



**Die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit
primären porcinen Epithelzellen des *Plexus
choroideus* nach Infektion mit *Streptococcus suis***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Corinna Wewer
aus Neuenkirchen

Düsseldorf, im Mai 2009

aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Pädiatrische Infektiologie,
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Horst Schrotten
Koreferent: Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung:

Sven

meinen Eltern, meiner Schwester

1. Inhaltsverzeichnis.....	1
2. Einleitung.....	5
2.1 Barrieren im Gehirn.....	5
2.1.1 Blut-Hirn-Schranke.....	5
2.1.2 Blut-Liquor-Schranke.....	6
2.1.2.1 Anatomie des <i>Plexus choroideus</i>	7
2.1.2.2 Funktionen des <i>Plexus choroideus</i>	8
2.2 <i>Tight Junctions</i>	9
2.3 Entzündung des zentralen Nervensystems (ZNS).....	11
2.3.1 Klinik der bakteriellen Meningitis.....	11
2.3.2 Pathogenese der bakteriellen Meningitis.....	12
2.3.3 Zytokine und Chemokine.....	16
2.3.3.1 Tumornekrosefaktor α (TNF α).....	16
2.3.3.2 Interleukin-8 (IL-8).....	17
2.4 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN).....	18
2.4.1 Bildung der PMN.....	19
2.4.2 Funktion der PMN.....	19
2.4.3 Transmigration polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN).....	21
2.4.3.1 Die Rolle der Integrine und der Adhäsionsmoleküle während der Transmigration von Leukozyten.....	21
2.4.3.2 Transendotheliale und transepitheliale Migration von PMN.....	22
2.4.3.2.1 Transendotheliale Migration von PMN.....	22
2.4.3.2.2 Transepitheliale Migration von PMN.....	24
2.5 <i>Streptococcus suis</i>	26
2.5.1 <i>Streptococcus suis</i> als humaner und porciner Krankheitserreger.....	26
2.5.2 Biologische Merkmale von <i>S. suis</i>	27
2.5.3 Virulenzfaktoren von <i>S. suis</i>	29
2.5.3.1 Kapselpolysaccharid (KPS).....	29
3. Motivation.....	31
4. Material.....	32
4.1 Bakterienstämme.....	32
4.2 Zellen.....	32
4.3 Medien.....	32

4.3.1	Kulturmedium für <i>S. suis</i>	32
4.3.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	33
4.3.3	Zellkulturmedien und -lösungen.....	34
4.4	Zytokine.....	35
4.5	Antikörper.....	35
4.5.1	Primärantikörper.....	35
4.5.2	Sekundärantikörper.....	36
4.6	Fluoreszenzfarbstoffe.....	37
4.7	Oligonukleotide für die quantitative <i>Real Time</i> -PCR.....	37
4.8	Größenstandards.....	37
4.9	Kits.....	37
4.10	Chemikalien.....	38
4.11	Puffer und Lösungen.....	39
4.12	Geräte.....	39
4.13	Verbrauchsmaterialien.....	40
5.	Methoden.....	41
5.1	Mikrobiologische Methoden.....	41
5.1.1	Einfrieren und Erstellen von Arbeitsaliquots von <i>S. suis</i>	41
5.1.2	Kultivierung von <i>S. suis</i>	41
5.2	Zellbiologische Methoden.....	42
5.2.1	Präparation der primären Epithelzellen aus dem porcinen <i>Plexus choroideus</i> (PCPEC).....	42
5.2.2	Kultivierung der PCPEC als Umkehrkulturen.....	43
5.2.3	Stimulierung der PCPEC-Umkehrkulturen.....	45
5.2.4	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER).....	46
5.2.5	Bestimmung der parazellulären Permeabilität der PCPEC-Monolayer.....	46
5.2.6	Isolierung porciner polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN).....	46
5.2.7	Färbung der PMN mit BCECF AM.....	47
5.2.8	Transmigration der PMN durch PCPEC-Umkehrkulturen.....	47
5.3	Mikroskopie.....	48
5.3.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	48
5.3.1.1	Analyse der Zellvitalität.....	48

5.3.1.2	Analyse der PMN-Transmigration, der <i>Tight Junction</i> -Struktur und des Aktin-Zytoskeletts	49
5.3.1.3	Analyse der Phagozytose durch Doppelimmunfluoreszenz	50
5.3.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	51
5.4	Durchflusszytometrie	52
5.5	Molekularbiologische Methoden	53
5.5.1	RNA-Isolierung	53
5.5.2	DNase-Verdau	54
5.5.3	Konzentrationsbestimmung von RNA	54
5.5.4	cDNA-Synthese	54
5.5.5	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	55
5.5.6	Agarose-Gelelektrophorese	57
5.6	Statistik	58
6.	Ergebnisse	58
6.1	Messung des TEER und der parazellulären Permeabilität unter Einfluss von IL-8, PMN und IL-8/PMN	58
6.2	Messung des TEER und der parazellulären Permeabilität während der PMN-Transmigration	59
6.3	PMN-Transmigration durch unstimulierte, <i>S. suis</i> - und TNF α -stimulierte PCPEC	61
6.4	Inhibition der PMN-Transmigration durch unstimulierte, <i>S. suis</i> - und TNF α -stimulierte PCPEC mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAK) ..	62
6.5	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle unstimulierter und stimulierter PMN	65
6.6	Untersuchung der mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in PCPEC nach <i>S. suis</i> - und TNF α -Stimulation	68
6.7	Immunfluoreszenzanalyse der Interaktion von PMN mit PCPEC	71
6.7.1	Zellvitalität der PCPEC nach der PMN-Transmigration	71
6.7.2	Immunfluoreszenz der Phagozytose von <i>S. suis</i> durch PMN	72
6.7.3	Immunfluoreszenzanalyse der PMN-Transmigration durch PCPEC ..	72
6.7.4	Analyse der <i>Tight Junction</i> -Struktur und des Aktin-Zytoskeletts von PCPEC nach PMN-Transmigration	73
6.7.5	Parazelluläre Transmigration der PMN	75
6.7.6	Transzelluläre Transmigration der PMN	80

6.8 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der PMN-Transmigration durch PCPEC	82
7. Diskussion	88
7.1 Einwirkungen der PMN-Transmigration auf die Barrierefunktion der PCPEC	88
7.2 <i>S. suis</i> und TNF α stimulieren die PMN-Transmigration	93
7.3 Beteiligung von Integrinen an der PMN-Transmigration	97
7.4 Transmigrationsroute der PMN durch PCPEC	102
8. Ausblick	105
9.1 Zusammenfassung	107
9.2 Summary	108
10. Anhang	109
10.1 Abkürzungsverzeichnis	109
10.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	113
10.3 Diverses	117
10.3.1 Histogramme der Durchflusszytometrie	117
10.3.2 Profile der quantitativen <i>Real Time</i> -PCR	134
10.3.3 3D-Darstellung der Immunfluoreszenzen (Transmigrationssequenzen, Occludin)	136
11. Literatur	138
Lebenslauf	
Danksagung	

2. Einleitung

2.1 Barrieren im Gehirn

Das Gehirn stellt hohe Anforderungen an seine Umgebung, denn nur in einem chemisch stabilen Milieu kann es seine volle Funktionstüchtigkeit entfalten. Daher wird der Stoffaustausch mit dem übrigen Organismus strikt kontrolliert, so dass die meisten wasserlöslichen Substanzen aus dem Blut, jedoch auch nützliche Medikamente, nicht passieren können. Drei Strukturen dienen dem Gehirn als Barriere in sein Inneres: 1. ein Netzwerk aus cerebralen Kapillaren, das sich in alle Hirnwindungen zieht und die Nervenzellen fast direkt erreicht, 2. die Arachnoidea (Spinnwebhaut), die das Gehirn umkleidet und 3. ein diffuses und hoch vaskularisiertes Gewebe, der *Plexus choroideus* (Spector und Johanson, 1989). Die drei Schranken können unter dem Oberbegriff Hirn-Schranken zusammengefasst werden.

2.1.1 Blut-Hirn-Schranke

Die bekannteste und wahrscheinlich am meisten untersuchte Barriere ist die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die von den Endothelzellen der Hirnkapillaren gebildet wird. Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke unterscheiden sich von Endothelzellen aus anderen Geweben durch die erhöhte Anzahl von Mitochondrien (Oldendorf *et al.*, 1977), das Fehlen von Fenestrierungen (Fenstermacher *et al.*, 1988), minimale pinozytische Aktivität (Sedlakova *et al.*, 1999) und durch die Ausbildung von dichten Zell-Zell-Kontakten (*Tight Junctions*) (Kniesel und Wolburg, 2000), die den Stoffaustausch zwischen dem Blut und der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns regulieren (Brightman und Reese, 1969). Außerdem sind Perizyten und Astrozyten am Aufbau und der Funktionalität der BHS beteiligt. Perizyten sind in unregelmäßigen Abständen mit der dem Lumen abgewandten Seite des Endothels verknüpft (Tagami *et al.*, 1990). Sie treten im Gehirn im Gegensatz zu anderen Organen besonders zahlreich auf. Bei ihnen handelt es sich um eine morphologisch, biochemisch und physiologisch heterogene Zellpopulation (Ramsauer *et al.*, 1998), deren Aufgabe in der Blut-Hirn-Schranke allerdings bisher noch unzulänglich geklärt ist. Mit Hilfe der in der Membran von Perizyten liegenden Aminopeptidase N werden

Neuropeptide abgebaut. Perizyten sind somit am Neurotransmittermetabolismus der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Kunz *et al.*, 1994). Perizyten und Endothelzellen sind von der Basallamina umgeben. Die Basallamina ist eine Membran, die 30-40 nm dick ist und aus Kollagen Typ IV, Heparinsulfat, Laminin, Fibronectin und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix besteht (Farkas und Luiten, 2001). In cerebralen Kapillaren grenzt sie an die Plasmamembran von Astrozyten. Astrozyten, die mit ihren Endfüßen die Endothelzellen und Perizyten einschließlich der Basallamina umfassen, bieten den Blutgefäßen mechanischen Schutz. Das Kapillarlumen ist von einer einzelnen Endothelzelle umgeben. In Abbildung 1 ist der Querschnitt einer typischen cerebralen Blutkapillare schematisch dargestellt.

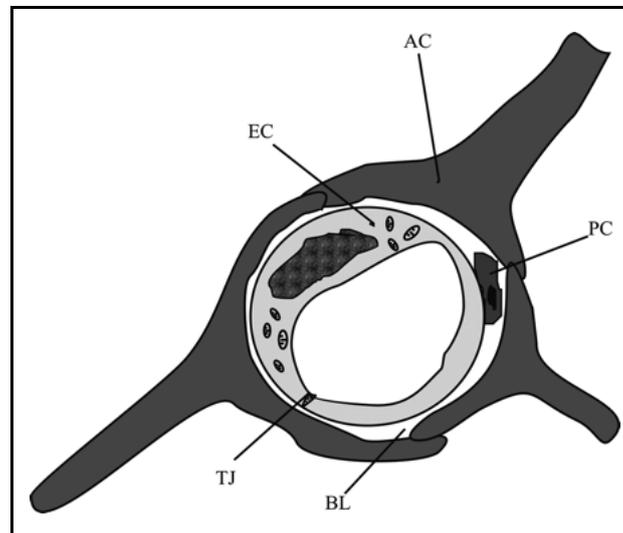


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine cerebrale Kapillare. Das Kapillarlumen ist vollständig von einer einzelnen Endothelzelle (EC) umgeben, die beiden Enden der Zelle sind durch *Tight Junctions* (TJ) verbunden. Perizyten (PC) liegen auf der dem Lumen abgewandten Seite der Endothelzelle. EC und PC sind von der Basallamina (BL) umgeben, die mit den Plasmamembranen von Astrozyten (AC) und ECs verknüpft ist (Hawkins und Davis, 2005).

2.1.2 Blut-Liquor-Schranke

Der *Plexus choroideus* und die Arachnoidmembran fungieren zusammen als Barriere zwischen dem Blut und dem *Liquor cerebrospinalis* (kurz: Liquor). Während die Arachnoidea als passive Barriere für wasserlösliche Substanzen impermeabel ist, reguliert der *Plexus choroideus* die molekulare Zusammensetzung der Gehirnflüssigkeit aktiv und macht die Blut-Liquor-Schranke selektiv (Spector und Johanson, 1989).

Die *Plexus choroidei* kommen im Gehirn im dritten Ventrikel in der Hirnmitte, in den beiden Seitenventrikeln und im vierten Ventrikel an der Hirnbasis vor (Abb. 2).

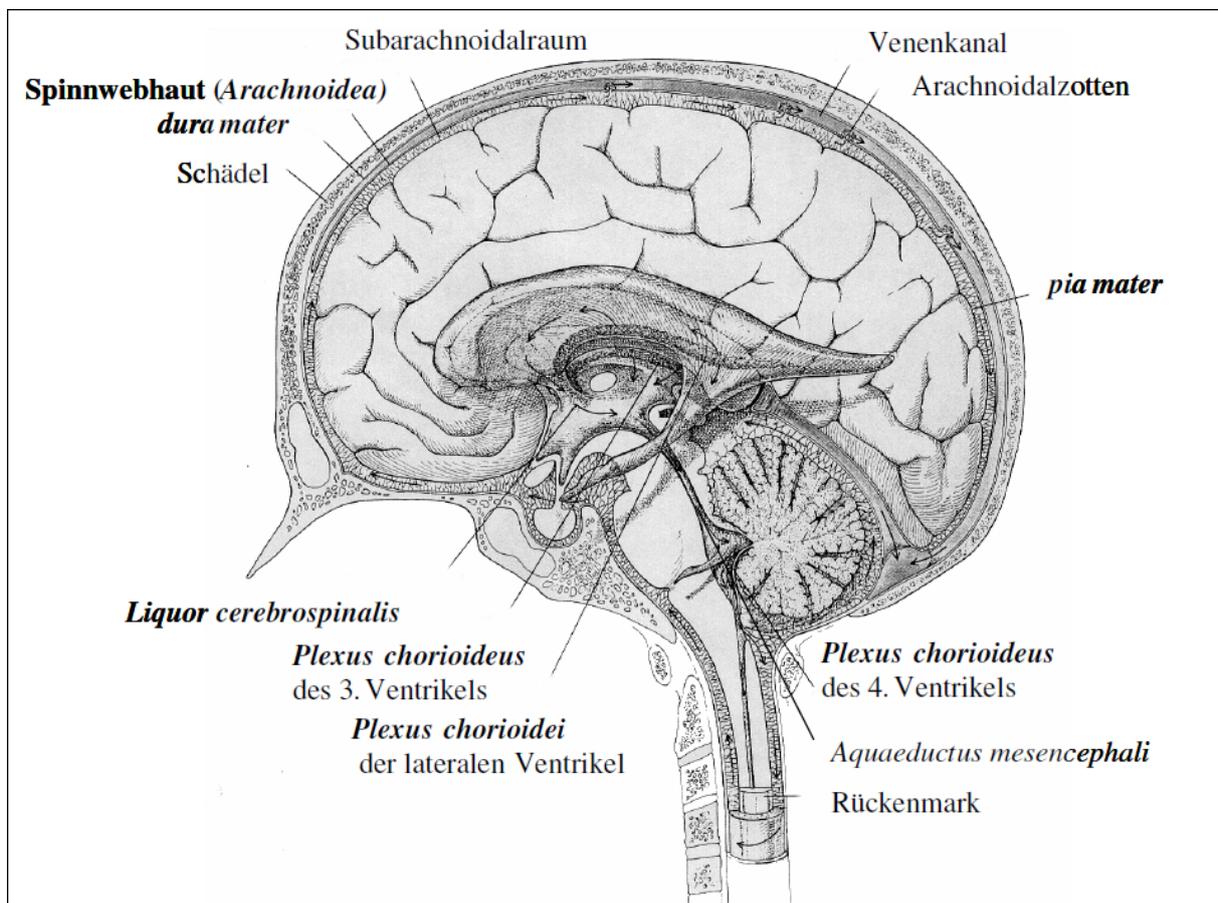


Abb. 2: Aufbau des menschlichen Gehirns mit dargestelltem Liquor-Fluss (Pfeile) (modifiziert nach Spector und Johanson, 1989).

2.1.2.1 Anatomie des *Plexus choroideus*

Die strukturelle Basis der Blut-Liquor-Schranke wird von dem Epithel der *Plexus choroidei* gebildet. Bei der Blut-Liquor-Schranke sind es die Epithelzellen, die auf der apikalen Seite durch *Tight Junctions* dicht miteinander verknüpft sind und den ungehinderten Stofftransport regulieren (Brightman und Reese, 1969). Die Endothelien des *Plexus choroideus* sind im Gegensatz zur Blut-Hirn-Schranke fenestriert und durchlässig und stellen somit keine Barriere zwischen Blut und Hirn dar (Brightman, 1968).

Die Epithelzellen sind polar aufgebaut: auf der basolateralen Seite haben sie Kontakt zum Blutplasma, das durch das fenestrierte Endothel fließen kann. Außerdem befindet sich an der basolateralen Seite die Basallamina, die die Epithelzellen vom

Stroma trennt. Diese wird von Fibroblasten produziert und besteht aus netzwerkartigen Collagenfasern. Dort sind zudem dendritische Zellen und Makrophagen lokalisiert (Strazielle und Gherzi-Egea, 2000).

Die apikale, den Ventrikeln zugewandte Seite der Epithelzellen weist zahlreiche Membraneinstülpungen und einen dichten Mikrovillisaum auf, was zur Oberflächenvergrößerung im Gegensatz zur basolateralen Membran führt (Keep und Jones, 1990). Außerdem befinden sich Zilien auf der apikalen Epithelseite (Maxwell und Pease, 1956), deren Bewegungen mit einem lokal gesteigerten Strömungsverhalten des Liquors zusammenhängen (Roth *et al.*, 1985). An der apikalen Oberfläche des Epithels lokalisierte Kolmer-Zellen partizipieren, neben ihrer primären Funktion als Phagozyten, an immunologischen Antworten und der Eisenregulation im ventrikulären System (Ling *et al.*, 1998).

Die beschriebene Polarität und die große Anzahl von Mitochondrien sind typisch für sezernierende und re-absorbierende Epithelien (Strazielle und Gherzi-Egea, 2000).

2.1.2.2 Funktionen des *Plexus choroideus*

Das Epithel des *Plexus choroideus* bildet, wie schon erläutert, eine Barriere zwischen dem Blut und dem Liquor. Der *Plexus choroideus* sorgt für die Aufrechterhaltung der chemischen Stabilität der Gehirnflüssigkeit und stellt diese her. Der Liquor wird vom *Plexus choroideus* in die Hirnventrikel sezerniert und versorgt sie mit Nährstoffen, die er dem Blut entnimmt. Die Sezernierung des Liquors stellt dabei keine bloße Ultrafiltration des Plasmas dar, sondern basiert auf hochspezifischen Transportprozessen (Spector und Johanson, 1989). Dies äußert sich beispielsweise in der Beobachtung, dass die Konzentrationen diverser anorganischer Ionen in Plasma und Liquor unterschiedlich sind (Fishman, 1992).

Der Liquor umspült das Gehirn und das Rückenmark sowie die Ventrikel, dient als Stoßdämpfer und schützt das Gehirn somit vor Stößen und Verletzungen (Spector und Johanson, 1989).

2.2 Tight Junctions

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben bilden die *Tight Junctions*, durch die die Epithelzellen des *Plexus choroideus* miteinander verknüpft sind, die strukturelle Basis der Blut- Liquor-Schranke. Neben den *Tight Junctions* kommen sowohl in der BHS als auch in der Blut-Liquor-Schranke noch die *Adherence Junctions* vor, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind.

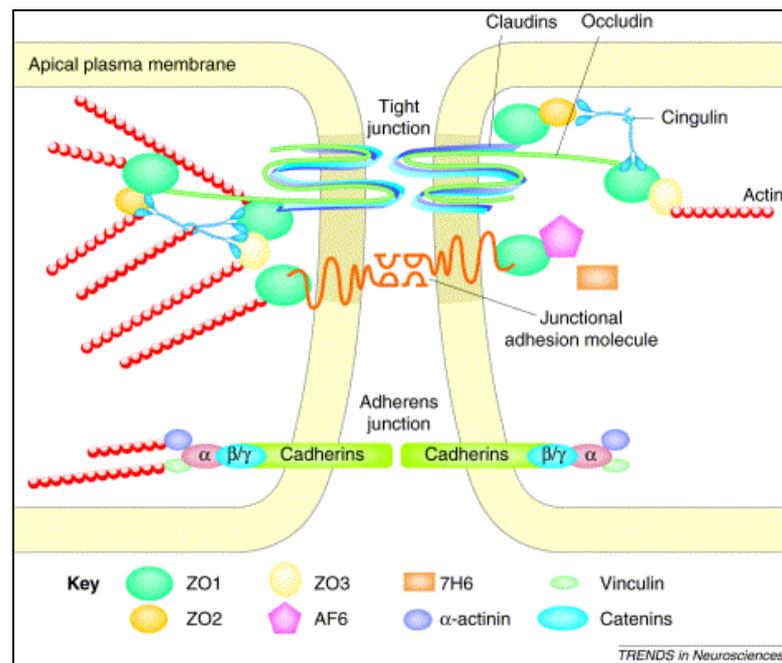


Abb. 3: Schematische Darstellung von Zell-Zell-Verbindungen an der Blut-Hirn-Schranke. *Adherence Junctions* bestehen aus Cadherinen, die die Plasmamembran einfach durchspannen und Komplexe mit Cateninen bilden. Zu den *Tight Junction* Proteinen zählen die Transmembranproteine Occludin, die Claudine und die *Junctional adhesion molecules* (JAM) und zytosmatische Proteine, wie Cingulin, ZO 1-3 und Aktin (Huber, Egleton und Davis, 2001).

Die *Adherence Junctions* erfüllen eine mechanische Aufgabe. Sie bestehen aus Cadherin-Catenin-Komplexen und ihren assoziierten Proteinen (Ballabh, 2004). Cadherine sind Transmembranproteine, die die Plasmamembran einmal durchspannen. An ihre zytosmatische Domäne binden Catenine, die die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen (Kemler, 1993). β - und γ -Catenin sind mit α -Catenin assoziiert, das wiederum direkt oder über α -Actinin mit dem Zytoskelett verbunden ist (Butz und Kemler, 1994). *Adherence Junctions* bilden somit feste Verbindungen zwischen den Zytoskeletten benachbarter Zellen und gewährleisten dadurch den mechanischen Zusammenhalt der Zellen.

Bei den *Tight Junctions* handelt es sich um relativ undurchlässige Zell-Zell-Verbindungen. Sie sind durch zwei Charakteristika gekennzeichnet. Eine wichtige Aufgabe der *Tight Junctions* in Epithelien und Endothelien ist die Aufrechterhaltung der Asymmetrie der Plasmamembran. Ein geregelter und zielgerichteter Transport von Soluten, Wasser und Immunzellen über das Gewebe setzt voraus, dass Transporter und Kanäle auf einer bestimmten Seite der Membran lokalisiert sind. *Tight Junctions* verhindern die Diffusion integraler Membranproteine (z.B. Kanäle, Carrier, ATPasen) und Lipidbestandteile, so dass die Unterschiede von apikaler und basolateraler Membran aufrechterhalten werden.

Das zweite Charakteristikum der *Tight Junctions* ist, dass sie die Diffusion zwischen den Zellen hindurch verhindern. Diese Barriere ist regulierbar und kann bei Erkrankungen stark verändert sein. Je nach Gewebe ist sie unterschiedlich stark ausgeprägt.

Epitheliale *Tight Junctions* der *Plexus choroidei* und endotheliale *Tight Junctions* des cerebralen Blutgefäßsystems weisen eine relativ starke Abdichtung auf. Sie limitieren den parazellulären Durchtritt hydrophiler Moleküle über die Hirn-Schranken. Im Gegensatz dazu diffundieren kleine lipophile Substanzen, wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid entlang ihres Konzentrationsgradienten frei über die Plasmamembran (Grieb *et al.*, 1985). Nährstoffe wie Glucose und Aminosäuren gelangen über Transporter in das Gehirn (Pardridge *et al.*, 1985). Größere Moleküle werden über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen (Zhang und Pardridge, 2001).

Tight Junctions sind multifunktionelle Komplexe, die aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut sind, welche in drei Gruppen eingeteilt werden können (Schneeberger und Lynch, 2004): 1. Integrale Membranproteine überbrücken den apikalen interzellulären Raum und bilden eine regulierte Permeabilitätsbarriere. Zu ihnen zählen Occludin, Claudin und JAM (*junctional adhesion molecule*). 2. *Tight Junction*-assoziierte zytosolische Proteine, von denen viele eine PDZ-Domäne tragen, dienen als Verbindung zwischen integralen *Tight Junction*-Proteinen und dem Aktin-Zytoskelett, sowie als Adaptoren für die Rekrutierung zytosolischer Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Hierzu zählt ZO-1 (Zonula occludens-1). 3. Eine Gruppe verschiedener zytosolischer und nukleärer Proteine, wie Regulatorproteine, Tumorsuppressoren, transkriptionale und posttranskriptionale Faktoren, interagiert direkt oder indirekt mit den *Tight Junction*-assoziierten Proteinen, um verschiedene

Funktionen, wie die Regulation der parazellulären Permeabilität, Zellteilung, Zellpolarität und Tumorsuppression zu koordinieren.

Tight Junctions spielen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum kortikalen Zytoskelett (Nusrat *et al.*, 2000), wobei Änderungen im Aktin-Zytoskelett den Zusammenbau und die Funktion von *Tight Junctions* zu regulieren scheinen (Perez-Monero *et al.*, 1998). Das Aktin-Zytoskelett ist durch Occludin und mehrere zytoplasmatische *Tight Junction*-spezifische Proteine, wie *Zonula occludens* Proteine (ZO 1 – 3), AF-6 oder Cingulin mit den *Tight Junctions* assoziiert (Fanning *et al.*, 1998; Bazzoni *et al.*, 2000; Cordenonsi *et al.*, 1999; Balda *et al.*, 2000). Claudine interagieren direkt mit Occludin und über die PDZ-Domäne auch mit den ZO-Proteinen (Itoh *et al.*, 1999) und sind am *Tight Junction*-abhängigen Signaltransduktionsweg beteiligt (Chen *et al.*, 2000).

2.3 Entzündung des zentralen Nervensystems (ZNS)

Das zentrale Nervensystem ist ein immunologisch privilegierter Raum, da es, wie beschrieben, durch die Barrieren im Gehirn vom übrigen Organismus abgeschlossen wird. Kommt es jedoch zur Überwindung der Barrieren durch invadierende Pathogene, kann dies zur Inflammation und letztendlich zu schweren Schädigungen des ZNS führen.

2.3.1 Klinik der bakteriellen Meningitis

Meningitis ist eine schwere Erkrankung, bei der die weichen Hirnhäute des Menschen entzündet sind. Sie ist mit einer hohen Krankheits- und Sterberate verbunden. Weltweit sterben jährlich über 170.000 Menschen an dieser Krankheit. Meningitis kann durch Bakterien, Viren und Pilze verursacht werden, wobei die bakterielle Meningitis für den größten Teil der Todesfälle verantwortlich ist. Die Einteilung der Meningitiden erfolgt nach dem Erregerspektrum, dem Krankheitsverlauf und nach der zellulären Reaktion (Hahn *et al.*, 2005). Bei der akuten bakteriellen Meningitis besteht ein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Erregerspektrum. Bei Neugeborenen dominieren *Escherichia coli* K1 und Gruppe B-Streptokokken sowie selten *Listeria monocytogenes*, in

Entwicklungsländern finden sich oft neben *E. coli* auch andere Gram negative Keime wie *Enterobacter*, *Salmonella* und *Klebsiella* (Moreno *et al.*, 1994). Die durch *Haemophilus influenzae* Typ B verursachte Meningitis ist wegen der seit 1990 durchgeführten Schutzimpfung (Hib) stark zurückgegangen. Nach dem 3. Lebensmonat treten dann *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* in den Vordergrund. Im Alter kommt vor allem auch *L. monocytogenes* als Erreger vor (Hahn *et al.*, 2005). Als Zoonose werden auch immer wieder die vom Schwein auf den Menschen übertragenen *S. suis*-Meningitiden beobachtet (Lun *et al.*, 2007).

2.3.2 Pathogenese der bakteriellen Meningitis

Die Entwicklung einer bakteriellen Meningitis ist ein komplexer und vielstufiger Prozess, der mit der Kolonisierung der Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raumes oder des Darms durch die Meningitis-Erreger beginnt (Abb. 4, 1).

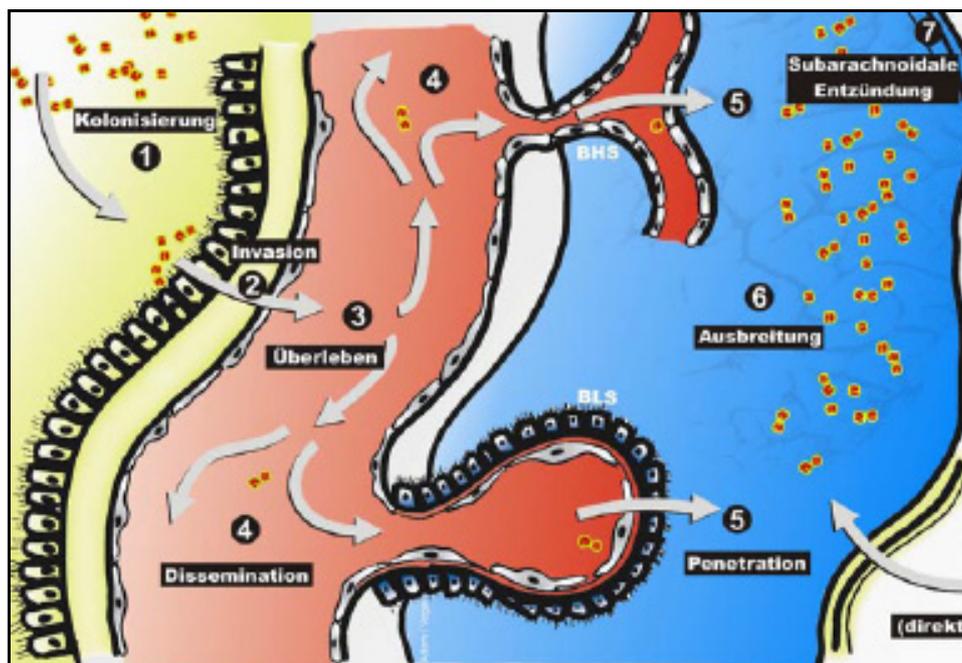


Abb. 4: Infektionsverlauf einer bakteriellen Meningitis. Der Infektionsverlauf einer bakteriellen Meningitis ist ein komplexer und vielstufiger Prozess, der mit der Kolonisierung der Mucosa des Respirations- oder Gastrointestinaltraktes beginnt (1). Es folgt die Translokation durch die Epithelzellen und die Invasion in den Intravaskularraum (2), woran sich das intravaskuläre Überleben (3) und die Dissemination (4) anschließen. Nach Erreichen eines Schwellenwertes der bakteriellen Konzentration penetrieren die Keime die Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke (5). Dort können sich die Bakterien vermehren (6) und induzieren die Freisetzung proinflammatorischer und toxischer Verbindungen (7). Dies führt zur erhöhten Permeabilität der Barrieren und zur Migration von Leukozyten (Pleozytose) in das Gehirn, wodurch die Meningitis verursacht wird (Adam und Schroten, 2004).

Um an den Epithelien, die eine wirksame mechanische Barriere mit Abwehrfunktion wie sekretorischem IgA oder Zilienschlag und Schleimsekretion darstellen, adhären zu können, bilden die Bakterien spezifische Virulenzfaktoren (Weiser *et al.*, 2003; Adam und Schroten, 2004). Diese Virulenzfaktoren nutzen sie, um der wirtseigenen Abwehr zu entgehen (Deuren *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000). Bei der Überwindung der epithelialen Barriere mit resultierender Invasion in die Blutbahn verwenden die unterschiedlichen Erreger zum Teil gleiche oder verschiedene Wege. Der Eintritt von Rhinoviren wird zum Beispiel durch witterungsbedingte Beeinträchtigungen der Schleimhautbarriere begünstigt. Andere Erreger überwinden die Barriere über induzierte Transzytose (Meningokokken, Pneumokokken) (Deuren *et al.*, 2000; Ring *et al.*, 1998) oder durch parazelluläre Passage (*Haemophilus influenzae* b) (van Schilfgaarde *et al.*, 2000). Nach Durchbrechen der epithelialen Schleimhautbarriere dringen die Erreger in die Blutbahn ein (Abb. 4, 2). Um sich hier vor der wirtseigenen Immunabwehr, primär der Opsonophagozytose und der komplementvermittelten Lyse zu schützen, ist die bakterielle Polysaccharidkapsel von essenzieller Bedeutung (Frosch *et al.*, 2003; Steenbergen und Vimr, 2003; Ren *et al.*, 2004; Prasadarao *et al.*, 2002). Die bekannten Schutzmechanismen sind jedoch abhängig von der Art des Erregers unterschiedlich. Neben der erregerspezifischen Virulenz können auch Abwehrschwächen des Wirts zur Verbreitung bekapselter Bakterien beitragen. Durch Virulenzfaktoren wie die Kapsel, Lipopolysaccharid (LPS) oder Eisenchelatsystem sind die Erreger in der Lage, im Blutstrom zu überleben und sich dort auszubreiten (Abb. 4, 3 und 4; Adam und Schroten, 2004). Für viele extrazelluläre Meningitiserreger ist neben dem grundsätzlichen Überleben noch ein weiterer Aspekt wichtig. Für *E. coli* K1, Gruppe B-Streptokokken, *H. influenzae* b und Pneumokokken konnte gezeigt werden, dass die Infektion der Meningen von der Intensität und Dauer der Bakteriämie abhängt. Offenbar muss die Bakterienzahl einen gewissen Schwellenwert überschreiten, um letztendlich eine Meningitis zu verursachen (Kim, 2003). Der Eintritt in den Subarachnoidalraum kann über die Blut-Hirn- oder die Blut-Liquor-Schranke geschehen (Abb. 4, 5). Für *E. coli* K1 und Pneumokokken ist beschrieben, dass das Eindringen in das Ventrikelsystem primär durch Überwinden der Blut-Hirn-Schranke erfolgt (Kim 2002; Huang *et al.*, 2000). Erreger, die das Liquorsystem über den *Plexus choroideus* erreichen, müssen primär am fenestrierten Endothel oder der extrazellulären Matrix adhären, um von der basalen Seite der Plexusendothelien,

die dem Blut zugewandt ist, diese epitheliale Grenzschicht zu durchbrechen. Erreger, die offenbar die Blut-Liquor-Schranke als Eintrittspforte in den Subarachnoidalraum nutzen, sind Meningokokken, *H. influenzae* b und *S. suis* (Pron *et al.*, 1997; Smith, 1987; Williams und Blakemore, 1990).

Zur Überwindung der durch *Tight Junctions* abgedichteten endothelialen oder epithelialen Zellbarrieren kommen verschiedene Wege in Betracht: die transzelluläre oder die parazelluläre Passage oder die Transmigration via Leukozyten („Trojanisches Pferd“) (Abb. 5). Die meisten Untersuchungen hierzu stammen von Blut-Hirn-Schranken-Modellen.

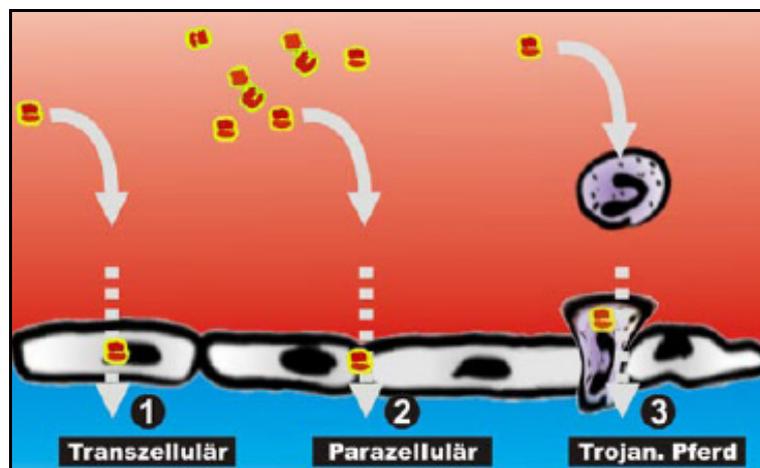


Abb. 5: Penetrationswege der Erreger: transzellulär (1), parazellulär (2) oder via Leukozyten (Trojanisches Pferd, 3) (Adam und Schroten, 2004).

Für Meningokokken, Pneumokokken und Gruppe B-Streptokokken wurde die transzelluläre Passage postuliert (Abb. 5, 1; Unkmeir, 2002; Saez-Llorens *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2000). Durch die Internalisierung in die Wirtszelle gelangen die Erreger in das ZNS. Auch *E. coli* passieren die Blut-Hirn-Schranke u.a. transzellulär, indem sie das Zytoskelett der Wirtszelle nutzen und die lysosomalen Fusionsmechanismen hemmen, so dass sie nicht durch die Lysosomen abgetötet werden (Kim, 2003). Für *S. suis* konnte von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass sie die Epithelzellen des *Plexus choroideus* kapselabhängig von der basolateralen Seite invadieren (Tenenbaum *et al.*, 2009). Durch die Schädigung des Endothels durch Hämolytine wird offenbar der parazelluläre Durchtritt von Streptokokken und Pneumokokken erleichtert (Abb. 5, 2; Huang *et al.*, 2000; Jedrzejak, 2001). Auch für *H. influenzae* b und *E. coli* ist der parazelluläre Mechanismus beschrieben (Tunkel *et al.*, 1992; Sukumaran und Prasadarao, 2003).

Diese Bakterien interagieren offenbar mit den *Adherence* und *Tight Junctions* benachbarter Zellen und verschaffen sich so den Zutritt in das ZNS.

Bei der Transmigration via Leukozyten können Erreger mit der Fähigkeit zum Überleben in Phagozyten mit deren Hilfe das ZNS erreichen, wenn diese durch die Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke migrieren. Dieser Mechanismus wird als Theorie des „Trojanischen Pferdes“ bezeichnet (Abb. 5, 3). Für *L. monocytogenes*, *Brucella sp.* und *Mycobacterium tuberculosis* könnte diese Theorie zutreffen (Drevets und Leenen, 2000). Auch für *S. suis*, Gruppe B-Streptokokken und *E. coli* wurde gezeigt, dass sie in Makrophagen überleben können. Möglicherweise überwinden diese Keime die protektiven Hirnschranken mit Hilfe eines „trojanischen Pferdes“ (Brazeau *et al.*, 1996; Sukumaran und Prasadarao, 2003; Valentin-Weigand *et al.*, 1996; Weiser *et al.*, 2003).

Sind die Bakterien in den Liquorraum eingedrungen, finden sie optimale Bedingungen vor und können bis zu hohen Konzentrationen heranwachsen (Abb. 4, 6). Im Liquor gibt es nur ein unzureichendes Immunsystem, um die Bakterien zu eliminieren, so dass ihr Wachstum nicht eingeschränkt wird. Bis zur Rekrutierung von immunkompetenten Zellen außerhalb des Liquorraums stehen ortsansässige Abwehrzellen, z. B. intraventrikuläre Makrophagen (Epiplexus- oder Kolmerzellen) als erste Abwehr zur Verfügung (Ling *et al.*, 1998). Diese können Bakterien phagozytieren, MHC-Moleküle exprimieren und Granulozyten rekrutieren. Plexusepithelzellen können in dieser frühen Phase zur Abwehr beitragen, indem sie dem Liquor Tryptophan entziehen und somit das Wachstum verschiedener Bakterien hemmen. Zudem können sie durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Rekrutierung immunkompetenter Zellen beitragen (Adam *et al.*, 2004).

Wenn die Bakterien im Liquor eine kritische Konzentration und das stationäre Wachstum erreicht haben bzw. nach Behandlung mit Antibiotika, sterben sie ab. Dadurch werden toxische bakterielle Hüllprodukte wie LPS von Gram negativen Bakterien, weitere Toxine und DNA im Liquorraum freigesetzt (Deuren *et al.*, 2003; Saez-Llorens *et al.*, 2003; Kim, 2003). Dies führt zur lokalen Aktivierung ortsansässiger Zellen wie Makrophagen, Mikroglia, Plexusepithelien und Ependymzellen, Endothelien oder Astrozyten, die proinflammatorische Zytokine produzieren. Die wichtigsten sind wahrscheinlich hier Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β) Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) (Adam und Schrotten, 2004).

Insbesondere die Invasion von Leukozyten, jedoch auch von initial ausgeschütteten Mediatoren führen zur Freisetzung einer Vielzahl von Substanzen, die letztendlich zur Schädigung des ZNS führen. Bei der maximalen Inflammation kommt es zur Freisetzung reaktiver oxidativer Stoffwechselprodukte (Koedel *et al.*, 2002; Nau und Bruck, 2002; Frosch *et al.*, 2003), zur Ausschüttung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) (Leib und Tauber, 2000; Shapiro *et al.*; 2003, Zeni *et al.*, 2007) und exzitatorischer Aminosäuren (Leib und Tauber, 2000) und zur weiteren Stimulation durch Zytokine und Chemokine (Koedel *et al.*, 2002; Saez-Llorens *et al.*, 2003). Die intensive Immunantwort des Wirts auf die eingedrungenen Keime ist in erster Linie für die cerebrale Schädigung bei eitrigen, bakteriellen Meningitiden verantwortlich (Abb. 4, 7; Saez-Llorens *et al.*, 2003).

2.3.3 Zytokine und Chemokine

Die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen ist eine wesentliche Phase im Verlauf einer Meningitis. Aus diesem Grund werden die für diese Arbeit besonders relevanten beschrieben.

2.3.3.1 Tumornekrosefaktor α (TNF α)

Humanes TNF α ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, das als Homotrimer entweder in membrangebundener oder nach proteolytischer Spaltung durch die Matrix-Metalloprotease TACE (TNF α -converting enzyme) in löslicher Form (51 kDa) vorkommt (Leib *et al.*, 2001). Die Bezeichnung Tumornekrosefaktor ist auf die erste Charakterisierung zurückzuführen, die eine hämorrhagische Nekrose von Tumoren nachwies (Carswell *et al.*, 1975). TNF α verfügt über ein breites Spektrum an Funktionen, die in erster Linie für die Ausbildung und Ausbreitung von entzündlichen Reaktionen von Bedeutung sind. Es wird von einer Vielzahl von Zellen als Antwort auf unterschiedliche biologische, chemische und physikalische Stimuli produziert. Die biologische Aktivität von TNF α wird durch die zwei strukturell unterschiedlichen Rezeptoren TNFR I und TNFR II transduziert. Während TNFR I konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression von TNFR II erst nach Induktion nachweisbar. Über TNFR I werden *in vivo* vor allem Entzündungsprozesse, wie die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs,

cellular adhesion molecules), initiiert. Im Gegensatz dazu führt die Bindung an TNFR II in erster Linie zur Induktion des programmierten Zelltodes (Holländer, 2006). In PCPEC bewirkt TNF α einen Verlust der Barrierefunktion, der in einem reduzierten transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) und einer erhöhten parazellulären Permeabilität resultiert. Außerdem werden die CAMs ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) auf mRNA-Ebene durch dieses Zytokin hochreguliert (Zeni *et al.*, 2007).

2.3.3.2 Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 wurde ursprünglich als chemotaktischer Faktor identifiziert, der auf neutrophile Granulozyten wirkt und sich im Überstand von LPS-stimulierten humanen mononukleären Zellen anreichert (Baggiolini *et al.*, 1989). Es gehört einer Gruppe strukturell verwandter Polypeptide an, die chemotaktische Aktivität aufweisen und daher auch als Chemokine bezeichnet werden. In der Regel sind diese Moleküle 8-10 kDa groß und für ein breites Spektrum an immunologischen und inflammatorischen Effekten innerhalb des Immunsystems verantwortlich, wobei Chemokine vor allem die Migration von Leukozyten regulieren und die Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren beeinflussen (Holländer, 2006). Funktionell können Chemokine in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: homöostatische und proinflammatorische Chemokine. Die erste Gruppe wird konstitutiv produziert und ist an der Leukozytenmigration und der Immunüberwachung beteiligt, während die proinflammatorischen Chemokine vor allem als Reaktion auf entzündliche Reize gebildet werden. Sie leiten die Leukozyten zum Ort der Entzündung. Neben dem chemotaktischen Potential wirkt IL-8 auch aktivierend auf neutrophile Granulozyten (Baggiolini *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1996). Als Folge darauf zeigen diese eine vermehrte Adhärenz an Endothelzellen bzw. der extrazellulären Matrix durch die Hochregulation von CD11a/CD18 (*leukocyte function associated molecule 1*, LFA-1), CD11b/CD18 (Komplementrezeptor 3, CR3; Makrophagenantigen, MAC-1) und CD11c/CD18. Außerdem wird die Degranulation gefördert, wobei Myeloperoxidase, Elastase und β -Glukuronidase freigesetzt werden und die Bildung mikrobizider Sauerstoffmetabolite vermittelt wird (Holländer, 2006).

2.4 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) gehören zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie sind hoch spezialisierte, kurzlebige Phagozyten, deren Hauptaufgabe darin besteht mikrobielle Erreger abzutöten, weshalb sie als primäre Effektorzellen bei akuten Entzündungen im Vordergrund stehen. Neutrophile Granulozyten sind etwa 9-16 μm groß und durch ihren gelappten Zellkern („polymorphkernig“) aus zwei bis fünf verbundenen Segmenten gekennzeichnet. In Abbildung 6 ist eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten vom Schwein dargestellt.

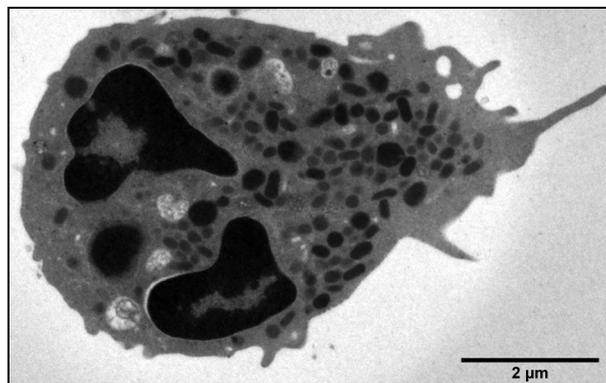


Abb. 6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines porcinen polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten.

Ausgereifte PMN enthalten in ihrem Zytoplasma fünf unterschiedliche Typen von Granula, die im Reifungsstadium der Promyelozyten bzw. Myelozyten gebildet werden. Die Granula enthalten Proteine zur Abtötung und Verdauung von Mikroorganismen. Die primären Granula enthalten Moleküle mit einer ausgeprägten mikrobiziden Wirkung wie Myeloperoxidase, α -Defensine, *Bactericidal permeability inducing protein* (BPI), Lysozym und Serinproteasen. Außerdem sind weitere Bestandteile saure Hydrolasen (β -Glucuronidase, β -Glycerophosphatase, Phospholipase A2, α -Mannosidase). Da die sekundären Granula für Neutrophile typisch sind, werden sie auch spezifische Granula genannt. Sie enthalten u.a. Lysozyme, CD11b/CD18 (CR3), Kollagenase, Gelatinase, Histaminase und Plasminogenaktivator. Einige dieser Moleküle tragen dazu bei, dass die Granulozyten an den Ort der Entzündung gelangen (CD11b/CD18). Die tertiären

Granula sind kleiner und sie enthalten lediglich Gelatinase und einige andere Enzyme. In den kleinen Vesikeln des vierten Granulatyps befindet sich typischerweise Katalase. Der fünfte Granulatyp ist dadurch charakterisiert, dass er alkalische Phosphatase enthält und leicht an die Zellmembran andocken kann (Holländer, 2006).

2.4.1 Bildung der PMN

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten entstehen im Knochenmark aus Vorläuferzellen, die *in vitro* Granulozyten/Makrophagen-Kolonien bilden. Aus diesen myeloetischen Zellen entstehen innerhalb von 14 Tagen über Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten die zunächst unreifen, stabkernigen und später reifen, polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten. Unterschiedliche Zytokine, wie die Kolonie-stimulierenden Faktoren für Granulozyten (G-CSF) und für Granulozyten/Makrophagen (GM-CSF), der *Insulin-like growth factor* (IGF)-I und -II und die Interleukine-3 und -6 sind an ihrer Entwicklung beteiligt. Die reguläre Neubildung von neutrophilen Granulozyten kann bei akuten Infektionen durch G-CSF um das Zehnfache gesteigert werden. Die zelluläre Entwicklung läuft parallel zur Reifung der Granula, wobei im Stadium der Promyelozyten zuerst nur die primären, ab dem dem Stadium der Myelozyten auch die sekundären Granula vorhanden sind (Holländer, 2006).

