

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Medizinischen Einrichtungen der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. E. Mayatepek

**Die Umkehrkultur als experimentelles Modell
zur Untersuchung der Interaktion von *Streptococcus suis*
mit der Blut-Liquor Schranke
*in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thaleia Papandreou

2011

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. H. Schrotten

Korreferent: Prof. Dr. W. Däubener

meinen Eltern

Inhaltsangabe

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	- 1 -
1.1 Die akute bakterielle Meningitis	- 1 -
1.1.1 Erreger und Epidemiologie der akuten bakteriellen Meningitis	- 1 -
1.1.2 Pathogenese der akuten bakteriellen Meningitis	- 2 -
1.1.3 Klinische Symptome und Komplikationen der bakteriellen Meningitis	- 5 -
1.1.4 Therapie der bakteriellen Meningitis	- 8 -
1.2 <i>Streptococcus suis</i> (<i>S. suis</i>)	- 10 -
1.2.1 Morphologie und Verhalten in der Zellkultur	- 10 -
1.2.2 Bedeutung von <i>S. suis</i> als Pathogen	- 11 -
1.2.3 Potentielle Virulenzfaktoren	- 12 -
1.2.3.1 Kapselpolysaccharid (KPS)	- 13 -
1.2.3.2 Hämolyse	- 14 -
1.3 Die Blut-Hirn Schranke	- 16 -
1.4 Die Blut-Liquor Schranke/ Plexus choroideus	- 19 -
1.5 Invasion von Bakterien in Wirtszellen - Die Rolle von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)	- 22 -
1.6 Inflammatorische Reaktion in Wirtszellen nach Bakterienstimulation - Die Rolle von Glukokortikoiden	- 25 -
1.7 Zielsetzung der Arbeit	- 27 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 28 -
2.1 Material für die Isolierung von porcinen Epithelzellen des Plexus choroideus (PCPEC)	- 28 -
2.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial	- 28 -
2.1.2 Enzyme und Sera	- 31 -
2.1.3 Pharmaka und Agenzien	- 31 -
2.1.4 Instrumente und Geräte	- 32 -
2.1.5 Inhibitoren	- 33 -
2.1.6 Bakterienstämme	- 33 -
2.2 Methoden	- 34 -
2.2.1 Präparation und Kultivierung der porcinen Epithelzellen des <i>Plexus choroideus</i> (PCPEC)	- 34 -
2.2.1.1 Umkehrkultur	- 36 -
2.2.1.2 Differenzierung der Zellen durch Umstellen auf serumfreies Medium (SFM)	- 38 -
2.2.2 Widerstandsmessung von PCPEC	- 39 -
2.2.3 Parazelluläre Flussmessung mit FITC-Inulin	- 40 -
2.2.4 Bakterienanzucht (Vorbereitung und Kultivierung/Einstellung der Bakterien)	- 40 -

Inhaltsangabe

2.2.5 Vorbereitung der Zellen und Durchführung des Infektionsversuches	- 41 -
2.2.5.1 Untersuchung der Translokation von <i>S. suis</i> durch PCPEC	- 42 -
2.2.5.2 Inhibition der Translokation von <i>S. suis</i> durch spezifische Inhibitoren.....	- 43 -
2.2.6 Vitalitätsmessung der PCPEC mittels Life/ Dead®-Assay.....	- 43 -
2.2.7 Statistik	- 44 -
3. ERGEBNISSE	- 45 -
3.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER), Kinetik in der Umkehrkultur	- 45 -
3.2 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER), des Inulinflusses und der Translokationsrate nach Infektion mit <i>S. suis</i> Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante	- 47 -
3.3 Einfluss von Dexamethason auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) und auf die Translokationsrate nach Infektion mit <i>S. suis</i> Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante.....	- 51 -
3.4 Einfluss des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)-Inhibitors Ly294002 auf die Translokationsrate von <i>S. suis</i> Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante	- 54 -
3.5 Zellvitalität der PCPEC nach Infektion mit <i>S. suis</i> Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante	- 57 -
3.6 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) nach Infektion mit <i>S.</i> <i>suis</i> und dessen Sullysin-defizienten Mutanten.....	- 59 -
3.7 Messung der Translokationsrate von <i>S. suis</i> Stamm und dessen Sullysin defizienten Mutanten	- 61 -
4. DISKUSSION	- 63 -
4.1 Zellkulturmodell der Blut-Liquor-Schranke in vitro.....	- 63 -
4.2 Bedeutung der Blut-Liquor-Schranke als Eintrittspforte für Erreger in das ZNS.....	- 64 -
4.3 Die Rolle der Virulenzfaktoren Kapsel und des Hämolyins bei der Translokation durch PCPEC.....	- 66 -
4.4 Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zur Hemmung der bakteriellen Translokationsrate durch PCPEC.	- 70 -
5. ZUSAMMENFASSUNG	- 76 -
6. SUMMARY	- 78 -
7. ANHANG	- 79 -
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	- 79 -
7.2 Literaturverzeichnis.....	- 83 -

Inhaltsangabe

7.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	- 107 -
7.4 Publikationsverzeichnis	- 110 -
7.5 Lebenslauf.....	- 111 -
7.6 Danksagung.....	- 113 -

1. Einleitung

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Die akute bakterielle Meningitis

1.1.1 Erreger und Epidemiologie der akuten bakteriellen Meningitis

Die akute bakterielle Meningitis ist eine ernste, lebensbedrohliche Infektion. Die geschätzte Inzidenz beträgt 3-10/ 100.000 Menschen/ Jahr in entwickelten Ländern und ist 10-mal höher in Ländern der Dritten Welt (Chaudhuri, 2004). Die Inzidenz ist im ersten Lebensmonat am höchsten (Schmutzhard, 2000). Die bakterielle Meningitis ist eine der „Top 10“ Ursachen für den durch eine Infektion bedingten Tod weltweit, und 30-50% der Patienten, die überleben, haben permanente neurologische Schäden (Fauci, 2001). Was die Geschlechtsverteilung angeht, ist ein leichtes Überwiegen des weiblichen Geschlechts festzustellen und die Mehrzahl der Kinder erkrankt bis zum Schulalter (Brandtzaeg *et al.*, 1992). Theoretisch kann jedes Bakterium eine akute Meningitis verursachen, wobei die relative Häufigkeit weltweit eine Altersspezifität zeigt (Adam and Schrotten, 2004). Bei Neugeborenen (< 4 Wochen) sind vor allem Streptokokken der Gruppe B, *Escherichia coli* (*E. coli*) K1 und *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) als Erreger verantwortlich. Bei Säuglinge zwischen 1-3 Monate bilden das Spektrum der Erreger: *Neisseria meningitidis* (Meningokokken), *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) und wesentlich seltener: *L. monocytogenes*, *E. coli* und Streptokokken der Gruppe B. Im Alter von dem 3. Lebensmonat bis zum 18. Lebensjahr treten *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* in den Vordergrund. *Haemophilus influenzae* Typ B (*Hib*) zählte vor den 1990er Jahren als Erreger in dieser Altersgruppe und war sogar einer der wichtigsten Verursacher von Meningitis bei jüngeren Kinder, ist aber seit der Einführung des Konjugatimpfstoffes sehr selten geworden (Chaudhuri, 2004).

1. Einleitung

Bei immunsupprimierten Patienten wird die Gruppe der häufigsten auslösenden Erreger von Listerien, Enterobakterien und Pneumokokken gebildet (Schroten, 2004). In Ländern der Dritten Welt finden sich oft neben *E. coli* auch andere gramnegative Keime wie *Enterobacter*, *Salmonellen* und *Klebsiellen* (Moreno *et al.*, 1994) als Auslöser. Prädisponierende Faktoren für die Erkrankung sind: Diabetes mellitus, Pneumonien, Splenektomien, paranasale Infekte, Liquorlecks und Immunglobulindefizienzen (Brandtzaeg *et al.*, 1992).

1.1.2 Pathogenese der akuten bakteriellen Meningitis

Die Infektion der Meningen durch pathogene Keime verläuft in einer typischen Abfolge von Ereignissen: Primär kolonisieren die Erreger die Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raums oder des Darms. Um an den Epithelien haften zu können, bilden die Bakterien spezifische Virulenzfaktoren, wie IgA-Proteasen oder Adhäsine (Adam and Schroten, 2004). Diese Virulenzfaktoren nutzen sie, um der wirtseigenen Abwehr zu entgehen (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* Typ B) (van Schilfgaard *et al.*, 2000). Nach Durchbrechen der epithelialen Schleimhautbarriere dringen die Erreger in die Blutbahn ein. Um sich hier vor der wirtseigenen Immunabwehr, primär der Opsonophagozytose und der

1. Einleitung

komplementvermittelten Lyse zu schützen, ist die bakterielle Polysaccharidkapsel bei allen wichtigen Meningitiserregern von essentieller Bedeutung (Frosch *et al.*, 2003; Steenberger and Vimr, 2003; Ren *et al.*, 2004; Prasadarao *et al.*, 2002). Durch Virulenzfaktoren wie die Kapsel, Lipopolysaccharid (LPS) oder Eisenchelatsysteme sind die Erreger in der Lage, im Blutstrom zu überleben und sich dort auszubreiten. Für viele extrazelluläre Meningitiserreger ist neben dem grundsätzlichen Überleben aber noch ein weiterer Aspekt von großer Wichtigkeit. Die Infektion der Meningen hängt auch von der Intensität und der Dauer der Bakteriämie ab. Dieses konnte für die Keime: *E. coli* K1, Gruppe B-Streptokokken sowie Pneumokokken und *Haemophilus influenzae* Typ B gezeigt werden. Eine kritische bakterielle Konzentration ist ebenso wichtig, um eine Meningitis verursachen zu können (Kim, 2003).

Der Eintritt in das ZNS kann entweder durch die Blut-Hirn oder durch die Blut-Liquor Schranke erfolgen. Tiermodelle erbrachten Belege dafür, dass zum Beispiel bei Pneumokokken das Eindringen in das Ventrikelsystem primär durch Überwindung der Blut-Hirn Schranke zustande kommt (Huang *et al.*, 2000). Erreger müssen bei Durchbrechen der Blut-Hirn-Schranke an die zerebralen Endothelien adhäreren, die Endothelschicht penetrieren und danach die Basalmembran und die perizytäre Scheide überwinden.

Erreger, die das Liquorsystem über den *Plexus choroideus* erreichen, müssen primär am fenestrierten Endothel oder der extrazellulären Matrix adhäreren, um von der basalen Seite der Plexusendothelien, die dem Blut zugewandt ist, diese epitheliale Grenzschicht zu durchbrechen. Der Plexus choroideus scheint die primäre Eintrittspforte für *S. suis* zu sein, der eine Meningitis sowohl bei Menschen als auch bei Schweinen verursachen kann (Williams and Blakemore, 1990). Auch bei *Neisseria meningitidis* erfolgt vermutlich das primäre Eindringen in das Liquorsystem durch die Blut-Liquor-Schranke (Pron *et al.*, 1997).

Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke kann durch unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Für Meningokokken, Pneumokokken, *E. coli* und für Gruppe-B-Streptokokken

1. Einleitung

konnte eine transzelluläre Passage nachgewiesen werden (Deuren *et al.*, 2000; Unkmeir *et al.*, 2002; Kim, 2003; Ring *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Jedrzejas, 2001). Die parazelluläre/interzelluläre Passage ist die nächste Möglichkeit für die Penetration in das ZNS und ist für *Haemophilus influenzae* Typ B, *E. coli* und Pneumokokken sowie bei Streptokokken beschrieben worden (van Schilfgaarde *et al.*, 2000). Insbesondere bei Streptokokken kann die β -Hämolyysin Produktion das Endothel schädigen, und so können die Bakterien interzellulär penetrieren (Huang *et al.*, 2000; Jedrzejas, 2001; Sukumaran and Prasadaras, 2003; Tunkel *et al.*, 1992).

Eine dritte Möglichkeit ist die Translokation via Leukozyten (Theorie des „trojanischen Pferds“) bei denen Erreger in Phagozyten überleben können und durch diese in das ZNS eindringen können. Das gilt für *L. monocytogenes*, *Brucella sp.* oder *Mycobacterium tuberculosis* (Dreerets and Leenen, 2000). Für *S. suis*, *E. coli* und Gruppe-B-Streptokokken wurde gezeigt, dass sie in Makrophagen überleben können, sodass sie auch als „Trojaner“ gelten können (Sukumaran and Prasadaras, 2003; Valentin-Weigand *et al.*, 1996; Weiser *et al.*, 2003). Nachdem die Bakterien in den Liquorraum eingedrungen sind, finden sie optimale Wachstumsbedingungen vor und können bis zu hohen Konzentrationen im Liquormilieu heranwachsen. Im Liquor gibt es nur ein unzureichendes Immunsystem, um die Bakterien zu eliminieren, so dass ihr Wachstum nicht eingeschränkt wird. Nach Erreichen einer kritischen bakteriellen Konzentration im Liquor und stationärer Wachstumsphase oder nach Behandlung mit Antibiotika kommt es zur Freisetzung toxischer bakterieller Hüllprodukte, Toxine und DNA im Liquorkompartiment. Autolytische Hydrolasen (Lyt A-C), Peptidoglykane, Lipoteichonsäure und Pneumolysin werden zum Beispiel von grampositiven Kokken freigesetzt. So werden Makrophagen, Mikroglia, Plexusepithelien und Ependymzellen, Endothelien oder Astrozyten aktiviert und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine angeregt. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6)

1. Einleitung

spielen hier wahrscheinlich die wichtigste Rolle (Deuren *et al.*, 2000; Koedel *et al.*, 2002; Adam and Schroten, 2004). Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke wird durch Einwirkung der Zytokine gestört und ihre Permeabilität erhöht. Durch Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen (initial Selektine, später insbesondere das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1) an der endothelialen Oberfläche wird die Anheftung von Granulozyten erleichtert. Schließlich kommt es zur Extravasation einer großen Zahl aktivierter Phagozyten und dem Eindringen in den Liquorraum (Adam and Schroten, 2004; Deuren *et al.*, 2000). In der Phase der maximalen Inflammation kommt es zur Freisetzung reaktiver oxidativer Stoffwechselprodukte (Koedel *et al.*, 2002; Frosch *et al.*, 2003; Nau and Bruck, 2002), Ausschüttung von Matrixmetalloproteinasen (MMP), die zu einer Schädigung der Basallamina durch Degradation von kollagen und elastischen Fasern führen können, (Leib and Täuber, 2000; Shapiro *et al.*, 2003) und zur weiteren Stimulation durch Zytokine und Chemokine (Koedel *et al.*, 2002; Saez-Llorens and McCracken, 2003). Die intensive Immunantwort des Wirts auf die eingedrungenen Keime ist in erster Linie für die cerebrale Schädigung bei eitrigen, bakteriellen Meningitiden verantwortlich (Saez-Llorens and McCracken, 2003).

1.1.3 Klinische Symptome und Komplikationen der bakteriellen Meningitis

Zum ersten Mal wurde das klinische Bild der bakteriellen Meningitis detailliert vom Schweizer Arzt Vieusseux 1805 beschrieben. Er hat den Begriff „böartiger Fieber mit Purpura“ verwendet. Als Symptome wurden starker Kopfschmerz, Nackensteifigkeit, Erbrechen und ausgeprägte Hautveränderungen genannt (Vieusseux, 1805). Das klinische Bild

1. Einleitung

der neonatalen Meningitis ist unspezifisch und kann mehrere Symptome aufweisen wie: Berührungsempfindlichkeit, Temperaturinstabilität (Hypothermie sogar häufiger als Fieber), gespannte Fontanelle (etwa 25%), Opisthotonus (etwa 13%), Krampfanfälle (20-50%), schrilles Schreien, Bewusstseinsstörung und gastrointestinale Symptome (Schroten, 2004). Je jünger ein Kind ist, umso unspezifischer ist die Symptomatik. Mit fortschreitendem Alter beobachtet man die Trias: Kopfschmerzen, Meningismus und Fieber (Schaad, 1999). Positives Kernig-Zeichen (passive Streckung des gebeugten Kniegelenks bei gebeugtem Hüftgelenk ist nur unter starken nuchalen Schmerzen möglich), Brudzinski (bei passiver Neigung des Kopfs nach vorne, werden die Hüft- und Kniegelenke zur Entlastung der entzündeten Meningen gebeugt) und Laseque (passives Anheben der gestreckten Beine wird schmerzreflektorisch gehemmt) kommen typischerweise auch vor (Schroten, 2004). Für die Folgen der Erkrankung spielen sowohl der ursächliche Erreger als auch das Alter des Patienten eine Rolle. Diese Parameter sind auch für die Prognose von Bedeutung. Meningitiden die durch Gruppe B-Streptokokken, gramnegative *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus pneumoniae* verursacht werden haben eine deutlich schlechtere Prognose als Meningitiden durch *Haemophilus influenzae* Typ B und *Neisseria meningitidis*. 30-40% aller Kinder haben nach der Akutphase dauerhafte neurologische Folgen. Diese können im Bereich der Hirnnerven, des Hörens und Sehens, der Motorik, des Verhaltens und der kognitiven Leistungen vorkommen (Grimwood *et al.*, 1995; Kornelisse *et al.*, 1995; Pomeroy *et al.*, 1990; Burstein and Breningstal, 1986). Zu den häufigsten langfristigen Komplikationen gehört der sensorische Hörverlust (Verlust >25 dB). Die Hörschädigung kann unterschiedlich schwer, einseitig oder beidseitig auftreten. Audiologische Komplikationen zeigen mehr als 38% der Kinder die an Meningitis aufgrund von *Hib* erkranken. Ein Drittel der Erkrankten haben epileptische Anfälle in der Akutphase (Grimwood *et al.*, 1995; Pomeroy *et al.*, 1990; Oosterbrink *et al.*, 2002; Odio *et al.*, 1991). Schwere Intelligenzminderung (IQ<70) kommen bei 5-10% der Kinder vor (Pomeroy *et al.*,

1. Einleitung

1990; Grimwood *et al.*, 2000; Sell, 1983). Viele Kinder zeigen außerdem neben paretische Symptome auch Bewegungsstörungen wie Ataxie, Choreoathetose, Hemiballismus und Tremor. Sehstörungen und Hydrozephalus können gelegentlich auch vorkommen. Mortalität und Morbidität der Meningitis sind bei Neugeborenen höher als bei älteren Kindern. Dies ist auf ein unterschiedliches Erregerspektrum, die höhere Vulnerabilität des Gehirns und die oft zusätzlichen Probleme wie z.B. Sepsis zurückzuführen (Schmitt, 2004).

