig synthetisch hergestellt wird [48]. Es wirkt als selektiver und spezifischer Agonist an TLR2-Rezeptoren.



**Abbildung 3:** Strukturformel des synthetischen bakteriellen Lipopeptids Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (*N*-palmitoyl-*S*-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cysteinylyl-seryl-(lysyl)3-Lysin). Adoptiert nach [49].

An der Entstehung der neuronalen Schäden in der Pneumokokkenmeningitis sind neben den bakteriellen Exotoxinen wie Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25, 50] in ebenso bedeutsamem Umfang schädigende Effekte der wirtsseitigen Immunreaktion beteiligt (Abb. 4) [26, 51]. Aktivierte Effektorzellen des Immunsystems setzen zytotoxische Stoffwechselprodukte wie freie Radikale und Proteasen frei, die in vielfältiger Weise Struktur und Stoffwechselfunktionen auch körpereigener Zellen direkt schädigen können [52]. Zusätzlich werden Zytokine wie TNF- $\alpha$  vermehrt gebildet, die Caspasen in Neuronen aktivieren und somit zur Induktion von Apoptose beitragen [53]. Im klinischen Kontext sind diese Vorgänge insofern von besonderer Bedeutung, da die übliche Therapie der bakteriellen Meningitis mit bakteriziden Antibiotika zu einer massiven Lyse der Bakterienzellwände führt. Folge ist eine paradoxe weitere Stimulation der Inflammationsantwort, die die wirtsseitige Neurotoxizität auch nach vollständiger mikrobiologischer Sanierung weiter verstärkt. Bei effektiver antibiotischer Therapie ist somit von einer überwiegend kontraproduktiven Rolle der wirtsseitigen Entzündungsreaktion auszugehen.

Die Teilprojekte dieser Arbeit haben das übergeordnete Ziel, die inflammatorischen Vorgänge in einem Mausmodell der bakteriellen Meningitis genauer zu charakterisieren, um ggf. Ansatzpunkte für die Entwicklung antiinflammatorischer oder neuroprotektiver Strategien zu identifizieren.



**Abbildung 4:** Pathologie der *Streptococcus pneumoniae*: Am neuronalen Zellverlust wirken apoptoseinduzierende Toxine der Bakterien und schädigende Effekte der wirtseigenen Immunantwort mit. LTS = Lipoteichonsäure; LP = Lipopeptide; PG = Peptidoglykane. Adaptiert nach [54].

#### 1.4 Rolle von TPO bei der bakteriellen Meningitis

Chemokine und Zytokine spielen vielfältige Rollen in der bakteriellen Meningitis. Proinflammatorische Zytokine sind im Liquor von Patienten mit Pneumokokkenmeningitis und bei experimenteller Meningitis erhöht, darunter TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 [55, 56]. TNF- $\alpha$  trägt bei der Pneumokokkenmeningitis zur Induktion der neuronalen Apoptose bei [53]. Als Gegenspieler von proapoptotischen Zytokinen treten Moleküle mit antiinflammatorischer oder neuroprotektiver Wirkung auf. Weitreichende Forschungsergebnisse liegen zu neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekten des hämatopoetischen Zytokins Erythropoietin vor [57]. So führt Erythropoietin zur einer Verringerung der verzögerten Apoptose nach experimentellem Hirninfarkt [58, 59]. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein weiteres hämatopoetisches Zytokin, Thrombopoietin (TPO).

TPO ist ein 70 kDa großes Glykoprotein, das vorwiegend in Leber, Niere und Skelettmuskel synthetisiert wird und die Bildung und Differenzierung der Megakaryozyten fördert [60, 61]. Sein Rezeptor c-Mpl [56] wird in verschiedenen Hirnregionen und Entwicklungsstadien auch in humanen Neuronen und Gliazellen

exprimiert [62-64]. Während der Gehirnentwicklung fördert TPO die neuronale Apoptose [64]. Bei systemischen Infektionen wird die TPO-Expression über IL-6 stimuliert [65-67]. Experimentelle Befunde zeigen in Hepatozyten eine über Thrombopoietin Rezeptor (c-Mpl) vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [68], während in einer Leberendothelzelllinie die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 hochreguliert werden [69]. Da in der bakteriellen Meningitis ähnliche Signalprozesse induziert werden, bestand somit die Frage, ob TPO über den Rezeptor c-Mpl zur Mikrogliaaktivierung und zur infektiös-entzündlichen Neurodegeneration in der bakteriellen Meningitis beiträgt.

### **1.5 Zelluläre Immunität in der bakteriellen Meningitis**

Serielle Untersuchungen in der bakteriellen Meningitis belegen einen sehr raschen Einstrom von neutrophilen Granulozyten in den Subarachnoidalraum, die in der hochakuten Phase mehr als 95 % der im Liquor angetroffenen Leukozyten darstellen. Folglich gelten neutrophile Granulozyten als zentrales und primäres Element in der Immunreaktion bei bakterieller Meningitis. Sie werden zum größten Teil im Knochenmark gebildet und zirkulieren für wenige Stunden in der Blutbahn, bevor sie in der Milz und anderen lymphatischen Organen durch kontrollierte Apoptose eliminiert werden. Alternativ werden sie über Chemokingradienten an Entzündungsorten rekrutiert. Unter physiologischen Bedingungen werden im Liquor keine Granulozyten angetroffen. Aus früheren Untersuchungen in Tiermodellen ist bekannt, dass Inflammationsantwort und neuronaler Zellverlust bei experimentell induzierter Agranulozytose abgemildert sind [47, 70], wobei auch die Konzentration anderer Leukozyten im Liquor drastisch reduziert ist. Dies legt eine aktive Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Regulation der Entzündungsreaktion nahe, die über eine reine Effektorfunktion hinausgeht.

Bei abklingender bakterieller Meningitis, z.B. nach erfolgreicher antibiotischer Therapie - nehmen der Anteil der Neutrophilen und die Gesamtzellzahl im Liquor allmählich ab, wobei Monozyten und Lymphozyten zunehmend in den Vordergrund treten [47]. Auch Monozyten zirkulieren nach ihrer Herstellung im Knochenmark in der Blutbahn. Zusätzlich werden sie in der Milz und weiteren Organen gespeichert und können an Entzündungsorte rekrutiert werden, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Zu ihren Aufgaben gehört die Entfernung von neutrophilen Granulozyten, die nach Phagozytose

von Erregern, im Rahmen des oxidativen Bursts oder bei der Nekrose abgestorben sind [71]. Somit werden die Monozyten in der Meningitis eher als Teil einer passiven Abräumreaktion eingeordnet.

Während die bakterielle Meningitis als Domäne der innate Immunität angesehen wird [72], werden Lymphozyten dem adaptiven Immunsystem zugeordnet. Dabei stellen B-Zellen die Vorstufe von Plasmazellen dar, die für die Bildung von Immunglobulinen verantwortlich sind, während effektorische T-Zellen infizierte oder maligne transformierte körpereigene Zellen abtöten. Beiden Aspekten kommt in der manifesten Pneumokokkenmeningitis vermutlich keine wesentliche Bedeutung zu. Allerdings wurden in den vergangenen Jahren zusätzliche Differenzierungsformen und Aufgaben von T- und B-Lymphozyten beschrieben, zu denen regulatorische Funktionen sowie Phagozytose und Antigenpräsentation gehören [73-75].

## **1.6 Ziele der Arbeit und zugehörige Hypothesen**

### **1.6.1 Rolle des Thrombopoietin-Signalweges in der bakteriellen Meningitis**

Mit Blick auf eine mögliche Rolle als Modulator von Entzündung und neuronalem Schaden in der bakteriellen Meningitis war zunächst von Interesse, ob die Zellen des zentralen Nervensystems nach bakterieller Stimulation TPO bilden. In einem parallelen *in vitro*-Projekt an Primärkulturen (Mikroglia, Astrozyten und Endothelzellen) aus Rattenhirnen, welches nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde nach der Stimulation mit LPS eine Hochregulation der Tpo mRNA in mikrovaskulären Endothelzellen gefunden, während die mRNA-Expression in Astrozyten und Mikroglia transient reduziert war. Alle getesteten Zellen exprimierten den Tpo-Rezeptor, ohne dass eine Regulation durch LPS zu verzeichnen war [76].

Im hier vorgestellten Projekt sollten nun die Regulation und die biologischen Effekte von TPO und seinem Rezeptor *in vivo* in einem etablierten Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis untersucht werden. Ausgehend vom dargestellten Kenntnisstand zur Biologie von TPO und den eigenen *in vitro* Voruntersuchungen wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Nach Meningitisinduktion in Wildtypmäusen ist eine vermehrte Expression von Tpo mRNA und eine erhaltene Expression von c-Mpl im Hirngewebe nachweisbar
- c-Mpl-defiziente (c-Mpl<sup>-/-</sup>)-Mäuse zeigen einen abgemilderten Krankheitsverlauf mit Verminderung des neuronalen Schadens und verminderter Mikrogliaaktivierung
- Intrathekale Applikation von rekombinantem Thrombopoietin (rTPO) führt zu einer Verstärkung des neuronalen Schadens.

### **1.6.2 Rolle von Lymphozyten in der bakteriellen Meningitis**

Mit Blick auf neu beschriebene regulatorische Funktionen von Lymphozyten, sowie weitere Fähigkeiten wie Phagozytose und Antigenpräsentation, sollte untersucht werden, ob sich eine Modulation der immunologischen und neuropathologischen Befunde, sowie des klinischen Krankheitsverlaufs der akuten Meningitis durch B- und T-Zellen belegen lässt. Hierfür sollten RAG-1-defiziente Mäuse, die keine reifen B- und T-Zellen bilden können, mit Wildtypmäusen verglichen werden. Es wurde vermutet, dass bei Abwesenheit von Lymphozyten nachweisbare Unterschiede bestehen hinsichtlich:

- der Rekrutierung von Leukozyten in den Subarachnoidalraum
- der Aktivierung der Mikroglia
- der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Hirnparenchym
- des meningitisassoziierten neuronalen Schadens
- klinischer Krankheitszeichen.

Ferner wurde postuliert, dass durch periphere Immunrestitution zwischen RAG-1-defizienten und Wildtyp-Mäusen divergente Befunde in der Meningitis partiell ausgeglichen werden können.

### **1.6.3 Rolle von Granulozyten und Monozyten in der Induktion und Regulation der Entzündung in der Akutphase der bakteriellen Meningitis**

Wie dargestellt, wurden bislang immunkompetente hirneigene Zellen (Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen) als wesentliche Träger der Wächterfunktion gegenüber invadierenden Bakterien angesehen, die nach ihrer Aktivierung durch Regulation von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen im Blut zirkulierende Granulozyten und Monozyten sekundär rekrutieren. Welchen Beitrag die in geringer Zahl im Subarachnoidalraum vorhandenen myeloiden Zellen leisten, ist hingegen nicht ausreichend geklärt. Im hier dargestellten Teilprojekt sollte untersucht werden, ob die isolierte Aktivierung von Monozyten oder Granulozyten im Subarachnoidalraum durch Bakterienbestandteile in der Lage ist, eine Inflammationskaskade und typische Aspekte der Meningitis in Gang zu setzen.

Das Projekt umfasste zunächst die Entwicklung eines Tiermodells, bei dem TLR2-positive Leukozyten aus der Milz von Wildtypmäusen gewonnen, *ex vivo* durch Inkubation mit dem selektiven TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> aktiviert und dann in den Subarachnoidalraum TLR2-defizienter Mäuse injiziert werden sollten. Im Weiteren sollte dann auf aufgereinigte Granulozyten bzw. Monozyten als Spenderleukozyten zurückgegriffen werden.

Dabei waren folgende Teilziele umzusetzen:

- Entwicklung eines Protokolls zur Gewinnung von Splenozyten sowie der optimalen Kultur- und Stimulationsbedingungen
- Nachweis der Meningitisinduktion durch die intrathekale Injektion der mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> aktivierten Wildtypsplenozyten in TLR2-defizienten Mäusen
- Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen
- Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls für Granulozyten und Monozyten als TLR2-positive Spenderleukozytenfraktionen.
- Durchführung von Pilotexperimenten sowie der eigentlichen Tierexperimente.

Dabei wurden folgende Hypothesen zugrunde gelegt:

- 
- Durch Inkubation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> lassen sich Splenozyten, sowie die aus ihnen mittels MACS isolierten Granulozyten und Monozyten zuverlässig aktivieren
  - Durch Transfer nativer, nicht aktivierter Spenderleukozyten wird keine meningeale Inflammation ausgelöst
  - Aktivierte Wildtyp-Monozyten, nicht aber aktivierte Granulozyten induzieren nach intrathekalem Transfer in TLR2-defiziente Mäuse eine meningeale Entzündungsantwort mit Einstrom wirtseigener Leukozyten in den Subarachnoidalraum.

## 2. Materialien

### 2.1 Reagentien

*Tabelle 1: Verwendete Chemikalien*

| <b>Chemikalienbezeichnung</b>                              | <b>Firma</b>                |
|--|-----------------------------|
| 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid | Sigma-Aldrich               |
| 5xMMLV-Puffer  | Promega                     |
| Actinomycin-D  | Sigma-Aldrich               |
| Amylalkohol  | Roth                        |
| Blutagarplatten  | Merck                       |
| Bovines Serumalbumin                                       | Sigma-Aldrich               |
| Chloroform   | Roth                        |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)                       | Sigma-Aldrich               |
| Di Natriumhydrogenphosphat dihydrat                        | Roth                        |
| Dimethylsulfoxid   | Sigma-Aldrich               |
| Di-Natriumhydrogenphosphat                                 | Roth                        |
| dNTP Mix (2,5 mM jeder)                                    | Roche                       |
| DTT 0,1 M  | Promega                     |
| Dulbecco's MEM- Medium                                     | Biochrom AG                 |
| Erythromycin   | Biochrom AG                 |
| Erythrozyten-Lysis-Puffer                                  | Miltenyi Biotec             |
| Essigsäure   | Roth                        |
| Ethanol  | Roth                        |
| Ethylenediaminetetraessigsäure (EDTA)                      | Sigma-Aldrich               |
| Fetales bovine Serum                                       | Biochrom AG                 |
| Hoechst 33258  | Invitrogen Life Technologie |
| Isopropanol  | Roth                        |
| Kaliumhydroxid   | Roth/ Fluka                 |
| Ketamin  | Delta Selekt                |
| Kristallviolett  | Sigma-Aldrich               |
| L-Glutamin   | Biochrom AG                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Lipopysaccharid                              | Sigma-Aldrich             |
| Methanol                                     | Roth                      |
| Methylbutan                                  | Roth                      |
| MMLV-RT 200 U/ $\mu$ l                       | Promega                   |
| Natriumcarbonat                              | Merck                     |
| Natriumchlorid                               | Merck                     |
| Neurobasales Medium                          | ThermoFisher Scientific   |
| Normal Goat Serum                            | Biochrome AG              |
| Nitroblau-Tetrazolium                        | Biomol                    |
| Pam <sub>3</sub> Cys-SK <sub>4</sub> x 3 HCL | EMC microcollections GmbH |
| Paraformaldehyd                              | Sigma-Aldrich             |
| Penicilin-Streptomycin                       | Biochrom AG               |
| Percoll                                      | Amersham-Pharmacia        |
| Phorbol 12-Myristate 13- Acetate             | Sigma-Aldrich             |
| Propidium Iodid                              | Invitrogen                |
| Random Hexamere                              | Roche                     |
| recombinantes Thrombopoietin                 | ImmunoTools               |
| RNA-sin 40U/ $\mu$ l <sub>2</sub>            | Qiagen                    |
| RPMI 1640- Medium                            | Biochrom AG               |
| RQ1 RNase- freie Dnase                       | Qiagen                    |
| RQ1 Rnase-freie Dnase 10x Puffer             | Qiagen                    |
| Natrium ( <i>Sodium</i> )- Dodecylsulfat     | Roth                      |
| Thiopenthal-Natrium                          | Sandoz                    |
| Tissue Tek                                   | ThermoFisher Scientific   |
| TNF- $\alpha$ Standard                       | R&D                       |
| Triton X                                     | Sigma-Aldrich             |
| TRizol Reagent                               | Invitrogen                |
| Trypanblau                                   | Sigma-Aldrich             |
| Trypsin/EDTA                                 | Biochrom AG               |
| Türksche Lösung                              | Merck                     |
| Xylazin                                      | Bayer                     |

## 2.2 Kommerzielle Puffer und Kits

*Tabelle 2: Kommerzielle Puffer und Kits*

| <b>Bezeichnung</b>                                 | <b>Firma</b>      |
|--|-------------------|
| Anti-Ly-6G MicroBead Kit mouse                     | Miltenyi Biotec   |
| CD 11b MicroBeads mouse/human                      | Miltenyi Biotec   |
| CD4- CD8a- CD19- MicroBeads mouse                  | Miltenyi Biotec   |
| FASTSTAR Universal Kit                             | Roche Diagnostics |
| LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I- Kit | Roche Diagnostics |
| peqGold TriFast                                    | Peqlab (VWR)      |
| TUNEL- Kit Apoptag                                 | Qbiogene          |

## 2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

*Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterial*

| <b>Bezeichnung</b>                      | <b>Firma</b>     |
|---|------------------|
| 1,5 ml Reaktionsgefäße                  | Eppendorf        |
| 50 µl Glasspritze                       | Hamilton         |
| 0,45 µm Mediumfilter                    | Becton Dickenson |
| AutoMACS Separator                      | Miltenyi Biotec  |
| Batterflay- Kanülen (27G)               | BD Biosciences   |
| FACS- Calibur                           | BD Biosciences   |
| FACS- Filter                            | BD Biosciences   |
| FACSAria                                | BD Biosciences   |
| FACS-Canto II                           | BD Biosciences   |
| Flaschenfilter 0,22 µm (150 ml, 500 ml) | Corning Scicor   |
| Fluoreszenzmikroskop                    | LEICA DMRA (I)   |
| Fuchs-Rosenthal- Kammer                 | Roth             |
| Filter zum steril Filtrieren            | Becton Dickinson |
| Hautklammern                            | Becton Dickinson |
| CO <sub>2</sub> - Inkubator IG 150      | Jouan            |

|                                       |                               |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Kanüle                                | BD Biosciences                |
| Kryoröhrchen                          | Sarstedt                      |
| Kryostat                              | LEICA CM 1950                 |
| Lichtmikroskop                        | Nikon Labophot 2              |
| LightCycler 1.5 (Real-Time-PCR-Gerät) | Roche Diagnostics G           |
| LightCycler 1.5 Zentrifuge            | Roche Diagnostics G           |
| LightCycler 1.5 Computer              | Roche Diagnostics G           |
| MS- Säulen                            | Miltenyi Biotec               |
| Objektträger SuperFrost               | R. Langenbrinck               |
| Operationsbesteck                     | FST Fine Science Tools        |
| Operationsmikroskop DMIL              | LEICA MS 5                    |
| Petrischalen                          | Falcon                        |
| Photometer                            | Thermo Spektronic             |
| Pipetten (2,5,10,25 ml)               | Falcon                        |
| Reader                                | mRX5                          |
| Schüttler                             | Edmund Bühler                 |
| Sterile Werkbank                      | Heraeus                       |
| Tischzentrifuge 5415 D                | Eppendorf                     |
| Waage                                 | Kern EG                       |
| Zellkultur- Kunststoffmaterialien     | Falcon                        |
| Zentrifuge                            | Sigma 3 K30                   |
| Mixer                                 | Scientific Industries Genie 2 |

## 2.4 FACS- Antikörper sekundäre Farbstoffe

**Tabelle 4:** FACS- Antikörper sekundäre Farbstoffe

| Name (Rat anti-Maus) | Isotyp                        | Konjugation   | Firma                      |
|----------------------|-------------------------------|---------------|----------------------------|
| B220                 | Rat IgG2a, κ                  | APC           | BioLegend                  |
| CD11b                | Rat IgG2b, κ                  | APC           | Miltenyi Biotec            |
| CD11b                | Rat IgG2b, κ                  | PE            | BD Pharmingen              |
| CD16/32              | Rat IgG2b, κ/<br>Rat IgG2a, λ | -             | BD Pharmingen<br>BioLegend |
| CD3                  | Rat IgG2b, κ                  | FITC          | BD Pharmingen              |
| CD4                  | Rat IgG2a, κ                  | FITC          | BD Pharmingen              |
| CD45                 | Rat IgG2b, κ                  | APC           | BD Pharmingen              |
| CD45                 | Rat IgG2b, κ                  | APC/Cy7       | BioLegend                  |
| CD8                  | Rat IgG2a, κ                  | Cy7/PE        | BioLegend                  |
| Gr1                  | Rat IgG2a, κ<br>Rat IgG2b, κ  | Cy7/PE<br>APC | BD Pharmingen<br>BioLegend |
| Gr1                  | Rat IgG2b, κ                  | PE            | Miltenyi Biotec            |

## 2.5 Immunhistologische Antikörper

**Tabelle 5:** Immunhistologische Antikörper

| Name  | Isotyp       | Firma                  |
|---|--------------|------------------------|
| Rat anti-Maus F4/80, monoklonal                         | Rat IgG2b    | AbD Serotec            |
| Rat anti-Maus CD11b, monoklonal                         | Rat IgG2b, κ | BD Pharmingen          |
| Texas Red konjugierte sekundär AK<br>(goat anti-rat)    | Goat IgG     | Jackson ImmunoResearch |
| DyLight 649 konjugierte sekundäre AK<br>(goat anti-rat) | Goat IgG     | Jackson ImmunoResearch |

**2.6 Angesetzte Lösungen und Medien**MACS-Puffer (1 L)

1 L PBS

0,7445 g EDTA (2 mM)

0,5 g BSA (0,5 %)

FACS- Puffer (1 L)

1 L PBS

10 g BSA (1 %)

MACS- Elutionslösung (1 L)

1L PBS

0,7445 g EDTA (2 mM)

Blockierlösung (400 µl)

3,76 ml PBS

120 µl NGS (3 %)

120 µl Triton X (0,3 %)

4 % Paraformaldehyd (100 ml)

4 g PFA

100 ml Sörensenpuffer (0,1 M)

C+Y-Medium zur Bakterienanzucht

siehe Anhang

Sörensenpuffer (500 ml)2,758 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>14,232 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>MTT-Stammlösung

5 mg MTT-Salz

1 ml PBS

Glia-Medium

500 ml DMEM L-Glut (2 mM L-Glutamin, 0,1 % Glucose)

50 ml FBS

5 ml Penicillin-Streptomycin

5 ml Na-Pyruvat

Wachstumsmedium

500 ml NBM-Medium  
10 ml B27 Supplement  
5 ml Penicillin-Streptomycin  
1,25 ml L-Glutamin

L929-Medium

500 ml VLE-RPMI m stabilem L-Glutamin  
37,5 ml FBS

10 % SDS

50 ml SDS  
450 ml 0,1M HCl

RPMI+ 10 % FKS-Medium

50 ml FKS  
450 ml RPMI-Fertigmedium

RAW 264.7-Medium

500 ml VLE-RPMI mit stabilem L-Glutamin  
50 ml FBS  
5 ml Na-Pyruvat

Narkosemittel

2 ml 0,9 % pyrogenfreies NaCl  
1 ml Ketamin (100 mg/ml)  
125 µl Xylazin (20 mg/ml)

## 2.7 Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden von Dr. Elaine Tuomanen (Children's Infection Defense Cente Memphis, USA) zur Verfügung gestellt.

Wildtyp: D39 *Streptokokkus pneumoniae*, bekapselt, Serotyp II

Mutanten: Peroxidase-defizienten *S. pneumoniae*:  $\Delta spxB$

Pneumolysin-defizienten *S. pneumoniae*:  $\Delta pln$

## 2.8 Versuchstiere

**Tabelle 6:** Verwendete Mausstämmen (*Mus musculus*):

| Stammbezeichnung   | Alter           | Tierhaltung   | Quelle |
|--|-----------------|---|--------|
| C57BL/6J   | 8-20<br>Wochen  | Charles River   | -      |
| c-Mpl <sup>-/-</sup><br>(C57bl/6J-Mpl <sup>h1b219</sup> )                            | 8-12<br>Wochen  | Zucht im<br>Forschungseinrichtungen<br>für Experimentelle<br>Medizin, FEM | [77]   |
| RAG-1 <sup>-/-</sup><br>B6.129-Tlr2 <sup>tm1Kir/J</sup><br>(Rag1 <sup>tm1Mom</sup> ) | 12-16<br>Wochen | Eigene Nachzucht im<br>Neuro-<br>wissenschaftliches<br>Forschungszentrum  | [78]   |
| TLR-2 <sup>-/-</sup><br>(B6.129-Tlr2 <sup>tm1Kir/J</sup> )                           | 16-20<br>Wochen | Eigene Nachzucht in der<br>experimentellen<br>Neurologie                  | [79]   |
| EGFP <sup>+/+</sup><br>(ACT $\beta$ -EGFP)   | 16-20<br>Wochen | Eigene Nachzucht im<br>Neuro-<br>wissenschaftliches<br>Forschungszentrum  | [80]   |

## **3. Methoden**

### **3.1 Versuchstiere**

Alle Tierexperimente wurden gemäß FELASA-Richtlinien durchgeführt. Die zugehörigen Tierversuchsanträge wurden von der zuständigen Landesbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales, LaGeSo) G0295/06 (Thrombopoietin-Projekt) und G0009/08 (Untersuchungen zu Leukozytenpopulationen) genehmigt. Die Tiere wurden in den Tierhaltungseinrichtungen der Charité aufgezogen oder von Firma Charles River bestellt. Pro Käfig wurden 4-6 Tiere gehalten.

Abhängig von der Fragestellung wurden C57/Bl6J- Wildtyp-Mäuse oder genetisch veränderte Mäuse desselben Hintergrundes eingesetzt. Die einzelnen Stämme sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

### **3.2 Immunrekonstitution**

Eine Untergruppe der RAG1-defizienten Mäusen erhielt zur peripheren Immunrekonstruktion 24 h vor Beginn des eigentlichen Experiments mittels Injektion in die Schwanzvene  $1,5 \times 10^7$  Lymphozyten, die zuvor aus dem Milzgewebe von Wildtyp-Donortieren isoliert worden waren (siehe Punkt 3.4.2). Durch diese Experimente sollte geklärt werden, ob eine Immunrekonstitution der RAG-1-defizienten Mäuse zur Minderung des neuronalen Schadens führt.

### **3.3 *In vivo*-Modell der bakteriellen Meningitis**

Für die Experimente wurden hauptsächlich 8 bis 16 Wochen alte Mäuse verwendet. Die Operationsmethode stellt eine Modifikation eines Protokolls dar, das in der Arbeitsgruppe etabliert worden war [46, 51]. Vor Beginn des Experimentes wurde das Körpergewicht bestimmt. Anschließend wurde zur Narkoseeinleitung 50 µl pro 10 g Körpergewicht Narkosemittel (siehe 2.6) eingesetzt. Eine ausreichende Narkosentiefe wurde anhand fehlender Reaktion auf Schmerzreize am Schwanz verifiziert. Danach wurde unter einem Operationsmikroskop die lumbale Wirbelsäule durch eine dorsale Längsinzision der Haut von ca. 1 cm Länge freipräpariert. Um eine Hypothermie zu vermeiden erfolgte dies auf einer geheizten Wärmeplatte.

Anschließend wurde ebenfalls unter mikroskopischer Kontrolle der Zwischenwirbelraum unterhalb des Dornfortsatzes L2 oder L3 mit einer 30G- Kanüle punktiert und ein Injektionsvolumen von 40 µl mittels Hamilton-Spritze sehr langsam intrathekal appliziert. Abhängig von der Fragestellung handelte es sich um eine Suspension aus lebenden Pneumokokken (500.000 KBE je Tier), um das bakterielle synthetische Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CycSK<sub>4</sub> (10 µg je Tier) oder um aktivierte Spenderleukozyten (1,5-5 x 10<sup>6</sup> je Tier, siehe 3.7.2). Den Kontrolltieren wurden unter gleichen Bedingungen 40 µl pyrogenfreies PBS injiziert, das in den übrigen Fällen als Trägerlösung diente.

Nach Ende der Injektion wurde die Wunde mit Hautclips verschlossen. Die Mäuse wurden in den Käfig zurückgesetzt und bis zum Erwachen aus der Narkose nachbeobachtet. Bis zum Ende des Versuches wurden die Mäuse unter Standardbedingungen gehalten.

#### **3.3.1 Tight-rope-Test**

Nach 24 Stunden wurden die Mäuse erneut gewogen, danach folgte der klinische Funktionstest, der sogenannte *tight-rope*-Test [81]. In diesem Test wurde die Zeitdauer gemessen, während der das Versuchstier sich an einem horizontal aufgespannten geflochtenen Faden (Fadenstärke 1 mm) festhalten kann. Die Maus wurde am Schwanz gehalten bis sie den Faden sicher mit beiden Vorderpfoten ergriffen hat. Mit einer Stoppuhr wurde gemessen, wann die Maus den Halt verloren hat. Herabfallende Tiere wurden mittels einer weich gepolsterten Schachtel aufgefangen. Falls es nicht zum Sturz gekommen war, wurde das Experiment nach 30 s beendet.

#### **3.3.2 Liquor- und Gehirnentnahme**

Nach dem *tight-rope*-Test wurden die Mäuse mit Thiopenthal (100 mg/kg oder mehr i.p.) tief narkotisiert. Unter dem Präparationsmikroskop wurden durch eine nuchale Längsinzision die Kallotte und der kraniozervikale Übergang freigelegt. Nach stumpfer Präparation der Nackenmuskulatur wurde die Cisterna magna dargestellt. Danach wurde die Dura mater mit einer 27G-Butterfly-Kanüle, die mit einer Hamilton-Mikroliterspritze verbunden war, punktiert. Durch vorsichtige Aspiration wurde eine Liquorprobe von 5-10 µl gewonnen. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, um Blutproben aus dem linken Vorhof zu entnehmen. Nach Kanülierung des linken

Ventrikels wurden die Mäuse mit PBS, 0,9 % NaCl oder 4 % PFA transkardial perfundiert und die Gehirne entnommen. Für histologische und biochemische Untersuchungen wurde das Gewebe in Methylbutan auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Um die Aktivierung der Mikroglia und die Einwanderung der Granulozyten zu untersuchen, wurde NaCl-perfundiertes Hirngewebe (linke Hirnhemisphären) entnommen und von einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Prof. Dr. Stenzel, Institut für Neuropathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin) direkt weiterverarbeitet. Hierzu erfolgte die Zellisolation von Immunzellen aus dem Parenchym mittels Percoll-Gradienten oder FACS-Sortierung.

#### **3.3.3 Bestimmung der Leukozytengesamtkonzentration**

Zur Bestimmung der Leukozytengesamtkonzentration wurden unverdünnte Liquorproben nativ mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer manuell ausgezählt. Der Anteil von EGFP-positiven Spenderleukozyten wurde in den betreffenden Versuchen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Zur Differenzierung der Leukozytenpopulationen wurden Liquorproben mit Türkischer Lösung gefärbt und der relative Anteil von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten aus 100 bis 200 Zellen bestimmt.

#### **3.3.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration im Liquor**

Um die Bakterienkonzentration im Liquor und im Blut zu bestimmen, wurden die Proben in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  Koloniebildenden Einheiten (KBE) auf Blutagarplatten ausgestrichen, über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend manuell ausgezählt.

### **3.4 Präparation von Leukozyten aus Geweben**

#### **3.4.1 Isolation von Leukozyten aus Gehirngewebe**

Die Quantifizierung des Aktivierungszustandes von Leukozytenpopulationen im Hirngewebe erfolgte durch kooperierende Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stenzel und war somit nicht Teil meiner Promotionsleistung. Nach transkardialer Perfusion mit 0,9 % NaCl wurden hierzu Einzelzellen durch mechanische Separation aus unfixiertem Hirngewebe gewonnen, mittels Percoll-Gradientenzentrifugation aufgereinigt und mehrmals gewaschen. Nach Blockade des Fc-Rezeptors mit einem CD16/32-Antikörper

wurden die Zellen je nach Fragestellung mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und mittels FACS analysiert. Die gesamte Zellzahl wurde mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer und Trypanblau bestimmt. Die detaillierten Vorgehensweisen können der zugehörigen Publikation entnommen werden [82].