2.4.2 Funktion der PMN

Reife polymorphkernige neutrophile Granulozyten haben vielfältige Funktionen, die zur Abwehr durch das natürliche Immunsystem beitragen. Dazu zählt die Fähigkeit zur Adhärenz an Gefäßwände, zur gerichteten Migration an Orte der Entzündung (Chemotaxis) und zur gezielten Aktivierung ihrer Effektorfunktionen. Diese Funktionen werden durch Moleküle vermittelt, die auf der Oberfläche von reifen neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Dazu zählen Adhäsionsmoleküle (z.B. CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, L-Selektin), P-Selektin Glykoprotein Ligand (PSGL-1), Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), Rezeptoren für Komplementfragmente, für Chemokine (IL-8-Rezeptoren) und für zellspezifische Aktivatoren (fMLP-Rezeptoren). Viele dieser Moleküle werden bereits im

Ruhezustand an der Oberfläche exprimiert und können bei der zellulären Aktivierung hochreguliert werden. Die Bindung dieser Rezeptoren an ihre entsprechenden Liganden bewirkt innerhalb von Minuten die Fähigkeit zur Chemotaxis, Phagozytose, Sekretion von Granula und die Bildung toxischer Sauerstoffderivate. Im Verlauf einer Entzündung können neutrophile Granulozyten deshalb innerhalb kürzester Zeit auf chemotaktische Reize hin das Blutgefäß verlassen und gerichtet in das Gewebe einwandern, um Immunkomplexe und Pathogene durch Phagozytose zu beseitigen. Als typische Reize zur Zellaktivierung gelten Leukotrien B₄ (LTB₄) und das Komplementspaltprodukt C5a. Beide Moleküle besitzen eine chemotaktische Wirkung und können, wie auch *Platelet-activating factor* (PAF) und Histamin, Neutrophile zur vermehrten Adhäsion und Degranulation stimulieren. Hingegen wird über die Rezeptor-vermittelte Bindung von Interferon- γ , G-CSF und TNF α die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität der PMN aktiviert. Die Stimulation der NADPH-Oxidase und somit die Bereitschaft zur Bildung von Sauerstoffradikalen erfolgt vor allem durch die Bindung von IL-8 und fMLP, die gleichzeitig als Lockstoffe und Aktivatoren der Degranulation wirken. Die NADPH-Oxidase besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die nach der Aktivierung zu einem katalytischen Komplex zusammengefügt werden. Sie ist in der Membran von sekundären Granula und in sekretorischen Vesikeln nachweisbar, so dass auch Sauerstoffradikale bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten abgegeben werden, was zur Schädigung des umliegenden Gewebes führt. Neutrophile Granulozyten können außerdem am Ort der Entzündung einerseits die für die Phagozytose wichtigen Moleküle (z.B. Aktin, IgG- und Komplementrezeptoren) synthetisieren, andererseits auch wichtige Mediatoren für die Entzündungsreaktion (Interferon- α , PAF, LTB₄) bilden und freisetzen. Sie nehmen jedoch auch selbst Einfluss auf die Ereignisse der Entzündungsreaktion, indem sie immunregulatorische Zytokine (IL-1- β , -6, -8, TNF α , IL-1-Rezeptor-Antagonist) sezernieren, die zum Teil eine funktionelle Verbindung zum spezifischen Immunsystem herstellen (Holländer, 2006).

2.4.3 Transmigration polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN)

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) gehören zu den ersten Leukozyten, die zum Ort der Inflammation rekrutiert werden (Chin und Parkos, 2007; Zemans *et al.*, 2009). Daher wird hier der gegenwärtige Stand der Forschung in Bezug auf die transendotheliale wie auch der transepithelialen Transmigration von Granulozyten, die durch Integrine und Adhäsionsmoleküle vermittelt wird, dargestellt.

2.4.3.1 Die Rolle der Integrine und der Adhäsionsmoleküle während der Transmigration von Leukozyten

Aufgrund ihres Potentials zur Zytokinfreisetzung, Sekretion von Sauerstoffradikalen und zur Phagozytose wird den neutrophilen Granulozyten eine wichtige Funktion während der akuten Inflammation zugeschrieben. Im Entzündungsgebiet werden die PMN von epithelialen und endothelialen Adhäsionsmolekülen aktiviert, wobei die sogenannten Integrine der PMN die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Zelltypen vermitteln (Jungi *et al.*, 1999). Integrine sind Transmembranglykoproteine, die auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert werden. Sie bestehen aus α - und β -Ketten. Im Fall der β_2 -Integrine kommen eine gemeinsame β - (CD18) und eine variable α -Kette (CD11a, b, c oder d) vor. Auch die auf den Granulozyten vorhandenen Integrine gehören zur Unterfamilie der β_2 -Integrine (z.B. CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) (Balsam *et al.*, 1993; Colgan *et al.*, 1993; Parkos *et al.* 1996; Janeway und Travers, 1997; Jungi *et al.*, 1999). Diese gehen mit den im Entzündungsgebiet vorhandenen endothelialen E- und P-Selektinen sowie mit den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie wie interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) oder vaskulärem Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) vorübergehende Bindungen ein (Janeway und Travers, 1997). Eine wichtige Rolle der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule*) am Epithel des *Plexus choroideus* konnte bereits bei *in vivo* und *in vitro* Studien zur Autoimmunenzephalitis (EAE) gezeigt werden (Steffen *et al.*, 1996; Engelhardt *et al.*, 2001). In Untersuchungen mit menschlichen Monozytenzelllinien (THP-1) konnte weiterhin eine Hochregulierung von Zytokinen und den Zelladhäsionsmolekülen ICAM-1, CD11a/CD18 und CD11c/CD18 nach *S. suis*-Infektion festgestellt werden (Segura *et al.*, 2002; Al-Numani *et al.*, 2003).

Neben den bereits erwähnten Adhäsionsmolekülen belegen experimentelle Daten die Rolle der desmosomalen Proteine JAM-A und JAM-C (*junctional adhesion molecules* –A und -C) sowie CD47 bei der Interaktion von Leukozyten mit der basolateralen Membran von Epithelien (Liu et al, 2004). Für die Migration von Monozyten durch Alveolarepithel konnte zudem gezeigt werden, dass an dieser neben CD11b/CD18 und CD47 zusätzlich die β_1 -Integrine CD29/CD49d, CD29/CD49e und CD29/CD49f (*very late antigen* 4, 5 und 6; VLA-4, -5, -6), die mit VCAM-1 interagieren, beteiligt sind (Rosseau et al., 2000).

2.4.3.2 Transendotheliale und transepitheliale Migration von PMN

Prinzipiell gibt es einige Unterschiede bei Transmigration von Leukozyten durch Endothelien und Epithelien. Bei ersteren reagieren die Leukozyten zuerst mit der apikalen Zellmembran, bei letzteren mit der basolateralen Zellmembran. Außerdem ist der Weg zwischen den Epithelzellen wesentlich länger (mind. 20 μm) als zwischen den Endothelzellen. Ein weiterer wichtiger Unterschied, wie kürzlich beschrieben, besteht darin, dass die Transmigration von PMN durch Endothelien sowohl para- als auch transzellulär, durch Epithelien lediglich parazellulär stattfindet (Garrido-Urbani et al., 2008; Zemans et al., 2008).

2.4.3.2.1 Transendotheliale Migration von PMN

Neutrophile verlassen den Blutkreislauf durch eine gut charakterisierte Serie von Vorgängen (Abb. 7), die die Adhäsion an und die Transmigration durch das vaskuläre Endothel in den interstitiellen Raum involvieren (Ley et al., 2007; Zemans et al., 2009). Der erste Schritt der neutrophilen Emigration aus dem Blutkreislauf ist die Adhäsion an die vaskulären Endothelzellen, die traditionell in drei Schritte unterteilt wird: Rollen, Aktivierung und feste Adhäsion (Ley et al., 2007; Zarbock und Ley, 2008; Zemans et al., 2009).

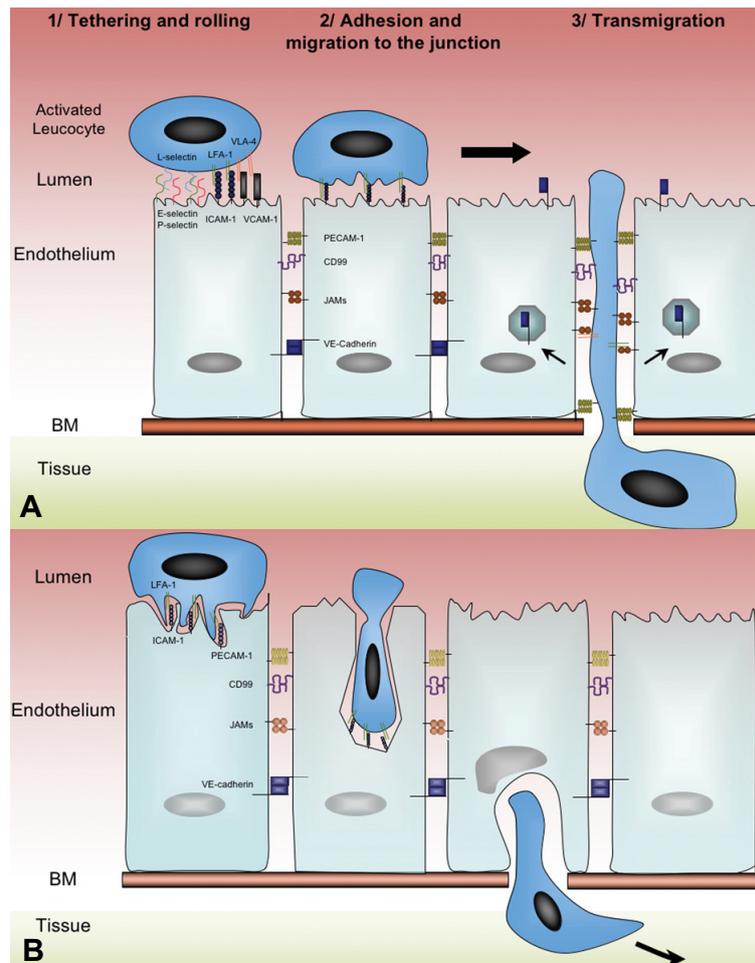


Abb. 7: Transendotheliale Migration von Neutrophilen. Dieser Prozess kann in drei Schritte unterteilt werden: 1. Bindung und Rollen über das Endothel, 2. Adhäsion und Kriechen zu den Zellkontakten, 3. Transmigration (parazellulär, Abb. 6A oder transzellulär, Abb. 6B) (Garrido-Urbani *et al.*, 2008).

Der initiale Schritt der Leukozytenadhäsion ist das sogenannte *Tethering* oder die Bindung und das Rollen über das Endothel, die durch die Interaktionen zwischen L-, E- und P-Selektinen und PSGL-1 und das β_1 -Integrin (CD29/CD49d) vermittelt wird (Abb. 7 A1). L-Selektin wird von Leukozyten exprimiert, P-Selektin von entzündeten Endothelien und Thrombozyten, E-Selektin von entzündeten Endothelien und PSGL-1 von Endothelien und einigen Leukozyten. Bei dem nachfolgenden Rollen interagieren Selektine und PSGL-1 sowie weitere glykosylierte Liganden. Nach dem Rollen erfolgt das langsame Rollen und schließlich die Anheftung der Neutrophilen an die endotheliale Oberfläche, worin β_1 - und β_2 -Integrine und ihre Liganden involviert sind. Die Phase der festen Adhäsion der Leukozyten wird durch die Interaktionen zwischen dem β_2 -Integrin CD11a/CD18 und ICAM-1, CD29/CD49d und VCAM-1 sowie $\alpha_4\beta_7$ und MAdCAM-1 vermittelt, gefolgt vom intravaskulären Kriechen der Leukozyten zu den Zellgrenzen (Abb. 7 A2). In dieser Phase ist die Bindung von

CD11b/CD18 und ICAM-1 involviert. Die Granulozyten transmigrieren dann letztendlich entweder parazellulär (Abb. 7A, 3) oder transzellulär (Abb. 7B) durch das Endothel. Parazelluläre Migration beteiligt PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*), CD99, JAMs und ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecule*), während an der transzellulären Migration ICAM-1, PECAM-1 und Caveoline beteiligt sind (Zemans *et al.*, 2009).

2.4.3.2.2 Transepitheliale Migration von PMN

Über die transepitheliale Migration ist im Gegensatz zur transendothelialen weniger bekannt. Analog zur transendothelialen Migration kann jedoch auch die transepitheliale Migration in drei sequenzielle Stufen eingeteilt werden: Adhäsion, Migration, Vorgänge nach der Migration (Abb. 8) (Zen und Parkos, 2003; Zemans *et al.*, 2009).

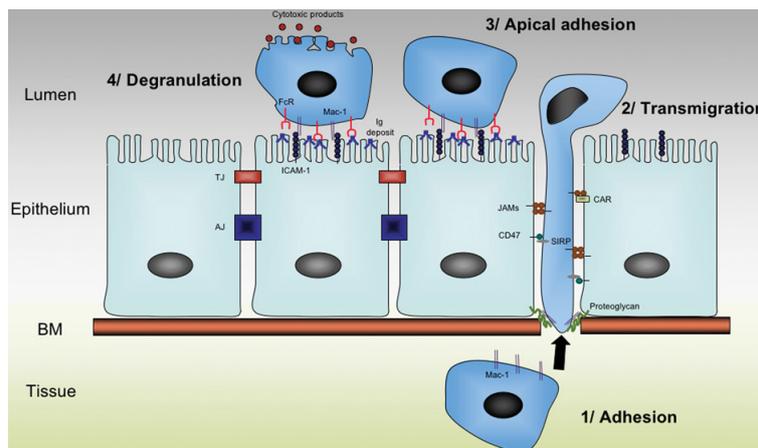


Abb. 8: Transepitheliale Migration von Neutrophilen. Analog zur transendothelialen wird diese Transmigration in drei Abschnitte eingeteilt: 1. basolaterale Adhäsion, 2. parazelluläre Transmigration, 3. apikale Adhäsion (Garrido-Urbani *et al.*, 2008).

Die initiale Stufe der transepithelialen Migration ist im Gegensatz zum Endothel durch die Adhäsion der Neutrophilen an die basolaterale epitheliale Membran charakterisiert (Abb. 8, 1). Die Adhäsion wird durch die Bindung von CD11b/CD18 der Neutrophilen an verschiedene Oberflächenmoleküle der Epithelzellen wie fucosylierte Glycoproteine, JAM-C und wahrscheinlich noch andere bisher nicht bekannte Moleküle vermittelt. Nach der initialen Adhäsion transmigrieren die Neutrophilen parazellulär entlang der epithelialen Zellgrenzen durch sequentielle Bindung an zahlreiche Oberflächenmarker der Epithelzellen (Abb. 8, 2). Im

Gegensatz zum Endothel konnte bisher lediglich die parazelluläre transepitheliale Migrationsroute für Neutrophile beschrieben werden. Das Glykoprotein CD47 wird sowohl auf der Oberfläche von Epithelzellen als auch auf der Oberfläche von Neutrophilen exprimiert und scheint an der transepithelialen Migration beteiligt zu sein. Epitheliales CD47 bindet möglicherweise an neutrophiles SIRP α (*signal regulatory protein α*), wodurch Signale in den Neutrophilen übermittelt werden. Auf Höhe der *Tight Junctions* bindet neutrophiles JAM-L an CAR (Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor). Wenn die Neutrophilen die epitheliale Zellschicht vollständig durchquert haben, adhären sie an der apikalen Epitheloberfläche, wo sie dem Flüssigkeitsstrom und dem mechanischen Druck standhalten und als Abwehrbarriere gegen invadierende Pathogene wirken (Abb. 8, 3). Wichtige Interaktionen an der apikalen Oberfläche sind die Bindung des neutrophilen Fc-Rezeptors an apikale Antigene, die Bindung von CD11b/CD18 an ICAM-1, und wahrscheinlich die Bindung von DAF (*decay accelerating factor*) an CD97 (Zen und Parkos, 2003; Zemans *et al.*, 2009).

2.5 *Streptococcus suis*

2.5.1 *Streptococcus suis* als porciner und humaner Krankheitserreger

Streptococcus suis ist ein wichtiges Pathogen, das zahlreiche Krankheiten in Schweinen hervorrufen kann. Dazu gehören Meningitis, Sepsis, Pneumonie, Endokarditis und Arthritis (Staats *et al.*, 1997). *S. suis* kommt jedoch auch als zoonotischer Krankheitserreger beim Menschen vor. Das natürliche Habitat von *S. suis* sind der obere Respirationstrakt, teilweise auch die Tonsillen und die Nasenhöhle sowie auch der Genital- und Verdauungstrakt von Schweinen (Robertson und Blackmore, 1989; Gottschalk und Segura, 2000). *S. suis* Typ 2 kolonisiert die Tonsillen von erkrankten und scheinbar gesunden Schweinen und wird normalerweise nasal oder oral übertragen (Arends *et al.*, 1984). *S. suis*-Träger sind für andere Schweine infektiös und für die Übertragung dieser Bakterien in Herden verantwortlich (Higgins *et al.*, 1990). Die symptomlosen Überträger stellen daher eine Infektionsquelle für Herden und Menschen da. Ferkel sind am anfälligsten, Infektionen können jedoch in jedem Alter auftreten. Die Anfälligkeit für *S. suis* wird durch suboptimale Aufzuchtbedingungen, wie ungenügende Belüftung mit daraus resultierenden erhöhten Schadgaskonzentrationen, erhöhter Luftfeuchtigkeit, starke Temperaturschwankungen sowie Umgruppierungen und Altersdifferenzen von mehr als zwei Wochen begünstigt (Taylor, 1989; Clifton-Hadley, 1983). Humane Infektionen entstehen vor allem durch den direkten Kontakt über Hautwunden oder Wunden an Schleimhäuten von Mund und Nase mit Überträger- oder erkrankten Schweinen oder rohem Fleisch, das mit *S. suis* kontaminiert ist. Daher kommen humane Infektionen in der Regel nur bei Menschen vor, die beruflich mit Schweinen oder mit Schweinefleisch zu tun haben, wie Schweinezüchter, Schlachthofarbeiter, Arbeiter in der Fleischverarbeitung und Tierärzte. Das Infektionsrisiko dieser Personen ist gegenüber der Normalbevölkerung etwa 1500fach erhöht. Immunsupprimierte Menschen sind einem größeren Risiko ausgesetzt, an einer *S. suis*-Infektion zu erkranken.

Von der ersten *S. suis*-Infektion beim Menschen wurde 1968 in Dänemark berichtet (Arends und Zanen, 1988). Vor allem in Ländern mit ausgeprägter Schweineproduktion ist eine humane Infektion mit *S. suis* zu einer

ernstzunehmenden Zoonose geworden. Immer wieder kommt es vor allem in China zu größeren Ausbrüchen (Abb. 9, Lun *et al.*, 2007).

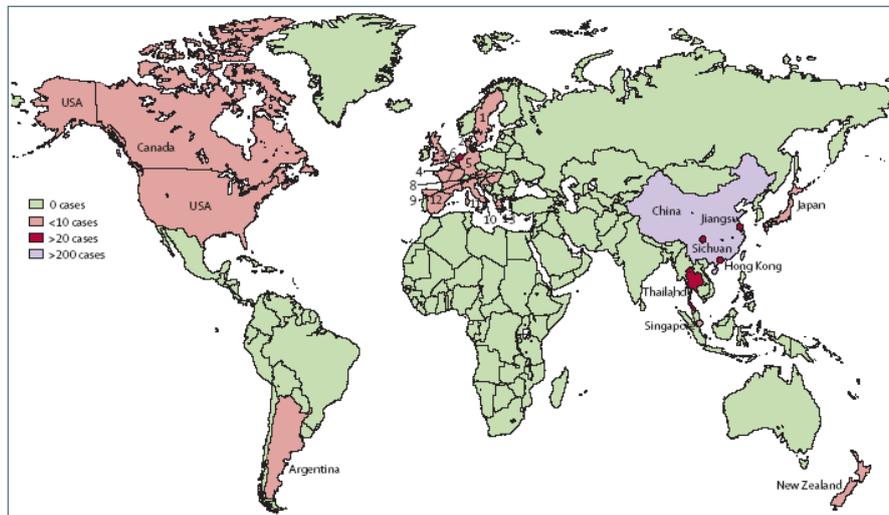


Abb. 9: Länder bzw. Regionen, in denen humane *S. suis*-Infektionen registriert wurden. 1. Schweden, 2. Dänemark, 3. UK, 4. Belgien, 5. Deutschland, 6. Niederlande, 7. Frankreich, 8. Ungarn, 9. Österreich, 10. Kroatien, 11. Italien, 12. Spanien, 13. Griechenland. (Lun *et al.*, 2007)

S. suis-Infektionen beim Menschen äußern sich meist als eitrige Meningitis, wobei auch Berichte über septische Schocks mit multiplem Organversagen, Endokarditis, Pneumonie, Arthritis und Peritonitis bekannt sind. Innerhalb der Patienten unterscheiden sich die klinischen Symptome deutlich voneinander. Während der akuten Phase einer Meningitis umfassen die Symptome hohes Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Übelkeit, Erbrechen und Schwindel. Anschließend können Hörverlust, Ataxie, Koma, Nacken-Rücken-Starre, Blutungen von Haut und inneren Organen, Gelenkschmerzen, periphere Lähmungen und Gesichtslähmung, starke Myalgie, Hautblutungen, Ausschlag und Rhabdomyolyse auftreten. Die häufigste Spätfolge einer eitrigen Meningitis ist Schwerhörigkeit.

2.5.2 Biologische Merkmale von *S. suis*

S. suis ist eines der zahlreichen Bakterien, das für die Entstehung einer Meningitis verantwortlich ist. Bei *S. suis* handelt es sich um ein Gram positives, fakultativ anaerobes kokkoides Bakterium, das einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten vorkommt. *S. suis*-Kolonien sind klein (0,5-1,0 mm im Durchmesser), gräulich oder transparent und leicht schleimig. Aufgrund der unterschiedlichen Hämolyse, die von

den verschiedenen Streptokokken produziert werden, wachsen sie auf bluthaltigen Nährböden mit einer vollständigen Lyse der Erythrozyten (β -Hämolyse), einer unvollständigen Lyse (α -Hämolyse) oder anhämolysierend (γ -Hämolyse). Die meisten *S. suis*-Stämme bilden begrenzte α -Hämolyse-Zonen auf Schafblut-Agarplatten (Abb. 10). Kolonien des Serotyps 2 wachsen unter α -Hämolyse auf Schafblut-Agarplatten und unter β -Hämolyse auf Pferdeblut-Agarplatten.

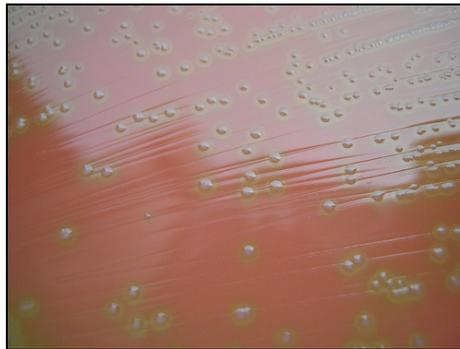


Abb. 10: *S. suis* auf Schafblutagar. (http://www.flickr.com/photos/william_asanome/2472644594/)

S. suis-Stämme werden nach ihren Kapselpolysaccharidantigenen in Serotypen eingeteilt. Gegenwärtig sind 35 verschiedene Serotypen bekannt, wobei die Serotypen 32 und 34 mittlerweile zu *Streptococcus orisratti* gezählt werden. Bei infizierten Schweinen und Menschen kommt am häufigsten Serotyp 2 vor (Lun *et al.*, 2007).

S. suis Typ 2 kontaminiert häufig Fäkalien, Staub und Wasser, denn dieser Organismus ist gegenüber zahlreichen Umweltbedingungen resistent. Trotz allem kann *S. suis* Typ 2 leicht mit Desinfektions- oder Reinigungsmitteln, die üblicherweise in landwirtschaftlichen Betrieben und Laboratorien verwendet werden, inaktiviert werden. Dabei reichen Konzentrationen unterhalb der vom Hersteller angegebenen zum Abtöten der Keime aus (Clifton-Hadley and Enright, 1984).

S. suis reagiert sensitiv auf Antibiotika wie Penicillin, Ceftriaxon, Cephalosporin, Ampicillin und Amoxicilin. Zur Behandlung oder Kontrolle von *S. suis*-Infektionen wird im Allgemeinen Penicillin G genutzt. Es wurden jedoch auch schon Penicillin-resistente *S. suis*-Stämme isoliert (Gottschalk *et al.*, 1991; Prieto *et al.*, 1994) und Stämme beschrieben, die hoch resistent gegenüber anderen geläufigen Antibiotika sind (Aarestrup *et al.*, 1998).

Das Genom von *S. suis* ist vollständig sequenziert und enthält 20.075 kb mit einem G+C-Gehalt von 41,3%. Obwohl die Funktion von noch etwa 20-30% der Gene

unbekannt ist, wurden schon viele Gene, die in der Pathogenese einer *S. suis*-Infektion eine Rolle spielen, untersucht. Untersucht wurden unter anderem Gene, die für die Polysaccharidproduktion, Kapseltransport, Eisenchelatsysteme, Suilysin, Virulenz-assoziierte Proteine, das Arginin-Deiminase-System und IgG-bindende Proteine kodieren.

2.5.3 Virulenzfaktoren von *S. suis*

Über die Virulenzfaktoren von *S. suis* ist bisher relativ wenig bekannt, so dass Untersuchungen der möglichen Pathogenitätsfaktoren erst beginnen, die Mechanismen der *S. suis*-Pathogenese aufzuklären. Die Virulenz von *S. suis* variiert zwischen den Serotypen und zwischen unterschiedlichen Stämmen desselben Serotyps. Die meisten Studien wurden bisher an Serotyp 2 vorgenommen. Zu den beschriebenen Virulenzfaktoren zählen das Kapselpolysaccharid (KPS), die Virulenz-assoziierten Proteine wie das *Muramidase-released* Protein (MRP) und der Extrazelluläre Proteinfaktor (EF), das Hämolyisin (Suilysin) und Adhäsine.

2.5.3.1 Kapselpolysaccharid (KPS)

Das Kapselpolysaccharid (KPS) von *S. suis* Serotyp 2 besteht aus den fünf folgenden Zuckern: Glukose, Galaktose, N-Acetylglucosamin, Rhamnose und Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) (Elliot und Tai, 1978). Die Zucker kommen in einem Verhältnis von 1:3:1:1:1 vor. Die genaue Struktur ist bisher noch nicht geklärt. Die Kapsel ist bisher der einzige erwiesene Virulenzfaktor, was Untersuchungen zu entnehmen ist, in denen nicht bekapselte isogene Mutanten verwendet wurden, die durch Insertionsmutagenese hergestellt wurden. Die fehlende Kapsel korrelierte mit einer erhöhten Hydrophobizität und Phagozytose durch murine und porcine Phagozyten (Chabot-Roy *et al.*, 2006). Außerdem waren unbekapselte Mutanten in Mäusen und in zwei verschiedenen Infektionsmodellen im Schwein avirulent (Smith *et al.*, 1999; Domínguez-Punaro *et al.*, 2007). Trotz der Tatsache, dass die Kapsel einer der Hauptvirulenzfaktor zu sein scheint, sind die meisten avirulenten Stämme bekapselt. Das deutet darauf hin, dass weitere Virulenzfaktoren essentiell sein müssen. Hinzu kommt, dass virulente und avirulente Stämme ähnlich große Kapseln mit einer ähnlichen Sialinsäurekonzentration aufweisen, so dass dies nicht der

kritische Faktor sein kann. Das Vorhandensein einer Kapsel allein schützt nicht vor der Eliminierung aus dem Blutstrom, denn es konnte gezeigt werden, dass ein bekapselter avirulenter Stamm innerhalb von 48 h aus dem Kreislauf eliminiert wurde, wohingegen ein bekapselter virulenter Stamm in einer relativ hohen Konzentration im Blut länger als fünf Tage überleben konnte (Gottschalk und Segura, 2000). Antikörper gegen das Kapselmaterial schützen nur teilweise vor Infektionen (Charland *et al.*, 1997) und genesene und damit geschützte Tiere produzieren nur geringe Mengen dieser Antikörper (Gottschalk und Segura, 2000).

3. Motivation

Die von den Epithelzellen des *Plexus choroideus* ausgebildete Blut-Liquor-Schranke verhindert zusammen mit der Blut-Hirn-Schranke und der Arachnoidea den uneingeschränkten Transport von Substanzen vom Blut in das ZNS. Strukturelle Basis der Blut-Liquor- und Blut-Hirn-Schranke sind die *Tight Junctions*.

Es gibt zahlreiche Erkrankungen, bei denen die Integrität der Barrieren durch Bakterien beeinträchtigt wird, was zur Freisetzung proinflammatorischer Faktoren und toxischer Produkte führt, wodurch Leukozyten rekrutiert werden. Dies führt letztendlich zu dem Ausbruch einer Meningitis. Die extreme Immunantwort des Wirts ist der Grund für schwere Schäden am ZNS nach einer bakteriellen Meningitis.

Auf der Grundlage eines zuvor entwickelten Zellkultursystems primärer porciner *Plexus choroideus* Epithelzellen (PCPEC) auf Transwell Filtern als Umkehrkulturen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit der Blut-Liquor-Schranke während einer bakteriellen Infektion mit *S. suis* und unter proinflammatorischen Bedingungen ($\text{TNF}\alpha$ -Stimulation) *in vitro* untersucht werden. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass *S. suis* PCPEC spezifisch von der basolateralen Seite in Abhängigkeit der Expression einer Kapsel invadiert (Tenenbaum *et al.*, 2009). Außerdem konnte dargestellt werden, dass die apikale Infektion der PCPEC mit *S. suis* die Funktion und Morphologie der *Tight Junctions* sowie die Expression der *Tight Junction*-Proteine signifikant verändern (Tenenbaum *et al.*, 2005, Tenenbaum *et al.*, 2008).

Parallel zur Transmigration der Leukozyten sollten die Barrierefunktion und die *Tight Junction*-Morphologie nach der Neutrophilen-Transmigration von der physiologisch relevanten basolateralen zur apikalen Seite durch bakteriell und $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte PCPEC analysiert werden. Weiteres Ziel dieser Arbeit war es außerdem, zahlreiche Integrine und Adhäsionsmoleküle zu identifizieren, die an der Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch das kultivierte Epithel des *Plexus choroideus* beteiligt bzw. unter den zu untersuchenden Bedingungen reguliert sind. Letztendlich sollte analysiert werden, auf welchem Weg – parazellulär und/oder transzellulär - die Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch das *in vitro*-Modell der Blut-Liquor-Schranke stattfindet.

4. Material

4.1 Bakterienstämme

S. suis Serotyp 2 Stamm 10

Stamm 10 Δ cps

Smith *et al.*, 1999

Die Bakterienstämme wurden von H. Smith (DLO-Institute for Animal Science and Health, Lelystad, The Netherlands) zur Verfügung gestellt.

4.2 Zellen

PCPEC *Primary porcine choroid plexus epithelial cells*

Die primären Zellen wurden 1-3 Mal wöchentlich aus frisch isolierten *Plexus choroidei* aus soeben geschlachteten Schweinen (Schlachthof Duisburg, Kurt Heinrich Kemink GmbH & Co. KG, Kemink Fleisch) nach einem ursprünglichen Protokoll von Gath *et al.* präpariert (Gath *et al.*, 1997).

PMN Polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten:
wurden für jeden Versuch aus Schweineblut frisch geschlachteter Schweine isoliert.

4.3 Medien

4.3.1 Kulturmedium für *S. suis*

Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Frankreich (2 g/400 ml THB)
THB	Todd-Hewitt-Broth Oxoid, Wesel

4.3.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

BSA 35%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytosinarabinosid (ARAcell)	Cell Pharm GmbH, Hannover
DMEM/F12 mit Phenolrot	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM/F12 ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG seromed, Berlin
HBSS (1x) + Ca/Mg	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
HBSS (1x) ohne Ca/Mg	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
HEPES, 1M	BioWhittaker, Apen
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Laminin	R&D Systems, USA
L-Glutamin, 200mM, 100x	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Apotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf
Penicillin/Streptomycin, 50x	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Percoll	Biochrom KG, Berlin
Polymorphprep	Axis-Shield, Norwegen
Prolong Antifade Gold	Invitrogen, Paisley, UK
Trypsin	Belger Biochemie, Kleinmachnow

4.3.3 Zellkulturmedien und -lösungen

Schlachthof

HBSS + Ca²⁺/Mg²⁺ +
HEPES/AB

500 ml HBSS + Ca²⁺/Mg²⁺
20 mM HEPES (10 ml)
Penicillin/Streptomycin, 100 U / 100 µg/ml (12 ml)

SFM/AB + Phenolrot

DMEM/F12 (500 ml)
L-Glutamin, 4mM (12 ml)
Penicillin/Streptomycin, 100 U / 100 µg/ml (12 ml)
Insulin, 5 mg/ml (250 µl)

Präparation

HBSS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ +
HEPES/AB

500 ml HBSS ohne Ca²⁺/Mg²⁺
20 mM HEPES (10 ml)
Penicillin/Streptomycin, 100 U / 100 µg/ml (12 ml)

Verdau

Trypsinlösung

0,2% w/v
100 mg Trypsinpulver / 50 ml HBSS ohne Ca/Mg + AB

Kultivierung

Selektionsmedium

DMEM/F12 (500 ml)
L-Glutamin, 4mM (12 ml)
Penicillin/Streptomycin, 100 U / 100 µg/ml (12 ml)
Insulin, 5 mg/ml (250 µl)
ARAccl, 20 µM (125 µl)
FCS, 10%, hitzeinaktiviert (60 ml)

SHM ohne Phenolrot
(für Versuche)

DMEM/F12 (500 ml)
L-Glutamin, 4mM (12 ml)
Insulin, 5 mg/ml (250 µl)
FCS, 10%, hitzeinaktiviert (60 ml)

4.4 Zytokine

TNF α	Rekombinanter porciner Tumornekrosefaktor α R&D Systems, USA
IL-8	Rekombinantes porcines Interleukin-8 R&D Systems, USA

4.5 Antikörper

4.5.1 Primärantikörper

Die meisten der Antikörper, die in den Inhibitionsexperimenten und durchflusszytometrischen Analysen verwendet wurden, wurden im „*Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens*“ beschrieben (Haverson *et al.*, 2001 a und b). Die Kreuzreaktion des humanen Antikörpers gegen CD47 mit dem porcinen Epitop wurde von Shahein *et al.* nachgewiesen (Shahein *et al.*, 2002).

Antikörper	Klon	Spezies	Konzentration	Firma
IgG ₁ , κ Isotyp	MOPC-31C	Maus	20 μ g/ml (Inhibition) 1:10, 10 μ l/Test (FACS)	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany)
IgG _{2b} , κ Isotyp	MPC-11	Maus	20 μ g/ml (Inhibition) 1:10, 10 μ l/Test (FACS)	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany)
CD11a, IgG _{2b}	BL2F1	Maus	20 μ g/ml (Inhibition) 1:10, 10 μ l/Test (FACS)	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany)
CD11R3, IgG ₁ = CD11b	2F4/11	Maus	20 μ g/ml (Inhibition) 1:10, 10 μ l/Test (FACS)	Serotec (Oxford, UK)
CD18, IgG ₁	PNK-I	Maus	20 μ g/ml (Inhibition) 1:10, 10 μ l/Test (FACS)	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany) oder Serotec (Oxford, UK)

CD47, IgG _{2b}	BRIC126	Maus	20 µg/ml (Inhibition) 1:10, 10µl/Test (FACS)	Serotec (Oxford, UK)
CD49d, IgG ₁	HP2/1	Maus	20 µg/ml (Inhibition) 1:10, 10µl/Test (FACS)	Serotec (Oxford, UK)
CD49e, IgG ₁	VC5	Maus	20 µg/ml (Inhibition) 1:10, 10µl/Test (FACS)	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany)
SWC3a-FITC	74-22-15	Maus	1:10 (IF) 10 µl/Test	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)
Occludin		Kaninchen	1:250 (IF) 1µg/ml	Zymed Laboratories (South San Francisco, CA, USA)
ZO-1		Kaninchen	1:250 (IF) 1µg/ml	Zymed Laboratories (South San Francisco, CA, USA)
Ziege-anti- <i>S. suis</i>		Ziege	1:100 (IF)	
Kaninchen- anti- <i>S. suis</i>		Kaninchen	1:100 (IF)	

4.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Alexa fluor [®] 488 Esel-anti-Ziege	1:500 (IF)	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa fluor [®] 488 Huhn-anti-Kaninchen	1:500 (IF)	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa fluor [®] 594 Esel-anti-Ziege	1:500 (IF)	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa fluor [®] 594 Ziege-anti-Huhn	1:1000 (IF)	Molecular Probes, Karlsruhe
Ziege anti Maus-PE	1:10, 10µl/Test (FACS)	Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)

4.6 Fluoreszenzfarbstoffe

BCECF AM	Invitrogen, Paisley, UK
DAPI	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Phalloidin Alexa fluor [®] 660	Invitrogen, Paisley, UK
Texas Red-Dextran	Invitrogen, Paisley, UK

4.7 Oligonukleotide für die quantitative *Real Time-PCR*

Die hier verwendeten *Primer* wurden von Zeni *et al* beschrieben (Zeni *et al.*, 2007) und von der Firma Biomers, Ulm, hergestellt.

Gen	<i>Primer</i>	Sequenz (5' → 3')
ICAM-1	<i>forward</i>	CACAGGCCGCCACTAACA
ICAM-1	<i>reverse</i>	GGTTCCATTGATCCAGGTCTT
VCAM-1	<i>forward</i>	GCACGAGCTTCCTGAGCACTT
VCAM-1	<i>reverse</i>	CTGTGTGACGAGGAAACAATG
β-Aktin	<i>forward</i>	TCCAGAGGCGCTCTTCCA
β-Aktin	<i>reverse</i>	CGCACTTCATGATCGAGTTGA

4.8 Größenstandards

MassRuler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
---------------------------------	-------------------------

4.9 Kits

2x QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix	Qiagen, Hilden
LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells	Molecular Probes, Karlsruhe
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-freie DNase I	Roche, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Paisley, UK

4.10 Chemikalien

Agarose High Resolution	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Apotheke, Universtitätsklinikum Düsseldorf
Aqua dest.	Apotheke, Universtitätsklinikum Düsseldorf
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (100%)	Apotheke, Universtitätsklinikum Düsseldorf
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd 4%	Apotheke, Universtitätsklinikum Düsseldorf
Glutaraldehyd, 25% EM-Grade	Polyscience, Warrington, PA, USA
Methanol	Apotheke, Universtitätsklinikum Düsseldorf
Osmiumtetroxid	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
PBS	Apotheke, Universtitätsklinikum Düsseldorf
Tris Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.11 Puffer und Lösungen

TAE 50x	2 M Tris Base 5,71% Eisessig (v/v) 50 mM EDTA
Ficoll-Ladepuffer 5x	25% Ficoll 25 mM EDTA 0,1% Bromphenolblau

4.12 Geräte

CO ₂ -Brutschrank Hera cell 240	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Epithelgewebe-Voltohmmeter (EVOM)	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
FACSscan	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mikroplatten-Reader: Infinite 200M	Tecan Trading AG, Schweiz
Mikroskop AxioObserver Z1 + Kamera + ApoTome®	Zeiss, Göttingen
NanoDrop	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
Photometer UV-Mini-1240 230V CE/LV	Shimadzu, Duisburg
Marking	
Sicherheitswerkbank KSP 12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
STX-2 Elektrode	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Transmissionselektronenmikroskop: Tecnai G2 Spirit Twin	Fei company, Eindhoven, Niederlande
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Zellzähler	möLab, Langenfeld
Zentrifugen:	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Rotixa 120 RS	
- Rotanta 460 RS	
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt

4.13 Verbrauchsmaterialien

12 Well-Platten, Tissue Culture Treated	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
24 Well-Platten, Tissue Culture Treated	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
24 Well-Platten, Non Tissue Culture Treated	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
96 Well-Platten, schwarz Nunclon™ Surface	Nunc™, Dänemark
96 Well-Platten, transparent Nunc™ MaxiSorp	Nunc™, Dänemark
Cell Culture Insert 3 µm Porengröße HD, PET, 24 Well-Format	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Cell Stammer 100 µm Nylon	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Instrumentenschalen mit Deckel aus Edelstahl 28x16x6 cm	Welabo, Düsseldorf
Sterilfilter Porengröße 0,2 µm	Welabo, Düsseldorf
Zentrifugenröhrchen, 8 ml	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg

5. Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Einfrieren und Erstellen von Arbeitsaliquots von *S. suis*

Die Keime wurden, ausgehend von einer Kryokultur, auf Blutagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden mit einer bis drei Kolonien 10 ml Todd-Hewitt Broth (THB) angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C im leicht schüttelnden Wasserbad bis zur mid-log- bis log-Phase kultiviert, was an einer deutlichen Trübung zu erkennen war. Zum Einfrieren wurden 10–15% Glycerin zugegeben und Aliquots à 100 µl erstellt. Diese wurden bei – 80°C eingefroren.

Es war zu beachten, dass es bei einer zu hohen Keimdichte zu einer Autolyse der Bakterien kam, daher musste auf die Trübung der Bakterienkultur geachtet werden.

5.1.2 Kultivierung von *S. suis*

Für eine Infektion der PCPEC wurde *S. suis* in THB-Flüssigmedium kultiviert. Dazu wurden 50 µl eines Arbeitsaliquots in 10 ml THB gegeben und für 4-6 h bei 37°C im leicht schwenkenden Wasserbad kultiviert. Nach Erreichen der mid-log- bis log-Phase konnten die Bakterien für Versuche eingesetzt werden. Die Bakterienkulturen wurden für 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut für 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Da die Bakterien in Ketten wachsen, wurden sie zunächst 20 sec gevortext, da dadurch gewährleistet wurde, dass sie als einzelne Kokken vorkommen. Die Bakterienkonzentration wurde photometrisch bei einer Extinktion von 600 nm bestimmt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,65 entsprach die Bakterienzahl 1×10^8 Bakterien/ml.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Präparation der primären Epithelzellen aus dem porcinen *Plexus choroideus* (PCPEC)

Epithelzellen vom porcinen *Plexus choroideus* (PCPEC) wurden nach einer modifizierten Methode, ursprünglich beschrieben von Gath *et al.*, präpariert (Gath *et al.*, 1997). Die *Plexus choroideus*-Stränge wurden frisch geschlachteten Schweinen im Schlachthof Duisburg (Kurt Heinrich Kemink GmbH & Co. KG, Kemink Fleisch) entnommen. Sie wurden mit einer sterilen Pinzette aus den halbierten Hirnhälften herausgezogen und sofort in ein steriles Gefäß mit HBSS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + Penicillin/Streptomycin + HEPES (4.3.3) überführt. Für die spätere Zellpräparation konnten bis zu 80 *Plexus choroideus*-Stränge gesammelt werden. Vor dem Transport in das Labor wurden die Stränge mit einer neuen sterilen Pinzette in ein Gefäß mit Medium (4.3.3) überführt.

Im Labor wurden die *Plexus choroideus*-Stränge in eine Petrischale mit HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + Penicillin/Streptomycin (4.3.3) gegeben. Zum Ausbluten wurden die Plexus-Stränge an dem dünneren Ende mit einer Pinzette gegriffen und mit einer Präparierschere an dem dickeren Ende, erkennbar auch an den großen Blutgefäßen, um etwa 0,5 cm gekürzt. Anschließend wurde jeder Strang solange vorsichtig über die Kante einer neuen gefüllten Petrischale gezogen, bis kein Blut mehr aus den Gefäßen lief. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Im weiteren Verlauf wurden die Epithelzellen aus den Plexussträngen durch einen enzymatischen Verdau gelöst. Dazu wurde eine 0,2%-ige Trypsinlösung in HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + Penicillin/Streptomycin (4.3.3) hergestellt. Es wurden 20 ml Verdauungslösung pro 10 Plexusstränge (= 1 g Nassgewicht) benötigt. Der Verdau begann mit einer Inkubation der Plexusstränge für 45 min bei 4°C, damit die Enzymlösung gleichmäßig das Gewebe durchdringen konnte. Es folgte der Warmverdau bei 37°C in einem leicht schwenkenden Wasserbad für 17-20 min. Vor dem Digestionsstopp mit FCS wurde das Gefäß mit den Plexussträngen geschwenkt, so dass sich die Epithelzellen aus dem darunter liegenden Stroma lösten. Nach Zugabe des FCS im gleichen Volumen wie die Verdauungslösung wurden die jetzt deutlich ausgedünnten Plexusstränge mit einer Pinzette gegriffen und erneut gewaschen, um noch anhaftende Epithelzellen zu entfernen. Die Zellsuspension

wurde in Zentrifugenröhrchen (50 ml) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur bei 20 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 20 ml pro 10 Plexusstränge mit Cytosinarabinosid-haltigem Selektionsmedium (4.3.3) resuspendiert, so dass die Zellen in Verbänden von 10 bis 20 Zellen vorlagen. Zur vitalen Aussaat war es essentiell, dass die Zellen in Clustern vorkamen.

5.2.2 Kultivierung der PCPEC als Umkehrkulturen

Die Epithelzellkultur ist nach der Präparation durch andere Zelltypen wie Erythrozyten und Fibroblasten kontaminiert, da durch den enzymatischen Verdau nicht spezifisch die Epithelzellen gewonnen werden. Daher wurden sie in einem Selektionsmedium (4.3.3), das mit Cytosinarabinosid (Ara-C) supplementiert war, kultiviert. Bei Cytosinarabinosid, ein Nukleosid mit Arabinose als Zuckerkomponente, handelt es sich um einen Inhibitor der DNA-Synthese und wird daher auch als Chemotherapeutikum eingesetzt. Es ist kein Substrat der Nukleosid-Transportsysteme in den Epithelzellen des *Plexus choroideus* und wird somit nicht von ihnen aufgenommen (Spector, 1982). Andere Zellen wie Fibroblasten oder Erythrozyten, die beim Trypsinverdau zusammen mit den Epithelzellen gewonnen werden, unterscheiden nicht zwischen Nukleosiden mit Ribose oder Arabinose als Zuckerrest. Die Aufnahme von Ara-C verhindert die Zellproliferation der unerwünschten Zellen und garantiert daher Reinkulturen der Epithelzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PCPEC als Umkehrkulturen auf Transwell Filtern eingesetzt. Dieses neuartige Zellkulturmodell wurde in der letzten Studie unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht (Tenenbaum *et al.*, 2009). Das Besondere an diesem Modell ist, dass die Epithelzellen auf der Unterseite der Transwell Filtermembran wachsen und somit die bakterielle Infektion sowie die Applikation neutrophiler Granulozyten von der physiologisch relevanten Seite erlauben. Eine schematische Darstellung des *in vitro*-Zellkulturmodells der PCPEC ist in Abbildung 11 gezeigt.

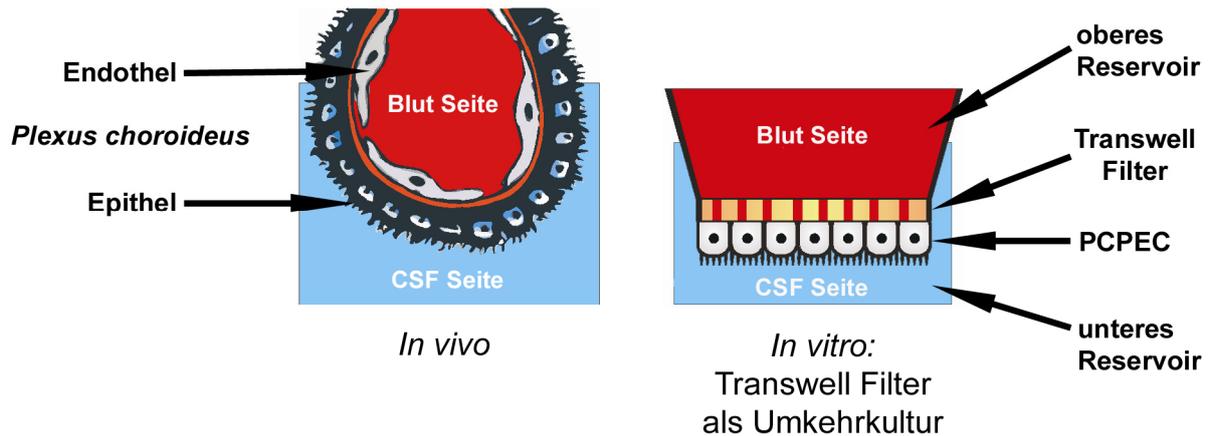


Abb. 11. *In vivo*-Situation des *Plexus choroideus* vs. *in vitro*-Zellkulturmodell der Blut-Liquor-Schranke. Die PCPEC wachsen auf der Unterseite der Transwell Filtermembran, so dass die Behandlung von der physiologisch relevanten basolateralen Seite möglich ist. CSF: Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor.