1. Einleitung

1.1.4 Therapie der bakteriellen Meningitis

Neben der symptomatischen Therapie und Behandlung eventueller Komplikationen steht die antibiotische Therapie ganz im Vordergrund. Die kausale Antibiotika Therapie sollte sofort und nicht verzögert beginnen (Bonsu and Harper, 2001). Grundsätzlich sollte zunächst eine empirische antibiotische Therapie begonnen werden, um eine sofortige antimikrobielle Wirkung zu erzielen und eine Verzögerung der Therapie zu verhindern. Je nach Antibiogramm erfolgt dann nach Möglichkeit die gezielte Umstellung auf ein anderes Antibiotikum. Die Auswahl des Antibiotikums muss unter Berücksichtigung des Lebensalters, des Immunstatus und der Prävalenz von Resistenzen erfolgen (Abele-Horn and Pfister, 2003). Grundsätzlich sollten die Antibiotika gut liquorgängig und bakterizid wirksam sein. Eine weitere nicht antibiotische, häufig diskutierte Therapieoption ist die adjuvante Kortikosteroidapplikation. 1997 wurden in einer ersten grösseren Metaanalyse die Daten von 11 randomisierten, kontrollierten Studien zur Dexamethasontherapie bei bakterieller Meningitis bei Kindern ausgewertet. Für die *Haemophilus influenzae* Meningitis zeigte sich in der Dexamethasongruppe im Vergleich zur Placebogruppe eine signifikante Reduktion schwerer Hörstörungen. Im Gegensatz dazu war bei der Pneumokokkenmeningitis ein günstiger Effekt von Dexamethason auf die Inzidenz schwerer Hörstörungen nur dann zu beobachten, wenn Dexamethason vor, gleichzeitig oder innerhalb von 6 Stunden nach Beginn der Antibiotikatherapie verabreicht wurde. Bei Kindern mit *Hib* Meningitis konnte die Gabe von Dexamethason 30 min. vor der Antibiotika Gabe die neurologische Folgen deutlich reduzieren (McIntyre *et al.*, 1997). In drei in den letzten Jahren publizierten Meta-Analysen konnte der günstige Effekt von Kortikosteroiden bei Patienten (Kinder und Erwachsene) mit akuter bakterieller Meningitis bestätigt werden (Van de Beek *et al.* 2003, 2004, 2007). In der zuletzt

1. Einleitung

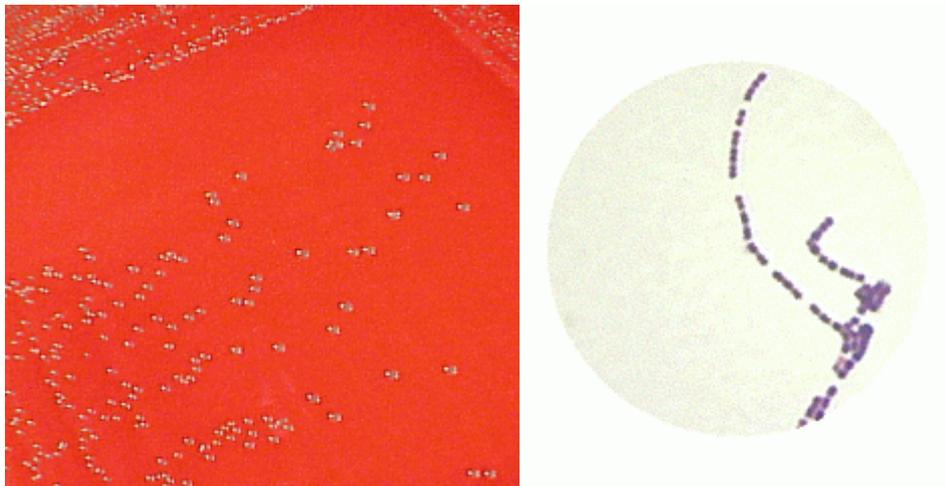
publizierten Meta-Analyse wurden die Daten von 18 klinischen Studien (2750 Patienten) ausgewertet (Van de Beek *et al.* 2007). Insgesamt konnte mit Kortikosteroiden die Letalität der bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen gesenkt werden. Auch die Häufigkeit schwerer Hörstörungen und neurologischer Residualsymptome war mit Kortikosteroiden auch bei Kindern insbesondere nach *Hib* Meningitis vermindert. Subgruppenanalysen zeigten den günstigen Effekt von Kortikosteroiden auf die Letalität nur für die Pneumokokkenmeningitis im Erwachsenenalter. Bei der Meningokokkenmeningitis konnten Letalität und Häufigkeit neurologischer Residuen nicht signifikant mit Dexamethason reduziert werden. In der aktuellsten Meta-Analyse, die mehr als 2000 Patienten eingeschlossen hat (Van de Beek *et al.*, 2010) konnte allerdings kein positiver Effekt von Dexamethason auf das Outcome von Patienten mit akuter bakterieller Meningitis nachgewiesen werden. Dieses gilt sowohl für die Mortalität als auch für permanente neurologische Schäden (wie zum Beispiel Hörstörungen bei Kindern mit *Hib* Meningitis). Zurzeit gibt es noch keine gesicherten Daten für die Rolle von Dexamethason bei der Therapie der Meningitis die durch gramnegative Erreger oder durch Staphylokokken verursacht wird. Das gleiche gilt auch für die Neugeborenen-Meningitis. Die Dexamethason Gabe ist nicht indiziert bei Patienten die unter einer nosokomialen Meningitis leiden, bei Neugeborenen sowie bei psychomotorisch retardierten Patienten (Chaudhuri, 2004). Als supportive Therapiemaßnahme kann Dexamethason bei der bakteriellen Meningitis jenseits der 6. Lebenswoche eingesetzt werden. Bei Kindern mit Pneumokokken-Meningitis sind die Daten unzureichend. Die weiteren therapeutischen Maßnahmen richten sich nach dem jeweiligen Krankheitsbild und den Komplikationen. Ein intensivmedizinisches Monitoring von Kreislaufparametern sowie regelmäßige neurologische Kontrollen sind heute Standard in der Meningitistherapie.

1. Einleitung

1.2 *Streptococcus suis* (*S. suis*)

1.2.1 Morphologie und Verhalten in der Zellkultur

Bei *Streptococcus suis* (*S. suis*) handelt es sich um ein Gram-positives, fakultativ anaerobes kokkoides Bakterium welches einen Durchmesser von ca. 1 μm hat und Einzeln, in Paaren oder selten in Kurzketten auftreten kann (Kilpper-Baelz and Schleifer, 1987). Auch ovoide oder pleomorphe Kokken in Diploform und in Kurzketten können vorkommen (Clifton-Hadley and Alexander, 1980). *S. suis*-Kolonien sind grau und teilweise auch schleimig. Der Koloniedurchmesser nach 24 Stunden Bebrütung auf Blutagar beträgt ca. 1-2 mm (Kaufhold *et al.*, 1988). Auf Schafblut- und Rinderblut- Agar wächst *S. suis* unter Ausbildung einer α -Hämolyse (Abb. 1). Eine β -Hämolyse zeigen einige *S. suis* Stämme auf Pferdeblutagar (Perch *et al.*, 1983).



A

B

Abb.1:A) Kolonien von *S. suis* auf Blutagar. B) Gramfärbung

(<http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/8/etiologia.htm>)

1. Einleitung

1.2.2 Bedeutung von *S. suis* als Pathogen

S. suis gehört zu den bedeutendsten bakteriellen Krankheitserregern in der modernen Schweinehaltung (Valentin-Weigand, 2007). Der Erreger gilt bei Schweinen als Auslöser einer Meningitis, Sepsis, Arthritis, „Sudden-death Syndrom“, Endokarditis, Pneumonie, Polyserositis, eines Aborts oder Abszesses (Clifton-Hadley, 1983; Vecht *et al.*, 1985). Humane Infektionen mit *S. suis* kommen vor allem bei Menschen vor, die beruflich mit Schweinen oder mit Schweinefleisch zu tun haben, wie Schweinezüchter, Schlachthofarbeiter, Arbeiter in der Fleischverarbeitung und Tierärzte, sind aber selten. Als Folge können: Meningitis, Sepsis, Endokarditis, Hörverlust und fulminante Verläufe vorkommen (Arends and Zanen, 1988; Staats *et al.*, 1997). Somit zählt *S. suis* zu den Zoonose-Erregern (Arends and Zanen, 1988; Kopic *et al.*, 2003; Strangmann *et al.*, 2002). Die oberen Atemwege, vor allem die Tonsillen und die Nasenhöhlen aber auch der Genital- und Gastrointestinaltrakt der Schweine werden als die hauptsächliche Infektionspforte für *S. suis* angesehen (Gottschalk and Segura, 2000). *S. suis* kolonisiert die Tonsillen von erkrankten und scheinbar gesunden Schweinen und wird normalerweise nasal oder oral übertragen (Arends *et al.*, 1984). *S. suis* konnte sogar bei gesunden Tieren oder bei antibiotisch vorgebehandelten Schweinen isoliert werden. Der Keim ist in der Lage an Epithelzellen zu adhären und zeigt außerdem ein invasives Verhalten in die Wirtszelle und in das Gewebe (Davies and Ossowicz, 1991). Die große Diversität von *S. suis* zeigt sich in der Vielzahl von Kapsel-Serotypen basierend auf zurzeit 35 differenzierbaren Polysaccharidantigenen. Stämme verschiedenen Serotyps aber auch innerhalb eines Serotyps können sich erheblich in ihrem Genotyp und in ihren Virulenzfaktoren unterscheiden. Die Bedeutung der Serotypen variiert geographisch und unterliegt auch zeitlichen Schwankungen. Weltweit besitzt der Serotyp 2 die größte Bedeutung. In Deutschland treten außerdem regelmäßig die Serotypen 1, 3, 7 und 9 auf. Serotyp 9 Stämme werden in Europa, vor allem in

1. Einleitung

den Ländern: Niederlande, Belgien und Deutschland, als ein „emerging pathogen“ eingestuft. Zurzeit sind etwa 60 % aller invasiven Stämme in Mitteleuropa den Serotypen 2 oder 9 zuzuordnen (Allgaier *et al.* 2001; Wisselink *et al.* 2000; Ghyslaine *et al.*, 2004; Lun *et al.*, 2007).

1.2.3 Potentielle Virulenzfaktoren

Die für die Adaptation an den Wirt verantwortlichen bakteriellen Faktoren sind bis heute nur teilweise bekannt (Gottschalk and Segura, 2000). Die meisten Studien zur Analyse von Virulenzfaktoren von *S. suis* sind an den Serotyp 2 durchgeführt worden. Die Virulenz von *S. suis* unterscheidet sich zwischen den Serotypen und zwischen unterschiedlichen Stämmen desselben Serotyps (Vecht *et al.*, 1992; Gottschalk *et al.*, 1999). Mehrere Moleküle sind als Virulenzfaktoren identifiziert worden. Dazu gehören u.a.: das Kapsel-Polysaccharid (KPS) (Vanier *et al.*, 2004), ein Hämolyisin (Suilyisin) (Jacobs *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 1995), ein 136 kDa Muramidase-released Protein (MRP) ein 110 kDa extracellular Factor Protein (EF-Protein) (Vecht *et al.*, 1991) und ein Adhäsion. In der letzten Zeit wurden neue Faktoren wie das Fibronectin und das Fibrinogen-Binding Protein sowie die Lipoteichonsäure (LTA) beschrieben die eine Rolle in der Kolonisation nach experimenteller Infektion spielen (De Greef *et al.*, 2002; Fittipaldi *et al.*, 2008; Esgleas *et al.*, 2005; Vanier *et al.*, 2007).

1. Einleitung

1.2.3.1 Kapselpolysaccharid (KPS)

Das Kapselpolysaccharid (KPS) von *S. suis* Serotyp 2 besteht aus fünf verschiedenen Zuckern, nämlich Rhamnose, Glukose, Galactose, N-Acetylglukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure) in einem Verhältnis 1:1:3:1:1. Die genaue Struktur ist jedoch noch nicht geklärt. Die Kapsel-Gene konnten kloniert und exprimiert werden (Elliot and Tai, 1978). Bis jetzt ist das Kapselpolysaccharid als der einziger wirklicher Virulenzfaktor nachgewiesen worden, da isogene Stämme ohne Kapsel komplett avirulent sind (Vanier *et al.*, 2004). Welche Aufgabe die einzelnen Bestandteile der Kapsel besitzen, ist noch nicht genau bekannt. Es gibt aber Hinweise dafür, dass einzelne Bestandteile eine Rolle in der Pathogenese von *S. suis* spielen, da bekapselte Stämme in *in vivo* Untersuchungen die Phagozytose durch Alveolarmakrophagen verhinderten, während die unbekapselten Deletionsmutanten sehr effektiv phagozytiert (über 99%) und abgetötet wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass akapsuläre Stämme, in Tiermodellen mit Schweinen und Mäusen, sehr schnell (nach 48 Stunden) aus der Zirkulation entfernt werden, während bekapselte Stämme auch nach 5 Tagen noch in der Zirkulation nachweisbar sind (Segura *et al.*, 1998; Charland *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). Neuere Studien konnten den protektiven Effekt der Kapsel von *S. suis* auf die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten bestätigen (Benga *et al.*, 2008). Trotz der Tatsache dass die Kapsel einer der Hauptvirulenzfaktoren zu sein scheint, sind auch die meisten avirulenten Stämme bekapselt. Das deutet darauf hin, dass weitere Virulenzfaktoren essentiell sein müssen. Antikörper gegen das KPS schützen nur partiell gegen eine Infektion (Charland *et al.*, 1997) und nicht infizierte Tiere zeigen nur einen niedrigen Titer dieser Antikörper (Gottschalk and Segura, 2000).

1. Einleitung

1.2.3.2 Hämolsine

Die Fähigkeit von Bakterien Erythrozyten zu lysieren (Hämolyse) wird bei verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien in Verbindung mit Virulenz und Pathogenität gebracht. Auch *S. suis* ist in der Lage Hämolsine zu exprimieren. Bei den bisher beschriebenen Hämolsinen handelt es sich ausnahmslos um extrazelluläre Proteine. Die Molekularmasse variiert zwischen 52 kDa und 65 kDa (Jacobs *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 1995). Homologie Untersuchungen von Okwumabua *et al.* (1999) ergaben eine sehr hohe Übereinstimmung des 52 kDa großen Hämolsins mit dem Hämolsin welches von Jacobs *et al.* (1994) beschrieben wurde. Letzteres wurde von Jacobs *et al.* (1994) als Suilysin (SLY) bezeichnet und gehört zu der Familie der Thiol-aktivierten Toxine, welche eine Antigen-Verwandtschaft mit Cholesterol-bindenden zytolytischen Toxinen aufweisen (Gottschalk *et al.*, 1995). Zu der Familie der Thiol-aktivierten Toxine gehören noch: Streptolysin 0 (SLO), Perfringolysin 0 (PFO), Listeriolysin 0 (LLO) und das Pneumolysin (PLY) (Shichum *et al.*, 2003). Die Rolle dieser Toxine in der Pathogenese variiert und ist noch nicht genau bekannt, aber es konnte gezeigt werden, dass sie alle eukaryotische Zellen die Cholesterol aufweisen lysieren können (Tveten, 1995). Das Gen, das für Suilysin codiert, zeigt eine relativ hohe Ähnlichkeit mit Pneumolysin, ein Toxin das von *S. pneumoniae* produziert wird (Gottschalk *et al.*, 2000; Segers *et al.*, 1998). Trotz der Tatsache, dass Antikörper gegen Suilysin vor einer Infektion schützen ist die Rolle dieses Toxins als Virulenzfaktor noch nicht sicher festgestellt (Gottschalk *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 1994). Jedoch konnte in *in vitro*-Versuchen eine zytotoxische Wirkung festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Hämolsin-Expression im Zusammenhang mit der Lyse von Epithel- und Endothelzellen steht und somit für *S. suis* bei der Überwindung von Zellbarrieren eine Bedeutung haben könnte (Norton *et al.* 1999; Charland *et al.* 2000). Mit Hämolsin vakzinierte Schweine zeigten nach einer Infektion

1. Einleitung

mit Hämolytin positiven *S. suis* Stämmen nur sehr milde Krankheitssymptome (Jacobs *et al.* 1996). Aufgrund dieses partiellen Impfschutzes kann davon ausgegangen werden, dass die Hämolytine für die Virulenz von *S. suis* eine Rolle spielen, obwohl auch virulente Hämolytin negative *S. suis*-Stämme nachgewiesen wurden (Staats *et al.* 1998).

Die meisten europäischen Stämme sind Suilysin positiv, während eine variable Produktion von diesem Protein in Nord-Amerikanische Stämme festgestellt worden ist (Gottschalk *et al.*, 1998; Staats *et al.*, 1999). Bis jetzt ist kein avirulenter, Suilysin positiver *S. suis* Serotyp 2 Stamm beschrieben worden (Lalonde *et al.*, 2000). Eine retrospektive Studie zeigte eine Korrelation zwischen der Präsenz von Suilysin und die Expression von Extracellular Factor (EF) und Muramidase released-Protein (MRP) und der hohen Virulenz von *S. suis* Typ 2 (Staats *et al.*, 1999). Außerdem zeigte eine *in vitro* Studie, dass die Präsenz von Suilysin die epitheliale Invasion und Zell-Lyse von virulenten *S. suis* Stämme erleichtert (Norton *et al.*, 1999). Die SLY positiven Stämme scheinen eher zu adhären und die Zellen zu schädigen und nicht direkt zu invadieren. Dies scheint ein Teil eines komplizierten Prozesses zu sein, der zur Bakteriämie und Meningitis bei Schweinen führt (Lalonde *et al.*, 2000).

1. Einleitung

1.3 Die Blut-Hirn Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurde zum ersten Mal 1885 von Paul Ehrlich beschrieben. Er hat mittels peripherer intravenöser Farbstoffinjektion (Trypan blau) eine Färbung bei allen Organen, mit Ausnahme des Gehirns festgestellt. Damit stellt sie eine strukturelle Barriere zwischen dem vaskulären System des Körpers und dem Gehirn dar. Der Begriff der Blut-Hirn-Schranke wird als Oberbegriff für alle Epithelbarrieren zwischen Blut und Nervengewebe verwendet, also der Blut-ZNS-Schranke, Blut-Liquor-Schranke, Blut-Retina-Schranke, Blut-Nerven-Schranke. Außerdem beschreibt die BHS die Grenze zwischen Kapillargefäßen und zerebraler extrazellulärer Flüssigkeit. Die Blut-Hirn-Schranke sorgt für ein eigenständig regulierbares Mikromilieu im Extrazellularraum des Gehirns, unabhängig von dem des restlichen Organismus. Anatomisch gesehen besteht die BHS aus dem cerebralen Endothel, den Perizyten und den Endfüßen der Gliazellen (Astrozyten) (Abb. 2a). Das Endothel des kontinuierlichen Typs (z.B. BHS) besitzt im Gegensatz zum fenestrierten und diskontinuierlichen Endothel sehr wenig endocytotische Vesikel (Abb. 2c). Daneben sind die Epithelzellen durch *tight junctions* fest miteinander verbunden (Risau *et al.*, 1998), wodurch die parazelluläre Diffusion verhindert wird. Dies bewirkt, dass die BHS gegenüber dem peripheren mikrovaskulären System 50-100-mal weniger permeabel ist (Abbott, 2002). Der gesamte Stofftransport zu den Nervenzellen erfolgt über dieses endotheliale Geflecht, das die im Blut vorhandenen Substanzen gleich einem biologischen Filter bei Bedarf durchlässt, aber für die Gehirnfunktion schädliche Substanzen vom Nervensystem fernhält.