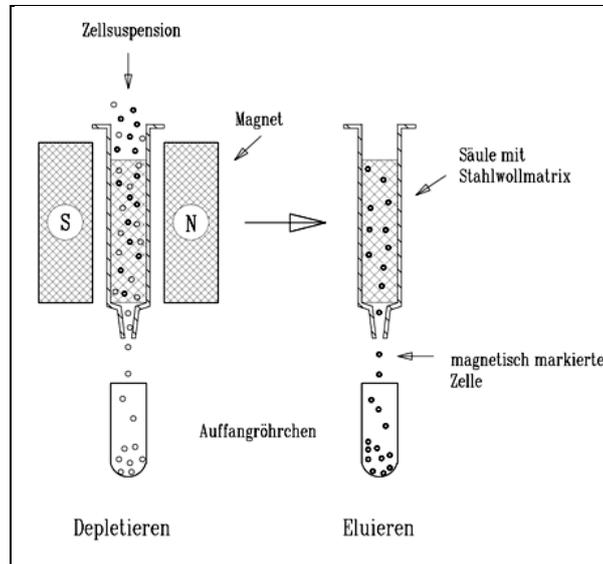
#### **3.4.2 Gewinnung von Splenozyten**

Die in einem Teil der Experimente zur Meningitisinduktion eingesetzten Leukozyten wurden aus Milzen von C57BL/6J- Mäusen oder von EGFP<sup>+/+</sup>-Mäusen isoliert und *ex vivo* aktiviert. Die Donortiere wurden durch Genickbruch getötet und mit Ethanol desinfiziert. Danach wurde die Milz mit sterilen Instrumenten frei präpariert und entnommen. Das Milzgewebe wurde durch ein mit kaltem PBS befeuchtes 100 µm-Sieb in ein 50 ml Falcontube gepresst. Dabei wurde das Gewebe immer wieder mit PBS befeuchtet (8-10 ml PBS pro Milz). Die Splenozyten wurden mit einer Pipette resuspendiert, auf zwei 15 ml Falcontubes verteilt und 10 min bei 300×g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Erythrozyten-Lysepuffer (12 ml pro Milz) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut bei 300×g und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml PBS pro Milz aufgenommen, durch einen 40 µm-Sieb filtriert und erneut 5 min bei 300×g, 4°C zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschgang mit 5 ml RPMI-Medium. Schließlich wurde das Zellpellet in 500 µl RPMI-Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl bzw. -konzentration wurden 10 µl der Suspension in 90 µl Trypanblaulösung verdünnt und mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt.

#### **3.5 Aufreinigung von Zellpopulationen mit MACS**

Zur Aufreinigung von Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Monozyten, T- und B-Zellen) aus den Milzgeweben wurde die magnetische Zellsortierung (MACS) eingesetzt. Für das Verfahren werden Zellen mittels Antikörper gegen zur Identifizierung geeignete Oberflächenproteine markiert, die mit magnetischen Microbeads gekoppelt werden. Dazu können herstellerseitig mit Microbeads konjugierte Antikörper eingesetzt werden. Die Zellsuspension wird anschließend durch eine Säule mit einer Stahlwollematrix geleitet, in der die mit Microbeads beladenen Zellen in Gegenwart eines starken Magnetfeldes retiniert werden, während die nicht markierten Zellen die Säule

ungehindert passieren und als Negativfraktion weiter verarbeitet werden können (Abb. 5). Nach Entfernen des Magnetfeldes werden die markierten Zellen von der Säule eluiert und stehen als Positivfraktion zur Verfügung.



**Abbildung 5:** Magnetische Zellsortierung [83].

### 3.5.1 Magnetic labeling

Für die in der Arbeit durchgeführten Experimente wurden Kits der Herstellerfirma Miltenyi Biotec eingesetzt. Zur Positivselektion von Granulozyten kamen Anti-Ly6-G-Microbeads zum Einsatz. Monozyten wurden mit Anti-CD11b-MicroBeads selektiert. Zur Aufreinigung von Lymphozyten (T- und B-Zellen) wurde eine Mischung bestehend aus Anti-CD4, -CD8 $\alpha$  und -CD19 MicroBeads nach Herstellerangaben eingesetzt.

Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension 12 min bei 300 $\times$ g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200  $\mu$ l MACS-Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Pro 10<sup>8</sup> Zellen wurden 30  $\mu$ l Antikörperlösung hinzugegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 150  $\mu$ l MACS-Puffer und 50  $\mu$ l Anti-Biotin Microbeads je 10<sup>8</sup> Zellen dazu gegeben, sorgfältig vermischt und weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 5-10 ml MACS-Puffer verdünnt und 10 min bei 300 $\times$ g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellen mittels eines 30  $\mu$ m Filters vereinzelt. Zur magnetischen Aufreinigung wurde das AutoMACS-Gerät genutzt. Die positive und negative Fraktion wurden separat gesammelt und entsprechend der Fragestellung weiter verarbeitet.

Die aufgereinigten Lymphozyten wurden für das Rekonstitution-Experiment verwendet. Aufgereinigte Granulozyten wurden für den Aktivitätstest und für *in vivo*-Pilotexperimenten eingesetzt. Monozyten, sowie verbleibenden Zellen (negative Fraktion) wurden für die *in vivo*-Pilotexperimente eingesetzt.

### **3.6 Quantifizierung von Zellpopulationen mittels fluoreszenzaktivierter Zellanalyse (FACS)**

Die durchflusszytometrische Analyse in Kombination mit fluoreszenzmarkierter Immunhistochemie erlaubt es, Zellen anhand ihrer physikalischen Beschaffenheit und des Expressionsgrades ausgewählter Differenzierungsantigene (*cluster of differentiation*, CD) zu identifizieren, zu quantifizieren und zu sortieren. Auch wenn keine Sortierung erfolgt, wird heute für die fluoreszenzgesteuerte Durchflusszytometrie meist der Begriff FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) verwendet. Für die FACS-Analyse werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen Differenzierungsantigene auf der Zelloberfläche inkubiert, die an Fluorochrome gekoppelt sind. Die Zellen werden dann im FACS- Gerät anhand ihrer Größe (*Forward scatter*), Granularität (*Side scatter*) und der von der Expression des Zielantigenes abhängige Fluoreszenzintensität differenziert. Durch Nutzung von Fluorochromen mit verschiedenen Emissionsspektren kann die Expression multipler Antigene gleichzeitig quantifiziert werden. Zudem können abgestorbene Zellen dadurch identifiziert werden, dass sie den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid durch die geschädigte Zellmembran aufnehmen.

Für die FACS- Analyse wurde folgende Fluorochrome verwendet:

**Tabelle 7:** Fluorochrome für die FACS-Analyse

| <b>Fluorochrome</b>                   | <b>Anregungswellenlänge</b> | <b>Detektionswellenlänge</b> |
|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <b>APC</b> =Allophycocyanin           | 595/633/635/647 nm          | 660 nm                       |
| <b>FITC</b> =Fluoresceinisothiocyanat | 488 nm                      | 525 nm                       |
| <b>PE</b> =R-Phycoerythrin            | 488 nm                      | 575 nm                       |
| <b>PE-Cy7</b> = Phycoerythrin-Cyanin7 | 488 nm                      | 690 nm                       |
| <b>PI</b> =Propidiumjodid             | 325/360/488 nm              | 620 nm                       |

### 3.6.1 Überprüfen der Populationsreinheit nach der MACS-Aufreinigung mittels FACS

Bei der Herstellung der Granulozyten- und Monozytenfraktionen aus Splenozyten wurden zur Beurteilung des Sortiererfolgs (Reinheit der aufgearbeiteten Populationen) Multikanal-FACS-Analysen durchgeführt. Das MACS- Protokoll sollte so optimiert werden, dass die Reinheit der Zielpopulation mindestens 90 % betrug. Durch die Färbung mit Propidiumiodid konnte zudem eine Aussage über den Anteil der während der Präparation abgestorbenen Zellen getroffen werden.

Für die FACS- Analyse wurden die positiv und negativ selektierte Fraktion mit Gr1-APC und CD11b-PE -Antikörpern (1:200) markiert. Es wurden Einzelfärbungen und Doppelfärbungen durchgeführt. Hierzu wurden 200.000 Zellen in 30 µl der entsprechenden Mixe aufgenommen und 25 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 300xg herunterzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe eines FACS-Callibur-Gerätes analysiert.

### 3.6.2 FACS-Analyse von aktivierte Mikroglia bzw. Makrophagen aus Hirngewebe

Die FACS-Analyse von aktivierten Mikroglia/Makrophagen aus dem Hirngewebe wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stenzel durchgeführt. Um die Aktivierung der Mikroglia/Makrophagen zu messen, wurden die isolierten Zellen mit CD11b-PE, Gr1-Cy7/PE und CD45-(APC)/Cy7- Antikörpern (1:400, 1:200, 1:200) markiert und 20 min bei 4°C, im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Hilfe eines

FACS-Canto-Gerätes analysiert. Die aktivierte Mikroglia/Makrophagen wurde als CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Population identifiziert, nicht aktivierte als CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>.

### 3.6.3 FACS-Analyse von Zellen aus dem Liquor

Die Liquor-Analyse wurde von Kooperationsarbeitsgruppe von Dr. Stenzel durchgeführt. Hierzu wurden die Liquorzellen mit CD11b-PE-, CD3-FITS-, Gr1-PE/Cy7-, B220-APC-Antikörpern (1:400; 1:200; 1:400; 1:400) markiert und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die inflammatorische Monozyten wurden als CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>-Population identifiziert, die Granulozyten als CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>CD3<sup>-</sup>-Population und die T-Zellen als CD11b<sup>-</sup>Gr1<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>.

### 3.7 Etablierung des *ex vivo*-Stimulationsprotokolls für Splenozyten

Um die direkte Aktivierung auf die adoptiv transferierten Leukozyten zu beschränken, wurden die aufgereinigten Splenozyten *ex vivo* mit dem spezifischen TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimuliert, bevor sie den TLR2-defizienten Empfängermäusen intrathekal appliziert wurden. Hierzu mussten sowohl das optimale Medium als auch das optimale Protokoll etabliert werden, um Überleben, Funktionsfähigkeit und Aktivierung der Leukozyten während der *ex vivo*-Stimulation sicherzustellen. Zuerst wurden die isolierten Splenozyten in PBS, RPMI-1640-Fertigmedium und im RPMI-Medium mit 10 % Serumzugabe für 2 h, 23 h und 43 h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um zu testen, in welchem Medium die Zellen besser überleben können.

Zur Bestimmung der Aktivität und Vitalität der Zellen wurden weitere Tests durchgeführt (siehe unten). Dazu wurde eine Dosis- und Zeit-Wirkungsbeziehung für Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (0- 10 µg) erstellt. Als Positivkontrolle für die Stimulation diente Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), als Negativkontrolle pyrogenfreies PBS.

### 3.7.1 Aktivitätsmessung der Phagozytenoxidase (NBT-Test)

Nach Stimulation wird in Granulozyten und Makrophagen die NADPH-Oxidase (Phagozyten-Oxidase) aktiviert. Das Enzym katalysiert die Bildung von Superoxid-Anionen aus NADPH und Sauerstoff (oxidativer Burst). Zur Messung der Aktivierung wurde ein colorimetrisches Verfahren zum Nachweis von Superoxidradikalen etabliert. Das eingesetzte Reagenz Nitroblau-Tetrazolium (NBT) hat im Ausgangszustand eine gelbe Farbe und wird durch Reaktion mit Superoxidradikalen zu einem violetten Diformazan reduziert, dessen Konzentration sich zur Konzentration von Superoxidradikalen proportional verhält und photometrisch bestimmt werden kann.

Die Granulozyten wurden laut Protokoll aufgereinigt, in DMEM- Medium verdünnt und in einer 24 Well-Platte ausplattiert (400 µl mit  $10^5$  Zellen pro Well), jedem Well wurden 100 µl einer NBT- Lösung (1 mg/ml) in PBS hinzugegeben. Zur Stimulation wurden Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> bzw. PMA oder PBS hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 500 µl warmen PBS gewaschen, um die NBT-Lösung zu entfernen. Durch Zugabe von 100 µl Methanol wurden die Zellen fixiert und an der Luft ca. 10 min getrocknet. Danach wurde die Zellmembran durch Zugabe von 120 µl 2 M Kaliumlauge (KOH) aufgeschlossen und das blaue Formazan mittels Zugabe von 140 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) aus dem Zellinnerem gelöst. Die Platten wurden hierzu 10 min bei Raumtemperatur bei niedriger Stufe auf einem Platten-Schüttler leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Überstände in eine 96 Wellplatte überführt und die Absorption wurde im Reader bei 630 nm gemessen. Durch den Vergleich mit den unstimulierten Proben wurde die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion quantifiziert.

### 3.7.2 Überprüfen der Viabilität der Zellen mit Hilfe des MTT-Tests

Als Viabilitätsassay wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) eingesetzt, das innerhalb von Zellen mit funktionierendem Energiestoffwechsel einen Farbumschlag von Gelb nach Blau aufweist.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurde die Splenozytensuspension so verdünnt, dass sich pro Ansatz in 50 µl der gewünschten Flüssigkeit  $10^5$  Zellen befanden. Zur Zellsuspension wurden 50 µl Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (10µg/ml) in einer 96-Wellplatte zugegeben und 15-240 min bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl MTT-Stammlösung pro Well wurden die Zellen

weitere 2 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden 75 µl 10 % SDS pro Well zugegeben und die Platten wurden über Nacht bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei 550 nm gemessen.

### **3.7.3 Endgültiges Protokoll zur *ex vivo*-Stimulation nach Leukozytenisolation und MACS-Aufreinigung**

Basierend auf den Vorversuchen wurde für die *in vivo*-Experimente folgendes Stimulationsprotokoll definiert, wobei alle Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden. Nach Isolation und MACS-Aufreinigung wurden die Zellen gezählt und in RPMI- Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (Splenozyten: 5 x 10<sup>6</sup>/50µl; Granulozyten: 10<sup>6</sup>/50 µl). In einem sterilen Eppendorf-Gefäß wurden zu 50 µl Zellsuspension 50 µl von 10 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> hinzugegeben. Die Ansätze wurden durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und 30 min bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 300xg herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur intrathekalen Injektion wurde das Zellpellet in 40 µl sterilem PBS aufgenommen.

### **3.8 Bakterienanzucht**

Experimentelle bakterielle Meningitis wurde in Mäusen durch intrathekale Inokulation von bekapselten Pneumokokken (Stamm D39) ausgelöst. Die Anzucht erfolgte in einer Flüssigkultur. Hierzu wurden 5-6 ml Casein-Hefe-Medium (C+Y) mit kryokonservierten *S. pneumoniae* beimpft und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert, bis exponentielles Wachstum eintrat [25]. Um die Konzentration koloniebildender Einheiten zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) bei 620 nm gemessen. Dazu wurde das Spektrometer mit 900µl PBS auf null abgeglichen und die OD erneut nach Zugabe von 100 µl Bakteriensuspension erneut bestimmt. Anhand von durch Ausplattierung bestimmter KBE war in früheren Projekten eine Eichkurve erstellt worden, aus der der Zusammenhang OD 0,1 = 10<sup>8</sup> KBE/ml bekannt war. Danach wurden die Bakterien bei 5300xg 3 min zentrifugiert und mit PBS auf die gewünschte Dichte verdünnt (definierte Inokula: 5 x 10<sup>5</sup> KBE in 40 µl je Maus).

### 3.8.1 Herstellung von bakterienkonditioniertem Medium

Es sollte geprüft werden, ob die bakteriellen Stoffwechselprodukte die Tpo-Expression der Mikrogliazellen beeinflussen. Dafür wurde bakteriell konditioniertes Medium hergestellt [25]. Der Pneumokokken Stamm D39 sowie seine Mutanten  $\Delta pln$ - und  $\Delta spxB$ - wurden wie oben beschrieben bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. 6 ml des C+Y-Medium wurden mit tiefgefrorenen Bakterienstämmen beimpft und über Nacht bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei der Anzucht der Bakterienmutanten  $\Delta pln$ - und  $\Delta spxB$ - wurde dem C+Y-Medium entsprechend der Resistenzkassette zur Selektion Erythromycin (Endkonzentration 1,5 µg/ml) hinzugegeben. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte gemessen, danach die Bakterien zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden resuspendiert und in 10 ml C+Y-Medium ohne Antibiotikumzusatz in einer Konzentration von 10<sup>7</sup> KBE/ml zugegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurde der Überstand durch Zentrifugation gewonnen und durch einen Filter mit Porengröße 0,45 µm sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.9 Zellkulturen

Primäre Mikrogliaulturen wurden von weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe nach einem zuvor etabliertem Protokoll erzeugt ([46] Hoffmann, O. 2007). Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen der Cortex von 0-3 Tage alter Mäusen isoliert. Das Gewebe wurde bei 37°C 15 min mit Trypsin/EDTA verdaut, anschließend durch mehrmaliges Pipettieren eine Zellsuspension erzeugt und in 75-cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 12 ml Glia-Medium ausplattiert. Nach 8 bis 10 Tagen in Kultur wurde die Mikroglia durch 2 h Schütteln abgelöst. Die nichtadhärierenden Zellen wurden aufgenommen, in 24 Well-Platten ausgesät und in Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert.

Als Mausmakrophagen wurde die immortalisierte Zelllinie RAW 264.7 verwendet. Diese Zellen wurden auf 24-Well-Platten in einer Dichte von 72.000/cm<sup>2</sup> ausgesät und in RPMI-Spezialmedium (siehe Punkt 2.6) kultiviert.

Anschließend wurde die Mikroglia mit bakteriell konditioniertem Medium oder mit 0,1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> zum Teil unter Zugabe von humanen rekombinanten Thrombopoietin (rTPO) in unterschiedlicher Konzentration (0, 1, 10 oder 100 pmol) inkubiert.

Um die Aktivierung der Mikroglia zu bestimmen, wurde nach 6 und 24 h die TNF- $\alpha$ -Aktivität im Überstand mit Hilfe des L-929 Zytotoxizitäts-Test durch gemessen. Der Test wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt und erstreckte sich über drei Tage: am ersten Tag wurden die Zellen der L929-Linie auf 96-Well Platte ausgesät. Am Tag 2 wurden die Proben und die Eichkurve aufgetragen. Am Tag 3 folgte die Kristallviolett-färbung und die Absorptionsmessung im Plattenreader bei 590 nm (nähere Beschreibung siehe Anhang 7.1).

#### **3.10 Real Time PCR**

Für die Quantifizierung der Expression ausgewählter Zytokine auf mRNA-Ebene wurde quantitative *real time* PCR (qPCR) nach Umschrift in die komplementäre DNA (cDNA) verwendet.

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der cDNA mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green I* durchgeführt. Während jedes PCR-Zyklus bindet der Fluoreszenzfarbstoff an den Doppelstrang des PCR-Produkts, so dass die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt. Mittels Quantifizierung des Fluoreszenzsignals in der exponentiellen Phase der PCR und Vergleich mit einem konstant exprimierten sog. House-keeping-Gen wird die relative Expression des interessierenden Gens gemessen.

##### **3.10.1 qPCR von *Tpo* mRNA Expression aus der Mikroglia/Astrozyten Zellkultur**

Die gesamte RNA wurde aus  $> 10^6$  Zellen laut Protokoll isoliert. Hierzu wurden zu 1ml Zellsuspension 200  $\mu$ l Chloroform gegeben, vorsichtig vermischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 12000 $\times$ g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 500  $\mu$ l Isopropanol vorsichtig gemischt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 10 min bei 12000 $\times$ g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und erneut bei 12000 $\times$ g und 4°C für 5 min herunterzentrifugiert. Das Ethanol wurde abgetrennt und das RNA- Pellet 5 bis 10 min an der Luft getrocknet. Das trockene RNA- Pellet wurde dann in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die RNA- Konzentration wurde anhand der optischen Dichte bestimmt. Im nächsten Schritt

erfolgte eine DNase- Verdauung. Hierzu wurde für jede Probe folgender Ansatz hergestellt und für 20 min bei 37°C inkubiert.

|   |              |
|---|--------------|
| Nuclease- freies Wasser                   | 5,0 µl       |
| RQ1 RNase-freie DNase 10x Reaktionspuffer | 3,5 µl       |
| RNA-sin 40 U/µl <sup>2</sup>              | 3,5 µl       |
| RQ1 RNase- freie DNase                    | 3,0 µl       |
| <u>Gesamt-RNA (ca. 20 µg)</u>             | <u>20 µl</u> |
| Gesamtvolumen                             | 35 µl        |

Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 200 µl Phenol, Chloroform und Amylalkohol im Verhältnis 25:24:1 hinzugegeben und 5 min bei 12000×g und 4°C abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation abgenommen, mit 200 µl Chloroform und Amylalkohol (24:1) vorsichtig gemischt und 5 min bei 12000×g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen, mit 6 µl 10 M Ammoniumacetat und 550 µl 96 % Ethanol vermischt und bei -70°C für eine Stunde gelagert und anschließend 30 min bei 12000×g und 4°C herunterzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 600 µl 75 % Ethanol gewaschen und erneut bei 12000×g für 30 min und 4°C zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Ethanol komplett entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in 20 µl Nuklease- freiem Wasser gelöst.

Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde folgender Ansatz hergestellt.

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| Isolierte RNA (1-5 µg)             | 15 µl         |
| Random-Hexamere                    | 1,5 µl        |
| dNTP Mix (2,5mM je Nucleotid)      | 1,5 µl        |
| DTT 0,1 M                          | 0,5 µl        |
| RNA-Sin 40U/µl                     | 0,5 µl        |
| MMLV-reverse Transkriptase 200U/µl | 1,5 µl        |
| <u>5xMMLV- Puffer</u>              | <u>5,0 µl</u> |
| Gesamtvolumen                      | 25,5 µl       |

Der Ansatz wurde 5 min bei 21°C, 1h bei 37°C und 5 min bei 95°C inkubiert.

Die Real Time PCR wurde mit Hilfe des FastStarDNA SYBR green I Kits an dem LightCycler 1.5 durchgeführt. Das Reaktionsprotokoll wurde über mehrere Schritte von mir etabliert. Zuerst wurden die optimale Primersequenz und dann die optimale Amplifikationstemperatur ermittelt. Danach wurde die Reaktion nach folgendem Protokoll durchgeführt: Preinkubation: 10 min bei 95°C; 45 Amplifikationszyklen mit 15 s bei 95°C, 10 s bei 66°C für Tpo und  $\beta$ -Actin, 15 s bei 72°C; und Schmelzkurvenanalyse bei 85°C. Die optimierten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt. Jede Probe wurde zweimal parallel gemessen und der Mittelwert für die Analyse ermittelt. Als *house-keeping*-Gen wurde  $\beta$ - Actin gewählt.

**Tabelle 8:** Primer Sequenz für qPCR

| Gen            | Forward Primer (FW) 5´-3´  | Reverse Primer (RV) 5´-3´   | Produkt-Größe |
|----------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|
| Tpo            | CCA TGC TTC CAG TGG CAA G  | CAG GCA GCA GAA CAG GGA TAG | 161 bp        |
| $\beta$ -Actin | ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA | GCC ACA GGA TTC CAT ACC GA  | Ca.300 bp     |

### 3.10.2 Quantitative PCR aus Hirngewebe und Liquor

In den *in vivo* Experimenten an RAG-1-defizienten Mäusen erfolgten qPCR-Untersuchungen zur Zytokinexpression in Liquorleukozyten zerebellären Lysaten, sowie in aktivierter Mikroglia und Makrophagen, die zuvor aus Hirngeweben der Großhirnhemisphären isoliert worden waren. Die RNA-Extraktion und die weiteren Schritte einschließlich der qPCR wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stenzel durchgeführt und können der zugehörigen Publikation [82] entnommen werden.

### 3.11 Immunhistologie

Von den PBS-perfundierten Großhirnhemisphären wurden 20 µm dicke koronare Kryostatschnitte angefertigt. Jeweils 4 Ebenen, die den gesamten Hippocampus umfassten, wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.11.1 TUNEL- Färbung (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

24 h nach Meningitis Induktion wurde neuronale Schaden durch Darstellung der apoptotischen Zellkerne mittels TUNEL-Färbung in der Körnerzellschicht der des Gyrus dentatus quantifiziert. Es kam ein kommerzieller TUNEL Kit gemäß Herstellerangaben zum Einsatz.

Die Objektträger mit den Kryostatschnitten wurden aufgetaut und bei Raumtemperatur über mindestens 30 min getrocknet. Die Schnitte wurden auf den Objektträgern mit einem Paraffinstift umrandet und in einem Färbegefäß für 10 min in 4 % PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschgang mit PBS wurden die Schnitte für 5 min in Ethanol und Essigsäure nachfixiert. Nach dem erneuten dreimaligen Waschgang mit PBS wurden die Schnitte 1 h mit 0,3 % Triton-X bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden dann ca. 1 min mit Equilibrierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde diese abgeschüttelt, die Schnitte mit dem TdT-Reaktionsmix überschichtet und für 90 min in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Sie wurden dann erneut mehrmals mit PBS gewaschen und mit Hoechst 33258 (1:10000 in dH<sub>2</sub>O) ca. 1 min bei Raumtemperatur gegengefärbt. Schließlich wurden die Schnitte dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Antifade-Medium eingedeckt und bis zur Verwendung gelagert.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Zahl der TUNEL-positiven Zellkerne in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus wurde in jeder Schnittebene bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Anschließend wurde die Fläche des Gyrus dentatus durch manuelles Umfahren in der Software Stereo Investigator 10.0 ermittelt. Die Dichte der apoptotischen Zellen im Gyrus dentatus wurde als Quotient der Gesamtzahl apoptotischer Zellen und der Summe der Flächen jeder Ebene berechnet.

### **3.11.2 Mikrogliafärbung (F4/80)**

Aktivierte Mikroglia bzw. Makrophagen wurden anhand der Expression des Panmakrophagenmarkers F4/80 immunhistologisch identifiziert. Für die Färbung wurden die Kryostatschnitte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und 20 min in Methanol/Aceton (1:1) bei -20°C nachfixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte 1 h mit Blockierungslösung (3 % Normal Goat Serum in PBS mit 0,3 % Triton-X 100) inkubiert, um unspezifische Antikörperbildung zu minimieren. Danach wurden die Schnitte mit dem primären monoklonalen Anti-F4/80-Antikörper (1:50 in Blockierungslösung) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Texas-Red-markierten sekundären Antikörper (1:200) in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst 33258 (1:10000 in dH<sub>2</sub>O) gegengefärbt, in dH<sub>2</sub>O gespült und wie oben dargestellt eingedeckt.

### **3.11.3 Mikrogliafärbung (CD11b)**

Zur Darstellung von Mikroglia/Makrophagen wurde eine immunhistologische Färbung für CD11b durchgeführt. Die 7 µm dicke Kryostatschnitte wurden 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und weitere 7 min mit Chloroform inkubiert. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte für 30 min in der feuchten Kammer mit Blockierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper gegen CD11b (1:100) für 1 h bei 4°C.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit dem DyLight 649-konjugierten sekundären Antikörper (1:100) 40 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Gegenfärbung und Eindeckeln erfolgte wie oben dargestellt.

### **3.12 Statistische Analysen**

Die statistischen Analysen von ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Software PrismGraphPad durchgeführt. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurden Kolmogorow-Smirnoff- oder Shapiro-Wilk- Tests durchgeführt. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurden Student's t Tests bei normaler Verteilung und Mann-Whitney U Tests bei deren Abwesenheit verwendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurden je nach Fragestellung *one-way* ANOVA oder *two-way* ANOVA

durchgeführt, wobei als Post-hoc-Verfahren t-Tests mit Bonferroni-Korrektur oder Student-Newmann-Keuls eingesetzt wurden. Bei fehlender Normalverteilung wurde eine Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn´s-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

Weiterhin wurden die Daten mit Hilfe der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) bzw. als Medianwerte und Spannweiten dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Projekt 1: Rolle von Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis

Vorexperimente in Primärzellkulturen aus Rattengehirnzellen hatten ergeben, dass Thrombopoietin und sein Rezeptor c-Mpl in Astrozyten und Mikroglia sowie mikrovaskulären Endothelzellen nach proinflammatorischer Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) differentiell reguliert werden [76]. Im folgenden Projekt wurde die Relevanz dieses Signalweges in einem *in vivo*-Modell der Pneumokokkenmeningitis untersucht, wobei Wildtypmäuse mit c-Mpl-Knockout-Mäusen verglichen wurden.

#### 4.1.1 Phänotyp der Thrombopoietin-Rezeptor-defizienten Mäuse in der experimentellen bakteriellen Meningitis

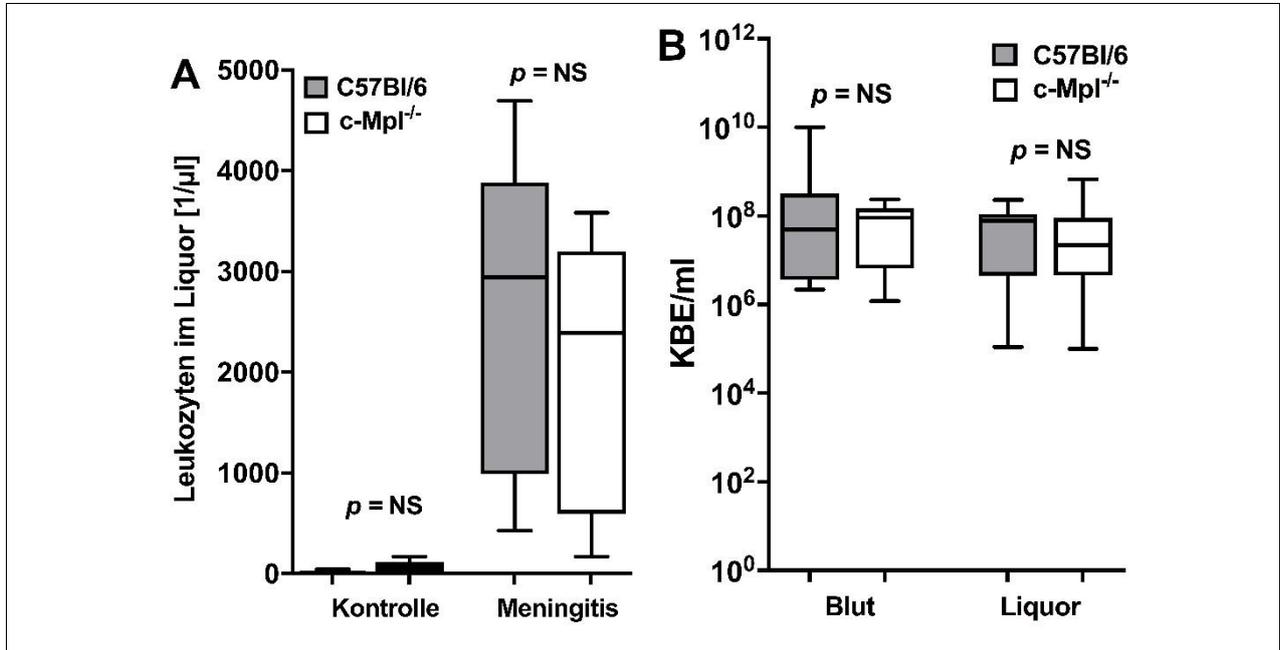
##### Leukozyten im Liquor

Die intrathekale Injektion von lebenden Pneumokokken verursachte einen ausgeprägten Einstrom von Leukozyten in den Liquorraum (Abb. 6A). In Wildtypmäusen ( $n = 13$ ) betrug der Median-Wert von Leukozyten im Liquor nach 24 h 2901/ $\mu\text{l}$  (Bereich von 427 bis 4693/ $\mu\text{l}$ ), in c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $n = 13$ ) hingegen 2389/ $\mu\text{l}$  (Bereich von 171 bis 3584/ $\mu\text{l}$ ). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $P = \text{NS}$ , Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Bei nichtinfizierten Kontrolltieren, den pyrogenfreies PBS injiziert wurden, lag der Median-Wert im Liquor nach 24 h bei Wildtypmäusen ( $n = 7$ ) bei 11/ $\mu\text{l}$  (Bereich von 0 bis 43/ $\mu\text{l}$ ) und bei c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $n = 7$ ) bei 53/ $\mu\text{l}$  (Bereich von 0 bis 171/ $\mu\text{l}$ ). Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Abb. 6A).