Zur Kultivierung der Epithelzellen des *Plexus choroideus* als Umkehrkultur wurden Transwell-Filter (3 μm Porendurchmesser) im 24 Well-Format über Kopf in die Wells einer 12 Well-Platte gestellt. Die 12 Well-Platte wurde ohne den dazu gehörigen Deckel in eine sterile Edelstahlbox gestellt. Die Unterseite der Filter, die nun nach oben zeigte, wurde mit 35 μl einer wässrigen Lamininlösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet. Die gesamte Membran musste mit dem Laminin benetzt sein. Dazu wurde der Tropfen mit einer 5 ml Stangenpipette auf der Membran verteilt. Das Laminin trocknete bei RT, bevor die Zellsuspension auf die Filtermembran gegeben werden konnte. Direkt vor der Aussaat der Zellen wurden die 12 Wells mit vorgewärmten Selektionsmedium befüllt (etwa 6,5 bis 7 ml), so dass jeder Filter von unten mit Medium benetzt war. Da das Well nun überfüllt war, wurden etwa 1,5 ml Medium wieder entfernt. Die Membran wurde auch von oben mit Medium benetzt. Die Zellsuspension wurde wie oben beschrieben vorbereitet und 100 μl davon auf die Filter pipettiert. Nach 48 h wurden die Filter gedreht und in 24 Well-Platten weiter kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte nach jeweils zwei Tagen. Die Fremdzellen waren nach fünf bis sieben Tagen nicht mehr vorhanden. Nach erreichter Konfluenz, d.h. nach etwa acht Tagen, wurden die Kulturen auf Medium ohne AraC und Penicillin/Streptomycin umgestellt. Dazu wurden sie zwei- bis dreimal mit Zellkulturmedium ohne Antibiotika und Ara-C gewaschen und darin weiter kultiviert. Das Medium wurde weiterhin nach zwei Tagen ausgetauscht. Vom 3. bis zum 5. Tag nach Umstellen auf Ara-C/Penicillin/Streptomycin-freies Medium konnten die Zellen für Versuche eingesetzt werden. Transmissionselektronenmikroskopische

Aufnahmen der PCPEC als Umkehrkulturen sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Vergrößerung zeigt die Ausbildung fester Zell-Zell-Kontakte (Abb. 12B).

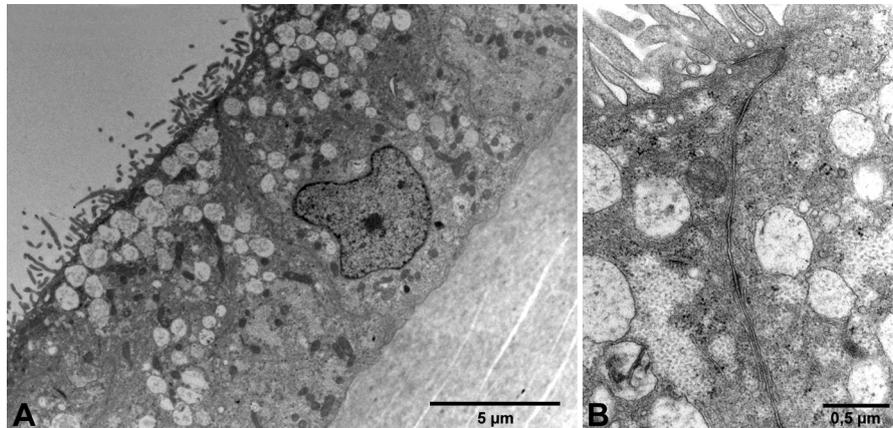


Abb. 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines intakten PCPEC-Monolayers als Umkehrkultur auf Transwell-Filtern. B. Vergrößerung von A, Ausbildung dichter Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen.

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der Kulturen lag für die Verwendung in Versuchen bei mindestens $1500 \Omega \times \text{cm}^2$ und die parazelluläre Permeabilität innerhalb von vier Stunden bei unter 1 % Dextranfluss (MW 3000). Somit war eine gute Barrierefunktion des Epithelzellmonolayers gegeben.

5.2.3 Stimulierung der PCPEC-Umkehrkulturen

Zur Vorbereitung auf die Transmigrationsversuche wurden die PCPEC-Umkehrkulturen mit *S. suis* Stamm 10, *S. suis* Stamm 10 Δcps und $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Die Bakterien wurden in einer MOI (*multiple of infection*) von 10 in das obere Kompartiment und somit auf die basolaterale Seite der PCPEC gegeben und für 2 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Um zytotoxische Effekte zu vermeiden, wurde danach Penicillin/Streptomycin (100 U+100 µg/ml) zugegeben und für weitere 22 h im Brutschrank inkubiert, bevor die Zellen für die Transmigrationsversuche verwendet wurden. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ erfolgte von der basolateralen und apikalen Seite in einer Konzentration von 10 ng/ml für 24 h. Wurden die Kulturen parallel zu den Bakterien-infizierten Kulturen eingesetzt, wurden nach 2 h Stimulation ebenfalls Antibiotika zugesetzt.

5.2.4 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Die Epithelzellen des *Plexus choroideus* bilden eine feste Barriere. Auch kultiviert auf Transwell-Filtern, auf denen sie in dichten Monolayern wachsen, zeigen sie diese Eigenschaft. Sie polarisieren und bilden *Tight Junctions* zu benachbarten Zellen aus. Diese Dichtigkeit kann zum einen anhand der Messung des parazellulären Flusses (5.2.5) zum anderen mit Hilfe der Messung des TEER bestimmt werden. Der TEER wurde mit einem Epithelgewebe Voltohmmeter (EVOM[®], World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) und einer STX-2 Elektrode gemessen. Vor der Messung wurde die Zellkulturplatte mit den Transwell-Filtern zum Abkühlen auf RT aus dem Brutschrank genommen, da erst bei RT der TEER konstant ist.

5.2.5 Bestimmung der parazellulären Permeabilität der PCPEC-Monolayer

Zur Bestimmung der Permeabilität der PCPEC-Monolayer wurde der Fluss von Texas Red-Dextran (MW 3000) von der apikalen zur basolateralen Seite bestimmt. Dazu wurde Texas Red-Dextran in einer Konzentration von 100 µg/ml auf die apikale Seite des Monolayers pipettiert und das Medium aus dem unteren Kompartiment nach der Versuchsdauer von 4 h gesammelt und am Tecan Infinite M200 Multiwell Reader gemessen. Anhand einer Standardreihe wurde der prozentuale Durchfluss des Dextrans von der apikal zugegebenen Menge bestimmt.

5.2.6 Isolierung porciner polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN)

Für die Transmigrationsversuche durch die primären *Plexus choroideus* Epithelzellen als Umkehrkulturen wurden neutrophile Granulozyten aus Schweineblut isoliert. Das Schweineblut stammte von Schweinen, die auf dem Duisburger Schlachthof geschlachtet wurden. Das Blut wurde in 50 ml-Röhrchen mit Natrium-Heparin (2500 U) aufgefangen und zum Labor transportiert. 5 ml Blut wurden vorsichtig über eine Mischung aus Percoll und NaCl (5 ml + 3 ml) in 15 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und 30 min bei 20 g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Vakuumpumpe entfernt und das Erythrozyten-haltige Pellet, in dem auch die gewünschten neutrophilen Granulozyten enthalten waren, mit

NH₄Cl auf Eis lysiert, bis die Suspension klar wurde. Nach Zentrifugation (10 min, 300 g, 4°C) wurden die lysierten Erythrozyten dekantiert und das Granulozyten-Pellet mit PBS gewaschen (5 min, 300 g, 4°C). Die Granulozyten wurden in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl am möLab-Zellzähler bestimmt. Für die Färbung der Granulozyten wurde die Zellsuspension auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt.

5.2.7 Färbung der PMN mit BCECF AM

Für die Färbung der neutrophilen Granulozyten mit BCECF AM wurde die Zellsuspension nach Angaben des Herstellerprotokolls mit einer Zellzahl von 1x10⁶ Zellen/ml verwendet. Das BCECF AM wurde 1 µM eingesetzt, d.h., dass 6,25 µl der Stocklösung auf 10 ml Zellsuspension gegeben wurden. Die Inkubation erfolgte für 15-30 min bei 37°C im leicht schwenkenden Wasserbad. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs zweimal mit dem verwendeten Kulturmedium gewaschen (10 min, 300g, 4°C). Die Zellzahl wurde am möLab-Zellzähler bestimmt. Für die Transmigrationsversuche wurde die Granulozytensuspension auf eine Zellzahl von 1x10⁷ Zellen/ml eingestellt.

5.2.8 Transmigration der PMN durch PCPEC-Umkehrkultur

Die gefärbten Granulozyten wurden im Verhältnis von 10:1 auf die Epithelzellen in das obere Kompartiment des Transwell-Filters gegeben, so dass die Transmigration der Granulozyten in der physiologisch relevanten basolateralen-zur-apikalen Richtung erfolgte. Die Granulozyten wurden je nach Versuchsbedingung mit rekombinanten porcinen IL-8 in einer Konzentration von 10 ng/ml im unteren Kompartiment eingesetzt. Das IL-8 wurde etwa 30 min vor Zugabe der Granulozyten in das untere Kompartiment des Transwell-Systems pipettiert. Die Transmigration der Granulozyten wurde nach vier Stunden am Tecan Infinite M200 Multiwell Reader gemessen. Dazu wurden nach Ablauf der Versuchszeit die Transwell-Filter aus den Wells entfernt und die Zellkulturplatte für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert, damit alle Granulozyten am Boden des Wells hafteten. Die Überstände wurden vorsichtig

abgenommen und für die Bestimmung des Dextran-Flusses gesammelt. Die Wells wurden mit je 0,5 ml HBSS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Granulozyten mit 250 μl 1% Triton X-100 in PBS lysiert. 200 μl der lysierten Zellen wurden in eine schwarze 96 Well-Platte pipettiert und die Fluoreszenz am Tecan Infinite M200 Multiwell Reader gemessen. Anhand einer Standardreihe konnte der prozentuale Anteil der transmigrierten Granulozyten von den oben zugegebenen bestimmt werden. Die Granulozyten für die Standardreihe wurden in einer 24 Well-Platte inkubiert und während des gesamten Versuchs so behandelt wie die Granulozyten im Transmigrationsversuch. Für die Inhibition der Transmigration mit Antikörpern wurden die BCECF AM gefärbten PMN bzw. die PCPEC für 30 min mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (mAK) bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert, bevor sie zur Transmigration eingesetzt wurden (Antikörper und eingesetzte Konzentrationen s. Kap. 4.5.1). Die Transmigration erfolgte dann wie oben beschrieben.

5.3 Mikroskopie

5.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung morphologischer Fragestellungen eignet sich die indirekte Immunfluoreszenz. Dabei werden primäre Antikörper an zelluläre Strukturen gekoppelt, die durch fluochromierte Sekundärantikörper detektiert werden können. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können die fluoreszierenden Antikörper analysiert und mit dem ApoTome (Carl Zeiss) und einer CCD-Kamera detektiert werden. Das ApoTome dient dazu, optische Schnitte eines Präparates in axialer (Z-) Richtung aufzunehmen und daraus die Lokalisation einer Struktur in der Z-Ebene darzustellen. Aus der Information der optischen Schnitte lässt sich mit dem Inside 4D-Modul (Carl Zeiss, Göttingen) die dreidimensionale Struktur eines Präparats entschlüsseln.

5.3.1.1 Analyse der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität und Cytotoxizität wurde das „*LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells*“ (Invitrogen) verwendet. In diesem

Assay wurden zwei Reagenzien verwendet, die spezifisch lebende bzw. tote Zellen färben, Calcein AM und Ethidium Homodimer (EthD-1). Das Prinzip dieser Methode basiert auf zwei charakteristischen Eigenschaften von lebenden und toten Zellen: intrazelluläre Esteraseaktivität und Plasmamembranintegrität.

Für lebende Zellen ist eine intrazelluläre Esteraseaktivität charakteristisch. Diese kann durch den enzymatischen Umsatz des nahezu nicht-fluoreszierenden zelldurchdringenden Farbstoffs Calcein AM zum intensiv fluoreszierenden Calcein bestimmt werden. Der polyanionische Farbstoff Calcein wird innerhalb lebender Zellen fixiert, so dass lebende Zellen intensiv grün fluoreszieren. Intakte Membranen lebender Zellen sind für EthD-1 impermeabel. EthD-1 dringt somit nur in Zellen mit beschädigter Membran ein. Seine Fluoreszenz wird durch die Bindung an Nucleinsäuren etwa 40-fach verstärkt, so dass tote Zellen leuchtend rot fluoreszieren. Die Bestimmung der Vitalität beruht somit auf diesen physikalischen und biochemischen Eigenschaften von Zellen.

Um zu überprüfen, ob die primären *Plexus choroideus* Epithelzellen nach Ablauf der Transmigrationsversuche noch intakt sind und sie die Versuchsbedingungen überlebt haben, wurden sie zunächst mit Zellkulturmedium einmal gewaschen. Calcein AM (2 µl/ml) und EthD-1 (4 µl/ml) werden in Medium gegeben und die Zellen darin für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Göttingen) mit 10 x Vergrößerung betrachtet. Die Zellvitalität wurde mit einer CCD-Kamera photographisch dokumentiert.

5.3.1.2 Analyse der PMN-Transmigration, der *Tight Junction*-Struktur und des Aktin-Zytoskeletts

Immunfluoreszenzfärbungen werden von den choroidalen Plexusepithelzellen auf Transwell-Filtern durchgeführt. Nach Ablauf des Transmigrationsversuchs wurden die Zellen dazu mindestens einmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 min mit Formaldehyd (4%) bei RT fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und konnten bis zur Färbung bei 4°C in PBS gelagert werden. Die Filtermembranen wurden mit einem spitzen Skalpell aus dem Filtersystem geschnitten und mit der Zellseite nach unten jeweils in ein Well einer 24 Well-Platte gelegt. Die Filter wurden erneut mit PBS gewaschen. Damit auch innere

Zellstrukturen für Antikörper zugänglich gemacht werden konnten, wurden die Zellen zunächst mit Triton X-100 permeabilisiert. Dazu wurden sie für 1 h mit 0,5% Triton X-100 / 1% BSA in PBS bei RT inkubiert. Das BSA diente zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Kopplung an die primären Antikörper gegen Occludin bzw. ZO-1 über Nacht bei 4°C (250 µl/Well, Kap. 4.5.1). Die Filter wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 594 Huhn anti-Kaninchen, Kap. 4.5.2), DAPI (1:25000) und Alexa Fluor® 660 Phalloidin (4 µl/Well) zur Färbung des F-Aktins, sowie mit dem FITC-gekoppelten anti-Granulozyten/Monozyten-Antikörper (1:100 in PBS, 250 µl/Well), der gegen den Granulozyten und Makrophagen spezifischen Oberflächenmarker SWC3a gerichtet ist, inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Filter mit der Zellseite nach oben in ProLong® Gold Antifade Reagent eingebettet. Die Präparate waren, bei RT gelagert, für einige Wochen verwendbar. Die Präparate wurden mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M und dem ApoTome (Carl Zeiss, Göttingen) bei 63x Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet und mit der CCD-Kamera detektiert. Die Aufnahmen wurden mit der Axiovision 4.6 Software und dem Axiovision Inside 4D Modul (Carl Zeiss, Göttingen) bearbeitet.

Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen sind in Kapitel 4.5 aufgelistet.

5.3.1.3 Analyse der Phagozytose durch Doppelimmunfluoreszenz

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz sollte getestet werden, ob frisch isolierte Granulozyten aus Schweineblut vom Schlachthof *S. suis* Stamm 10 und die akapsuläre isogene Mutante *S. suis* Stamm 10 Δ cps phagozytieren. Dazu wurden die Bakterien, wie zuvor beschrieben, kultiviert und von jedem Stamm 5×10^6 Bakterien in 450 µl Zellkulturmedium in nicht Gewebekultur behandelte 24 Well-Platten gegeben und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um weiteres bakterielles Wachstum zu verhindern, wurde Penicillin/Streptomycin zugegeben (10 µl; P: 100 U/ml, S: 100 µg/ml) und für weitere 22 h inkubiert, bevor frisch isolierte Granulozyten im Verhältnis 1:1 zugegeben wurden. Nach 4 h Inkubationszeit wurde die

Granulozyten-Bakterien-Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen (300 g, 5 min, 4°C).

Zur Färbung der extrazellulär gebundenen Bakterien wurden die Granulozyten für 20 min bei 4°C mit dem Ziege-anti *S. suis*-Antikörper (1:100 in Kulturmedium) inkubiert und einmal mit Zellkulturmedium und zweimal mit serumfreien Medium gewaschen (je 5 min, 300 g, 4°C). Die Fixierung erfolgte für 10 min bei RT mit 4% Formaldehyd. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht in PBS + 1% BSA im Kühlschrank gelagert. Die Zellen wurden am folgenden Tag für 15 min mit dem sekundären Antikörper (Esel-anti-Ziege-Alexa Fluor® 594 und 488, 1:500 in PBS + 1% BSA) im Dunkeln bei RT behandelt und anschließend dreimal mit PBS + 1% BSA gewaschen. Anschließend wurden die Granulozyten für 15 min mit 0,5% Triton X-100/1% BSA/PBS permeabilisiert, um Zugang zu den innen liegenden Bakterien zu gewährleisten. Zur Färbung der extra- und intrazellulär gelegenen Bakterien wurden die Granulozyten mit Kaninchen-anti-*S. suis* Serum (1:100, in PBS + 1% BSA) für 30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten sekundären Antikörper (Huhn-anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488, 1:500 in PBS + 1% BSA), mit DAPI (1:20000) und Phalloidin Alexa Fluor 600 (10 µl/Röhrchen). Nach dreimaligem Waschen wurden die Granulozyten auf Objektträger pipettiert und getrocknet. Die getrockneten Granulozyten wurden in ProLong® Gold Antifade Reagent eingebettet. Die Präparate sind, bei RT gelagert, für einige Wochen verwendbar. Die Präparate wurden mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M und dem ApoTome (Carl Zeiss, Göttingen) bei 63x Vergrößerung in Immersionsöl betrachtet und mit der CCD-Kamera detektiert. Die Aufnahmen wurden mit der Axiovision 4.6 Software (Carl Zeiss, Göttingen) bearbeitet.

5.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können das Innere oder die Oberfläche von Proben durch Elektronen sichtbar gemacht werden. Aufgrund der geringen Wellenlänge des Elektronenstrahls können im Gegensatz zur Lichtmikroskopie Vergrößerungen von mehr als 100.000-fach erreicht werden, denn die Auflösung eines Mikroskops ist durch die Wellenlänge begrenzt. Grundsätzlich werden zwei elektronenmikroskopische Verfahren unterschieden: Transmissions- und

Rasterelektronenmikroskopie. Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird die Oberfläche von Untersuchungsmaterialien mit einem Elektronenstrahl abgetastet bzw. gerastert. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird das Innere der Proben sichtbar gemacht. Ultradünnschnitte eines Objekts werden dabei von Elektronen durchstrahlt.

Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Institut für Infektiologie, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) in Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt in Zusammenarbeit mit Frau Lilo Greune durchgeführt.

Nach Ablauf des Versuchs wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen und mit 2% Glutaraldehyd in D-PBS, pH 7,4 für 24 h bei 4°C fixiert. Die Kulturen wurden anschließend dreimal 5 min mit D-PBS gewaschen und mit 0,5% Osmiumtetroxid (OSO₄) in D-PBS für 1 h fixiert und kontrastiert. Anschließend wurden sie dreimal 5 min in PBS gewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Zellen entwässert. Dabei wurden sie für 15 min in 30, 50, 70, 90, 96%-igem und zweimal 30 min in 100%-igem unvergällten Alkohol inkubiert. Die Membranen wurden aus dem Filterinsert bei dem Inkubationsschritt in 70% Ethanol ausgeschnitten. Vollständig entwässert wurden die Filter in Propylenoxid für zweimal 5-10 min. Über Nacht wurden sie mit je einem Volumen Epoxydharz und Propylenoxid überschichtet. Die Präparate wurden in Epoxydharz in Flachmatten eingebettet und für 48 h bei 60°C getrocknet. Ultradünnschnitte wurden erstellt und mit Uranylacetat und Reynold's lead Citrat gefärbt. Betrachtet wurden die Präparate mit dem Fei company, Tecnai G2 Spirit Twin Elektronenmikroskop.

5.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wandert eine Einzelzellsuspension, markiert mit einem spezifischen fluoreszenz-gekoppelten Antikörper durch einen Laserstrahl mit der entsprechenden Anregungswellenlänge. Die Zellen emittieren Licht, das zur Menge ihrer gebundenen Antikörper proportional ist. Außerdem erhält man auf Grund der Lichtstreuung und Lichtbeugung Informationen über die Größe (Vorwärtsstreulicht) und die Granularität (Seitwärtsstreulicht) der Zellen. Die Daten werden an ein Auswertungsprogramm (in dieser Arbeit: Cell Quest pro) weitergeleitet und in Diagrammen (z. B. Dot Plot oder Histogramm) dargestellt.

Durchflusszytometrische Messungen wurden durchgeführt, um die Spezifität der in den Inhibitionsversuchen verwendeten Antikörper zu überprüfen (4.5.1). Außerdem wurden die Expressionsmuster der Oberflächenmarker der neutrophilen Granulozyten vor und nach der Transmigration und als Antwort auf unterschiedliche Stimuli (*S. suis* Stamm 10, TNF α , IL-8) analysiert. Um die spezifischen Effekte der Stimuli und der Transmigration an sich auf die Integrinexpression zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen wurden Neutrophile untersucht, nachdem sie in Richtung eines IL-8-Gradienten (10 ng/ml im unteren Kompartiment) durch unstimulierte, *S. suis* (MOI 10) oder TNF α (10 ng/ml) -stimulierte PCPEC transmigriert waren. Zum anderen wurden Neutrophile gefärbt, die in nicht Zellkultur behandelten 24 Wells gegeben wurden, die mit *S. suis* und TNF α vorbehandelten Zellkulturmedium bzw. nur mit Medium befüllt waren. Auch in diesem Versuchsansatz wurde für 4 h IL-8 (0, 6,7 und 10 ng/ml) zugefügt. Nach 4 h Transmigration bzw. Inkubation wurden die Granulozyten der entsprechenden Ansätze gesammelt und auf Zentrifugenröhrchen verteilt und vor Färbung zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen (5 min, 300 g). Die Granulozyten wurden mit den verschiedenen primären Antikörpern für 12 min inkubiert und erneut zweimal gewaschen (5 min, 300 g). Anschließend wurden sie für 7 min mit dem sekundären Antikörper im Dunkeln behandelt. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen mit dem FACScan (Becton Dickinson, USA) mit den entsprechenden Light Scattern und der CellQuest Pro Software analysiert. Die Daten wurden als mittlere Fluoreszenzintensität (*mean of fluorescence intensity*) in der logarithmischen Darstellung angegeben.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde von Umkehrkulturen unstimulierter, *S. suis* Stamm 10, *S. suis* Stamm 10 Δ cps und TNF α -stimulierten PCPEC nach 2 bzw. 4 h Inkubation isoliert. Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt und für Umkehrkulturen auf Transwell-Filtern angepasst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Filter dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Filtermembran mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils

in ein 48 Well überführt wurden. Die Zellen jeden Filters wurden mit 100 µl RLT-Puffer lysiert und für jeden Stimulus wurden die Zellen von drei Transwell-Filtern vereinigt. Das Volumen wurde mit RLT-Puffer auf 350 µl aufgefüllt und zur Homogenisation auf die „Qiashredder“-Säule (Qiagen) gegeben. Die RNA wurde mit 30 µl H₂O eluiert und bei -80°C eingefroren.

5.5.2 DNase-Verdau

Zur Beseitigung kontaminierender DNA wurde 0,5 Units RNase-freie DNase zur RNA gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Inaktiviert wurde die DNase durch die Erwärmung auf 70°C für 1 min.

5.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf ihrem Absorptionsspektrum bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Mit Hilfe des NanoDrops wurde die Konzentration der zuvor isolierten RNA gemessen.

5.5.4 cDNA-Synthese

Der Nachweis der ICAM-1- und VCAM-1-Expression wurde über eine quantitative *Real Time*-PCR erbracht. Bei dieser Methode handelt es sich um eine molekularbiologische Technik, durch die mRNA detektiert und quantifiziert werden kann. Zunächst wird cDNA mit Hilfe der reversen Transkriptase von RNA, die als Matrize dient, synthetisiert. Anschließend wird die erhaltene einzelsträngige cDNA in einem Thermocycler durch eine PCR spezifisch amplifiziert.

Als *Template* wurde 145-200 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die Synthese des ersten Stranges wurde mit dem „*SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Als *Primer* wurden Random Hexamers verwendet. Die Reaktion wurde ohne reverse Transkriptase als Negativkontrolle durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren bis sie für die quantitative *Real Time*-PCR eingesetzt wurde.

5.5.5 Quantitative *Real Time*-PCR

In der *Real Time*-PCR wird die Entstehung der PCR-Produkte während der Amplifikation nach jedem Elongationszyklus in Anwesenheit von SYBR Green gemessen. SYBR Green ist ein Fluorophor, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet. Die Fluoreszenz von SYBR Green wird verstärkt, wenn es sich in die kleine Furche der DNA einlagert. So ist es möglich, durch die Messung der Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus die Menge des amplifizierten PCR-Produkts zu bestimmen. Hierbei ist nicht, wie in der Agarose-Gelelektrophorese, die Größe des Produkts erkennbar, weswegen am Ende der *Real Time*-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wird. Jedes DNA-Fragment hat eine spezifische Schmelzkurve, wodurch bestimmt werden kann, ob tatsächlich nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Zur quantitativen Analyse im 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) wird der sogenannte C_T (*cycle threshold* – Schwellenwertzyklus) -Wert herangezogen. Der C_T -Wert repräsentiert die Anzahl der Zyklen, bei denen der Fluoreszenzlevel aller Proben gleich ist. Diese bestimmte Zykluszahl ist abhängig von der Ausgangsmenge der Ziel-RNA in der Probe. Mit zunehmender Menge an cDNA verringert sich die Zykluszahl, die nötig ist, um den C_T -Wert zu erreichen. So ist es möglich, Rückschlüsse auf die Menge an spezifischer mRNA in einer Probe zu ziehen. Die vom Messsystem nach Vorgabe des Schwellenwertes ausgegebenen C_T -Werte wurden zur Auswertung zunächst für jede Bedingung gemittelt (Dreifachbestimmung). Zur Normierung wurden dann von diesen Mittelwerten die des *housekeeping*-Gens β -Aktin subtrahiert und so wurden entsprechende ΔC_T -Werte erhalten. Schließlich wurden die ΔC_T -Werte der einzelnen Kulturbedingungen auf die Kontrollbedingung (unstimulierte PCPEC) bezogen und daraus $\Delta\Delta C_T$ -Werte berechnet. Durch Vorzeichenumkehr ($-\Delta\Delta C_T$) wurde eine anschauliche Darstellung der jeweiligen Genregulation erreicht, da ein positiver $-\Delta\Delta C_T$ -Wert eine im Vergleich zur Kontrollbedingung gesteigerte Genexpression angibt. Da sich im Verlauf einer PCR die Zahl der Amplikone idealerweise mit jedem Zyklus verdoppelt, liegt für $-\Delta\Delta C_T = 1$, bezogen auf die Kontrollbedingungen, rechnerisch eine doppelt so große Menge an mRNA vor.

Als *housekeeping*-Gen wurde β -Aktin als Bezugs-cDNA für das ICAM-1- und VCAM-1-Gen eingesetzt. Die verwendeten *Primer* sind in Kapitel 4.7 aufgelistet und wurden zuvor von Zeni *et al.* beschrieben (Zeni *et al.*, 2007). Das Reaktionsgemisch wurde,

wie in Tabelle 1 angegeben, zusammengefügt und zu der cDNA gegeben und in Triplikaten in 96 Wells pipettiert. Als Negativkontrollen wurde zum einen dem Reaktionsgemisch RNA-freies Wasser zugegeben zum anderen die Proben ohne reverse Transkriptase eingesetzt.

Tab. 1: Pipettierschema für den Ansatz der *Real Time*-PCR

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix	10 µl	1x
<i>Primer A</i> (10 pg/ml)	0,6 µl	0,3 µM
<i>Primer B</i> (10 pg/ml)	0,6 µl	0,3 µM
cDNA	2,0 µl	200 ng/Reaktion
RNase-freies Wasser	6,8 µl	
Geamtvolumen	20 µl	

Zur Amplifizierung der cDNA im 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde das folgende Programm verwendet:

Programm zur Durchführung der *Real Time*-PCR:

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zyklen</u>
Initialer Aktivierungsschritt	15 min	95°C	
<u>3-Schritte-Zyklus</u>			
Denaturierung	15 sec	94°C	} 40 x
Annealing	30 sec	60°C	
Extension	30 sec	72°C	
<u>Schmelzkurvenanalyse</u>			
	30 sec	95°C	
	20 sec	60°C	
	19,59 min	bis 95°C	
	30 sec	95°C	

5.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nucleinsäuren auf Grund ihrer Größe. In dieser Arbeit wurden nicht denaturierende Gele mit einem Agaroseanteil von 1,5% verwendet. Die Agarose wurde in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer gelöst. Das Gel wurde in einen Gelschlitten gegossen und nach dem Aushärten in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Zu den Proben wurde im Verhältnis 1:10 Ladepuffer gegeben und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 1 h 15 min bei 120 V. Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das Agarose-Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht photodokumentiert.

Ethidiumbromid kann auf Grund seiner planaren Struktur in die DNA interkalieren. Dabei interagieren seine aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nucleinsäuren. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Die Bindung an DNA bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass die Färbung der Nucleinsäuren auch in Gegenwart des freien Ethidiumbromids in der Färbelösung gut zu sehen ist (Lottspeich und Zorbas, 1998).

5.6 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Sie wurden mit Hilfe des *Student's* T-Test bzw mit Hilfe der *Analysis of variance* (ANOVA) mit wiederholten Messungen analysiert und die Methode der *compound symmetry* wurde durchgeführt. Die *P*-Werte für den *post-hoc*-Test wurden nach der Methode von Tukey-Kramer angepasst. Das Verfahren von MIXED von SAS wurde angewandt. Ein *P*-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant bewertet. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Der TR-Dextran-Fluss wurde als prozentualer Anteil der im oberen Kompartiment zugegebenen Indikatorlösung angegeben. Die PMN-Transmigration wurde als dyadischer Logarithmus dargestellt.

6. Ergebnisse

6.1 Messung des TEER und der parazellulären Permeabilität unter Einfluss von IL-8, PMN und IL-8/PMN

Für die Blut-Hirn-Schranke ist bereits beschrieben, dass die Transmigration von neutrophilen Granulozyten zu einer defekten Barrierefunktion führt, was sich in einem Rückgang des TEER und in einer erhöhten parazellulären Permeabilität widerspiegelt (Wong *et al.*, 2007). Um zu bestimmen, ob diese Beobachtung auch für die Blut-Liquor-Barriere gilt, wurden der TEER und der parazelluläre TR-Dextran-Fluss der PCPEC nach vier Stunden unter vier unterschiedlichen Bedingungen gemessen (Abb. 13): 1. unstimulierte PCPEC (Ko), 2. PMN im oberen Kompartiment (PMN), 3. IL-8 im unteren Kompartiment (IL8) und 4. PMN im oberen und IL-8 im unteren Kompartiment (PMN + IL8) zur Stimulation der Transmigration.

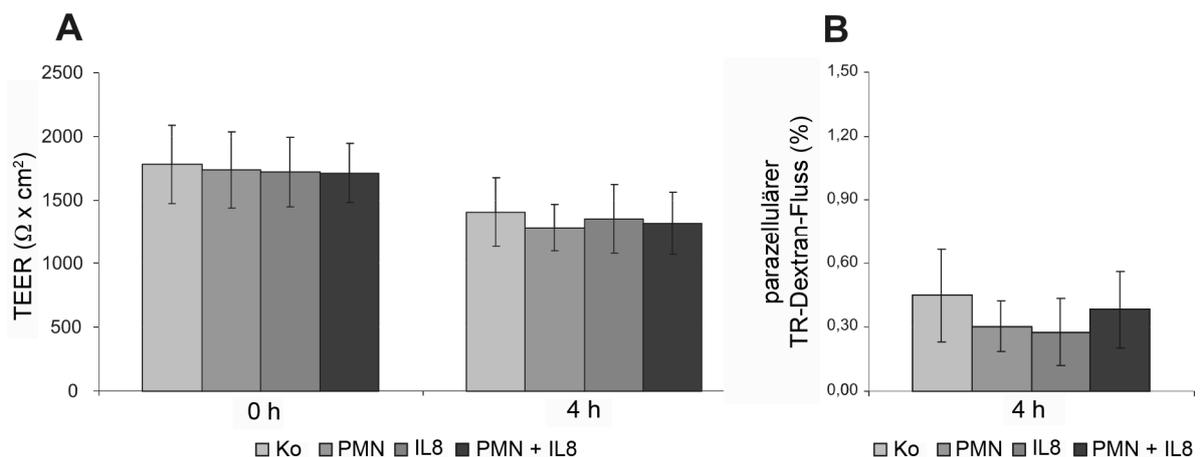


Abb. 13: Effekt von IL-8 und der neutrophilen Granulozyten (PMN) auf die Barrierefunktion der PCPEC. Die Barrierefunktion wurde anhand des TEER (A) und des parazellulären TR-Dextran-Flusses (B) bestimmt. PMN (PCPEC:PMN 1:10) wurden in das obere Kompartiment, IL-8 (10 ng/ml) in das untere Kompartiment bzw. in Kombination zu den PCPEC-Umkehrkulturen gegeben. Der TEER ist in absoluten Werten ($\Omega \times \text{cm}^2$) angegeben und wurde vor und nach 4 h Inkubation gemessen. Der TR-Dextran-Fluss wurde von der basolateralen in die apikale Richtung (oberes zu unterem Kompartiment) gemessen. Der parazelluläre Dextran-Fluss ist dargestellt als prozentualer Anteil der im oberen Kompartiment zugegebenen Indikatorlösung. Der TR-Dextran-Fluss wurde nach 4 h Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, je $n=3$ dargestellt.

Abbildung 13A zeigt unter allen getesteten Bedingungen eine leichte jedoch nicht signifikante Abnahme des TEER während der Inkubationszeit von vier Stunden. Der beobachtete Effekt auf den TEER ist deshalb eher auf die experimentelle Durchführung als auf die unterschiedlichen Stimuli zurückzuführen. Parallel dazu

wurde keine signifikante Veränderung der parazellulären Permeabilität durch die PMN, IL-8 oder PMN + IL-8 im Vergleich zu den Kontrollzellen induziert.

6.2 Messung des TEER und der parazellulären Permeabilität während der PMN-Transmigration

Da andere Studien gezeigt haben, dass die Permeabilität zellulärer besonders von Hirnendothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden (de Vries *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2007), und PCPEC (Zeni *et al.*, 2007) im Standard Transwell-System durch TNF α erhöht wird, wurde dieses Zytokin für den Vergleich mit bakteriell infizierten PCPEC im Umkehrkultur-System verwendet. In Transmigrationsversuchen wurde IL-8 als Lockstoff verwendet und in das untere Kompartiment bestimmter PCPEC-Kulturen gegeben. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, beeinflusst IL-8 weder den TEER (Abb. 14B) noch den parazellulären Dextran-Fluss (Abb. 14C).

Abbildung 14A zeigt die signifikante Abnahme des TEER auf $24\% \pm 4$ ($391 \pm 91 \Omega \times \text{cm}^2$) der Anfangswerte nach 24 h TNF α -Stimulation. Die Abnahme der TEER geht einher mit einer signifikanten Zunahme des parazellulären Dextran-Flusses um den Faktor 3 (Kontrolle: $0,27\% \pm 0,05$ vs. TNF α : $0,88\% \pm 0,08$ der Indikatorlösung). Unter Kontrollbedingungen und nach Infektion mit *S. suis* Stamm10 Δcps nehmen die TEER innerhalb von 24 h leicht ab. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit *S. suis* Stamm 10 nach der Dauer von 24 h zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg des TEER. Innerhalb der Granulozyten-Transmigration von 4 h nahm der TEER signifikant unter bakterieller Stimulation ab. Der durch TNF α induzierte verminderte TEER veränderte sich während der Transmigration nicht weiter.

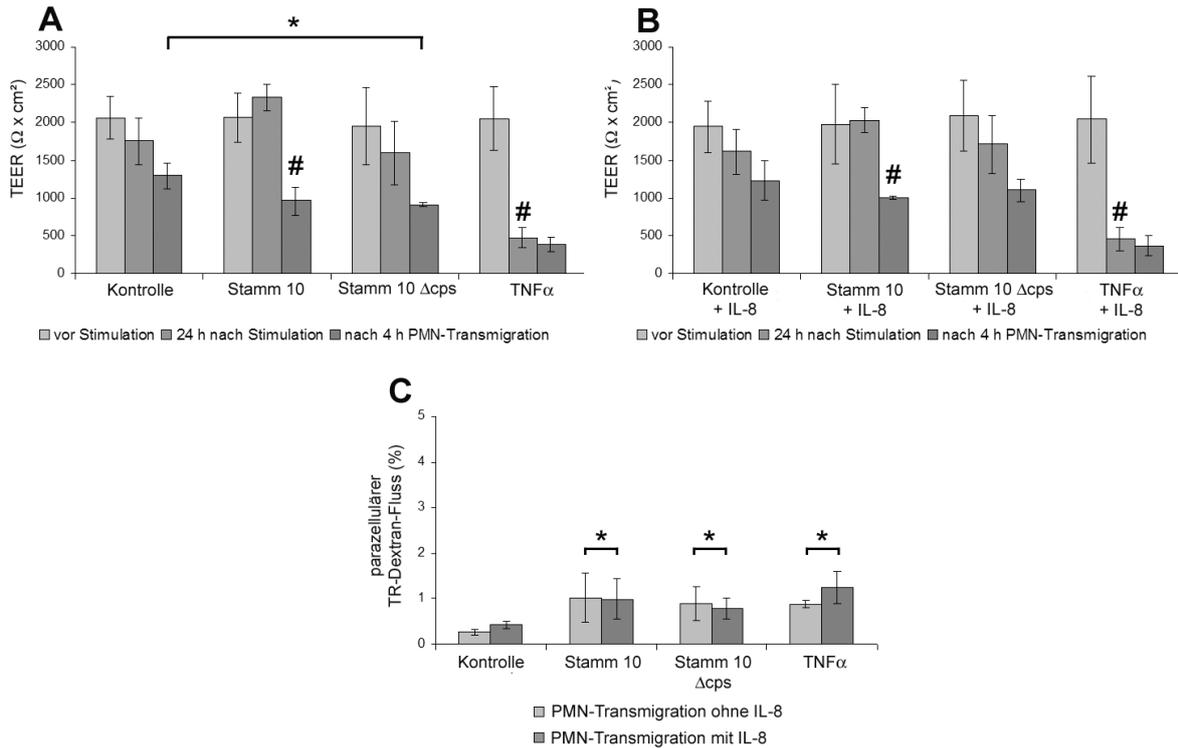


Abb. 14: Barrierefunktion der PCPEC während der PMN-Transmigration unter *S. suis*-Infektion und TNF α -Stimulation. PCPEC wurden mit *S. suis* Stamm 10, der unbekapselten Mutante Stamm 10 Δ cps (MOI 10) oder mit TNF α (10 ng/ml), wie in Kap. 5.2.3 beschrieben, stimuliert. In bestimmten Proben wurde IL-8 (10 ng/ml) als chemotaktisches Agens eingesetzt. Die Effekte auf die Barrierefunktion wurden anhand des TEER (A, B) und des parazellulären TR-Dextran-Flusses (C) ermittelt. A, B. Der TEER ist in absoluten Werten ($\Omega \times \text{cm}^2$) angegeben und wurde vor und 24 h nach der Stimulation (direkt vor Beginn der Transmigration) und 4 h nach der PMN-Transmigration gemessen. C. Der TR-Dextran-Fluss wurde von der basolateralen in die apikale Richtung (oberes zu unterem Kompartiment) unstimulierter, *S. suis*- und TNF α -stimulierter PCPEC gemessen. Der parazelluläre Dextran-Fluss ist als prozentualer Anteil der im oberen Kompartiment zugegebenen Indikatorlösung dargestellt. Der TR-Dextran-Fluss wurde nach 4 h Transmigration bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten je $n=3$ bestimmt. #, $P < 0,01$ im Vergleich zum Zeitpunkt zuvor, *, $P < 0,05$ im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

Der parazelluläre Dextran-Fluss blieb während der PMN-Transmigration niedrig, wurde jedoch durch die bakterielle Infektion mit *S. suis* Stamm 10 ($0,99\% \pm 0,66$) und Stamm 10 Δ cps ($0,88\% \pm 0,08$) im Vergleich zur Kontrolle ($0,27\% \pm 0,05$) signifikant verstärkt, wobei sich die Stimuli untereinander nicht unterschieden. Wie auch auf die TEER-Werte (Abb. 14B) hatte IL-8 keinen Einfluss auf den TR-Dextran-Fluss (Abb. 14C).

6.3 PMN-Transmigration durch unstimulierte, *S. suis*- und TNF α -stimulierte PCPEC

Nachdem Bakterien das Gehirn erreicht haben, beginnt der Einstrom von Leukozyten vom Blut in das ZNS als einer der fundamentalen Schritte im Verlauf einer Meningitis. In der letzten Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Transmigration des bekapselten *S. suis* Wildtypstamms 10 und seiner unbekapselten isogenen Mutante Stamm 10 Δ cps untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die bakterielle Kapsel ein kritischer Faktor für die Adhäsion der Bakterien an und die Invasion in PCPEC ist (Tenenbaum *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, ob die Kapsel ebenfalls einen Einfluss auf die Transmigration neutrophiler Granulozyten hat, wurden Transmigrationsversuche nach Infektion der PCPEC mit den bekapselten und den unbekapselten *S. suis*-Stämmen im Vergleich zu unstimulierten und TNF α -stimulierten PCPEC durchgeführt (Abb. 15).

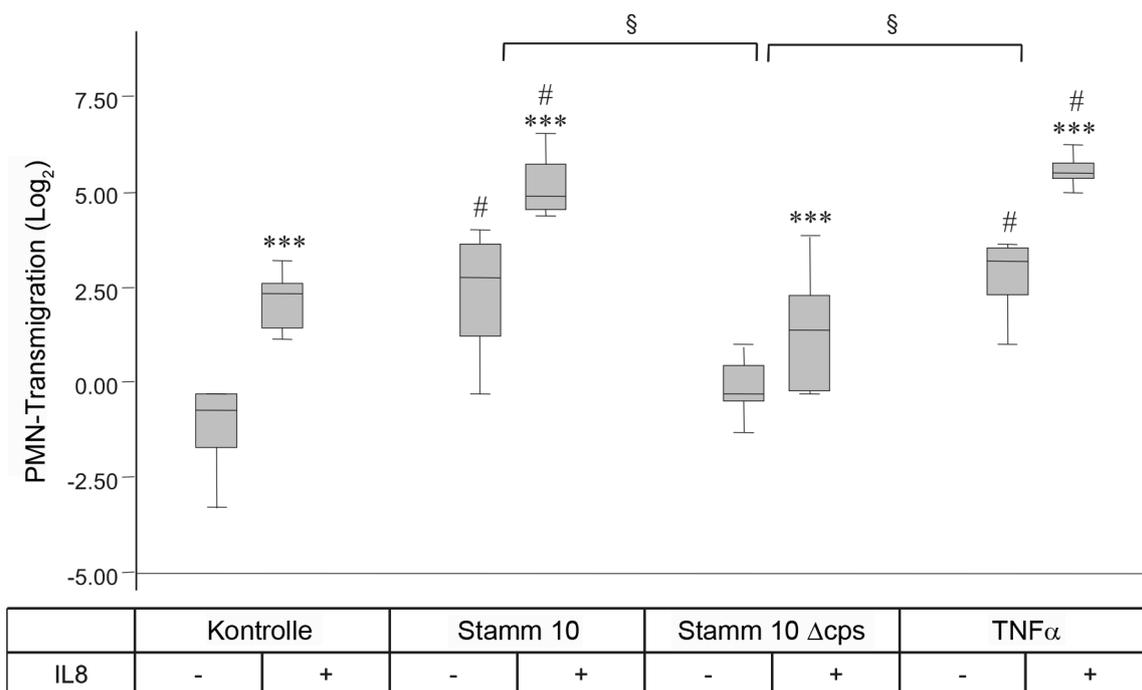


Abb. 15: Effekt von *S. suis* und TNF α auf die PMN-Transmigration durch PCPEC. PCPEC wurden mit *S. suis* Stamm 10, der unbekapselten Mutante Stamm 10 Δ cps (MOI 10) oder mit TNF α (10 ng/ml), wie in Kap. 5.2.3 beschrieben, stimuliert. BCECF AM-gefärbte Neutrophile wurden nach 24 h Stimulation auf die basolaterale Seite der PCPEC-Umkehrkulturen in einem PCPEC:PMN-Verhältnis von 1:10 gegeben. Die Anzahl transmigrierter Granulozyten wurde nach 4 h fluorometrisch bestimmt. Die Daten sind als dyadischer Logarithmus von drei unabhängigen Experimenten angegeben, je n=3. ***, P < 0,0001 im Vergleich zu PCPEC ohne IL-8, #, P < 0,0001 im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle \pm IL-8, §, P < 0,0001 im Vergleich der unterschiedlichen Stimuli.

Die Infektion der PCPEC mit *S. suis* Stamm 10 (MOI 10) von der physiologisch relevanten basolateralen Seite und die apikale und basolaterale Stimulation mit TNF α (10 ng/ml) führten zu einer signifikanten Granulozyten-Transmigration im Vergleich zu Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu bewirkte die Stimulation der PCPEC mit Stamm 10 Δ cps keine erhöhte Transmigrationsrate. Die Transmigrationsrate der Granulozyten war im Vergleich zu *S. suis* Stamm 10 oder TNF α -stimulierten Zellen signifikant geringer und vergleichbar mit den Kontrollen. Durch den Lockstoff IL-8 konnte die Transmigrationsrate durch Kontrollzellen, sowie durch *S. suis* und TNF α -stimulierte Zellen signifikant verstärkt werden. Die Transmigration durch nicht stimulierte Zellen nahm in Anwesenheit von IL-8 von 0,5% \pm 0,3 auf 4,7% \pm 1,2 um das 9,4-fache zu. Die Verstärkung der Transmigration bei stimulierten Zellen lag bei Faktor 3,7 bis 5,8 (*S. suis* Stamm 10: von 7,6% \pm 5,7 auf 41% \pm 25,1, *S. suis* Stamm 10 Δ cps: von 0,9% \pm 0,2 auf 3,7% \pm 2,1, TNF α : von 8,3% \pm 4,0 auf 48,3% \pm 13,2). In Abbildung 15 ist die Transmigrationsrate der Granulozyten als dyadischer Logarithmus dargestellt.

6.4 Inhibition der PMN-Transmigration durch unstimulierte, *S. suis*- und TNF α -stimulierte PCPEC mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAK)

Die zellulären und molekularen Mechanismen der PMN-Transmigration durch Epithelzellen sind bisher zu einem großen Teil noch ungeklärt. Um die Integrine, die an der PMN-Transmigration durch PCPEC beteiligt sind, zu entschlüsseln, wurden Inhibitionsexperimente mit monoklonalen Antikörpern, die mit porcinen Epitopen kreuzreagieren (Haverson *et al.*, 2001 a und b; Shahein *et al.*, 2002), durchgeführt. Die Bindung der Antikörper an ihre Epitope wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen (5.4) bestätigt.

Die Transmigration der Neutrophilen, die mit Isotypkontrollen inkubiert wurden, war vergleichbar mit der von unbehandelten PMN unter allen Bedingungen (Kontrolle, *S. suis* Stamm 10 und TNF α -stimuliert). Abbildung 16 zeigt die inhibitorischen Effekte der Antikörper gegen die neutrophilen β_2 -Integrine CD11a, CD11b und CD18.

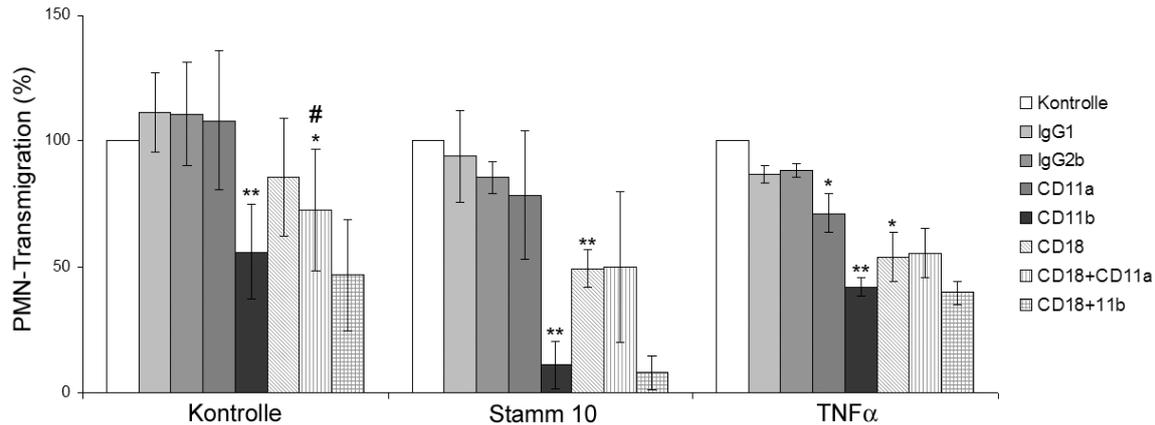


Abb. 16: Inhibitorische Effekte monoklonaler Antikörper gegen CD11a, CD11b und CD18 auf die PMN-Transmigration durch unstimulierte, *S. suis* Stamm 10- und TNF α -stimulierte PCPEC. Die Epithelzellen wurden wie in Kap. 5.2.3 vorstimuliert und BCECF AM-gefärbte Granulozyten 30 min vor Beginn der Transmigration mit den entsprechenden Antikörpern und den Isotypkontrollen inkubiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf die Transmigration ohne spezifischen Antikörper von drei unabhängigen Experimenten je $n \geq 3$ bestimmt. *, $P < 0,05$ im Vergleich zur Transmigration durch unstimulierte bzw. stimulierte PCPEC ohne spezifischen Antikörper; **, $P < 0,01$ 05 im Vergleich zur Transmigration durch unstimulierte bzw. stimulierte PCPEC ohne spezifischen Antikörper; #, $P < 0,05$ im Vergleich zu anti-CD11a allein.