1. Einleitung

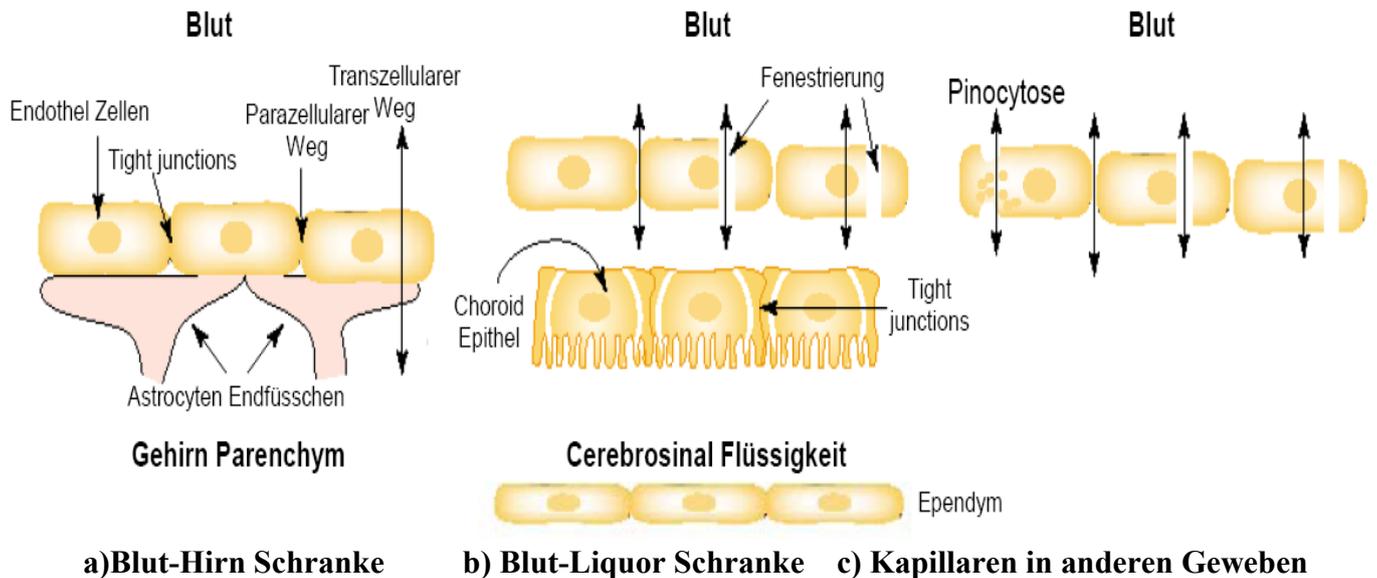


Abb. 2: a) Schematisches Diagramm der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und b) der Blut-Liquor-Schranke (BLS) mit den spezifischen tight junctions, die die parazelluläre Diffusion ins ZNS verhindern. Im Vergleich dazu c) der relativ freie Stoffaustausch in Endothelien anderer Gewebe (Kusuhara and Sugiyama, 2001).

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Blut-Hirn-Schranke ist der hohe transendotheliale elektrische Widerstand (TEER), welcher in vivo über 1500-2000 Ω/cm^2 (Butt *et al.*, 1990) beträgt. Die BHS ist für anorganische Ionen nahezu undurchlässig, und die Leitfähigkeit infolgedessen gering. Der Aufbau der enzymatischen Barriere erfolgt durch Enzyme wie α -Glutamyl-transpeptidase (α -GT) und alkalische Phosphatase, welche in anderen Endothelien vermindert oder nicht exprimiert werden. Schließlich wird noch eine Polarität zwischen luminaler und abluminärer Membran der Kapillarzellen beobachtet, die sich in der Protein- und Lipidzusammensetzung äußert (Cornford and Hyman, 1999). Die Endothelzellen bilden zusammen mit den Perizyten und den Astrozyten einen dynamisch regulierten

1. Einleitung

Zellverband - die Hirnkapillare. Diese besitzt einen Durchmesser von 3-7 μm (Abb. 3). Die Endothelzelle, die als einzelne Zelle den ganzen Kapillarrumfang umschließt, ist von den anderen beiden Zelltypen durch die Basallamina getrennt, welche unter anderem aus Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Heparan-sulfat besteht (Scherrmann, 2002).

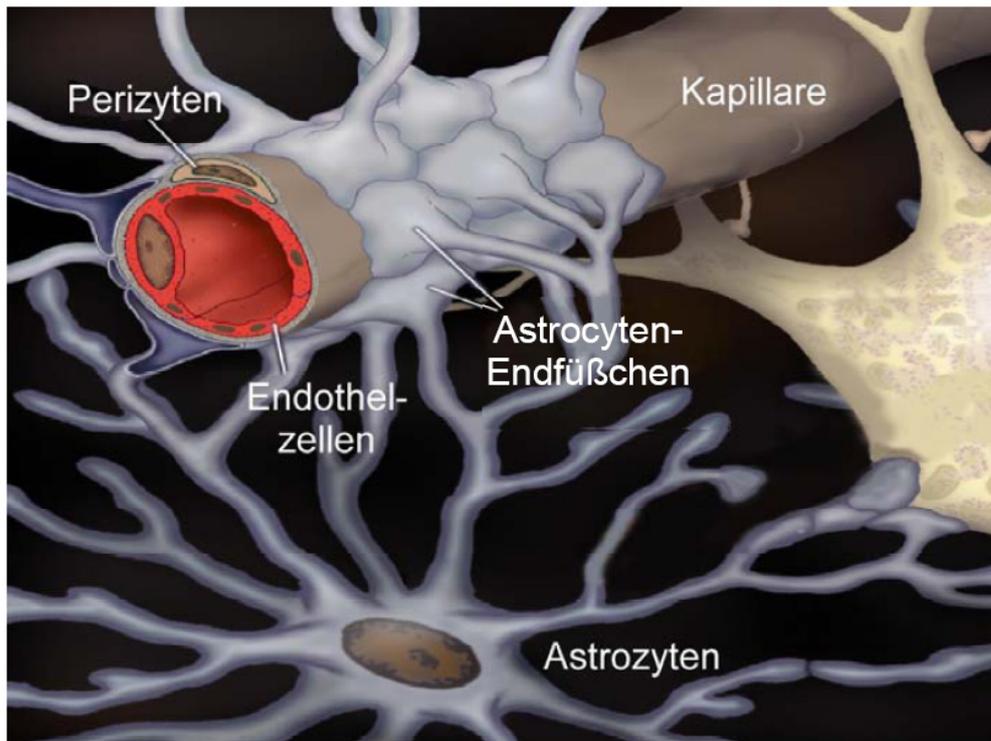


Abb. 3: Darstellung einer Hirnkapillare, bestehend aus Endothelzelle und aufsitzenden Perizyten. Das Kapillarrohr wird von den Endfüßchen der Astrozyten umschlossen. (http://www.ruhr-uni-bochum.de/rubin/rbin1_01/medizin/Beitrag4/index.html)

1. Einleitung

1.4 Die Blut-Liquor Schranke/ Plexus choroideus

Der Plexus choroideus (PC) ist in den beiden Seitenventrikeln, dem 3. Ventrikel und dem 4. Ventrikel lokalisiert. Im Gegensatz zur BHS ist die Blut- Liquor-Schranke (BLS) auf den Plexus choroideus beschränkt und besteht aus einer einschichtigen Epithellage, auf der außen eine gefäßführende Bindegewebsschicht aus einschichtigem kubischem Epithel zu liegen kommt. Die Epithelzellen werden ebenfalls durch *tight junctions* miteinander verbunden (Abb. 2b, Abb. 4). Prinzipiell ähneln sich Aufbau und Funktion von Plexus choroideus und Blut-Hirn Schranke, wobei die Kapillaren des Choroidplexus etwas durchlässiger sind, als die der BHS (Nassif *et al.*, 2002). Die Epithelzellen sind polar aufgebaut: auf der basolateralen Seite haben sie Kontakt zum Blutplasma, das durch das fenestrierte Endothel fließen kann. Das Stützgewebe wird von Fibroblasten produziert und besteht aus netzwerkartigen Collagenfasern. Es beherbergt dendritische Zellen sowie Makrophagen (Strazielleand Ghersi-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 and Jones, 1990). Die basolaterale Membran des PC weist im Vergleich zur apikalen Membran mit 25cm² eine deutlich kleinere Oberfläche auf (Keep and Jones, 1990). Hier trennt die Basallamina die Zellen vom Stroma. Da die Austauschfläche der BHS mit etwa 10-20 m² ca. 5000 mal größer ist, als die der BLS, wird erstere als verantwortliche Kontrollstruktur für den Stoffaustausch des Gehirns angesehen (Demeule *et al.*, 2002). Im Plexus choroideus wird der größte Teil des Liquor cerebrospinalis produziert. Außerdem wird die Zusammensetzung des Liquors vom Plexus überwacht. Im Prinzip ist der Liquor cerebrospinalis ein „modifiziertes Lymphsystem“ des ZNS. Die inneren und äußeren Liquorräume sind damit gefüllt und er bietet außerdem auch

1. Einleitung

Die beschriebene Polarität und die große Anzahl von Mitochondrien sind typisch für sezernierende und re-absorbierende Epithelien (Strazielle und Ghersi-Egea, 2000). Das Epithel des *Plexus choroideus* bildet, wie schon erläutert, eine Barriere zwischen dem Blut und dem Liquor. Die Rolle der Epithelzellen des *Plexus choroideus*, die die strukturelle Basis der Blut-Liquor-Schranke darstellen, ist dagegen im Infektionsgeschehen bisher weitgehend unbekannt. Eine Schädigung des Plexusepithels kann entweder durch Bakterien bedingt sein, oder den Durchtritt weiterer Bakterien, Leukozyten und toxischer Substanzen in das ZNS begünstigen. Mehrere PC-Zelllinien wurden bis heute beschrieben (die aus Mäuse, Ratten oder Schaffe stammen). Allerdings sind die Erkenntnisse über diese Zelllinien bezüglich der ZNS-Infektionen beschränkt (Adam *et al.*, 2007). 2001 wurde ein porcines *in vitro* Plexusepithelzellmodell mit hohen Barriereigenschaften entwickelt und charakterisiert (Hasselbach *et al.*, 2001). Um die Invasion und Translokation durch die Blut-Liquor-Schranke untersuchen zu können, hat unsere Arbeitsgruppe eine Umkehrkultur im Transwell Filter System entwickelt, die erstmalig die Infektion von PCPEC von der basolateralen Zellseite ermöglicht. Die basolaterale Zellmembran ist das eigentliche Hindernis, das die Bakterien für den Eintritt in und die Translokation durch die Zellen zu überwinden haben, da das Endothel des *Plexus choroideus* fenestriert ist und nur eine minimale Barriere darstellt. Im Gegensatz dazu sind die PCPEC durch die *Tight junctions* eng miteinander verbunden und bilden so die strukturelle Basis der Blut-Liquor-Schranke (Gath *et al.*, 1997, Haselbach *et al.*, 2001).

1. Einleitung

1.5 Invasion von Bakterien in Wirtszellen - Die Rolle von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)

Das Eindringen von Bakterien in Wirtszellen wird als Invasion bezeichnet. Eukaryotische Zellen können von Erregern invadiert werden wobei es im Zellinneren zu einer Erregerreplikation kommt. Mittels Adhäsion binden zunächst die Bakterien an der Wirtszelle, wobei es zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden beim Kontakt kommt, die direkt oder indirekt die Erregeraufnahme zur Folge haben (Bliska *et al.*, 1993). Alle bakterielle Invasionssysteme induzieren dramatische Umstrukturierungen des Zytoskeletts. Hierdurch werden bestimmte Aktinfilamente abgebaut und andere F-Aktinbündel am Ort der Internalisation, z.B. zur Bildung von Pseudopodien, neu synthetisiert. Um diese zytoplasmatischen Veränderungen einzuleiten, werden durch die Bindung des bakteriellen Invasins an den Zellrezeptor (Zippering) oder durch die Wechselwirkung injizierter Effektoren mit zytoplasmatischen Signalmolekülen (Triggering) bestimmte Signaltransduktionswege (z.B. PI3-Kinase, Rac-1, F-Aktin) aktiviert (Dresch, 2002). Ein oder mehrere Liganden auf bakterieller Seite, die Adhäsine und Integrine, binden dabei an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Die An- oder Abwesenheit dieser Rezeptoren in bestimmten Geweben oder Organen kann den Gewebetropismus des Erregers bestimmen. Anschließend kommt es zur Signalübertragung und zur Reorganisation des Wirtszytoskeletts (Tang *et al.* 1993). Die Invasion in eukaryotische Zellen ist für viele pathogene Bakterien ein wichtiger Schritt im Verlauf der Infektion eines Organismus und verschafft ihnen zahlreiche Vorteile. Auf diese Weise können die Bakterien z.B. die Angriffe des Immunsystems bzw. die Wirkung von Antibiotika umgehen. Der Invasionsprozess erlaubt es ihnen auch, durch bestimmte Zellschichten hindurchzutreten und in tief gelegene Wirtsgewebe und Organe einzuwandern. Die Invasion kann entweder durch direktes oder indirektes Binden von Wirtszellrezeptoren

1. Einleitung

oder durch die Translokation von bakteriellen Faktoren in das Wirtszytosol und die dadurch jeweils ausgelöste Rearrangierung des Aktinzytoskeletts ausgelöst werden (Pizarro-Cerda and Cossart, 2006). Zur Internalisation synthetisieren die Bakterien verschiedene Oberflächenstrukturen. Diese Oberflächenstrukturen ermöglichen die Anheftung der Bakterien an eukaryotische Zellrezeptoren, in deren Folge verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle aktiviert werden (Dresch, 2002). Für die Signaltransduktion besitzen Phospholipide als Signalmediatoren eine sehr große Bedeutung. Die chemische Struktur dieser Phospholipide kann durch verschiedene Enzyme beeinflusst werden. Hierzu zählt die zu den Lipidkinasen gehörende Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) (Foster *et al.*, 2003), die in sämtlichen eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden können. PI3K beteiligt sich an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen, wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion. Diese Enzymgruppe phosphoryliert die 3'-Position des Inositolringes der Phosphatidylinositide, und als Ergebnis entstehen verschiedene Phosphatidylinositid-Phosphate (Vanhaesebroek *et al.*, 2000). Die PI3K's sind heterodimere, die aus einer 85-kDa regulatorische Subunit und eine 110-kDa katalytische Subunit bestehen, die D-3-phosphorylierte Lipid-Produkte in der Zell-Membran generieren, wenn sie stimuliert werden. Diese Phosphoinositiden funktionieren wie „second Messenger“ und so ist es möglich signal-Proteine zu aktivieren, die pleckstrin homology (PH) Domäne beinhalten. Bindung dieser Phosphoinositiden an Effektormoleküle resultiert zu einer Signalkaskade die zu Aktin-Polymerisation und letztendlich auch zu Invasion führt (Purushothaman *et al.*, 2003). PI3-Kinasen sind auch für spezifische endozytische Prozesse verantwortlich (Carpenter and Cantley, 1996). Es ist bekannt, dass 2 Komponente, nämlich Wortmannin und LY294002 die strukturell keine Verbindung zueinander haben auf verschiedene Wege die PI-3- Kinase-Aktivität inhibieren (Hu *et al.*, 2000). Die PI-3-Kinase-Aktivität kann spezifisch durch den pharmakologischen Inhibitor 4-Morpholinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002;

1. Einleitung

C₁₉H₁₇NO₃) gehemmt werden (Huang *et al.*, 2006). LY294002 ist ein zellmembrandurchgängiger, potenter und spezifischer Inhibitor, der an der ATP-Bindungsstelle des Enzymskovalent bindet. Dieser zeigt keinen Effekt bezüglich der Aktivität der EGF-Rezeptor-Kinase, der MAP-Kinase, PKC, PI-4-Kinase und S6 Kinase. LY294002 wird in vielen Studien benutzt (Vlahos *et al.*, 1994).

LY290042 hat ein MG von 343,8 g/mol und seine Struktur sieht wie folgend aus:

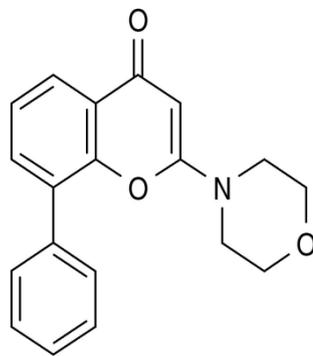


Abb. 5: chemische Struktur von LY294002

Mehrere Isoformen der PI3-Kinase aber auch Isoformen von PI4-Kinase werden von LY290042 inhibiert (Martin, 1998). Sowohl Wortmannin als auch LY290042 sind in der Lage die homotypische Fusion zwischen Endosomen zu inhibieren (Jones and Clague, 1995; Li *et al.*, 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass LY290042 die Invasion von Gruppe A Streptokokken in Hep-2-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration inhibiert. Die Inhibition war spezifisch, da sowohl LY290042 als auch Wortmannin, nicht in der Lage waren den Eintritt von *S. enterica* serovar Typhimurium in Hep-2 Zellen zu inhibieren, welcher unabhängig von PI3-Kinasen ist (Purushothaman *et al.*, 2003; Finlay and Cossart, 1997). Allerdings konnte in der gleiche Studie gezeigt werden, dass die Adhärenz und das

1. Einleitung

intrazelluläres Überleben der Gruppe A- Streptokokken nicht durch LY290042 beeinflusst werden konnte (Purushothaman *et al.*, 2003). Auch die Invasion von anderen Bakterien wie *L. monocytogenes* oder *Pseudomonas aeruginosa* in der apikalen Seite von HeLa-Zellen wird durch LY290042 inhibiert (Tang *et al.*, 1998; Kierbel *et al.*, 2005).

1.6 Inflammatorische Reaktion in Wirtszellen nach Bakterienstimulation- Die Rolle von Glukokortikoiden

Glukokortikoide werden weltweit als Immunsuppressiva und als antiinflammatorische Medikamente benutzt (Wissink *et al.*, 1998). Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass sie die Expression von Zytokinen und die Adhäsion von Molekülen und Enzymen, die in den inflammatorischen Prozess involviert sind, inhibieren. Diese Effekte werden durch einen intrazellulären Rezeptor vermittelt, den Glukokortikoid Rezeptor, ein Mitglied der Steroid/Thyroid Hormonrezeptor Superfamilie (Wissink *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um einen 777- Å großen Rezeptor, der vom Zytoplasma aus zu den Zellkern migriert (Lasa *et al.*, 2002). Die durch Glukokortikoide bedingte Entzündungshemmung ist auf ihre antiinflammatorischen, immunsuppressiven, antiexsudativen, antiallergischen und antitoxischen Eigenschaften zurückzuführen, die Grundlage für die breite therapeutische Anwendung der Glukokortikoide sind.