##### Bakterienkonzentration im Liquor und Blut

Im Liquor betrug der Median-Wert für Bakterien-Konzentration bei intrathekal infizierten Wildtypmäusen  $7,8 \times 10^7$  KBE/ml (Bereich von  $1,1 \times 10^5$  -  $2,3 \times 10^8$  KBE/ml) und bei c-Mpl<sup>-/-</sup>- Mäusen  $1,8 \times 10^8$  KBE/ml (Bereich von  $1,0 \times 10^5$  -  $6,7 \times 10^8$  KBE/ml). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $P = \text{NS}$ , Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Bei bakterieller Meningitis liegt regelmäßig eine Bakteriämie vor. Bei den infizierten Wildtypmäusen betrug der Median-Wert für Bakterienkonzentration im Blut  $5 \times 10^7$  KBE /ml (Bereich von  $2,2 \times 10^6$ -  $1,0 \times 10^{10}$  KBE

/ml). Es bestand kein signifikanter Unterschied zu c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei denen im Mittel  $9,1 \times 10^7$  KBE /ml nachgewiesen wurden (Bereich von  $1,2 \times 10^6$ -  $2,4 \times 10^8$  KBE /ml;  $P = \text{NS}$ , Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn´s-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 6B).

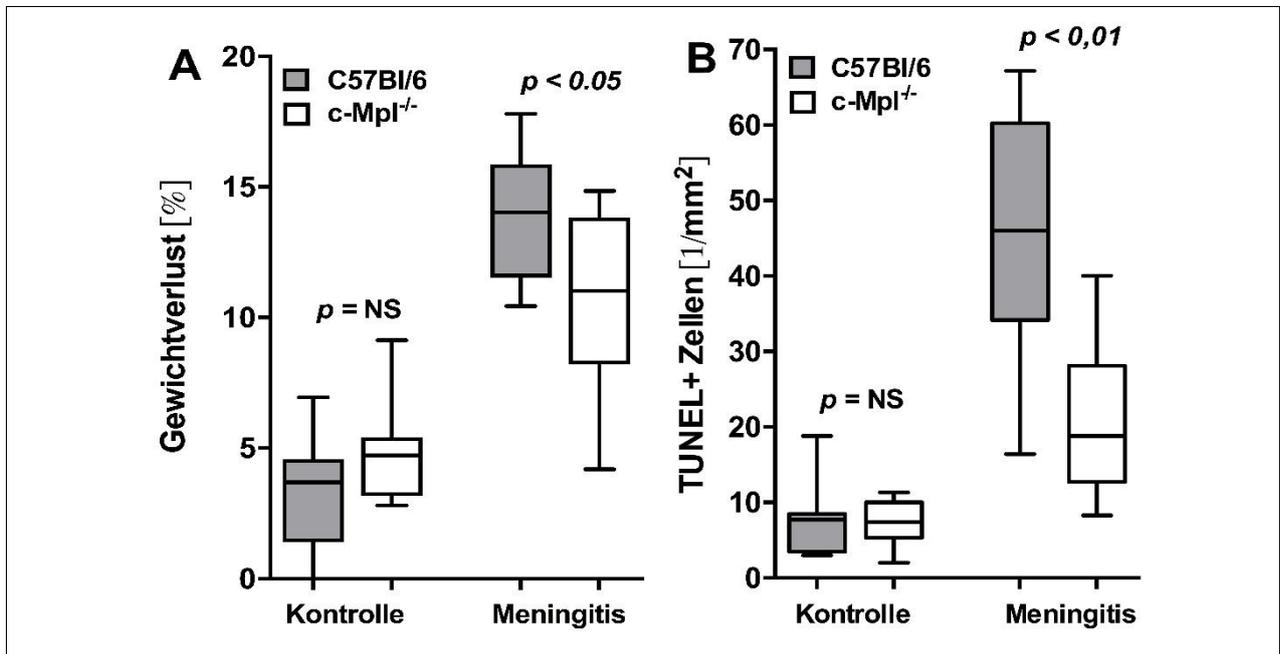


**Abbildung 6:** Einfluss des Thrombopoietin-Signalweges in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis. **(A)** Leukozytenzahl im Liquor von Wildtypmäusen (graue Balken,  $n = 13$ ) und Thrombopoietin-Rezeptor-defizienten c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen (weiße Balken,  $n = 13$ ), jeweils 24 h nach intrathekaler Infektion mit  $5 \times 10^5$  koloniebildender Einheiten (KBE) von *S. Pneumoniae* (kapseltragender Stamm D39). Den Kontrolltieren ( $n = 7$  pro Gruppe) wurde dasselbe Volumen pyrogenfreies PBS intrathekal injiziert. **(B)** Bakterienkonzentration in Blut und Liquor 24 h nach der intrathekaler Infektion. Den Kontrolltieren ( $n = 7$  pro Gruppe) wurde dasselbe Volumen pyrogenfreies PBS intrathekal injiziert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn´s-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

### Krankheitsassoziierter Gewichtsverlust

Als unspezifischer Marker der Schwere der Erkrankung wurde der Gewichtsverlust untersucht. Dazu wurden die Tiere vor und 24 h nach Induktion der experimentellen Pneumokokkenmeningitis gewogen (Abb. 7A). In den mit PBS behandelten Kontrolltieren war die prozentuale Gewichtsabnahme durch Narkose und Operation bei Wildtyp- und bei c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen vergleichbar ( $3,4 \pm 2,2$  % bzw.  $4,9 \pm 2,1$  %;  $P = \text{NS}$ , one-way ANOVA mit Student-Newmann-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Dagegen war die prozentuale Gewichtsabnahme bei den infizierten Wildtypmäusen mit  $13,8 \pm 2,3$  % etwas höher als der Vergleichswert von  $10,9 \pm 3,5$  % bei infizierten c-Mpl<sup>-/-</sup>

-Mäusen ( $P < 0,05$ , one-way ANOVA mit Student-Newmann-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 7A).



**Abbildung 7:** Einfluss des Thrombopoietin-Signalweges in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis. **(A)** Gewichtsabnahme innerhalb der 24-stündigen Dauer des Experimentes von Wildtypmäusen (graue Balken,  $n = 13$ ) und Thrombopoietin-Rezeptor-defizienten  $c-Mpl^{-/-}$ -Mäusen (weiße Balken,  $n = 13$ ), jeweils 24 h nach der intrathekalen Infektion mit  $5 \times 10^5$  koloniebildender Einheiten (KBE) von *S. Pneumoniae* (kapseltragender Stamm D39). Den Kontrolltieren ( $n = 7$  pro Gruppe) wurde dasselbe Volumen pyrogenfreies PBS intrathekal injiziert. Statistische Analyse mittels one-way ANOVA mit Student-Newmann-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche. **(B)** Dichte apoptotischer Zellen im Gyrus dentatus 24 h nach der Infektion mit Pneumokokken, identifiziert durch TUNEL-Reaktion von Wildtypmäusen (graue Balke,  $n = 13$ ) und Thrombopoietin-Rezeptor-defizienten  $c-Mpl^{-/-}$ -Mäusen (weiße Balken,  $n = 13$ ), jeweils 24 h nach der intrathekalen Infektion mit  $5 \times 10^5$  koloniebildender Einheiten (KBE) von *S. Pneumoniae* (kapseltragender Stamm D39). Den Kontrolltieren ( $n = 7$  pro Gruppe) wurde dasselbe Volumen pyrogenfreies PBS intrathekal injiziert. Statistische Analyse mittels one-way ANOVA mit Student-Newmann-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche.

### Neuronaler Schaden im Gyrus dentatus

Im adulten Mausmodell führt die bakterielle Meningitis zu einem ausgeprägten apoptotischen Zellverlust in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus der Hippocampusformation. Zur Quantifizierung wurde die TUNEL-Reaktion durchgeführt und die Dichte der markierten Zellen in der genannten Region bestimmt. In den Kontrolltieren lag die (physiologische) Apoptose bei Wildtypmäusen  $8,1 \pm 5,2$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  und für  $c-Mpl^{-/-}$ - Mäuse bei  $7,4 \pm 3,1/\text{mm}^2$ , wobei der Unterschied statistisch nicht

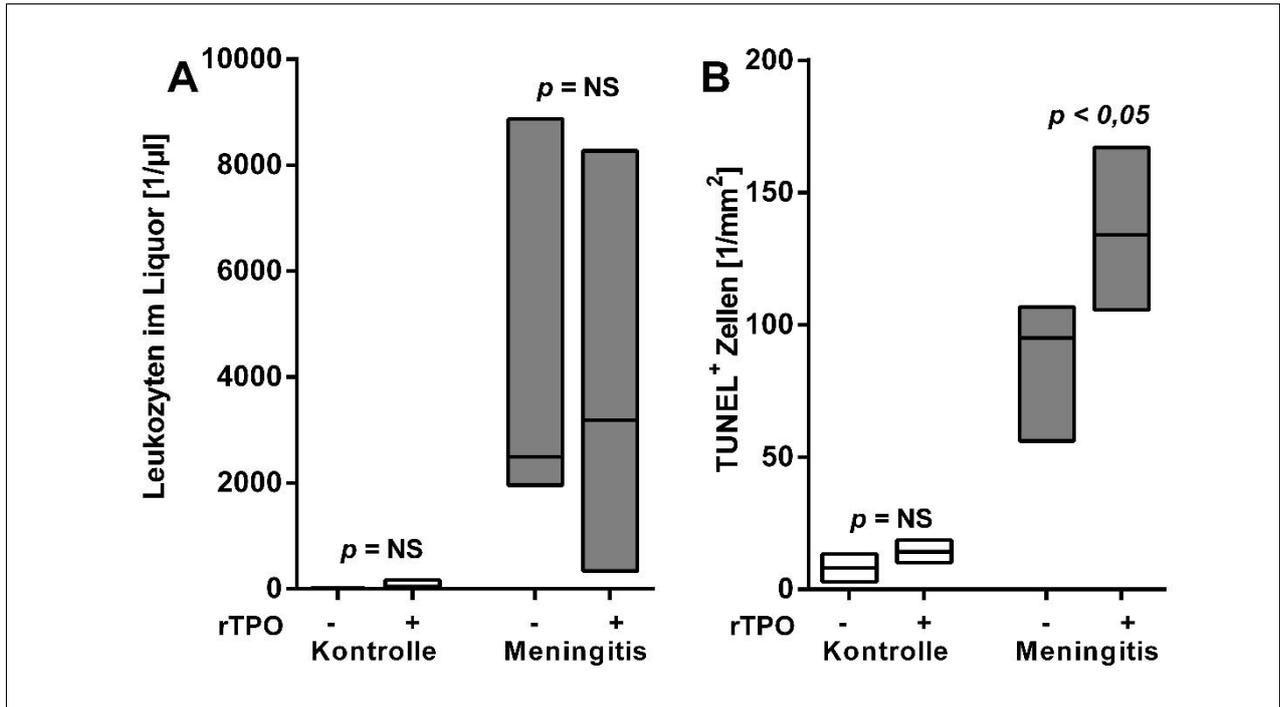
signifikant war ( $P = \text{NS}$ , *one-way* ANOVA mit Student-Newmann-Keuls- Korrektur für Mehrfachvergleiche, Analyse, Abb. 7B). Im Vergleich zu den Kontrollen des jeweiligen Genotyps wiesen die infizierten Wildtypmäuse mit  $45,9 \pm 15,1$  ( $P < 0,01$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  und infizierte *c-Mpl*<sup>-/-</sup>- Mäuse mit  $20,3 \pm 9,7/\text{mm}^2$  ( $P < 0,05$ ) nach 24 h eine signifikant erhöhte Zahl an TUNEL-positiven Zellen auf. Bei *c-Mpl*<sup>-/-</sup>- Mäuse war dieser induzierte neuronale Schaden im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant kleiner ( $P < 0,01$ , *one-way* ANOVA mit Student-Newmann-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 7B).

#### 4.1.2 Effekte von rekombinantem Thrombopoietin

In weiteren Versuchen wurden die Effekte von intrathekal appliziertem rekombinanten TPO (rTPO) an Wildtypmäusen untersucht. In nicht infizierten Kontrollen zeigte sich ( $n = 6$ ) nach Gabe von  $1\text{nmol/kg}$  rTPO keine Entzündungsreaktion und keine Zunahme der Apoptose im Gyrus dentatus. Der Median-Wert der Leukozytenkonzentration im Liquor betrug 24 h nach Gabe von rTPO  $21/\mu\text{l}$  ( $P = \text{NS}$  im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollen, Kruskal-Wallis ANOVA-Test mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 8A). Die mittlere Dichte von apoptotischen Zellen im Gyrus dentatus betrug nach Gabe von rTPO  $13,9 \pm 3,2/\text{mm}^2$  im Vergleich zu  $8,1 \pm 5,2/\text{mm}^2$  bei PBS-behandelten Mäusen. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $P = \text{NS}$ , *one-way* ANOVA mit Student-Newmann-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 8B).

Bei den mit Pneumokokken infizierten Mäusen lag der Median-Wert der Leukozytenkonzentration im Liquor ohne Behandlung mit rTPO bei  $2496/\mu\text{l}$  (Bereich von  $1963 - 8874/\mu\text{l}$ ;  $n = 3$ ) im Vergleich zu  $3189/\mu\text{l}$  nach Gabe von rTPO (Bereich von  $341 - 8277/\mu\text{l}$ ;  $n = 5$ ;  $P = \text{NS}$ , Kruskal-Wallis ANOVA-Test mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche Abb. 8A)<sup>1</sup>. Neben diesem proinflammatorischen Effekt wurde auch eine Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellkerne im Gyrus dentatus bei zusätzlicher Behandlung mit rTPO erkennbar. So wurde 24 h nach Infektion ohne Zugabe von rTPO  $88,6 \pm 21,6/\text{mm}^2$  TUNEL-positive Zellkerne gezählt, während die Dichte nach Zugabe von rTPO auf  $135,2 \pm 31,1/\text{mm}^2$  anstieg ( $P < 0,05$ , *one-way* ANOVA mit Student-Neuman-Keuls- Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 8B).

<sup>1</sup> Die Liquores von zwei nicht mit rTPO behandelten Mäusen und von einer mit rTPO behandelten Maus waren nicht auswertbar.



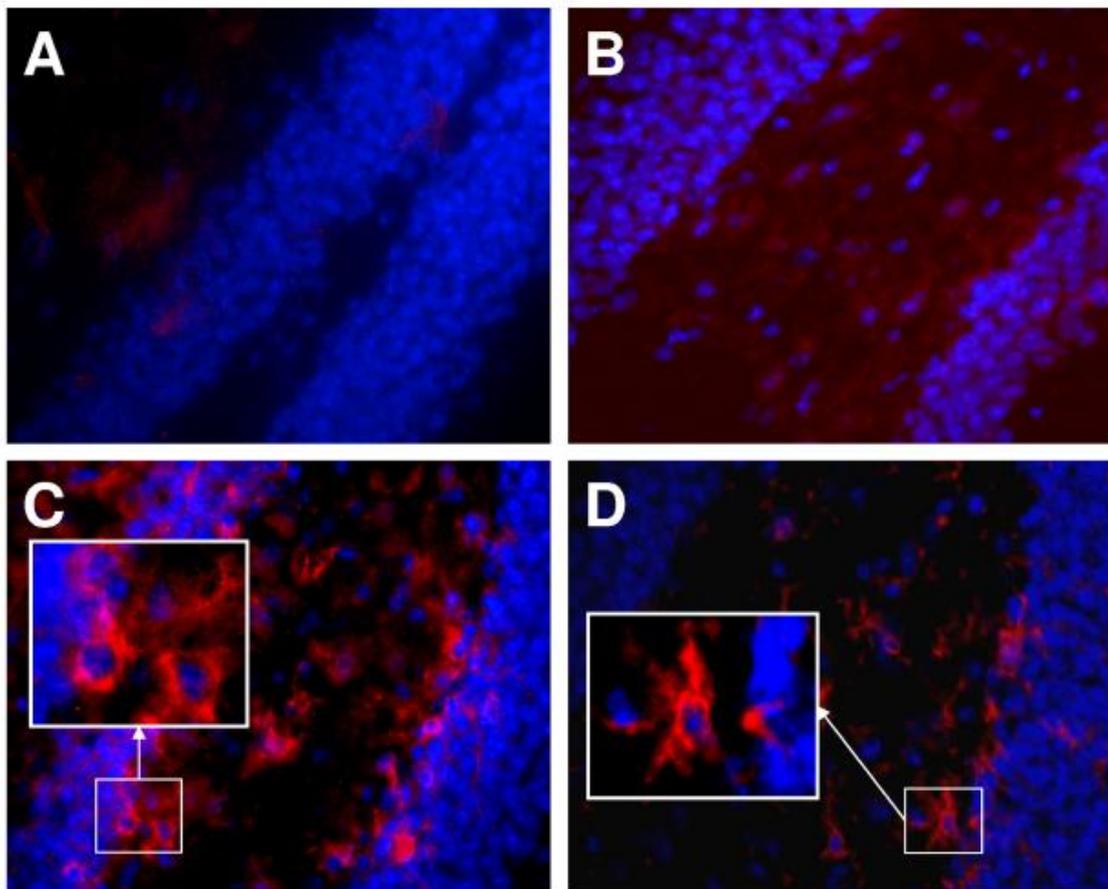
**Abbildung 8:** Effekte von rekombinantem Trombopoietin (rTpo) bei bakterieller Meningitis (intrathekale Injektion von  $5 \times 10^5$  KBE *S. pneumoniae*) bzw. in Kontrollen (intrathekale Injektion von PBS). In den rTPO-behandelten Gruppen wurde zusätzlich 1 nmol/kg rTPO intrathekal verabreicht. **(A)** Leukozytenkonzentration im Liquor 24 h postoperativ. Statistische Analyse mit Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche. **(B)** Dichte TUNEL-positiver apoptotischer Zellkerne im Gyrus dentatus 24 h postoperativ. Statistische Auswertung mit one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls-Korrektur für Mehrfachvergleiche.

#### 4.1.3 Aktivierung von Mikroglia

Die Einwanderung aktivierter Leukozyten aus der Blutbahn und die Aktivierung ortsständiger Mikroglia stellen wichtige wirtsseitige Schadensmechanismen in der bakteriellen Meningitis dar. Die Mikrogliaaktivierung wurde histologisch qualitativ beurteilt und durchflusszytometrisch quantifiziert. In Gefrierschnitten war die Expression des F4/80-Antigens im Gyrus dentatus von PBS-behandelten Kontrolltieren sowohl bei Wildtypen als auch bei *c-Mpl<sup>-/-</sup>*-Mäusen sehr gering (Abb. 9A und 9B). Im Vergleich dazu zeigte sich 24 h nach intrathekaler Injektion von *S. pneumoniae* eine deutliche Zunahme der F4/80-Immunreaktivität. Dabei zeigten in den Wildtypmäusen die Mehrheit der F4/80-positiven Zellen eine amöboide Morphologie, die als Ausdruck der Aktivierung angesehen wird (Abb. 9C). In den *c-Mpl<sup>-/-</sup>*-Mäusen war der Anteil amöboider Mikroglia geringer, während mehr ramifizierte Mikroglia erkennbar war (Abb. 9D).

Dieser qualitative Eindruck wurde durch FACS-Analyse in den komplementären Hemisphären bestätigt, welche von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stenzel durchgeführt wurden. Die aus dem Parenchym isolierten Immunzellen zeigten mit  $6,2 \pm 6,7\%$  einen höheren Anteil an aktivierten hochgradig  $CD11b^+CD45^{\text{high}}$  exprimierende Microglia in Wildtyp-Mäusen verglichen mit  $c-Mpl^{-/-}$ -Mäusen ( $1,2 \pm 0,2\%$ ;  $P < 0,05$ , Mann-Whitney U Test, Daten veröffentlicht in [84]).

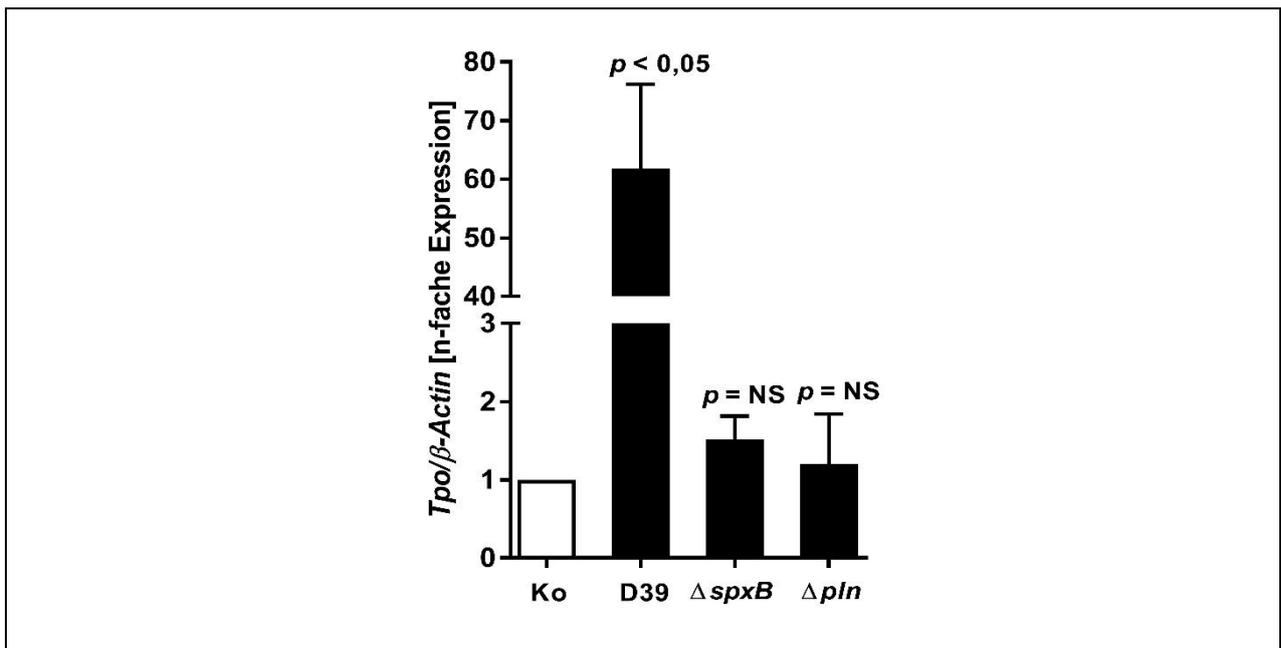
Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass zu den über  $c-Mpl$  vermittelten Effekten von Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis, auch proinflammatorische und proliferationsfördernde Wirkungen an Mikrogliazellen gehören.



**Abbildung 9:** Modulation der Mikrogliaaktivierung durch Thrombopoietin. (A-D) Immunhistologische Darstellung von Mikroglia im Gyrus dentatus 24 h postoperativ mittels Anti-F4/80-Färbung (rot) in Wildtypmäusen (A,C) und  $c-Mpl^{-/-}$ -Mäusen (B,D). Nucleäre Gegenfärbung mit Hoechst 33258 (blau). (A,B) Kontrollexperimente mit intrathekaler Injektion von pyrogenfreiem PBS. (C,D) Meningitisinduktion mit intrathekaler Injektion von *S. pneumoniae*.

#### 4.1.4 Regulierung von *Tpo* mRNA in Makrophagen durch bakterielle Faktoren

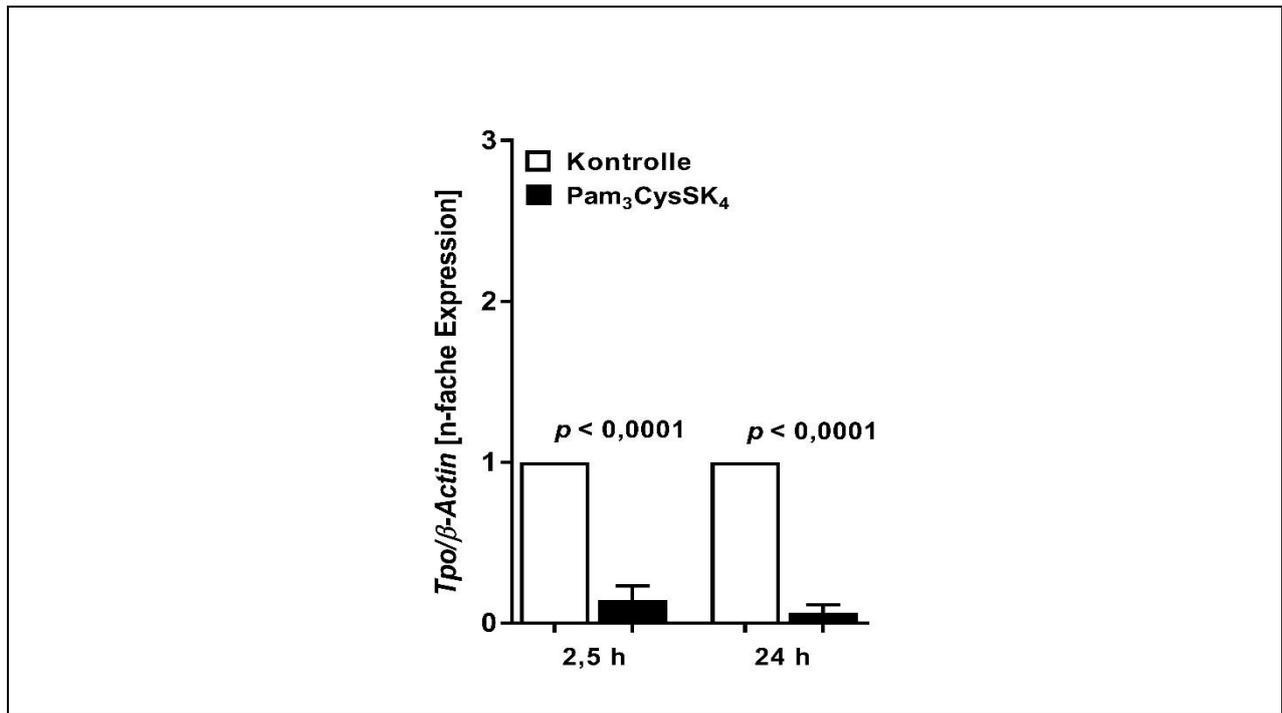
Die *in vivo*-Ergebnisse deuteten auf eine Regulation von Thrombopoietin im Hirngewebe während bakterieller Meningitis hin. In der Zellkultur wurde daher untersucht, wie bakterielle Produkte die Expression von Thrombopoietin modulieren. In der Mausmakrophagen-Zelllinie RAW264.7 zeigte sich nach Inkubation mit D39-konditioniertem Medium nach 2,5 h eine erhebliche Zunahme der *Tpo* mRNA um den Faktor  $60,6 \pm 3,5$  im Vergleich zur Inkubation mit nicht konditioniertem Medium ( $P < 0,05$ , Student's t Test, Abb. 10). Bei Konditionierung des Mediums mit der Peroxidase-defizienten Pneumokokken Mutante  $\Delta spxB$  fand sich ein geringerer Anstieg um  $54,5 \pm 52\%$  ( $P = \text{NS}$ , im Vergleich zur Stimulation mit Kontrollbedingungen, Student's t Test, Abb. 10), ebenso bei Verwendung der Pneumolysin-defizienten Pneumokokken Mutante  $\Delta pln$ - (Zunahme um  $37,5 \pm 58\%$ ;  $P = \text{NS}$ , im Vergleich zur Stimulation mit Kontrollbedingungen, Student's t Test, Abb. 10).



**Abbildung 10:** Regulation von *Tpo*-mRNA in der Maus-Makrophagenzelllinie RAW264.7 nach 2,5 h Inkubation mit konditioniertem Medium: D39, Konditionierung mit Wildtyp-Pneumokokken;  $\Delta spxB$ , Konditionierung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -defizienten Pneumokokken;  $\Delta pln$ , Konditionierung mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken; Ko, Kontrollbedingung mit nicht konditioniertem Medium. Statistische Analyse mittels Student's t Tests. Der P-Wert bezieht sich auf den Vergleich zur Kontrolle. Die Expression wurde als Vielfaches der Kontrollbedingung ausgedrückt, wobei  $\beta$ -Actin als interne Referenz diente.

#### 4.1.5 Regulierung von *Tpo* mRNA in Mikroglia durch Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>

In primären Mikroglia-kulturen aus der Maus führte die Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> nach 2,5 h zur einer Reduktion der *Tpo* mRNA-Expression um  $82,6 \pm 11,5 \%$  und um  $91,7 \pm 5,6 \%$  nach 24 h ( $P < 0,0001$ , im Vergleich zur Stimulation mit Kontrollbedingungen, Student's *t* Test, Abb. 11).

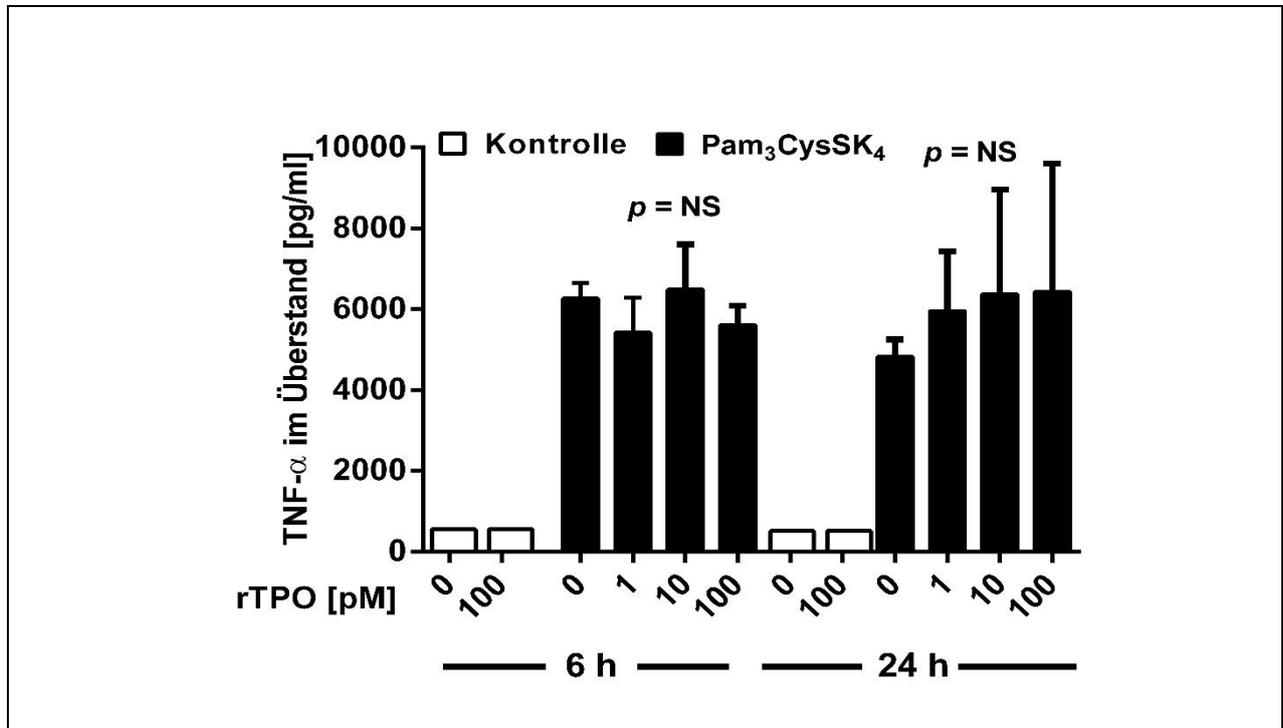


**Abbildung 11:** Regulation von *Tpo*-mRNA in Maus-Mikroglia 2,5 und 24 h nach Stimulation mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (schwarze Balken) bzw. in PBS-behandelten Kontrollen ( $n = 3$ ). Die Expression wurde als Vielfaches der Kontrollbedingung ausgedrückt, wobei  $\beta$ -Actin als interne Referenz diente. Statistische Analyse mittels Student's *t* Tests. Der *P*-Wert bezieht sich auf den Vergleich zur Kontrolle.