Die PMN-Transmigration durch Kontrollzellen konnte durch anti-CD11a nicht ($108\% \pm 27,7$ im Vergleich zur Kontrolle) und durch anti-CD18 nur leicht ($86\% \pm 23,5\%$ im Vergleich zur Kontrolle) inhibiert werden. Die α -Untereinheiten von CD11a und CD11b sind mit dem β_2 -Integrin CD18 assoziiert. Daher wurden die Granulozyten auch mit den Kombinationen CD11a/CD18 und CD11b/CD18 inkubiert. Der stärkste inhibitorische Effekt durch einen einzelnen mAK jedoch konnte mit anti-CD11b erzielt werden ($56\% \pm 18,7$ im Vergleich zur Kontrolle). Die Kombination von anti-CD11b/CD18 bewirkte lediglich einen leichten zusätzlichen Effekt im Vergleich zu anti-CD11b alleine ($46,7\% \pm 22,3$). Im Gegensatz dazu hatte die Kombination CD11a/CD18 einen signifikanten zusätzlichen Effekt im Vergleich zu anti-CD11a ($72,5\% \pm 24,0$ vs. $108\% \pm 27,7$ im Vergleich zur Kontrolle). Eine ähnliche Tendenz konnte für die Inhibitionsversuche mit *S. suis* Stamm 10 infizierten Zellen beobachtet werden. Anti-CD11a inhibierte die PMN-Transmigration leicht, jedoch nicht signifikant ($78,4\% \pm 25,6$ im Vergleich zur Kontrolle). Der blockierende Effekt von anti-CD11b und anti-CD18 war signifikant stärker als unter Kontrollbedingungen ($11,1\% \pm 9,6$ bzw. $49,2\% \pm 7,6$ im Vergleich zur Kontrolle). Die Antikörperkombinationen anti-CD11a/CD18 und anti-CD11b/CD18 bewirkten keine zusätzliche Inhibition als anti-CD11a, -CD11b und -CD18 allein. Unter TNF α -Stimulation hatte anti-CD11a einen signifikanten Einfluss auf die Granulozytendiapedese ($71,5\% \pm 7,7$ im Vergleich zur

Kontrolle). Zudem waren die blockierenden Effekte von anti-CD11b ($42,1\% \pm 3,7$ im Vergleich zur Kontrolle) und anti-CD18 ($54\% \pm 9,8$ im Vergleich zur Kontrolle) signifikant. Wie unter bakterieller Stimulation hatten die Kombinationen aus den verschiedenen Antikörpern keine zusätzlichen inhibitorischen Effekte im Vergleich zu den einzelnen Antikörpern.

Darüber hinaus wurde die mögliche Inhibition der Granulozyten-Transmigration durch Antikörper gegen das α_4 -Integrin CD49d (VLA-4) und das α_5 -Integrin CD49e (VLA-5) und das Integrin assoziierte Glykoprotein CD47 untersucht (Abb. 17).

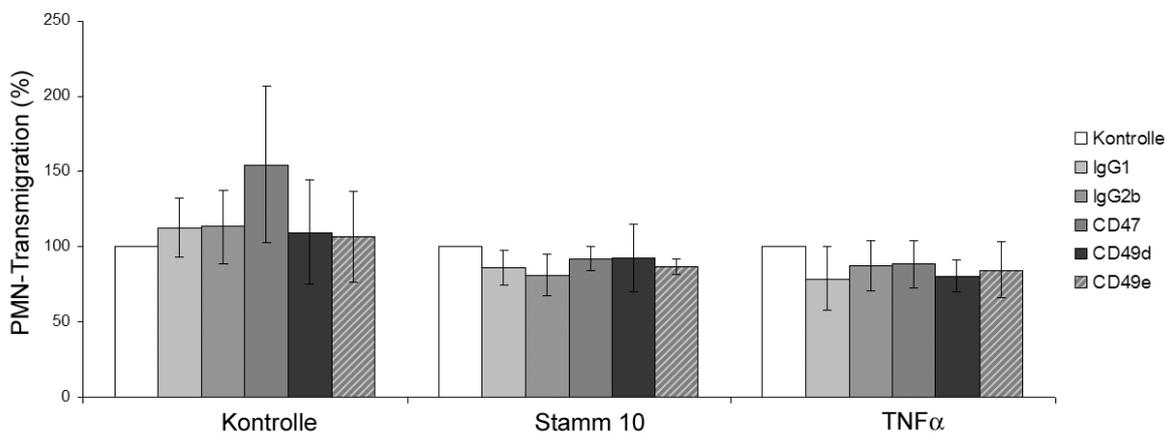


Abb. 17: Inhibitorische Effekte monoklonaler Antikörper gegen CD47, CD49d und CD49e auf die PMN-Transmigration durch unstimulierte, *S. suis* Stamm 10- und TNF α -stimulierte PCPEC. Die Epithelzellen wurden wie in Kap. 5.2.3 vorstimuliert und BCECF AM-gefärbte Granulozyten 30 min vor Beginn der Transmigration mit den entsprechenden Antikörpern und den Isotypkontrollen inkubiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf die Transmigration ohne spezifischen Antikörper von drei unabhängigen Experimenten je $n \geq 3$ bestimmt.

Die Transmigration neutrophiler Granulozyten, die mit Antikörpern inkubiert wurden, wiesen keine veränderten Werte auf. Lediglich anti-CD47-inkubierte PMN zeigten eine verstärkte, jedoch nicht signifikante Transmigrationsrate, so dass dieser Effekt vernachlässigt werden konnte. Die Transmigrationsrate Antikörper-behandelter Granulozyten durch *S. suis* Stamm 10- und TNF α -stimulierte Zellen war im Vergleich zur Kontrolle leicht jedoch nicht signifikant reduziert. Im Vergleich zu den Isotypkontrollen war jedoch keine Veränderung zu detektieren.

Außerdem wurde die Transmigration neutrophiler Granulozyten, behandelt mit Antikörpern gegen CD11a, CD11b, CD18 und CD47, durch unstimulierte und TNF α -stimulierte PCPEC, die mit Antikörpern gegen epitheliales CD47 inkubiert wurden, bestimmt. Neben anti-CD49d, -CD49e und -CD47 inkubierten Granulozyten wiesen

auch anti-CD47 inkubierte PCPEC keine reduzierte Transmigrationsrate auf. Auch die Kombinationen aus anti-CD47 auf Epithelseite und anti-CD11a, -CD11b, -CD18 und -CD47 auf Granulozytenseite zeigten keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt im Vergleich zu den jeweiligen Antikörpern allein (Daten nicht gezeigt).

6.5 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle unstimulierter und stimulierter PMN

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die beobachteten inhibitorischen Effekte der Antikörper gegen CD11a, CD11b und CD18 während der Transmigration validiert und die Expressionsmuster dieser Integrine unter verschiedenen Stimuli analysiert (Abb. 18). IL-8, das in den Transmigrationsexperimenten als Lockstoff eingesetzt wurde, stimuliert möglicherweise die Expression von den PMN-Integrinen (Detmers *et al.*, 1990). Daher wurden die Effekte von IL-8 und der Transmigration an sich auf die Integrinexpression an unstimulierten Kontrollzellen, *S. suis* Stamm 10- und TNF α -stimulierten Zellen untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche IL-8-Konzentrationen (6,7 und 10 ng/ml) eingesetzt, da die genaue Konzentration, die während der Transmigration potentiellen Einfluss auf die Granulozyten haben kann, nicht exakt ermittelt werden kann. Für die Transmigrationsversuche wurden 10 ng/ml in das untere Kompartiment des Transwell Filters gegeben, was einer Konzentration von 6,7 ng/ml im gesamten Well entspricht (1 ml im unteren Kompartiment + 0,5 ml im oberen Kompartiment). Daher liegt die IL-8-Konzentration, die potentiellen Einfluss auf die Granulozyten hat, in einem Bereich von 6,7 bis 10 ng/ml.

Die durchflusszytometrische Messung von CD11a (Abb. 18A) zeigte keine Unterschiede im Expressionsmuster für alle IL-8-Konzentrationen vor und nach der Granulozyten-Transmigration und für alle getesteten Stimuli. Eine signifikante Zunahme der CD18-Expression konnte nach der Transmigration durch unstimulierte und *S. suis* Stamm 10-stimulierte PCPEC beobachtet werden (Abb. 18B). Außerdem führte die IL-8-Behandlung (6,7 und 10 ng/ml) und die Transmigration unter TNF α -Stimulation zu einer erhöhten CD18-Expression (Abb. 18B).

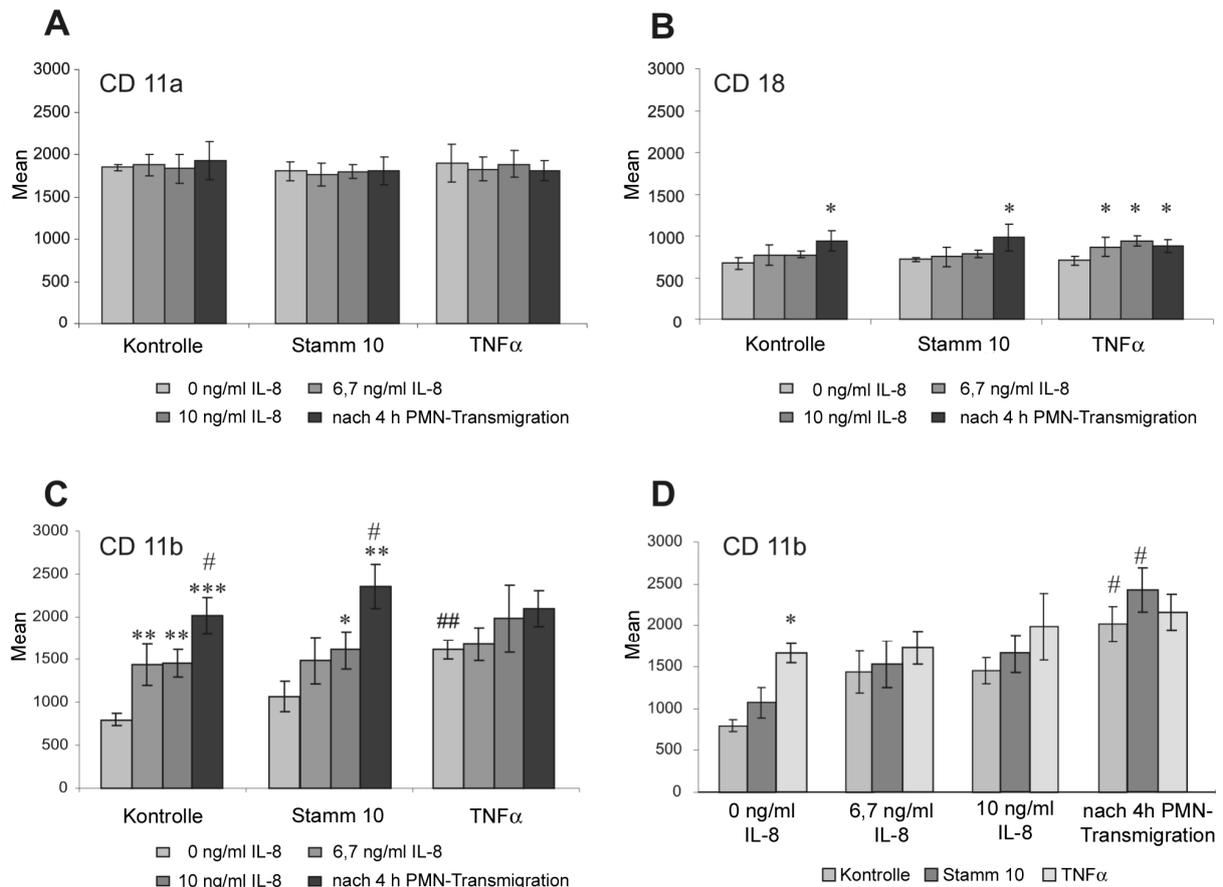


Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse der CD11a-, CD11b- und CD18-Expression der Granulozyten abhängig von IL-8 und ihrer Transmigration nach *S. suis*-Infektion und TNF α -Stimulation. A, B und C zeigen den Einfluss der unterschiedlichen IL-8-Konzentrationen kombiniert mit den verschiedenen Stimuli auf die CD11a-, CD11b- und CD18-Expression vor und nach der Transmigration. D zeigt die CD11b-Expression im Besonderen abhängig von den Kontrollbedingungen bzw. der *S. suis* Stamm 10- und TNF α -Stimulation. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean of fluorescent intensity*) in der logarithmischen Darstellung \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ***, $P < 0,0001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,01$ im Vergleich zu nicht mit IL-8 behandelten Granulozyten; #, $P < 0,01$ im Vergleich zu Granulozyten, die mit 10 ng/ml IL-8 inkubiert wurden, ##, $P < 0,01$ im Vergleich zu unstimulierten und *S. suis* Stamm 10-stimulierten Granulozyten.

Den Inhibitionsexperimenten mit anti-CD11b entsprechend wurde die Expression des Integrins CD11b signifikant verstärkt (Abb. 18C). Unter Kontrollbedingungen sowie unter TNF α - und *S. suis* Stamm 10-Stimulation wurde CD11b durch den Einfluss von IL-8 und der Transmigration auf den Granulozyten stark hochreguliert. Zwischen beiden IL-8-Konzentrationen (6,7 und 10 ng/ml) wurde kein signifikant unterschiedlicher Effekt auf die CD11b-Expression beobachtet. Eine zusätzliche und signifikante Hochregulierung von CD11b nach der PMN-Transmigration im Vergleich zu der höheren IL-8-Konzentration konnte für Kontrollen und *S. suis* Stamm 10-behandelte Kulturen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu induzierte TNF α eine starke und signifikante Hochregulierung von CD11b im Vergleich zu Kontrollen und

S. suis Stamm 10-stimulierten Zellen, die durch IL-8-Behandlung oder durch den Transmigrationsprozess nicht weiter verstärkt werden konnte.

In Abbildung 18D wurde der Einfluss von TNF α und *S. suis* Stamm 10 auf die CD11b-Expression mit unterschiedlichen IL-8-Konzentrationen spezifisch dargestellt. Abgesehen von der CD11b-Expression nach der PMN-Transmigration wurde CD11b durch den Einfluss von *S. suis* Stamm 10 und TNF α tendenziell höher exprimiert, wobei eine Signifikanz lediglich für die TNF α -Stimulation neutrophiler Granulozyten, die nicht mit IL-8 behandelt wurden, festgestellt werden konnte. Im Vergleich zur höheren IL-8-Konzentration (10 ng/ml) wurde CD11b unstimulierter und *S. suis* Stamm 10-stimulierter Granulozyten durch deren Transmigration signifikant hochreguliert. Zusammenfassend konnte somit beobachtet werden, dass die Granulozyten-Transmigration an sich einen signifikanten Effekt auf die CD11b-Expression hat.

In Abbildung 19 sind die durchflusszytometrischen Analysen von CD47 (Abb. 19A), CD49d (Abb. 19B) und CD49e (Abb. 19c) nicht transmigrierter bzw. transmigrierter Granulozyten dargestellt.

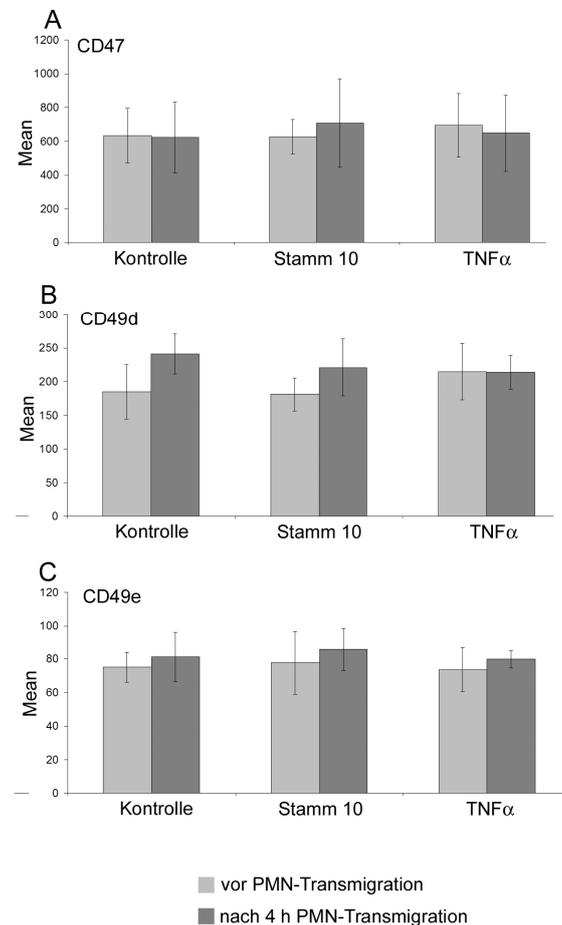


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse der CD47-, CD49d- und CD49e-Expression der Granulozyten abhängig von ihrer Transmigration nach *S. suis*-Infektion und TNF α -Stimulation. A, B und C zeigen den Einfluss der Granulozyten-Transmigration unter den verschiedenen Stimuli auf die CD47-, CD49d- und CD49e-Expression. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean of fluorescent intensity*) in der logarithmischen Darstellung \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Die Expressionsmuster von CD47, CD49d und CD49e veränderten sich nach der Transmigration im Vergleich zur Kontrolle unter allen untersuchten Stimuli nicht signifikant. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen aus den Inhibitionsexperimenten, in denen keine inhibitorischen Einflüsse der Antikörper gegen CD47, CD49d und CD49e auf die Granulozyten-Transmigration gezeigt werden konnten.

Die Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen sind dem Anhang (9.4.1) zu entnehmen.

6.6 Untersuchung der mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in PCPEC nach *S. suis*- und TNF α -Stimulation

Bereits veröffentlichte Studien im Standard Transwell Filter System haben gezeigt, dass die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in PCPEC durch TNF α -Stimulation erhöht ist (Zeni *et al.*, 2007). Daher wurde hier die mRNA-Expression dieser Adhäsionsmoleküle nach bakterieller Infektion mit dem bekapselten *S. suis* Stamm 10 und der unbekapselten isogenen Mutante Stamm 10 Δ cps im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen und TNF α -behandelten Zellen und normiert auf das *housekeeping*-Gen β -Aktin im Umkehrkulturmodell analysiert. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der quantitativen *Real Time*-PCR.

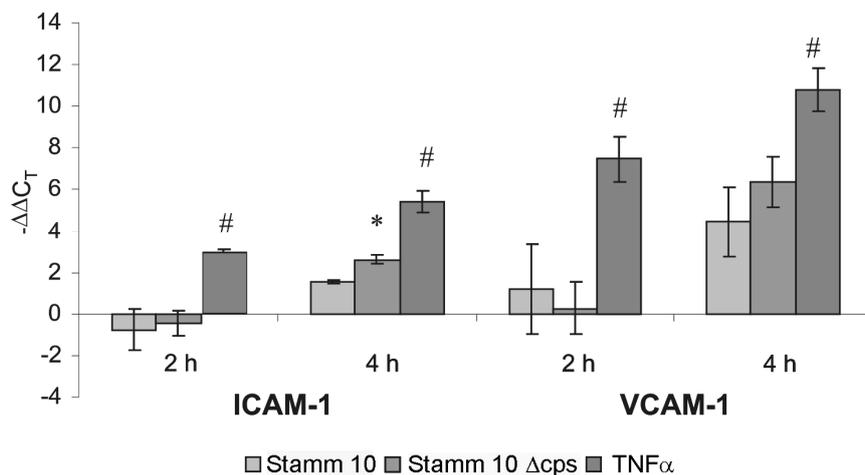


Abb. 20: Quantitative *Real-Time* PCR zum Effekt von *S. suis* und TNF α auf die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in PCPEC. Die Werte wurden auf β -Aktin und auf unstimulierte Kontrollzellen normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten je $n=3 \pm$ Standardabweichung dargestellt. Positive $-\Delta\Delta C_T$ -Werte bedeuten eine Hochregulation. #, $P < 0,01$ im Vergleich zur Bakterienstimulation, *, $P < 0,05$ im Vergleich zu *S. suis* Stamm 10.

Mit Hilfe der quantitativen *Real Time*-PCR konnte beobachtet werden, dass es nach 2 h bakterieller Stimulation zu keiner Veränderung der Expressionslevel von ICAM-1 und VCAM-1 kam, während TNF α bereits eine signifikante Hochregulierung bewirkte. Die Hochregulierung von VCAM-1 ($-\Delta\Delta C_T$ 7,5 \pm 1,1) war zu diesem Zeitpunkt stärker als von ICAM-1 ($-\Delta\Delta C_T$ 3,02 \pm 0,08). Nach 4 h Stimulation wurden schließlich sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 auch durch die *S. suis*-Infektion hochreguliert. Der mRNA-Expressionslevel von VCAM-1 war erneut signifikant stärker als das von ICAM-1 nach Behandlung mit jedem Stimulus. Für beide Adhäsionsmoleküle war die mRNA-Expression nach 4 h durch die unbekapselte Mutante stärker als durch den bekapselten Wildtyp (ICAM-1: Stamm 10 $-\Delta\Delta C_T$ 1,5 \pm 0,1, Stamm 10 Δ cps $-\Delta\Delta C_T$ 2,6 \pm 0,2; VCAM-1: Stamm 10 $-\Delta\Delta C_T$ 4,5 \pm 1,7, Stamm 10 Δ cps $-\Delta\Delta C_T$ 6,4 \pm 1,2). TNF α wies den stärksten Effekt auf die CAM-Expression in PCPEC auf, der signifikant höher war im Vergleich zur Bakterienstimulation (ICAM-1: $-\Delta\Delta C_T$ 5,5 \pm 0,5, VCAM-1: $-\Delta\Delta C_T$ 10,8 \pm 1,1). Die Profile der *Real Time*-PCR sind exemplarisch für einen Versuch dem Anhang (9.4.2; Abb. A21 und A22) zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurden eine Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 21) und eine Schmelzkurvenanalyse (Abb. 22) durchgeführt und somit die Spezifität nachgewiesen.

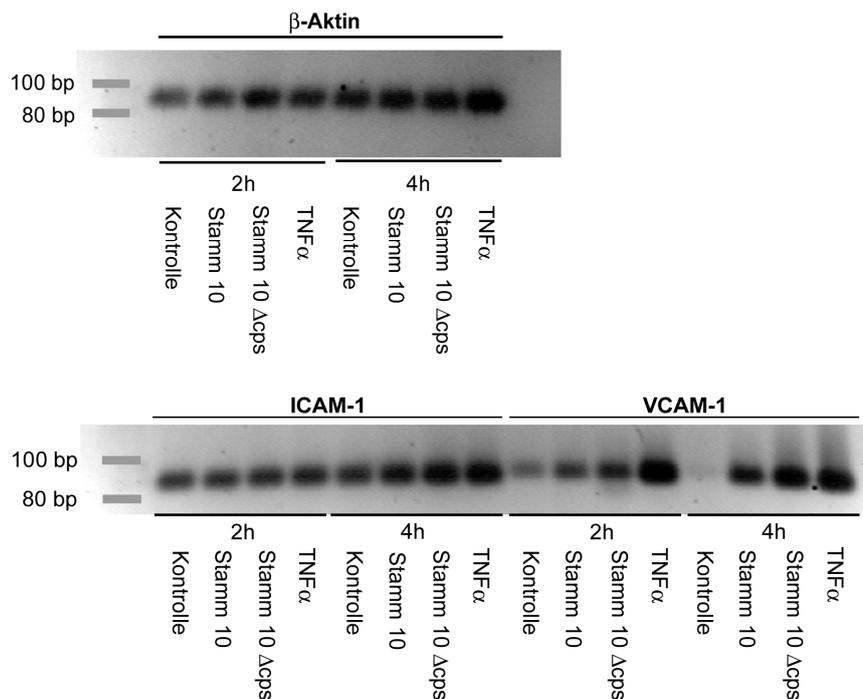


Abb. 21: Agarosegel. Nach der quantitativen *Real Time*-PCR wurden die PCR-Produkte zur Überprüfung der Spezifität auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

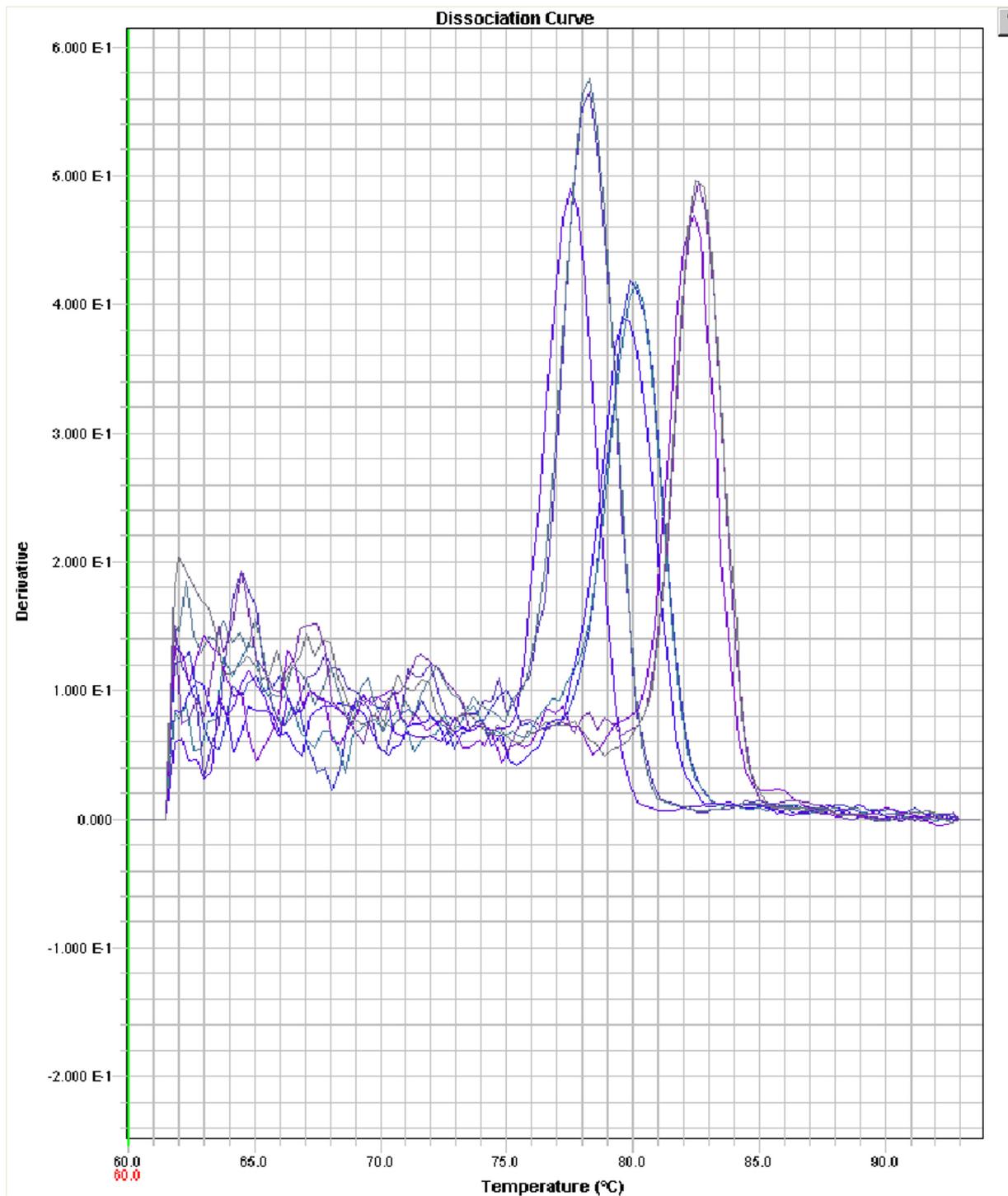


Abb. 22: Schmelzkurve. Nach der *Real Time-PCR* wurde zur Überprüfung der Spezifität eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dargestellt sind β -Aktin Kontrolle, β -Aktin 2 h $\text{TNF}\alpha$, β -Aktin 4 h $\text{TNF}\alpha$, ICAM-1 Kontrolle, ICAM-1 2 h $\text{TNF}\alpha$, ICAM-1 4 h $\text{TNF}\alpha$, VCAM-1 Kontrolle, VCAM-1 2 h $\text{TNF}\alpha$ und VCAM-1 4 h $\text{TNF}\alpha$.

6.7 Immunfluoreszenzanalyse der Interaktion von PMN und PCPEC

6.7.1 Zellvitalität der PCPEC nach der PMN-Transmigration

Damit sichergestellt ist, dass die PCPEC unter den gewählten Versuchsbedingungen intakt bleiben, wurde ihre Zellvitalität nach Ablauf der Transmigrationsversuche bestimmt. Nach der Infektion mit *S. suis*, der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und nach der Transmigration durch PCPEC mit oder ohne Verwendung von IL-8 wurde mit Hilfe des „LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kits for mammalian cells“ die Vitalität der PCPEC am Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis dieses Tests.

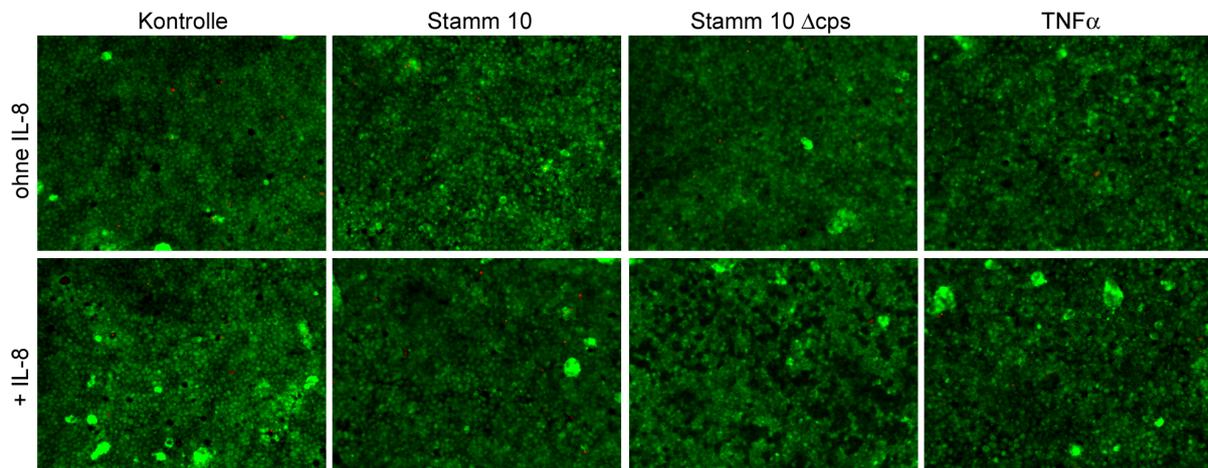


Abb. 23: Einfluss von *S. suis*, $\text{TNF}\alpha$ und der PMN-Transmigration auf die Zellvitalität. Die Zellvitalität wurde nach Ablauf der PMN-Transmigration durch unstimulierte, *S. suis*- und $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen mit und ohne IL-8 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fotos sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Unter allen Versuchsbedingungen konnten kaum abgestorbenen Zellen beobachtet werden, was an der Grünfärbung zu erkennen ist. Es kommen lediglich vereinzelte rote und damit abgestorbene Zellen vor. Somit sind die gestörte Barrierefunktion und die erhöhte Transmigration durch stimulierte Zellen nicht auf das Absterben der PCPEC zurückzuführen.

6.7.2 Immunfluoreszenz der Phagozytose von *S. suis* durch PMN

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz können von Granulozyten phagozytierte und an diese adhärenente Bakterien sichtbar gemacht werden. Abbildung 23 zeigt die Phagozytose von *S. suis* Stamm 10 (Abb. 24A) und der akapsulären isogenen Mutante Stamm 10 Δ cps (Abb. 24B) nach 4 h Inkubation mit Granulozyten in einem Verhältnis 1:1.

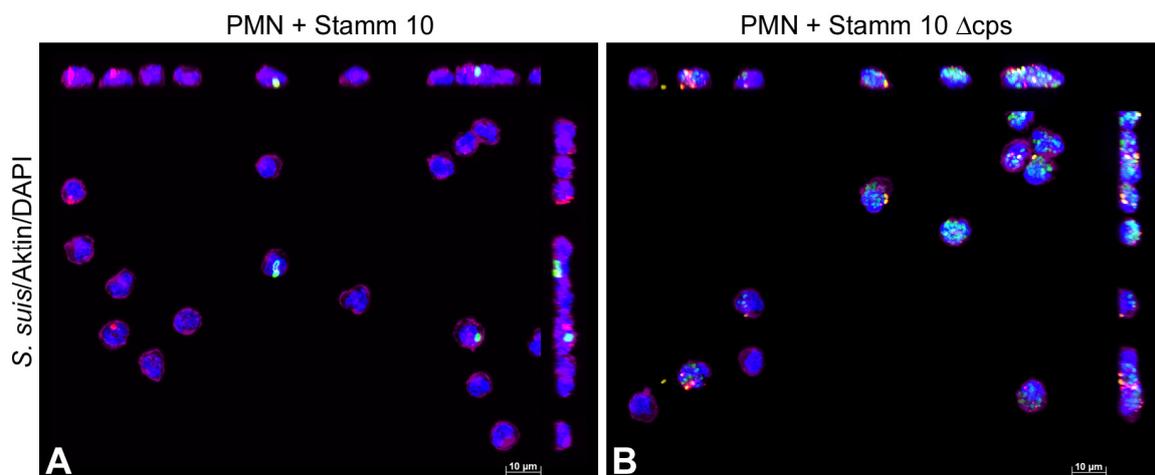


Abb. 24. Immunfluoreszenz der Phagozytose. *En face* Apotome Mikroskopie von Granulozyten (Zellkerne: DAPI: blau, Aktin-Zytoskelett (Phalloidin: violett) inkubiert mit Antibiotika-abgetöteten *S. suis* Stamm 10 (A) und Stamm 10 Δ cps (B) (phagozytierte Bakterien: grün). Oben und an der rechten Seite jedes Bildes ist der Querschnitt durch die Z-Ebene der optischen Schnitte dargestellt. Die Abbildungen sind repräsentative Beispiele von drei unabhängigen Experimenten, die dasselbe Ergebnis gezeigt haben. Maßstabbalken, 10 μ m.

Abbildung 24A zeigt klar, dass der bekapselte *S. suis* Wildtypstamm 10 kaum von den Granulozyten phagozytiert wurde. Von den hier dargestellten 15 Granulozyten haben lediglich zwei Granulozyten den Wildtyp (1-2 Bakterien) phagozytiert. Im Gegensatz dazu wurde der unbekapselte *S. suis* Stamm 10 Δ cps in hohem Maße aufgenommen (9 von 11 Leukozyten mit innen liegenden Bakterien), so dass einige Granulozyten mit Bakterien vollgefüllt sind.

6.7.3 Immunfluoreszenzanalyse der PMN-Transmigration durch PCPEC

In den folgenden Experimenten wurde getestet, ob die Veränderungen der Barrierefunktion, die durch *S. suis*, TNF α und durch Granulozyten induziert wurden, mit morphologischen Veränderungen der *Tight Junction*-Struktur und des Aktin-

Zytoskeletts einhergehen. Zudem wurden detaillierte und sequenzielle Analysen des Transmigrationsprozesses durchgeführt. Die Apotome Abbildungen zeigen eine *en face*-Ansicht der xy-Ebene auf die apikale Seite der PCPEC-Monolayer in einer Projektion durch die z-Achse sowie durch den xz- und yz-Stapel.

6.7.4 Analyse der *Tight Junction*-Struktur und des Aktin-Zytoskeletts von PCPEC nach PMN-Transmigration

In Abbildung 25 werden die Veränderungen des *Tight Junction*-Proteins ZO-1, in Abbildung 26 die des *Tight Junction*-Proteins Occludin sowie des Aktin-Zytoskeletts als Antwort auf die Infektion mit *S. suis* und die Stimulation mit TNF α während der Granulozyten-Transmigration dargestellt.

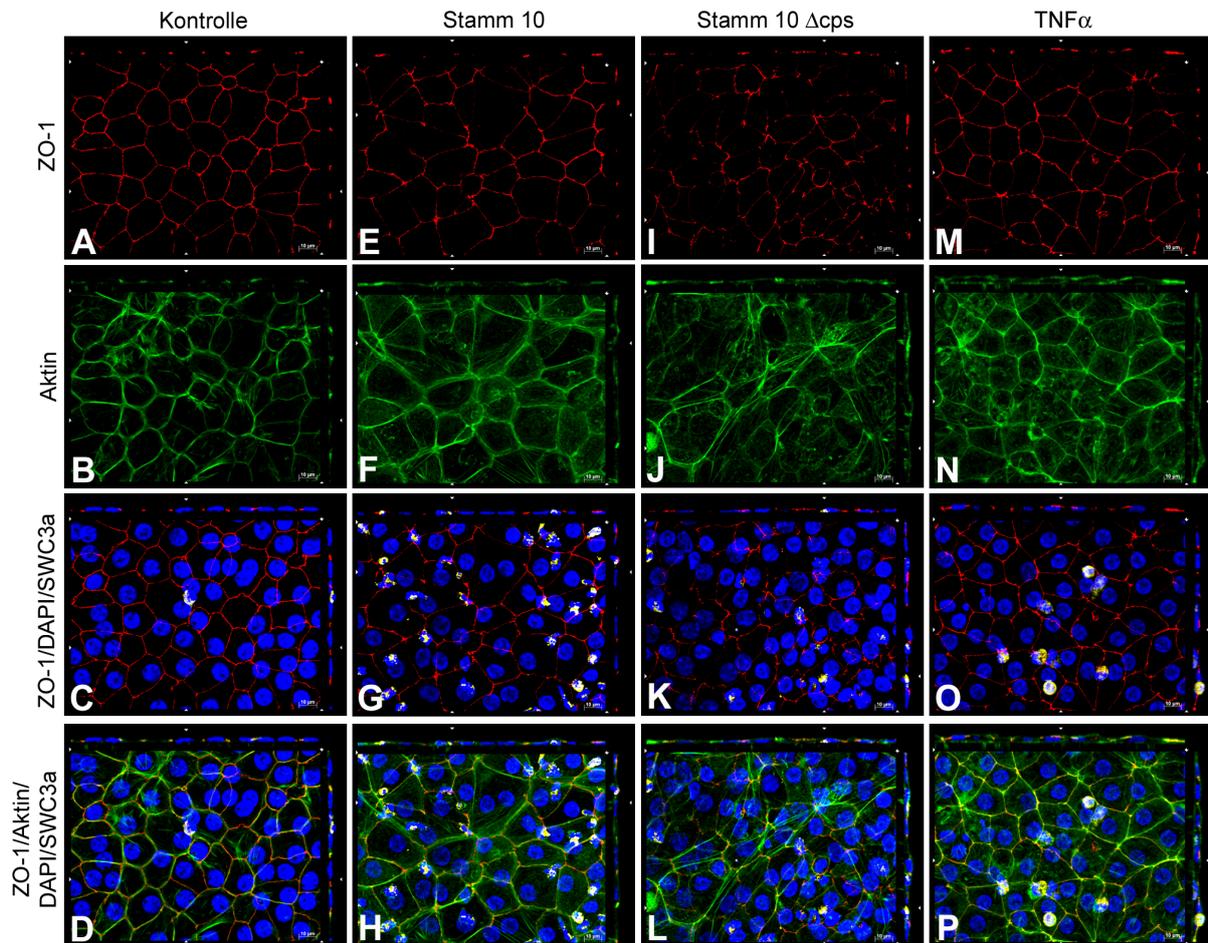


Abb. 25: Immunfluoreszenz der PCPEC (ZO-1). *En face* Apotome Mikroskopie von unstimulierten (A-D), *S. suis*- (Stamm 10: E-H, Stamm 10 Δ cps: I-L) und TNF α - (M-P) stimulierten PCPEC, deren ZO-1 (rot), Aktin-Zytoskelett (Phalloidin, grün), Zellkerne (DAPI, blau) nach PMN- (SWC3a, gelb) Transmigration gefärbt wurden. Oben und an der rechten Seite jedes Bildes ist der Querschnitt durch die z-Ebene der optischen Schnitte dargestellt. Die Abbildungen sind repräsentative Beispiele von drei unabhängigen Experimenten, die dasselbe Ergebnis gezeigt haben. Maßstab Balken, 10 μ m.

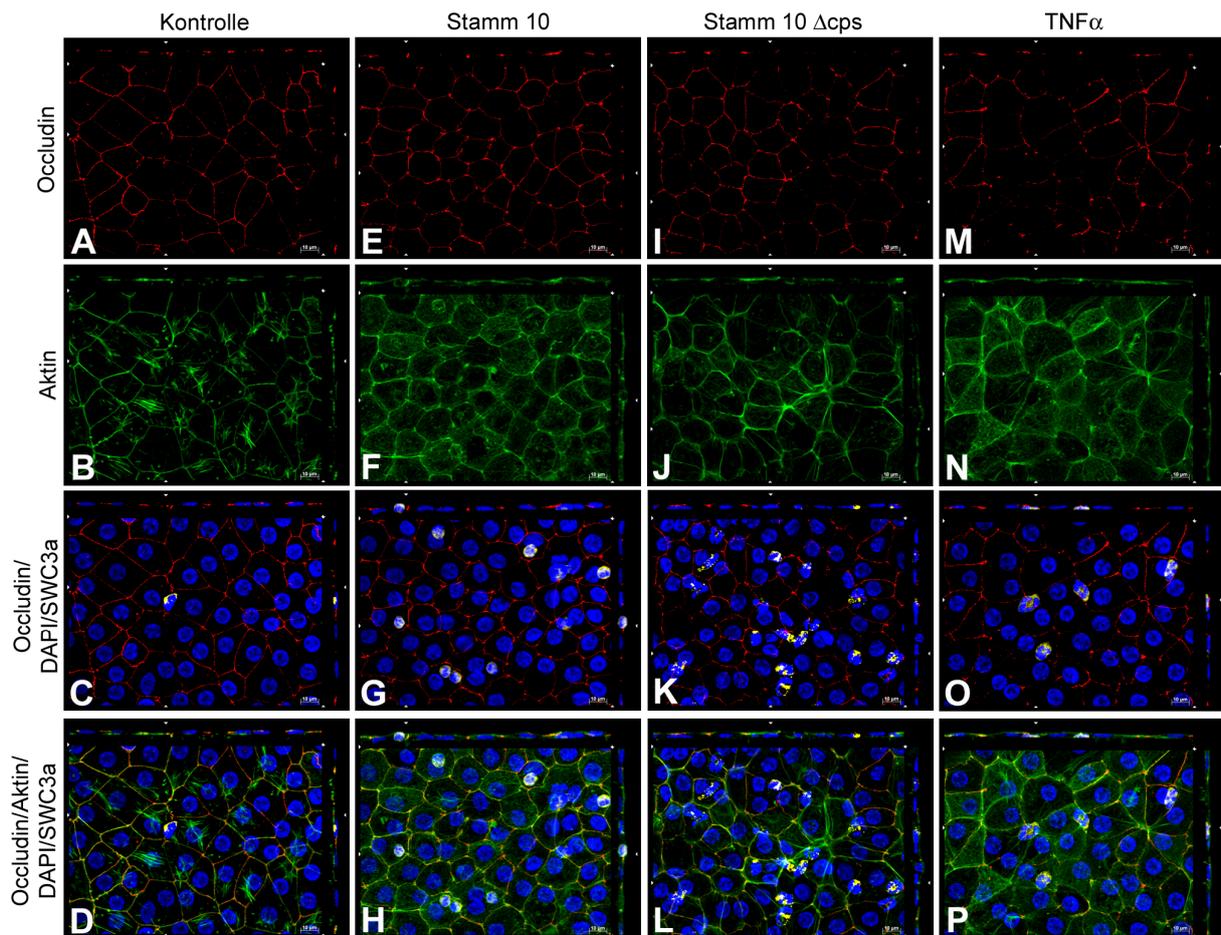


Abb. 26: Immunfluoreszenz der PCPEC (Occludin). *En face* Apotome Mikroskopie von unstimulierten (A-D), *S. suis*- (Stamm 10: E-H, Stamm 10 Δ cps: I-L) und $\text{TNF}\alpha$ - (M-P) stimulierten PCPEC, deren Occludin (rot), Aktin-Zytoskelett (Phalloidin, grün), Zellkerne (DAPI, blau) nach PMN-(SWC3a, gelb) Transmigration gefärbt wurden. Oben und an der rechten Seite jedes Bildes ist der Querschnitt durch die z-Ebene der optischen Schnitte dargestellt. Die Abbildungen sind repräsentative Beispiele von drei unabhängigen Experimenten, die dasselbe Ergebnis gezeigt haben. Maßstabbalken, 10 μm .

Wie in den Abbildungen 25 und 26 E, I, M dargestellt, zeigen *S. suis*- und $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen ein verzerrtes und zackiges Verteilungsmuster von ZO-1 und Occludin, während nicht stimulierte Zellen eine klarere und glattere Proteinexpression an den Zellgrenzen aufweisen (Abb. 25A, 26A). Die Stimulation der Zellen führte zu einer schwächeren Färbung der *Tight Junction*-Proteine, was mit den Beobachtungen einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe im Standard Transwell-System übereinstimmt (Tenenbaum *et al.*, 2008). Die Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts nicht stimulierter Zellen, die mit Granulozyten inkubiert wurden, zeigt sehr klare Strukturen und gut definierte apikale Aktinringe, die neben den *Tight Junctions* liegen, sowie kaum Bildung von Stressfasern. Nach der Stimulation wird die Struktur des Aktin-Zytoskeletts modifiziert, wobei die klare Struktur sich zu einer diffusen Färbung im apikalen und basolateralen

Zellkompartiment mit starker Ausbildung von Stressfasern hin verändert (Abb. 25 und 26 F, J,N).

6.7.5 Parazelluläre Transmigration der PMN

Die Abbildungen 27 und 28, 29 und 30 zeigen im Detail Granulozyten in verschiedenen Phasen der parazellulären Migration durch Kontrollzellen (Abb. 27), durch *S. suis* Stamm 10- (Abb. 28), durch *S. suis* Stamm 10 Δ cps- (Abb. 29) und durch TNF α -stimulierte PCPEC (Abb. 30). Die Transmigration durch nicht stimulierte PCPEC ist in Abbildung 27 dargestellt.

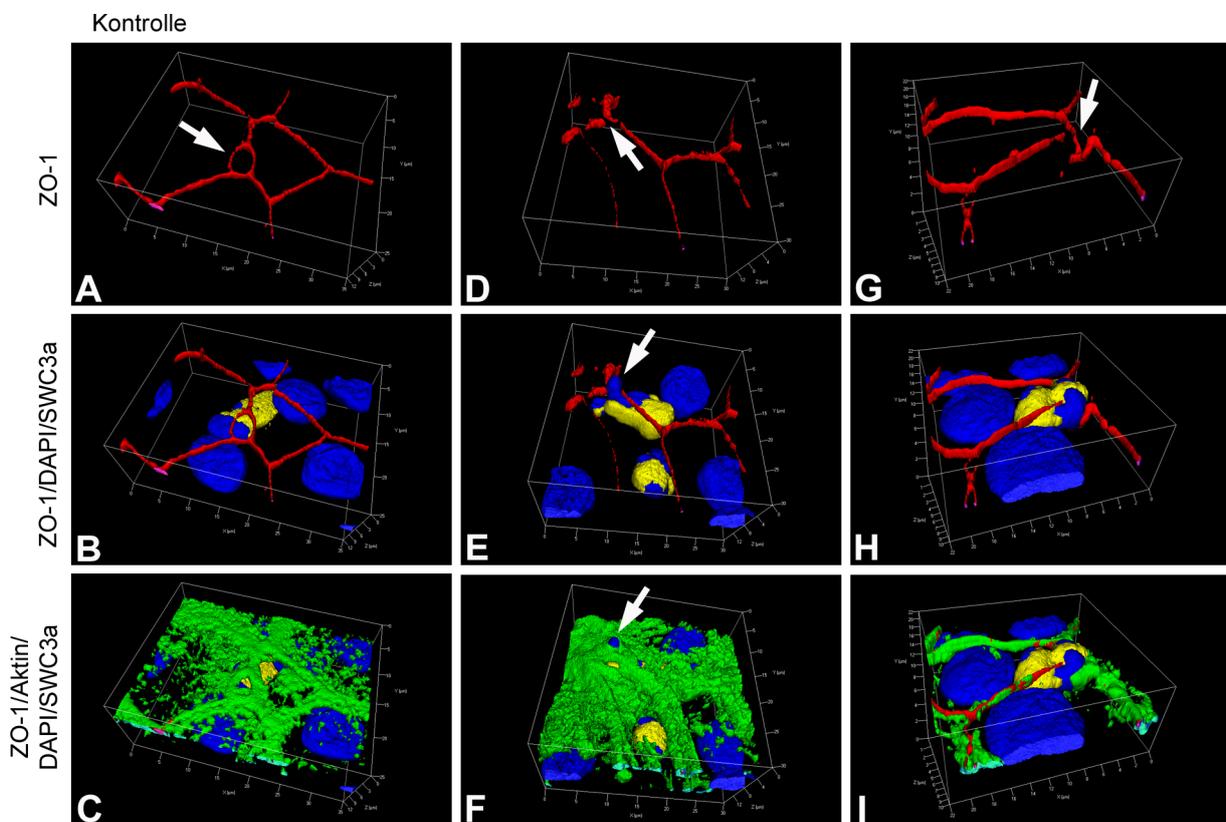


Abb. 27: 3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch unstimulierte PCPEC (ZO-1: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten (0,3 μ m) durch Kontrollzellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

In den Abbildungen 27 A-C ist ein Granulozyt gezeigt, der beginnt, sich durch eine Lücke im ZO-1 zu quetschen. Der Granulozyt liegt direkt unterhalb der ringähnlichen Struktur, die vom ZO-1 gebildet wird (Abb. 27A Pfeil, B). Das Aktin-Zytoskelett bedeckt den Granulozyten und weist keine Veränderungen auf (Abb. 27C). In den

Abbildungen 27D-F ist ein späteres Stadium der Granulozyten-Transmigration abgebildet. Der Neutrophile quetscht sich durch eine unterbrochene Region im ZO-1 (Abb. 27D, Pfeil) und ein kleiner Teil von ihm liegt schon oberhalb der *Tight Junction*-Lücke (Abb. 27E, Pfeil). Der größte Teil des Granulozyten ist jedoch noch unterhalb des Tight-Junction-Stranges lokalisiert, was auch an dem Aktin-Zytoskelett zu sehen ist, das ihn bedeckt (Abb. 27F). Lediglich ein sehr kleiner Teil des Granulozyten hat das Aktin-Zytoskelett schon durchbrochen (Abb. 27F, Pfeil). In den Abbildungen 27G-I ist der Transmigrationsprozess etwas weiter fortgeschritten als in den Abbildungen 27D-F. Der mittlere Teil des Granulozyten liegt zwischen dem ZO-1-Strang, der eine Mulde bildet (Abb. 27G, Pfeil), in die der Granulozyt gebettet ist (Abb. 27H).