Das klinisch am häufigsten genutzte Glukokortikoid ist das Dexamethason. Dexamethason (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) (Abb. 6), ist ein künstliches Glukokortikoid, welches entzündungshemmend und dämpfend auf das Immunsystem wirkt. Dexamethason gehört, durch die Fluorierung am C-9-Atom und weitere Substituierung am C-16-Atom, zu der Gruppe der fluorierten Glukokortikoide, welche sich durch starke antiallergische, antiinflammatorische

1. Einleitung

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein entscheidender Schritt während der Pathogenese der bakteriellen Meningitis ist das Eindringen von Erregern in das zentrale Nervensystem (ZNS). Als Eintrittspforte in das ZNS wird neben der bereits gut untersuchten Blut-Hirn-Schranke (BHS) ebenso die Blut-Liquor-Schranke (BLS) diskutiert. Das Epithel des Plexus choroideus, welches die strukturelle Basis der Blut-Liquor Schranke darstellt, wird als wesentliche Eintrittspforte für *S. suis* (aber auch für andere Bakterien) und Leukozyten vom Blut in den Liquor vermutet. Als *in vitro* Modell der BLS dienten primäre porcine choroidale Plexus-epithelzell-Monolayer (PCPEC). Ziel dieser Arbeit war es eine Umkehrkultur („inserted“ Transwell-Filter) zu etablieren, die die Untersuchung der Translokation von Bakterien von der physiologisch relevanten „Blutseite“, sprich basolateralen Plexusepithelmembran möglich macht. In diesem Zellkultursystem sollte dann der Unterschied zwischen bekapseltem *S. suis* Serotyp 2 und dessen akapsulärer Mutante sowie der mögliche protektive Einfluss von Dexamethason und eines PI3-Kinase Inhibitors untersucht werden. Die Rolle des Pathogenitätsfaktors Suilysin auf die Translokation von *S. suis* sollte außerdem untersucht werden. Des Weiteren sollte die Barrierefunktion anhand des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) und des parazellulären Inulinflusses quantifiziert werden. Diese Arbeit eröffnet möglicherweise neue diagnostische und therapeutische Wege in der Behandlung der Meningitis.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material für die Isolierung von porcinen Epithelzellen des Plexus choroideus (PCPEC)

2.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- Agar (CCH-B-Agar) + Oxoid Agar-Platten (Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf)
- Aqua destillata /Aqua ad injectabilia, Braun, (Melsungen, Deutschland)
- HEPES (Gewebskulturpuffer) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure, 1M, Bio Whittaker Europe (Verviers, Belgium)
- Laminin: BD Biosciences Discovery 354232 (1 mg in 62 mg/ml, gefroren) mit Aqua dest. gelöst. Die Zellkulturfilter wurden für 24 Stunden mit einer Endkonzentration von 50 µg/ ml in Raumtemperatur beschichtet (Heidelberg, Deutschland)
- Schutzkleidung für die Plexuspräparation auf dem Schlachthof
- Steriles Bechergesäß mit Schraubverschluss
- Sterile Bechergläser
- Sterile Pinzetten
- Sterile Skalpelle
- THB (Todd Hewitt Broth): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Transwell Zellkultureinsätze: Costar 3415, 3 µm Poren mit Polyester Membran für 24 well platten, Corning Incorporated (NY, USA)

2. Material und Methoden

Transwell Zellkultureisätze: Falcon 3492 HD, 3 µm Poren, PET track membran für 24 well platten, Becton & Dickinson (Le Pont De Claix, Frankreich)

- Zellkulturplatten: mit 12 oder 24 Vertiefungen, Flachboden, Becton & Dickinson (Le Pont De Claix, Frankreich)

Die verwendeten Pufferlösungen wurden kurz vor der Verwendung aus Stammlösungen hergestellt und setzten sich wie folgt zusammen:

- HBSS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (HBSS+): Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (HBSS--): Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- HBSS+/Hepes/Ab: 500 ml HBSS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco, Deutschland)
Hepes 20 mM (Bio Whittaker Europe)
Penicillin/Streptomycin: 100 U Penicillin+100µgStreptomycin/ml
(ICN,Deutschalnd)
- HBSS--/Hepes/Ab: 500 ml HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco, Deutschland)
Hepes 20 mM (Bio Whittaker Europe)
Penicillin/Streptomycin: 100 U Penicillin+100µgStreptomycin/ml
(ICN,Deutschland)
- Phosphate Buffered Saline, ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PBS--),(Gibco,Deutschland)

2. Material und Methoden

- SFM/Ab: 500 ml DMEM/F-12 HAM (Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin, 4mM (Gibco, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin: 100 U Penicillin+ 100 µgStreptomycin/ml
(ICN,Deutschland),
Insulin: 5µg/ml (Sigma, Deutschland)
- SFM ohne Ab: 500 ml DMEM/F-12 HAM (Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin, 4mM (Gibco, Deutschland)
Insulin: 5µg/ml (Sigma, Deutschland)
+/-Phenol rot
- SHM/ARAC: 500 ml DMEM/F-12 HAM (Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin, 4mM (Gibco, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin: 100 U Penicillin+ 100 µgStreptomycin/ml
(ICN,Deutschland)
Insulin: 5µg/ml (Sigma, Deutschland)
Cytosinarabinosid (Ara-C): 20 µM (Cell Pharm GmbH, Hannover)
Fätales Kälberserum (FCS) 10% hitzeinaktiviert, 60ml
(Seromed/Biochrom)
- Trypsinlösung: 20 ml Trypsinlösung/1 g Naßgewicht Plexusgewebe.
100 µg/50 ml PBS--(ohne Ca/Mg)

2. Material und Methoden

2.1.2 Enzyme und Sera

- Trypsin: Belger Biochemie, Kleinmachnow
- Fötale Kälberserum (FCS), steril, Seromed/Biochrom (Berlin, Deutschland). Es wurde 30 min lang bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert

2.1.3 Pharmaka und Agenzien

- Calcein AM, 40 µl, Live-Dead Viability- Cytotoxicity Kit: Mobitec (Göttingen, Deutschland)
- Cytosinarabinosid (Ara-C): 20 mg/ml, Cell pharm GmbH (Hannover, Deutschland)
- DMEM (Dulbeco`s modified eagle Medium), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Ethanol 70%
- Ethidium Homodimer-1, 150 µl, Live-Dead Viability- Cytotoxicity Kit: Mobitec (Göttingen, Deutschland)
- FITC-Inulin, 1g, Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Es wurde in 200 ml SFM o. Ab o. Phenol-rot aufgelöst (=5mg/ml)
- Insulin: 10 mg/ml, sterilfiltriert aufgelöst in 25 mM HEPES, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- L-Glutamin, 200 mM: Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin: ICN, Nr: 1670049 (Northeim, Deutschland)

2. Material und Methoden

2.1.4 Instrumente und Geräte

- Analysewaage CPA623S, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
- CO₂-Inkubator, HERA Cell 240, Thermo scientific Laboratories (Karlsruhe, Deutschland)
- Eppendorf Tubes: 2,0/1,5/0,5 ml, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 200MAxio, Carl Zeiss Microimaging (Göttingen, Deutschland)
- Hettich Rotanda TRC Kühlenzentrifuge mit Schwingbecherrotor, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Küvetten, steril, 10x4x45 mm, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Latexhandschuhe, Braun (Melsungen, Deutschland)
- Mikroplatten-Reader: Infinite 200M Tecan Trading AG, (Schweiz)
- Petrischalen, bakteriologisch 100 x 20 mm, aus Polystyrol, Falcon (Le Pont de Claix, Frankreich)
- Pipetten für Zellkultur: 5ml, 10ml, 25 ml Becton & Dickinson (Le Pont De Claix, Frankreich)
- Pippetenspitzen für Zellkultur: 101-1250µl, 1-200 µl, 0,1-10 µl, 1-100 µl, Starlab (Ahrensburg, Deutschland)
- Pipettos: Pipetboy comfort, Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland)
- Präparierbesteck und Scheren zur Gewebszerkleinerung
- Sterilbank:Hera Safe, Thermo-Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
- sterile Handschuhe: Peha-taft R , Paul Hartmann AG, (Heidenheim, Deutschland)
- UV-mini-1240 Spektrophotometer, Shimadzu (Milan, Italien)

2. Material und Methoden

- Vortexgerät: press-to-mix, 34524, 220/240 volt – 50Hz, Snijders (Tilburg, Niederlande)
- Wasserbad: Köttermann Labortechnik, (Niedersachsen, Deutschland)
- Widerstandsmessungsgerät: Millicell- Electrical Resistance System, ± 199.0 mV, 0–1999 Ω oder 0–20 K Ω , Millipore (Schwalbach, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen Cellstar 15 ml aus Polypropylen mit konischem Boden, Greiner Bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen Falcon „Blue Max“ 50 ml aus Polypropylen mit konischem Boden, Falcon (Le Pont De Claix, Frankreich)

2.1.5 Inhibitoren

- Dexamethason , D2915, 25 μ M Dexamethason Lösung, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LY294002 50 μ M Lösung, Calbiochem, Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)

2.1.6 Bakterienstämme

Für die Versuche wurden hauptsächlich 2 verschiedene Stämme des *S. suis* Serotyp 2 verwendet. Diese wurden freundlicherweise von H. Smith (DLO-Institute for animal Science and Health, Lelystad, The Netherlands) bereitgestellt. Zum einem wurde der Wildtyp Stamm 10 eingesetzt und dessen akapsuläre Mutante (10cps Δ EF). Beide Stämme sind MRP+, EF+ und Suilysin+, wobei die Suilysin-Aktivität bei dem Stamm 10 bei 58% und bei dem Stamm

2. Material und Methoden

10cps Δ EF bei 82% liegt. Außerdem wurden die Wildtypen Sx332 (Q8), 9657573 (Q11), 31533 (Q9) und deren Suilysin defiziente Mutanten Sx932 (Q10), Sx917 (Q7), Sx911 (Q6) verwendet. Sx332 (Q8) ist ein Nordamerikanischer Stamm, wobei es bei 9657573 (Q11) und 31533 (Q9) um europäische Stämme handelt. Alle Stämme sind MRP+, EF+ und Kapselpolysaccharid+ und zeigen eine hämolytische Aktivität (Lun *et al.*, 2003).

Lactococcus lactis strang MG1363 diente als Kontrolle bei den Versuchen und wurde in 30°C und M17 Medium mit 0,5 % Glukose kultiviert (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom).

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Kultivierung der porcinen Epithelzellen des *Plexus choroideus* (PCPEC)

Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellen wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Es wurden ausschließlich sterile Materialien, Lösungen und Medien verwendet.

Präparation

Die Isolierung der Epithelzellen des *Plexus choroideus* aus Schweinehirnen (*porcine choroid plexus epithelial cells*, kurz: PCPEC) wurde gemäß dem von Crook *et al.* (1981) beschriebenen Verfahren unter Berücksichtigung der Modifikationen nach Hakvoort *et al.* (1998) durchgeführt. Am Schlachthof Duisburg, (Firma Kemink, Gelderblomstr., 47137, Duisburg) wurden die *Plexus chorioidei* aus den lateralen Ventrikeln frisch geschlachteten Schweine mit einer sterilen Pinzette entnommen und in Hank's buffered salt solution (Raumtemperatur), mit

2. Material und Methoden

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 2% Pen. / Strept. + 15 mM HEPES (HBSS++/HEPES) überführt. Die Plexusstränge wurden sofort in 50 ml ungekühltem HBSS ++ gewaschen. Der anschließende Transport des Plexusgewebes fand in serumfreiem Medium (SFM) statt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. In unserem Labor mussten die Plexusstränge zunächst ausbluten. Aus diesem Grund wurde jeder Strang separat mit einer sterilen Pinzette am dünnen Ende gegriffen und vom dickeren Ende, das man an den größeren Blutgefäßen erkennen konnte, wurde ca. 0,5 cm mit einer sterilen Präparierschere abgeschnitten. Um die restlichen Erythrozyten zu entfernen, wurden die Stränge dreimal in Hank's buffered salt solution ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+} + 2% Pen. / Strept. + 15 mM HEPES (HBSS--) gewaschen. Das Hirngewebe musste sorgfältig abpräpariert werden. Anschließend wurden die Plexusstränge mit einer 0,2%igen Trypsinlösung (w/v) behandelt, wobei pro Gramm Plexusgewebe 20 ml Trypsin verwendet wurden. Die Stränge wurden zunächst einer kalten Trypsinisierung 45 Minuten bei 4°C unterzogen. Während der warmen Trypsinisierung für 20 Minuten bei 37 °C wurde die Lösung alle 5 Minuten geschwenkt, um die Epithelzellen vom darunterliegenden Stroma abzutrennen. Bei diesem enzymatischen Verdau werden die außen liegenden Epithelzellen des *Plexus chorioideus* von der Basallamina abgetrennt. Der proteolytische Prozess wurde anschließend durch die Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) in gleichem Volumen wie bei der Trypsinlösung gestoppt. Nach nochmaligem Ausschlagen der Stränge wurden diese verworfen und die erhaltene Zellsuspension 10 min bei 300 rotation per minute (rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 20 ml pro 10 Plexusstränge mit Cytosinarabinosid-haltigem Selektionsmedium resuspendiert, so dass die Zellen in Verbänden von 10 bis 20 Zellen vorlagen. Das Cytosinarabinosid (Ara-C) diente zur Vorbeugung einer Kontamination durch Fibroblasten. Bei Cytosinarabinosid, ein Nukleosid mit Arabinose als Zuckerkomponente, handelt es sich um einen Inhibitor der DNA-Synthese. Es ist, im Gegensatz zu anderen Zellen, kein Substrat der

2. Material und Methoden

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. Um Untersuchungen von Epithelzellschichten durchführen zu können, wurden die Zellen auf Filtersysteme ausgesät.

Die Aussaat der Epithelzellen erfolgte auf permeablen, mit Laminin beschichteten Transwell Filtern. Die Filtersysteme besitzen zwei getrennte Kompartimente: Das Medium im unteren Kompartiment hat Kontakt mit der basolateralen Seite der Epithelschicht (bei der Normalkultur, bzw. mit der apikalen Seite der Epithelschicht bei der Umkehrkultur), während das Medium im oberen Kompartiment nur an die apikale Zellmembran (bei der Normalkultur, bzw. an die basolaterale Zellmembran der Umkehrkultur) grenzt.

2.2.1.1 Umkehrkultur

Verwendet wurden Filter mit einem Porendurchmesser von 3,0 μm (Falcon, Le Pont de Claix, France) für 24 well Platten. Ein besseres Anheften der Zellen auf der Oberfläche der Filter wurde durch eine zuvor durchgeführte Beschichtung mit Laminin erreicht. Am Tag vor der Aussaat wurden die Filter umgedreht in ein steriles Gefäß (Pipettenspitzenbox) gestellt und die Filterunterseite wurde mit 35 μl Lamininlösung/24 well-Filter beschichtet. Nach Auftragen des Laminins erfolgte eine Trocknung für 24 h in Raumtemperatur unter der Sterilbank. Wichtig

2. Material und Methoden

war, dass die Lamininlösung vollständig eingetrocknet war bevor die Filter für die Umkehrkultur eingesetzt wurden. Direkt vor dem Auftragen der Zellsuspension wurde je ein 24-well Filter mit der laminierten Unterseite nach oben in ein well einer 12-well Platte gestellt. Die 12-well Platte wurde danach in einer sterilen Edelstahlbox gestellt. Das Well wurde soweit mit SHM+Ara-C gefüllt (ca. 6,5-7 ml) bis die Filtermembran von unten (innen) mit Medium benetzt war. Da das Well dann überfüllt war wurden anschließend ca. 1,5 ml Medium wieder entfernt. Die Lösung für die Umkehrkultur wurde 3fach konzentriert aufgetragen. Dazu wurden ca. 12 ml Zellsuspension 10 min bei Raumtemperatur und 300 rpm zentrifugiert und in 4 ml SHM+Ara-C vorsichtig resuspendiert. Danach konnten die Zellen ausgesät werden. Auf die laminierte Unterseite der Filter wurden 100 µl der 3-fach konzentrierten Lösung pipettiert, möglichst so, dass die Zellsuspension gleichmäßig auf der ganzen Filteroberfläche verteilt wurde. Die Filter wurden anschließend im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ gelagert. Am 2. Kultivierungstag wurden vorsichtig 2 ml SHM + Ara-C auf die Filterunterseite tröpfchenweise pipettiert, um Erythrozyten und nicht angeheftete Epithelzellen zu entfernen. Die Umkehrkultur-Filter wurden am 3. Kultivierungstag gedreht und auf 24-well Platten mit frischem Medium weiterkultiviert (apikal 0,5 ml und basolateral 1,0 ml Medium). Die Widerstandsmessung (vgl. Kap. 3.2.2) und der Mediumwechsel erfolgten nach jeweils zwei Tagen. Eine schematische Darstellung des in vitro-Zellkulturmodells der PCPEC ist in Abbildung 7 dargestellt:

2. Material und Methoden

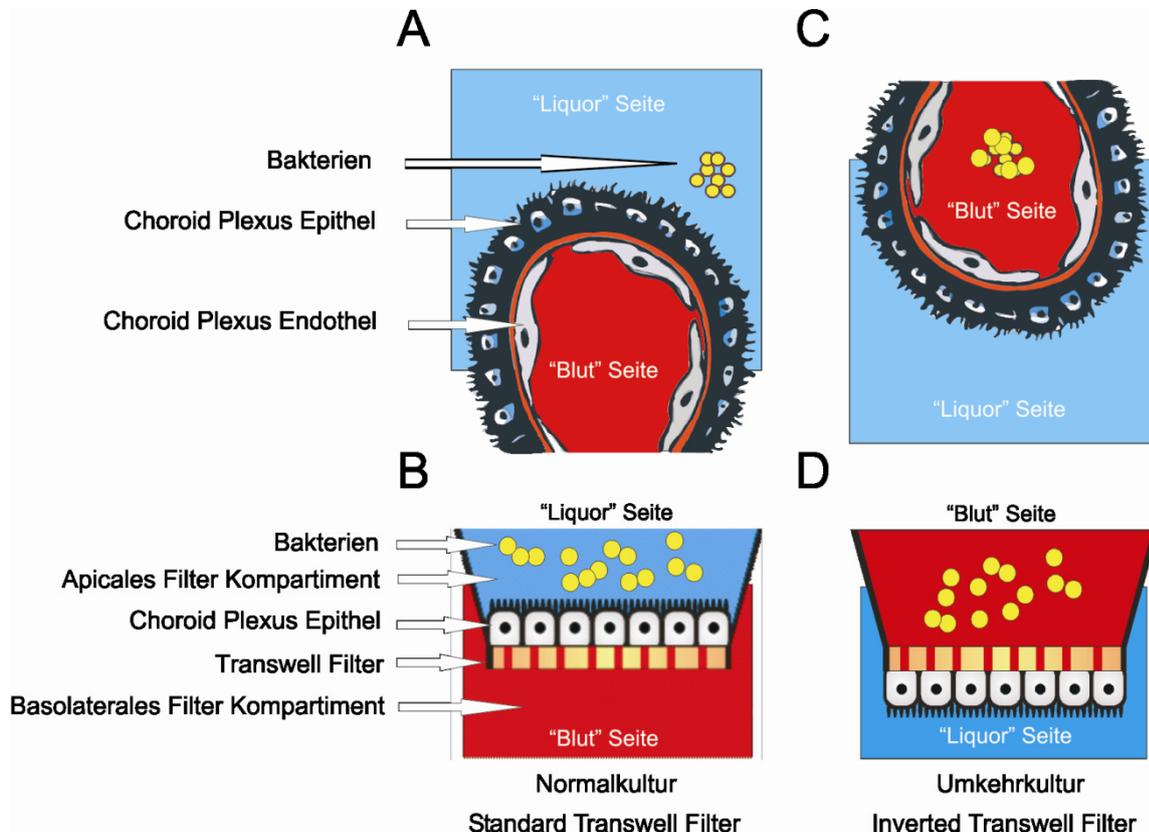


Abb. 7: Schematische Darstellung der Normal- (A und B) und Umkehrkultur (C und D)

2.2.1.2 Differenzierung der Zellen durch Umstellen auf serumfreies Medium (SFM)

Das serumhaltige Medium (SHM) ist einerseits in den ersten sieben Kulturtagen für die Proliferation und die Ausbildung eines konfluenten, fremdzellenfreien Monolayers notwendig, andererseits hemmt das Serum die Zelldifferenzierung. Zum Zeitpunkt der vollständigen Konfluenz, meist am 7. Tag der Kultivierung wurden die Zellen auf SFM umgestellt, um die Zellen aus der Proliferations- in die Differenzierungsphase zu überführen. Dazu wurde ein Mediumwechsel mit serumfreies Medium ohne Antibiotika (SFM ohne Ab) durchgeführt, der

2. Material und Methoden

im Folgenden alle 1-2 Tage wiederholt wurde. Ein letzter Mediumwechsel mit SFM wurde am Tag des Versuches durchgeführt, wobei die für den Versuch benötigten Volumina an Medium im apikalen und basalen Kompartiment appliziert wurden. Vom 3. Tag bis zum 5. Tag nach Umstellung konnten die Zellen für die Infektionsversuche verwendet werden. In dieser Phase wiesen die Zellen ihre maximale Barrierefunktion auf.