#### 4.1.6 Proinflammatorischer Effekt von Thrombopoietin auf Mikroglia

Die oben dargestellten *in vivo*-Ergebnisse legten einen proinflammatorischen Effekt von Thrombopoietin auf Mikroglia während der Meningitis nahe. Auch dieser Aspekt wurde in einem *in vitro* Experiment näher untersucht. Hierzu wurden primäre Mikroglia-kulturen mit rekombinantem TPO (rTPO) allein oder zusätzlich zu dem synthetischen bakteriellen Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimuliert. Stimulation mit rTPO allein führte in einer Konzentration bis zu  $100 \text{ pmol/l}$  weder nach 6 h noch nach 24 h zu einer messbaren Freisetzung von TNF- $\alpha$  in den Überständen. Bei Kostimulation mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> wurde sowohl nach 6 h als auch nach 24 h eine deutliche Freisetzung von TNF- $\alpha$  in den Überstand gefunden. Es fand sich jedoch kein signifikanter zusätzlicher

Effekt von rTpo ( $P = \text{NS}$ , Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 12).



**Abbildung 12:** TNF- $\alpha$  Aktivität im Überstand nach Stimulation primärer Mausmikroglia mit rTPO in der angegebenen Konzentration. Schwarze Balken: Kostimulation mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Weiße Balken: Keine Kostimulation (Kontrollbedingung). Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis ANOVA mit Dunn's-Korrektur für Mehrfachvergleiche.

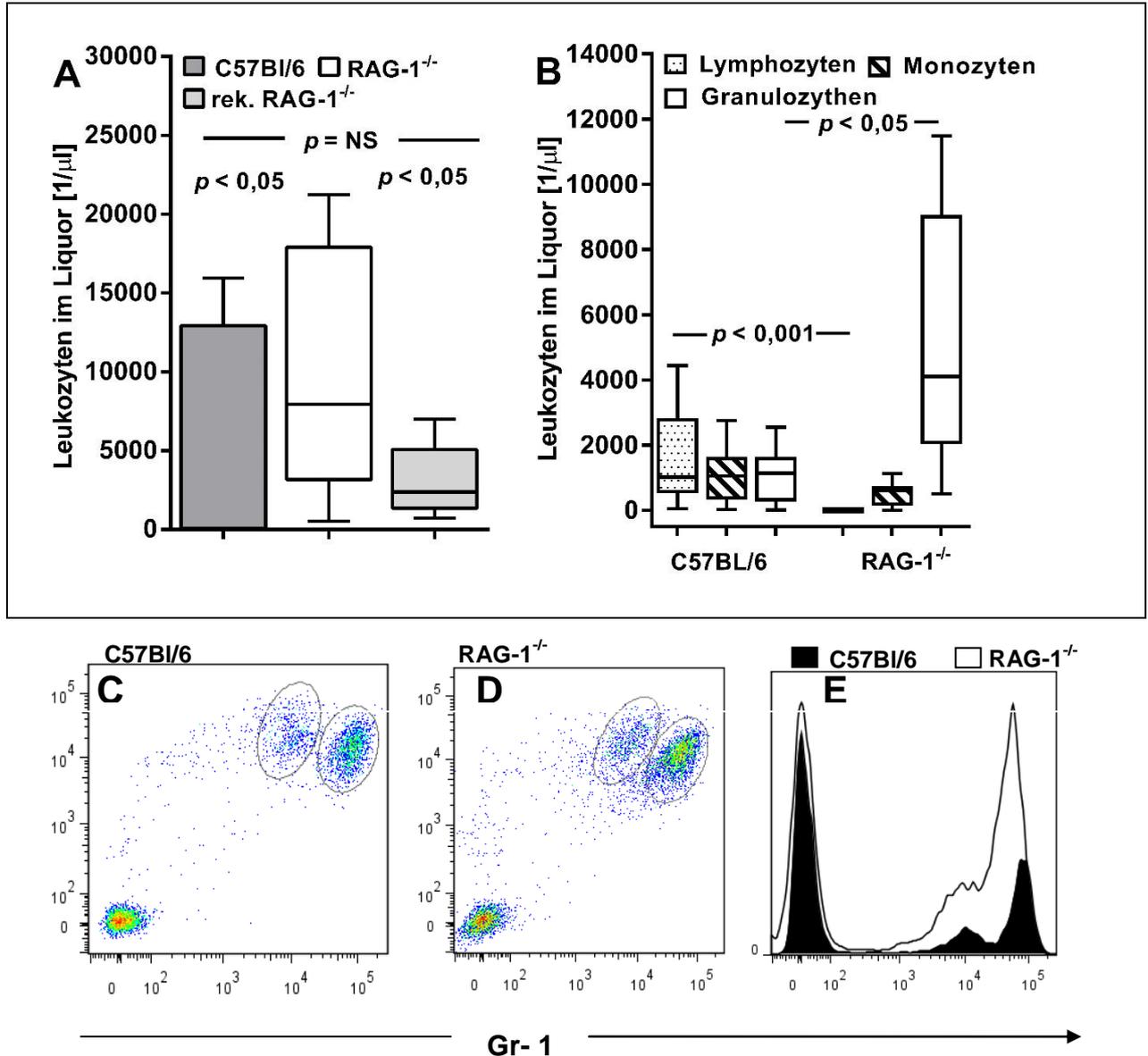
## 4.2 Projekt 2: Rolle der Lymphozyten in der bakteriellen Meningitis

In diesem Projekt wurden RAG-1-defiziente (RAG-1<sup>-/-</sup>)-Mäuse, bei denen keine Reifung von B- und T-Lymphozyten möglich ist, mit Wildtypmäusen hinsichtlich verschiedener Meningitis-assoziiierter Befunde verglichen. Um zusätzliche Variabilität durch potentielle Effekte der Immundefizienz auf das bakterielle Wachstum auszuschließen, wurde das Meningitismodell modifiziert: Anstelle der intrathekalen Infektion mit lebenden Pneumokokken wurde eine sterile meningeale Entzündung mit dem synthetischen bakteriellen Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> induziert. Ergänzend erfolgten Rekonstitutionsexperimente mit Wildtyp-Splenozyten, um die beobachteten Effekte spezifisch auf den Mangel an Lymphozyten zurückzuführen.

### 4.2.1 Effekt fehlender reifer Lymphozyten auf die Entzündungsreaktion im Liquorraum

In Wildtypmäusen lag die mittlere Leukozytenkonzentration 24 h nach Meningitisinduktion mit intrathekal appliziertem 10 µg Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> bei 4865 ± 4215/µl (Bereich von 91 - 11776/µl, Abb. 13A). Dagegen zeigten RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine deutlich höhere Leukozytenkonzentration von 9726 ± 7575/µl (Bereich von 512 - 21248/µl;  $P < 0,05$ , Kruskal-Wallis ANOVA und Mann-Whitney U Test). Wurden RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäuse vor der Meningitisinduktion mit Wildtyp-Lymphozyten peripher immunrekonstituiert, so unterschied sich die Leukozytenkonzentration mit 3086 ± 2160/µl (Bereich von 711 – 6997/µl;  $P = \text{NS}$ , Kruskal-Wallis ANOVA und Mann-Whitney U Test, Abb. 13A) nicht signifikant von derjenigen der Wildtyp-Mäuse.

Die manuelle Differenzierung der Leukozyten nach Anfärben mit Türkscher Lösung ergab erwartungsgemäß, dass Lymphozyten bei RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen nahezu vollständig fehlten, während sie bei Wildtypmäusen mit 1605/µl nachweisbar waren (Abb. 13B). Während kein signifikanter Unterschied in der Zahl der Monozyten zwischen den Genotypen bestand, wurden im Liquor von RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant mehr neutrophile Granulozyten gezählt (5471/µl in RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen versus 1120/µl in WT-Mäusen;  $P < 0,05$ , Kruskal-Wallis ANOVA und Mann-Whitney U Test, Abb. 13B). Dieser Befund bestätigte sich in der FACS-Analyse, in der ein deutlich erhöhter Anteil von Gr1<sup>high</sup> Leukozyten in gepoolten Liquores von RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen gefunden wurde (Abb. 13C-E).



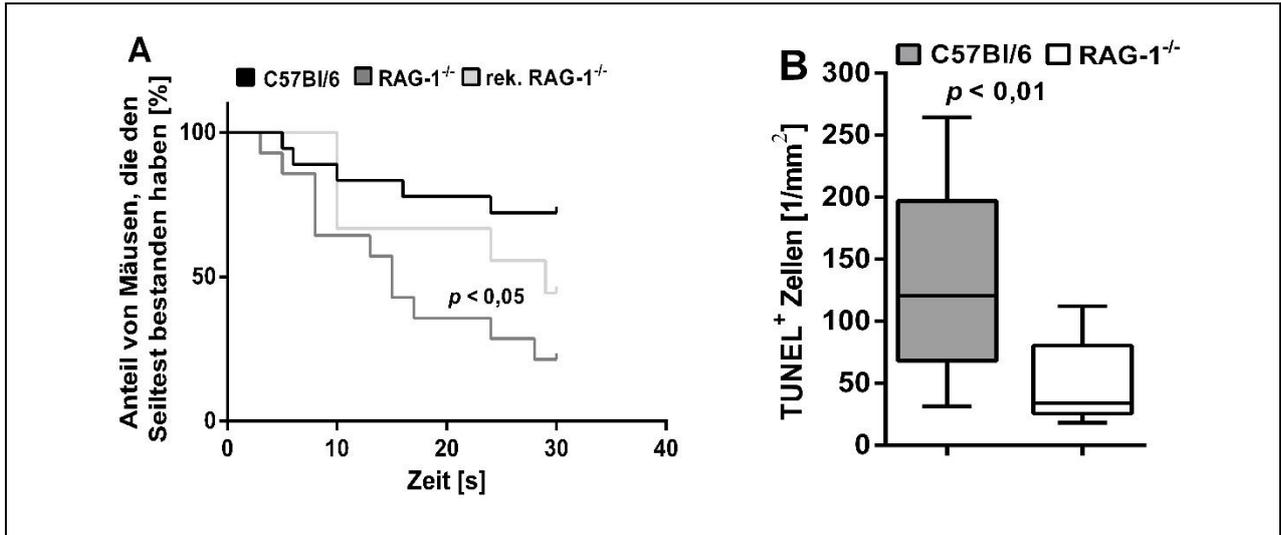
**Abbildung 13:** Effekt der RAG-1-Defizienz auf die Leukozyten im Liquor 24 h nach intrathekaler Injektion von 10  $\mu\text{g}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. **(A)** Gesamte Leukozyten bei Wildtypmäusen ( $n = 24$ ), RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $n = 21$ ) und peripher immunrekonstituierten RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $n = 9$ ). Mit Lymphozyten rekonstruierte RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäuse sind als rek. RAG-1<sup>-/-</sup> dargestellt. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis ANOVA und Mann-Whitney U Test. **(B)** Konzentration von Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten im Liquor. Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis ANOVA und Mann-Whitney U Test. **(C-E)** FACS-Analyse von gepoolten Liquores. CD11b<sup>+</sup> Leukozyten von Wildtyp- und RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden hinsichtlich ihrer Gr1-Immunopositivität analysiert.

#### 4.2.2 Effekt der Rag-1-Defizienz auf die klinische Erkrankungsschwere und den neuronalen Schaden

Als unspezifisches Krankheitsmerkmal tritt im Mausmodell der experimentellen Meningitis im Vergleich zu Sham-operierten Tieren in den ersten 24 h eine gesteigerte Gewichtsabnahme auf. In den hier gezeigten Versuchen fand sich in der Gesamtheit der mit Pam<sub>3</sub>CycSK<sub>4</sub>-stimulierten Tiere eine Gewichtsabnahme von  $8,4 \pm 1,2 \%$  ( $P < 0,001$ , Mann-Whitney U-Test). Dabei bestand kein Unterschied zwischen Wildtypmäusen ( $8,2 \pm 4,5 \%$ ) und RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $8,5 \pm 4,1 \%$ ;  $P = \text{NS}$ , Mann-Whitney U Test, Daten nicht gezeigt).

Als weiterer Marker der klinischen Erkrankungsschwere wurde die motorische Koordination und Körperkraft im *tight-rope*-Test untersucht. Die Dauer, während derer sich die Tiere an einem horizontal aufgespannten Faden festhalten konnten, war bei den RAG1<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringer als bei den Wildtyp-Mäusen ( $P < 0,05$ , log-rank Test, Abb. 14A), was auf eine ausgeprägtere klinische Beeinträchtigung der RAG-1-defizienten Mäuse hindeutet.

Konträr zu diesem klinischen Befund zeigte die histologische Auswertung des neuronalen Schadens bei den RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen eine deutlich geringere Induktion von Apoptose im Gyrus dentatus. So lag die Dichte von TUNEL-positiver Zellkerne 24 h postoperativ bei den RAG-1-defizienten Mäusen bei  $40 \pm 25/\text{mm}^2$ , während bei den Wildtypmäusen  $120 \pm 66/\text{mm}^2$  nachweisbar waren ( $P < 0,01$ , Mann Withney U Test, Abb.14B).



**Abbildung 14:** Auswirkung der Rag-1-Defizienz auf die klinische Erkrankungsschwere **(A)** und den neuronalen Schaden **(B)** 24 h nach Auslösung einer experimentellen Meningitis mittels intrathekaler Injektion von 10 µg Pam<sub>3</sub>CycSK<sub>4</sub>. **(A)** Kaplan-Meier-Darstellung der prozentualen Wahrscheinlichkeit des Nichtversagens im tight-rope-Test in Abhängigkeit von der Zeit. Statistische Auswertung mittels log-rank-Test. Sämtliche Tiere in der Kontrollgruppe (nicht gezeigt) konnten sich mehr als 30 Sekunden am Faden festhalten. Mit Lymphozyten rekonstruierte RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse sind als rek. RAG1<sup>-/-</sup> dargestellt. **(B)** Dichte der TUNEL-positiven Zellen im Gyrus dentatus. Statistische Analyse mittels Mann Whitney U Test.

### 4.2.3 Immunologische Effekte im Hirngewebe

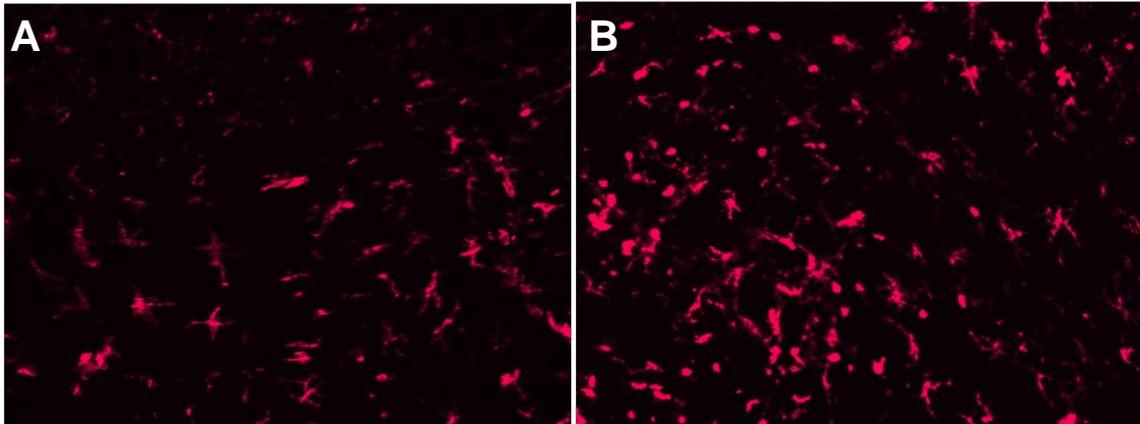
#### FACS-Untersuchungen

Von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stenzel durchgeführte FACS-Untersuchungen an isolierten Immunzellen des Hirnparenchyms ergaben, dass 24 h nach der Meningitisinduktion in den RAG-1-defizienten Mäusen mit 13,58 % ein signifikant höherer Anteil von aktivierter CD45<sup>high</sup>GR1<sup>dim</sup>-Mikroglia bzw. Makrophagen vorhanden war als in Wildtypmäusen (4,28 %). Hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Zahl der CD45<sup>high</sup>GR1<sup>high</sup>-Granulozyten. Details zur Sortierstrategie und den Ergebnissen können der zugehörigen Publikation „Lymphocytes Modulate Innate Immune Responses and Neuronal Damage in Experimental Meningitis“ entnommen werden [82].

#### Immunhistologie

Histologisch zeigte sich 24 h nach Meningitisinduktion eine stärkere Immunpositivität für CD11b im Hirnparenchym RAG-1-defizienter Mäuse (Abb.15B) im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen (Abb. 15A), was auf eine höhere Dichte aktivierter Mikroglia und Makrophagen hinweist.



**Abbildung 15:** Darstellung CD11b-positiver Mikroglia bzw. Makrophagen im Hirnparenchym von Wildtyp- (A) und RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen 24 h nach der Meningitisinduktion mit 10 µg Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. (B). Vergrößerung x400.

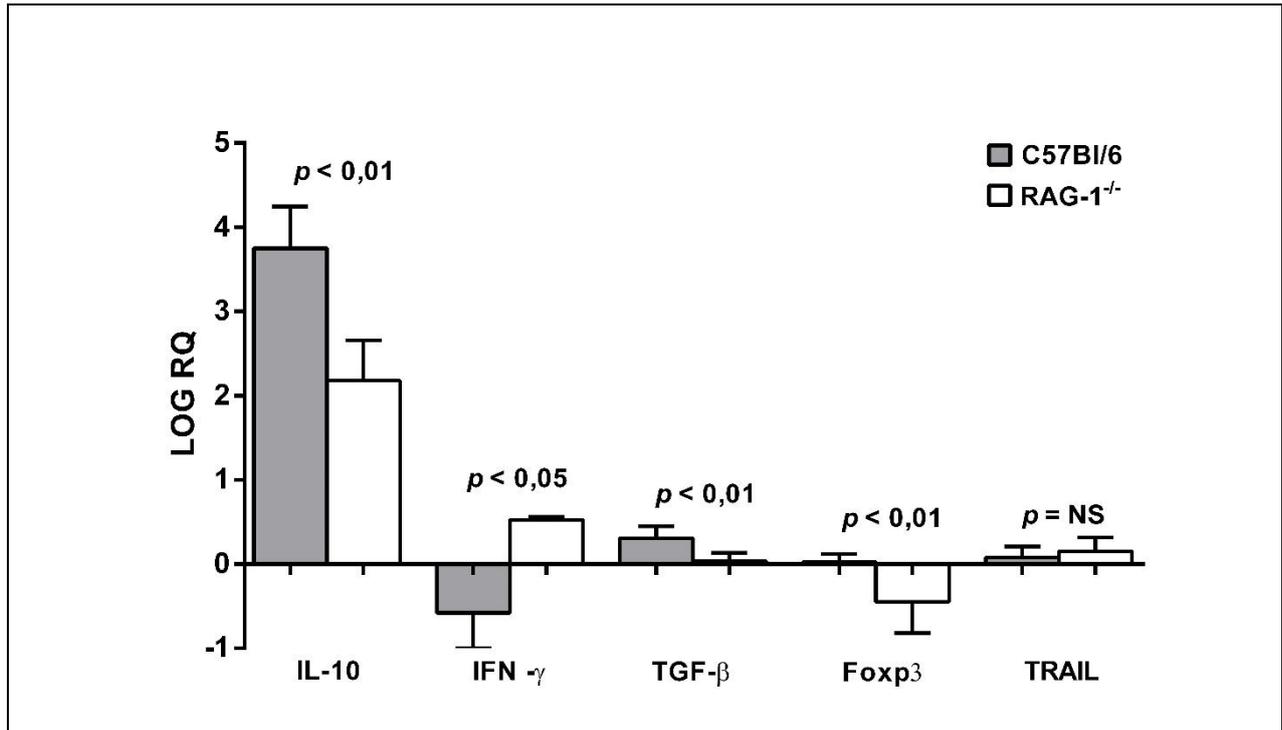
#### Expression pro- und antiinflammatorischer Genprodukte auf mRNA Ebene

Expressionsanalysen für repräsentative pro- und antiinflammatorische Genprodukte wurden in Lysaten aus Hirngewebe, in aus dem Gewebe isolierten Mikrogliazellen/ Makrophagen und in myeloiden Zellen aus gepoolten Liquoren durchgeführt.

Im Kleinhirngewebe unbehandelter Kontrollen fand sich bei RAG-1-defizienten Mäusen eine deutlich höhere basale Expression von IL-10 mRNA als bei Wildtypmäusen ( $\Delta_{CT}$ -Mittelwert,  $15,7 \pm 0,1$  gegenüber  $20,3 \pm 0,2$ ,  $P = 0,01$ ). Hingegen konnten nur geringe Unterschiede für IFN- $\gamma$  und Foxp3 mRNA festgestellt werden. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden bei TRAIL- und TGF- $\beta$  mRNA (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> wurden im Parenchym Unterschiede in der Regulation zwischen Wildtyp- und RAG-1<sup>-/-</sup>- Mäusen deutlich (Abb. 16). Dabei zeigten RAG-1<sup>-/-</sup>- Mäuse eine Hochregulation von IFN- $\gamma$  mRNA, während in Wildtypen eine verminderte Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung vorlag. Dagegen wiesen die RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant schwächere Induktion von IL-10 und TGF- $\beta$  mRNA, sowie eine Herabregulierung von Foxp3 mRNA auf. Kein Unterschied fand sich hinsichtlich einer schwachen Induktion von TRAIL mRNA. IL-4 mRNA wurde unabhängig vom Genotyp weder in Kontrollen noch nach Meningitisinduktion detektiert.

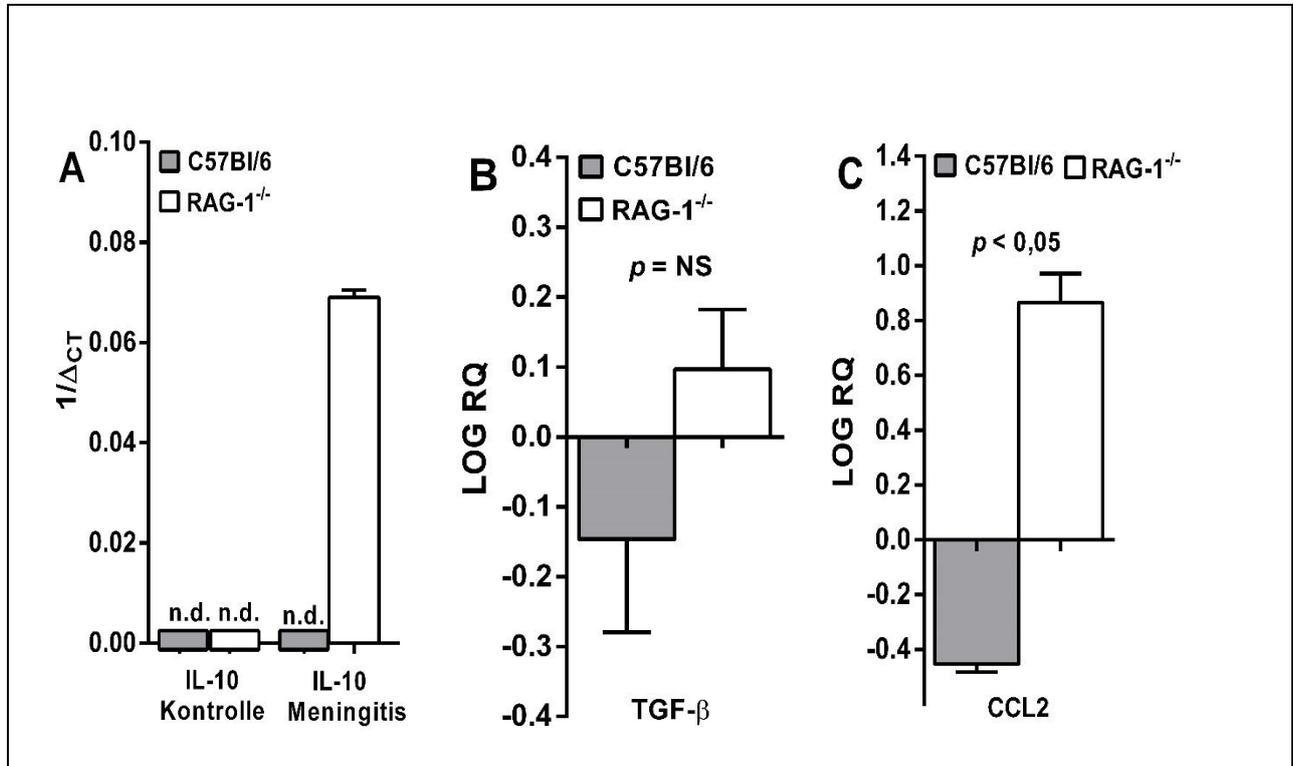
Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für eine Induktion von regulatorischen Genprodukten im Hirnparenchym in den Wildtyp-Mäusen, die u.a. mit der aktivitätsinduzierten alternativen Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen in Verbindung gebracht werden. Hingegen erscheint diese alternative Aktivierung in den RAG-1-defizienten Mäusen abgeschwächt bei vermehrter Aktivität proinflammatorischer Signale.



**Abbildung 16:** Einfluss der RAG-1-Defizienz auf die mRNA-Expression pro- und antiinflammatorischer Genprodukte 24 h nach Meningitisauslösung mit 10  $\mu$ g Pam<sub>3</sub>CycSK<sub>4</sub>. Als housekeeping-Gen wurden HGPRT genutzt. Expression von Interleukin-10 (IL-10), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3) und Tumor necrosis factor  $\alpha$ -related apoptosis inducing ligand (TRAIL) mRNA in zerebellären Lysaten. Die Regulation im Vergleich zu Kontrollmäusen des jeweiligen Genotyps ist als LOG RQ (Log Fold Change ( $\Delta\Delta_{CT}$ )) dargestellt. Statistische Analyse mittels Student's t Test für normal verteilte Daten und Mann Whitney U Test für nicht normal verteilte Daten.

In aus dem Hirngewebe isolierter CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Mikroglia zeigte sich ein entgegengesetztes Bild. So war IL-10 mRNA ausschließlich in RAG1<sup>-/-</sup>-Mäusen während Meningitis nachweisbar, nicht jedoch in erkrankten Wildtyp-Mäusen oder Kontrollen beider Genotypen (Abb. 17A). Für TGF- $\beta$  mRNA zeigten sich während der Meningitis numerisch eine Herabregulierung bei den Wildtyp-Mäusen und eine

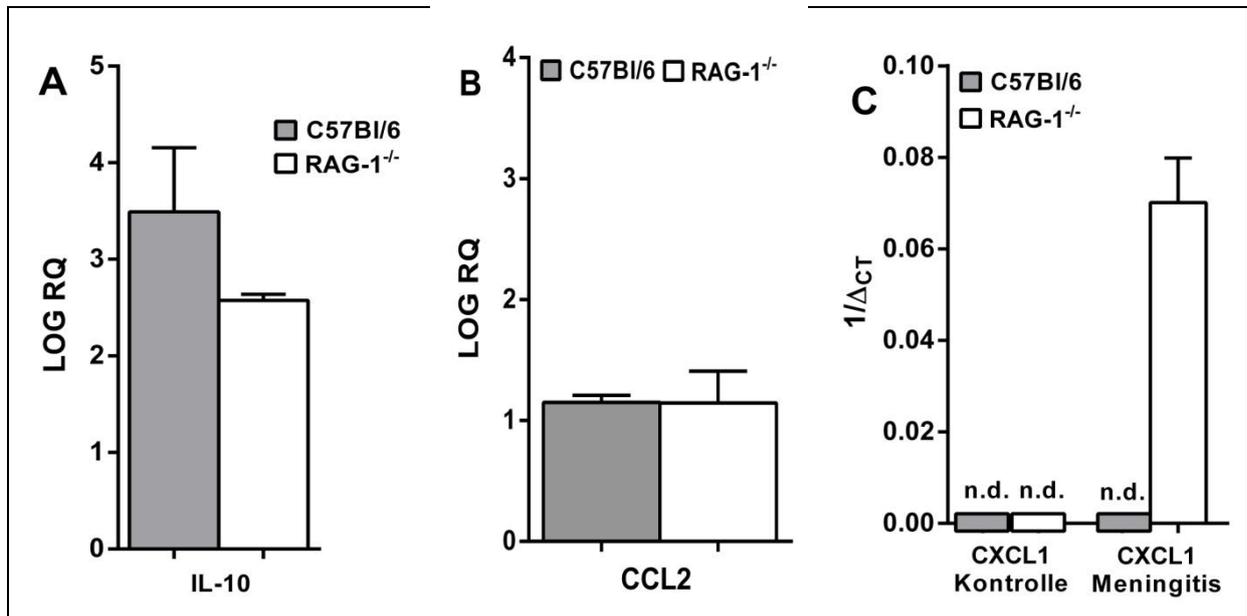
Induktion bei den RAG-1-defizienten Mäusen; der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ( $P = \text{NS}$ , Student's t Test, Abb.17B). Auch die CCL2 mRNA war bei Wildtyp-Mäusen herabreguliert und bei RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen hochreguliert ( $P < 0,05$ , Student's t Test, Abb. 17C).



**Abbildung 17:** Einfluss der RAG-1-Defizienz auf die mRNA-Expression pro- und antiinflammatorischer Genprodukte 24 h nach Meningitisauslösung mit 10  $\mu\text{g}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Als housekeeping-Gen wurden  $\beta$ -Actin genutzt. **(A-C)** Aktivierte Mikroglia und Makrophagen wurden aus dem Großhirnparenchym präpariert, mittels FACS-Sort als CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>-Population isoliert und auf die mRNA-Expression von IL-10 **(A)**, TGF- $\beta$  **(B)** und CCL2 **(C)** untersucht. In **(A)** ist die Expressionshöhe als  $\Delta_{CT}$ -Wert relativ zu Beta-Actin dargestellt, da innerhalb von 40 PCR-Zyklen keine Expression in der Kontrollbedingung nachweisbar war (n.d. = nicht detektierbar). In **(B-C)** ist die Expression relativ zu Kontrollen als LOG RQ (Log Fold Change ( $\Delta\Delta_{CT}$ )) dargestellt. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t Tests.

In CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen aus dem Liquor zeigte sich, ähnlich wie im Parenchymlysat, 24 h nach intrathekaler Injektion von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> eine tendenziell geringere Induktion der IL-10 mRNA in RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen als im Wildtyp-Mäusen ( $P = 0,08$ , Student's t Test, Abb. 18A). Kein Unterschied bestand bezüglich einer geringen Zunahme der CCL2 mRNA-Expression in beiden Genotypen ( $P = \text{NS}$ , Student's t Test, Abb. 18B). CXCL1 mRNA war ausschließlich in erkrankten RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäusen

nachweisbar, in Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-behandelten Wildtyp-Mäusen und in Kontrollen beider Genotypen hingegen nicht (Abb. 18C).