Die nächsten Abbildungen zeigen drei verschiedene Stadien der Granulozytenmigration durch *S. suis* Stamm 10 infizierten PCPEC (Abb. 28).

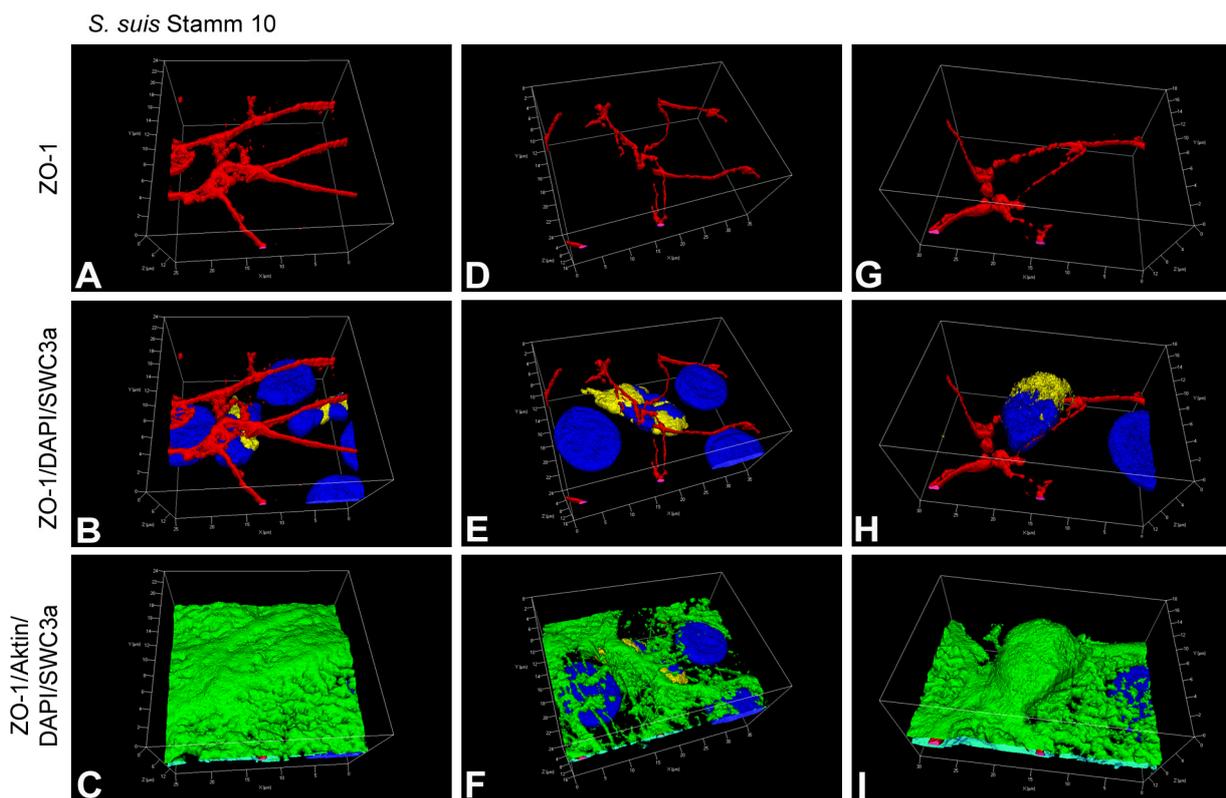


Abb. 28: 3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch *S. suis* Stamm 10-stimulierte PCPEC (ZO-1: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten ($0,3 \mu\text{m}$) durch *S. suis* Stamm 10-stimulierte Zellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

In den Abbildungen 28A-C liegt der Neutrophile noch vollständig unterhalb des *Tight Junction*-Stranges an einem trizellulären Kontakt, wobei das ZO-1 beginnt sich zu verlagern. Zu diesem Zeitpunkt zeigt das Zytoskelett noch keine Veränderungen (Abb. 28C). Auch in den Abbildungen 28D-F liegt der Neutrophile unterhalb der *Tight Junction*-Struktur (Abb. 28E), wobei diese beginnt sich zu verändern (Abb. 28D), so dass der Granulozyt durch die unterbrochene Struktur migrieren kann. Ein späteres Stadium der PMN-Migration wird in den Abbildungen 28G-I dargestellt. Der *Tight Junction*-Strang ist etwas verschoben und der Granulozyt drängt sich angrenzend durch die Epithelzelle (Abb. 28G, H). Der Granulozyt liegt in einer großen Zellausstülpung und wird von dem Aktin-Zytoskelett gleichmäßig und eng ummantelt (Abb. 28I).

Abbildung 29 zeigt die sequenzielle parazelluläre Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch *S. suis* Stamm 10 Δ cps-stimulierte PCPEC.

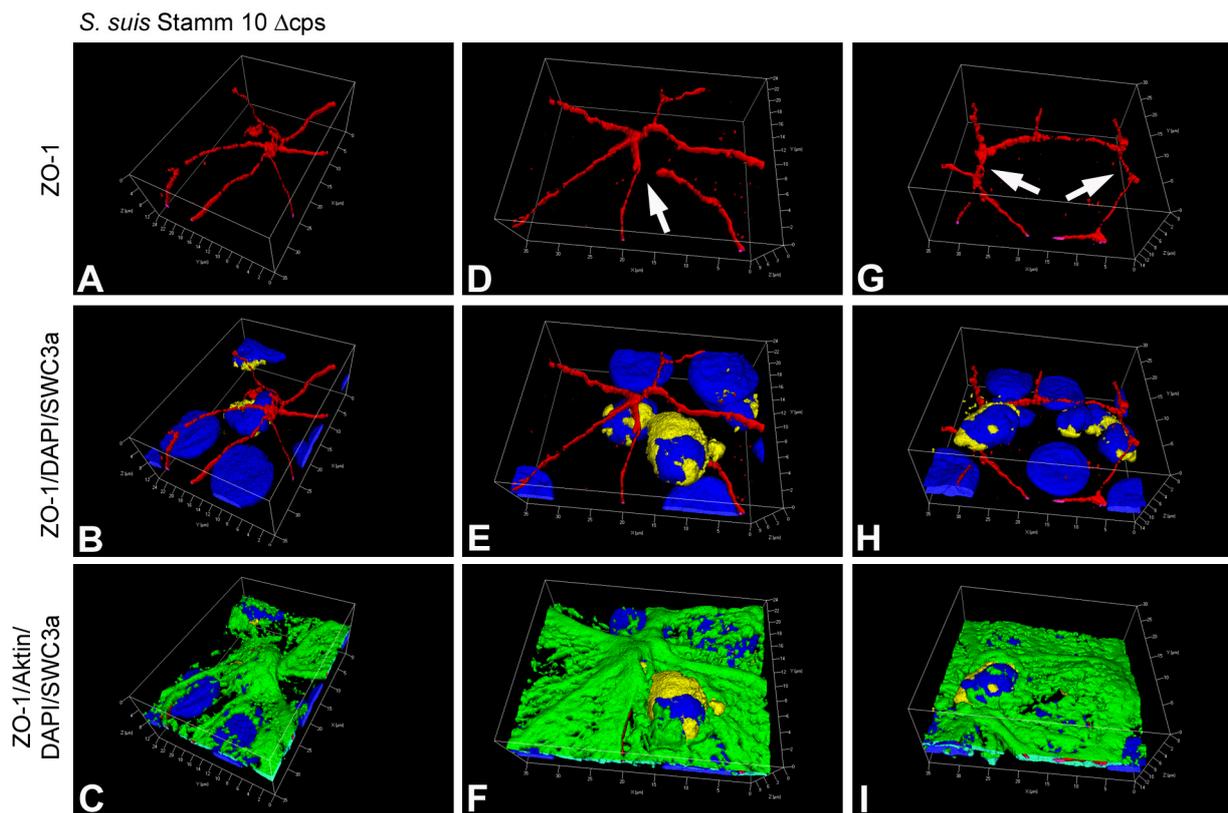


Abb. 29: 3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch *S. suis* Stamm 10 Δ cps-stimulierte PCPEC (ZO-1: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten ($0,3 \mu\text{m}$) durch *S. suis* Stamm 10 Δ cps-stimulierte Zellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

Ein frühes Stadium der Granulozyten-Transmigration ist in den Abbildungen 29A-C zu sehen. Der Granulozyt liegt unterhalb des *Tight Junction*-Stranges (Abb. 29B), wobei diese Struktur schon begonnen hat, sich zu verändern, und diffus erscheint (Abb. 29A). Das Aktin-Zytoskelett zeigt keine Veränderungen und bedeckt den Granulozyten vollständig (Abb. 29C). Im Weiteren ist eine mittlere Transmigrationsphase dargestellt (Abb. 29D-F). Der Neutrophile liegt direkt zwischen zwei Zellen (Abb. 29E), wobei der ZO-1-Strang unterbrochen zu sein scheint (Abb. 29D, Pfeil). Ein Teil hat das Aktin-Zytoskelett an der Austrittsstelle bereits durchbrochen (Abb. 29F). Die Abbildungen 29G-I zeigen zwei Granulozyten, von denen der rechte in der relativ frühen Phase noch unterhalb der intakten *Tight Junction*-Struktur (Abb. 29G, linker Pfeil) liegt, während der linke schon oberhalb der *Tight Junction*-Struktur liegt, die wieder nahezu intakt ist (Abb. 29G rechter Pfeil, H). Das Aktin-Zytoskelett ist verschoben und wurde schon zum Teil von dem Granulozyten durchquert. (Abb. 29I).

Unterschiedliche Stadien der Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch TNF α -stimulierte PCPEC sind in Abbildung 30 gezeigt.

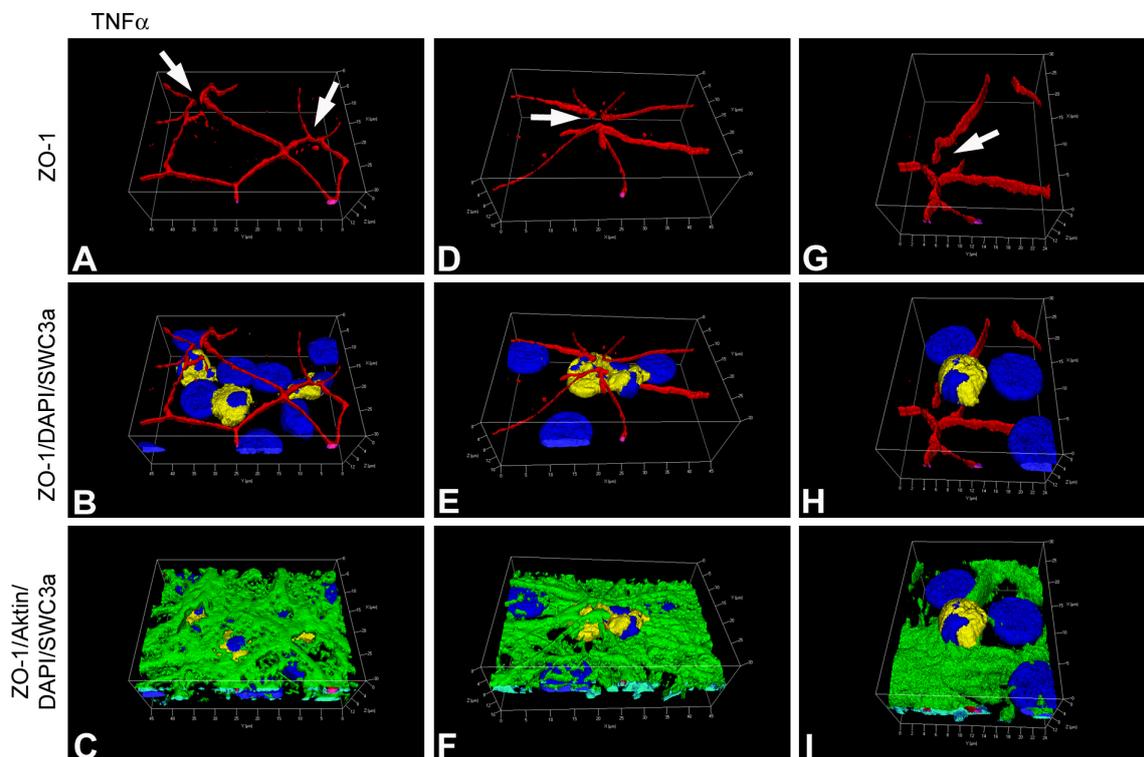


Abb. 30: 3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC (ZO-1: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten (0,3 μ m) durch TNF α -stimulierte Zellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

Dass parazelluläre und transzelluläre Transmigration zur selben Zeit an einer Zelle stattfinden können, wird in den Abbildungen 30A-C deutlich. Der zentral gelegene Granulozyt liegt transzellulär inmitten der Epithelzelle (Abb. 30B). Der links lokalisierte Granulozyt liegt unterhalb einer Lücke in der *Tight Junction*-Struktur (Abb. 30A, rechter Pfeil), der rechts lokalisierte liegt auch unterhalb, wobei hier im Gegensatz zum Linken der *Tight Junction*-Strang noch intakt ist (Abb. 30A, linker Pfeil). Ein Beispiel für die PMN-Transmigration an einem multizellulären Kontakt ist in den Abbildungen 30D-F dargestellt. Der Granulozyt ist mit der einen Hälfte schon oberhalb des *Tight Junction*-Stranges (Abb. 30E), der scheinbar eine Lücke gebildet hat (Abb. 30D, Pfeil). Das Aktin-Zytoskelett beginnt, sich zu verändern, so dass der Granulozyt hindurch migrieren kann (Abb. 30F). Schon fast gänzlich außerhalb der Aktinschicht liegt der in den Abbildungen 30G-I gezeigte Neutrophile. Der ZO-1-Strang ist unterbrochen (Abb. 30G, Pfeil) und der Granulozyt ist in dem geöffneten Aktin-Zytoskelett zu erkennen (Abb. 30I).

6.7.6 Transzelluläre Transmigration der PMN

In den mikroskopischen Analysen konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten durch Epithelzellen migrieren, indem sie neben der parazellulären Route zwischen zwei Zellen auch die transzelluläre durch den Epithelzellkörper benutzen. In Abbildung 31 ist die transzelluläre PMN-Transmigration durch unstimulierte (Abb. 31 A-D), *S. suis* Stamm 10- (Abb. 31 E-H), *S. suis* Stamm 10 Δ cps- (Abb. 31I-L) und TNF α -stimulierte (Abb. 31M-P) PCPEC dargestellt.

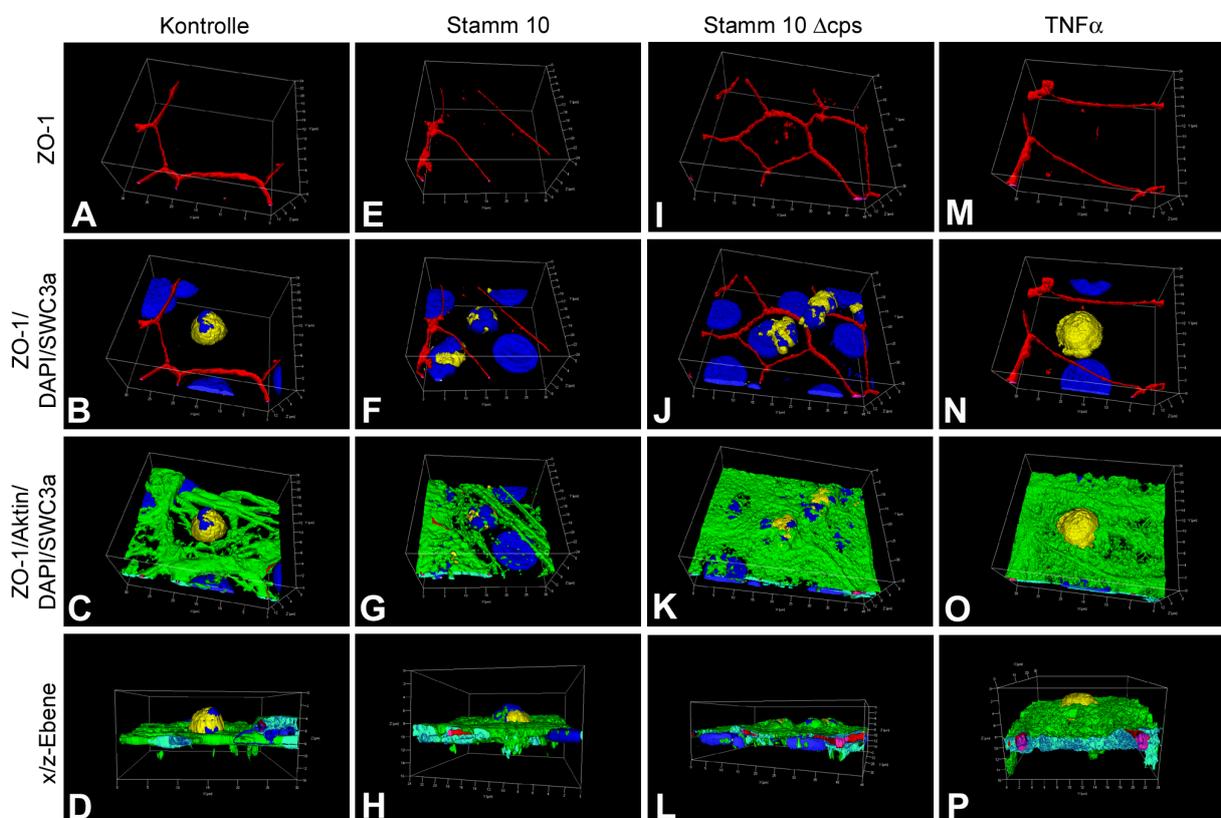


Abb. 31: 3D-Darstellung der transzellulären Granulozyten-Transmigration durch PCPEC (ZO-1: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten (0,3 μ m) durch unstimulierte Zellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen die transzelluläre Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch den Zellkörper unstimulierter (A-D), *S. suis*- (Stamm 10: E-H, Stamm 10 Δ cps: I-L) und TNF α - (M-P) stimulierter PCPEC. In D, H, L, P sind Querschnitte durch die z-Achse der PCPEC dargestellt. Die Abbildungen sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

In den Abbildungen 31 A-D ist der Granulozyt nicht in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten der unstimulierten PCPEC lokalisiert, die noch eine sehr klare und intakte Struktur aufweisen (Abb. 31A). Er liegt in der Mitte der Zelle (Abb. 31B) und beginnt

aus der Zelle auszutreten, was an dem verschobenen Aktin-Zytoskelett und dem Querschnitt deutlich wird (Abb. 31C, D). Außerdem bildet das Aktin kabelähnliche Strukturen.

Der in *S. suis* Stamm 10-stimulierten Zellen transzellulär gelegene Neutrophile (Abb. 31E-H) hat keinen Kontakt zu Zellgrenzen, die vollkommen intakt sind (Abb. 31E, F). Das Aktin-Zytoskelett bedeckt den Granulozyten nicht und bildet kabelähnliche Bündel innerhalb der Zelle (Abb. 31G). Im Querschnitt wird deutlich, dass der Granulozyt etwa zur Hälfte die Zelle durchquert hat (Abb. 31H).

In den Abbildungen 31I-L (*S. suis* Stamm 10 Δ cps-Stimulation) ist der linke Granulozyt im Zentrum der Zelle oberhalb des Zellkerns lokalisiert. Das Aktin-Zytoskelett beginnt sich zu verschieben (Abb. 31K) und wird von dem Granulozyten ausgestülpt (Abb. 31L).

Die Abbildungen 31M-P zeigen die transzelluläre Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC. Auch hier hat der Granulozyt keinen Kontakt zu den *Tight Junctions*, die eine klare Struktur aufweisen (Abb. 31M, N). Das Aktin-Zytoskelett ist an der Stelle, an der der Granulozyt die Epithelzelle verlässt, verschoben (Abb. 31O, P). In den Seitenaufnahmen (Abb. 31D, H, L, P) ist zu erkennen, dass sich die Granulozyten tatsächlich in der Zellebene der PCPEC befinden.

Da keine Unterschiede bei der Darstellung des ZO-1 und des Occludins während der Granulozyten-Transmigration zu erkennen waren, sind die unterschiedlichen Phasen der Transmigration der Neutrophilen durch unstimulierte (9.4.3, Abb. A23), *S. suis*- (9.4.3, Abb. A24) und TNF α - (9.4.3, Abb. A25) stimulierte PCPEC, in denen das *Tight Junction*-Protein Occludin gefärbt wurde, dem Anhang zu entnehmen.

6.8 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der PMN-Transmigration durch PCPEC

Anhand der Transmissionselektronenmikroskopie konnten die Ergebnisse zur para- und transzellulären Migration der Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden. Die Abbildungen 32-35 zeigen die Neutrophilen-Transmigration durch unstimulierte (Abb. 32), *S. suis* Stamm 10- (Abb. 33), Stamm 10 Δ cps- (Abb. 34) und TNF α -stimulierte PCPEC (Abb. 35) von der basolateralen (unterer Bildrand) zur apikalen (oberer Bildrand) Seite.

Abbildung 32 zeigt die para- und transzelluläre Transmigration neutrophiler Granulozyten durch unstimulierte PCPEC.

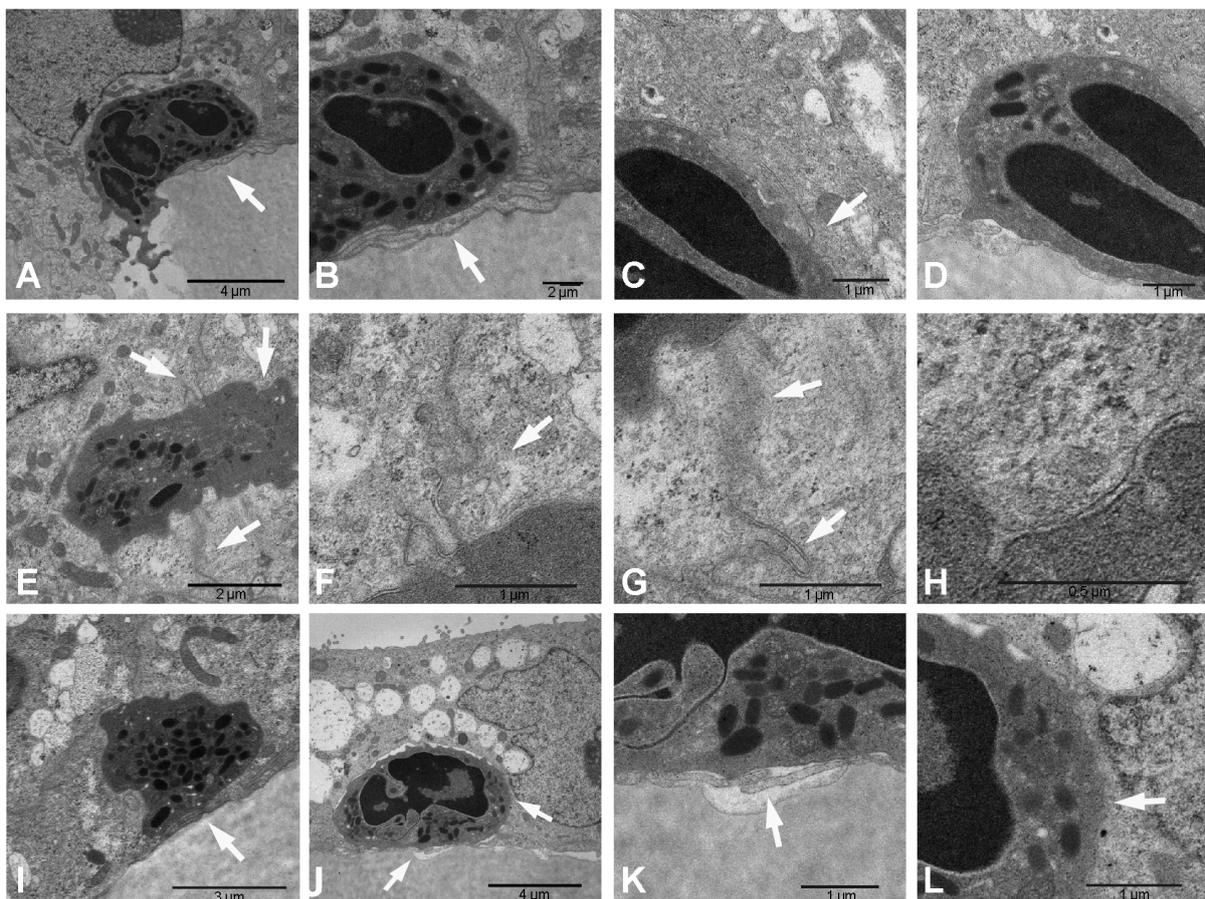


Abb. 32: Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch unstimulierte PCPEC. Die Transmigrationsrichtung ist von basolateral (unterer Rand der Bilder) nach apikal (oberer Rand der Bilder). Die Pfeile in A, E und J markieren die Stellen, die vergrößert wurden. A-D. Frühes Stadium der Transmigration in der Nähe von Zellkontakten (A, B) und zwischen diesen (C, D). E-H. Mittlere Phase der parazellulären Transmigration mit intakten Zellkontakten oberhalb (F), diffusen unterhalb des Granulozyten und erneut intakten (G) darunterliegend, sowie eine Doppelmembran (H), die die Zelle umgibt. I. Geschlossene Filopodien in einer frühen Stufe der parazellulären Transmigration. J-L. Transzellulärer Eintritt eines PMN mit Filopodien der Epithelzelle, die den Granulozyten umgeben (K), keine Doppelmembran (L). Maßstab wie angegeben.

Die Abbildungen 32 A und B zeigen die Transmigrationsroute eines Neutrophilen durch Kontrollzellen, der in den Monolayer in nächster Nähe zu den Zellgrenzen eintritt (Abb. 32A). Hervorstülpungen, die beginnen den Granulozyten zu umgeben, sind in Abbildung 32B im Detail dargestellt (Abb. 32B, Pfeil). In den nächsten Bildern ist ein Neutrophiler abgebildet, der sich zwischen zwei Epithelzellen an einer Zellgrenze in den Monolayer quetscht (Abb. 32C, Pfeil: Zellgrenze). Filopodien der Epithelzelle beginnen, den Granulozyten zu umschließen (Abb. 32D, Pfeil). Die Abbildungen 32E-H zeigen einen Granulozyten, der die parazelluläre Route nutzt und direkt in der Mitte von Zell-Zell-Kontakten liegt. Die Zellkontakte auf der apikalen Zellseite sind noch intakt (Abb. 32F, Pfeil), während die Zellverbindung direkt unterhalb des Granulozyten diffus und schlecht zu erkennen ist (Abb. 32G, oberer Pfeil). Weiter unterhalb sind die Zellkontakte wieder hergestellt und als klare Struktur zu sehen (Abb. 32G, unterer Pfeil). Außerdem ist der Granulozyt von einer Doppelmembran umgeben, wovon eine Membran zu dem Granulozyten selbst gehört, während die andere die der Epithelzellen ist (Abb. 32H). Beide Beobachtungen sprechen dafür, dass der Neutrophile zwischen den Epithelzellen liegt und daher die parazelluläre Route nutzt. Ein zweiter Granulozyt, der parazellulär liegt (Abb. 32I), ist soeben in den Monolayer eingedrungen, die Filopodien der Epithelzellen haben sich bereits geschlossen (Abb. 32I, Pfeil). Ein frühes Stadium der transzellulären Migration wird in den Abbildungen 32J-L demonstriert. Der neutrophile Granulozyt tritt in den Monolayer an einer Stelle ein, wo keine Zellkontakte vorhanden sind. Er ist von Zellaustülpungen umgeben, die ihn fast vollständig umschließen (Abb. 32K, Pfeil). Die nächste Vergrößerung zeigt klar, dass dieser Granulozyt von keiner Doppelmembran umgeben ist (Abb. 32L, Pfeil).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von neutrophilen Granulozyten, die durch *S. suis* Stamm 10-stimulierte PCPEC transmigrieren, sind in Abbildung 33 dargestellt.

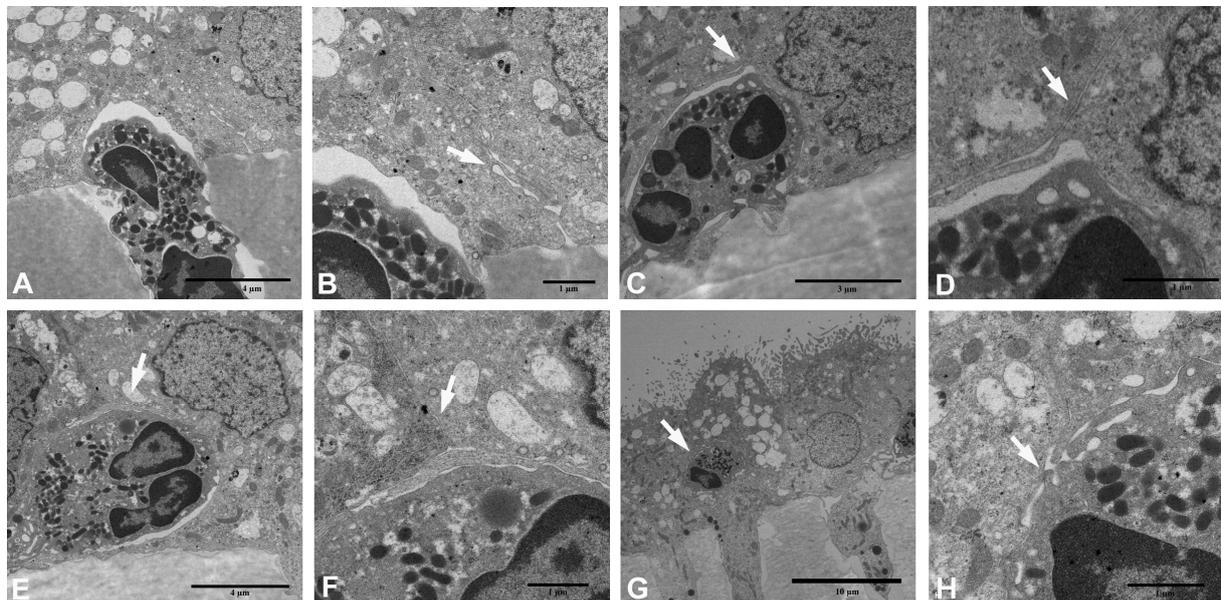


Abb. 33: Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch *S. suis* Stamm 10-stimulierte PCPEC. Die Transmigrationsrichtung ist von basolateral (unterer Rand der Bilder) nach apikal (oberer Rand der Bilder). Die Pfeile in C, E und F markieren die Stellen, die vergrößert wurden. Das rechte Bild ist jeweils die Vergrößerung des linken. A, B. Frühes Stadium: transzellulärer Eintritt in der Nähe von Zellgrenzen. C, D. Frühes Stadium: parazellulärer Eintritt zwischen Zell-Zell-Kontakten. E, F. späteres Stadium: parazellulär, Zellgrenzen öffnen sich. G, H. Mittlere Phase: parazellulär, Epithelzelle und PMN bilden über Ausstülpungen Kontakte. Maßstab wie angegeben.

Abbildung 33A zeigt ein frühes Stadium der transzellulären Migration. Der Granulozyt, der noch zum Teil in der Pore des Filters liegt, tritt neben den Zellkontakten in den Monolayer ein (Abb. 33B, Pfeil: Zellgrenze). Im Gegensatz dazu ist in Abbildung 33C der parazelluläre Eintritt eines Granulozyten zwischen zwei Zellen dargestellt. Die Zellkontakte sind in Abbildung 33D vergrößert (Abb. 33D, Pfeil). Der Transmigrationsprozess in Abbildung 33E ist im Vergleich zu Abbildung 33C etwas weiter fortgeschritten. Der Granulozyt liegt innerhalb der Zell-Zellkontakte der Epithelzellen (Abb. 33E, Pfeil), die den Granulozyten schon vollständig umschlossen hat (Abb. 33E). Eine mittlere Stufe der parazellulären Transmigration ist in Abbildung 33G gezeigt. Über Ausstülpungen der Granulozyten und der Epithelzelle bilden beide Zelltypen Kontakte auf (Abb. 33H, Pfeil).

Die Transmigration Neutrophiler durch *S. suis* Stamm 10 Δ cps-stimulierter PCPEC zeigt Abbildung 34.

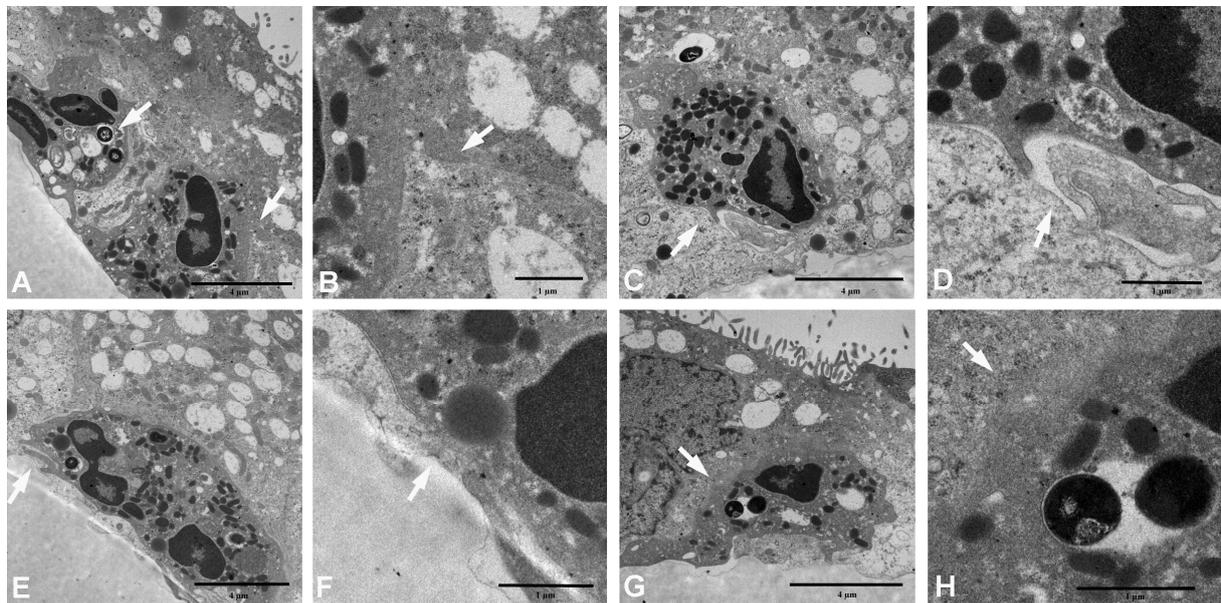


Abb. 34: Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch *S. suis* Stamm 10 Δ cps-stimulierte PCPEC. Die Transmigrationsrichtung ist von basolateral (unterer Rand der Bilder) nach apikal (oberer Rand der Bilder). Die Pfeile in A (rechter), C, E und G markieren die Stellen, die vergrößert wurden. Das rechte Bild ist jeweils die Vergrößerung des linken. A, B. Zwei Granulozyten an der basalen Seite der Granulozyten, links: mit phagozytierten Bakterien, rechts: Eintritt zwischen den Zellgrenzen. C, D. Parazellulärer Eintritt mit sich schließenden Filopodien. E, F. Parazellulärer Granulozyt mit zwei Bakterien innerhalb von Vakuolen und mit geschlossenen Filopodien. G, H. Transzellulärer Granulozyt mit zwei Bakterien innerhalb einer Vakuole. Maßstab wie angegeben.

In Abbildung 34A sind zwei Granulozyten an der basalen Seite der Epithelzellen zu sehen, von denen der linke phagozytierte Bakterien trägt (Abb. 34A, linker Pfeil). Möglicherweise trifft in diesem System die „Trojan horse“-Theorie zu, die besagt, dass Bakterien Leukozyten als trojanisches Pferd benutzen, um zelluläre Barrieren zu überwinden. Der rechte Granulozyt tritt parazellulär in den Monolayer ein. Die Zellkontakte zwischen denen der Granulozyt liegt, sind in Abbildung 34B vergrößert (Abb. 34B, Pfeil). Der in Abbildung 34C dargestellte Neutrophile liegt parazellulär zwischen zwei Epithelzellen. Die Filopodien der Epithelzellen schließen sich und nehmen somit den Granulozyten in die Zellschicht auf (Abb. 34D, Pfeil). Auch der Granulozyt in den folgenden Bildern (Abb. 34E,F) ist in einer frühen Phase der parazellulären Migration, wobei sich die Filopodien der Epithelzellen soeben geschlossen haben (Abb. 34F, Pfeil). Zudem hat der Granulozyt unbekapselte Bakterien phagozytiert. Da der in der folgenden Abbildung dargestellte Granulozyt

nicht in der Nähe von Zellgrenzen lokalisiert ist, transmigriert dieser transzellulär durch den Zellkörper der Epithelzelle (Abb. 34G). Die Vergrößerung zeigt zudem, dass dieser Granulozyt sich nicht klar von der Epithelzelle abgrenzt und von keiner Doppelmembran umgeben ist (Abb. 34H, Pfeil). Außerdem wird hier zusätzlich gezeigt, dass zwei Bakterien, die in einer Vakuole liegen, phagozytiert wurden.

Abbildung 35 zeigt die Transmigration neutrophiler Granulozyten durch TNF α -stimulierte PCPEC.

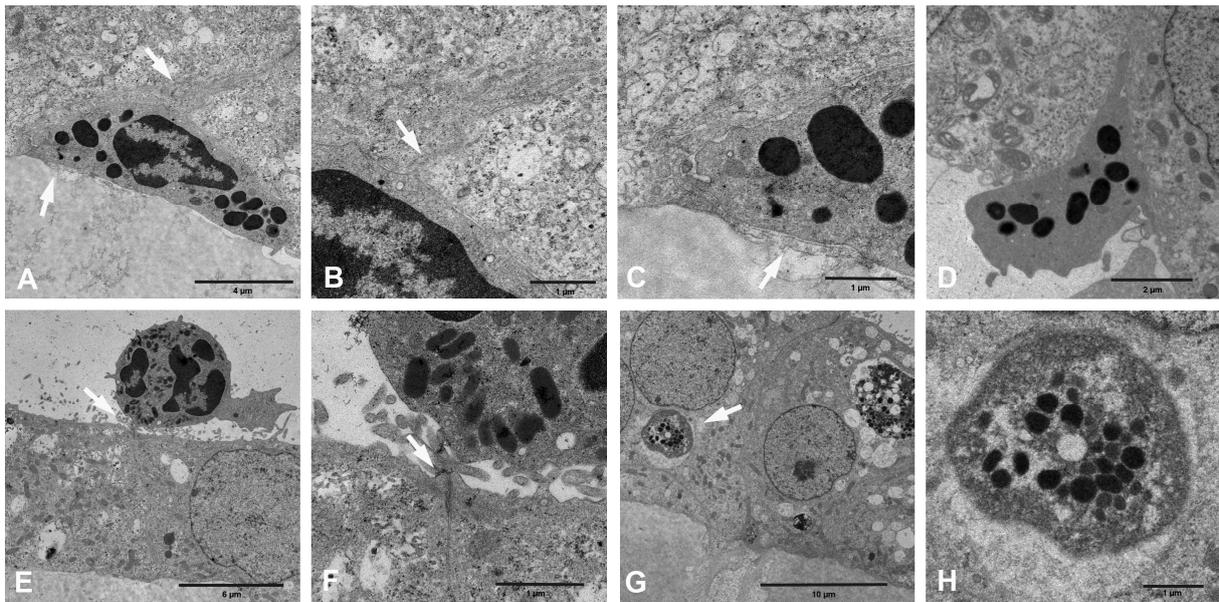


Abb. 35: Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC. Die Transmigrationsrichtung ist von basolateral (unterer Rand der Bilder) nach apikal (oberer Rand der Bilder). Die Pfeile in A, E und G markieren die Stellen, die vergrößert wurden. A-C. Frühes Stadium: parazellulärer Eintritt zwischen Zellgrenzen (B), Filopodien umschließen den Granulozyten (C). D. Frühe Phase: parazellulärer Eintritt direkt zwischen zwei Epithelzellen. E, F. Spätes Stadium der parazellulären Transmigration, Hervorstülpung der Epithelzellen am Austrittsort (F). G, H: Mittlere Phase der transzellulären Transmigration, keine Doppelmembran (H).

Wie schon bei unstimulierten Kontrollzellen und *S. suis*-stimulierten PCPEC beobachtet, dringen die Granulozyten zwischen Epithelzellen in den Monolayer ein (Abb. 35A). In der Vergrößerung sind die Zellgrenzen, zwischen die der Granulozyt sich quetscht, dargestellt (Abb. 35B, Pfeil). Zelluläre Filopodien beginnen, den Granulozyten zu umschließen (Abb. 35C, Pfeil). In Abbildung 35D ist ein Granulozyt abgebildet, der direkt zwischen zwei Epithelzellen in den Monolayer eindringt. Die Abbildungen 35E-F zeigen ein spätes Stadium der parazellulären Migration, wo der Transmigrationsprozess bereits beendet ist. Die Epithelzellen sind an der Stelle, an der der Granulozyt die Zellschicht verlassen hat, hervorstülpung (Abb. 35F, Pfeil).

Zudem sind die Zellkontakte wieder geschlossen und intakt und als definierte Struktur zu erkennen (Abb. 35F). Der in den Abbildungen 35G-H dargestellte Granulozyt liegt nicht in der Nähe von Zellkontakten und ist nicht von einer Doppelmembran umgeben (Abb. 35H), was ein Hinweis darauf ist, dass er die Zelle transzellulär durchquert.

Mit Hilfe der mikroskopischen Analysen konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal an Epithelzellen gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten offensichtlich neben der parazellulären Route auch die transzelluläre Transmigrationsroute nutzen, um die Epithelzellen des *Plexus choroideus* zu überwinden.

7. Diskussion

Ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese der bakteriellen Meningitis, nachdem die Bakterien in das ZNS gelangt sind, ist der exzessive Einstrom von Granulozyten in den Liquor, was zu einer massiven Inflammation führt. Um die Transmigration neutrophiler Granulozyten an der Blut-Liquor-Schranke zu untersuchen, wurde ein Umkehrkulturmodell der PCPEC auf Transwell Filtern verwendet, dass von unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde (Tenenbaum *et al.*, 2009). Dieses neue Zellkulturmodell ermöglicht neben der bakteriellen Infektion der PCPEC von der basolateralen Seite auch die Untersuchung der Leukozyten-Transmigration von der physiologisch relevanten basolateralen zur apikalen Epithelzelleseite.

7.1 Einwirkungen der PMN-Transmigration auf die Barrierefunktion der PCPEC

Die Transmigration von Leukozyten durch vaskuläre Endothelien oder durch Epithelien kann unter nicht-inflammatorischen Bedingungen einen Prozess darstellen, bei dem kurzfristig und reversibel die interzellulären Verbindungen geöffnet werden, ohne die Integrität der Barriere zu stören (Nash *et al.*, 1987; Parsons *et al.*, 1987, Edens *et al.*, 2002). Kommt es jedoch zu einer massiveren Transmigration, wird die Barrierefunktion beeinflusst und die parazelluläre Permeabilität nimmt zu, wie es beispielsweise für die Transmigration neutrophiler Granulozyten durch kultiviertes Darmepithel (T84) gezeigt werden konnte (Edens *et al.*, 2002).

Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich die Barrierefunktion der PCPEC nach induzierter PMN-Transmigration verhält. Weder der TEER noch die parazelluläre Permeabilität wurden durch die Anwesenheit neutrophiler Granulozyten im oberen Filterkompartiment beeinflusst. Auch die Applikation von IL-8, das in dieser Arbeit als Lockstoff eingesetzt wurde, führte zu keiner Veränderung der untersuchten Messparameter. Die kombinierte Zugabe von Granulozyten im oberen und IL-8 im unteren Kompartiment, wodurch die Transmigration induziert wurde, zeigte ebenfalls, dass die Barrierefunktion der PCPEC intakt blieb. In diesem experimentellen Ansatz konnte somit bewiesen werden, dass die Barrierefunktion weder durch die Anwesenheit der Granulozyten noch durch deren Transmigration beeinflusst wird.

Von Zeni *et al.* wurde beschrieben, dass $\text{TNF}\alpha$ als zentrales proinflammatorisches Zytokin, das nicht nur bei der bakteriellen Meningitis eine Rolle spielt, die Barrierefunktion der PCPEC im Standard Transwell-System beeinträchtigt (Zeni *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die Infektion der PCPEC mit *S. suis* mit der Stimulation dieser Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und mit unstimulierten Zellen im Umkehrkulturmodell verglichen. Die bakterielle Infektion allein führte nicht zu einem abnehmenden TEER im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen, so dass die Monolayer, die in den Transmigrationsversuchen eingesetzt wurden, eine intakte Barriere aufwiesen. Erst die Transmigration der Granulozyten durch die bakteriell stimulierten PCPEC führte zu einem signifikanten TEER-Abfall. Die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation allein führte im Gegensatz zur bakteriellen Stimulation zu einem deutlich gesenkten TEER, der durch die Transmigration der Granulozyten jedoch nicht zusätzlich gesteigert wurde. Im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen war der TR-Dextran-Fluss durch die drei Stimuli während der PMN-Transmigration leicht jedoch signifikant erhöht, so dass zusammengefasst werden kann, dass die Transmigration der Neutrophilen durch stimulierte PCPEC zu einer leicht gestörten Barrierefunktion führt.

Trotzdem kann der erhöhte TR-Dextran-Fluss allein nicht die deutlich erhöhte parazelluläre Transmigrationsrate der Granulozyten durch PCPEC erklären, da die Beeinträchtigung der Barrierefunktion mit bis zu 1% der Indikatorlösung deutlich schwächer ausfällt als die im Standard Tranwell-System nach Infektion mit *S. suis* bereits demonstrierte (Tenenbaum *et al.*, 2005, Tenenbaum *et al.*, 2008). Dort konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit lebenden *S. suis* Stamm 10 (MRP^+ , EF^+ , SLY^+) und anderen Serotyp 2 Stämmen über die Dauer von 8 h zu einem signifikanten Widerstandsabfall und zu einem parazellulären (^3H)-Mannitol-Fluss von ~5%, mit UV-inaktivierten *S. suis* S735 für 48 h zu ~7% und mit Ultraschall-inaktivierten *S. suis* S735 für 48 h zu ~20% der im oberen Kompartiment zugegebenen Indikatorlösung führte (Tenenbaum *et al.*, 2005). Dadurch wird deutlich, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Stimulation mit *S. suis* in eine minimale Kompromittierung der Barrierefunktion resultierte.

Es gibt jedoch auch gegensätzliche Daten in Hinblick darauf, ob die PMN-Transmigration selbst zu einer signifikanten Minderung der Barrierefunktion führen

kann, was jedoch vom Zelltyp und vom eingesetzten Stimulus abhängt (Edens *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2007; *reviewed* von Chin und Parkos, 2007).