2.2.2 Widerstandsmessung von PCPEC

Anhand der transepithelialen Widerstandsmessung kann auf die Konfluenz des epithelialen Plexuszellmonolayers und dessen Barriereeigenschaft geschlossen werden. Der transepitheliale elektrischer Widerstand (TEER) wurde mit einem Epithelgewebe Voltohmmeter (Millipore, Deutschland) und einer STX-2 Elektrode gemessen. Die Elektrode hatte ein Chopstick-Design, wobei die eine Elektrode 2,5 mm länger als die andere war. Somit konnte das längere Ende im Well platziert werden und das kürzere im Filter, ohne den epithelialen Monolayer zu verletzen. Die Elektroden wurden somit durch die Filtermembran und das epitheliale Monolayer voneinander getrennt. Vor der Messung erfolgte ein zweiminütiges Akklimatisieren der Filterplatten bei Raumtemperatur (RT) unter der sterilen Werkbank. Vor Messbeginn musste die Chopstick-Elektrode gründlich mit 70 % Ethanol desinfiziert werden. Direkt vor der Messung wurde die Elektrode mit SFM ohne Ab (also das verwendete Medium) abgespült. Damit die Filter für den Versuch verwendet werden konnten, mussten sie einen Nettowiderstand von mindestens 200 Ohm x cm² haben. [Nettowiderstand= (gemessener Widerstand-150)x 0,33].

2. Material und Methoden

2.2.3 Parazelluläre Flussmessung mit FITC-Inulin

Inulin ist bekannt als ein parazellulärer Marker und sollte in den vorliegenden Versuchen Aufschluß darüber geben, ob die parazelluläre Permeabilität der PCPEC nach Bakterienstimulation beeinträchtigt wird. Das FITC-Inulin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml angesetzt. Es wurde in SFM ohne Ab und ohne Phenol-rot aufgelöst. Das Inulin wurde apikal (10 µl im Filter) zu Beginn des Infektionsversuches in den Filter zugegeben (dies entsprach bei der UK der basolateralen Seite). Zu den Zeitpunkten 30 min, 2h und 4h wurde basal das Medium entnommen. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz am Infinite M200 Multiwell Reader (Tecan) gemessen. Anhand einer Standardreihe wurde der prozentuale Durchfluss des Inulins von der apikal zugegebenen Menge bestimmt.

2.2.4 Bakterienanzucht (Vorbereitung und Kultivierung/Einstellung der Bakterien)

Alle Bakterien-Primäraliquots wurden bis zu den Versuchen bei -80°C in 20 % Glycerol (100/µl/ Stock) gelagert. Für eine Infektion der PCPEC wurde *S. suis* in Todd-Hewitt-Broth (THB) Flüssigmedium kultiviert. Dazu wurden 50 µl eines Arbeitsaliquots in 10 ml THB überführt und für 6 h bei 37°C im leicht schwenkenden Wasserbad kultiviert. In dieser Zeit erreichten die Bakterien die mid-log Phase und konnten somit für die Infektionsversuche eingesetzt werden. Nach 6 Stunden wurden die Bakterien für 10 min bei 4° C und 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien erneut in 10 ml SFM ohne Ab resuspendiert, und anschließend zum zweiten Mal zentrifugiert. Nach erneutem Waschschrift

2. Material und Methoden

wurde das Pellet in 1 ml SFM ohne Ab resuspendiert. Da die Bakterien in Ketten wachsen, wurden sie zunächst 20 sec gemischt, 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 ca. 1×10^8 Bakterien/ml. Für eine Multiple of Infection (MOI) von 10 wurde die eingestellte Bakteriensuspension im Verhältnis 1:10 auf 1×10^7 Bakterien/ml mit Zellkulturmedium verdünnt.

2.2.5 Vorbereitung der Zellen und Durchführung des Infektionsversuches

Am morgen vor Versuchbeginn wurden die Widerstände aller Filter gemessen und diejenigen mit einem Widerstand $>200 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ wurden für den Versuch ausgewählt. Die ausgewählten Filter wurden in eine Platte in frisches SFM ohne Ab überführt (1 ml im Well und 450 μl im Filter). Nach Einstellung der Bakterien (vgl. Kap. 2.2.4), wurden 50 μl der 1×10^7 Bakteriensuspension (MOI=10), in das obere Kompartiment (bei der UK entsprach dies eigentlich die basolaterale Seite) appliziert. In den Infektionsversuchen zur Untersuchung der Translokation wurde standardmässig eine MOI von 10 eingesetzt und die Translokation über insgesamt 6 Stunden gemessen. Solange wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei jedem Versuch wurden mindestens 2 Filter als Kontrolle verwendet, d.h anstatt von 50 μl Bakterien wurden 50 μl SFM ohne Ab apikal im Filter appliziert. Dabei sollte bei der Ausplattierung auf Agarplatten am Versuchsende kein Bakterienwachstum zu beobachten sein. Falls das nicht der Fall war, konnte man von einer Kontamination ausgehen und der Versuch war nicht auswertbar.

2. Material und Methoden

2.2.5.1 Untersuchung der Translokation von *S. suis* durch PCPEC

Nach der apikalen Applikation der Bakterien (dies entsprach dem Zeitpunkt 0) wurde die Translokation zu den Zeitpunkten 5 min, 30 min, 2h, 4h und 6h gemessen. Nach 30 min, 2h, 4h und 6h wurden zusätzlich die Widerstände gemessen. 5 min vor der Messung wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen und unter der Sterilbank bei Raumtemperatur akklimatisiert. Nach 30 min, 2h, 4h und 6 h wurden zunächst die Widerstände gemessen. Nach jedem Bakterienstamm wurde der Chop-stick ca. 3 min in Ethanol überführt und anschließend in SFM ohne Ab gewaschen. Dies diente der Vorbeugung der Verschleppung von Bakterien. Danach wurde der gesamte basale Überstand entnommen (1000µl) und in ein Eppendorf-Tube überführt. Die Filter sind nach 5 min, 30 min, 2h, 4h und 6h in ein neues Well umgesetzt worden (erneut mit 1000µl SFM ohne Ab). Dies sollte verhindern, dass ein bakterielles Wachstum mitgemessen wurde. Die Keime konnten sich auf diese Art und Weise im basolateralen Kompartiment nicht mehr vermehren. Die basale 1000 µl Probe wurde nach Erstellung einer Verdünnungsreihe mit 10 µl auf Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Tag konnten die Agarplatten ausgewertet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Platten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Auf diesen Weg konnte die Menge an durchgewanderten Bakterien ermittelt werden. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle auch das Wachstum der verwendeten Keime ausgetestet. Parallel mit der Messung der Translokation wurden die gewachsenen Bakterien auf Agarplatten ausplattiert.

2. Material und Methoden

2.2.5.2 Inhibition der Translokation von *S. suis* durch spezifische Inhibitoren

Mit Hilfe von zellulären Inhibitoren der Aktin-Zytoskelettregulation und Dexamethason sollte untersucht werden ob und inwieweit die Translokation von *S. suis* durch PCPEC beeinflusst wird.

LY294002: Dabei handelt es sich um einen spezifischen, zellpermeablen Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Burghard *et al.*, 1994). In diese Arbeit wurde der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen benutzt (50µM, 10µM, 1µM). Dazu musste die Ausgangskonzentration des Stocks (50 µM) entsprechend verdünnt werden. Die Plexusepithelzellen wurden mit dem LY294002-Inhibitor für 1 ½ Stunden im Brutschrank bei 5% CO₂ präinkubiert und anschliessend mit den Bakterien für 30 min, 2h, 4h und 6h stimuliert.

Dexamethason: Ist ein Vertreter der synthetischen Glukokortikoide. Dexamethason wurde, ähnlich wie LY294002, in verschiedenen Konzentrationen benutzt, nämlich 1µM und 100µM. Dafür musste der Ausgangstock (25µM) entsprechend verdünnt werden. Auch in diesem Fall wurden die Zellen zunächst 1 ½ Stunden mit Dexamethason präinkubiert und anschliessend mit den Bakterien für 30 min, 2h, 4h und 6h stimuliert.

2.2.6 Vitalitätsmessung der PCPEC mittels Life/ Dead®-Assay

Der Life/ Dead®-Assay diente der Messung der Vitalität der Zellen nach der Bakterien-Translokation. Dafür wurden zwei Farbstoffe benutzt, nämlich das Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) und das Calcein AM. Beide Farbstoffe sind nur dann fluoreszierend, wenn sie mit den Zellen interagiert haben. Calcein AM fluoresziert dabei grün (Emission bei 515-535 nm)

2. Material und Methoden

und EthD-1 rot bei einer Wellenlänge von 617 nm. Die Vitalität der Zellen lässt sich von der Grünfärbung ableiten, denn Calcein AM wirkt nur bei funktionierenden zellulärer Esterase-Aktivität, während das Ethidium-Homodimer-1 nicht in der Lage ist in vitale Zellen zu penetrieren, detektiert aber Zellschäden indem es an zerstörten Zellkerne bindet (diese leuchten somit rot) (Burghard *et al.*, 1994). Um zu überprüfen, ob die primären *Plexus choroideus* Epithelzellen nach Ablauf der Translokationsversuche noch intakt sind und sie die Versuchsbedingungen überlebt hatten, wurden sie zunächst mit Zellkulturmedium einmal gewaschen. Für die Färbung wurden eine 4 μ M Lösung von Calcein-AM und eine 2 μ M Lösung des Ethidium-Homodimers-1 verwendet. Für die Umkehrkultur wurden 100 μ l der Färbung für den apikalen Bereich und 350 μ l Färbung für den basalen Bereich benutzt. Die Zellen wurden darin für 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluß wurden sie zwei Mal mit SFM ohne Ab ohne Phenol rotgewaschen und im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Göttingen) mit 10 x Vergrößerung betrachtet. Die Zellvitalität wurde mit einer CCD-Kameraphotographisch dokumentiert. Die Aufnahmen wurden mit der Axiovision 4.6 Software (Carl Zeiss, Göttingen) bearbeitet.

2.2.7 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Sie wurden mit Hilfe des gepaarten *Student's* T-Test mit wiederholten Messungen analysiert. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant bewertet. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal wiederholt. Die TEER-Werte sind als Prozent vom Ausgangswert angegeben. Der FITC-Inulin Fluss wurde als prozentualer Anteil der Inulin Menge die sich im basolateralen Kompartiment befand berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER), Kinetik in der Umkehrkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, nach Präparation aus Schweinehirnen, fremdzellenfreie Monolayer aus Epithelzellen des *Plexus chorioideus* (porcine choroid plexus epithelial cells, kurz:PCPEC) erhalten. Mit primären porcinen Plexusepithelzellen konnte bereits ein so genanntes „Standard Transwell Filter System“ (Normalkultur) etabliert werden (Hasselbach *et al.* 2001). Da Bakterien in das Zentralnervensystem bzw. die Cerebrospinalflüssigkeit sowohl über die Blut-Hirn- als auch Blut-Liquor-Schranke eindringen können, war es Ziel dieser Arbeit ein „Inverted Transwell Filter System“ (Umkehrkultur) zu entwickeln. Im Gegensatz zur Normalkultur ermöglicht die Umkehrkultur erstmalig die Untersuchung der bakteriellen Interaktion mit der basolateralen Zellseite (Blutseite). Diese ist relevant für den Eintritt von Bakterien in den Liquorraum. Auf Transwell-Filtern ausgesäte PCPEC polarisieren nach einigen Tagen (3-4) und weisen einen messbaren transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) auf. Nach spätestens sieben Tagen unter serumhaltigen Bedingungen haben die Zellen ein konfluenter Zelllayer ausgebildet, der eine hydrodynamische Barriere darstellte. Nach Umstellung auf serumfreie Kulturbedingungen am siebten Kulturtag (DIV [day *in vitro*]) wiesen die auf Filtern kultivierten PCPEC innerhalb von zwei bis drei Tagen transepitheliale elektrische Widerstände von über 300 Ohm x cm² ($299 \pm 18,9$ Ohm x cm²) auf. 2-3 Tage nach der Umstellung konnten somit die Zellen für die Infektionsversuche verwendet werden.

3. Ergebnisse

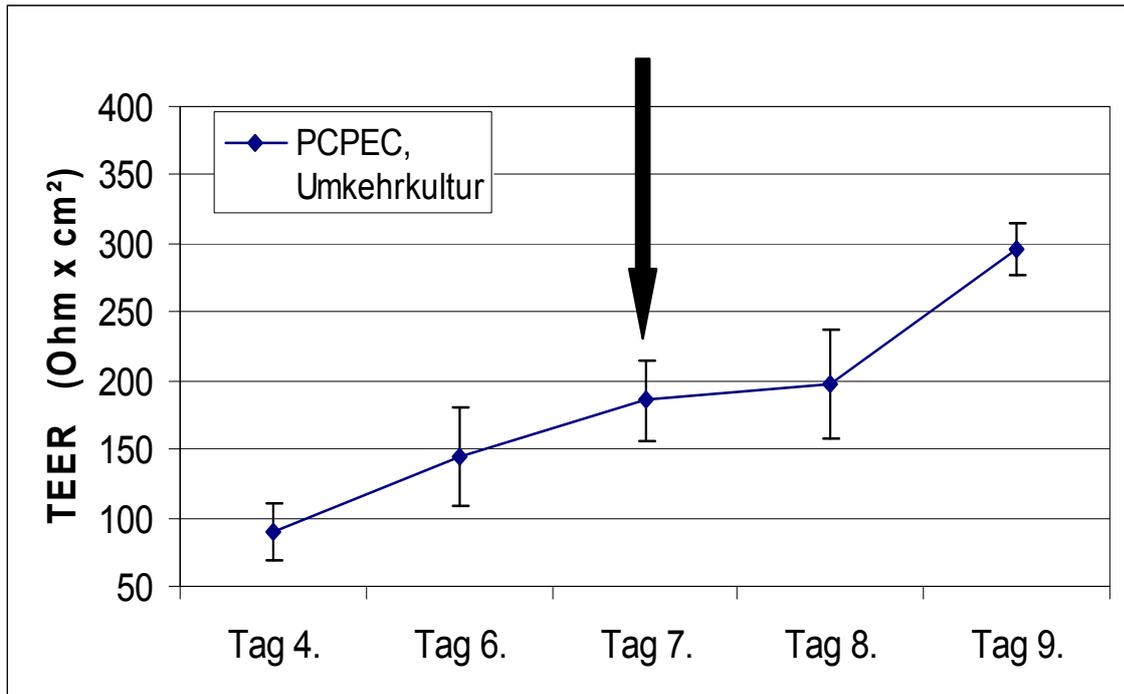


Abb. 8: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) über 9 Tage unter SHM in der Umkehrkultur. Die PCPEC wurden auf Filter mit einem Porendurchmesser von 3 μm ausgesät. Der TEER wurde mit Hilfe eines Voltohmmeters gemessen. Der TEER ist in absoluten Werten (Ohm x cm²) angegeben. Der schwarze Pfeil zeigt wann die Zellen auf SFM umgestellt wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwölf unabhängigen Experimenten je n=12 dargestellt.

3. Ergebnisse

3.2 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER), des Inulinflusses und der Translokationsrate nach Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante

Die Einflüsse der Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante auf die Barriere Funktion wurden mittels TEER- Messung und Messung des parazellulären Inulinflusses bestimmt. Die Messung des transepithelialen Widerstandes erfolgte zum Zeitpunkt 0 und zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden nachdem die Zellen mit den Bakterien infiziert wurden. Abbildung 9A zeigt den TEER 2 und 4 Stunden nach Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante, sowie bei der Kontrolle. Die TEER-Werte sind als Prozent vom Ausgangswert angegeben. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass sowohl bei beiden Stämmen als auch bei der Kontrolle, 2 (Stamm 10: $101 \pm 9\%$, Stamm 10 Δ cps: $104 \pm 12\%$, Kontrolle: $94 \pm 8\%$) und 4 Stunden (Stamm 10: $92 \pm 11\%$, Stamm 10 Δ cps: $93 \pm 8\%$, Kontrolle: $90 \pm 7\%$) nach der Infektion kein signifikanter Abfall des Widerstands zu beobachten ist. Zusätzlich zu den TEER-Messungen wurde die parazelluläre Permeabilität mittels Inulinfluss (Abb. 9B) 2 und 4 Stunden nach Infektion gemessen. Hier zeigte sich ähnlich wie bei den TEER kein signifikanter Unterschied zwischen mit Bakterien infizierten Zellen und Kontrolle.