**Abbildung 18:** Einfluss der RAG-1-Defizienz auf die mRNA-Expression pro- und antiinflammatorischer Genprodukte 24 h nach Meningitisauslösung mit 10 µg Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Als housekeeping-Gen wurden β-Actin genutzt. **(A-C)** CD11b<sup>+</sup> myeloide Zellen wurden mittels FACS-Sort aus gepooltem Liquor isoliert und auf die mRNA-Expression von IL-10 **(A)**, CCL2 **(B)** und CXCL1 **(C)** untersucht. In **(A-B)** ist die Expression relativ zur Kontrolle als LOG RQ (Log Fold Change ( $\Delta\Delta_{CT}$ )) dargestellt. In **(C)** ist die Expressionshöhe als  $\Delta_{CT}$ -Wert relativ zu β-Actin dargestellt, da innerhalb von 40 PCR-Zyklen keine Expression in der Kontrollbedingung nachweisbar war (n.d. = nicht detektierbar). Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen.

#### 4.2.4 Rekonstitutionsexperimente

Zur peripheren Immunrekonstruktion erhielten RAG-1<sup>-/-</sup>-Mäuse 24 h vor Meningitisinduktion als Injektion in die Schwanzvene 1,5 x 10<sup>7</sup> Lymphozyten, die aus der Milz von Wildtyp-Mäusen gewonnen worden waren.

Im manuellen Differentialblutbild fand sich 24 h nach Meningitisinduktion eine partielle Rekonstitution der Lymphozyten mit 38 ± 14 % der Gesamtleukozyten im Vergleich zu 76 ± 15 % in Wildtypmäusen ( $P < 0,01$ , Kruskal-Wallis ANOVA und Man-Whitney U-Test).

Hinsichtlich der meningitisbezogenen Endpunkte 24 h nach intrathekaler Injektion von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> zeigte sich nach Gabe der Spenderlymphozyten eine deutlich höhere Leukozytenkonzentration im Liquor als bei nicht rekonstituierten RAG-1-defizienten Mäusen, vergleichbar mit den Befunden bei Wildtypmäusen (Abb. 13A). Auch im *tight-rope*-Test (Abb. 14A) führte die Rekonstitution mit Lymphozyten zu einer signifikanten Verringerung der klinischen Krankheitsschwere. Dagegen war kein signifikanter Effekt auf die Dichte der apoptotischen Zellkerne im Gyrus dentatus festzustellen (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Projekt 3: Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Rolle myeloider Zellen in der bakteriellen Meningitis

Für die *in vivo*-Experimente wurden aufgereinigte, vitale und funktionsfähige Granulozyten bzw. Monozyten von Wildtyp-Spendermäusen benötigt, die vor dem adoptiven Transfer *in vitro* aktiviert werden sollten.

#### 4.3.1 Kultur und Aktivierung unfraktionierter Splenozyten

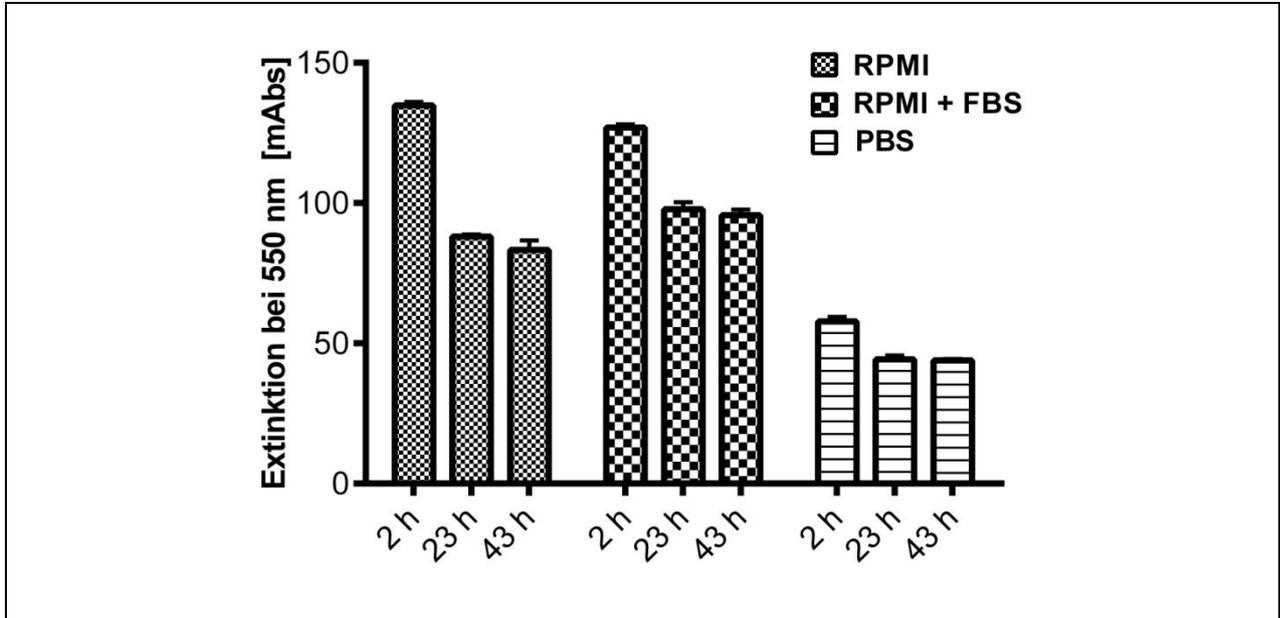
Als Ausgangsmaterial konnten aus je 2 Milzen  $52 \times 10^6$  bis  $73 \times 10^6$  Splenozyten gewonnen werden.

##### Kulturmedium

In Vorversuchen wurden jeweils  $10^5$  Splenozyten mit unterschiedlichen Medien inkubiert, um die optimalen Kulturbedingungen hinsichtlich des Überlebens zu ermitteln. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe des MTT-Tests quantifiziert. Bei Verwendung von RPMI-Fertigmedium mit Zugabe von 10 % fetalem bovinem Serum (FBS) betrug die mittlere Extinktion nach 2 h Inkubation  $126,98 \pm 3,71$  mAbs und sank nach 23 h auf  $97,43 \pm 7,71$  mAbs ( $P < 0,001$ , *two-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 19). Nach weiteren 24 h zeigte sich keine signifikante zusätzliche Abnahme der Extinktion ( $95,69 \pm 6,78$  mAbs,  $P = \text{NS}$ ). Allerdings führte die Verwendung von RPMI mit FBS-Zugabe nach adoptivem Transfer im Tierversuch ( $n = 2$ ) auch ohne vorherige Stimulation der Zellen zu einer intrathekalen Inflammation, erkennbar an einer Liquorpleozytose von 1386 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  nach 24 h, so dass FBS nicht verwendet werden konnte.

Als serumfreie Alternative wurden daher pyrogenfreies PBS sowie RPMI-Fertigmedium ohne Zugabe von Serum geprüft. Bei Verwendung von pyrogenfreiem PBS lag die Extinktion nach 2 h bei  $57,84 \pm 5,48$  mAbs und nach 23 h bei  $44,34 \pm 4,56$  mAbs ( $P < 0,001$  vs. RPMI mit 10 % FBS nach 23 h, *two-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Bei Verwendung von serumfreiem RPMI-Medium lag die Extinktion nach 2 h bei  $134,87 \pm 4,3$  mAbs und nach 23 h bei  $88,11 \pm 2,62$  mAbs ( $P < 0,05$  vs. RPMI mit 10 % FKS nach 23 h, *two-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Die Viabilität der Zellen war also bei Verzicht auf die Zugabe von

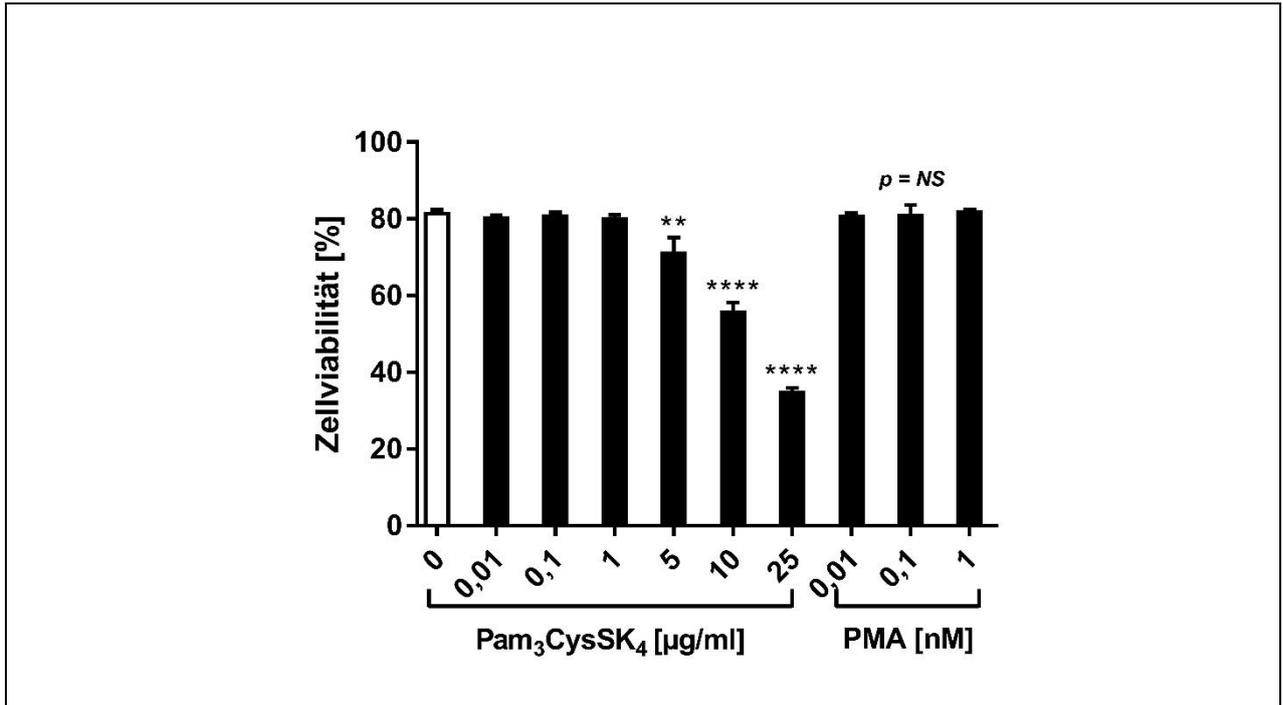
FBS nur geringfügig beeinträchtigt, während die Kultivierung in PBS mit einem hohen Verlust an Zellen verbunden war (Abb. 19).



**Abbildung 19:** Photometrisch bestimmte MTT-Aufnahme zur vergleichenden Quantifizierung der Stoffwechselaktivität der Splenozyten nach Kultivierung in unterschiedlichen Medien zu den dargestellten Zeitpunkten. Dargestellt sind Ergebnisse aus einer Präparation in 12 facher Bestimmung. Die statistische Analyse wurde mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

#### Dosis-Wirkungsbeziehung von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>

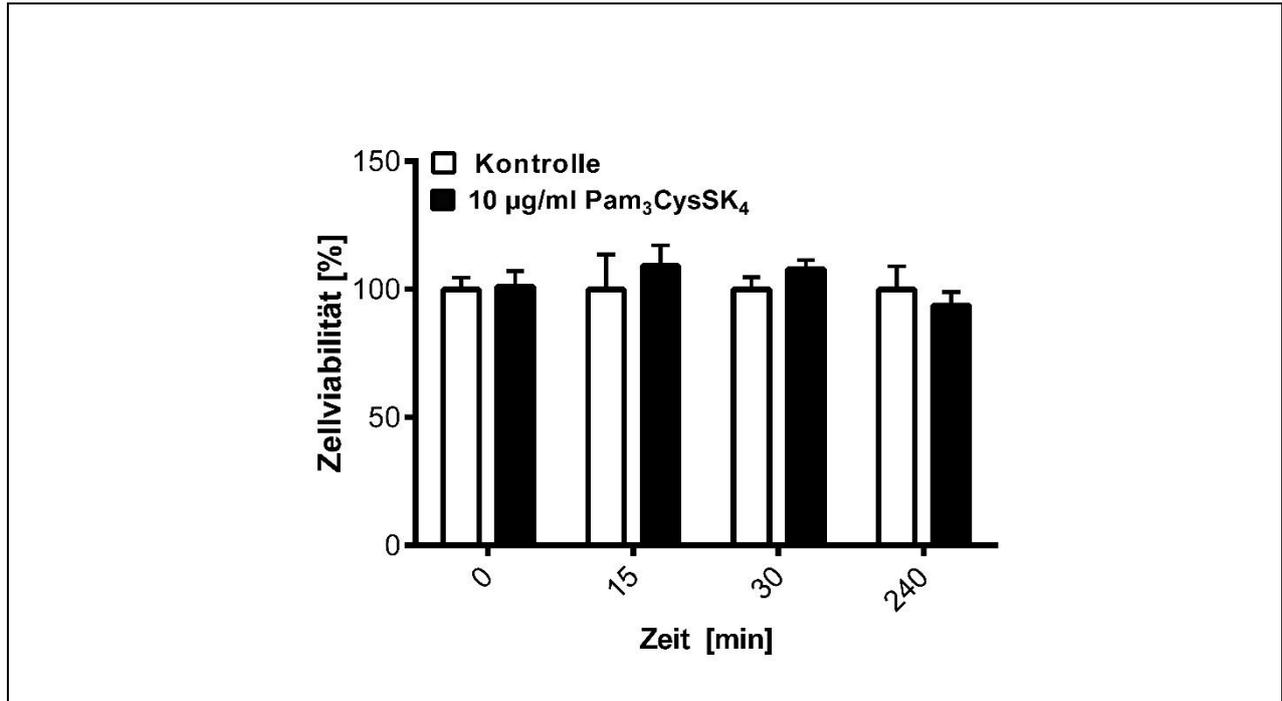
In einer Dosis-Wirkungs-Studie wurden Splenozyten mit aufsteigenden Konzentrationen von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> inkubiert. Als Positivkontrolle diente der Phorbolster PMA. Vitalität und Aktivierung wurden nach 30 min mittels FACS untersucht. Während PMA in Konzentrationen bis 1 nM nicht zu einer Zunahme abgestorbener Zellen führte, zeigte sich zunehmende Toxizität von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> in einer Konzentration von 5 mg/ml oder mehr ( $P < 0,05$ , two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 20).



**Abbildung 20:** Prozentualer Anteil lebender Splenozyten nach 30 min Inkubation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (0,1-25 µg/ml) oder PMA (0,01-1 nM). Tote Zellen wurden mit Propidiumiodid markiert. Dargestellt sind Ergebnisse aus einem Experiment in Doppelbestimmung. Die statistische Analyse wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

#### Metabolismus (Stoffwechselaktivität) nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>

Um biologische Effekte der aktivierten Splenozyten *in vivo* untersuchen zu können, musste eine ausreichend lange Lebensdauer der *in vitro* stimulierten Zellen sichergestellt werden. Nach Zugabe von 10 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> zeigte sich im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen bis 4 h ein vergleichbarer und hoher Anteil an vitalen Zellen. Der MTT-Umsatz blieb in stimulierten Zellen bis zu 4 h auf dem Niveau der nicht stimulierten Kontrollen ( $P = NS$ , two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 21).

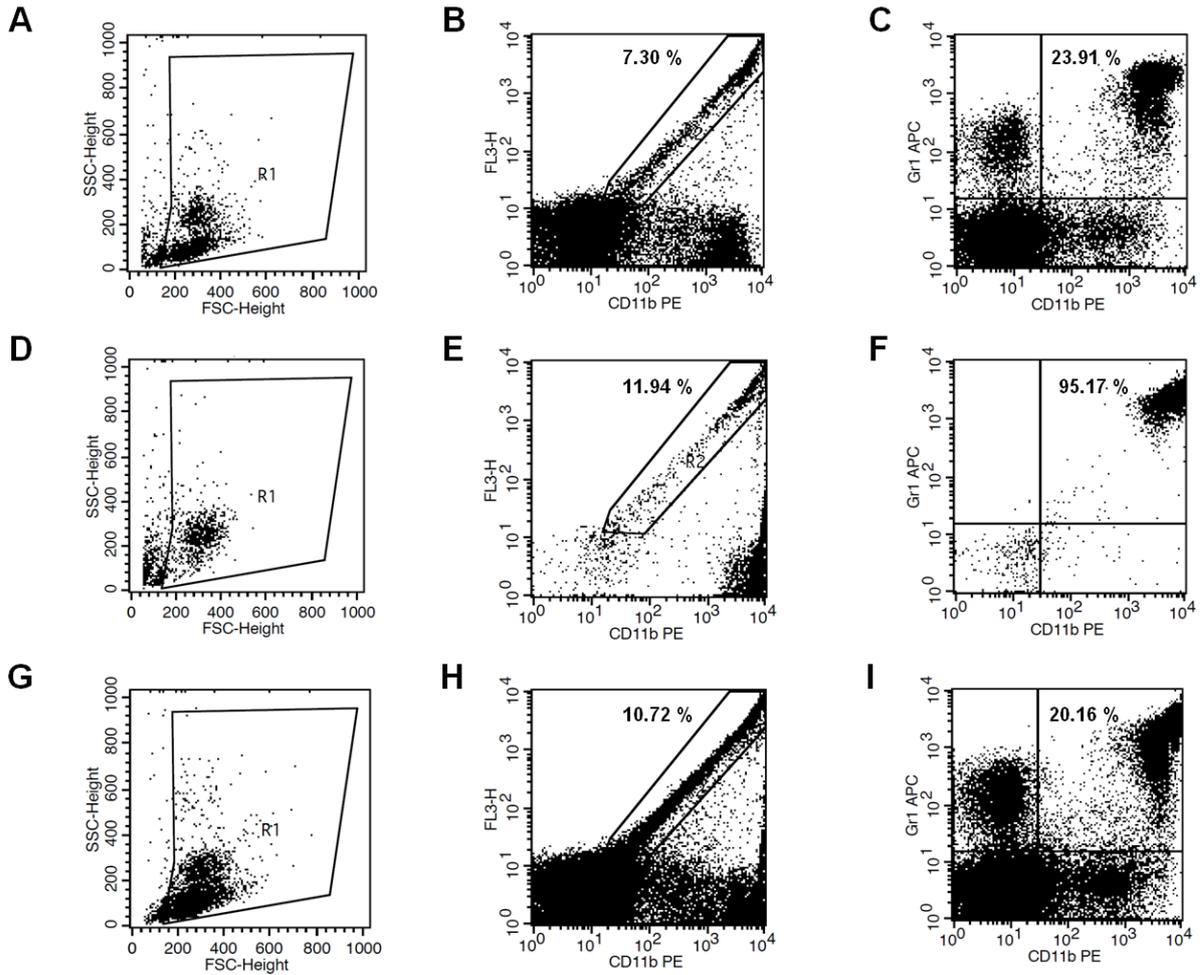


**Abbildung 21:** MTT-Umsatz zur vergleichenden Quantifizierung der Stoffwechselaktivität der Splenozyten nach Stimulation mit 10 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (schwarze Balken) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (weiße Balken) zu den dargestellten Zeitpunkten. Dargestellt sind Ergebnisse aus einer Präparation in 5 facher Bestimmung. Die statistische Analyse wurde mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

### 4.3.2 Gewinnung und Aktivierung von Granulozyten

#### Gewinnung von Granulozyten

Granulozyten wurde aus den Splenozyten mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) als Ly6G<sup>+</sup>-Population positiv selektiert. Der Erfolg der Präparation wurde vor und nach der Zellsortierung mittels FACS quantifiziert. Ein repräsentatives Beispiel findet sich in Abbildung 22. Der Anteil toter Zellen vor MACS lag bei 5 - 10 %. Etwa 20 - 25 % der Zellen waren CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>. Nach MACS stieg der Anteil der toten Zellen in der positiv selektierten Fraktion auf 12 - 17 % an. Der Anteil CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> Zellen (Reinheitsgrad der Granulozyten) in der Ly6G-positiv selektierten Fraktion betrug 90 - 96 %. In der negativen Fraktion verblieb ein Anteil von ca. 20 % CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> Zellen. Somit konnte durch die etablierte MACS-Methode eine hohe Reinheit der Positivfraktion (Ziel: > 90 %) erreicht werden. Die Negativfraktion zeigte hingegen eine nur mäßige Spezifität.

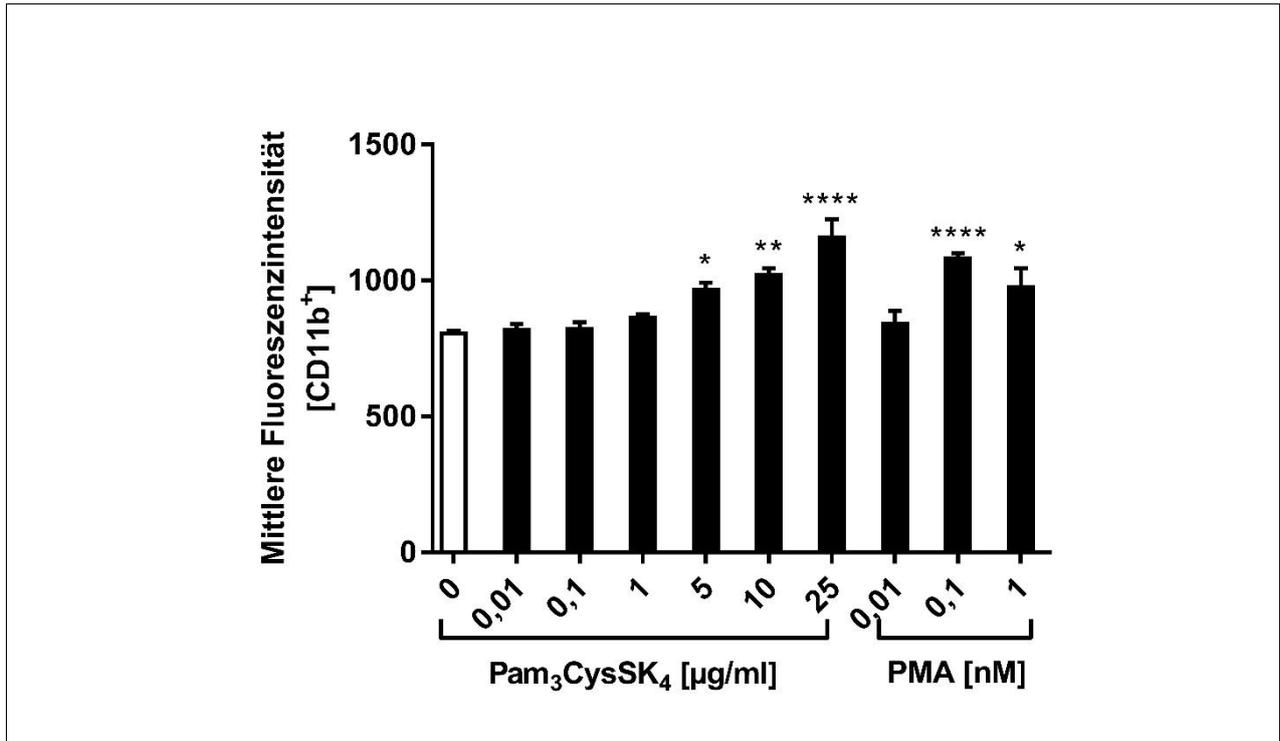


**Abbildung 22:** Begleitende FACS-Analyse zur Aufreinigung von Granulozyten aus Splenozyten mittels MACS. (A-C) gesamte Splenozyten. (D-F) Ly6G-positiv selektierte Fraktion. (G-I) Negativfraktion. (B, E, H) tote Zellen. (C, F, I) Anteil der  $Cd11bGr1^{high}$ -Zellen (Granulozyten).

#### Aktivierung der Granulozyten mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>

Die Aktivierung der Granulozyten wurde mittels FACS-Analyse anhand der mittleren Fluoreszenzintensität für CD11b innerhalb der  $Cd11b^{+}Gr1^{high}$ -Zellen gemessen. Hier zeigte sich eine erkennbare Aktivierung ab Konzentrationen von 5  $\mu\text{g/ml}$  mit einem Maximum bei der höchsten untersuchten Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$ . Die Aktivierung bei 5 und 10  $\mu\text{g/ml}$  war vergleichbar mit dem bei PMA beobachteten Effekt ( $P < 0,001$ , one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche, Abb. 23).

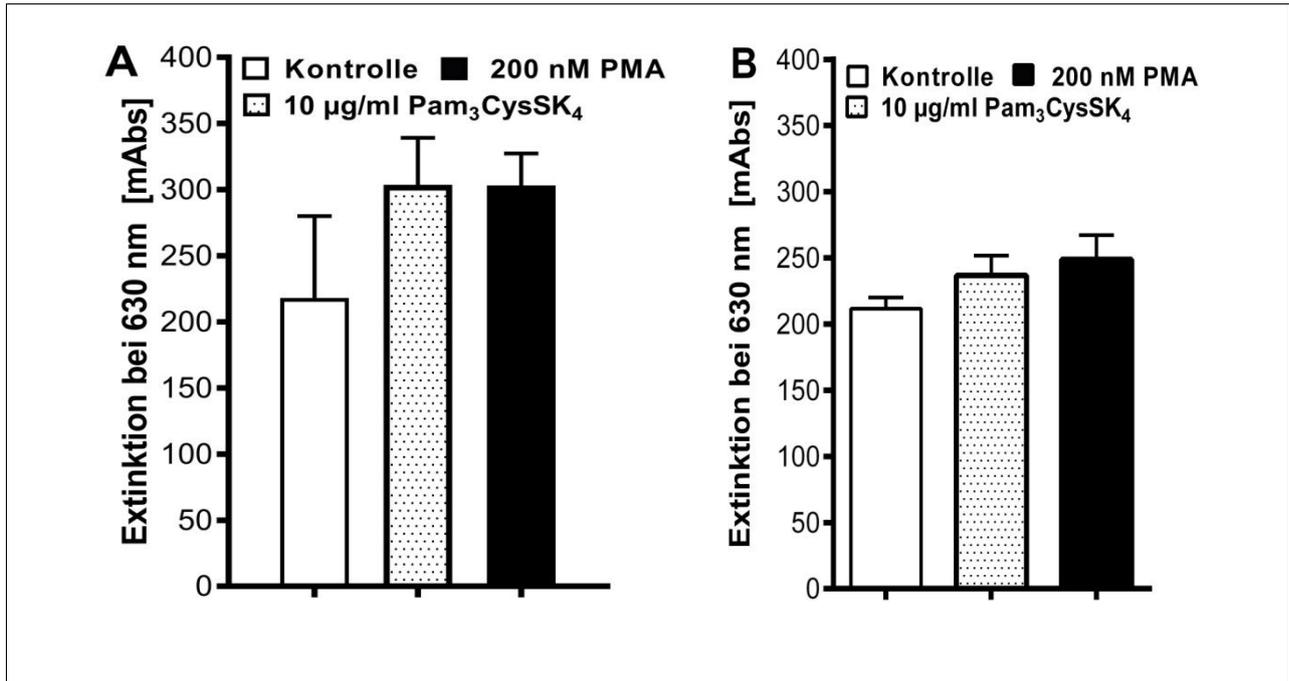
Aufgrund der festgestellten Dosis-Wirkungsbeziehungen wurde für die weiteren Experimente eine Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> gewählt, um einen Kompromiss hinsichtlich einer ausreichenden Aktivierung der Granulozyten bei geringer Toxizität zu finden.



**Abbildung 23:** Dosisabhängige Aktivierung der  $Cd11b^+Gr1^{high}$ -Granulozyten nach 30 min Inkubation mit  $Pam_3CysSK_4$  oder PMA, gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität der Anti-CD11b-Immurfärbung. Weißer Balken, Kontrolle. Die statistische Analyse wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

#### Aktivität der Phagozytenoxidase

Neben der Hochregulation von CD11b als Hinweis auf eine immunologische Aktivierung war von Interesse, ob in den Ly6G-positiv selektierten Granulozyten durch  $Pam_3CysSK_4$  typische entzündliche Stoffwechselfvorgänge induziert werden können. Repräsentativ hierfür wurde die Aktivität der Phagozytenoxidase anhand der Umsetzung von NBT zum Diformazan im Zellkulturüberstand colorimetrisch gemessen. Eine tendenzielle Zunahme der Extinktion im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen fand sich nach Inkubation mit 10 µg/ml  $Pam_3CysSK_4$  sowohl bei unfraktionierten Splenozyten ( $303,6 \pm 71,03$  mAbs im Vergleich zu Kontrolle  $218,12 \pm 123,84$  mAbs, Abb. 24A) als auch bei den Ly6G-positiv selektierten Granulozyten ( $236,73 \pm 25,92$  mAbs im Vergleich zur Kontrolle  $211,63 \pm 14,52$  mAbs, Abb. 24B). Die Enzymaktivität nach Inkubation mit  $Pam_3CysSK_4$  lag dabei in einer vergleichbaren Größenordnung wie nach Stimulation mit PMA als Positivkontrolle.



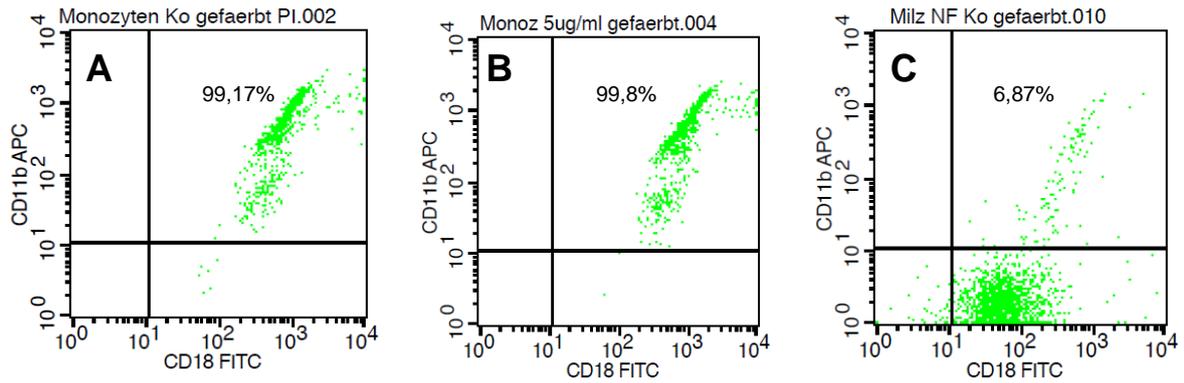
**Abbildung 24:** Aktivierung der Phagozytenoxidase (A) in  $10^5$  unfraktionierten Splenozyten ( $n = 2$ , Doppelbestimmung) bzw. (B) in  $10^5$  Ly6G-positiv selektierten Granulozyten ( $n = 2$ , Doppelbestimmung) nach 30 min Inkubation mit  $10 \mu\text{g/ml Pam}_3\text{CysSK}_4$  oder  $200 \text{ nM PMA}$ . Nachweis über fotometrisch gemessenen Farbumschlag von NBT (Messung der Extinktion bei 630 nm). Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen.