Der Studie von Edens *et al.* zufolge wurde die Barrierefunktion von kultiviertem Darmepithel (T84) durch den basolateralen Kontakt mit PMN auch ohne deren Transmigration kompromittiert. Durch die Transmigration der Neutrophilen konnte dieser Effekt noch weiter verstärkt werden (Edens *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den hier ermittelten, die gezeigt haben, dass weder die Anwesenheit der PMN noch deren Transmigration durch unstimulierte PCPEC zu einer beeinträchtigten Barriere führt. Gegensätzliche Ergebnisse zeigt die Arbeit von Wong *et al.* Dort wurde die Barrierefunktion von primären HBMEC, die ein Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke darstellen, während der PMN-Transmigration untersucht. Sie konnten zeigen, dass die parazelluläre HRP- (*horseradish peroxidase*) Permeabilität zunimmt, während der TEER sinkt (Wong *et al.*, 2007). Der TEER nahm während der PMN-Transmigration durch unstimulierte HBMEC in Richtung eines fMLP-Gradienten um mehr als 50% und durch TNF α -stimulierte HBMEC um ~40% ab. Unstimulierte HBMEC + PMN wiesen zum Vergleich eine ~15% Reduktion des TEER auf (Wong *et al.*, 2007). Dieser Verlust der Barrierefunktion konnte nicht durch blockierende Antikörper, die in Inhibitionsexperimenten die Transmigration deutlich verminderten, aufgehoben werden.

Der Verlust der Barrierefunktion, der von *S. suis* und TNF α induziert wird, ist mit einer Veränderung im Aktin-Zytoskelett und der *Tight Junction*-Struktur assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Tight Junction*-Proteine ZO-1 und Occludin untersucht und bei beiden Veränderungen festgestellt. Beide Stimulationen führten von einer klaren und strukturierten zu einer schwächeren Färbung beider *Tight Junction*-Proteine. Zusätzlich konnte morphologisch ein verzerrtes und zackiges Expressionsmuster beobachtet werden. Das Aktin-Zytoskelett veränderte sich in der Art, dass der strukturierte apikale Aktinring verschwand und es zu einer diffusen Färbung und einer Umverteilung des Aktins in das basolaterale Zellkompartiment kam. Außerdem konnte eine vermehrte Bildung von Aktinstressfasern festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen im Standard Transwell-System nach ähnlicher Stimulation. Nach 24 h basolateraler und apikaler Stimulation mit TNF α (20 ng/ml) bzw. apikaler Infektion mit UV- bzw. Ultraschall-inaktivierten *S.*

suis S735 (MOI 500) konnten dort vergleichbare Veränderungen detektiert werden (Zeni *et al.*, 2007, Tenenbaum *et al.*, 2008).

Auffällig war außerdem, dass die *Tight Junction*-Struktur in Bereichen der PCPEC, durch die Granulozyten parazellulär transmigriert waren, unterbrochen war. In anderen Blickfeldern, wo Granulozyten den Monolayer bereits durchwandert hatten, war hingegen deutlich zu erkennen, dass sich die Struktur der *Tight Junctions* nach dem Transmigrationsprozess wieder neu organisiert hat. Zudem zeigen die EM-Aufnahmen Bereiche an Zell-Zell-Kontakten (32E-G), die diffus erscheinen, durch die ein Neutrophiler soeben transmigriert ist (32G). Weiter unterhalb sind jedoch auch Bereiche mit wieder hergestellten und klaren Strukturen zu erkennen, wenn der Transmigrationsprozess weiter fortgeschritten ist. Die Zellgrenzen, durch die der Granulozyt noch nicht gelangt war, erscheinen auch als klare und definierte Strukturen (Abb 31F).

Für HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) haben Burns *et al.* im Gegensatz dazu beschrieben, dass die Adhäsion und die Transmigration Neutrophiler nicht zu einer Auflösung der *Tight Junction*-Komplexe führen. Es konnte dort gezeigt werden, dass die *Tight Junction*-Proteine ZO-1, ZO-2 und Occludin während der PMN-Transmigration mit den Zellgrenzen assoziiert bleiben und nicht degradiert werden. Im Vergleich dazu wurden für ZO-1 und Occludin eine schwächere Färbung und ein verzerrtes Expressionsmuster nach PMN-Transmigration durch stimulierte PCPEC beobachtet. Außerdem haben bei HUVEC weder die PMN-Adhäsion noch die PMN-Transmigration einen Einfluss auf die Ultrastruktur der *Tight Junctions* oder auf den TEER des Endothels (Burns *et al.*, 2000). Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen der PMN-Transmigration durch PCPEC überein.

Die Beobachtungen der Immunfluoreszenzen und der Elektronenmikroskopie zur PMN-Transmigration durch die Plexusepithelien sprechen dafür, dass es sich bei den Veränderungen an den *Tight Junction*-Strängen an der Transmigrationsstelle um transiente Effekte handelt. Somit öffnen und schließen die Zellkontakte reversibel und ermöglichen den Granulozyten dadurch den Durchtritt, jedoch ohne zu einem kompletten Verlust der Barrierefunktion zu führen. Für kultiviertes Darmepithel (T84) wurde beschrieben, dass die Unterbrechung der *Tight Junction*-Struktur während der späten Vorgänge der transepithelialen Migration vorkommt. Jedoch kommt es dabei nicht zur Beeinträchtigung der Barrierefunktion, da unstimulierte Monolayer weder einen abnehmenden TEER noch eine zunehmende parazelluläre Permeabilität

aufwiesen (Edens *et al.*, 2002). Gemeinsamkeiten mit der hier durchgeführten Arbeit sind somit zum einen, dass die *Tight Junctions* an der Transmigrationsstelle unterbrochen sind und zum anderen, dass die Barrierefunktion unstimulierter Zellen intakt bleibt.

Während immunologischer Prozesse u.a. auch im Rahmen der Reaktion auf invasive Pathogene können Leukozyten durch die Zellschichten migrieren, ohne Schäden am Epithel zu verursachen (Cramer, 1992). Wie auch für PCPEC konnte dies bereits für Lungenepithel (Martin *et al.*, 1989), kultiviertes Darmepithel (Nash *et al.*, 1987) und Nierenepithel (Parsons *et al.*, 1987) beobachtet werden.

Martin *et al.* konnten in *in vivo*-Experimenten an Menschen zeigen, dass LTB₄ aktive PMN innerhalb von 4 h in die gesunde humane Lunge rekrutieren kann, ohne eine signifikante Veränderung der Proteinpermeabilität der epithelialen Barriere zu verursachen (Martin *et al.*, 1989). Weiterhin wurde in *in vitro*-Versuchen am kultivierten Darmepithel (T84) beobachtet, dass der Verlust des TEER mit einer zunehmenden makromolekularen Permeabilität der T84-Kulturen während der maximalen PMN-Transmigration in Richtung eines fMLP-Gradienten assoziiert ist. Nach Entfernen des fMLP hat sich der initiale TEER innerhalb von 18 h wieder hergestellt. Die Granulozyten überwinden auch die Darmepithel-Monolayer durch die interzellulären Kontakte und auf Grund dessen ist die Transmigration wahrscheinlich lediglich mit einer reversiblen Zunahme der epithelialen Permeabilität assoziiert (Nash *et al.*, 1987). Auch Untersuchungen am Nierenepithel (MDCK-Zellen) haben ergeben, dass, wie bei den PCPEC, die Transmigration neutrophiler Granulozyten per se keinen Einfluss auf die epitheliale Permeabilität und den TEER hat und die Zellkontakte somit lediglich kurzfristig öffnen und schließen. Erst die nachfolgenden Interaktionen zwischen den Granulozyten und den Epithelzellen führen offenbar zu einer gestörten Barrierefunktion (Parsons *et al.*, 1987).

Um die Barrierefunktion während der parazellulären Transmigration aufrechtzuerhalten, sind dichte Zell-Zell-Kontakte und stark regulierte Mechanismen zum Öffnen und Schließen der *Tight Junctions* nötig (Nash *et al.*, 1988). Frühe ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass transmigrierende Neutrophile enge Kontakte zu anderen Neutrophilen und zu benachbarten Epithelzellen ausbilden, so dass sichergestellt ist, dass die Barriere für Makromoleküle impermeabel ist (Nash *et al.*, 1988; Milks *et al.*, 1983; Nash *et al.*, 1987). Die Ultrastruktur dieser engen Kontakte erscheint vergleichbar mit denen, die während

der transendothelialen Migration Neutrophiler beobachtet wurde (Nash *et al.*, 1988). Es konnte demonstriert werden, dass die Kontaktpunkte aus spezifischen endothelialen Oberflächenmolekülen, im Besonderen JAM-A, bestehen. JAM-A bildet einen transienten Ring um den migrierenden Leukozyten und ist mit CD11a/CD18 auf den Neutrophilen kolokalisiert (Ma *et al.*, 2003, Shaw *et al.*, 2004; Zemans *et al.*, 2009). Da keine spezifischen Antikörper gegen porcines JAM-A verfügbar sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung dieses Proteins in dem PCPEC-Kulturmodell bisher nicht untersucht werden.

7.2 *S. suis* und TNF α stimulieren die PMN-Transmigration

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch das Epithel des *Plexus choroideus* in der physiologisch relevanten Blut-in-Liquor-Richtung im Umkehrkulturmodell analysiert. Für die Epithelien der Luftwege und des Darms sowie für peritoneale Mesothelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Transmigration der PMN vorzugsweise in die physiologisch relevante basolateral-in-apikal Richtung vorkommt (Liu *et al.*, 1996, Parkos *et al.*, 1991, Zeillemaker *et al.*, 1995).

Untersuchungen an H292-Luftwegepithelzellen haben ergeben, dass die PMN-Transmigration von apikal nach basolateral in Richtung von PAF- und fMLP-Gradienten kaum stattfindet, während sie in entgegengesetzter Richtung deutlich detektierbar ist. IL-8 und das Komplement Spaltprodukt C5a bewirkten zwar in beide Richtungen eine Transmigration, jedoch war diese in der physiologisch relevanten Richtung signifikant stärker. Während die Transmigration durch den Einsatz von IL-8 von der apikalen Seite bei ~15% lag, lag die Migrationsrate von basolateral nach apikal bei nahezu 50% (Liu *et al.*, 1996). Die Ergebnisse der Neutrophilen-Transmigration durch T84-Darmepithelzellen zeigten ein vergleichbares Ergebnis. Die Transmigration ausgehend von der apikalen Zellseite lag innerhalb von 110 min bei ~3% im Vergleich zu ~45% von der physiologisch relevanten basolateralen zur apikalen Seite (Parkos *et al.*, 1991). Auch Zeillemaker *et al.* haben die Relevanz der Transmigration in die physiologisch relevante Richtung nachgewiesen. Für Mesothelzellen wurde eine doppelt so effiziente Transmigration von basolateral nach apikal im Vergleich zur umgekehrten Richtung detektiert (Zeillemaker *et al.*, 1995).

In vivo findet die Transmigration neutrophiler Granulozyten am *Plexus choroideus* vom Blut in den Liquor und somit von der basolateralen zur apikalen Zellseite statt. Die soeben beschriebenen Ergebnisse waren der Anlass dafür, die PMN-Transmigration in dieser Arbeit lediglich in die physiologisch relevante Richtung zu untersuchen.

Unter Kontrollbedingungen ohne chemotaktischen Einfluss wurde innerhalb von vier Stunden eine Transmigrationsrate von 0,5% von der Gesamtzahl der im oberen Kompartiment zugebenen PMN gemessen. Dies entspricht einer absoluten Zahl von etwa 250 Granulozyten. Neben den hohen TEER-Werten und dem extrem niedrigen parazellulären TR-Dextran-Fluss betont dieses Ergebnis die Dichtigkeit der PCPEC, die unter nicht-inflammatorischen Bedingungen eine intakte Barriere bilden. Die Vorstimulation der PCPEC mit *S. suis* und $\text{TNF}\alpha$ sowie der Einfluss des Lockstoffs IL-8 hingegen führten zu einer deutlich verstärkten Transmigration.

IL-8 ist ein wirkungsvolles Chemokin und wird während einer Entzündung von unterschiedlichen Immunzellen und anderen Zelltypen wie Epithel-, Endothel- und Mesothelzellen nach der Stimulation mit anderen Zytokinen wie IL-1- β oder Bakterien freigesetzt. Dies wiederum führt zur Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten (Zeilemaker *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1996). Um eine verstärkte Transmigration auszulösen, wurde in dieser Arbeit IL-8 als Lockstoff in das untere Transwell Reservoir gegeben. Die gewählte Konzentration (10 ng/ml) wurde sowohl zuvor im Überstand *S. suis*-infizierter PCPEC (Standard Transwell-System, Manuskript in Vorbereitung) als auch in dem Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis gemessen (López-Cortés *et al.*, 1995). Daher simuliert die Applikation von IL-8 als chemotaktisches Agens in diesem experimentellen Aufbau die bakterielle Meningitis in einem hohen Maße.

Die bakterielle Infektion mit dem bekapselten *S. suis* Wildtypstamm 10 und die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin $\text{TNF}\alpha$ führte zu einer erhöhten PMN-Transmigration. Die Infektion mit *S. suis* bewirkt zum einen, dass die Barrierefunktion der PCPEC vermindert wird, so dass eine erleichterte Transmigration der Granulozyten möglich ist. Zum anderen kann die gesteigerte Transmigration von 0,5% durch unstimulierte Kontrollzellen auf 7,6% durch *S. suis* Stamm 10-vorstimulierte PCPEC jedoch nicht allein auf die erhöhte parazelluläre Permeabilität (Kontrollen: 0,3%, *S. suis* Stamm 10: 1%) zurückzuführen sein. Vielmehr bewirkt die bakterielle Infektion eine Stimulation der PCPEC zur

Freisetzung proinflammatorischer Faktoren wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-8 (Manuskript in Vorbereitung), so dass die Granulozyten-Transmigration gesteigert wird.

Auch die gesteigerte Transmigrationsrate von 0,5% auf 8,3% durch die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ hängt nicht allein mit der erhöhten Permeabilität (0,9%) zusammen. $\text{TNF}\alpha$ führt zu einer Stimulierung von Zellen, wodurch beispielsweise die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert wird (Zeni *et al.*, 2007), so dass es zu einer vermehrten Adhäsion und daraus resultierend zur gesteigerten Transmigration kommen kann.

Die Ergebnisse von Wong *et al.* stimmen mit den hier gemessenen Ergebnissen bezüglich der erhöhten Transmigration durch $\text{TNF}\alpha$ überein. Dort wird beschrieben, dass die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation (24 h) primärer HBMEC (Modell der Blut-Hirn-Schranke) eine 10-fach verstärkte Transmigration von Neutrophilen im Gegensatz zu nicht stimulierten HBMEC verursacht. Lediglich der Einsatz von fMLP konnte einen noch stärkeren Effekt (30-fach) hervorrufen (Wong *et al.*, 2007). Eine andere Studie an Epithelzellen kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Vorinkubation der renalen proximalen tubulären Epithelzellen (LLC-PK₁) mit $\text{TNF}\alpha$ resultierte in der Stimulation der Adhäsion neutrophiler Granulozyten an die Zellen und als Konsequenz daraus in einer erhöhten Migration durch die Monolayer (Joannidis *et al.*, 2004). Die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation (10 bzw. 50 ng/ml für 4 h) führte innerhalb einer Transmigrationsdauer von 5 h zu einer Erhöhung der Transmigration um den Faktor 2,6 bzw. 3,8 im Vergleich zur Transmigration in Richtung von IL-8 (= Faktor 1). Die Verstärkung der Transmigration durch Lockstoffe konnte in den hier durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Die Granulozyten-Transmigration konnte unter allen getesteten Stimuli mit Hilfe von IL-8 signifikant gesteigert werden.

Interessanterweise verursachte die Vorstimulation der PCPEC mit *S. suis* Stamm 10 Δcps keinen Anstieg der PMN-Transmigration, obwohl der Einfluss auf die Barrierefunktion mit der Wirkung, die durch den Wildtyp verursacht wurde, vergleichbar war und auch dieser Keim die Stimulation der PCPEC zur Sezernierung proinflammatorischer Produkte bewirkt (Manuskript in Vorbereitung). In der Immunfluoreszenzanalyse der Phagozytose wurde jedoch beobachtet, dass die Neutrophilen die unbekapselte Mutante in einem deutlich größeren Ausmaß phagozytiert haben als den bekapselten *S. suis* Wildtyp, der kaum phagozytiert wurde.

Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von Chabot-Roy *et al.*, in denen gezeigt werden konnte, dass das Kapselpolysaccharid von *S. suis* anti-phagozytotische Eigenschaften aufweist (Chabot-Roy *et al.*, 2006). Es wurde ebenso beobachtet, dass das Kapselpolysaccharid einen bekapselten virulenten *S. suis*-Stamm vor der Aufnahme und dem Abtöten durch Neutrophile, sogar nach Opsonisierung mit Komplement-haltigem Serum, schützt. Im Gegensatz dazu wurde eine unbekapselte Mutante unter verschiedenen Bedingungen (ohne Serum, inaktiviertes Serum, Komplement-haltiges Serum, Komplement-haltiges Serum + Kontroll-IgG, Komplement-haltiges Serum + spezifisches IgG) phagozytiert.

Die Funktion der neutrophilen Granulozyten besteht darin, als erste Wirtsabwehr zum Ort der Inflammation zu migrieren. Nach Kontakt mit den invadierten Pathogenen werden die Neutrophilen sofort aktiviert, um diese zu vernichten (Wiko-Sarsat *et al.*, 2000; Burg and Pillinger, 2001; Segal, 2005). Daher wird erwogen, dass die Granulozyten, die eine große Menge Bakterien phagozytiert haben und mit diesen vollgefüllt sind, ihre Aufgabe erfüllt und ihre Fähigkeit zur Transmigration verloren haben.

Es wurden in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen jedoch auch Neutrophile mit ein bis zwei internalisierten Bakterien beobachtet, die innerhalb von PCPEC-Monolayern lagen und offenbar transmigrierten. Möglicherweise trifft hier die viel diskutierte Theorie „Trojan horse“-Theorie zu. Sie besagt, dass Bakterien das ZNS mit Hilfe von Leukozyten invadieren. Hiernach sollen Pathogene v.a. Monozyten als „Trojanisches Pferd“ nutzen, ohne von diesen lysiert zu werden, um schließlich die Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke zu überwinden und dem Immunsystem zu entgehen. Nach der „modifizierten Trojan horse“-Theorie adhären die Bakterien außen an den Monozyten und nutzen diese so als Vehikel. Es wird spekuliert, dass diese Mechanismen für persistente Bakteriämien und disseminierte Infektionen verantwortlich sind (Williams, 1990, Segura *et al.*, 2002). Auch für virulente (opsonisierte) bekapselte *S. suis*-Stämme konnte gezeigt werden, dass *S. suis* innerhalb von murinen Makrophagen für mindestens drei Stunden überleben kann (Brazeau *et al.*, 1996). Diese Daten weisen insgesamt darauf hin, dass ein Überwinden der protektiven Hirn-Schranken von *S. suis* innerhalb des „Trojanischen Pferdes“ möglich wäre. Die elektronenmikroskopischen Daten der eigenen Studie zeigen, dass Granulozyten mit wenigen phagozytierten Bakterien in der Lage sind, PCPEC-Monolayer zu durchwandern. Möglicherweise spielt daher der erstgenannte

Mechanismus der „Trojan horse“-Theorie bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zellkultursystem eine Rolle, bei dem die Bakterien innerhalb der Leukozyten migrieren.

7.3 Beteiligung von Integrinen an der PMN-Transmigration

Die molekularen Mechanismen der PMN-Transmigration durch epitheliale Barrieren sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Für T84-Darmepithelzellen ist eine wichtige Rolle von CD11b/CD18 beschrieben, jedoch nicht für die anderen β_2 -Integrine CD11a/CD18 und CD11c/CD18 (Parkos *et al.*, 1991). Blake *et al.* haben demonstriert, dass Granulozyten T84-Darmepithelzellen unter bestimmten Bedingungen auch mit Hilfe von CD11b/CD18-unabhängigen Mechanismen überwinden (Blake *et al.*, 2004). In Richtung eines fMLP-Gradienten konnte die Transmigration der neutrophilen Granulozyten mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen CD18 vollständig inhibiert werden. Die Transmigration in Richtung anderer Lockstoffe (C5a, IL-8, LTB₄) war weniger abhängig von CD18. Bei der Verwendung von inhibierenden mAK gegen CD11a und CD11b in Transmigrationsversuchen mit C5a als Lockstoff wurde die Transmigrationsrate lediglich durch anti-CD11b-AK, jedoch nicht durch anti-CD11a, und in einem ähnlichen Maß wie durch anti-CD18-AK limitiert. Daher nutzen neutrophile Granulozyten neben CD11b/CD18 weitere Mechanismen zur Transmigration durch das Darmepithel.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Inhibitionsexperimente mit monoklonalen Antikörpern, die gegen Epitope auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten bzw. auf der Oberfläche der PCPEC gerichtet sind, durchgeführt. Die Ergebnisse, die hier erzielt werden konnten, sind größtenteils in Übereinstimmung mit denen bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Monoklonale Antikörper gegen das β_2 -Integrin CD11a der Granulozyten inhibierten deren Transmigration unter TNF α -Stimulation signifikant und zu einem geringeren Ausmaß unter Kontrollbedingungen, jedoch nur in Kombination mit anti-CD18. Unter bakterieller Stimulation war keine Inhibition zu erkennen. Durchflusszytometrische Messungen haben zudem gezeigt, dass CD11a weder durch die Einwirkung von IL-8 noch durch die Infektion mit *S. suis* oder die Stimulation mit TNF α hochreguliert wird.

Die PMN-Transmigration durch nicht stimulierte PCPEC wurde durch die anti-CD11b- und anti-CD18-Antikörper signifikant inhibiert. Die blockierenden Effekte des anti-

CD18-Antikörper waren im Vergleich zum anti-CD11b-Antikörper schwächer, was nicht unbedingt zu erwarten war, da der CD18-mAK potentiell alle β_2 -Integrine (CD11a, CD11b, CD11c und CD11d) inhibieren sollte. Möglicherweise ist jedoch die inhibitorische Aktivität der Antikörper gegen die verschiedenen porcinen Epitope im Gegensatz zum humanen System unterschiedlich effektiv. Der blockierende Effekt von anti-CD11b- und -CD18-mAK wurde jedoch nach $\text{TNF}\alpha$ - und *S. suis*-Stimulation noch signifikant verstärkt. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass unter inflammatorischen Bedingungen und während der Transmigration diese Oberflächenmarker hochreguliert werden, was für CD11b durch durchflusszytometrische Analysen bestätigt werden konnte. Diese Analyse zeigte im Einzelnen, dass CD11b im Gegensatz zu CD11a nicht nur durch den Einfluss von Bakterien und Zytokinen allein hochreguliert wurde, sondern dass seine Expression durch den Prozess der Transmigration durch das Epithel des *Plexus choroideus* an sich noch weiter erhöht wurde. Hinzu kommt, dass die Behandlung mit IL-8 (10 ng/ml) unter Kontrollbedingungen einen gewissen Einfluss auf den Expressionslevel von CD18 aufweist. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Beobachtungen zur Neutrophilen-Transmigration durch kultiviertes Darmepithel (T84) (Hofman *et al.*, 1999). Dort wurde eine massiv erhöhte CD11b/CD18-Expression nach der transepithelialen Migration detektiert. Die Hochregulation des Integrins war außerdem mit einer verstärkten Phagozytose von *E. coli* durch die Leukozyten assoziiert. Daher wurde vermutet, dass die bakterizide Wirkung der Neutrophilen stärker wird, nachdem sie in das Darmlumen gelangt sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hochregulation der Integrine auf funktioneller Ebene durchaus relevant ist. Welche Auswirkungen die erhöhte CD11b- und CD18-Expression nach der Transmigration durch PCPEC z. B. auf die Phagozytose von *S. suis* hat, sollte in weiteren Experimenten noch untersucht werden.

Inhibitionsexperimente mit mAK und durchflusszytometrische Analysen zeigten außerdem, dass die PMN-Transmigration durch das *Plexus choroideus* Epithel nicht von den β_1 -Integrinen CD49d und CD49e der Granulozyten sowie dem Integrin assoziierten Glykoprotein CD47 der Granulozyten und der Epithelzellen abhängt. Die Inhibitionsexperimente mit Antikörpern gegen CD49d, CD49e und CD47 zeigten keine inhibitorischen Effekte auf die Granulozyten-Transmigration. Außerdem waren in den durchflusszytometrischen Messungen diese Integrine nach der Transmigration

durch unstimulierte, *S. suis* Stamm 10- und $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte PCPEC nicht hochreguliert.

Zusammenfassend ist somit für die Integrine festzustellen, dass CD11b/CD18 und zu einem gewissen Maße CD11a/CD18 an der Granulozyten-Transmigration beteiligt sind. Im Gegensatz dazu konnte eine Beteiligung von CD47 sowohl auf epithelialer als auch auf leukozytärer Seite, sowie von CD49d und CD49e der Granulozyten nicht nachgewiesen werden.

Die Beobachtung dieser Arbeit, dass die Transmigration Neutrophiler durch PCPEC nicht durch CD47 vermittelt wird, steht im Gegensatz zur nachgewiesenen Beteiligung dieses Proteins an der PMN-Transmigration durch Darmepithelien und Endothelien (Chin und Parkos, 2007). Die CD47-Expression von Epithelien wird *in vitro* (T84-Darmepithel) durch inflammatorische Stimuli (fMLP) und während der Transmigration (Liu *et al.*, 2001) sowie *in vivo* in der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*, IBD) hochreguliert (Chin und Parkos, 2006). Die Blockierung von CD47 mit mAK inhibiert die parazelluläre Transmigration durch T84-Darmepithelzellen, jedoch nicht die Adhäsion an diese (Parkos *et al.*, 1996). Durch die Bindung von neutrophilem CD47 an epitheliales SIRP α wird die Transmigration zum Teil durch SIRP α -abhängige Mechanismen reguliert (Liu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). SIRP α interagiert mit den Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2, so dass Signaltransduktionskaskaden von CD47 über SIRP α und SHP-1/SHP-2 vermittelt werden (Liu *et al.*, 2002).

Die hier generierten Ergebnisse der Inhibitionsexperimente und der durchflusszytometrischen Messungen deuten klar daraufhin, dass die β_1 -Integrine nicht in die Transmigration neutrophiler Granulozyten durch das Blut-Liquor-Schranken-Modell involviert sind. Studien an anderen Zelltypen zeigen zum Teil ähnliche, zum Teil gegenteilige Resultate: in Arbeiten an Lungenfibroblasten sowie an dermalen und synovialen Fibroblasten wurde nachgewiesen, dass die Transmigration Neutrophiler durch die CD49d-, CD49f- und CD49e-Integrine vermittelt wird. In Übereinstimmung mit der PMN-Transmigration durch PCPEC ist die Transmigration durch die Bindegewebsbarrieren auch teilweise von den CD11/CD18-Integrinen, besonders jedoch von CD11b/CD18 abhängig (Gao und Issekutz, 1995, Gao und Issekutz, 1997, Shang und Issekutz, 1997). Weiterhin konnte in Monozyten-Transmigrationsexperimenten gezeigt werden, dass Monozyten

durch TNF α -stimulierte Alveolarepithelbarrieren unter Beteiligung von CD11a/CD18, CD11b/CD18 und CD11c/CD18 überwinden, was in Einklang mit den eigenen Ergebnissen steht. Daneben ist die Monozyten-Transmigration in diesem Modell abhängig von CD49d, CD49e, CD49f und CD47 auf der Oberfläche der Monozyten, sowie von ICAM-1, VCAM-1 und CD47 auf der Oberfläche der Epithelzellen, was andererseits im Gegensatz zu den eigenen Daten steht. Hingegen scheint die Transmigration unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in erster Linie von CD11b/CD18 und CD47 abhängig zu sein, wobei jedoch eine zusätzliche Beteiligung der β_1 -Integrine (CD49d, CD49e und CD49f) für eine optimale Transmigration erforderlich ist (Rosseau *et al.*, 2000). Parallel zu den hier dargestellten Resultaten wurde für ein *in vitro*-Modell des Endothels (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) gezeigt, dass CD18 in unstimulierten und IL-1 α -stimulierten HUVEC an der C5a-vermittelten Neutrophilen-Transmigration beteiligt ist. Im Gegensatz dazu scheinen die β_1 -Integrine (CD49d, CD49e und CD49f) durch IL-1 α -aktivierte HUVEC keine Rolle zu spielen (Shang *et al.*, 1999).

Inwieweit die epithelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die potentielle Liganden für die β_2 -Integrine (CD11/CD18) und die β_1 -Integrine (CD49d, CD49e und CD49f) der neutrophilen Granulozyten darstellen, an der PMN-Transmigration beteiligt sind, konnte hier nicht vollständig geklärt werden. Es wurde jedoch vielfach beschrieben, dass sie in anderen Geweben in die Leukozyten-Transmigration involviert sind. Die Beteiligung dieser beiden Adhäsionsmoleküle an der Transmigration ist jedoch abhängig vom Zelltyp. In kultivierten Darmepithel-Monolayern ist ICAM-1 jedoch nicht an der Transmigration der PMN beteiligt und ist zudem kein Rezeptor für CD11b/CD18 auf der basolateralen Zellseite (Colgan *et al.*, 1993). Andere mögliche Liganden von CD11b/CD18 auf der basolateralen Seite sind fucosylierte Glykoproteine, die die frühe Bindung während der Transmigration vermitteln könnten (Colgan *et al.*, 1995, Parkos *et al.*, 1996). Ähnlich wie in den zuvor beschriebenen Studien ist die Beobachtung, dass die Adhäsion der PMN an humanes Epithel der Luftwege unter inflammatorischen Bedingungen von ICAM-1 unabhängig, jedoch von CD11b und CD18 abhängig ist (Tosi *et al.*, 1993). Die transendotheliale Migration der meisten Leukozyten wird von ICAM-1, CD11a/CD18 und CD11b/CD18 vermittelt, während VCAM-1 offenbar nur in der Migration von Monozyten durch Endothelien eine Rolle spielt (Engelhardt und Wolburg, 2004, Weber und Springer, 1998). In dem Review von Zemans *et al.* wurde beschrieben,

dass die Interaktion von Neutrophilen und VCAM-1 während der Transmigration nicht relevant zu sein scheint (Zemans *et al.*, 2009). Dort wurden unterschiedliche Studien zitiert, die gegenteilige Ergebnisse zeigten. Die VCAM-1-Expression in bronchialen (Atsuta *et al.*, 1997) und renal tubulären (Wuthrich, 1992) Epithelzellen wird durch den Einfluss inflammatorischer Stimuli induziert. Andere Studien zeigten jedoch das Gegenteil (Jagels *et al.*, 1999). In der Arbeit von Tabary *et al.* wurde hingegen gezeigt, dass die Adhärenz von Neutrophilen an Luftwegsepithel VCAM-1 abhängig ist (Tabary *et al.*, 2006). Für Lymphozyten ist jedoch bekannt, dass VCAM-1 *in vitro* an der Migration von diesen Zellen durch retinale Pigmentepithelmonolayer beteiligt sind (Devine *et al.*, 1996). Während VCAM-1 und PECAM-1 nicht an der Adhäsion von PMN an und der Transmigration durch HBMEC beteiligt sind, ist ICAM-1 hingegen involviert (Wong *et al.*, 2008). Für die Epithelzellen des *Plexus choroideus*, an denen ultrastrukturelle Untersuchungen am Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) durchgeführt wurden, ist hinsichtlich ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1 bekannt, dass diese Moleküle auf der apikalen Zellseite lokalisiert sind, während sie am fenestrierten Plexusendothel nicht nachgewiesen werden konnten. Durch diese polare Lokalisation vermitteln ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1 die Bindung von Lymphozyten über ihre bekannten Liganden (Engelhardt *et al.*, 2001).

Auf Grund der kontroversen Berichte über die Beteiligung von ICAM-1 und VCAM-1 an der Leukozyten-Transmigration durch die unterschiedlichen endothelialen und epithelialen Zelltypen war im Rahmen dieser Arbeit von großem Interesse, inwieweit diese beiden Adhäsionsmoleküle bei der Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch die Epithelzellen des *Plexus choroideus* involviert sind und inwieweit sie im Rahmen der Inflammation hochreguliert werden.

Hierfür wurden zahlreiche verfügbare Antikörper, die gegen ICAM-1 und VCAM-1 gerichtet sind, getestet, jedoch keiner von diesen erkannte spezifisch die porcinen Adhäsionsmoleküle. Daher konnten hier weder potentielle inhibitorische Effekte noch die Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 durch Western Blot oder Durchflusszytometrie bestimmt werden. Demzufolge wurde die Expression dieser Moleküle auf mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen *Real Time*-PCR untersucht. Dazu wurden Umkehrkulturen der PCPEC mit *S. suis* Stamm 10, der unbekapselten Mutante *S. suis* Stamm 10 Δ cps und TNF α stimuliert und die mRNA-Level mit dem unstimulierten Zellen verglichen. Die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1

war deutlich erhöht, wobei VCAM-1 höher reguliert war und TNF α den stärksten Effekt ausübte. Diese Daten indizieren eine gewisse Beteiligung der Adhäsionsmoleküle an der Inflammation an der Blut-Liquor-Schranke und möglicherweise an der transepithelialen Migration von Leukozyten durch PCPEC. Weitere Untersuchungen sollen zudem die genaue Lokalisation dieser Moleküle auf den PCPEC zeigen und ihre Bindungspartner identifizieren.

7.4 Transmigrationsroute der PMN durch PCPEC

Für die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten wurde lange Zeit die parazelluläre Route zwischen benachbarten Zellen postuliert, doch mittlerweile ist die transzelluläre Route direkt durch den Zellkörper ebenso dokumentiert (Ransohoff *et al.*, 2003, Engelhardt und Wolburg, 2004). Im Gegensatz zur transendothelialen Migration gab es bisher keine Hinweise dafür, dass Neutrophile die transzelluläre Route nutzen, um Epithelien zu überwinden (Chin und Parkos, 2007; Garrido-Urbani *et al.*, 2008; Zemans *et al.*, 2009). Für andere Leukozyten, wie den Monozyten, hingegen wurde auch die transzelluläre Transmigration durch die Epithelzellen des *Plexus choroideus*, ein Prozess, der Emperiopolese genannt wird, beobachtet (Ling *et al.*, 1998)

In den hier durchgeführten Immunfluoreszenzen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte jedoch zum ersten Mal gezeigt werden, dass Neutrophile epitheliale Monolayer sowohl trans- als auch parazellulär im *in vitro*-Modell der Blut-Liquor-Barriere überwinden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die molekularen Mechanismen der neu entdeckten transzellulären Migrationsroute der PMN nur partiell aufgeklärt werden. Daraus resultierend sind diesbezüglich weitere Untersuchungen notwendig.

Transzelluläre Migration durch Endothelzellen wird durch ICAM-1, PECAM-1 und Caveoline vermittelt (Zemans *et al.*, 2008). Daher sind diese Moleküle ein begründeter Ausgangspunkt, um die transzelluläre transepitheliale PMN-Migration aufzuklären. Ein weiterer Hinweis auf den Mechanismus der transzellulären Migration kann eine Studie an murinen Endothelzellen geben. Für die transendotheliale Migration in einem Mausmodell wurde beschrieben, dass Neutrophile von Wildtyp Mäusen bevorzugt parazellulär transmigrieren, während Granulozyten von CD11b/CD18-defizienten Mäusen eher den transzellulären Weg nutzen (Phillipson *et*

al., 2006). Der Grund für diesen Unterschied wurde darauf zurückgeführt, dass die Wildtyp Granulozyten zu Zell-Zell-Verbindungen kriechen. Im Gegensatz dazu war dieses Verhalten in den CD11b/CD18-defizienten Granulozyten nicht mehr zu beobachten. Im Bezug auf das hier verwendete Modell implizieren diese Ergebnisse, dass möglicherweise CD11b/CD18 unabhängige Mechanismen existieren, die einen Teil der Neutrophilen dazu bringen, transzellulär statt parazellulär zu migrieren. Die Inhibitionsexperimente haben gezeigt, dass die Transmigration durch mAK gegen CD11b und CD18 signifikant (54% unter Kontrollbedingungen bis zu 92% Inhibition unter *S. suis*-Stimulation durch anti-CD11b/CD18), jedoch nicht vollständig blockiert werden konnte. Die verbleibenden Granulozyten könnten aus diesem Grund möglicherweise CD11b/CD18 unabhängig transmigrieren. Die transzelluläre Migration kann deshalb teilweise CD11b abhängig sein, was jedoch noch weiter untersucht werden muss.

In einer weiteren Studie von Phillipson *et al.* wurde analysiert, ob die Transmigrationsrouten einen Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion haben. In beiden Formen der Transmigration war die Zunahme der Permeabilität jedoch nahezu identisch, da das Endothel eine Kuppel über den migrierenden Granulozyten ausbildet. Dadurch wird das Endothel abgedichtet, und die geringen Veränderungen in der vaskulären Permeabilität sind auf Grund dessen unabhängig von der Migrationsroute (Phillipson *et al.*, 2008). In den elektronenmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit konnten auch Einkapselungen der Granulozyten durch die PCPEC beobachtet werden. Doch ob eine Kuppelbildung durch die Epithelzellen vorkommt, ist schwierig zu bewerten, da die Analyse der PCPEC von der basolateralen Seite durch den Transwell Filter limitiert wird.

Neben den transzellulär lokalisierten PMN konnten in den Immunfluoreszenzen und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen Granulozyten beobachtet werden, die zwischen benachbarten Zellen liegen. Es wurden zudem Neutrophile gesehen, die an trizellulären Zellverbindungen migrieren, jedoch nicht bevorzugt, wie für HUVEC Monolayer beschrieben (Burns *et al.*, 1997). In der Studie wurde dargestellt, dass 75% der Neutrophilen an trizellulären Verbindungen der HUVEC migrieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es keine Unterschiede in der Neutrophilen-Transmigration durch HUVEC gab, die *Tight Junctions* ausbildeten oder nicht. Daher transmigrieren die PMN durch diesen Zelltyp offenbar unabhängig von den *Tight*

Junctions, die zwischen den Endothelzellen ausgebildet sind, sondern eher an den Stellen, wo sie diskontinuierlich sind, an den Grenzen, wo drei Zellen aufeinandertreffen.

Im Fall der Blut-Liquor-Schranke transmigrieren neutrophile Granulozyten durch kultiviertes *Plexus choroideus* Epithel offenbar auf drei unterschiedliche Weisen: parazellulär zwischen zwei Epithelzellen, an den Grenzen zwischen drei Epithelzellen sowie transzellulär, was für Epithelzellen in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden konnte.

Die vorliegende Arbeit gibt neue Einblicke in die transepitheliale Migration neutrophiler Granulozyten und beschreibt zum ersten Mal die transzelluläre Route der Neutrophilen durch Epithelzellen. Außerdem konnten hier wichtige Mechanismen der PMN-Transmigration durch die Blut-Liquor-Schranke nach der Infektion mit *S. suis* und Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ *in vitro* beschrieben werden, die einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung von therapeutischen Strategien zur Kontrolle der neutrophilen Inflammation leisten könnten.

8. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Aufklärung der Entzündungsprozesse geleistet, die während einer bakteriellen Meningitis am *Plexus choroideus*, am Beispiel einer *S. suis*-Meningitis, auftreten. Neben den zahlreichen neu gewonnenen Erkenntnissen sind jedoch noch viele Fragen offen, die in weiteren Untersuchungen geklärt werden sollen.

Die molekularen Mechanismen, die hinter der PMN-Transmigration stehen, konnten in weiten Teilen entschlüsselt werden. Hier wurden zahlreiche Integrine identifiziert, die an der Transmigration beteiligt sind (CD11a/CD18, CD11b/CD18), jedoch konnten auch einige ausgeschlossen werden, die keine Beteiligung zeigen (CD47, CD49d, CD49e). Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 wurden unter den getesteten Stimuli auf molekularbiologischer Ebene hochreguliert, so dass ihre Beteiligung auch möglich ist. Da es bisher keine spezifischen Antikörper für diese Proteine vom Schwein gibt, steht der endgültige Beweis noch aus, sollte jedoch nachgeholt werden, sobald Antikörper verfügbar sind. Dasselbe gilt für die Beteiligung von JAM-A in dem hier untersuchten Prozess.

Mit Hilfe der Inhibitionsexperimente konnte eine Beteiligung von CD11b/CD18 an der Transmigration neutrophiler Granulozyten durch die Epithelzellen des *Plexus choroideus* nachgewiesen werden. Außerdem haben die durchflusszytometrischen Messungen eine Hochregulation dieses Integrins durch den Transmigrationsprozess gezeigt. Die funktionelle Relevanz ist hier jedoch noch nicht untersucht worden, so dass dies ein möglicher Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen wäre. Es gibt Hinweise darauf, dass die phagozytotische Aktivität zur Aufnahme von *E. coli* verstärkt ist, so dass in diesem System die mögliche Phagozytose von *S. suis* durch die Neutrophilen nach der Transmigration von Interesse ist.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit an Epithelzellen nachgewiesen werden, dass Neutrophile die Epithelzellen des *Plexus choroideus* transzellulär überwinden können. Auf Grund dessen gibt es noch keine Hinweise darauf, wie der Mechanismus der transzellulären Route am Epithel abläuft. Zur Aufklärung dieser

Mechanismen sollten sich die Untersuchungen dazu an den Erkenntnissen zur transzellulären endothelialen Migration orientieren.

Desweiteren gaben die elektronenmikroskopischen Aufnahmen Hinweise darauf, dass *S. suis* die Blut-Liquor-Schranke innerhalb von Granulozyten überwindet und somit in diesem System möglicherweise die „Trojan horse“-Theorie zutrifft. Weitere Untersuchungen zur Absicherung dieser Theorie sind nötig, um sie zu bestätigen. Es muss analysiert werden, ob die Bakterien der Lyse durch die Granulozyten entgehen und diese nach dem Überwinden der Barriere wieder verlassen. Auch die Mechanismen, wie sie der Wirtsabwehr entgehen, sollten geklärt werden.

Neben polymorphkernigen Neutrophilen spielen weitere Leukozyten eine große Rolle während der Inflammation. Der Bedeutung der Transmigration von Monozyten besonders in Hinsicht auf die „Trojan horse“-Theorie sollte in weiteren Untersuchungen Beachtung geschenkt werden.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse wurden an einem *in vitro*-Kulturmodell mit Schweinezellen generiert. Von besonderem Interesse wäre jedoch, diese Ergebnisse mit denen am humanen System zu vergleichen. Aus ethischen Gründen wird es jedoch schwierig sein, Material vom humanen *Plexus choroideus* zu erhalten. Eine humane Zelllinie wäre jedoch eine gute Alternative zu Primärkulturen, um die bakterielle Meningitis mit anderen relevanten Erregern wie *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* oder *Streptococcus pneumoniae*, die beim Menschen vorkommen, und die Interaktion mit Leukozyten zu untersuchen.

9.1 Zusammenfassung

Streptococcus suis (*S. suis*) Serotyp 2 ist weltweit ein wichtiger Krankheitserreger beim Schwein, kommt jedoch auch beim Menschen als Zoonose vor. Meningitis zählt zu den Erkrankungen, für die *S. suis* verantwortlich ist. Der *Plexus choroideus*, der die strukturelle Basis der Blut-Liquor-Schranke bildet, ist eine mögliche Pforte für *S. suis*, um in das zentrale Nervensystem (ZNS) zu gelangen. Das Kapselpolysaccharid (KPS) von *S. suis* ist bisher der einzige erwiesene Virulenzfaktor. Wie bereits durchgeführte Experimente an einem Umkehrkultursystem auf Transwell Filtern gezeigt haben, invadiert *S. suis* porcine *Plexus choroideus* Epithelzellen (PCPEC) spezifisch von der physiologisch relevanten basolateralen Seite in Abhängigkeit von der Expression der Kapsel. Ein kritischer Punkt im Verlauf einer Meningitis ist das exzessive Eindringen von polymorphnukleären Neutrophilen (PMN) vom Blut in das Gehirn. Im Gegensatz zu der bakteriellen Invasion war die PMN-Transmigration nach der Infektion mit der unbekapselten *S. suis*-Mutante Stamm 10 Δ cps signifikant geringer im Vergleich zu dem Wildtypstamm oder der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$. Die Barrierefunktion wurde durch die Granulozyten-Transmigration allein nicht signifikant beeinträchtigt, jedoch in Kombination mit einer *S. suis*-Infektion. Durchflusszytometrische Messungen und Transmigrations-Inhibitionsexperimente mit Antikörpern, die spezifisch gegen Integrine gerichtet waren, zeigten, dass die Transmigration Neutrophiler vor allem von CD11b/CD18, weniger von CD11a/CD18 und nicht von CD47, CD49d und CD49e abhängig ist. Die Analyse der Zelladhäsionsmoleküle der PCPEC ergab eine signifikante Hochregulation der ICAM-1 und VCAM-1 mRNA-Expression nach $\text{TNF}\alpha$ - und *S. suis*-Stimulation. Anhand der sequentiellen Analysen der PMN-Transmigration mit Hilfe von Apotome®-Immunfluoreszenzen und der Transmissionselektronenmikroskopie wurde neben der parazellulären Route zum ersten Mal für Epithelien auch die transzelluläre Route von Granulozyten beobachtet, die zum Teil auch Bakterien phagozytiert hatten. Außerdem wurden die Aufnahme der Neutrophilen in den Monolayer, transientes Öffnen und Schließen der *Tight Junctions*, sowie Veränderung im Aktin-Zytoskelett und der *Tight Junction*-Struktur beobachtet. Diese Daten unterstreichen die Relevanz der Blut-Liquor-Barriere als Pforte für die Leukozyten, um entweder transzellulär oder parazellulär in das ZNS zu gelangen. Außerdem fanden sich Hinweise für einen „Trojan horse“-Mechanismus in der Pathogenese der *S. suis*-Meningitis.

9.2 Summary

Streptococcus suis (*S. suis*) serotype 2 is an important agent of diseases including meningitis among pigs worldwide, and is also a zoonotic agent. The choroid plexus, which constitutes the structural basis for the blood-cerebrospinalfluid (CSF)-barrier, is a possible entry for *S. suis* for invading the central nervous system (cns). The capsular polysaccharide (cps) of *S. suis* is to date the only proven virulence factor. As previous experimental studies in an “inverted” Transwell culture system could show for the first time, *S. suis* invades porcine choroid plexus epithelial cells (PCPEC) specifically from the physiologically relevant basolateral side in a capsule dependent manner. A critical point during the course of meningitis is the excessive influx of polymorphnuclear neutrophils (PMNs) from the blood into the brain. In contrast to previous bacterial invasion experiments, PMN transmigration was significantly lower after infection with the non-encapsulated *S. suis* mutant Stamm 10 Δ cps compared to its wild-type Stamm or stimulation with TNF α . Barrier function was not significantly affected by PMN migration alone, but in combination with *S. suis* infection. Flow cytometric and transmigration inhibition studies with integrin-specific antibodies showed that PMN traversal is predominantly dependent on CD11b/CD18, less on CD11a/CD18 and not on CD47, CD49d and CD49e. Analysis of the cell adhesion molecules on PCPEC revealed a significant increase of ICAM-1 and VCAM-1 mRNA-expression after TNF α and *S. suis* stimulation. Most strikingly, sequential analysis of the PMN transmigration process with Apotome®-imaging and electron microscopy revealed transcellular as well as paracellular transmigration of PMNs, which in part contained bacteria. Beside neutrophil engulfment, transient opening and resealing of tight junctions and cytoskeletal actin and tight junction reorganisation were observed. Our data underline the relevance of the blood-CSF-barrier as a gate for leukocyte entry into the CNS via the transcellular as well as the paracellular route and show a possible role of the *Trojan horse* mechanism in the pathogenesis of *S. suis* meningitis.