3. Ergebnisse

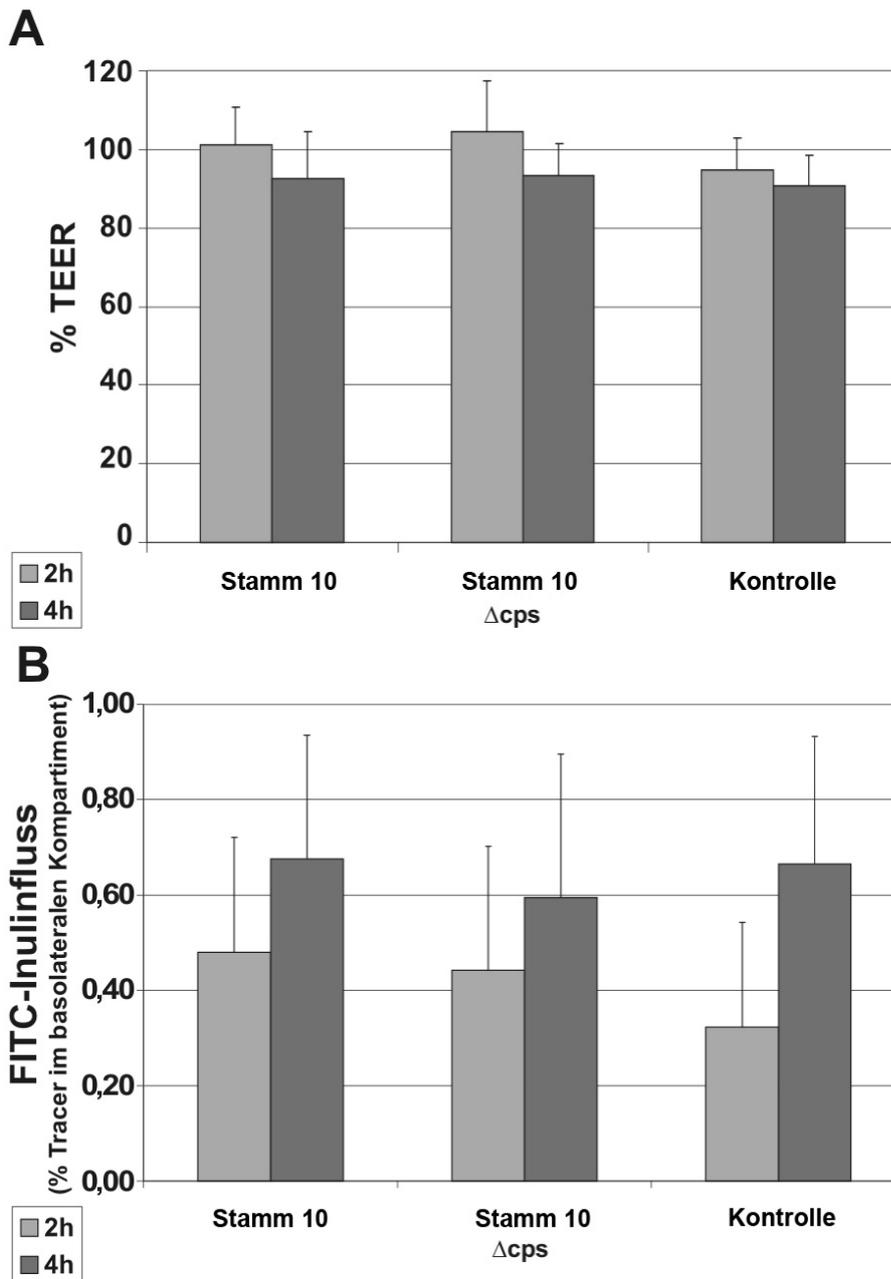


Abb. 9: Einfluss der Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante auf die Barrierefunktion der PCPEC in der Umkehrkultur. PCPEC wurden mit *S. suis* Stamm 10, der unbekapselten Mutante Stamm 10 Δ cps (MOI 10), wie im Kap. 2.2.5 beschrieben, stimuliert. Die Effekte auf die Barrierefunktion wurden anhand des TEER (A) und des parazellulären Inulinflusses (B) ermittelt. Die TEER-Werte sind als Prozent vom Ausgangswert angegeben. Der Inulinfluss wurde in der von apikal nach basolateralen Richtung im Transwell Filter 2 und 4 h nach Stimulation gemessen und ist als prozentualer Anteil des Inulins, welches im Well nach 2 und nach 4 h detektiert worden ist, dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n=4 bestimmt.

3. Ergebnisse

Anschliessend sollte die Translokationsrate von *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante untersucht werden, um die Rolle der Kapsel als Pathogenitätsfaktor in diesem Zusammenhang zu beurteilen. Bei den Infektionsversuchen wurde die Translokationsrate nach 5 min, nach 30 min, nach 2 Stunden und nach 4 Stunden ermittelt. Als Kontrolle diente *L. lactis* Strang MG1363, der kein Erreger einer bakteriellen Meningitis ist. Abbildungen 10 A und 10 B zeigen die Translokationsarten von *S. suis* Stamm 10, dessen akapsulärer Mutante und *L. lactis* durch die PCPEC in der Umkehrkultur nach 5 min., 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden. Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass der Stamm 10 Δ cps eine signifikant höhere Translokationsrate als der Wild-Typ aufweist (Stamm 10 Δ cps nach 4 Stunden: 1,99% \pm 0,80% im Vergleich zu Stamm 10: 0,47% \pm 0,15%); p Wert von <0,05 verglichen mit dem bekapselten *S. suis* Wild-Typ zum jeweiligen Zeitpunkt. Das apathogene grampositive Bakterium *L. lactis* transloziert durch die PCPEC signifikant weniger (*p* Wert von <0.05 verglichen mit dem bekapselten und unbekapselten *S. suis*-Stamm zum jeweiligen Zeitpunkt) als die beiden *S. suis* Stämme.

3. Ergebnisse

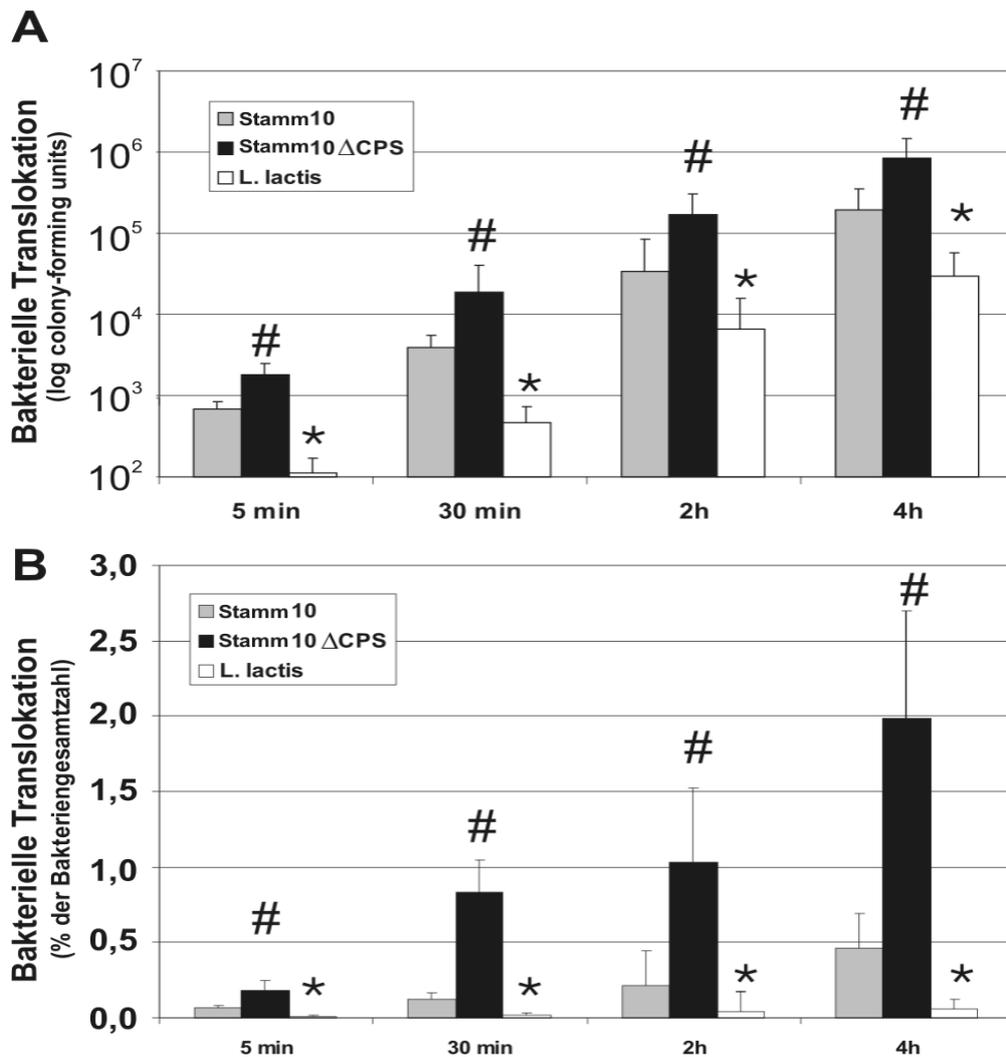


Abb. 10: Translokationsraten von *S. suis*-Stamm 10, dem nicht-bekapselten Stamm Δ 10 und von *L. lactis* durch PCPEC in der Umkehrkultur nach 5 min, 30 min, 2h und 4h. Die Translokationsraten wurde sowohl logarithmisch als Absolutzahl [in colony forming units (CFU)] (A) als auch als prozentuale Rate dargestellt (B). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n= 4 bestimmt. #, *p* Wert von <0.05 verglichen mit dem bekapselten *S. suis* Wild-Typ zum jeweiligen Zeitpunkt. *, *p* Wert von <0.05 verglichen mit dem bekapselten und unbekapselten *S. suis*-Stamm zum jeweiligen Zeitpunkt.

3. Ergebnisse

3.3 Einfluss von Dexamethason auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) und auf die Translokationsrate nach Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante

Ob das Dexamethason Einfluss auf die Translokation von *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante hat, ist auch für den klinischen Alltag von Bedeutung. Die Zellen wurden daher mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason präinkubiert. Ziel war es zu bestimmen, ob Dexamethason in der Lage war, die Translokation der Bakterien zu inhibieren. Aus der Abbildung 11 wird ersichtlich, dass die Präinkubation mit 1 μ M Dexamethason aber auch mit 100 μ M Dexamethason sowohl die Translokation von *S. suis* Stamm 10 als auch dessen akapsulärer Mutante nicht inhibiert (Stamm 10 nach 4 Stunden: $3,90 \times 10^5 \pm 3,29 \times 10^5$ mit 1 μ M Dexamethason: $4,07 \times 10^5 \pm 4,15 \times 10^5$ und mit 100 μ M Dexamethason: $6,67 \times 10^5 \pm 3,33 \times 10^5$. Im Vergleich dazu: Stamm 10 Δ cps nach 4 Stunden: $6,77 \times 10^5 \pm 4,62 \times 10^5$, mit 1 μ M Dexamethason: $1,62 \times 10^6 \pm 1,84 \times 10^6$ und mit 100 μ M Dexamethason: $2,34 \times 10^6 \pm 1,76 \times 10^6$). Die Translokationsraten wurden nach 30 min, 2 Stunden und 4 Stunden geprüft.

Außerdem konnte man nach der Vorbehandlung mit Dexamethason in unterschiedlichen Konzentrationen keinen signifikanten Widerstandsabfall oder eine Erhöhung sowohl nach 2 als auch nach 4 Stunden beobachten (Stamm 10 nach 4 Stunden: $94\% \pm 17\%$, mit 1 μ M Dexamethason: $85\% \pm 17\%$ und mit 100 μ M Dexamethason: $94 \pm 19\%$. Stamm 10 Δ cps nach 4 Stunden $94\% \pm 15\%$, mit 1 μ M Dexamethason: $93\% \pm 16\%$ und mit 100 μ M Dexamethason: $99\% \pm 19\%$. Im Vergleich dazu die Kontrolle nach 4 Stunden: $92\% \pm 29\%$). Dies wird in der Abbildung 12 dargestellt.

3. Ergebnisse

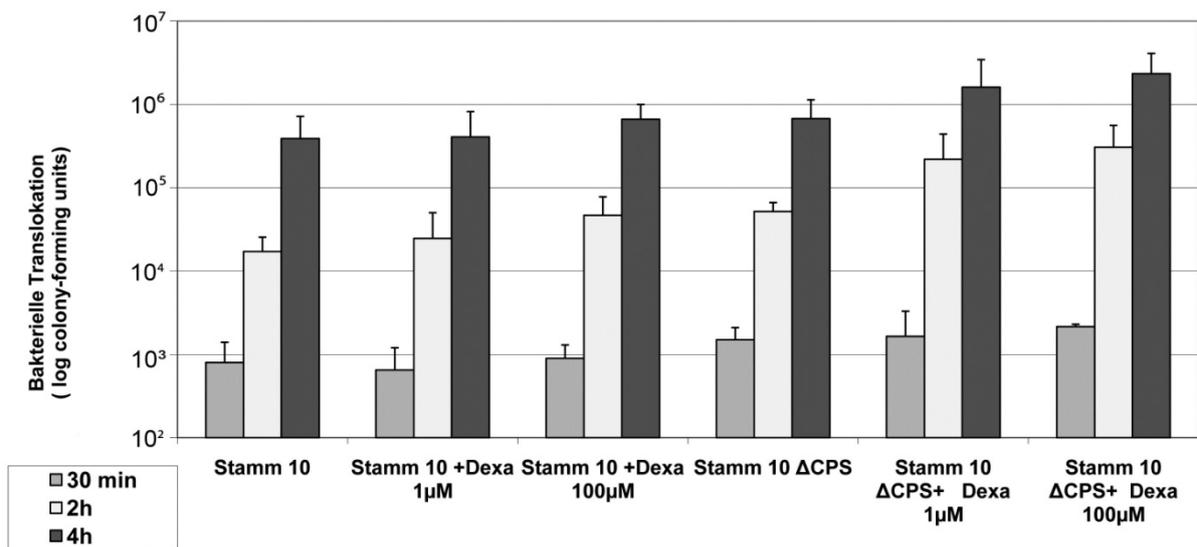


Abb. 11: Translokationsraten von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δcps in der Umkehrkultur, nach der Präinkubation mit Dexamethason (Dexa) (1μM und 100μM). Die Filter wurden 1 Stunde mit Dexamethason präinkubiert und im Anschluss mit Bakterien stimuliert. Die Translokationsraten wurden logarithmisch als Absolutzahl [in colony forming units (CFU)], nach 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n= 4 bestimmt.

3. Ergebnisse

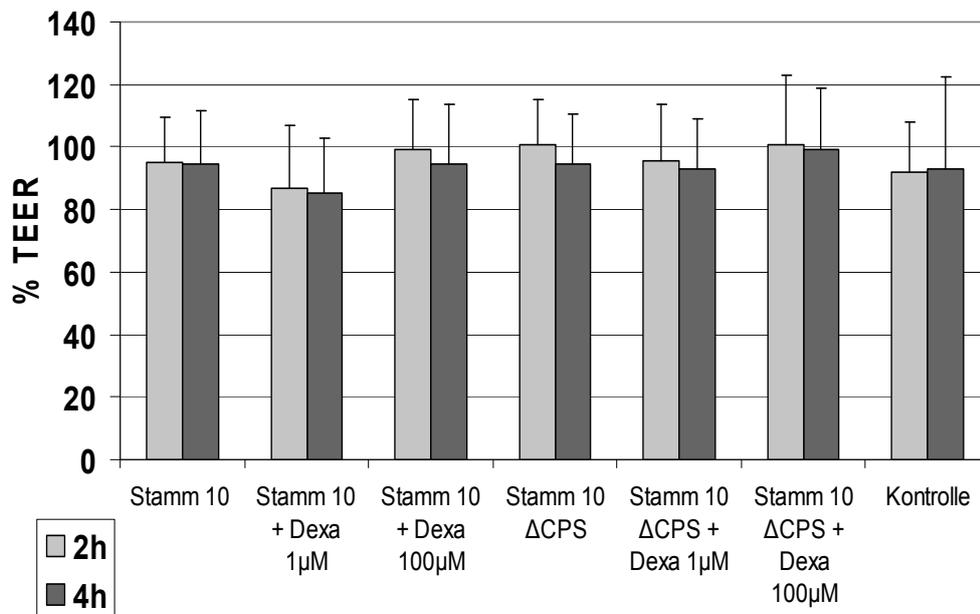


Abb. 12: Barrierefunktion der PCPEC während der Translokation von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δcps in der Umkehrkultur nach der Vorbehandlung mit Dexamethason (Dexa) (1µM und 100µM). Die Filter wurden 1 Stunde mit Dexamethason präinkubiert und im Anschluss mit Bakterien stimuliert. Die TEER-Werte sind als Prozent vom Ausgangswert angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n= 4 bestimmt.

3. Ergebnisse

3.4 Einfluss des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)-Inhibitors Ly294002 auf die Translokationsrate von *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante

LY294002 ist ein zellmembrandurchgängiger PI3-Kinase-Inhibitor, der an der ATP-Bindungsstelle des Enzyms kovalent bindet. Um herauszufinden, ob LY 294002 in der Lage ist die Translokation von *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulären Mutante zu beeinflussen wurden die Zellen 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors präinkubiert und anschließend mit Bakterien stimuliert. Die Translokationsraten wurden nach 30 min, nach 2 und nach 4 Stunden gemessen. Abbildung 13 zeigt den Einfluß des Inhibitors auf die Translokation bei einer Konzentration von 1µM. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass LY294002 in einer Konzentration von 1µM die Translokationsraten sowohl vom *S. suis* Stamm 10 als auch vom Stamm 10 Δcps signifikant inhibiert (Stamm 10 nach 4 Stunden: $5,82 \times 10^5 \pm 5,52 \times 10^5$, mit 1 µM LY294002: $3,37 \times 10^4 \pm 3,24 \times 10^4$. Im Vergleich dazu: Stamm 10 Δcps nach 4 Stunden: $1,03 \times 10^6 \pm 6,61 \times 10^5$, mit 1 µM LY294002: $1,90 \times 10^5 \pm 2,48 \times 10^5$); p Wert von <0.05 verglichen mit stimulierten PCPEC's ohne Inhibitor.