#### 4.3.3 Gewinnung und Aktivierung von Monozyten

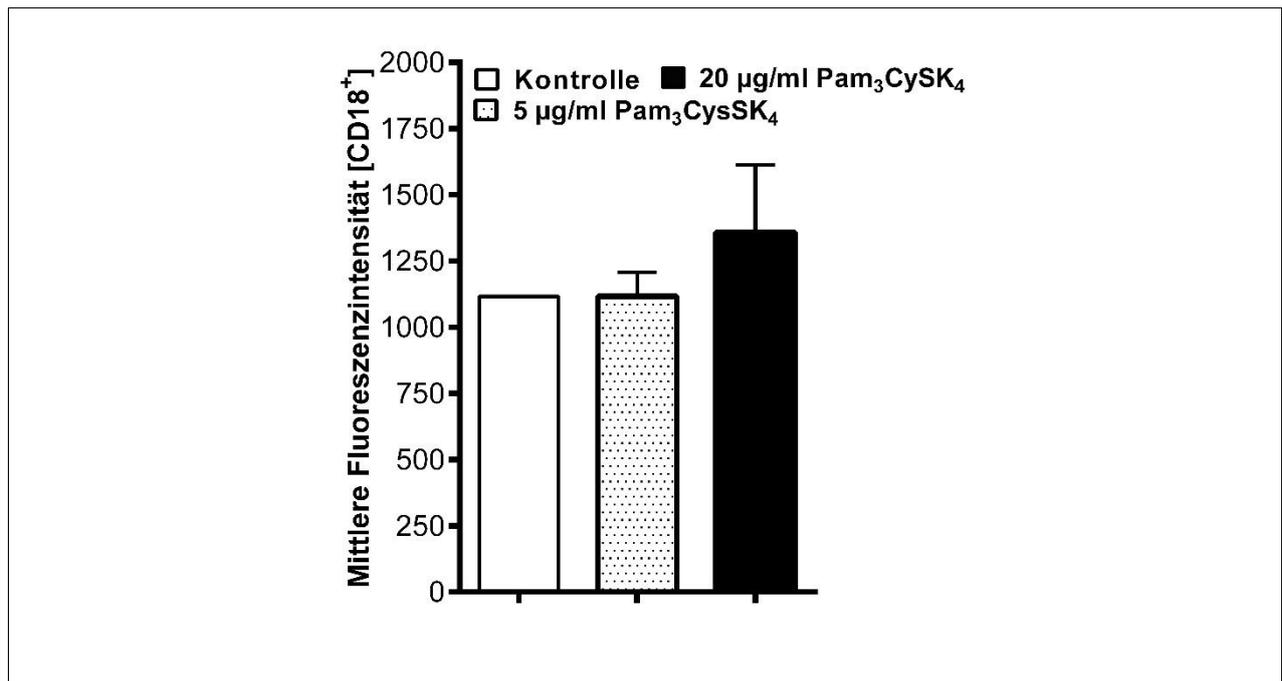
Zur Anreicherung von Monozyten wurden aus den Splenozyten  $\text{CD11b}^+$ -Zellen mittels MACS positiv selektiert und durch Inkubation mit  $\text{Pam}_3\text{CysSK}_4$  stimuliert. Reinheit und Aktivierung der Zellen wurden mittels FACS überprüft (Abb. 25).

Nach der Aufreinigung waren bis zu 99,17 % der lebenden Zellen  $\text{CD11b}$ -positiv (Abb. 25A). Nach 30 min Stimulation mit  $5 \mu\text{g/ml Pam}_3\text{CysSK}_4$  waren 90,5 % bis 99,8 % der lebenden Zellen  $\text{CD11b}^{\text{high}}\text{CD18}^{\text{high}}$ -exprimierend (Abb. 25B). Bei Messung der mittleren Fluoreszenzintensität trat die Dosisabhängigkeit der Aktivierung hervor (Abb. 26). Zusammenfassend führte das MACS-Verfahren in Verbindung mit der Stimulation mit  $20 \mu\text{g/ml Pam}_3\text{CysSK}_4$  zu einer tendenziell höheren Ausbeute lebender und aktivierter Monozyten.

Im Gegensatz zur der Gewinnung der Granulozyten zeigte sich eine fast vollständige Spezifität der Negativfraktion. Die FACS-Untersuchungen ergaben hier einen Anteil von 5,04 % bis 6,87 % enthaltener  $\text{CD11b}$ -positiver Zellen (Abb. 25C).



**Abbildung 25:** Ein Beispiel der Isolation und Aktivierung von Monozyten. (A) FACS-Analyse nicht stimulierter mittels MACS CD11b-positiv selektierter Monozyten. (B) Mittels MACS CD11b-positiv selektierte Population (Monozyten) nach Stimulation mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Der Anteil der CD11b<sup>high</sup>CD18<sup>high</sup>-Population beträgt 99,17 %. (C) CD11b-negativ selektierte Population, nicht stimuliert (Beispiel von  $n = 2$  representative Experimente).



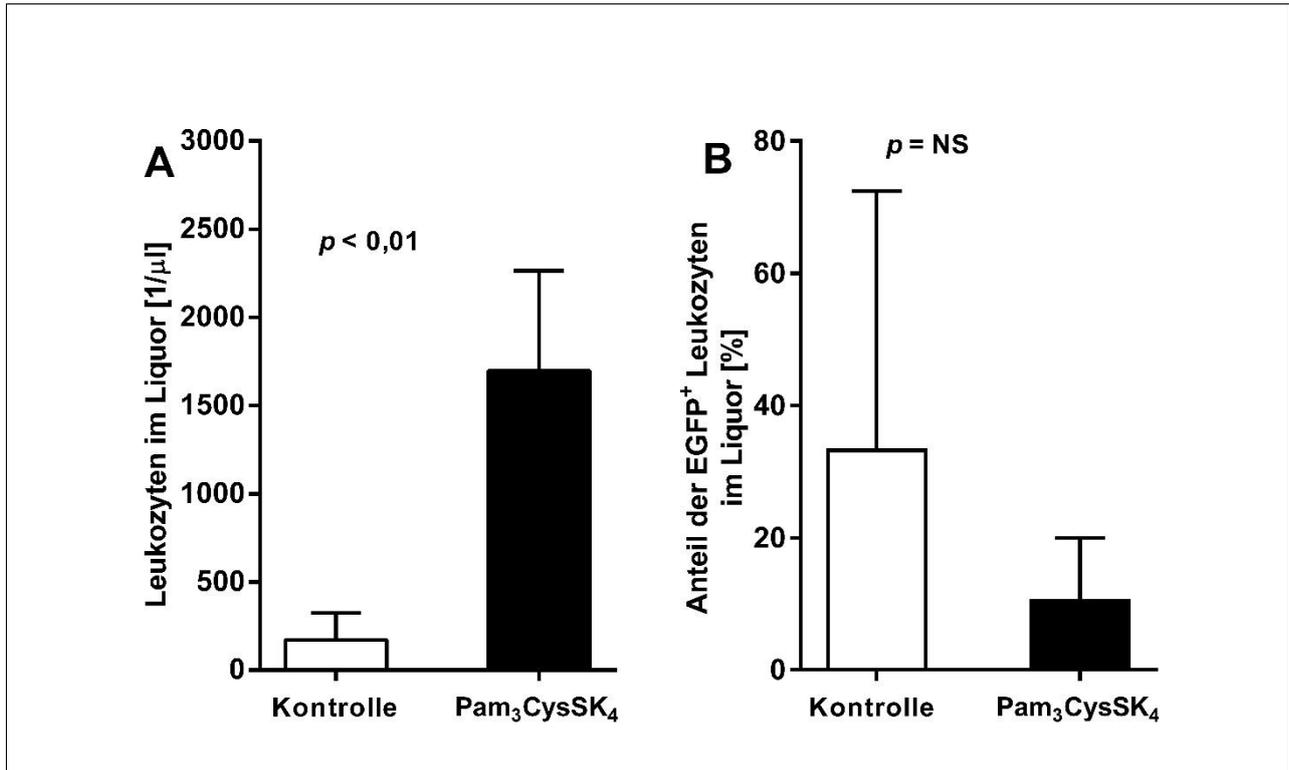
**Abbildung 26:** Konzentrationsabhängige Aktivierung der aus der Milz gewonnenen Monozyten durch Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, dargestellt als mittlere CD18-Fluoreszenzintensität der CD11b<sup>high</sup>CD18<sup>high</sup>-Zellen nach 30 min Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Dargestellt ist das Ergebnis von zwei Experimenten. Weißer Balken, Kontrolle ( $n = 1$ ) behandelt mit PBS. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen.

#### 4.3.4 *In vivo* Experimente

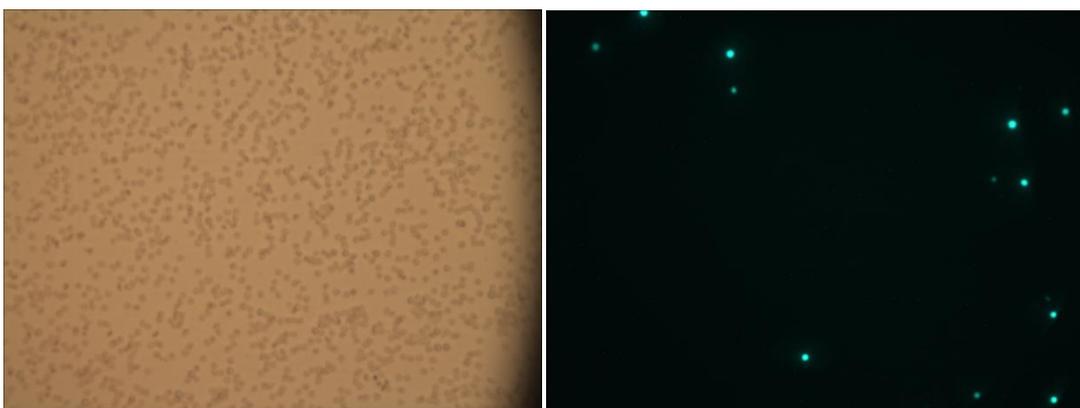
Das hier etablierte Modell beruht auf dem Transfer von Wildtyp-Leukozyten, die zuvor mit dem spezifischen TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> aktiviert wurden, in den Subarachnoidalraum von TLR2-defizienten Mäusen, um so die direkte entzündliche Aktivierung auf spezifische Leukozytenpopulationen zu begrenzen. Nachdem wie oben dargestellt die Protokolle zur Aufreinigung und Stimulation der Spenderleukozyten etabliert worden waren, wurden Pilotexperimente mit unfraktionierten Splenozyten, mit Ly6G-positiv selektierten Granulozyten sowie mit der Negativfraktion oder den nach MACS wiedervereinigten Positiv- und Negativfraktionen durchgeführt, außerdem mit Cd11b-positiv selektierten Monozyten. Um eine Differenzierung zwischen wirtseigenen und Spenderleukozyten zu ermöglichen, wurden in einem Teil der Experimente TLR2-Wildtyp Splenozyten von EGFP-transgenen Mäusen als Ausgangsmaterial verwendet.

##### Unfraktionierte Splenozyten

In Kontrollexperimenten war 24 h nach intrathekaler Injektion von  $5 \times 10^6$  unstimulierten Splenozyten nur eine geringe Leukozytenkonzentration im Liquor nachweisbar. Von den nachgewiesenen  $98 \pm 122$  Leukozyten je  $\mu\text{l}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) waren  $33,5 \pm 38,9$  % (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) Spenderleukozyten (Abb. 27, Abb. 28). Bei Verwendung von  $5 \times 10^6$  mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimulierten Splenozyten fand sich eine erheblich ausgeprägtere Liquorpleozytose von  $1654 \pm 827/\mu\text{l}$  ( $P < 0,001$  verglichen mit unstimulierten Splenozyten, Student's t Test), von denen  $10,8 \pm 10,02$  % EGFP-positive Donorzellen waren, dabei bestand hinsichtlich der absoluten Konzentration von Donorzellen im Liquor kein signifikanter Unterschied zwischen Experimenten mit Injektion von stimulierten bzw. unstimulierten Zellen ( $P = \text{NS}$ , Student's t Test). Diese Befunde sprechen dafür, dass die spinal injizierten aktivierten Leukozyten sich bis in den zerebralen Subarachnoidalraum verteilen und dort eine weitere Rekrutierung wirtseigener Leukozyten bewirken können.



**Abbildung 27:** Leukozytenzahl im Liquor von TLR2-defizienten Mäusen nach intrathekalem Transfer von stimulierten Wildtyp-Donorzellen. **(A)** Leukozytenzahl im Liquor 24 h nach Injektion von unstimulierten (offener Balken,  $n = 10$ ) versus mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimulierten ( $n = 14$ , schwarzer Balken) unfraktionierten Splenozyten ( $P < 0,01$  Student's *T*-Test). **(B)** Prozentualer Anteil EGFP-positiver Leukozyten im Liquor 24 h nach dem Transfer von unstimulierten ( $n = 5$ , offener Balken) versus mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimulierten Leukozyten ( $n = 5$ , schwarzer Balke). Statistische Analyse mittels Student's *t* Test.

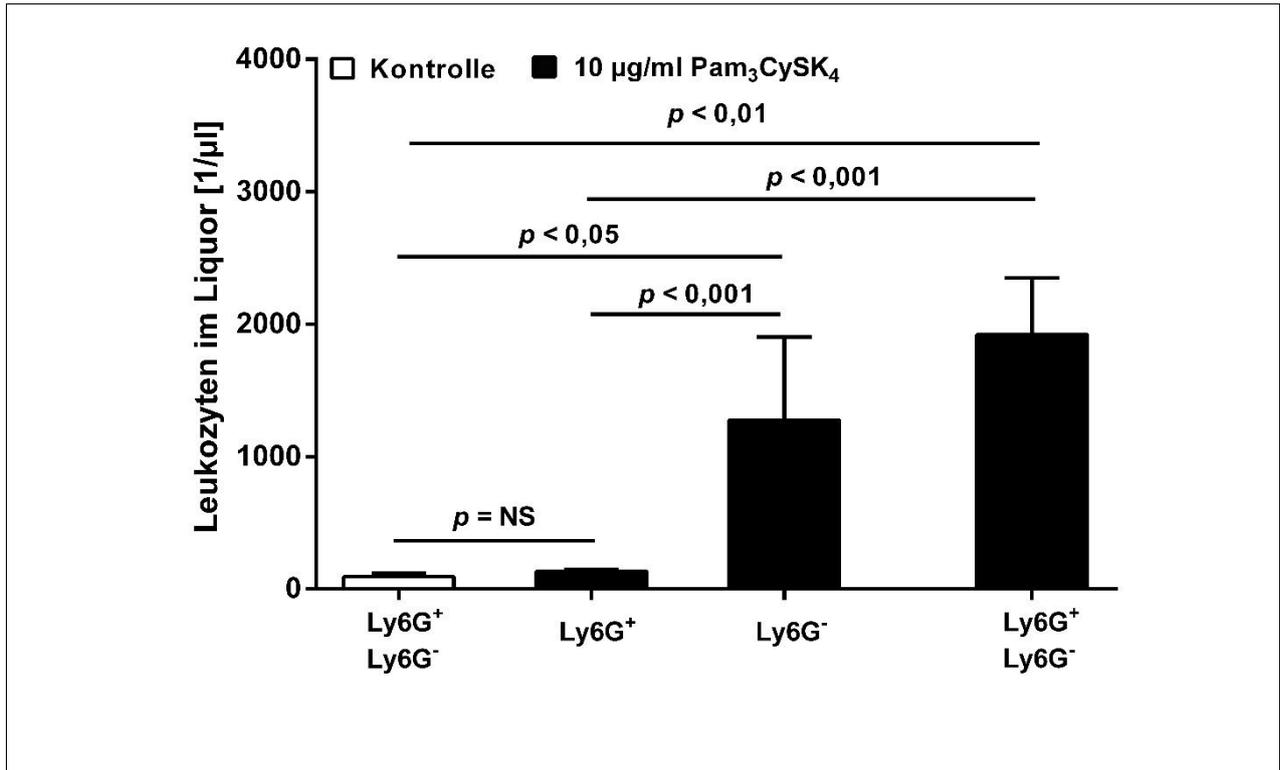


**Abbildung 28:** Bestimmung des Anteils der wirtseigenen Leukozyten im Liquor durch lichtmikroskopische Zählung der Gesamtzahl **(A)** und fluoreszenzmikroskopische Identifikation der EGFP-positiven Donorleukozyten **(B)**. Das Beispiel zeigt ein einzelnes Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung.

### Pilotexperimente mit Granulozyten

In vier experimentellen Gruppen wurden TLR2-defizienten Mäusen entweder nach vorheriger *in vitro*-Stimulation der Zellen mittels Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> 1,5 x 10<sup>6</sup> Ly6G-positiv selektierte Zellen, 5 x 10<sup>6</sup> negativ selektierte Zellen, 5 x 10<sup>6</sup> Zellen aus den wiedervereinigten Fraktionen oder 5 x 10<sup>6</sup> unstimulierte Zellen aus den wiedervereinigten Fraktionen intrathekal injiziert.

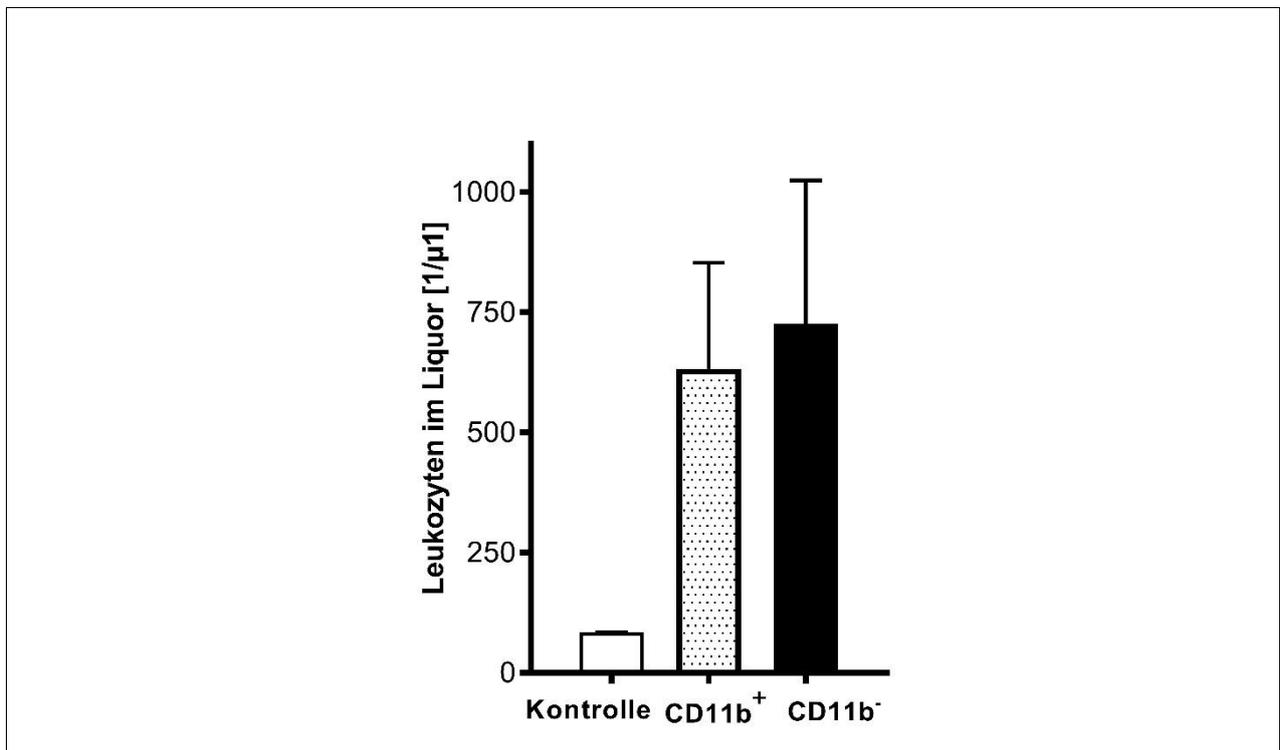
Bei Verwendung aktivierter Ly6G<sup>+</sup>-Zellen fand sich im Liquor nach 24 h nur eine geringe Pleozytose von 133 ± 16 Leukozyten/μl, die sich nicht signifikant von der Zellzahl von 93 ± 26 /μl in den mit unstimulierten Zellen beider Fraktionen behandelten Kontrollen unterschied ( $P = \text{NS}$ ; *one-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche; Abb. 29). Im Gegensatz dazu war die Leukozytenkonzentration bei Verwendung der negativen Fraktion stark erhöht (1251 ± 622/μl,  $P < 0,01$  im Vergleich zu stimulierten Ly6G<sup>+</sup>-Zellen und  $P < 0,001$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen). Auch die intrathekale Injektion der wiedervereinigten Fraktionen bewirkte einen starken Leukozyteneinstrom in den Liquor mit 1922 ± 427/μl ( $P < 0,01$  verglichen mit stimulierten Ly6G<sup>+</sup>-Zellen und  $P = 0,015$  verglichen mit der Kontrollbedingung).



**Abbildung 29:** Leukozytenzahl im Liquor 24 h nach intrathekalem Transfer von  $1,5 \times 10^6$  aufgereinigten Ly6G<sup>+</sup>-Zellen (Granulozyten;  $n = 11$ ),  $5 \times 10^6$  Ly6G<sup>-</sup>-Zellen (Negativfraktion;  $n = 10$ ) oder  $5 \times 10^6$  Zellen der wiedervereinigten Ly6G<sup>+</sup>- und Ly6G<sup>-</sup>-Fraktionen ( $n = 3$ ) nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (schwarze Balken) oder ohne vorherige Stimulation (Kontrolle;  $n = 10$ ; weißer Balken). Statistische Analyse mittels one-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche.

### Pilotexperimente mit Monozyten

In Pilotexperimenten wurden 3 Mäusen  $1,5 \times 10^6$  Leukozyten aus der CD11b-Positivfraktion oder  $5 \times 10^6$  Leukozyten aus der Negativfraktion ( $n = 2$ ) nach Aktivierung mit Pam<sub>3</sub>CysSk<sub>4</sub> intrathekal injiziert. In Kontrollmäusen waren 24 h nach Injektion nicht stimulierter CD11b<sup>+</sup> Zellen ( $n = 2$ )  $45 \pm 56,6$  Leukozyten/ $\mu$ l nachweisbar. Bei den mit der aktivierten Positivfraktion behandelten Mäusen fanden sich  $633 \pm 381$  Leukozyten/ $\mu$ l im Liquor. Der Unterschied zur Kontrolle war statistisch nicht signifikant, ebenso bei Verwendung der stimulierten Negativfraktion ( $725 \pm 422$  Leukozyten/ $\mu$ l, Abb. 30).



**Abbildung 30:** Leukozytenzahl im Liquor 24 h nach intrathekalem Transfer von  $1,5 \times 10^6$  aufgereinigten CD11b<sup>+</sup>-Zellen (Monozyten,  $n = 3$ ) bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen aus der negativen Fraktion ( $n = 2$ ). Schwarze Balken zeigen mit  $20 \mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSk<sub>4</sub> stimulierte Zellen. Weißer Balken: Gabe von nicht stimulierten CD11b<sup>+</sup>-Zellen (Kontrollen;  $n = 2$ ). Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Rolle von Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis

#### 5.1.1 Proapoptotische Effekte von TPO

Viele Überlebende einer bakteriellen Meningitis weisen chronische neurophysiologische Defizite auf. Als eine wichtige Ursache wird ein bei bakterieller Meningitis nachgewiesener Verlust von neuronalen Zellen, insbesondere im Hippocampus, einer für Gedächtnisprozesse bedeutsamen Hirnregion, angesehen [85]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht im Detail aufgeklärt. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine Beteiligung von TPO und dessen Rezeptor c-Mpl an der Modulation der entzündlich bedingten Nervenzellschädigung.

Als diesbezüglicher Hauptbefund zeigte sich 24 h nach der Meningitis-Induktion mit *S. pneumoniae* in den TPO-Rezeptor-defizienten c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen eine geringere Dichte apoptotischer Zellkerne in Körnerzellschicht des Gyrus dentatus als bei Wildtyp-Mäusen. Eine spezifische proapoptotische Wirkung von TPO im Kontext der Inflammation wird dadurch unterstützt, dass in infizierten Wildtyp-Mäusen die zusätzliche intrathekale Applikation von rekombinantem TPO zu einer Zunahme apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus führte. Nebenbefundlich war auch eine Verschlechterung des klinischen Phänotyps in Form eines verstärkten perioperativen Gewichtsverlustes bei Wildtyp-Mäusen nachweisbar.

Eine proapoptotische Wirkung von TPO auf Nervenzellen *in vivo* wurde erstmals im Jahr 2005 durch H. Ehrenreich und ihre Arbeitsgruppe in einem Ratten-Ischämiemodell beschrieben [64]. In diesen Experimenten wirkten sowohl endogenes TPO als auch exogenes rekombinantes TPO insbesondere auf neugebildete Neuronen im Gyrus dentatus proapoptotisch. Die Autoren vermuteten, dass eine physiologische Funktion von TPO/c-Mpl darin liegen könnte, überzählige Neurone während der Hirnreifung zu entfernen.

In früheren Untersuchungen fand unsere Arbeitsgruppe Hinweise, dass bei der bakteriellen Meningitis negative Effekte auf die Neurogenese zu Atrophie und Nervenzellverlust im Hippocampus beitragen könnten [86].

Effekte auf die Neurogenese wurden im aktuellen Projekt nicht untersucht. In dem in beiden Fragestellungen verwendeten Mausmodell zeigten Doppelfärbungen gegen NeuN jedoch, dass überwiegend reife Neuronen von der krankheitsinduzierten Apoptose betroffen sind [86]. Es ist daher zu vermuten, dass die Schadenszunahme in der bakteriellen Meningitis nicht auf der Verstärkung eines physiologischen Reifungsmechanismus, sondern auf der Verstärkung anderer Prozesse durch TPO/c-Mpl-System beruht.

### **5.1.2 Wo wird TPO während der bakteriellen Meningitis gebildet?**

Eine wichtige Frage ist, wo proapoptotisch wirksames TPO während der Meningitis gebildet wird. Aus unterschiedlichen Quellen war bekannt, dass Thrombopoietin und sein Rezeptor sowohl im menschlichen als auch im Nagetiergehirn exprimiert werden [62-64, 87], wobei die beteiligten Zelltypen noch nicht identifiziert waren.

*In vivo* zeigte sich im aktuellen Projekt in den mit Pneumokokken infizierten Mäusen eine vermehrte Expression von Tpo mRNA im Hirngewebe, wobei eine immunhistologische Lokalisation des Proteins leider nicht gelang. Ursachen könnten in einer geringen Konzentration des Liganden im Gewebe und in der Spezifität der verwendeten Antikörper liegen. Untersuchungen der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stenzel wiesen hingegen TPO-Expression auf Proteinebene in Makrophagen bzw. aktivierter Mikroglia im menschlichen Cortex bei Enzephalitis nach [84].

Die aktuellen *in vitro* Untersuchungen lieferten im Vergleich zu früheren Befunden uneinheitliche Ergebnisse. Eine verminderte Expression von Tpo mRNA war in primären hippocampalen Neuronen und Astrozyten der Ratte nach Hypoxie [64] sowie in primärer Mikroglia und Astrozyten der Ratte nach der Stimulation mit dem Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben [76]. Ähnlich zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit eine Herunterregulation von Tpo mRNA in primärer Mikroglia der Maus nach der Stimulation mit dem synthetischen Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Abweichend hiervon führte jedoch die Inkubation dieser Zellen mit bakteriell konditioniertem Medium zu einer Hochregulation von Tpo mRNA nach 2,5 und 24 h, während in Maus-Makrophagen eine vorübergehende Hochregulation von Tpo mRNA nach 2,5 h und eine anschließende Herunterregulation nach 24 h beobachtet wurden (Daten gezeigt in [84]).

Diese differentiellen Ergebnisse deuten höchstwahrscheinlich auf einen Unterschied der Wirkung bakterieller Zellwandbestandteilen (LPS, Lipopeptid) und der

Stoffwechselprodukte lebender Bakterien hin. Um die beteiligten Stoffwechselprodukte zu identifizieren, wurden ergänzende Experimente durchgeführt, in denen kultivierte Makrophagen mit bakteriell konditioniertem Zellkulturmedium stimuliert wurden. Die bei Konditionierung mit D39 Wildtyp-Pneumokokken gesehene Hochregulation von Tpo mRNA war bei der Konditionierung mit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-defizienten Pneumokokken Mutante  $\Delta spxB$  oder mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken Mutante  $\Delta pln$  jeweils stark abgeschwächt oder fehlend. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Pneumolysin scheinen daher an der Regulation der Tpo-Expression durch Mikroglia und Makrophagen der Maus beteiligt zu sein. Im Fall von Pneumolysin könnten hierbei sowohl seine direkte Wirkung als porenbildendes Exotoxin [88] als auch eine rezeptorvermittelte Wirkung an immunkompetenten Zellen nach Bindung an TLR4 [89] eine Rolle spielen. Gegen letztere Annahme spricht allerdings, dass LPS als prototypischer TLR4-Agonist keine vergleichbare Wirkung zeigte [76].

In dieser Arbeit wurden mögliche Effekte in zerebralen Endothelzellen nicht untersucht. Zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen werden durch Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien aktiviert [42], und diese Aktivierung stellt den ersten entscheidenden Schritt für die Rekrutierung von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke in den Liquorraum dar. Endothelzellen aus unterschiedlichen Geweben exprimieren Thrombopoietin und c-Mpl [69, 76, 90, 91]. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Hochregulation der Tpo-Expression in mikrovaskulären zerebralen Endothelzellen der Ratte nach der Stimulation mit LPS [76]. Zudem bewirkt die Stimulation mit rTPO eine Induktion proinflammatorischer Zytokinen in kultivierten Endothelzellen [69].

Es scheint insofern plausibel, dass aktivierte Endothelzellen während einer bakteriellen Meningitis vermehrt TPO bilden könnten, welches dann einen proinflammatorischen Effekt auf das Endothelium selbst und auf die benachbarten Astrozyten ausüben würde.

### 5.1.3 Einfluss von TPO auf die Aktivierung von Mikroglia

Als weiteren Kernbefund des Projektes zeigten FACS-Untersuchungen aus dem Hirngewebe isolierter Zellen, sowie Immunhistologie, eine reduzierte Aktivierung der Mikroglia während der experimentellen Meningitis in den c-Mpl-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Mikrogliazellen stellen residente mononukleäre Zellen des innatens Immunsystems im ZNS dar und üben eine Wächterfunktion aus [92]. Bei

Aktivierung durch Kontakt mit Pathogenen setzt Mikroglia chemotaktische Faktoren wie CXCL2 und CXCL8 frei, die die Invasion von Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten ins Hirngewebe und somit die Inflammation fördern [93, 94]. In den c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen korrelierte die verminderte Aktivierung der Mikroglia mit einer niedrigeren Anzahl von Granulozyten im Gehirngewebe als in den Wildtyp-Mäusen. Neutrophile Granulozyten sind wichtige Vermittler des neuronalen Schadens bei bakterieller Meningitis [95]. Mikroglia könnte insofern indirekt über die Rekrutierung von Granulozyten zum neuronalen Schaden beitragen.

Alternativ könnten direkte zytotoxische Effekte der aktivierten Mikroglia vorliegen und durch den c-Mpl-Genotyp moduliert werden. Im vorliegenden Projekt wurde der Effekt von rekombinantem TPO auf Mikroglia *in vitro* untersucht. Dabei führte weder die Behandlung mit rTPO allein zu einer, anhand der TNF-Aktivität gemessenen, Aktivierung von Mikroglia, noch zeigte sich eine Verstärkung der Aktivierung durch bakterielles Lipopeptid bei Koapplikation von rTPO. Diese Befunde sprechen gegen die Hypothese, dass der neuroprotektive Phänotyp der c-Mpl-defizienten Mäuse direkte Folge einer verminderten Aktivierung von Mikroglia via TPO ist. Vorstellbar sind indirekte Effekte, z.B. mit Bezug auf die Aktivierung von Endothelzellen [69].