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Ω	Ohm
°C	Grad Celcius
μ	mikro (10^{-6})
Abb.	Abbildung
AC	<i>astrocyte</i>
Ara-C	Cytosinarabinosid
BL	Basallamina
BM	<i>basement membrane</i>
BPI	<i>Bactericidal permeability inducing protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cln-1	Claudin-1
CP	<i>Plexus choroideus</i>
cps	<i>capsular polysaccharide</i>
CR3	Komplementrezeptor 3
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
C_T	<i>cycle threshold</i>
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC	<i>epithelial cell</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat,
ESAM	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fötales Kälberserum

fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
G-CSF	Kolonie-stimulierenden Faktoren für Granulozyten
GM-CSF	Kolonie-stimulierenden Faktoren für Granulozyten/Makrophagen
h	Stunde
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cells</i> , humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , humane Nabelschnurvenen Endothelzellen
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i> ,
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>
kDa	Kilodalton
KPS	Kapselpolysaccharid
l	liter
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LFA	<i>leukocyte function-associated antigen</i>
LLC-PK ₁	porcine renale Epithelzelllinie mit Eigenschaften proximaler tubulärer Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
LTB	Leukotrien B
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
MAC-1	Makrophagenantigen 1
MAdCAM	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MDCK	<i>Madin-darby canine kidney</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
MNC	Mononucleäre Zellen
MOI	<i>multiple of infection</i>
n	nano (10^{-9})
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>pericyte</i>
PCPEC	<i>porcine choroid plexus epithelial cells</i>
PECAM	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PMN	Polymorphnucleäre neutrophile Granulozyten
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
SIRP	<i>signal regulatory protein</i>
sp.	<i>species</i>
SWC	<i>swine workshop cluster</i>
Tab.	Tabelle
TACE	<i>TNFα-converting enzyme</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i> Transepithelialer elektrischer Widerstand
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THB	Todd-Hewitt Broth
THP-1	humane Monozytenzelllinie
TJ	<i>Tight Junctions</i>

TJ	<i>Tight Junction</i>
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF α -Rezeptor
TR	Texas Red
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
vgl.	Vergleich
VLA	<i>very late antigen</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z. T.	zum Teil
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

10.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tabelle 1	56
Pipettierschema für den Ansatz der <i>Real Time</i> -PCR	
Abbildung	
1	6
Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine cerebrale Kapillare	
2	7
Aufbau des menschlichen Gehirns mit dargestelltem Liquor-Fluss	
3	9
Schematische Darstellung von Zell-Zell-Verbindungen an der Blut-Hirn-Schranke.	
4	12
Infektionsverlauf einer bakteriellen Meningitis	
5	14
Penetrationswege der Erreger	
6	18
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines porcinen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	
7	23
Transendotheliale Migration von Neutrophilen.	
8	24
Transepitheliale Migration von Neutrophilen	
9	27
Länder bzw. Regionen, in denen humane <i>S. suis</i> -Infektionen registriert wurden	
10	28
<i>S. suis</i> auf Schafblutagar.	
11	44
<i>In vivo</i> -Situation des <i>Plexus choroideus</i> vs. <i>in vitro</i> -Zellkulturmodell der Blut-Liquor-Schranke.	
12	45
eines intakten PCPEC-Monolayers als Umkehrkultur auf Transwell-Filtern	
13	58
Effekt von IL-8 und der neutrophilen Granulozyten (PMN) auf die Barrierefunktion der PCPEC	
14	60
Barrierefunktion der PCPEC während der PMN-Transmigration unter <i>S. suis</i> -Infektion und TNF α -Stimulation.	
15	61
Effekt von <i>S. suis</i> und TNF α auf die PMN-Transmigration durch PCPEC.	
16	63
Inhibitorische Effekte monoklonaler Antikörper gegen CD11a, CD11b und CD18 auf die PMN-Transmigration durch unstimulierte, <i>S. suis</i> Stamm 10- und TNF α -stimulierte PCPEC	
17	64
Inhibitorische Effekte monoklonaler Antikörper gegen CD47, CD49d und CD49e auf die PMN-Transmigration durch unstimulierte, <i>S. suis</i> Stamm 10- und TNF α -stimulierte PCPEC	

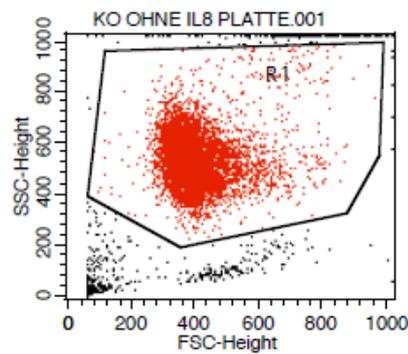
18	Durchflusszytometrische Analyse der CD11a-, CD11b- und CD18-Expression der Granulozyten abhängig von IL-8 und ihrer Transmigration nach <i>S. suis</i> -Infektion und TNF α -Stimulation	66
19	Durchflusszytometrische Analyse der CD47-, CD49d- und CD49e-Expression der Granulozyten abhängig von ihrer Transmigration nach <i>S. suis</i> -Infektion und TNF α -Stimulation	67
20	Quantitative Real-Time PCR zum Effekt von <i>S. suis</i> und TNF α auf die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in PCPEC.	68
21	Agarosegel.	69
22	Schmelzkurve	70
23	Einfluss von <i>S. suis</i> , TNF α und der PMN-Transmigration auf die Zellvitalität	71
24	Immunfluoreszenz der Phagozytose	72
25	Immunfluoreszenz der PCPEC (ZO-1)	73
26	Immunfluoreszenz der PCPEC (Occludin)	74
27	3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch unstimulierte PCPEC	75
28	3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PCPEC	76
29	3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch <i>S. suis</i> Stamm 10 Δ cps-stimulierte PCPEC	77
30	3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC	78
31	3D-Darstellung der transzellulären Granulozyten-Transmigration durch PCPEC	80
32	Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch unstimulierte PCPEC	82
33	Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PCPEC.	84
34	Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch <i>S. suis</i> Stamm 10 Δ cps-stimulierte PCPEC	85
	Transmissionselektronenmikroskopie der Granulozyten-Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC.	86

A1	Unstimulierte PMN.	117
A2	Analyse von CD11a. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	118
A3	Analyse von CD11a. <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	119
A4	Analyse von CD11a. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	120
A5	Analyse von CD11R3 (=CD11b). PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	121
A6	Analyse von CD11R3 (=CD11b). <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	122
A7	Analyse von CD11R3 (=CD11b). TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	123
A8	Analyse von CD18. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	124
A9	Analyse von CD18. <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	125
A10	Analyse von CD18. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	126
A11	Unstimulierte PMN	127
A12	Analyse von CD47. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	128
A13	Analyse von CD47. <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	128
A14	Analyse von CD47. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	129
A15	Abb. A15: Analyse von CD49d. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	130
A16	Analyse von CD49d. <i>S. suis</i> Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	130
A17	Analyse von CD49d. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	131
A18	Analyse von CD49e. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	132

A19	Analyse von CD49e. <i>S. suis</i> Stamm 10 stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	132
A20	Analyse von CD49e. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration	133
A21	Profil der <i>Real Time</i> -PCR	134
A22	Profil der <i>Real Time</i> -PCR	135
A23	3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch unstimulierte PCPEC	136
A24	3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC	136
A25	3D-Darstellung der transzellulären (A-C) und parazellulären (D-I) Granulozyten-Transmigration durch <i>S. suis</i> Stamm 10 (A-F) und Stamm 10 Δ cps (G-I)-stimulierte PCPEC	137

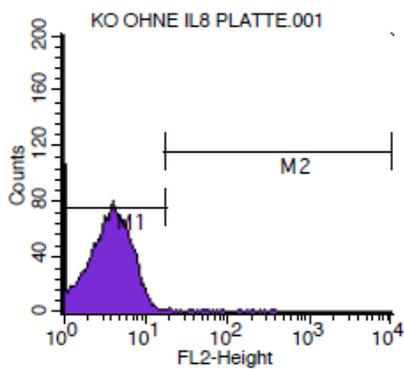
10.3 Diverses

10.3.1 Histogramme der Durchflusszytometrie



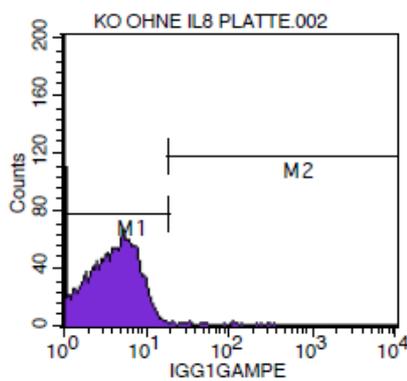
File: KO OHNE IL8 PLATTE.001
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Region	Events	% Gated	% Total
R1	9427	94.27	94.27



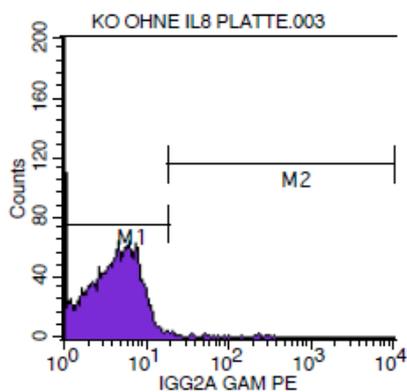
File: KO OHNE IL8 PLATTE.001
 Gate: G1
 Gated Events: 9427
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	4.42
M1	99.62	4.04
M2	0.38	102.37



File: KO OHNE IL8 PLATTE.002
 Gate: G1
 Gated Events: 9438
 Total Events: 10000

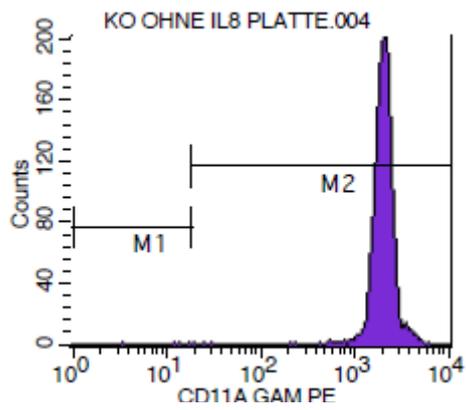
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	4.60
M1	99.62	4.29
M2	0.38	87.52



File: KO OHNE IL8 PLATTE.003
 Gate: G1
 Gated Events: 9390
 Total Events: 10000

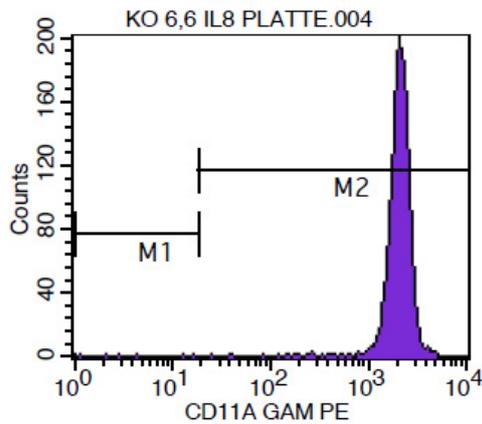
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	4.87
M1	99.52	4.52
M2	0.49	76.14

Abb. A1: Unstimulierte PMN.



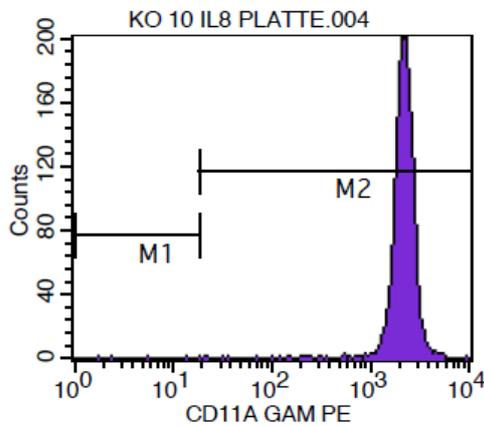
File: KO OHNE IL8 PLATTE.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9466
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1899.12
M1	0.05	9.58
M2	99.95	1900.11



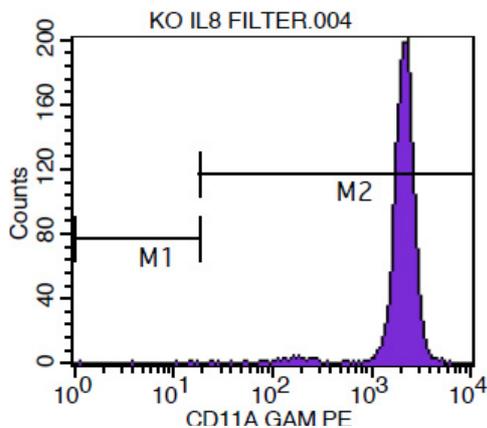
File: KO 6,6 IL8 PLATTE.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9399
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1926.47
M1	0.07	5.63
M2	99.93	1927.90



File: KO 10 IL8 PLATTE.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9432
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	2030.68
M1	0.05	7.97
M2	99.95	2031.75



File: KO IL8 FILTER.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9693
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1956.20
M1	0.06	10.09
M2	99.94	1957.41

Abb. A2: Analyse von CD11a. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration

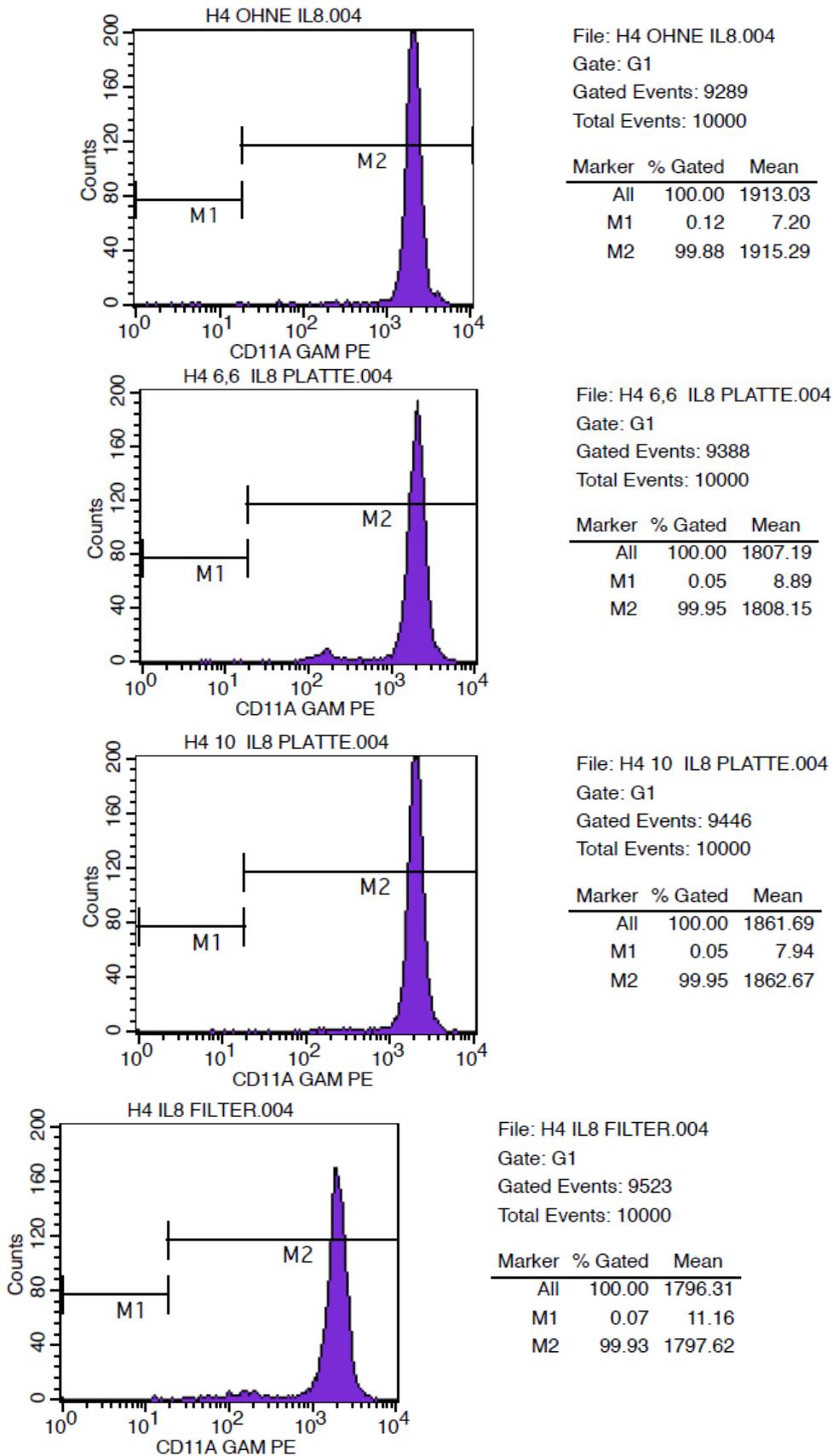
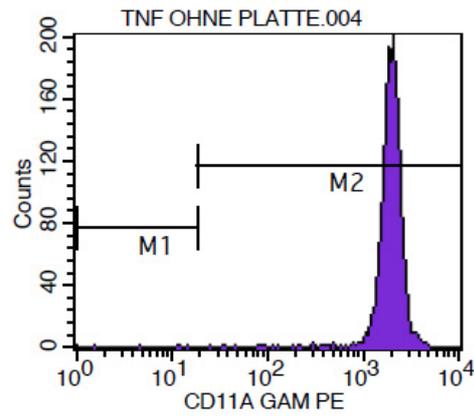
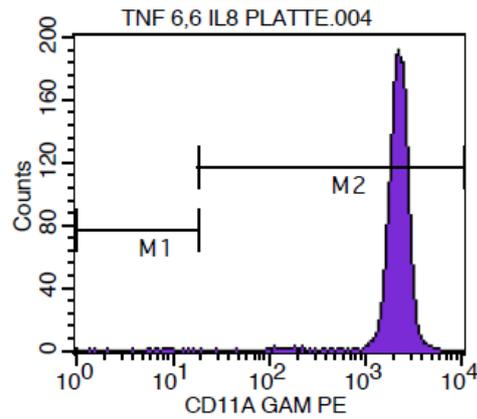


Abb. A3: Analyse von CD11a. *S. suis* Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



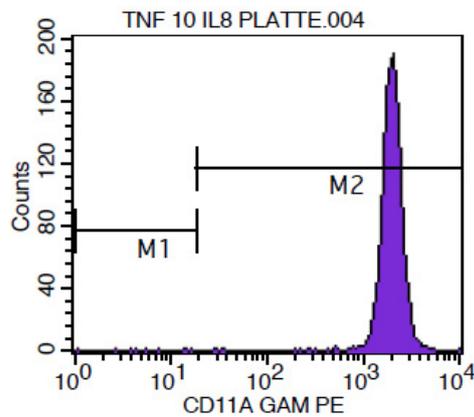
File: TNF OHNE PLATTE.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9306
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1831.99
M1	0.06	7.37
M2	99.94	1833.16



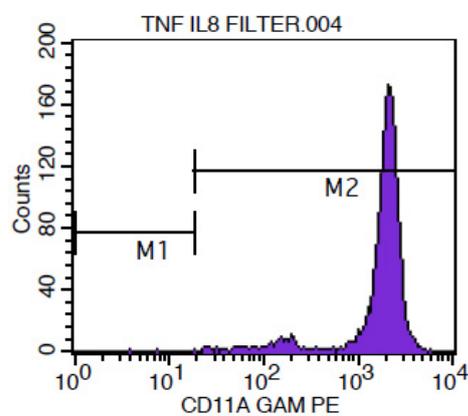
File: TNF 6,6 IL8 PLATTE.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9527
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	2031.63
M1	0.22	6.52
M2	99.78	2036.10



File: TNF 10 IL8 PLATTE.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9429
 Total Events: 10000

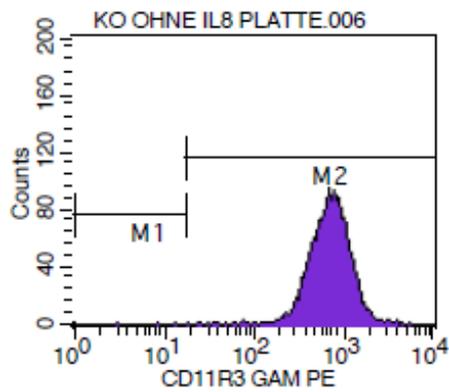
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1847.80
M1	0.11	7.10
M2	99.89	1849.75



File: TNF IL8 FILTER.004
 Gate: G1
 Gated Events: 9400
 Total Events: 10000

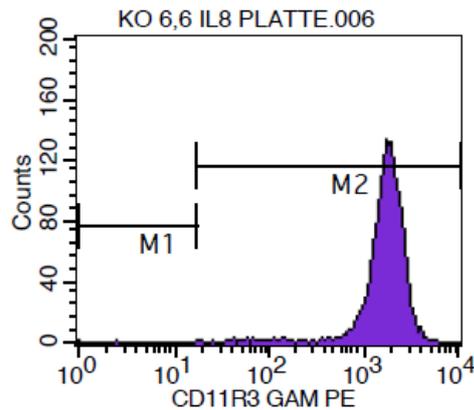
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1845.94
M1	0.02	5.46
M2	99.98	1846.33

Abb. A4: Analyse von CD11a. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



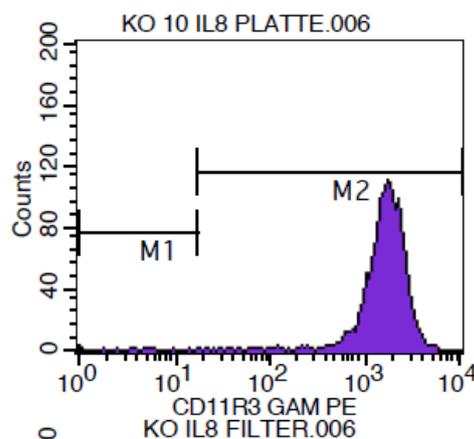
File: KO OHNE IL8 PLATTE.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9507
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	728.47
M1	0.07	9.79
M2	99.93	729.00



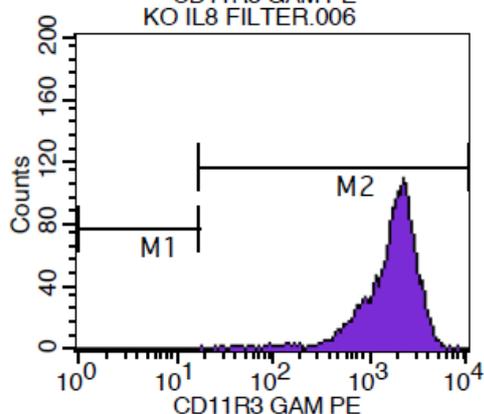
File: KO 6,6 IL8 PLATTE.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9427
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1693.96
M1	0.03	6.63
M2	99.97	1694.50



File: KO 10 IL8 PLATTE.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9387
 Total Events: 10000

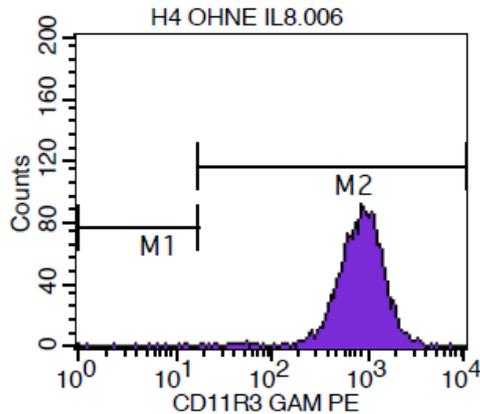
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1620.98
M1	0.17	6.39
M2	99.84	1623.56



File: KO IL8 FILTER.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9707
 Total Events: 10000

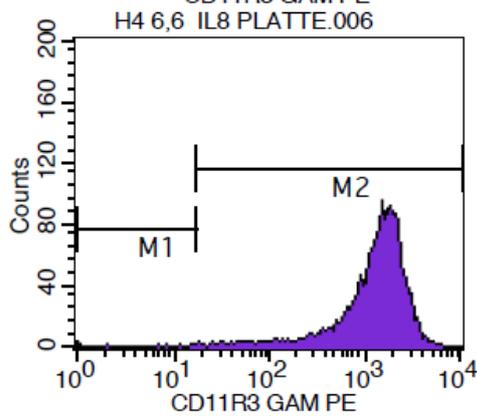
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1771.84
M1	0.01	17.62
M2	99.99	1772.02

Abb. A5: Analyse von CD11R3 (=CD11b). PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



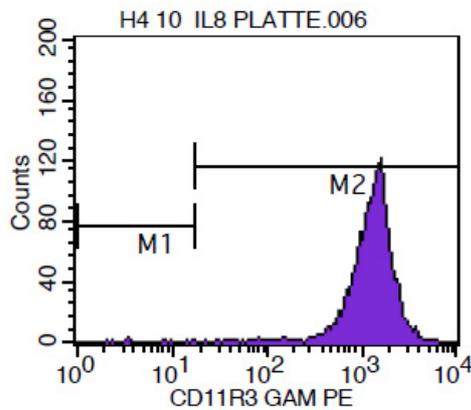
File: H4 OHNE IL8.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9411
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	871.58
M1	0.13	6.37
M2	99.87	872.68



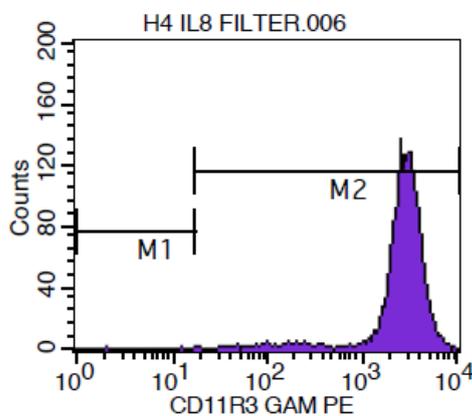
File: H4 6,6 IL8 PLATTE.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9452
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1426.09
M1	0.14	11.41
M2	99.88	1427.74



File: H4 10 IL8 PLATTE.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9466
 Total Events: 10000

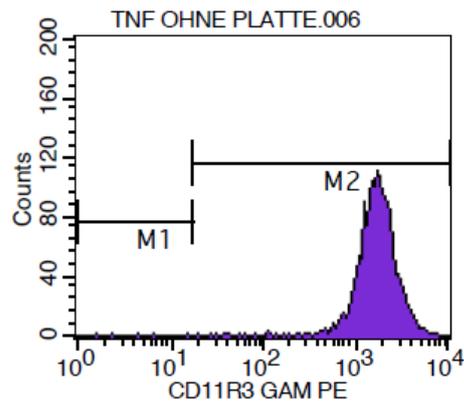
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1295.58
M1	0.13	8.61
M2	99.87	1297.22



File: H4 IL8 FILTER.006
 Gate: G1
 Gated Events: 9547
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	2712.03
M1	0.03	10.45
M2	99.97	2712.88

Abb. A6: Analyse von CD11R3 (=CD11b). *S. suis* Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



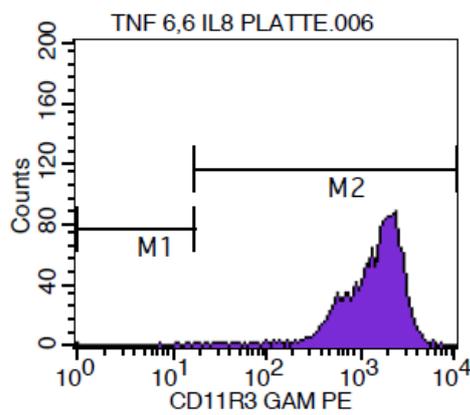
File: TNF OHNE PLATTE.006

Gate: G1

Gated Events: 9422

Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1706.35
M1	0.05	5.89
M2	99.95	1707.25



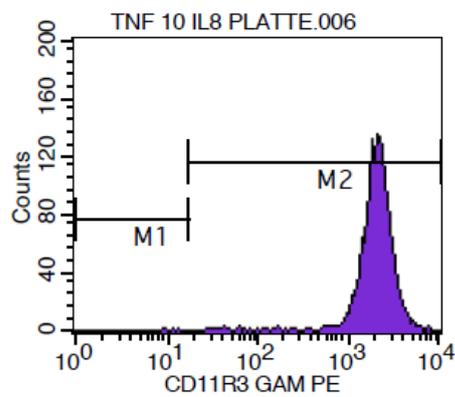
File: TNF 6,6 IL8 PLATTE.006

Gate: G1

Gated Events: 9517

Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1523.18
M1	0.09	11.98
M2	99.91	1524.61



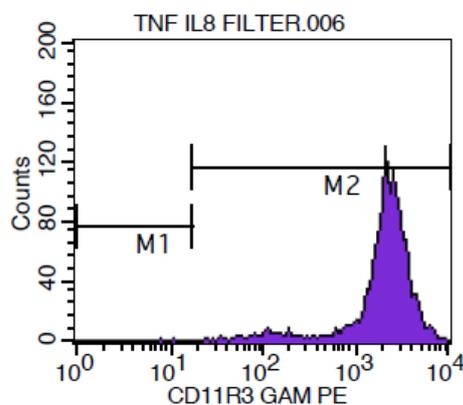
File: TNF 10 IL8 PLATTE.006

Gate: G1

Gated Events: 9336

Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1985.30
M1	0.04	10.77
M2	99.96	1986.15



File: TNF IL8 FILTER.006

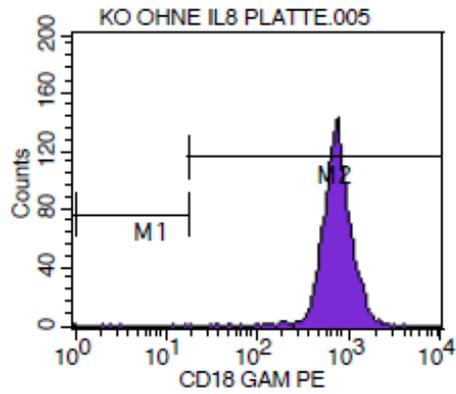
Gate: G1

Gated Events: 9376

Total Events: 10000

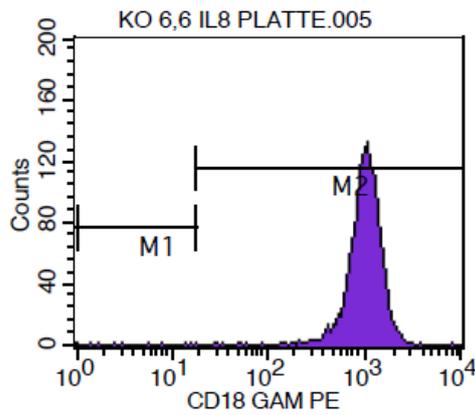
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	2198.19
M1	0.02	9.27
M2	99.98	2198.66

Abb. A7: Analyse von CD11R3 (=CD11b). TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



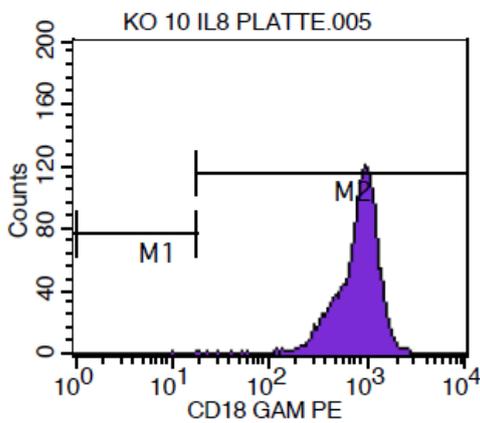
File: KO OHNE IL8 PLATTE.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9465
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	736.52
M1	0.07	5.35
M2	99.93	737.06



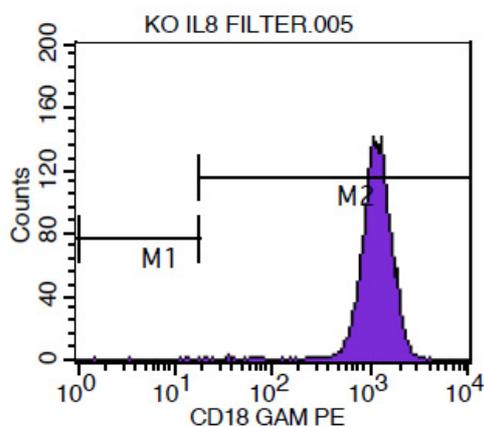
File: KO 6,6 IL8 PLATTE.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9438
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	989.60
M1	0.12	6.25
M2	99.88	990.75



File: KO 10 IL8 PLATTE.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9454
 Total Events: 10000

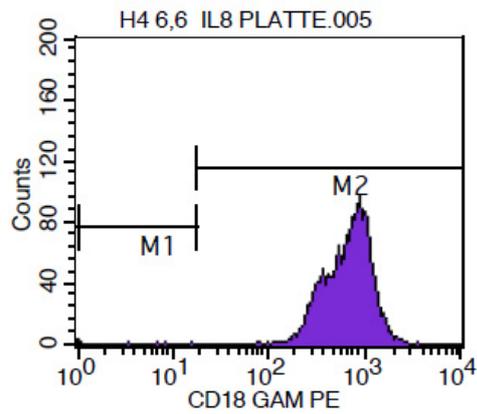
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	809.58
M1	0.05	14.25
M2	99.96	809.92



File: KO IL8 FILTER.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9685
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	1122.60
M1	0.06	9.65
M2	99.94	1123.29

Abb. A8: Analyse von CD18. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



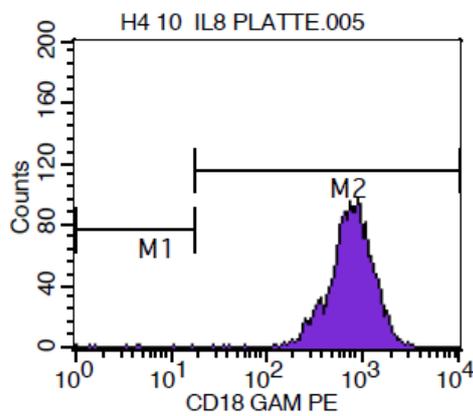
File: H4 6,6 IL8 PLATTE.005

Gate: G1

Gated Events: 9468

Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	690.55
M1	0.06	5.71
M2	99.94	690.98



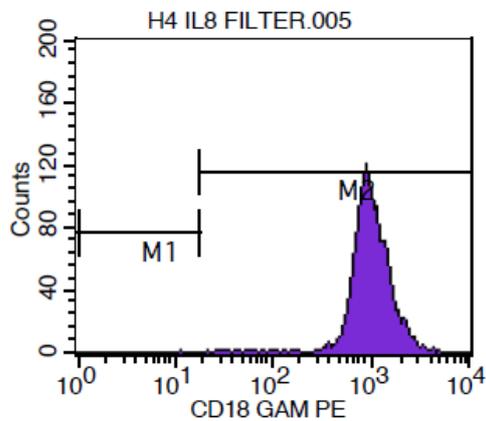
File: H4 10 IL8 PLATTE.005

Gate: G1

Gated Events: 9497

Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	779.83
M1	0.08	5.29
M2	99.92	780.48



File: H4 IL8 FILTER.005

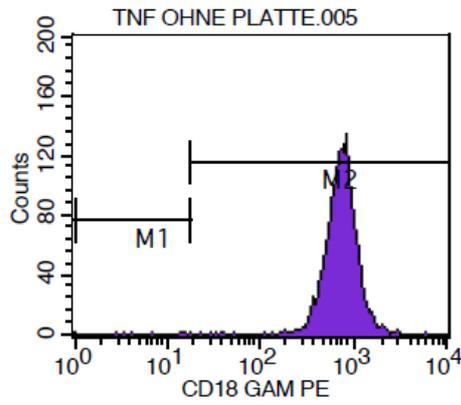
Gate: G1

Gated Events: 9160

Total Events: 10000

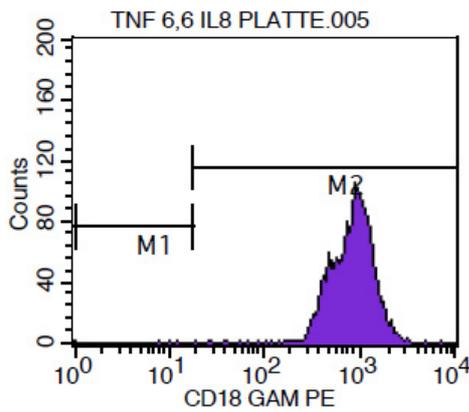
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	996.86
M1	0.01	11.04
M2	99.99	996.97

Abb. A9: Analyse von CD18. *S. suis* Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



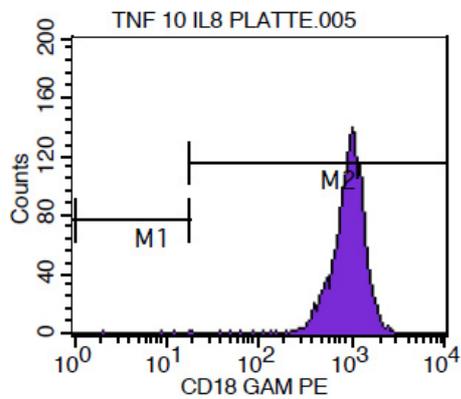
File: TNF OHNE PLATTE.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9456
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	720.27
M1	0.11	9.22
M2	99.89	721.02



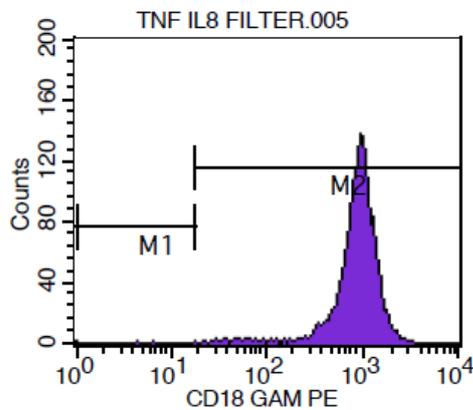
File: TNF 6,6 IL8 PLATTE.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9559
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	852.54
M1	0.06	10.73
M2	99.94	853.07



File: TNF 10 IL8 PLATTE.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9460
 Total Events: 10000

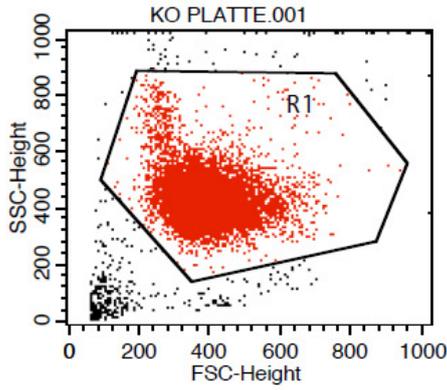
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	910.83
M1	0.05	11.05
M2	99.95	911.31



File: TNF IL8 FILTER.005
 Gate: G1
 Gated Events: 9421
 Total Events: 10000

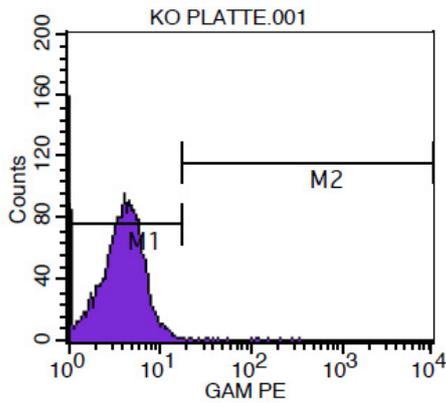
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	884.74
M1	0.04	7.02
M2	99.96	885.12

Abb. A10: Analyse von CD18. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



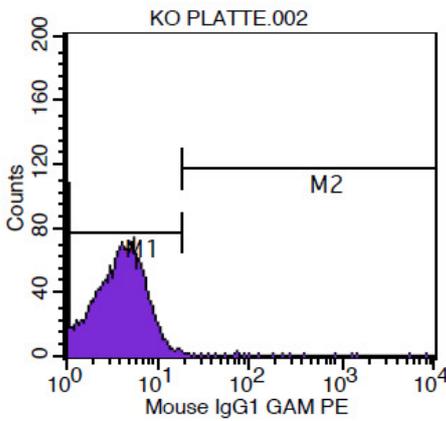
File: KO PLATTE.001
 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000
 Total Events: 10000

Region	Events	% Gated %
R1	9541	95.41



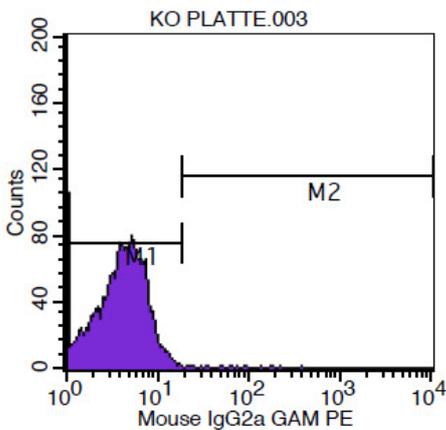
File: KO PLATTE.001
 Gate: G1
 Gated Events: 9541
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	4.40
M1	99.78	4.23
M2	0.22	82.37



File: KO PLATTE.002
 Gate: G1
 Gated Events: 9447
 Total Events: 10000

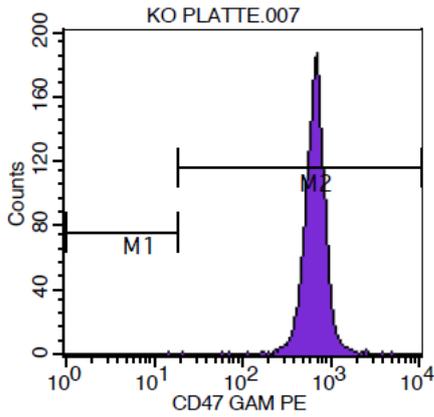
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	7.14
M1	99.71	4.24
M2	0.30	984.74



File: KO PLATTE.003
 Gate: G1
 Gated Events: 9486
 Total Events: 10000

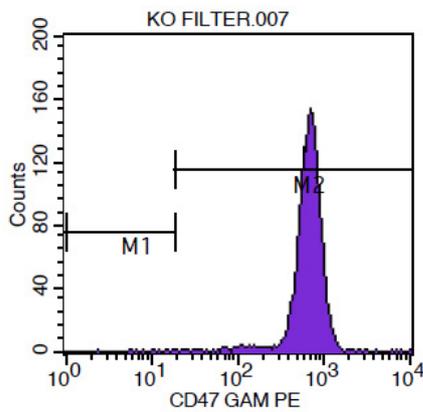
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	4.61
M1	99.77	4.45
M2	0.23	77.38

Abb. A11: Unstimulierte PMN.



File: KO PLATTE.007
 Gate: G1
 Gated Events: 9410
 Total Events: 10000

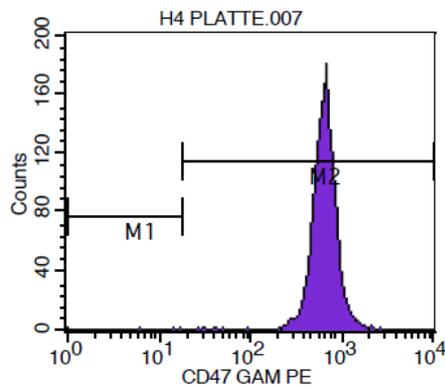
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	629.19
M1	0.01	13.82
M2	99.99	629.25



File: KO FILTER.007
 Gate: G1
 Gated Events: 9560
 Total Events: 10000

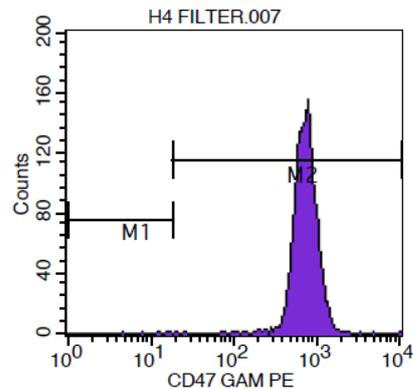
Marker	Events	% Gated	Mean
All	9560	100.00	641.78
M1	11	0.12	9.53
M2	9549	99.88	642.51

Abb. A12: Analyse von CD47. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: H4 PLATTE.007
 Gate: G1
 Gated Events: 9381
 Total Events: 10000

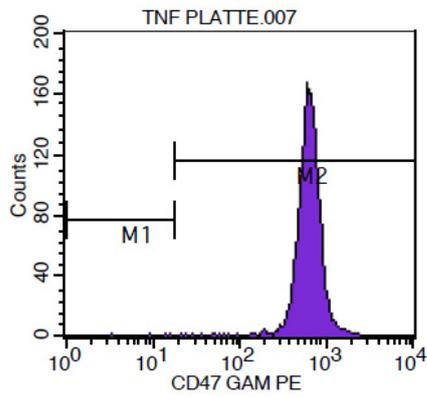
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	636.58
M1	0.04	9.51
M2	99.96	636.84



File: H4 FILTER.007
 Gate: G1
 Gated Events: 9745
 Total Events: 10000

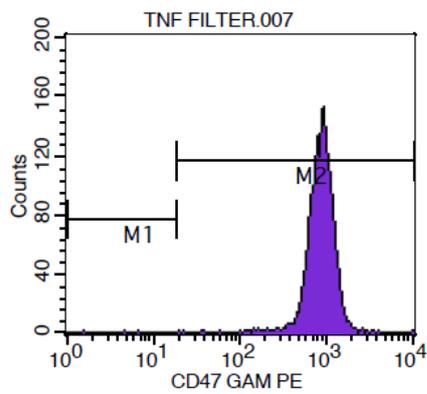
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	704.32
M1	0.07	11.92
M2	99.93	704.82

Abb. A13: Analyse von CD47. *S. suis* Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: TNF PLATTE.007
Gate: G1
Gated Events: 9415
Total Events: 10000

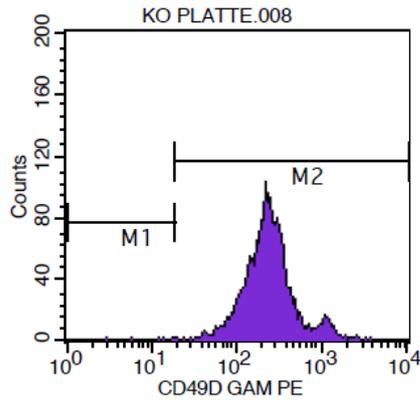
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	614.10
M1	0.04	10.19
M2	99.96	614.36



File: TNF FILTER.007
Gate: G1
Gated Events: 9421
Total Events: 10000

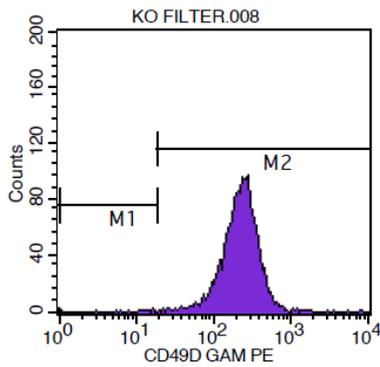
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	838.29
M1	0.03	4.12
M2	99.97	838.56

Abb. A14: Analyse von CD47. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: KO PLATTE.008
 Gate: G1
 Gated Events: 9568
 Total Events: 10000

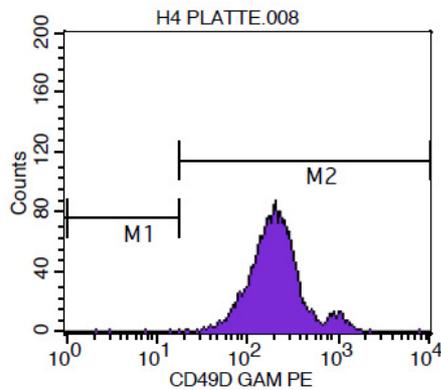
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	263.40
M1	0.07	11.94
M2	99.93	263.59



File: KO FILTER.008
 Gate: G1
 Gated Events: 9592
 Total Events: 10000

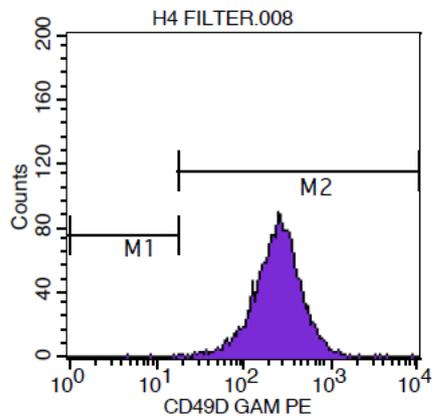
Marker	Events	% Gated	Mean
All	9592	100.00	233.08
M1	17	0.18	9.78
M2	9575	99.82	233.47

Abb. A15: Analyse von CD49d. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: H4 PLATTE.008
 Gate: G1
 Gated Events: 9482
 Total Events: 10000

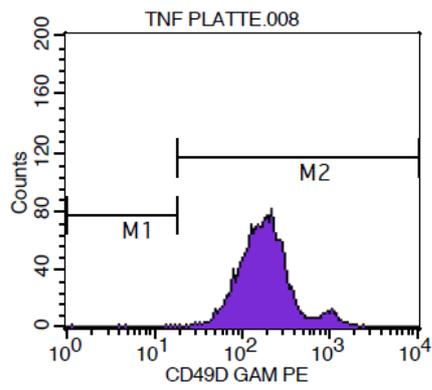
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	230.55
M1	0.06	9.90
M2	99.94	230.69



File: H4 FILTER.008
 Gate: G1
 Gated Events: 9693
 Total Events: 10000

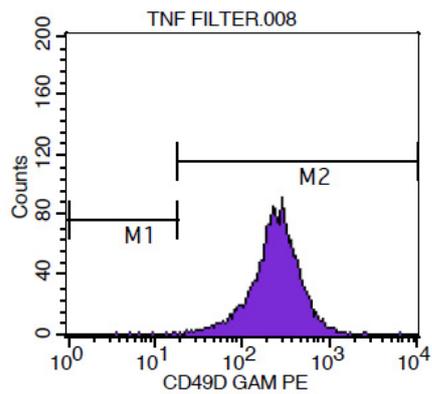
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	269.38
M1	0.04	11.42
M2	99.96	269.48

Abb. A16: Analyse von CD49d. *S. suis* Stamm 10-stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: TNF PLATTE.008
Gate: G1
Gated Events: 9505
Total Events: 10000

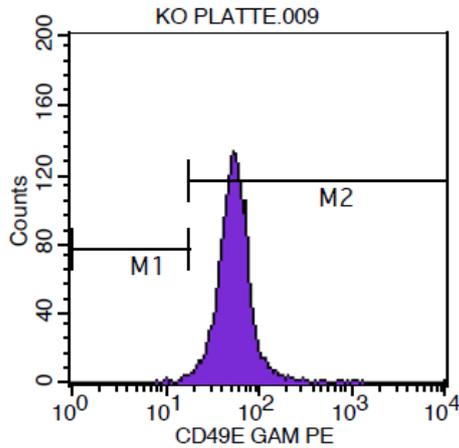
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	208.59
M1	0.07	7.95
M2	99.93	208.74