3. Ergebnisse

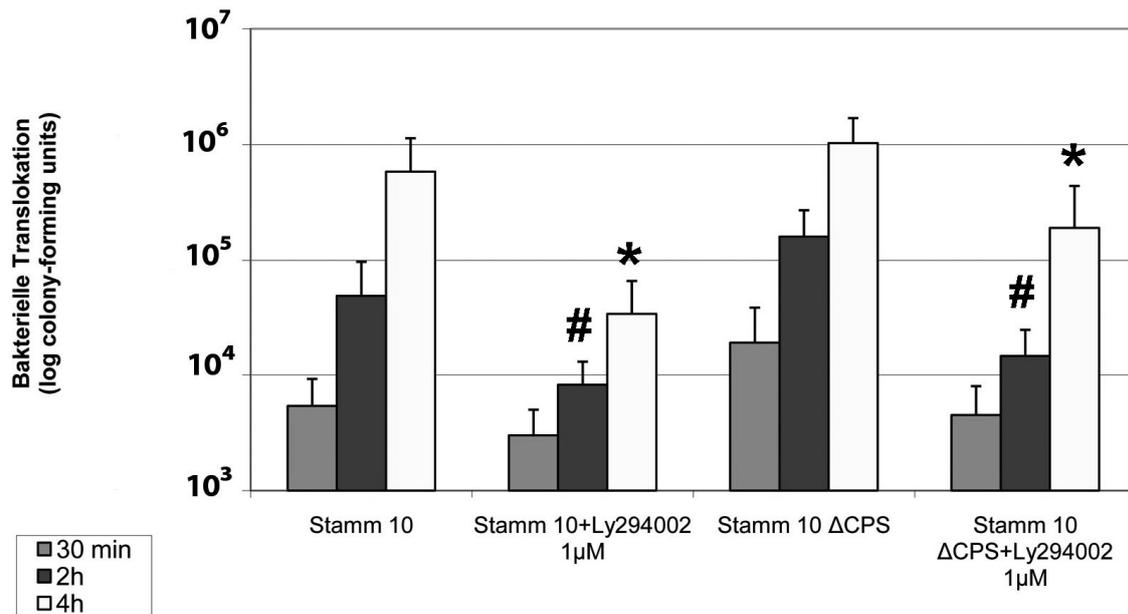


Abb. 13: Translokationsraten von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δcps in der Umkehrkultur, nach der Präinkubation mit LY294002 (1µM). Die Filter wurden 1 Stunde mit dem Inhibitor präinkubiert und im Anschluss mit Bakterien stimuliert. Die Translokationsraten wurden logarithmisch als Absolutzahl [in colony forming units (CFU)], nach 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n= 4 bestimmt. #, *: p Wert von <0.05 verglichen mit stimulierten PCPEC's ohne Inhibitor

Weiterhin wurde untersucht ob der LY294002 in den Konzentrationen von 50µM und 10 µM die Translokationsrate inhibiert. Abbildung 14 zeigt den Einfluss auf die Translokation nach 30 min, 2 und 4 Stunden. Der LY294002 beeinflusst in höheren Konzentrationen nicht die Translokation von *S. suis* (Stamm 10 nach 4 Stunden: $5,82 \times 10^5 \pm 5,52 \times 10^5$, mit 10 µM LY294002: $6,31 \times 10^5 \pm 7,50 \times 10^5$ und mit 50µM LY294002: $9,58 \times 10^5 \pm 9,08 \times 10^5$. Im Vergleich dazu: Stamm 10 Δcps nach 4 Stunden: $1,03 \times 10^6 \pm 6,61 \times 10^5$, mit 10 µM LY294002: $9,17 \times 10^5 \pm 6,39 \times 10^5$ und mit 50µM LY294002: $1,09 \times 10^6 \pm 8,59 \times 10^5$). Aus

3. Ergebnisse

diesen Versuchen wurde ersichtlich, dass es zu einer Konzentrationsabhängige Inhibition der Translokationsrate von *S. suis* kommt. Interessanterweise konnte die niedrigere LY294002-Konzentration zu einer signifikanten Inhibition der Translokation führen, als die höhere LY294002 Konzentrationen.

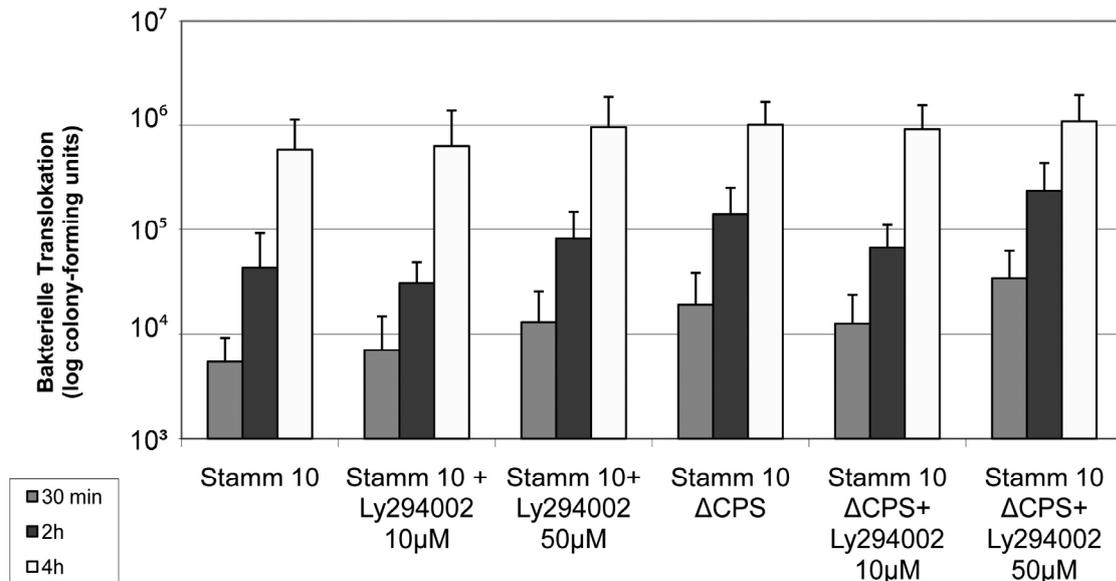


Abb. 14: Translokationsraten von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δcps in der Umkehrkultur, nach der Präinkubation mit LY294002 (10μM und 50μM). Die Filter wurden 1 Stunde mit dem Inhibitor präinkubiert und im Anschluss mit Bakterien stimuliert. Die Translokationsraten wurden logarithmisch als Absolutzahl [in colony forming units (CFU)], nach 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n=4 bestimmt.

Als Indikator der Barriere Funktion wurde gleichzeitig mit der bakteriellen Infektion und der Präinkubation mit dem LY294002 der TEER nach 2 und 4 Stunden gemessen. Abbildung 15 gibt wieder inwieweit sich dabei die Widerstände geändert haben. Dabei kann man feststellen, dass auch nach 4 Stunden kein signifikanter Abfall oder Anstieg der Widerstände stattfindet obwohl gleichzeitig die Translokation bei einer LY294002 Konzentration von 1μM signifikant

3. Ergebnisse

gehemmt wird. Bei höheren Ly294002 Konzentration sank jedoch der TEER, so dass daher kein protektiver Effekt auf die Transmigrationsrate beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

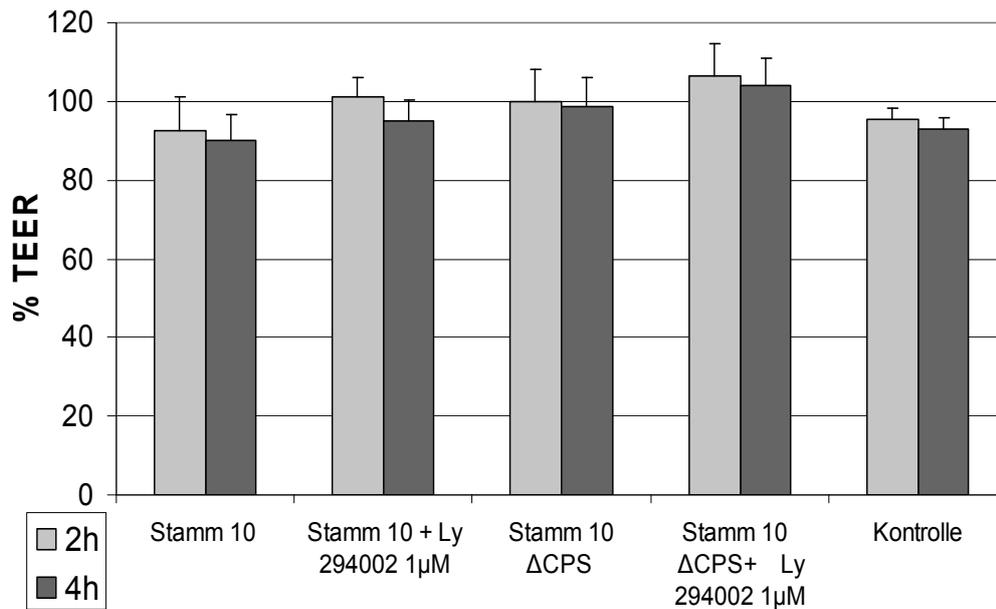


Abb. 15: Barrierefunktion der PCPEC während der Translokation von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δcps in der Umkehrkultur nach der Vorbehandlung mit LY294002 (1µM). Die Filter wurden 1 Stunde mit dem LY294002 in einer Konzentration von 1µM präinkubiert und im Anschluss mit Bakterien stimuliert. Die TEER-Werte sind als Prozent vom Ausgangswert angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten je n= 4 bestimmt.

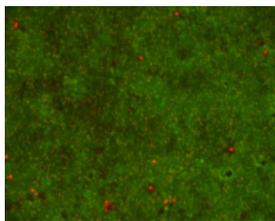
3.5 Zellvitalität der PCPEC nach Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante

Damit sichergestellt war, dass die PCPEC unter den gewählten Versuchsbedingungen intakt blieben, wurde ihre Zellvitalität nach Ablauf der Translokationsversuche bestimmt. Die

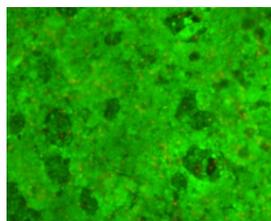
3. Ergebnisse

Zellvitalität wurde mit Hilfe des Live/Dead®-Assay2 und 4 Stunden nach der Translokation von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps am Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

***S. suis* Stamm 10**



***S. suis* Stamm 10 Δ cps**



Kontrolle

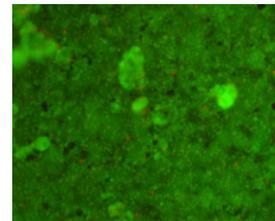


Abb. 16: Einfluss von *S. suis* auf die Zellvitalität in der Umkehrkultur 4 Stunden nach Infektion. Die Zellvitalität wurde nach Ablauf der Translokation mit *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fotos sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Unter allen Versuchsbedingungen konnten kaum abgestorbenen Zellen beobachtet werden, was an der überwiegenden Grünfärbung der Zellen zu erkennen ist. Es kommen lediglich vereinzelte rote und damit abgestorbene Zellen vor. Somit bleibt die Zellvitalität auch bis 4 Stunden nach der Infektion mit *S. suis* ohne größere Beeinträchtigungen erhalten.

3. Ergebnisse

3.6 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) nach Infektion mit *S. suis* und dessen Suilysin-defizienten Mutanten

Das thiol-aktivierte Hämolyisin Suilysin zählt zu den wesentlichen Pathogenitätsfaktoren von *S. suis*. In einer weiteren Reihe von Experimenten war das Ziel zu analysieren, ob sich die Wildtypen, die Suilysin exprimieren in Gegensatz zu Suilysin defiziente Mutanten bezüglich des Effektes auf den TEER und Translokationsrate durch PCPEC unterscheiden. Für die Versuche wurden die Wildtypen Sx332 (Q8), 9657573 (Q11), 31533 (Q9) und deren Suilysin defiziente Mutanten Sx932 (Q10), Sx917 (Q7), Sx911 (Q6) analysiert. Als Indikator für die Barrierefunktion wurde der TEER 2 und 4 Stunden nach der Infektion mit den Wildtypen und deren Suilysin defizienten Mutanten gemessen. Aus der Abbildung 17 wird ersichtlich, dass auch 4 Stunden nach der Infektion keine signifikanten Widerstandsveränderungen sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Suilysin negativen Stämmen zu beobachten waren, (SX332 nach 4 Stunden: $89\% \pm 13\%$, SX932 (Sly -): $81\% \pm 10\%$, 9657573 nach 4 Stunden: $94\% \pm 14\%$, SX917 (Sly-): $79\% \pm 16\%$ und 31533 nach 4 Stunden: $79\% \pm 11\%$, SX911 (Sly-): $85\% \pm 12\%$. In Vergleich dazu die Kontrolle nach 4 Stunden: $92\% \pm 2\%$).

3. Ergebnisse

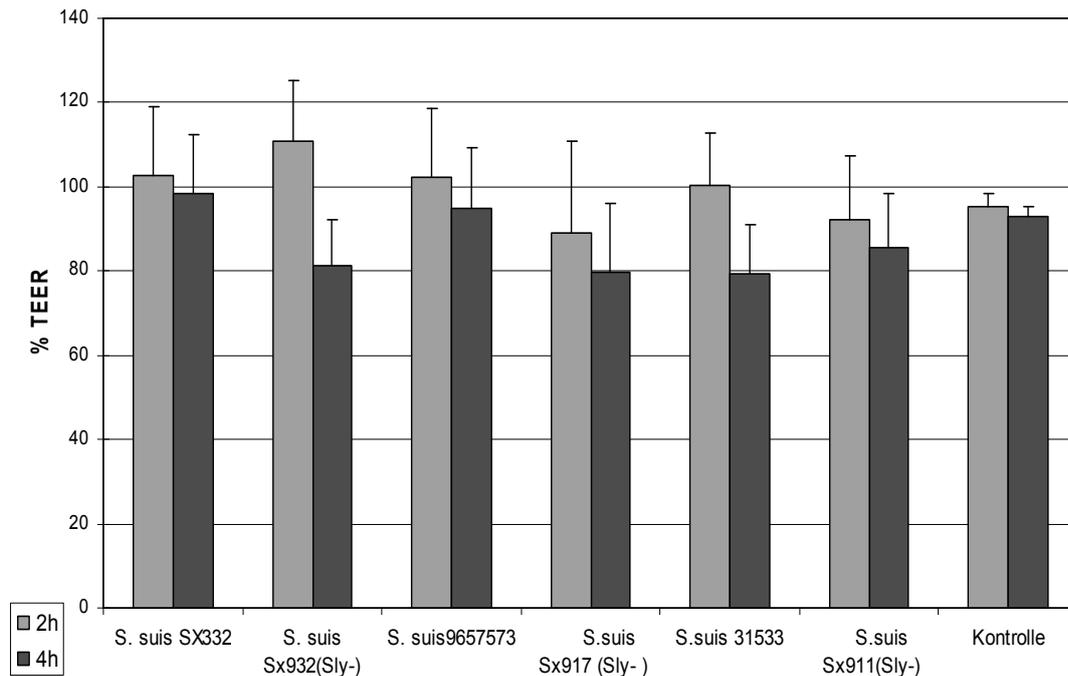


Abb. 17: Einfluss der Infektion mit den *S. suis* Wildtypen SX332, 9657573 und 31533 und deren entsprechenden Sulysin Mutanten (Sly-): SX932, SX917 und SX911 auf die Barrierefunktion der PCPEC in der Umkehrkultur. PCPEC wurden mit den *S. suis* Wildtypen SX332, 9657573 und 31533 und deren entsprechenden Sulysin Mutanten (Sly-): SX932, SX917 und SX911 (MOI 10), wie im Kap. 2.2.5 beschrieben, stimuliert. Die Effekte auf die Barrierefunktion wurden anhand des TEER ermittelt. Die TEER-Werte sind als Prozent vom Ausgangswert angegeben und wurden nach 2 und nach 4 h nach der Stimulation gemessen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten, je n=4 bestimmt.

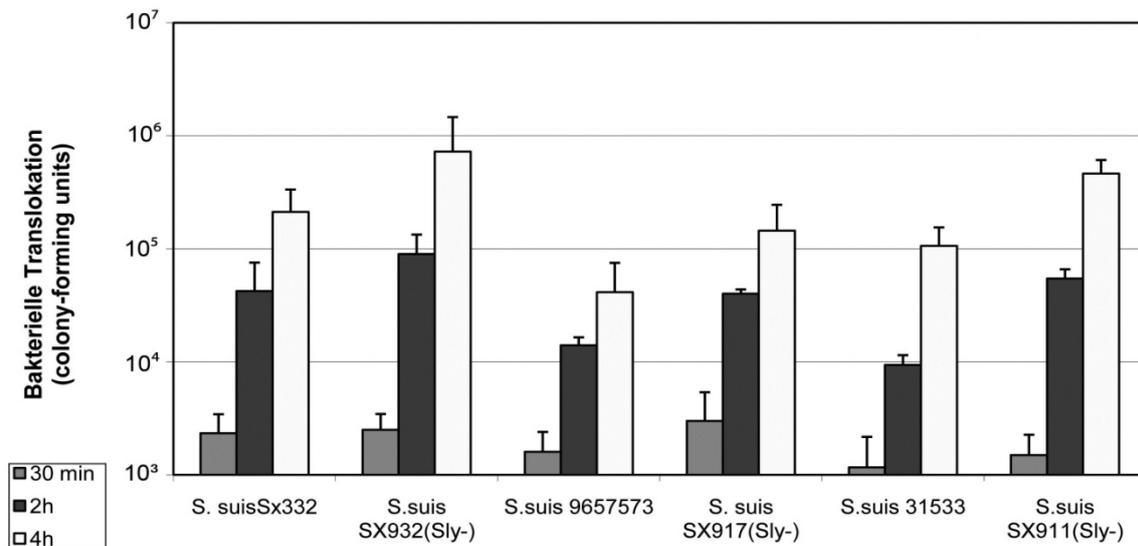
3. Ergebnisse

3.7 Messung der Translokationsrate von *S. suis* Stamm und dessen Suilysin defizienten Mutanten

Als nächstes wurde die Translokation von den Suilysin Wildtypen mit der Translokation von den Suilysin defizienten Mutanten verglichen. Abbildung 17 zeigt die Translokationsrate beider Gruppen nach 30 min, 2 und 4 Stunden. Die niedrigere Translokationsrate bei den drei *S. suis* Wild-Typen im Vergleich zu den Suilysin Mutanten ist deutlich zu erkennen. (Stamm Sx332 nach 4 Stunden: $2,9\% \pm 0,27\%$, Stamm Sx932(Sly-): $3,8\% \pm 0,6\%$, Stamm 965757: $1,25\% \pm 0,06\%$, Stamm Sx917 (Sly-): $4,5\% \pm 0,6\%$ und das Pärchen: Stamm 31533: $1,2\% \pm 0,2\%$, Stamm Sx911(Sly-): $2,6 \pm 0,4\%$); p Wert von <0.05 verglichen mit dem jeweiligen *S. suis* Wildtyp (Sx332, 9657573 und 31533) zum jeweiligen Zeitpunkt. Das ist ein ein überraschender und sehr interessanter Befund. Weitere Experimente müssen die zellulären und molekularen Mechanismen für unsere Beobachtungen klären.