Alternativ könnte die verminderte Mikrogliaaktivierung nicht Ursache, sondern Folge des reduzierten neuronalen Schadens bei c-Mpl-Defizienz sein. Zelluläre Schädigung führt zur Freisetzung von Hitzeschockproteinen, die die Reifung und Aktivität von Zellen des innatens Immunsystems regulieren [96-98]. Speziell für das Hitzeschockprotein 60 (HSP60) wurde in gemischten Zellkulturen ein bidirektionaler Mechanismus aufgezeigt, bei dem einerseits das von geschädigten Neuronen freigesetzte HSP60 über spezifische Bindung an TLR4 eine Mikrogliaaktivierung verursacht und andererseits Mikroglia nach Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) NO-vermittelte Neurodegeneration mit weiterer Freisetzung von HSP60 auslöst [99].

#### **5.1.4 Limitationen**

Zu bedenken ist, dass in den c-Mpl-defizienten Mäusen weitere Effekte des fehlenden TPO-Signals eine Rolle spielen können. So zeigten c-Mpl<sup>-/-</sup>-Mäuse eine erhebliche Reduktion der Trombozytenkonzentration im peripheren Blut auf etwa 6 % der Vergleichswerte in Wildtyp-Mäusen [77]. Trombozyten wirken an der Abwehr bakterieller Infektionen mit [100, 101]. Allerdings finden sich Thrombozyten nicht in

einer relevanten Zahl im Liquor, und die Bakterienkonzentrationen im Liquor waren bei den c-Mpl-defizienten Mäuse nicht höher als im Liquor von Wildtyp-Mäusen.

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse des Projektes dafür, dass TPO den neuronalen Schaden bei bakterieller Meningitis moduliert. Mikroglia und Makrophagen stellen mögliche Quellen für TPO im Nervensystem während einer akuten bakteriellen Meningitis dar.

## 5.2 Die Rolle der Lymphozyten in der experimentellen Meningitis

### 5.2.1 Effekte auf die Entzündungsreaktion im Liquorraum und im Hirngewebe

Nach bisherigen Vorstellungen handelt es sich bei der akuten bakteriellen Meningitis um ein Krankheitsbild, bei dem die wirtsseitige Entzündungsreaktion in der Frühphase im Wesentlichen durch das angeborene Immunsystem bewirkt wird, wohingegen dem adaptiven Immunsystem allenfalls eine untergeordnete Rolle zugeschrieben wird.

Die hier dargestellten Experimente weisen erstmals auf eine wichtige Funktion von Lymphozyten in der Regulation der frühen Leukozytenakkumulation im Subarachnoidalraum hin. Zwar zeigten sowohl Wildtyp- als auch RAG-1-defiziente Mäuse 24 h nach intrathekaler Meningitisauslösung mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> eine erhebliche Liquorpleozytose, wobei erwartungsgemäß in den RAG-1-defizienten Mäusen B- und T-Zellen fast vollständig fehlten. Darüber hinaus bestand jedoch in den RAG-1-defizienten Mäusen gegenüber dem Wildtyp eine erhebliche Zunahme der Absolutzahl der neutrophilen Granulozyten im Liquor. Dass es sich bei diesem Befund um eine spezifische Wirkung der fehlenden Lymphozyten handelt, wird dadurch unterstützt, dass der Effekt durch periphere Immunrekonstruktion der RAG-1-defizienten Tiere mit Wildtyplymphozyten partiell aufgehoben wurde.

Mögliche Mechanismen der Zunahme der Granulozytenkonzentration nach 24 h können einerseits eine verstärkte Rekrutierung und andererseits eine verzögerte Elimination beinhalten.

Mit Blick auf letzteren Aspekt ist bekannt, dass T-Zellen das Überleben neutrophiler Granulozyten beeinflussen können [102]. In einem Pneumonie-Modell wurde bei RAG-1-defizienten Mäusen eine Verzögerung der Apoptose und der Eliminierung aktivierter Granulozyten gezeigt [103]. Als möglicher Signalweg sind von aktivierten Lymphozyten ausgehende proapoptotische Signale zu diskutieren, zu denen auch das Zytokin TRAIL zählt [104]. Aus Untersuchungen der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass TRAIL eine wichtige Rolle bei der Elimination neutrophiler Granulozyten aus dem Liquor in der bakteriellen Meningitis spielt [95]. Die im Hirngewebe durchgeführten Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene zeigten im vorliegenden Projekt jedoch keinen Einfluss der RAG-1-Defizienz auf die TRAIL-Expression. In den erwähnten früheren Untersuchungen an TRAIL-defizienten Mäusen war eine partielle Normalisierung der Granulozytenapoptose in Knochenmarks-chimären fünf Wochen nach letaler

Bestrahlung und Transplantation beobachtet worden [95]. Zusammen mit den aktuellen Befunden kann dies dafür sprechen, dass im Meningitis-Modell myeloide Zellen und nicht Lymphozyten die wesentliche Quelle von TRAIL darstellen.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten RAG-1-defiziente Mäuse ein verändertes mRNA-Expressionsmuster weiterer Zytokine und Chemokine während der experimentellen Meningitis. Besonders interessant erscheint hierbei eine gewebespezifische Modulation der Expression von IL-10, einem wichtigen antiinflammatorischen Zytokin. Während RAG-1-defiziente Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte mRNA-Expression von IL-10 in mittels FACS aus dem Hirngewebe isolierten aktivierten Mikroglia und Makrophagen zeigten, war sie im Hirngewebshomogenat und in Liquorleukozyten der RAG-1-defizienten Mäuse vermindert.

IL-10 wird von T-Lymphozyten sezerniert, deren Fehlen in den RAG-1-defizienten Mäusen somit direkt zu der verminderten IL-10-Expression im Liquor und im Gewebshomogenat beitragen könnte. Während in der Peripherie regulatorische T-Zellen (Treg) eine bedeutsame Quelle von IL-10 und TGF-beta darstellen und hierdurch antiinflammatorische Effekte an neutrophilen Granulozyten und an Monozyten/Makrophagen vermitteln [73, 75], wird davon ausgegangen, dass Treg im zentralen Nervensystem keine relevante Quelle von IL-10 und TGF-beta sind. Stattdessen wird IL-10 von Mikroglia und Astrozyten gebildet, an welchen es dann autokrine oder parakrine Effekte vermitteln kann [105]. Auch in einem Modell einer chronischen Borrelieninfektion wurde bei RAG-1-defizienten Mäusen trotz fehlender T-Zellen eine vermehrte IL-10-Expression durch Mikroglia beschrieben, die mit einer relativen Neuroprotektion einherging [106].

Eine Schlüsselrolle von IL-10 als negativer Regulator der meningealen Infiltration durch Granulozyten wurde in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis bereits gezeigt [107]. Nicht aktivierte neutrophile Granulozyten haben eine kurze Lebensdauer. Durch Aktivierung wird ihre konstitutive Apoptose inhibiert. IL-10 wirkt diesem antiapoptotischen Signal entgegen und unterstützt so die Elimination aktivierter neutrophiler Granulozyten [108]. Zudem wird die Expression von IL-10 und TGF- $\beta$  in Makrophagen durch die Phagozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten stimuliert [109, 110]. IL-10 kann somit als Bestandteil einer positiven Feedback-Schleife zur Beendigung der Inflammation angesehen werden. In diesem Zusammenhang würde

die verminderte Expression von IL-10 zu einer Verzögerung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten im Liquor führen und umgekehrt.

Hinsichtlich der Rekrutierung von Granulozyten stellt IL-10 einen negativen Regulator der Expression von CXCL1 durch aktivierte Phagozyten dar [111, 112]. CXCL1 fördert die Rekrutierung von Granulozyten [113, 114]. Im Hirngewebe und in Leukozyten aus dem Liquor der RAG-1-defizienten Mäuse war CXCL1-mRNA nachweisbar, während in den Wildtyp-Mäusen die Nachweisgrenze nicht erreicht wurde. Ähnlich dem hier erhobenen Befund wurde in einem Entzündungsmodell an der Haut nach Applikation regulatorischer T-Zellen eine reduzierte Expression von CXCL1 und CXCL2 sowie eine Hemmung der Rekrutierung von Neutrophilen gezeigt [111].

Zusammenfassend fand sich in den RAG-1-Mäusen während der Meningitis eine verminderte Induktion antiinflammatorischer Signale einschließlich IL-10, was u.a. durch vermehrte Expression von CXCL1 zu einer länger anhaltenden Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Liquor führen kann. Zudem stellt die verminderte IL-10-Expression durch Makrophagen einen plausiblen Mechanismus dar, der zu einer Verzögerung der Apoptose neurophiler Granulozyten führen kann.

### **5.2.2 Effekt der RAG-1-Defizienz auf den neuronalen Schaden und die klinische Erkrankungsschwere**

Vierundzwanzig Stunden nach Induktion der Meningitis fand sich in den RAG-1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant geringere Dichte apoptotischer Neurone im Gyrus dentatus. Zugleich zeigte sich im *tight-rope*-Test in den RAG-1-Mäusen eine stärkere Beeinträchtigung hinsichtlich der allgemeinen Körperkraft und Koordinationsleistung.

Bei der scheinbaren Divergenz dieser Befunde ist hervorzuheben, dass beide Untersuchungen unterschiedliche Krankheitsaspekte der bakteriellen Meningitis beleuchten. Akuter und chronischer neuronaler Zellverlust, negative Effekte auf die Neurogenese sowie permanente Atrophie wurden in den hippokampalen Strukturen im Tierexperiment und bei Patienten nachgewiesen und korrelieren mit neuropsychologischen Defiziten, insbesondere mit Bezug zu Gedächtnis- und Lernprozessen [15-17, 86, 115-117]. Als wichtige Mediatoren dieser histologisch fassbaren Form der neuronalen Schädigung werden bakterielle Toxine wie Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [26] sowie entzündlich aktivierte Mikroglia [118] angesehen.

Stärker mit dem im *tight-rope*-Test erfassten klinischen Allgemeinzustand korrelieren dürften die akuten Komplikationen der Inflammation wie Hirnödembildung und gesteigerter intrakranieller Druck [119], an deren Entstehung eine entzündlich bedingte Endothelschädigung beteiligt ist [52]. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Granulozyten eine zentrale Rolle in der Entstehung dieser und weiterer vaskulärer Komplikationen spielen [55, 120-122]. Die in den RAG-1-Mäusen deutlich erhöhte Konzentration von neutrophilen Granulozyten im Subarachnoidalraum, der ein Kontinuum mit dem perivaskulären Raum bildet, stellt somit eine plausible Erklärung für die ausgeprägtere klinische Beeinträchtigung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen dar. Zusammen mit den quantitativen PCR-Ergebnissen in den Liquorleukozyten deutet dies auf eine immunprotektive Rolle reifer Lymphozyten im Subarachnoidalraum hin, die wie oben dargestellt eine Verstärkung des IL-10-Signalwegs und eine negative Regulierung von Rekrutierung und Überleben der neutrophilen Granulozyten in diesem Kompartiment zu beinhalten scheint.

### **5.2.3 Einfluss der Lymphozytenabwesenheit auf Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen**

Wie bereits dargestellt wird aktivierte Mikroglia als wichtiger Mediator des Gewebes Schadens angesehen [118]. Im Mausmodell führt die selektive Stimulation des TLR2-Rezeptors mit intrathekal appliziertem Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> sowohl zum Einstrom von Leukozyten in den Subarachnoidalraum als auch zur Aktivierung der Mikroglia und vermehrter neuronaler Apoptose im Gyrus dentatus [47]. In den RAG-1-defizienten Mäusen war nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> das Fehlen reifer B- und T-Zellen mit einer Zunahme der CD45 hoch exprimierenden aktivierten Mikroglia/Makrophagen im Hirngewebe im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verbunden, während allerdings die Dichte der TUNEL-positiven Zellen im Gyrus dentatus signifikant reduziert war.

Makrophagen zeigen ein Spektrum unterschiedlicher Aktivierungszustände, die in idealisierter Form als M1 und M2 voneinander abgegrenzt werden. Der M1-Zustand wird prototypisch durch IFN- $\gamma$  aktiviert und ist charakterisiert durch die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12, Chemokinen und Bildung von NO. M2 beschreibt antiinflammatorische Makrophagenzustände, die von zentraler Bedeutung in der Resolutionsphase der Entzündungsreaktion sind und z. B. als Folge einer sogenannten alternativen Aktivierung via IL-4 und IL-13 oder durch induzierte

Deaktivierung unter dem Einfluss antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  entstehen können [123]. Ähnliche Funktionszustände wurden auch für aktivierte Mikroglia beschrieben [124]. Um den Gegensatz einer vermehrten Aktivierung der Mikroglia bei relativer Neuroprotektion in den RAG-1-defizienten Mäusen zu erklären, wurden 24 h nach Meningitisinduktion Parenchymlysate auf Marker der alternativen Aktivierung bzw. der induzierten Deaktivierung untersucht. Für das Schlüsselzytokin IL-4 lag in beiden Genotypen die mRNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, so dass keine Aussage hinsichtlich einer potentiell unterschiedlich ausgeprägten alternativen Aktivierung möglich war. Hinsichtlich einer induzierten Deaktivierung zeigten aus dem Hirngewebe von RAG-1-defizienten Mäusen isolierte Mikroglia bzw. Makrophagen auf mRNA-Ebene eine Hochregulation von IL-10 und TGF- $\beta$  während der experimentellen Meningitis, die in den Wildtyp-Mäusen nicht beobachtet wurde. Zudem war bereits in der Kontrollbedingung bei den RAG-1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp die mRNA-Expression für IL-10, TGF- $\beta$  und Foxp3 im Hirnparenchym erhöht und für IFN- $\gamma$  leicht reduziert. Der RAG-1-defiziente Genotyp scheint also dazu zu führen, dass Mikroglia und Makrophagen in Richtung einer Deaktivierung prädisponiert sind. Interessanterweise zeigte sich außerdem in den Liquorleukozyten ein zu den parenchymatösen Immunzellen konträres Bild mit einer in den RAG1-defizienten Mäusen verminderten Expression von IL-10 mRNA und einer höheren Expression von CXCL1 mRNA.

Die Vermehrung aktiver Mikroglia war mit einer verstärkten Expression von CCL2 mRNA in den RAG-1-Mäusen verbunden. CCL2 fördert die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten aus der Blutbahn [125] und die Proliferation und Aktivierung von Mikroglia, ohne allerdings in letzterer die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine direkt zu bewirken [126]. Ebenso spricht auch der hier beobachtete neuroprotektive Effekt der RAG-1-Defizienz dafür, dass neben CCL2 weitere Signale erforderlich sind, um einen pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp der Mikroglia/Makrophagen zu erzeugen.

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dafür, dass Lymphozyten in der Frühphase der Meningitis die Inflammation in Subarachnoidalraum und Parenchym in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Im Subarachnoidalraum scheinen von ihnen überwiegend antiinflammatorische Signale auszugehen, bei deren Fehlen es zur vermehrten Akkumulation von neutrophilen Granulozyten kommt. Im Parenchym scheint

die Rolle der Lymphozyten in der akuten Neuroinflammation darin zu liegen, die Balance von einem vorherrschenden antiinflammatorischen Mikroglia-Phänotyp zu einem proinflammatorischen und neurotoxischen Phänotyp zu verschieben, wobei die Herabregulation von IL-10 eine zentrale Rolle zu spielen scheint.

#### **5.2.4 Limitationen**

Die hier diskutierten Ergebnisse wurden in einem Modell einer sterilen, nicht-replikativen Meningitis erhoben. Daher fanden Aspekte wie bakterielles Wachstum und Elimination sowohl intrakraniell wie auch im übrigen Organismus keine Berücksichtigung. In einer jüngeren, ähnlich angelegten Studie mit intrazerebraler Injektion lebender Pneumokokken [127] zeigten RAG-1-defiziente Mäuse eine erhöhte Mortalität und eine verminderte Fähigkeit, die systemische Ausbreitung der Infektion einzudämmen. Ähnlich den oben diskutierten Befunden fanden die Autoren eine verminderte Proliferation und proinflammatorische Aktivierung der Mikroglia mit reduzierter Expression von IL-1 $\beta$ , die die oben getroffenen Schlussfolgerungen unterstützt.

Unklar zum aktuellen Zeitpunkt bleibt, welche spezifischen Lymphozytenpopulationen und Zellinteraktionen an der kompartimentspezifischen Modulation der intrakraniellen Entzündungsreaktion mitwirken. Weiterer Aufschluss könnte hier durch weitere Experimente mit adoptivem Transfer spezifischer Lymphozytenuntergruppen gewonnen werden.

### **5.3 Rolle von Granulozyten und Monozyten bei der Induktion und Regulation der Entzündung in der Akutphase der bakteriellen Meningitis**

Ausgangspunkt des Projektes war die Frage, welche Funktionen Granulozyten und Monozyten für die Auslösung der Inflammation in der Frühphase der bakteriellen Meningitis haben. Dass Granulozyten eine wichtige Rolle für die Rekrutierung weiterer Leukozyten in den Subarachnoidalraum während der bakteriellen Meningitis spielen, war aus früheren Untersuchungen bekannt [55, 95, 125]. In den hier vorgestellten Pilotexperimenten sollten eine Methodik für die Isolation von Granulozyten bzw. Monozyten mit hohem Reinheitsgrad, sowie optimierte Verfahren für ihre Kultivierung und Stimulation etabliert werden. Durch den adoptiven Transfer von TLR2-exprimierenden Spenderleukozyten in TLR2-defiziente Empfängertiere und die Nutzung eines TLR2-selektiven proinflammatorischen Stimulus sollte die direkte Inflammationsauslösung auf die zu untersuchende Spenderzellpopulation begrenzt werden. Zudem sollten aus den Pilotexperimenten erste Hinweise auf mögliche Effekte der Zellpopulationen *in vivo* gewonnen werden.

#### **5.3.1 Kultur und Aktivierung unfraktionierter Splenozyten**

Zur Gewinnung der Leukozyten wurden Splenozyten als Ausgangsmaterial benutzt, die durch mechanische Desintegration von Milzen gewonnen wurden. Bei Verwendung von VLE-RPMI 1640 als Kulturmedium überlebten die Zellen bis zu 23 h und waren durch TLR2-Stimulation aktivierbar. RPMI-1640 ist ein serumfreies, kommerziell erhältliches Fertigmedium, das allgemein zur Kultivierung normaler und neoplastischer Leukozyten verwendet wird. Bei Verwendung von PBS anstelle des Zellkulturmediums war die Überlebensdauer deutlich verkürzt. Durch Zusatz von Serum zu dem RPMI-1640 Medium konnte zwar das Überleben der Zellen verlängert werden. Wurden jedoch in dieser Weise kultivierte Zellen in den Subarachnoidalraum transferiert, kam es bereits ohne vorherige Aktivierung mit dem TLR2-Agonisten zu einer Immunantwort, möglicherweise als Reaktion auf im Serum enthaltene Mediatoren. Für die Zwecke des Projektes stellte somit die Verwendung des serumfreien Mediums einen sinnvollen Kompromiss dar.

Für die Stimulation der Splenozyten wurde als optimale Konzentration 10 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> festgestellt. Höhere Konzentrationen wirkten sich negativ auf das Überleben der Zellen aus. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich hierbei um einen rezeptorvermittelten Effekt. Da Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> in pyrogenfreiem PBS verdünnt wurde, ist ein toxischer Einfluss von Lösungsvermittlern wie DMSO ausgeschlossen.

Zur Wirkung einer Stimulation von TLR-Rezeptoren auf das Überleben von Leukozyten liegen unterschiedliche Vorergebnisse vor. In einer Monozytenzelllinie sowie in TLR2-transfizierten HEK293-Zellen wurden nach Stimulation mit einem TLR2-Agonisten proapoptotische Effekte beobachtet. Eine zentrale Rolle kommt dabei dem intrazellulären Adapterprotein MyD88 zu, das einerseits über weitere intrazelluläre Signalvorgänge proinflammatorische und potentiell antiapoptotische Effekte durch Aktivierung von NFκB vermittelt, andererseits über eine enthaltene Todesdomäne einen proapoptotischen Signalweg unter Beteiligung von FADD („Fas-associated death domain protein“) und Caspase-8 aktiviert [128]. Biologische Vorteile der gleichzeitigen Aktivierung proinflammatorischer und proapoptotischer Signale könnten in einer zeitlichen Begrenzung der Entzündungsreaktion und einer erleichterten Aktivierung adaptiver Immunprozesse liegen [128].

Neutrophile Granulozyten werden über TLR aktiviert. Während sowohl TLR2 als auch TLR4 in der Lage sind, die Expression von CD11b zu erhöhen und den respiratorischen Burst zu verstärken, scheint eine aktivierungsabhängige Unterdrückung der konstitutiven Apoptose wesentlich stärker von TLR4 als von TLR2 vermittelt zu werden [129]. Ein proapoptotischer Effekt von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> an aufgereinigten Neutrophilen war hingegen nicht beschrieben [129].

Da als Vitalitätsassay eine FACS-Analyse der gesamten Splenozyten hinsichtlich der Aufnahme von Propidiumiodid eingesetzt wurde, ist keine Aussage dazu möglich, auf welche Leukozytenspezies sich die Vulnerabilität gegenüber höheren Konzentrationen von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> bezieht. In der unfraktionierten Splenozytenpräparation könnten außerdem indirekte proapoptotische Effekte an den neutrophilen Granulozyten auftreten, die von TLR2-stimulierten Monozyten ausgehen können [130].

Für das Projekt entscheidend waren ein zuverlässig hoher Anteil vitaler neutrophiler Granulozyten bzw. Monozyten am Ende der Präparation sowie eine ausreichend lange

Lebensdauer der stimulierten Zellen, um nach Durchführung des adoptiven Zelltransfers physiologische Effekte vermitteln zu können. Anhand des Umsatzes von MTT zeigte sich mindestens bis zu 4 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> eine im Wesentlichen unverminderte metabolische Aktivität der Splenozyten, was für die Zwecke dieser Arbeit als ausreichend angesehen wurde.

### 5.3.2 Gewinnung und Aktivierung von Granulozyten und Monozyten

Zur Aufreinigung von Granulozyten bzw. Monozyten wurde die magnetische Zellsortierung (MACS) verwendet. Für die Aufreinigung der Granulozyten wurden die für diesen Zweck vom Hersteller optimierten Ly6G-Microbeads eingesetzt. Die nachfolgenden FACS-Analysen wiesen dem Marker Gr-1 bei bis zu 96 % Reinheit nach, erreichten jedoch keine absolute Reinheit. Die Differenz könnte zum Teil in der unterschiedlichen Spezifität der Antikörper bzw. ihrer Zielantigene begründet sein. Während der Oberflächenmarker Ly6G (Ly6 complex locus G) ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten mit fortschreitender Differenzierung und Reifung exprimiert wird, reagiert der zum Nachweis genutzte Antikörper Gr-1 auch mit dem Ly6C-Antigen [131], welches neben Neutrophilen auch auf den in der Milz ebenfalls vorhandenen Monozyten, Dendritischen Zellen, NK-Zellen und T-Lymphozyten exprimiert wird [132]. Vorrangig ist jedoch von technischen Einflüssen auszugehen, da trotz höchster Sorgfalt eine nicht unerhebliche Variabilität der Präparationsergebnisse beobachtet wurde. Typische Fehlerquellen des Verfahrens - Frische der Lösungen (MACS- und FACS-Puffer), Zustand der Affinitätssäule und Umgebungstemperatur - wurden bei der Versuchsdurchführung vermieden.

Für die immunologischen Fragestellungen war die erhaltene Aktivierbarkeit der Leukozyten durch den TLR2-Liganden nach der Aufreinigungsprozedur von größter Relevanz. Bei neutrophilen Granulozyten stellt die positive Regulation des Oberflächenantigens CD11b einen geeigneten immunologischen Aktivierungsmarker dar [129]. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensität für CD11b innerhalb der Cd11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>-Zellen zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung nach Inkubation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Diese lag in einer vergleichbaren Größenordnung wie nach Stimulation mit dem als Positivkontrolle genutzten Phorbol ester PMA, einem direkten Aktivator der Proteinkinase C [133]. Die dosisabhängige Aktivierung sprach zudem dafür, dass nicht bereits die Aufreinigungsprozedur selbst zu einer erheblichen Aktivierung der

Granulozyten führt, was eine wichtige Voraussetzung für die folgenden *in vivo*-Versuche darstellt. Zusätzlich zur CD11b-Expression wurde als weiterer Aktivierungsmarker die Aktivität der Phagozytenoxidase (NADPH-Oxidase) untersucht [134]. Die Ergebnisse deuteten auf eine biologische Aktivierung der aufgereinigten Granulozyten durch den TLR2-Agonisten. Sie sind außerdem insofern von Interesse, weil die Expression von TLR2 in Neutrophilen durch Aktivierung der NAPH-Oxidase verstärkt wird [135]. In der für CD11b positiv selektierten monozytenreichen Fraktion wurde ebenfalls die Hochregulation von CD11b als durchflusszytometrisch fassbarer Aktivierungsparameter genutzt. Auch für die Monozytenfraktion zeigte sich hier eine Stimulierbarkeit durch Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, wobei die Dosis-Wirkungs-Kurve hier erst bei der Verwendung von 20 µg/ml eine wesentliche Aktivierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ergab. Auch hier sprach jedoch die Antwort auf den Stimulus dafür, dass Präparation und Aufreinigung für sich genommen keine starke Aktivierung der Monozyten zur Folge hatte.

### **5.3.3 Pilot-Experimente zu *in vivo*-Untersuchungen**

Das verwendete Meningitismodell basiert auf einem etablierten Protokoll, bei dem zur Meningitisinduktion eine Infektion des Subarachnoidalraums mit lebenden Bakterien nicht durch intrazisternale oder intrazerebrale Inokulation [136-139], sondern durch lumbale Instillation einer Bakteriensuspension ausgelöst wird [140, 141]. In der Folge wurde gezeigt, dass auch lumbale Injektionen einer sterilen Präparation aus bakteriellen Zellwänden [46] oder eines vollständig synthetisch hergestellten bakteriellen Lipopeptids [47] die typischen wirtsseitigen Krankheitsaspekte der bakteriellen Meningitis induzieren. In allen diesen Versuchsvarianten fanden sich auch intrakraniell Zeichen der meningealen Inflammation, gesteigerter Hirndruck und vermehrte Neurodegeneration als Hinweis darauf, dass das lumbal eingebrachte Agens den intrakraniellen Subarachnoidalraum erreicht. Auch mikroskopisch lassen sich lumbal eingebrachte Bakterienzellwände intrazerebral nachweisen [142].

Es ergibt sich somit die Fragestellung, zu welchem Anteil eine nach lumbaler Injektion aktivierter Leukozytenfraktionen im zisternalen Liquor nachgewiesene Pleozytose der transferierten Population zuzuordnen ist und welchen Anteil ein entzündlich bedingter Einstrom aus der Zirkulation nach Öffnung der Blut-Hirn-Schranke darstellt. Aus diesem Grund wurden in einem Teil der aktuellen Experimente EGFP-transgene

Spenderleukozyten eingesetzt, die fluoreszenz-mikroskopisch von wirtseigenen Leukozyten unterschieden werden konnten. Konsistent fanden sich nach lumbaler Injektion EGFP-positive Leukozyten auch im zisternalem Liquor, was im Sinne des oben Dargestellten als Beleg dafür anzusehen ist, dass die Leukozyten sich nach intrathekalen Injektion auch entgegen der normalen Liquorflussrichtung im Liquorraum verbreiten.

Wurden in den Pilotexperimenten unstimulierte Spenderleukozyten verwendet, fand sich, neben dem Nachweis der EGFP-exprimierenden Spenderzellen allenfalls, ein minimaler Einstrom wirtseigener Leukozyten in einer ähnlichen Größenordnung, wie sie auch bei intrathekalen Injektion von sterilem PBS vermutlich als unspezifische Reizpleozytose beobachtet wird. Dieser Befund ist insofern bedeutsam, als die allogenen Zellen intrathekal im hier untersuchten Zeitfenster von 24 h trotz anzunehmender MHC-Inkompatibilität offensichtlich keine erhebliche Aktivierung des adaptiven Immunsystems im Sinne einer „Abstoßungsreaktion“ zur Folge hatten.

In den Pilotexperimenten wurden Wildtypleukozyten lumbal injiziert, die im Gegensatz zu den wirtseigenen Zellen der TLR2-defizienten Tiere als einzige Leukozyten durch Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimulierbar waren. Bei Verwendung unfraktionierter aktivierter Splenozyten kam es zu einem deutlichen Einstrom wirtseigener (EGFP-negativer) Leukozyten. Hingegen waren aktivierte Granulozyten offensichtlich nicht in der Lage, eine starke Inflammationskaskade in Gang zu setzen. Dieser Befund steht in gewissem Kontrast zu der Beobachtung, dass nach systemischer Depletion der Granulozyten im Mausmodell [95] und auch bei Patienten mit einer Agranulozytose entzündliche Liquorbefunde bei bakterieller Meningitis deutlich abgeschwächt sind [143]. Offensichtlich spielen Granulozyten bei der Auslösung der Entzündungsreaktion eine nicht-redundante Rolle, auch wenn sie nach den hier erhobenen Ergebnissen selbst keine hinreichende Fähigkeit zu haben scheinen, eine Inflammationsantwort zu induzieren. Denkbar ist, dass sie einen Teil der Verstärkungsschleife bilden, indem sie durch Freisetzung chemotaktischer Proteine wie CXCL2 und CXCL1 [144, 145] an der Rekrutierung weiterer myeloider Zellen mitwirken. Andererseits wurde in einem Sepsismodell berichtet, dass TLR2-Signale die Einwanderung von Neutrophilen behindern [146]. Zu dieser Frage kann wegen des fehlenden TLR2-Rezeptors im vorliegenden Modell keine Aussage gemacht werden. Allerdings fand sich ein Trend zu höheren Leukozytenkonzentrationen im Liquor bei Verwendung der wiedervereinigten

Fraktionen im Vergleich zu den Ly6G-depletierten Splenozyten. Dies würde eher für einen co-stimulatorischen als einen inhibitorischen Effekt von TLR2 auf den Granulozyten in der Meningitis sprechen.

Ein Leukozyteneinstrom wurde zuverlässig von aktivierten Immunzellen in der Ly6G-negativen Fraktion ausgelöst. Eine zentrale Rolle von Lymphozyten ist aufgrund der oben dargestellten Untersuchungen in RAG-1-defizienten Mäusen wenig wahrscheinlich. Hingegen kann aufgrund ihrer Häufigkeit vermutet werden, dass Cd11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup>-Monozyten die hierfür verantwortliche Effektorpopulation bilden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass auch die Injektion von positiv selektierten Monozyten eine geringe Inflammation auslöste. Hierbei handelte es sich allerdings nur um ein Einzelexperiment.

Nach Stimulation mit TLR2-Liganden bilden Monozyten CXCL1 und CXCL2, und aktivierte Monozyten IL-1 $\beta$  als wichtige Signale für die Rekrutierung von Granulozyten [147, 148]. In der experimentellen Pneumokokkenmeningitis führt die systemische Behandlung mit einem anti-CCR2 Antikörper zu einer stark verminderten Rekrutierung von Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> "inflammatorischen" Monozyten, aber nicht von Ly6G-positiven Granulozyten [125]. Dagegen bewirkte die Depletion meningealer und perivaskulärer residenter Makrophagen mittels intraventrikulärer Applikation von Clodronat eine erhebliche Verminderung der meningealen Inflammation in einem Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis [149]. Zusammen mit diesen früheren Befunden unterstützen die vorliegenden Ergebnisse das Konzept, dass residente monozytäre Zellen im Subarachnoidal- und Perivaskulärraum eine Wächterfunktion ausüben und nach Kontakt mit bakteriellen Liganden eine meningeale Inflamationsantwort auslösen. Weiteren Aufschluss zu diesen Fragen könnten einerseits zusätzliche Experimente mit intrathekalem Transfer von aktivierten monozytären Subfraktionen liefern. Andererseits wären Versuche von Interesse, in denen nach peripherer Rekonstitution der TLR2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Wildtypleukozyten (insbesondere Monozyten) eine intrathekale Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> durchgeführt wird. Aus verschiedenen Gründen war es leider nicht mehr möglich, über die hier diskutierten Pilotexperimente hinausgehende Versuche durchzuführen.