File: TNF FILTER.008
Gate: G1
Gated Events: 9413
Total Events: 10000

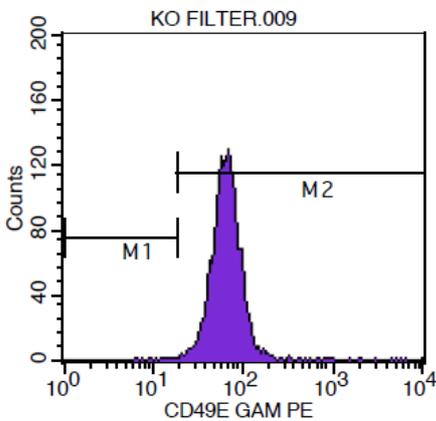
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	266.79
M1	0.10	10.50
M2	99.90	267.04

Abb. A17: Analyse von CD49d. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: KO PLATTE.009
 Gate: G1
 Gated Events: 9570
 Total Events: 10000

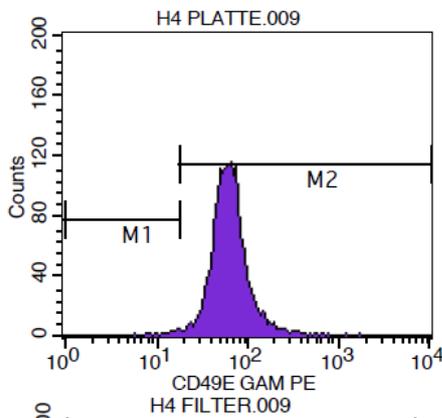
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	60.23
M1	0.34	14.96
M2	99.69	60.38



File: KO FILTER.009
 Gate: G1
 Gated Events: 9598
 Total Events: 10000

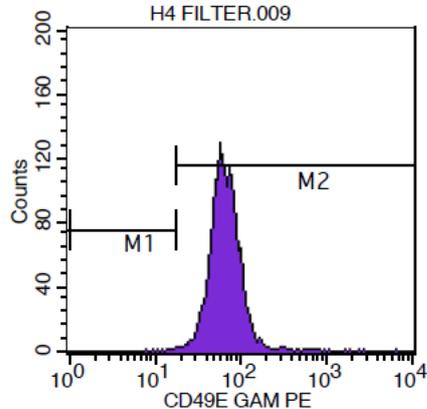
Marker	Events	% Gated	Mean
All	9598	100.00	73.77
M1	18	0.19	12.04
M2	9581	99.82	73.88

Abb. A18: Analyse von CD49e. PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: H4 PLATTE.009
 Gate: G1
 Gated Events: 9483
 Total Events: 10000

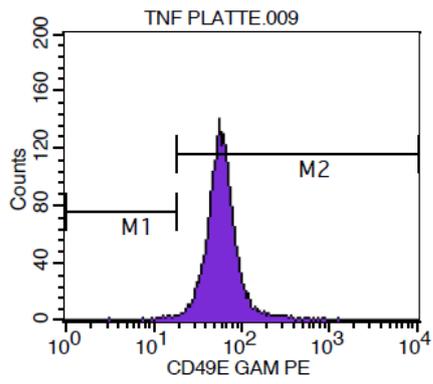
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	65.65
M1	0.44	14.32
M2	99.58	65.87



File: H4 FILTER.009
 Gate: G1
 Gated Events: 9733
 Total Events: 10000

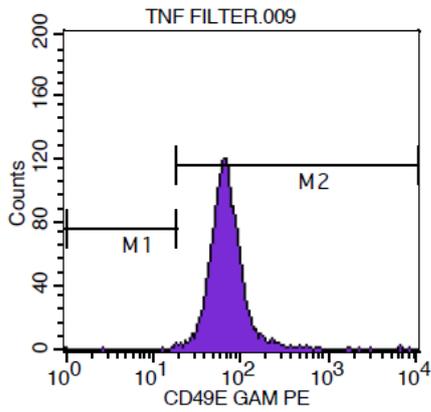
Marker	% Gated	Mean
All	100.00	68.11
M1	0.15	13.57
M2	99.85	68.20

Abb. A19: Analyse von CD49e. *S. suis* Stamm 10 stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration



File: TNF PLATTE.009
 Gate: G1
 Gated Events: 9511
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	61.03
M1	0.33	14.03
M2	99.70	61.18



File: TNF FILTER.009
 Gate: G1
 Gated Events: 9352
 Total Events: 10000

Marker	% Gated	Mean
All	100.00	71.32
M1	0.11	13.22
M2	99.89	71.39

Abb. A20: Analyse von CD49e. TNF α -stimulierte PMN + 0, 6,7, 10 ng/ml IL-8 bzw. nach Transmigration

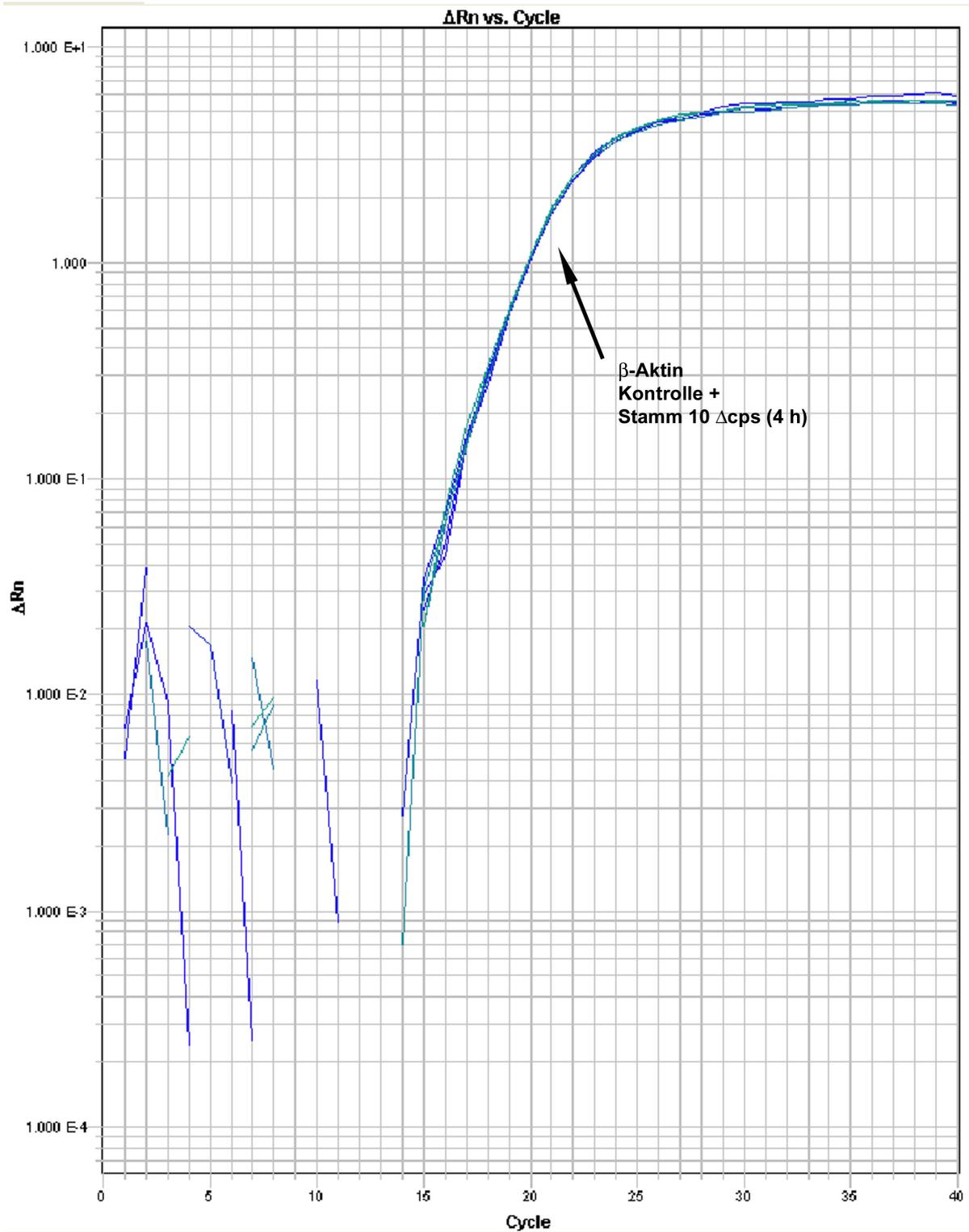
10.3.2 Profile der quantitativen *Real Time*-PCR

Abb. A21: Profil der *Real Time*-PCR. Angegeben sind Triplets von β -Aktin Kontrolle und β -Aktin 4 h *S. suis* Stamm 10 Δ cps.

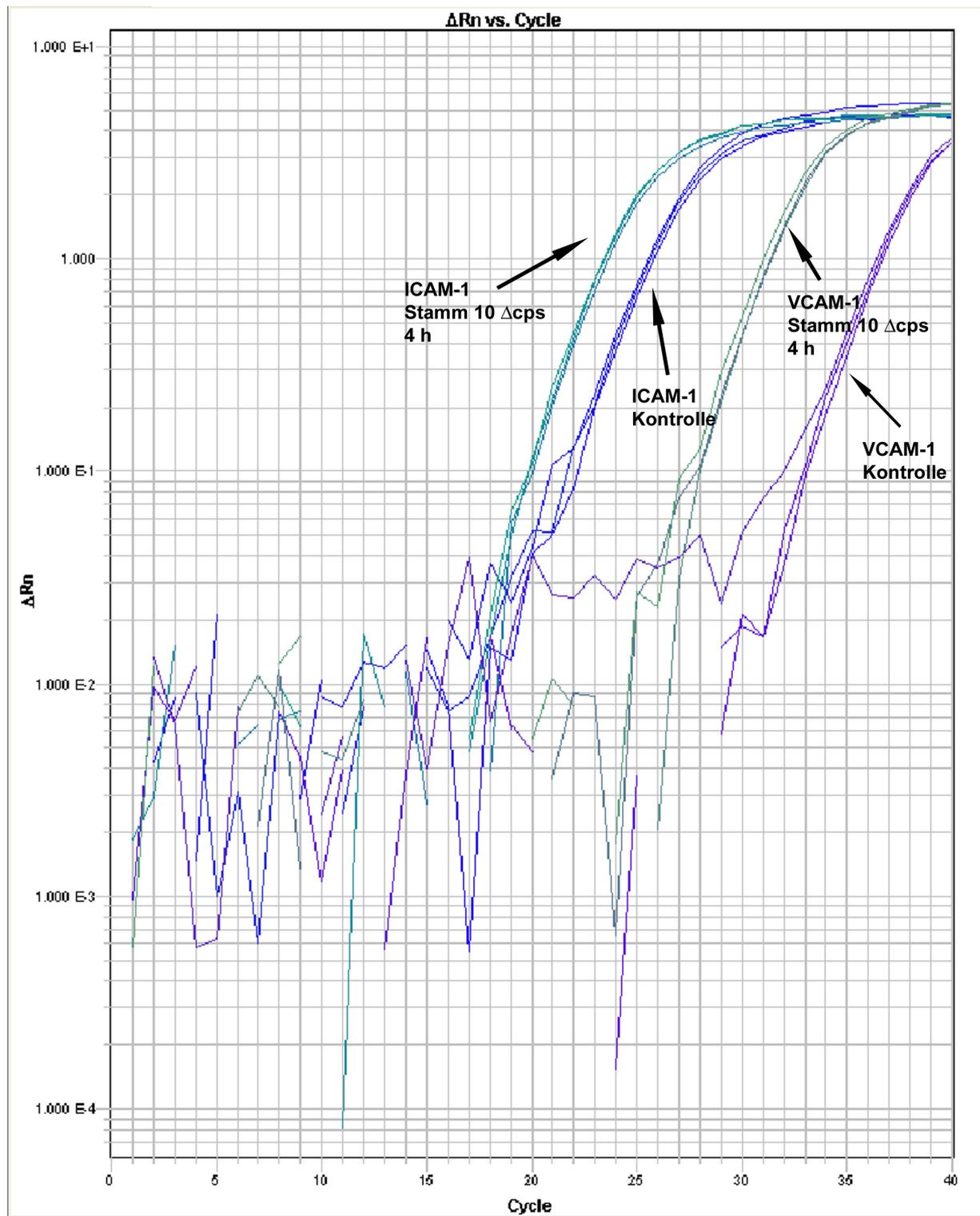


Abb. A22: Profil der Real Time-PCR. Angegeben sind Triplets von ICAM-1 und VCAM-1 je Kontrolle und 4 h *S. suis* Stamm 10 Δcps.

10.3.3 3D-Darstellung der Immunfluoreszenzen (Transmigrationssequenzen,

Occludin)

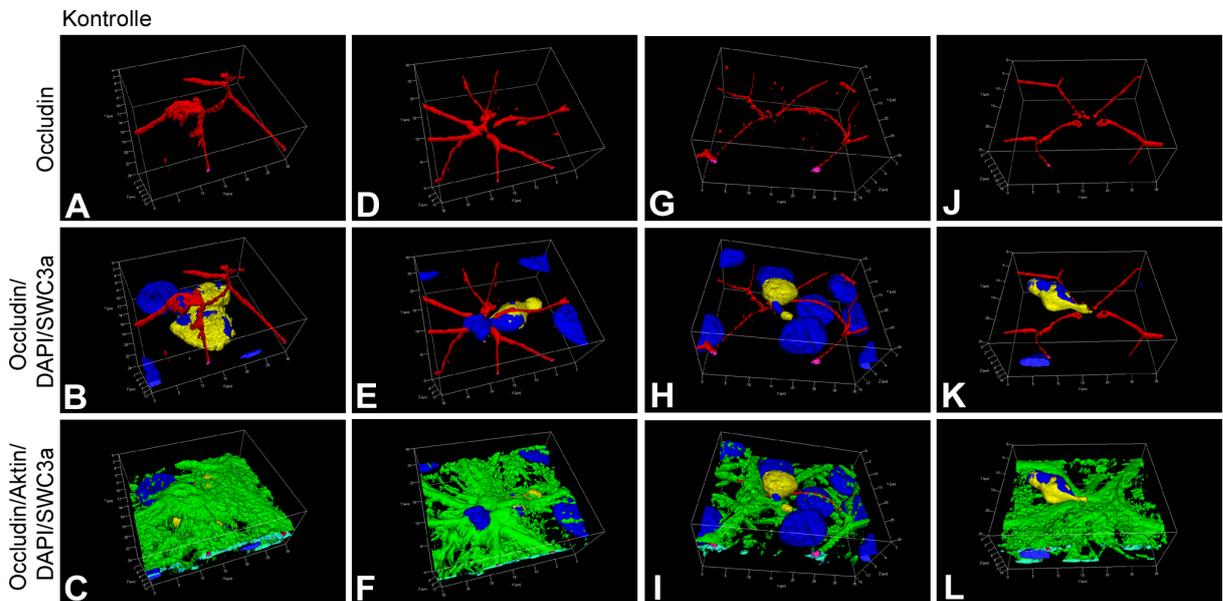


Abb. A23: 3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch unstimulierte PCPEC (Occludin: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten ($0,3 \mu\text{m}$) durch Kontrollzellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

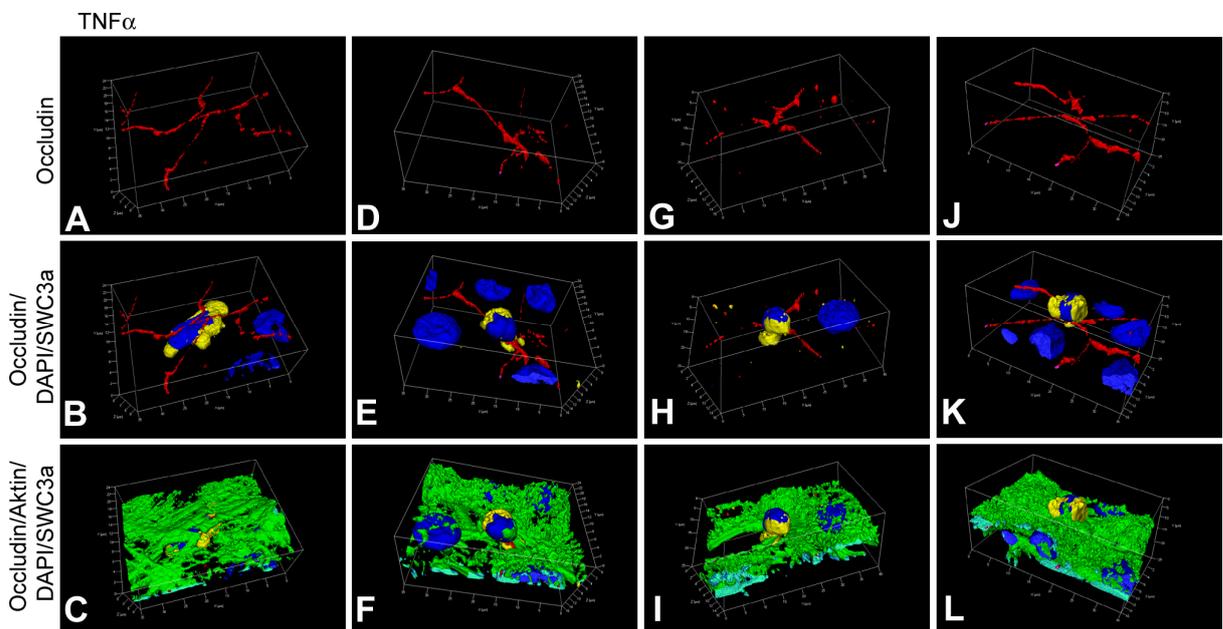


Abb. A24: 3D-Darstellung der parazellulären Granulozyten-Transmigration durch TNF α -stimulierte PCPEC (ZO-1: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten ($0,3 \mu\text{m}$) durch TNF α -stimulierte Zellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

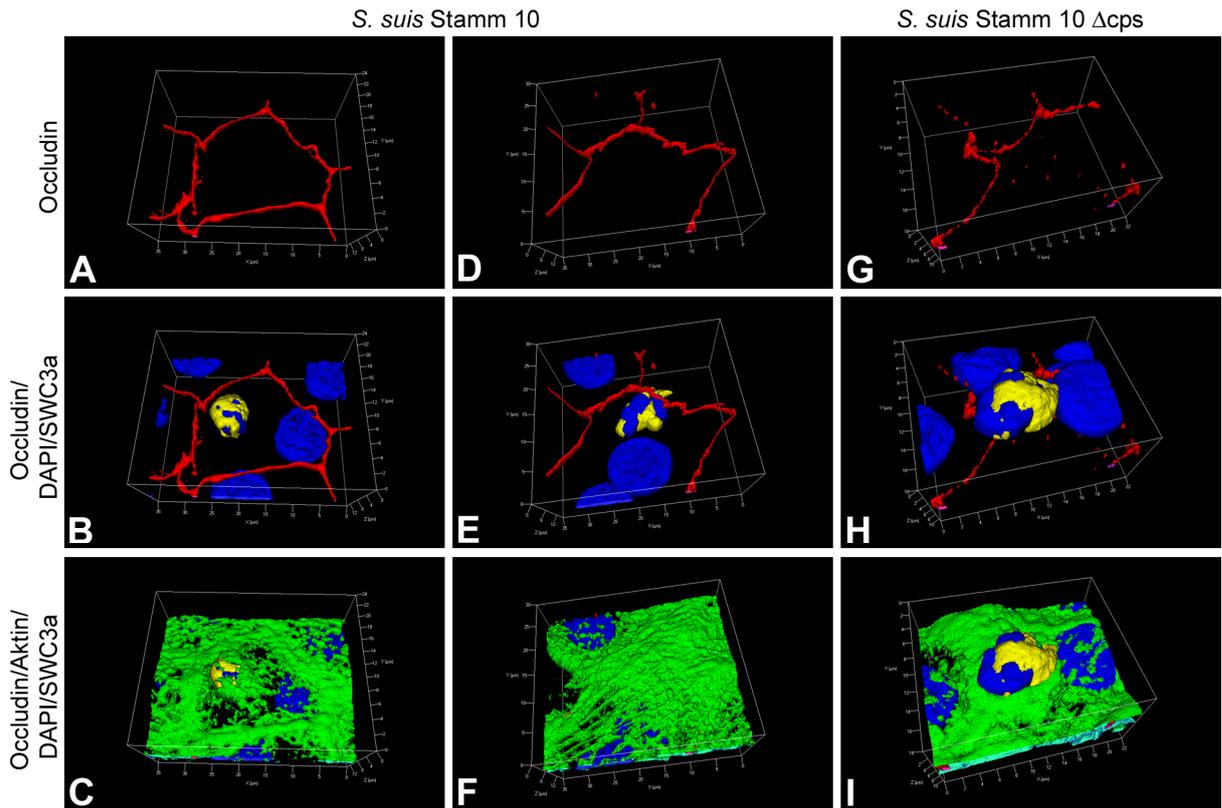


Abb. A25: 3D-Darstellung der transzellulären (A-C) und parazellulären (D-I) Granulozyten-Transmigration durch *S. suis* Stamm 10 (A-F) und Stamm 10 Δ cps (G-I)-stimulierte PCPEC (Occludin: rot, Aktin: Phalloidin, grün, Zellkerne: DAPI, blau; PMN: SWC3a, gelb). Die dreidimensionale Darstellung wurde von optischen Schnitten ($0,3 \mu\text{m}$) durch *S. suis*-stimulierte Zellen mit Hilfe der Inside 4D-Software (Zeiss, Göttingen) rekonstruiert. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Phasen der parazellulären PMN-Transmigration und sind repräsentative Beispiele von mindestens drei verschiedenen Experimenten, die das gleiche Ergebnis ergeben haben. Maßstab wie angegeben.

11. Literatur

Aarestrup, F. M., S. E. Jorsal, and N. E. Jensen. 1998. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol* 60:59-66.

Adam, R., and H. Schroten. 2004. Pathogenese der bakteriellen Meningitis. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 152:362-370.

Adam, R. A., T. Tenenbaum, P. Valentin-Weigand, M. Laryea, B. Schwahn, S. Angelow, H. J. Galla, W. Daubener, and H. Schroten. 2004. Porcine choroid plexus epithelial cells induce *Streptococcus suis* bacteriostasis in vitro. *Infect Immun* 72:3084-3087.

Al-Numani D, Segura M, Dore M, Gottschalk M. Up-regulation of ICAM-1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clin Exp Immunol*.2003;133:67-77

Arends, J. P., N. Hartwig, M. Rudolph, and H. C. Zanen. 1984. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. *J Clin Microbiol* 20:945-947.

Arends, J. P., and H. C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* 10:131-137.

Atsuta, J., S. A. Sterbinsky, J. Plitt, L. M. Schwiebert, B. S. Bochner, and R. P. Schleimer. 1997. Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(5):571-82.

Baggiolini, M., A. Walz, S. L. Kunkel. 1989. Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a Novel Cytokine That Activates Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84: 1045-1049

Balda, M. S., C. Flores-Maldonado, M. Cerejido, and K. Matter. 2000. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem* 78:85-96.

Balsam LB, Liang TW, and Parkos CA. Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain *J Immunol.* 1998;160:5058-65.

Bazzoni, G., O. M. Martinez-Estrada, F. Orsenigo, M. Cordenonsi, S. Citi, and E. Dejana. 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275:20520-20526.

Brazeau, C., M. Gottschalk, S. Vincelette, and B. Martineau-Doize. 1996. In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsular type 2 inside murine macrophages. *Microbiology* 142 (Pt 5):1231-1237.

Brightman, M. W. 1968. The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog Brain Res* 29:19-40.

Brightman, M. W., and T. S. Reese. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677.

Burg, N. D., and M. H. Pillinger. 2001. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 99:7-17.

Burns, A. R., R. A. Bowden, S. D. MacDonell, D. C. Walker, T. O. Odebunmi, E. M. Donnachie, S. I. Simon, M. L. Entman, and C. W. Smith. 2000. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci* 113 (Pt 1):45-57.

Burns, A. R., D. C. Walker, E. S. Brown, L. T. Thurmon, R. A. Bowden, C. R. Keese, S. I. Simon, M. L. Entman, and C. W. Smith. 1997. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol* 159:2893-2903.

Butz, S., and R. Kemler. 1994. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett* 355:195-200.

Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.

Chabot-Roy, G., P. Willson, M. Segura, S. Lacouture, and M. Gottschalk. 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb Pathog* 41:21-32.

Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk. 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology* 144 (Pt 2):325-332.

Chen, Y., Q. Lu, E. E. Schneeberger, and D. A. Goodenough. 2000. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11:849-862.

Chin, A. C., W. Y. Lee, A. Nusrat, N. Vergnolle, and C. A. Parkos. 2008. Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol* 181:5702-5710.

- Chin, A. C., and C. A. Parkos. 2006. Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 1072:276-287.
- Chin, A. C., and C. A. Parkos. 2007. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol* 2:111-143.
- Clifton-Hadley, F. A. 1983. Streptococcus suis type 2 infections. *Br Vet J* 139:1-5.
- Clifton-Hadley, F. A., and M. R. Enright. 1984. Factors affecting the survival of Streptococcus suis type 2. *Vet Rec* 114:584-586.
- Colgan, S. P., C. A. Parkos, C. Delp, M. A. Arnaout, and J. L. Madara. 1993. Neutrophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers is modulated by epithelial exposure to IFN-gamma in a highly polarized fashion. *J Cell Biol* 120:785-798.
- Colgan, S. P., C. A. Parkos, D. McGuirk, H. R. Brady, A. A. Papayianni, G. Frendl, and J. L. Madara. 1995. Receptors involved in carbohydrate binding modulate intestinal epithelial-neutrophil interactions. *J Biol Chem* 270:10531-10539.
- Cordenonsi, M., F. D'Atri, E. Hammar, D. A. Parry, J. Kendrick-Jones, D. Shore, and S. Citi. 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* 147:1569-1582.
- Cramer, E. B. 1992. The ability of leukocytes to cross tight junctions. In *Tight Junctions* (ed. M. Cereijido), pp. 321-336. Boca Ratan, FL: CRC Press.
- Devine, L., S. L. Lightman, and J. Greenwood. 1996. Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology* 88:456-462.
- de Vries, H. E., M. C. Blom-Roosemalen, M. van Oosten, A. G. de Boer, T. J. van Berkel, D. D. Breimer, and J. Kuiper. 1996. The influence of cytokines on the
- Drevets, D. A., and P. J. Leenen. 2000. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect* 2:1609-1618.
- Dominguez-Punaro, M. C., M. Segura, M. M. Plante, S. Lacouture, S. Rivest, and M. Gottschalk. 2007. Streptococcus suis serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 179:1842-1854

Edens, H. A., B. P. Levi, D. L. Jaye, S. Walsh, T. A. Reaves, J. R. Turner, A. Nusrat, and C. A. Parkos. 2002. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J Immunol* 169:476-486.

Elliott, S. D., and J. Y. Tai. 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J Exp Med* 148:1699-1704.

Engelhardt, B., and H. Wolburg. 2004. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34:2955-2963.

Engelhardt, B., K. Wolburg-Buchholz, and H. Wolburg. 2001. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech* 52:112-129.

Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, and J. M. Anderson. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753.

Farkas, E., and P. G. Luiten. 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 64:575-611.

Fenstermacher, J., P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, S. Pettersen, and K. Gruber. 1988. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci* 529:21-30.

Frosch M, Hammerschmidt S, Koedel U *et al.* 2003. Pathogenese und Pathophysiologie der akuten bakteriellen Meningitis. In: Frosch M (Hrsg) *Akute bakterielle Meningitis*. Uni-Med, Bremen, S 30–46

Gao, J. X., and A. C. Issekutz. 1995. Polymorphonuclear leucocyte migration through human dermal fibroblast monolayers is dependent on both beta 2-integrin (CD11/CD18) and beta 1-integrin (CD29) mechanisms. *Immunology* 85:485-494.

Gao, J. X., and A. C. Issekutz. 1997. The beta 1 integrin, very late activation antigen-4 on human neutrophils can contribute to neutrophil migration through connective tissue fibroblast barriers. *Immunology* 90:448-454.

Garrido-Urbani, S., P. F. Bradfield, B. P. Lee, and B. A. Imhof. 2008. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem Soc Trans* 36:203-211.

Gath, U., A. Hakvoort, J. Wegener, S. Decker, and H. J. Galla. 1997. Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components. *Eur J Cell Biol* 74:68-78.

Gottschalk, M., and M. Segura. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76:259-272.

Gottschalk, M., P. Turgeon, R. Higgins, M. Beaudoin, and A. M. Bourgault. 1991. Susceptibility of *Streptococcus suis* to penicillin. *J Vet Diagn Invest* 3:170-172.

Grieb, P., R. E. Forster, D. Strome, C. W. Goodwin, and P. C. Pape. 1985. O₂ exchange between blood and brain tissues studied with 18O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol* 58:1929-1941.

Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U., 2005, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Haverson, K., A. Saalmüller, B. Alvarez, F. Alonso, M. Bailey, A. T. J. Bianchi, W. J. A. Boersma, Z. Chen, W. C. Davis, J. Dominguez, H. Engelhardt, A. Ezquerra, L. S. Grosmaire, M. J. Hamilton, E. Hollemweguer, C. A. Huang, K. V. Khanna, G. Kuebart, G. Lackovic, J. A. Ledbetter, R. Lee, D. Llanes, J. K. Lunney, K. C. McCullough, T. Molitor, J. Nielsen, T. A. Niewold, M. D. Pescovitz, J. Perez de la Lastra, Z. Rehakova, H. Salmon, W. M. Schnitzlein, J. Seebach, A. Simon, J. Sinkora, M. Sinkora, C. R. Stokes, A. Summerfield, L. Sver, E. Thacker, I. Valpotic, H. Yang, F. A. Zuckermann, and R. Zwart. 2001. Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 80:5-23.

Haverson, K., A. Saalmüller, Z. Chen, C. A. Huang, A. Simon, J. Seebach, W. J. A. Boersma, R. Zwart, T. A. Niewold, E. Thacker, D. Llanes, J. M. P. d. I. Lastra, H. Engelhardt, A. Ezquerra, F. Alonso, J. Dominguez, J. A. Ledbetter, L. Grosmaire, R. Lee, J. Nielsen, H. Salmon, I. Valpotic, L. Sver, G. Lackovic, A. Summerfield, and K. V. Khanna. 2001. Summary of the first round analyses of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 80:25-34.

Hawkins, B. T., and T. P. Davis. 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185.

Higgins, R., M. Gottschalk, K. R. Mittal, and M. Beaudoin. 1990. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can J Vet Res* 54:170-173.

Hofman, P., M. Piche, D. F. Far, G. Le Negrate, E. Selva, L. Landraud, A. Alliana-Schmid, P. Boquet, and B. Rossi. 2000. Increased *Escherichia coli* phagocytosis in neutrophils that have transmigrated across a cultured intestinal epithelium. *Infect Immun* 68:449-455.

Holländer, G. A., 2006, *Immunologie*, 1. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, München, Jena

Huang, S. H., M. F. Stins, and K. S. Kim. 2000. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* 2:1237-1244.

http://www.flickr.com/photos/william_asanome/2472644594/

Huber, J. D., R. D. Egleton, and T. P. Davis. 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24:719-725.

Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147:1351-1363.

Jagels, M. A., P. J. Daffern, B. L. Zuraw, and T. E. Hugli. 1999. Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(3):418-27.

Janeway CA., and Travers P 1997. *Immunologie*, 2. Auflage ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Jesaitis LA and DA Goodenough. Molecular characterisation and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*. 1994;124:949-961.

Jedrzejewski, M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207 ; first page, table of contents.

Joannidis, M., S. Truebsbach, K. Bijuklic, P. Schratzberger, S. Dunzedorfer, S. Wintersteiger, K. Lhotta, G. Mayer, and C. J. Wiedermann. 2004. Neutrophil transmigration in renal proximal tubular LLC-PK1 cells. *Cell Physiol Biochem* 14:101-112.

Jungi TW. 1999. Einführung in die Immunbiologie für Studierende der Veterinärmedizin (Block 1 des 6teiligen Immunologielehrgangs), Institut für Veterinär-Virologie, Universität Bern. p. 1-74.

Keep, R. F., and H. C. Jones. 1990. A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 56:47-53.

Kemler, R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9:317-321.

Kim, K. S. 2002. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 186 Suppl 2:S220-224.

Kim, K. S. 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 4:376-385.

Kniesel, U., and H. Wolburg. 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20:57-76.

Koedel, U., W. M. Scheld, and H. W. Pfister. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2:721-736.

Kunz, J., D. Krause, M. Kremer, and R. Dermietzel. 1994. The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *J Neurochem* 62:2375-2386.

Leib, S. L., J. M. Clements, R. L. Lindberg, C. Heimgartner, J. M. Loeffler, L. A. Pfister, M. G. Tauber, and D. Leppert. 2001. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain* 124:1734-1742.

Leib, S. L., and M. G. Tauber. 2000. [In search of strategies for preventing brain damage as a sequela of bacterial meningitis]. *Schweiz Med Wochenschr* 130:928-935.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.

Ling, E. A., C. Kaur, and J. Lu. 1998. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc Res Tech* 41:43-56.

Liu, L., F. P. Mul, T. W. Kuijpers, R. Lutter, D. Roos, and E. F. Knol. 1996. Neutrophil transmigration across monolayers of endothelial cells and airway epithelial cells is regulated by different mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 796:21-29.

Liu, L., F. P. Mul, R. Lutter, D. Roos, and E. F. Knol. 1996. Transmigration of human neutrophils across airway epithelial cell monolayers is preferentially in the physiologic basolateral-to-apical direction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:771-780.

Liu, Y., H. J. Buhring, K. Zen, S. L. Burst, F. J. Schnell, I. R. Williams, and C. A. Parkos. 2002. Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 277:10028-10036.

Liu, Y., D. Merlin, S. L. Burst, M. Pochet, J. L. Madara, and C. A. Parkos. 2001. The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *J Biol Chem* 276:40156-40166.

Liu, Y., M. B. O'Connor, K. J. Mandell, K. Zen, A. Ullrich, H. J. Buhning, and C. A. Parkos. 2004. Peptide-mediated inhibition of neutrophil transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol* 172:2578-2585.

Lopez-Cortes, L. F., M. Cruz-Ruiz, J. Gomez-Mateos, P. Viciano-Fernandez, F. J. Martinez-Marcos, and J. Pachon. 1995. Interleukin-8 in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: its possible role as neutrophil chemotactic factor. *J Infect Dis* 172:581-584.

Lottspeich, F., Zorbach, H., 1998, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu. 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis* 7:201-209.

Ma, S. 2003. Dynamics of Junctional Adhesion Molecule 1 (JAM1) during leukocyte transendothelial migration under flow in vitro. In *The FASEB journal*. A1189.

Martin, T. R., B. P. Pistorese, E. Y. Chi, R. B. Goodman, and M. A. Matthay. 1989. Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. *J Clin Invest* 84:1609-1619.

Maxwell, D. S., and D. C. Pease. 1956. The electron microscopy of the choroid plexus. *J Biophys Biochem Cytol* 2:467-474.

Milks, L. C., M. J. Brontoli, and E. B. Cramer. 1983. Epithelial permeability and the transepithelial migration of human neutrophils. *J Cell Biol* 96:1241-1247.

Milks, L. C., G. P. Conyers, and E. B. Cramer. 1986. The effect of neutrophil migration on epithelial permeability. *J Cell Biol* 103:2729-2738.

Moreno, M. T., S. Vargas, R. Poveda, and X. Saez-Llorens. 1994. Neonatal sepsis and meningitis in a developing Latin American country. *Pediatr Infect Dis J* 13:516-520.

Nash, S., J. Stafford, and J. L. Madara. 1987. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 80:1104-1113.

- Nash, S., J. Stafford, and J. L. Madara. 1988. The selective and superoxide-independent disruption of intestinal epithelial tight junctions during leukocyte transmigration. *Lab Invest* 59:531-537.
- Nau, R., and W. Bruck. 2002. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25:38-45.
- Nusrat, A., C. A. Parkos, P. Verkade, C. S. Foley, T. W. Liang, W. Innis-Whitehouse, K. K. Eastburn, and J. L. Madara. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* 113 (Pt 10):1771-1781.
- Oldendorf, W. H., M. E. Cornford, and W. J. Brown. 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1:409-417.
- Pardridge, W. M., J. Eisenberg, and J. Yang. 1985. Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem* 44:1771-1778.
- Parkos, C. A., S. P. Colgan, M. S. Diamond, A. Nusrat, T. W. Liang, T. A. Springer, and J. L. Madara. 1996. Expression and polarization of intercellular adhesion molecule-1 on human intestinal epithelia: consequences for CD11b/CD18-mediated interactions with neutrophils. *Mol Med* 2:489-505.
- Parkos, C. A., S. P. Colgan, T. W. Liang, A. Nusrat, A. E. Bacarra, D. K. Carnes, and J. L. Madara. 1996. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 132:437-450.
- Parkos, C. A., C. Delp, M. A. Arnaout, and J. L. Madara. 1991. Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium. Dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. *J Clin Invest* 88:1605-1612.
- Parsons, P. E., K. Sugahara, G. R. Cott, R. J. Mason, and P. M. Henson. 1987. The effect of neutrophil migration and prolonged neutrophil contact on epithelial permeability. *Am J Pathol* 129:302-312.
- Perez-Moreno, M., A. Avila, S. Islas, S. Sanchez, and L. Gonzalez-Mariscal. 1998. Vinculin but not alpha-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J Cell Sci* 111 (Pt 23):3563-3571.

- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne, and P. Kubes. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 203:2569-2575.
- Phillipson, M., J. Kaur, P. Colarusso, C. M. Ballantyne, and P. Kubes. 2008. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS ONE* 3:e1649.
- Prasadarao, N. V., A. M. Blom, B. O. Villoutreix, and L. C. Linsangan. 2002. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J Immunol* 169:6352-6360.
- Prieto, C., F. J. Garcia, P. Suarez, M. Imaz, and J. M. Castro. 1994. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. *Zentralbl Veterinarmed B* 41:608-617.
- Pron, B., M. K. Taha, C. Rambaud, J. C. Fournet, N. Pattey, J. P. Monnet, M. Musilek, J. L. Beretti, and X. Nassif. 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PiiC. *J Infect Dis* 176:1285-1292.
- Ramsauer, M., J. Kunz, D. Krause, and R. Dermietzel. 1998. Regulation of a blood-brain barrier-specific enzyme expressed by cerebral pericytes (pericytic aminopeptidase N/pAPN) under cell culture conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1270-1281.
- Ransohoff, R. M., P. Kivisakk, and G. Kidd. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *J Neurosci* 23:569-581.
- Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead, and D. E. Briles. 2004. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun* 72:114-122.
- Ring, A., J. N. Weiser, and E. I. Tuomanen. 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102:347-360.
- Robertson, I. D., and D. K. Blackmore. 1989. Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. *Vet Rec* 124:391-394.
- Rosenberg, G. A., E. Y. Estrada, J. E. Dencoff, and W. G. Stetler-Stevenson. 1995. Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of

- Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2000. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164:427-435.
- Roth, Y., Y. Kimhi, H. Edery, E. Aharonson, and Z. Priel. 1985. Ciliary motility in brain ventricular system and trachea of hamsters. *Brain Res* 330:291-297.
- Saez-Llorens, X., and G. H. McCracken, Jr. 2003. Bacterial meningitis in children. *Lancet* 361:2139-2148.
- Schneeberger, E. E., and R. D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1213-1228.
- Sedlakova, R., R. R. Shivers, and R. F. Del Maestro. 1999. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31:149-161.
- Segal, A. W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197-223.
- Segura, M., N. Vadeboncoeur, and M. Gottschalk. 2002. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin Exp Immunol* 127:243-254.
- Shahein, Y. E., D. F. de Andres, and J. M. Perez de la Lastra. 2002. Molecular cloning and functional characterization of the pig homologue of integrin-associated protein (IAP/CD47). *Immunology* 106:564-576.
- Shang, T., T. Yednock, and A. C. Issekutz. 1999. alpha9beta1 integrin is expressed on human neutrophils and contributes to neutrophil migration through human lung and synovial fibroblast barriers. *J Leukoc Biol* 66:809-816.
- Shang, X. Z., and A. C. Issekutz. 1997. Beta 2 (CD18) and beta 1 (CD29) integrin mechanisms in migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes through lung fibroblast barriers: shared and distinct mechanisms. *Immunology* 92:527-535.
- Shapiro, S., A. Miller, N. Lahat, E. Sobel, and A. Lerner. 2003. Expression of matrix metalloproteinases, sICAM-1 and IL-8 in CSF from children with meningitis. *J Neurol Sci* 206:43-48.
- Shaw, S. K., S. Ma, M. B. Kim, R. M. Rao, C. U. Hartman, R. M. Froio, L. Yang, T. Jones, Y. Liu, A. Nusrat, C. A. Parkos, and F. W. Luscinskas. 2004. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J Exp Med* 200:1571-1580.

Smith, A. L. 1987. Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 6:783-786.

Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits. 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 67:1750-1756

Spector, R. 1982. Nucleoside transport in choroid plexus: mechanism and specificity. *Arch Biochem Biophys* 216:693-703.

Spector, R., and C. E. Johanson. 1989. The mammalian choroid plexus. *Sci Am* 261:68-74.

Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa. 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* 21:381-407.

Steenbergen, S. M., and E. R. Vimr. 2003. Functional relationships of the sialyltransferases involved in expression of the polysialic acid capsules of *Escherichia coli* K1 and K92 and *Neisseria meningitidis* groups B or C. *J Biol Chem* 278:15349-15359.

Strazielle, N., and J. F. Gherzi-Egea. 2000. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:561-574.

Sukumaran, S. K., and N. V. Prasadarao. 2003. *Escherichia coli* K1 invasion increases human brain microvascular endothelial cell monolayer permeability by disassembling vascular-endothelial cadherins at tight junctions. *J Infect Dis* 188:1295-1309.

Tagami, M., Y. Nara, A. Kubota, H. Fujino, and Y. Yamori. 1990. Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 21:1064-1071.

Tabary, O., H. Corvol, E. Boncoeur, K. Chadelat, C. Fitting, J. M. Cavaillon, A. Clement, and J. Jacquot. 2006. Adherence of airway neutrophils and inflammatory response are increased in CF airway epithelial cell-neutrophil interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(3):L588-96..

Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggelnpohler, D. Matalon, A. Seibt, K. N. GE, H. J. Galla, and H. Schroten. 2005. Stamm-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:25-34.

- Tenenbaum, T., D. Matalon, R. Adam, A. Seibt, C. Wewer, C. Schwerk, H. J. Galla, and H. Schroten. 2008. Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* in vitro. *Brain Res* 1229:1-17.
- Tenenbaum, T., T. Papandreou, D. Gellrich, U. Friedrichs, A. Seibt, R. Adam, C. Wewer, H. J. Galla, C. Schwerk, and H. Schroten. 2009. Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Cell Microbiol* 11:323-336.
- Tosi, M. F., A. Hamedani, J. Brosovich, and S. E. Alpert. 1994. ICAM-1-independent, CD18-dependent adhesion between neutrophils and human airway epithelial cells exposed in vitro to ozone. *J Immunol* 152:1935-1942.
- Tunkel, A. R., B. Wispelwey, V. J. Quagliarello, S. W. Rosser, A. J. Lesse, E. J. Hansen, and W. M. Scheld. 1992. Pathophysiology of blood-brain barrier alterations during experimental *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Infect Dis* 165 Suppl 1:S119-120.
- Unkmeir, A., K. Latsch, G. Dietrich, E. Wintermeyer, B. Schinke, S. Schwender, K. S. Kim, M. Eigenthaler, and M. Frosch. 2002. Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* 46:933-946.
- Valentin-Weigand, P., P. Benkel, M. Rohde, and G. S. Chhatwal. 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun* 64:2467-2473.
- van Deuren, M., P. Brandtzaeg, and J. W. van der Meer. 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 13:144-166, table of contents.
- van Schilfgaarde, M., P. van Ulsen, W. van Der Steeg, V. Winter, P. Eijk, V. Everts, J. Dankert, and L. van Alphen. 2000. Cloning of genes of nontypeable *Haemophilus influenzae* involved in penetration between human lung epithelial cells. *Infect Immun* 68:4616-4623.
- Weber, C., and T. A. Springer. 1998. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol* 161:6825-6834.
- Weiser, J. N., D. Bae, C. Fasching, R. W. Scamurra, A. J. Ratner, and E. N. Janoff. 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4215-4220.
- Williams, A. E. 1990. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb Pathog* 8:189-196.

Williams, A. E., and W. F. Blakemore. 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* 162:474-481.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.

Wong, D., R. Prameya, and K. Dorovini-Zis. 2007. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J Neuroimmunol* 184:136-148.

Wuthrich, R. P. 1992. Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1-stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression by murine renal tubular epithelial cells is transcriptionally regulated and involves protein kinase C. *Ren Physiol Biochem* 15(6):302-6.

Xie, Y., K. J. Kim, and K. S. Kim. 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42:271-279.

Zarbock, A., and K. Ley. 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* 172:1-7.

Zeilemaker, A. M., F. P. Mul, A. A. Hoyneck van Papendrecht, T. W. Kuijpers, D. Roos, P. Leguit, and H. A. Verbrugh. 1995. Polarized secretion of interleukin-8 by human mesothelial cells: a role in neutrophil migration. *Immunology* 84:227-232.

Zemans, R. L., S. P. Colgan, and G. P. Downey. 2008. Trans-Epithelial Migration of Neutrophils: Mechanisms and Implications for Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*.

Zen, K., and C. A. Parkos. 2003. Leukocyte-epithelial interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 15:557-564.

Zeni, P., E. Doepker, U. Schulze-Topphoff, S. Huewel, T. Tenenbaum, and H. J. Galla. 2007. MMPs contribute to TNF-alpha-induced alteration of the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C855-864.

Zhang, Y., and W. M. Pardridge. 2001. Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 76:1597-1600.

Curriculum vitae

Corinna Wewer
28. Juli 1980
geboren in Neuenkirchen
ledig

Schulbildung

02/1991 - 06/2000 Arnold-Janssen-Gymnasium, Neuenkirchen/St. Arnold

Hochschulbildung **an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster**

10/2000-12/2005 Biologie-Studium mit Abschluss Diplom

Thema der Diplomarbeit:

Der Einfluss von Pertussis Toxin auf die Barrierefunktion
humaner Hirnendothelzellen
Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE),
Münster, Institut für Infektiologie, Prof. Dr. M.A. Schmidt

Promotion **an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

01/2006 – 05/2009 Promotion in der Pädiatrischen Infektiologie
Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Prof. Dr. H. Schrotten

Thema der Promotion:

Die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit primären
Epithelzellen des *Plexus choroideus* nach Infektion mit
Streptococcus suis
(Förderung der Promotion durch die Forschungskommission der
Heinrich-Heine-Universität)

Berufliche Tätigkeiten

Sommersemester
2004 und 2005 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Botanik und
Botanischer Garten, Molekulare Entwicklungsbiologie der
Pflanzen, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

01/2005 – 05/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe
Pädiatrische Infektiologie, Klinik für Allgemeine Pädiatrie,
Universitätsklinikum

Auszeichnungen

04/2009 Bester Vortrag im Symposium Pathogenese der Meningitis,
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie

Publikationen und Vorträge

Tenenbaum, T., Matalon, D., Adam, R., Seibt, A., Wewer, C., Schwerk, C., Galla, HJ., Schroten, H., 2008, Dexamethasone prevents alteration of tight junction-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* in vitro. Brain Res. 1229:1-17

Tenenbaum, T., Papandreou, T., Gellrich, D., Friedrichs, U., Seibt, A., Adam, R., Wewer, C., Galla, HJ., Schwerk, C., Schroten, H., 2009, Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. Cell Microbiol., 2:323-36

Im Review, J. Immunol.:

Wewer, C., Seibt, A., Galla, HJ., Schmidt, MA., Schwerk, C., Schroten, H., Tenenbaum, T., Paracellular and transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-CSF barrier after infection with *Streptococcus suis*

Vortrag: "Transmigration of neutrophils through choroid plexus epithelial cells during infection with *Streptococcus suis*", 11th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Amsterdam, 09/2008

Vortrag: "Parazelluläre und transzelluläre Transmigration neutrophiler Granulozyten durch Epithelzellen des Plexus choroideus während der Infektion mit *Streptococcus suis*", 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, 04/2009

DANKE ...

- Herrn Prof. Schrotten, für die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe Infeketiologie zu promovieren, für die Betreuung und für die gute Beratung in Problemfällen.
- Herrn Prof. Hegemann, für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Tobias, für die gute Betreuung und für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten.
- Annette, für die großartige Unterstützung, die Kritik und die Freundschaft.
- der restlichen AG Pädiatrische Infektiologie in Düsseldorf und Mannheim.
- Prof. Schmidt und besonders Lilo Greune, für die gute Zusammenarbeit in der Elektronenmikroskopie.
- dem gesamten Laborteam der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, v.a. Martina, Steffi, Elke, Lars, Thomas, Marie-Luise. Ihr habt einen großen Anteil daran, dass es mir so schwer fällt, zu gehen.
- Martina, dass du so bist, wie du bist und immer ein offenes Ohr für mich hattest.
- Karin, für deine Freundschaft. Wir schaffen, was wir wollen.
- Katrin, für die Ablenkung beim Sport, im Café, am Telefon.
- meiner Familie, für das Interesse an meiner Arbeit.
- meinen Eltern für den Glauben an mich und die Unterstützung in jeder Hinsicht.
- meiner Schwester Kerstin. Danke, dass du so stolz auf mich bist.
- Sven, für das Gut zureden, den Glauben an mich, das Für mich da sein, dafür dass du ruhig bleibst, wenn ich nicht ruhig bleiben kann, dafür dass du es bist.