Obwohl es sich um ein hochgradig künstliches Modell handelt, bietet die Auslösung einer TLR2-abhängigen Inflammation in TLR2-defizienten Mäusen die Möglichkeit, den

Entzündungsreiz auf eine genau definierte Zellpopulation und ein definiertes Kompartiment zu beschränken. Dies stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber chemischer oder antikörpervermittelter Depletion von Immunzellen *in vivo* dar, bei der Effekte in weiteren Kompartimenten, unvollständige Deletion der Zielpopulation und Effekte auf zusätzliche Zelltypen bedacht werden müssen [129].

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] **Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS JR, Swartz MN.** Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* **1993**;328(1):21-8.
- [2] **Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA.** Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* **1997**;337(14):970-976.
- [3] **Aronin SI, Peduzzi, P. und Quagliarello, V. J.** Community-acquired bacterial meningitis: risk stratification for adverse clinical outcome and effect of antibiotic timing. *Ann Intern Med* **1998**;129(11):862-9.
- [4] **Faustini A, Fano V, Sangalli M, Ferro S, Celesti L, Contegiacomo P, Renzini V, Perucci CA.** Estimating incidence of bacterial meningitis with capture-recapture method, Lazio Region, Italy. *Eur J Epidemiol* **2000**;16(9):843-8.
- [5] **Ross KL, Tyler KL, Jödicke A.** Meningitis, Enzephalitis, Hirnabszess und andere eitrige Infektionen. In: Dietel M, Suttrop N, Zeit M, Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J (Hrsg.). *Harrisons Innere Medizin* (18. Auflage). Berlin: ABW Wissenschaftsverlag, **2012**, Seiten: 3690-3715.
- [6] **Backhaus E, Berg S, Andersson R, Ockborn G, Malmström P, Dahl M, Nasic S, Trollfors B.** Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors. *BMC Infect Dis* **2016**;16:367.
- [7] **Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR.** Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* **2010**;14(3):e197-209.
- [8] **GBE-BUND.DE.** Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000; Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen; [letzter Zugriff: 17.05.2017]. Verfügbar unter: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=3&p\\_aid=39296777&nummer=550&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=34856152](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=39296777&nummer=550&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=34856152) und [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=i&p\\_aid=39296777&nummer=550&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=85055072](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=39296777&nummer=550&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=85055072).

- [9] **Pfister HW, Feiden W, Einhüpl KM.** Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* **1993**;50(6):575-81.
- [10] **Schut ES, Brouwer MC, de Gans J, Florquin S, Troost D, van de Beek D.** Delayed cerebral thrombosis after initial good recovery from pneumococcal meningitis. *Neurology* **2009**;73(23):1988-95.
- [11] **Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL.** The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* **2002**;419(6905): 367-74.
- [12] **Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N. Pneumococcal meningitis.** Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* **1984**;41(10):1045-9.
- [13] **Dodge PR.** Sequelae of bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis* **1986**; 5(6):618-20.
- [14] **Pomeroy SL, Holmes SJ, Dodge PR, Feigin RD.** Seizures and other neurologic sequelae of bacterial meningitis in children. *N Engl J Med* **1990**;323(24):1651-7.
- [15] **Nau R, Soto A, Brück W.** Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **1999**;58:265-274.
- [16] **Free SL, Li LM, Fish DR, Shorvon SD, Stevens JM.** Bilateral hippocampal volume loss in patients with a history of encephalitis or meningitis. *Epilepsia* **1996**;37(4):400-5.
- [17] **Bohr V, Hansen B, Kjersem H, Rasmussen N, Johnsen N, Kristensen HS, Jessen O.** 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(2):102-10.
- [18] **Meli DN, Leib SL, Christen S, Täuber MG.** Pathogenese der bakteriellen Meningitis: Wie können neurologische Spätfolgen verhindert werden? *Schweiz Med Forum* **2002**; Seiten: 1016-1020.
- [19] **Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW.** The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology* **2008**:288-301.
- [20] **Mitchell TJ.** Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Res Microbiol* **2000**;151(6):413-19.
- [21] **Jedrzejak MJ.** Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**;65(2):187-207.
- [22] **Paton JC, Lock RA, Hansman DJ.** Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **1983**;40 (2):548-52.
- [23] **Cochrane CG.** Cellular injury by oxidants. *Am J Med* **1991**;91(3C):23S-30S.

- [24] **Chandra J, Samali A, Orrenius S.** Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **2000**;29(3-4):323-33.
- [25] **Braun JS, Novak R, Murray PJ, Eischen CM, Susin SA, Kroemer G, Halle A, Weber JR, Tuomanen EI, Cleveland JL.** Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis* **2001**;184(10):1300-309.
- [26] **Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR.** Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* **2002**;109(1):19-27.
- [27] **Avery OT, Cullen GE.** STUDIES ON THE ENZYMES OF PNEUMOCOCCUS : IV. BACTERIOLYTIC ENZYME. *J Exp Med* **1923**;38(2):199-206.
- [28] **Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, Ohnstad HS, Håvarstein LS.** Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* **2009**;155(Pt7):2223-34.
- [29] **Cockeran R, Anderson R, Feldman C.** The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis* **2002**;15(3):235-39
- [30] **Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Guerin CJ, Nicotera P, Andrew PW, O'Callaghan C.** *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J Infect Dis* **2008**;197(5):744-51.
- [31] **Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala'Aldeen DA, Tuomanen EI.** Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest* **2009**;119(6):1638-46.
- [32] **Iovino F, Molema G, Bijlsma JJ.** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, a putative receptor for the adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to the vascular endothelium of the blood-brain barrier. *Infect Immun* **2014**;82(9):3555-66.
- [33] **Uchiyama S, Carlin AF, Khosravi A, Weiman S, Banerjee A, Quach D, Hightower G, Mitchell TJ, Doran KS, Nizet V.** The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med* **2009**;206(9):1845-52.
- [34] **Radin JN, Orihuela CJ, Murti G, Guglielmo C, Murray PJ, Tuomanen EI.** beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **2005**;73(12):7827-35.
- [35] **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** Pathogen recognition and innate immunity *Cell* **2006**;124(4):783-801.
- [36] **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.** Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **1999**;274(25):17406-9.

- [37] **Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S.** Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* **2000**;164(2):554-7
- [38] **Nishiguchi M, Matsumoto M, Takao T, Hoshino M, Shimonishi Y, Tsuji S, Begum NA, Takeuchi O, Akira S, Toyoshima K, Seya T.** Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J Immunol* **2001**;166(4):2610-6.
- [39] **Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **2001**;13(7):933-40.
- [40] **Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B.** Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* **1998**;24(3):340-55.
- [41] **Quagliarello V, Scheld WM.** Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* **1992**;327:864-72.
- [42] **Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, Weih M, Angstwurm K, Döcke WD, Meisel A, Schumann RR, Schönfelder G, Dirnagl U, Weber JR.** Cerebral endothelial cells release TNF-alpha 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(8):4308-14.
- [43] **Turowski P, Adamson P, Greenwood J.** Pharmacological targeting of ICAM-1 signaling in brain endothelial cells: potential for treating neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* **2005**;25(1):153-70.
- [44] **Zysk G, Brück W, Huitinga I, Fischer FR, Flachsbarth F, van Rooijen N, Nau R.** Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol* **1997**;73(1-2):77-80.
- [45] **Imler JL, Hoffmann JA.** Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* **2001**;11(7):304-11.
- [46] **Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A.** The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* **1985**;151(5):859-68.
- [47] **Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR.** TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* **2007**;178(10):6476-81.

- [48] **Bessler WG, Johnson RB, Wiesmüller K, Jung G.** B-lymphocyte mitogenicity in vitro of a synthetic lipopeptide fragment derived from bacterial lipoprotein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1982**;363(7):767-70.
- [49] **Genaxxon bioscience GmbH;** (letzter Zugriff: 17.05.2017]. Verfügbar unter: <http://www.genaxxon.com>.
- [50] **Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN.** Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **1993**;61(10):4392-97.
- [51] **Hoffmann O, Zweigner J, Smith SH, Freyer D, Mahrhofer C, Dagand E, Tuomanen EI, Weber JR.** Interplay of pneumococcal hydrogen peroxide and host-derived nitric oxide. *Infect Immun* **2006**;74(9):5058-66.
- [52] **van der Flier M, Geelen SP, Kimpen JL, Hoepelman IM, Tuomanen EI.** Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome? *Clin Microbiol Rev* **2003**;16(3):415-29.
- [53] **Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM.** The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* **2006**;147:S232-40.
- [54] **Angstwurm K.** Bakterielle Meningitis im Erwachsenenalter. Ansätze adjuvanter Therapiestrategien [Habilitation]: Universität Berlin; **2005**.
- [55] **Weber JR, Angstwurm K, Burger W, Einhäupl KM, Dirnagl U.** Anti ICAM-1 (CD 54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* **1995**;63(1):63-8.
- [56] **Wolber EM, Dame C, Fahnenstich H, Hofmann D, Bartmann P, Jelkmann W, Fandrey J.** Expression of the thrombopoietin gene in human fetal and neonatal tissues. *J Blood* **1999**;94(1):97-105.
- [57] **Dame C, Juul SE, Christensen RD.** The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* **2001**;79:228-35.
- [58] **Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L.** Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* **2007**;27(3):552-63.
- [59] **Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno Y, Urabe T.** Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem* **2006**;96(4):1101-10.
- [60] **Kaushansky K.** Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* **2006**;354(19):2034-45.
- [61] **Kaushansky K.** Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Blood* **1998**;92:1-3.

- [62] **Li B, Pan H, Winkelmann JC, Dai W.** Thrombopoietin and its alternatively spliced form are expressed in human amygdala and hippocampus. *Blood* **1996**;87(12):5382-4.
- [63] **Dame C, Wolber EM, Freitag P, Hofmann D, Bartmann P, Fandrey J.** Thrombopoietin gene expression in the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* **2003**;143(2):217-23.
- [64] **Ehrenreich H, Hasselblatt M, Knerlich F, von Ahsen N, Jacob S, Sperling S, Woldt H, Vehmeyer K, Nave KA, Sirén AL.** A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102(3):862-7.
- [65] **Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H.** Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* **2001**;98(9):2720-5.
- [66] **Wolber EM, Fandrey J, Frackowski U, Jelkmann W.** Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. *Thromb Haemost* **2001**;86(6):1421-4.
- [67] **Burmester H, Wolber EM, Freitag P, Fandrey J, Jelkmann W.** Thrombopoietin production in wild-type and interleukin-6 knockout mice with acute inflammation. *J Interferon Cytokine Res* **2005**;25(7):407-13.
- [68] **Romanelli RG, Petrai I, Robino G, Efsen E, Novo E, Bonacchi A, Pagliai G, Grossi A, Parola M, Navari N, Delogu W, Vizzutti F, Rombouts K, Gentilini P, Laffi G, Marra F.** Thrombopoietin stimulates migration and activates multiple signaling pathways in hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2006**;290(1):G120-8.
- [69] **Cardier JE.** Effects of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) on liver endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* **1999**;58(2):108-13.
- [70] **Zysk G, Bruck W, Gerber J, Bruck Y, Prange HW, Nau R.** Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* **1996**;55(6):722-8.
- [71] **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Cellular and Molecular Immunology. 6. Auflage. Saunders Elsevier, Philadelphia **2007**; Seiten: 303-320.
- [72] **Koedel U.** Toll-like receptors in bacterial meningitis. *Curr Top Microbiol Immunol* **2009**;336:15-40.
- [73] **Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad U S A* **2007**;104(49):19446-51.

- [74] **Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R.** Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* **2009**;15(2):192-9.
- [75] **Lewkowicz N, Klink M, Mycko MP, Lewkowicz P.** Neutrophil-CD4+CD25+ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology* **2013**;218(4):455-64.
- [76] **Zhang J, Freyer D, Rung O, Im AR, Hoffmann O, Dame C.** Inflammation Stimulates Thrombopoietin (Tpo) Expression in Rat Brain-Derived Microvascular Endothelial Cells, but Suppresses Tpo in Astrocytes and Microglia. *J Interferon Cytokine Res* **2010**;30(7):465-9.
- [77] **Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D.** Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* **1996**;87(6):2162-70.
- [78] **Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE.** RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **1992**;68(5):869-77.
- [79] **Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. **1999**;11(4):443-51.
- [80] **Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y.** Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **1997**;407(3):313-9.
- [81] **Miquel J, Blasco M.** A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* **1978**;13(6):389-96.
- [82] **Hoffmann O, Rung O, Held J, Boettcher C, Prokop S, Stenzel W, Priller J.** Lymphocytes modulate innate immune responses and neuronal damage in experimental meningitis. *Infect Immun* **2015**;83(1):259-67.
- [83] **Göttlinger C, Radbruch A.** „Methoden der Zelltrennung“ Mta 8,5; **1993**, Seiten: 530-536.
- [84] **Hoffmann O, Rung O, Im AR, Freyer D, Zhang J, Held J, Stenzel W, Dame C.** Thrombopoietin contributes to neuronal damage in experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* **2011**;79(2):928-36.
- [85] **Nau R, Brück W.** Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* **2002**;25:38.45.
- [86] **Hoffmann O, Mahrhofer C, Rueter N, Freyer D, Bert B, Fink H, Weber JR.** Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. *Infect Immun* **2007**;75(9):4289-97.

- [87] **Ivanova A, Wuerfel J, Zhang J, Hoffmann O, Ballmaier M, Dame C.** Expression pattern of the thrombopoietin receptor (Mpl) in the murine central nervous system. *BMC Dev Biol* **2010**;10:77.
- [88] **Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM, Holland IB.** Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun.* **1986** Apr;52(1):63-9.
- [89] **Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R.** The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun* **2005**;73(10):6479-87.
- [90] **Cardier JE, Dempsey J.** Thrombopoietin and its receptor, c-Mpl are constitutively expressed by mouse liver endothelial cells: evidence of thrombopoietin as a growth factor for liver endothelial cells. *Blood* **1998**;91(3):923-9.
- [91] **Ishybash T, Nakazato K, Maruyama Y.** Expression of thrombopoietin receptor in human endothelial cells and smooth muscle cells of aortic and coronary arteries. *Blood* **1997**;90(1):76b.
- [92] **Kreutzberg GW.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **1996**;19(8):312-8.
- [93] **Ostergaard C, Yieng-Kow RV, Larsen CG, Mukaida N, Matsushima K, Benfield T, Frimodt-Møller N, Espersen F, Kharazmi A, Lundgren JD.** Treatment with a monoclonal antibody to IL-8 attenuates the pleocytosis in experimental pneumococcal meningitis in rabbits when given intravenously, but not intracisternally. *Clin Exp Immunol* **2000**;122(2):207-11.
- [94] **Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJ, Roord JJ, van Furth AM.** Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *J Infect Dis* **2001**;183(7):1143-6.
- [95] **Hoffmann O, Priller J, Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Baeva N, Lunemann JD, Aktas O, Mahrhofer C, Stricker S, Zipp F, Weber JR.** TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis. *J Clin Invest* **2007**;117(7):2004-13.
- [96] **Chen HC, Guh JY, Tsai JH, Lai YH.** Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury. *Kidney Int* **1999**;56(4):1270-3.
- [97] **Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK.** Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* **2000**;12(11):1539-46.
- [98] **Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, Srivastava P, Bhardwaj N.** Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* **2001**;167(9):4844-52.

- [99] **Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, Nitsch R, Weber JR.** A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* **2008**;28(10):2320-31.
- [100] **Beachey EH, Stollerman GH.** Toxic effects of streptococcal M protein on platelets and polymorphonuclear leukocytes in human blood. *J Exp Med* **1971**;134(2):351-65.
- [101] **Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME.** Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* **2002**;70(12):6524-33.
- [102] **Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchórzewski H.** Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* **2006**;177(10):7155-63.
- [103] **D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, Pipeling MR, Brower RG, Tuder RM, McDyer JF, King LS.** CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* **2009**;119(10):2898-913.
- [104] **Mariani SM, Krammer PH.** Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* **1998** May;28(5):1492-8.
- [105] **Ledeboer A, Brevé JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJ, Van Dam AM.** Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Immunol* **2002**;16(7):1175-85.
- [106] **Gelderblom H, Schmidt J, Londoño D, Bai Y, Quandt J, Hornung R, Marques A, Martin R, Cadavid D.** Role of interleukin 10 during persistent infection with the relapsing fever Spirochete *Borrelia turicatae*. *Am J Pathol* **2007**;170(1):251-62.
- [107] **Zwijenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, Roord JJ, van Furth AM.** Interleukin-10 negatively regulates local cytokine and chemokine production but does not influence antibacterial host defense during murine pneumococcal meningitis. *Infect Immun* **2003**;71(4):2276-9.
- [108] **Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W.** Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* **1997**;90(9):3356-63.
- [109] **Byrne A, Reen DJ.** Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* **2002**;168(4):1968-77.
- [110] **Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C.** A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* **2002**;2(12):965-75.

- [111] **Richards H, Williams A, Jones E, Hindley J, Godkin A, Simon AK, Gallimore A.** Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* **2010**;131(4):583-92.
- [112] **Olszyna DP, Pajkrt D, van Deventer SJ, van der Poll T.** Effect of interleukin 10 on the release of the CXC chemokines growth related oncogene GRO-alpha and epithelial cell-derived neutrophil activating peptide (ENA)-78 during human endotoxemia. *Immunol Lett* **2001**;78(1):41-4.
- [113] **Moser B, Clark-Lewis I, Zwahlen R, Baggiolini M.** Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J Exp Med* **1990**;171(5):1797-802.
- [114] **Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B.** High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**;89(21):10542-6.
- [115] **Wellmer A<sup>1</sup>, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R.** Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci Lett* **2000**;296(2-3):137-40.
- [116] **Hofer S<sup>1</sup>, Grandgirard D, Burri D, Fröhlich TK, Leib SL.** Bacterial meningitis impairs hippocampal neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* **2011**;70(10):890-9.
- [117] **Focke NK<sup>1</sup>, Kallenberg K, Mohr A, Djukic M, Nau R, Schmidt H.** Distributed, limbic gray matter atrophy in patients after bacterial meningitis. *AJNR Am J Neuroradiol* **2013**;34(6):1164-7.
- [118] **Gerber J<sup>1</sup>, Nau R.** Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* **2010**;23(3):312-8.
- [119] **Koedel U<sup>1</sup>, Scheld WM, Pfister HW.** Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* **2002**;2(12):721-36.
- [120] **Angstwurm K, Weber JR, Segert A, Bürger W, Weih M, Freyer D, Einhäupl KM, Dirnagl U.** Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neurosci Lett* **1995**;191(1-2):1-4.
- [121] **Weber JR<sup>1</sup>, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Bürger W, Einhäupl KM, Dirnagl U.** Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis in rats. *Neurosci Lett* **1997**;226(1):17-20.
- [122] **Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S, Obermaier B, Häcker H, Paul R, Häcker G.** Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog* **2009**;5(5):e1000461.

- [123] **Benoit M<sup>1</sup>, Desnues B, Mege JL.** Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **2008**;181(6):3733-9.
- [124] **Colton CA.** Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* **2009**;4(4):399-418.
- [125] **Mildner A, Djukic M, Garbe D, Wellmer A, Kuziel WA, Mack M, Nau R, Prinz M.** Ly-6G<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup> myeloid cells rather than Ly-6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system. *J Immunol* **2008**;181(4):2713-22.
- [126] **Hinojosa AE, Garcia-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL.** CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation* **2011**;8:77.
- [127] **Ribes S, Nessler S, Heide EC, Malzahn D, Perske C, Brück W, Nau R.** The Early Adaptive Immune Response in the Pathophysiological Process of Pneumococcal Meningitis. *J Infect Dis* **2017**;215(1):150-8.
- [128] **Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A.** The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* **2000**;19(13):3325-36.
- [129] **Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MK.** Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* **2003**;170(10):5268-75.
- [130] **Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK.** Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* **2002**;168(9):4701-10.
- [131] **Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR.** Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* **1993**;151(5):2399-408.
- [132] **Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA.** Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol* **2013**;94(4):585-94.
- [133] **Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y.** Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **1982**;257(13):7847-51.
- [134] **Babior BM.** NADPH oxidase: an update. *Blood* **1999**;93(5):1464-76.
- [135] **Fan J, Frey RS, Malik AB.** TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest.* **2003**;112(8):1234-43.

- [136] **Stewart FW.** LOCAL SPECIFIC THERAPY OF EXPERIMENTAL PNEUMOCOCCAL MENINGITIS : I. EXPERIMENTAL PNEUMOCOCCAL MENINGITIS IN RABBITS. *J Exp Med* **1927**;46(3):391-407.
- [137] **Dacey RG, Sande MA.** Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* **1974**;6(4):437-41.
- [138] **Pfister HW, Koedel U, Haberl RL, Dirnagl U, Feiden W, Ruckdeschel G, Einhüpl KM.** Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* **1990**;10(6):914-22.
- [139] **Cauwels A, Frei K, Sansano S, Fearn C, Ulevitch R, Zimmerli W, Landmann R.** The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis. *J Immunol* **1999**;162(8):4762-72.
- [140] **Hoffmann O, Keilwerth N, Bille MB, Reuter U, Angstwurm K, Schumann RR, Dirnagl U, Weber JR.** Triptans reduce the inflammatory response in bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**;22(8):988-96.
- [141] **Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR, Tuomanen EI.** Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* **2004**;190(11):2039-46.
- [142] **Izadpanah K, Freyer D, Weber JR, Braun JS.** Brain parenchymal TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induction in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol* **2014**;276(1-2):104-11.
- [143] **Lukes SA, Posner JB, Nielsen S, Armstrong D.** Bacterial infections of the CNS in neutropenic patients. *Neurology* **1984**;34(3):269-75.
- [144] **Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Højberg B, Lindquist L, Wretling B, Bakhiet M, Link H.** Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1 $\alpha$  attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* **1999**;67(5):2590-601.
- [145] **Kielian T, Barry B, Hickey WF.** CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J Immunol* **2001**;166(7):4634-43.
- [146] **Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ.** Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106(10):4018-23.
- [147] **Ramilo O, Sáez-Llorens X, Mertsola J, Jafari H, Olsen KD, Hansen EJ, Yoshinaga M, Ohkawara S, Nariuchi H, McCracken GH Jr.** Tumor necrosis factor  $\alpha$ /cachectin and interleukin 1  $\beta$  initiate meningeal inflammation. *J Exp Med* **1990**;172(2):497-507.

- [148] **Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E.** The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* **1990**;171(2):439-48.
- [149] **Polfliet MM, Zwijnenburg PJ, van Furth AM, van der Poll T, Döpp EA, Renardel de Lavalette C, van Kesteren-Hendrikx EM, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK.** Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol* **2001**;167(8):4644-50.
- [150] **Flick DA, Gifford GE.** Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol Methods* **1984**;68(1-2):167-75.

## **7. Anhang**

### **7.1 L929 TNF- $\alpha$ Bioassay**

Die Bestimmung des TNF- $\alpha$  beruht auf der stark dosisabhängigen Zytotoxizität des TNF- $\alpha$  für die Zelllinie L929 (Maus Fibrosarkom). Die Sensitivität des Tests liegt bei 4 pg/ml. Der Test erstreckt sich über drei Tage [150].

#### **Tag 1: Aussäen von L 929 Zelllinie auf 96-well Platte**

Zuerst werden die Zellen trypsiniert und auf 300.000 Zellen/ml mit dem L 929 Medium eingestellt. Pro Well werden 75  $\mu$ l aufgetragen und für 30-32 h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 3 Wells werden als Blank frei gelassen.

#### **Tag 2: Auftragen der Proben und Eichkurve**

Die Zellteilung wird durch Zugabe von Actinomycin inhibiert, damit die Proliferation der L 929-Zellen den toxischen Effekt des TNF- $\alpha$  nicht überdecken kann. Für den Test werden folgende Stock- und Gebrauchslösungen hergestellt:

##### ***Actinomycin-D Stocklösung***

- 2 mg in 1 ml Methanol lösen

##### ***Actinomycin-D Gebrauchslösung (AD-Medium)***

- 1:1000 in L 929 Medium verdünnen (2  $\mu$ g/ml Endkonzentration), pro Platte werden 13-15 ml benötigt

##### ***TNF- $\alpha$ Standard Stocklösung***

- 10  $\mu$ g in 938  $\mu$ l PBS/ 0,1 % BSA lösen (10,66  $\mu$ g/ml Endkonzentration)
- Aliquots je 4  $\mu$ l abfüllen und bei -80°C lagern

##### ***Eichkurve***

Auf jeder Platte wird immer eine vollständige Verdünnungsreihe als Eichkurve aufgetragen.

A 4 µl TNF-Stock + 396 µl AD-Medium = 106,6 ng/ml

B 10 µl von A + 990 µl AD-Medium = 1,07 ng/ml = 80 pg/75µl

C 350 µl von B + 350 µl AD-Medium = 535 pg/ml = 40 pg/75µl

D-K je 350 µl AD-Medium vorlegen, dann aus C seriell 1:2 verdünnen bis die Endkonzentration 2,125 pg/ml erreicht wird.

Der Test ist nur im Bereich von 268 pg/ml bis 2,125 pg/ml sensitiv. Deswegen müssen die Messproben in diesen Bereich verdünnt werden. Die A-C Konzentrationen werden nicht aufgetragen, da schon eine TNF-α Konzentration von 268 pg/ml zum Tod aller führt.

### ***Auftragen der Proben***

Bei erwarteten hohen Konzentrationen von TNF-α in der Probe muss die Probe entsprechend verdünnt werden.

Nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle der Zellen werden die Proben in Doppelbestimmung aufgetragen. Pro Probe werden max. 30 µl aufgetragen. Die Wells werden anschließend mit AD Medium auf 150 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach ca. 20 h erfolgt die Färbung der Platten.

### **Tag 3: Färbung der Platten**

Das Medium wird von den Platten abgekippt, und die Platten werden ausgeklopft. Die Zellen werden 5 min mit 100 µl/Well 5 % Formaldehyd fixiert. Das Formaldehyd wird abgegossen und die Zellen dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Bei Raumtemperatur werden die Wells mit jeweils 50 µl 1 % Kristallviolett gefärbt. Die Färbelösung wird abgegossen und dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Zellen werden mit 100 µl/Well 33 % Essigsäure über 5 min lysiert, und die Absorption wird im Plattenreader bei 590 nm gemessen.

## 7.2 Zusammensetzung des C + Y- Mediums

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des C+Y- Mediums

| <b>C+Y-Medium</b>                             | <b>Zusammensetzung</b>   |
|---|--|
| <b>400 ml Prä C Medium (pH 7,4)</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,45 g Natriumacetat</li> <li>• 6 mg L-Tryptophan</li> <li>• 60 mg L-Cystein</li> <li>• 6 g Casamino Acids</li> <li>• 1,2 L H<sub>2</sub>O</li> </ul>   |
| <b>13 ml Ergänzungsmedium</b>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 60 ml 3-fach Salzlösung*</li> <li>• 120 ml Glucose (20 %)</li> <li>• 6 ml Sucrose (50 %)</li> <li>• 120 ml Adenosin (2 mg/ml)</li> <li>• 120 ml Uridin (2 mg/ml)</li> <li>• 14 mg Riboflavin</li> </ul> |
| <b>5 ml Pyruvat (2 %)</b>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g Pyruvat</li> <li>• 100 ml H<sub>2</sub>O</li> </ul>   |
| <b>15 ml Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 8)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 26,5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>• 473 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> </ul>  |
| <b>10 ml Adams III Lösung</b>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 64 ml Adams I**</li> <li>• 16 ml Adams II***</li> <li>• 800 mg Asparagin</li> <li>• 80 mg Cholinchlorid</li> <li>• 6,4 mg CaCl<sub>2</sub></li> </ul>   |
| <b>10 ml Hefe (5 %)</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 g Hefe</li> <li>• 100 ml H<sub>2</sub>O</li> </ul>  |
| <b>10 ml Glutamin (1 mg/ml)</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mg Glutamin</li> <li>• 10 ml H<sub>2</sub>O</li> </ul>   |

*\*3-fach-Salzlösung*

- 10 g Mg Cl<sub>2</sub>
- 50 mg CaCl<sub>2</sub>
- 20 µl MnSO<sub>4</sub>
- 100 ml H<sub>2</sub>O

*\*\* Adams I Lösung*

- 60 µl Biotin (0,5 mg/ml)
- 30 mg Nikotinsäure
- 35 mg Pyridoxin
- 120 mg Ca-pentithotat
- 32 mg Thiamin

*\*\*\* Adams II Lösung*

- 50 mg FeSO<sub>4</sub>
- 50 mg CuSO<sub>4</sub>
- 50 mg ZnSO<sub>4</sub>
- 20 mg MgCl<sub>2</sub>
- 1 ml HCl
- 100 ml H<sub>2</sub>O

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Olga Rung, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Rolle von Lymphozyten, myeloiden Zellen und des Zytokins Thrombopoietin in der bakteriellen Meningitis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Olga Rung hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Hoffmann O, Rung O, Im AR, Freyer D, Zhang J, Held J, Stenzel W, Dame C. Thrombopoietin contributes to neuronal damage in experimental bacterial meningitis. *Infect Immun.* 2011 Feb;79(2):928-36.

Beitrag im Einzelnen: 40 % (Anzucht von Bakterien, *in vivo*-Experimente, Immunhistologie, quantitative PCR).

**Publikation 2:** Hoffmann O, Rung O, Held J, Boettcher C, Prokop S, Stenzel W, Priller J. Lymphocytes modulate innate immune responses and neuronal damage in experimental meningitis. *Infect Immun.* 2015 Jan;83(1):259-67.

Beitrag im Einzelnen: 25 % (*in vivo*-Experimente, Immunhistologie).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **10. Lebenslauf**

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

## 11. Publikationsliste

1. Zhang J, Freyer D, **Rung O**, Im AR, Hoffmann O, Dame C. Inflammation stimulates thrombopoietin (Tpo) expression in rat brain-derived microvascular endothelial cells, but suppresses Tpo in astrocytes and microglia. *J Interferon Cytokine Res.* 2010 Jul;30(7):465-9.
2. Hoffmann O, **Rung O**, Im AR, Freyer D, Zhang J, Held J, Stenzel W, Dame C. Thrombopoietin contributes to neuronal damage in experimental bacterial meningitis. *Infect Immun.* 2011 Feb;79(2):928-36.
3. Hoffmann O, **Rung O**, Held J, Boettcher C, Prokop S, Stenzel W, Priller J. Lymphocytes modulate innate immune responses and neuronal damage in experimental meningitis. *Infect Immun.* 2015 Jan;83(1):259-67.

## 12. Danksagung

Herrn PD Dr. Olaf Hoffmann danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Neuroinfektiologie sowie für die Betreuung und die fachliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertationsschrift.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dorette Freyer für die Einführung in zahlreiche Methoden, für die geduldige Beantwortung meiner Fragen und für die sprachliche Durchsicht der Arbeit. Mein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter im Labor der experimentellen Neurologie an der Charité Berlin Mitte sowie an ihren Leiter, Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl.

Weiterhin bedanke ich mich bei den kooperierenden Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Josef Priller, Prof. Dr. Christof Dame und von Prof. Dr. Werner Stenzel, die wesentliche Methoden und Ergebnisse zu den hier dargestellten Projekten beigesteuert haben. Besonders zu nennen sind hier Dr. Josephine Held, Dr. Chotima Boettcher und Dr. Juan Zhang.

Ein großes Dankeschön an Dr. Adnan Ghori und Dr. Kinga Blecharz-Lang für ihre Hilfe am Computer und für die Einweisung ins Programm GraphPad. Ich bedanke mich auch bei meiner Familie, meinem Mann und bei allen Freunden und Bekannten, die mir während dieser Zeit mit aufmunternden Worten und Taten geholfen haben.

Ein liebevoller Dank an meine Kinder Alessia und Nikita für ihre Geduld und Durchhaltevermögen.