3. Ergebnisse

A)



B)

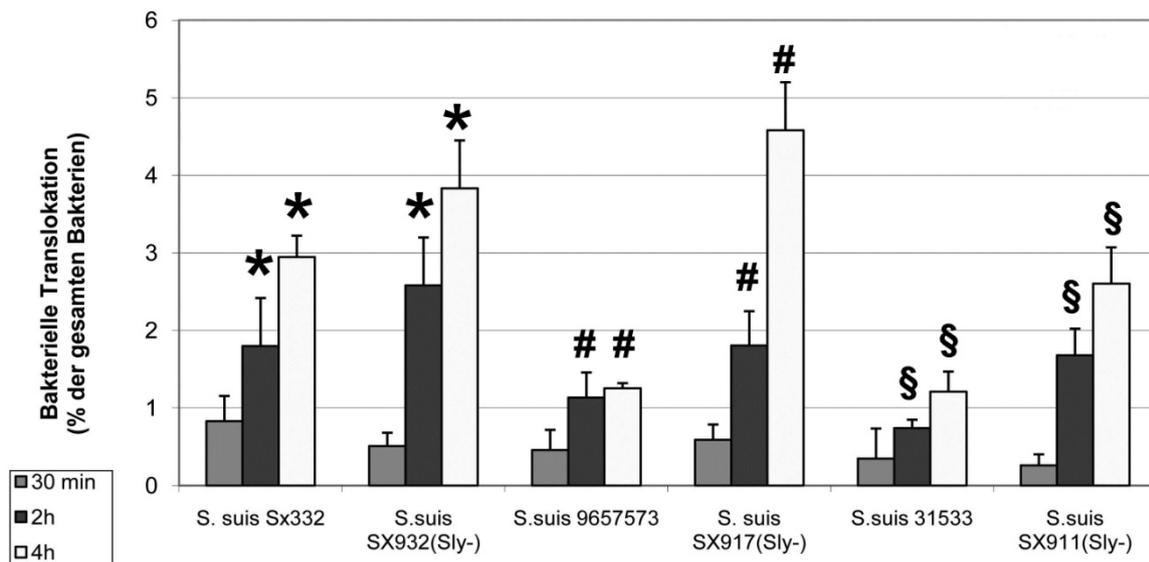


Abb. 18: Translokationsraten von *S. suis* Wildtypen SX332, 9657573 und 31533 und deren entsprechenden Suilysin Mutanten (Sly-): SX932, SX917 und SX911 durch PCPEC in der Umkehrkultur nach 30 min, 2h und 4h. Die Translokationsraten wurde sowohl logarithmisch als Absolutzahl [in colony forming units (CFU)] (A) als auch als prozentuale Rate dargestellt (B). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten je n= 4 bestimmt. p Wert von <0.05 verglichen mit dem jeweiligen *S. suis* Wildtyp (Sx332: *, 9657573: # und 31533: §) zum jeweiligen Zeitpunkt.

4. Diskussion

4.1 Zellkulturmodell der Blut-Liquor-Schranke *in vitro*

Die Untersuchung der Barrierefunktion von Epithelien und Endothelien kann auf so genannten Transwell-Filtersystemen durchgeführt werden. Eine so genannte „Standard Transwell Filter System“ (Normalkultur) konnte bereits für primäre porcine Plexusepithelzellen etabliert werden (Hasselbach *et al.* 2001). Mit dieser Art von Zellkulturverfahren kann die bakterielle Interaktion mit der apikalen Zellmembran (Liquorseite) untersucht werden. Da Bakterien in das Zentralnervensystem sowohl über die Blut-Hirn- als auch Blut-Liquor-Schranke eindringen können, haben wir ein „Inverted Transwell Filter System“ (Umkehrkultur) entwickelt. Im Gegensatz zur Normalkultur ermöglicht die Umkehrkultur erstmalig die Untersuchung der bakteriellen Interaktion mit der basolateralen Zellseite. Dieses Modell ist der *in-vivo* Situation näher, da die Bakterien aus dem Blut in den Liquor einwandern. In diesem Zellkultursystem wurden zum ersten Mal sowohl die Translokation des bekapselten *S. suis* Stammes 10 (Wild-Typ) und einer isogenen akapsulären Mutante, als auch die Beeinträchtigung der Barrierefunktion durch die Bakterien anhand Bestimmung des TEER und des parazellulären Inulin-Flusses ermittelt. Außerdem wurde die Rolle von Suilysin als Pathogenitätsfaktor untersucht. Bereits 1999 konnten Mackarel *et al.* zeigen, dass humane endotheliale Zellen [z.B. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)] sowohl auf der Ober- als auch auf der Unterseite von Filtern wachsen können. In diesem System wurde die Transmigration von neutrophile Granulozyten untersucht. Im Gegensatz zu unserem System wurde dieses Zellkultursystem vorwiegend elektronenmikroskopisch beschrieben. Eine Barrierefunktion oder ob die Zellen polar wachsen, wurde zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht (Mackarel *et*

4. Diskussion

al., 1999). Im Gegensatz dazu haben Wakabayashi *et al.* (2007) beschrieben, dass epitheliale Zellen, wie z.B. Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen, ein polares Wachstum auf der Unterfläche von Filtern zeigen. Dieses System zeigte sogar eine Barrierefunktion. Im Vergleich zu unserem System war allerdings die Barrierefunktion (durch Bestimmung des TEER) deutlich schwächer ausgeprägt (Wakabayashi *et al.*, 2007). Wir waren in der Lage zum ersten Mal ein System zu entwickeln, welches die Möglichkeit gibt die Blut-Liquor Schranke zu untersuchen. Die PCPEC zeigen ein polares Wachstum und bilden eine ausgeprägte Barrierefunktion. In diesem System kann zum ersten Mal die Interaktion von Bakterien mit der Blut-Liquor Schranke in „*in-vivo* nah“ untersucht werden.

4.2 Bedeutung der Blut-Liquor-Schranke als Eintrittspforte für Erreger in das ZNS

Die Blut-Liquor-Schranke ist durch dichte Zell-Zell-Verbindungen, die sog. *tight junctions*, zwischen angrenzenden Epithelzellen gekennzeichnet und stellt eine wesentliche Barriere für Erreger dar (Hasselbach *et al.*, 2001). Diejenigen Erreger, die via Plexus das Liquorsystem erreichen wollen, müssen zunächst primär am fenestrierten Plexusendothel oder der extrazellulären Matrix adhären. Von dieser basolateralen Seite der Blut-Liquor-Schranke wird schliesslich die epitheliale Grenzschiicht des Plexus choroideus erreicht (Adam and Schroten, 2004). Die Entwicklung einer Umkehrkultur ermöglicht *in vitro* eine Anlehnung an die *in vivo* Verhältnisse. Andere Autoren haben bereits die Blut-Liquor-Schranke als Eintrittspforte von Bakterien wie *N. meningitidis* (Pron *et al.*, 1997) und *E. coli* (Parkkinen *et al.*, 1988) in das ZNS beschrieben. Auch bei *S. suis* scheint der *Plexus choroideus* die primäre Eintrittspforte für die Infektion des ZNS darzustellen (Williams and Blakemore, 1990; Madsen

4. Diskussion

et al., 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nun erstmalig eine bakterielle Translokation in einem *in vitro* Modell für die Blut-Liquor-Schranke. Bei der Untersuchung der Translokation von *S. suis* durch PCPEC konnte, im Rahmen dieser Arbeit, eine signifikant höhere Translokationsrate der akapsulären Mutante als beim Wild-Typ beobachtet werden. In weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte *S. suis* auch eine relevante Invasion von basolateral („blutseitig“). Hier zeigte die akapsuläre *S. suis* Mutante im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine signifikant höhere Invasionsrate (Tenenbaum *et al.*, 2009). Interessanterweise, zeigte *S. suis* zwar eine gute Adhärenz bei Applikation von der apikalen Plexuszellseite („liquorseitig“), jedoch keine Invasion. Da *S. suis* bevorzugt bzw. fast ausschließlich von der basolateralen Seite in PCPEC invadiert und durch die PCPEC transloziert, deutet dies auf einen besonderen pathogenetischen Mechanismus für die Durchwanderung der Bakterien durch diese Zellen an. Die Bevorzugung des basolateralen Eintritts von *S. suis* lässt einen selektiven Mechanismus für die Aufnahme von Bakterien in diese Zelle vermuten. Andere Untersucher haben eine ähnliche „Vorliebe“ für den basolateralen Zugang in Zellen durch andere Bakterien und sogar einige Viren festgestellt: Monteville und Konkel (2002) konnten beispielweise zeigen, dass *Campylobacter jejuni* eher von der basolateralen Seite als von der apikalen Seite in humane Colon-Karzinom Zellen invadiert bzw. durch diese transmigriert. Die Ergebnisse von Fleiszig *et. al* (1997) haben auch darauf hingewiesen, dass die basolaterale Zelloberfläche von epitheliale Zellen Strukturen aufweisen müssen, die die Invasion von *P. aeruginosa* von der basolateralen Seite in die Zellen ermöglichen. Allerdings wurden in diesen Experimenten die verwendeten MDCK-Zellen mit EGTA vorinkubiert, welches die *tight-junction*-Funktion der Zellen negativ beeinträchtigt hat. In diesem Fall wurde eine Invasion, nach 3 Stunden, nur bei einer entsprechenden Vorbehandlung der Monolayer beobachtet. Im Gegensatz dazu weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass bei der Verwendung eines adäquaten *in vitro* Models *S. suis* in der Lage ist, polar durch einen dichten Zellmonolayer zu translozieren.

4. Diskussion

Unsere Daten unterstreichen die Relevanz der Blut-Liquor-Schranke als Eintrittspforte für Bakterien ins Zentralnervensystem. Weitere Experimente müssen jedoch die zellulären und molekularen Mechanismen für unsere Beobachtungen klären.

4.3 Die Rolle der Virulenzfaktoren Kapsel und des Hämolyins bei der Translokation durch PCPEC

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist eine stabile Makromolekülstruktur unterhalb von Epithel- und Endothelzellen und dem darunterliegenden Bindegewebe. Da die basolaterale Applikation von Bakterien zu Zellen den direkten Zugang zu ECM Bestandteilen ermöglicht, könnte eine Bindung an diese zum Invasions- und Translokationsprozess beitragen. Walia *et al.* (2004) konnten zum Beispiel zeigen, dass die apikale Fibronectin-Sekretion von stimulierten T84 Zellen die Invasion von *S. typhimurium* von der apikalen Seite begünstigt. De Greef *et al.* (2002) haben ein Fibronectin - bindendes Protein (FBPS) von *S. suis* als einen entscheidenden Faktor für die Kolonisation von Organe, durch Bindung an der extrazellulären Matrix der Wirtszelle, beschrieben. Esgleas *et al.* (2005) haben gezeigt, dass 23 getestete *S. suis* Bakterienstämme in der Lage sind an Plasma und zelluläres Fibronectin sowie an Kollagen vom Typ I, III und V zu binden. Interessanterweise war, im Gegensatz zu dem bekapselten Wildtyp, eine nicht bekapselte Mutante in der Lage sowohl an Fibronectin als auch an Kollagen vom Typ III und V besser zu binden. Im Gegensatz zu dem bekapselten Wildtyp konnte die akapsuläre Mutante auch an Laminin und Vitronectin binden. In unserem Model wurde der Einfluss der Kapsel und von Suilysin auf die Translokation von *S. suis* untersucht. Wir haben beobachtet, dass die unbekapselte Mutante deutlich besser als der bekapselte Wildtyp durch den PCPEC's translozieren konnte (Abb. 10). Proteine der extrazellulären

4. Diskussion

Matrix, wie Vitronectin und Laminin könnten zu der besseren Translokation der unbekapselten Mutante beitragen, da die basolaterale Applikation von Bakterien in unserer Umkehrkultur den direkten Zugang zu diesen extrazellulären Matrixbestandteilen ermöglicht. Da in den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe die unbekapselte *S. suis*-Mutante besser in PCPEC invadierte (Tenenebaum *et al.*, 2009), vermuten wir eine stärkere Bindung an diese extrazellulären Matrixproteine.

Es wurde schon beschrieben, dass die Kapsel die Bindung von anderen Bakterien wie *S. pyogenes* und *S. aureus* an manche extrazelluläre Proteine wie Laminin, Fibrinogen und Collagen Typ-IV beeinflussen kann (Vercellotti *et al.*, 1984). Auch für *S. suis* konnten Esgleas *et al.* (2005) eine bessere Adhärenz der unbekapselten *S. suis* Mutante an Fibronectin, Collagen-Typ III und V feststellen. Die Mutante adhärte im Vergleich zum Wild-Typ zusätzlich an Laminin und Vitronectin. Benga *et al.* (2004) konnten außerdem zeigen, dass die akapsuläre Mutante von *S. suis* in der humanen laryngealen epitheliale Zelllinie HEp-2 besser adhärte und invadiert als der bekapselte Wildtyp. Charland *et al.* (2000) konnten auch eine höhere Invasionsrate für die unbekapselte *S. suis* Mutante in humane endotheliale Gehirnzellen (HBMEC) nachweisen im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu konnten Lalonde *et al.* (2000) keine Invasion sowohl für den Wildtyp als auch für die akapsuläre Mutante in unterschiedlichen epithelialen Zelllinien nachweisen (im Gegensatz zu Gruppe B Streptokokken). Andererseits konnte diese Arbeitsgruppe eine Adhäsion sowohl für den bekapselten Wildtyp als auch für die unbekapselte Mutante nachweisen. Die unbekapselte Mutante zeigte sogar eine bessere Adhärenz als der bekapselte Wildtyp. Weiterhin konnten Vanier *et al.* (2004) zum ersten Mal eine Invasion von *S. suis* an porcine epitheliale Gehirnzellen (PMEC) nachweisen. Auch in diesem Fall konnte eine bessere Invasion für die unbekapselte Mutante festgestellt werden. In dieser Arbeit konnten wir eine transzelluläre Translokation von *S. suis* durch PCPEC nachweisen, ohne signifikanten Veränderungen der

4. Diskussion

TEER und des parazellulären Inulin-Flusses feststellen zu können, was vermutlich auf die niedrig eingesetzte MOI zurückzuführen ist, bei der keine Beeinträchtigung der Zellvitalität zu beobachten war. Des Weiteren haben wir eine höhere Translokationsrate der unbekapselten Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp beobachtet. Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe mittels Doppelimmunfluoreszenz eine bessere Invasion der unbekapselten Mutante (10cps Δ EF) von *S. suis* im Vergleich zu dem bekapselten Wildtyp (Stamm 10) feststellen (Tenenbaum *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse zeigen erstmalig eine bakterielle Invasion und Translokation in einem *in vitro* Modell für die Blut-Liquor-Schranke. Dabei verminderte die als Virulenzfaktor beschriebene Kapsel von *S. suis* die Invasions- und Translokationsrate.

Weiterhin war Ziel dieser Arbeit, den Einfluss des thiol-aktivierten Hämolytins Suilysin (SLY) auf die Translokation von *S. suis* durch PCPEC zu analysieren. Die Rolle von Suilysin bei der Interaktion von *S. suis* mit verschiedenen Zelltypen wurde in vielen Studien getestet. Dass SLY-positive *S. suis*-Stämme in der Lage sind Zellen zu lysieren, konnte für humane, porcine und canine Epithelzellen (Norton *et al.* 1999; Lalonde *et al.* 2000; Tenenbaum *et al.* 2005, 2006), für humane und porcine Endothelzellen (Charland *et al.* 2000; Vanier *et al.* 2004) und für murine Makrophagen (Segura und Gottschalk 2002) gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir drei unterschiedliche Suilysin Mutanten von *S. suis* mit den entsprechenden Wildtypen verglichen. Überraschenderweise konnte bei allen drei Mutanten eine höhere Translokationsrate beobachtet werden (Abb. 18A und B). Als Maß für die Barrierefunktion diente die TEER-Messung. Auch in diesem Fall haben wir keine Erniedrigung der TEER nach der Infektion mit den Suilysin Mutanten beobachtet (Abb.17). Unsere Ergebnisse widersprechen denen von Lalonde *et al.* (2000), die im Fall von *S. suis* das Suilysin als Ursache für die Zerstörung von epithelialen Zellen *in vitro* gesehen haben. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte die Adhärenz und Invasion von *S. suis* an humanen, caninen und porcinen Epithelzellen und fand heraus, dass nur die Suilysin produzierende *S. suis* Stämme

4. Diskussion

die Zellen beschädigen können. Segura und Gottschalk (2002) haben auch eine höhere Toxizität der Suilysin positive Stämme für Makrophagen festgestellt. 3 Stunden nach der Exposition von Makrophagen an Suilysin positive Stämme konnte ein Verlust der zytoplasmatischen Dichtigkeit, Spaltung der zytoplasmatischen Membranen und Freisetzung von zelluläre Inhalte sowie das Verschwinden der Zellkerne nachgewiesen werden. Norton *et al.* (1999) haben zum ersten Mal die Fähigkeit von *S. suis* in HEp-2 Zellen zu invadieren und sie zu lysieren demonstriert und postuliert, dass bei diesem Prozess Suilysin auch eine wichtige Rolle spielt. Alle genannten Untersuchungen wurden allerdings mit zytotoxischen Konzentrationen durchgeführt, um die Fähigkeit von SLY zur Zytolyse zu zeigen. In unseren Versuchen haben wir eine niedrige MOI eingesetzt, die zu keiner Beeinträchtigung der Zellvitalität geführt hat. Da es sich bei SLY um ein sezerniertes Protein handelt, ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass SLY ein Adhäsion oder Invasin von *S. suis* darstellt und eine spezifische Interaktion zwischen zellgebundenem SLY und *S. suis* stattfindet, die eine Internalisierung von *S. suis* initiiert.

Eine Möglichkeit der Zellaktivierung besteht in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF κ B, und Stimulation proinflammatorischer Zytokine. Für SLY wurde Unterschiedliches gezeigt, abhängig vom Zelltyp. In murinen Makrophagen konnte keine Zytokinexpression durch SLY stimuliert werden (Segura *et al.* 1999). Vadeboncoeur *et al.* (2003) wiesen eine Stimulation der IL-6- und IL-8-Produktion durch gereinigtes SLY in humanen Endothelzellen nach, jedoch keine MCP-1-Expression. Segura *et al.* (2006) belegten, dass nur ein geringer Unterschied zwischen dem *S. suis*-WT-Stamm, einer SLY-negativen Mutante und gereinigtem SLY in der Induktion der Zytokine IL-1, -6, -8, TNF- α und MCP-1 besteht. Durch die Induktion der Zytokinfreisetzung in Endothelzellen können also zusätzlich Effekte auf die Barrierefunktion und den Einstrom von Entzündungszellen in das ZNS ausgelöst werden (Vadeboncoeur *et al.*, 2003).

4. Diskussion

Bei der Adhärenz und Invasion von *S. suis* an bzw. in porcine Endothel- und Epithelzellen ist die Rolle von SLY noch unklar. Eine SLY-negative Mutante zeigte ähnliche Adhärenz- und Invasionsrate wie der Wildtyp-Stamm in porcine mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (PBMEC) (Vanier *et al.* 2007). Unsere Arbeitsgruppe konnte eine niedrigere Invasionsrate vom *S. suis* Wildtyp im Vergleich zu der SLY-negativen Mutante in PCPEC's demonstrieren (Daten unveröffentlicht). Suilysin vermag möglicherweise über die Induktion einer Signalkaskade den bakteriellen Internalisierungsprozess in PCPEC zu verhindern. Eine signifikant erhöhte Zytotoxizität durch die Suilysin Wild-Typen wurde nicht beobachtet. Die Rolle von SLY in der Pathogenese von *S. suis* bleibt somit immer noch unklar und weitere Studien sind notwendig um diese Rolle weiter zu charakterisieren.

4.4 Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zur Hemmung der bakteriellen Translokationsrate durch PCPEC.

Die Behandlung von vielen inflammatorischen ZNS-Erkrankungen, wie der akuten bakteriellen Meningitis umfasst neben der antibiotischen Therapie in der Anfangsphase die Therapie mit einem Kortikosteroid, meist Dexamethason. Die Rolle von Dexamethason bei der Behandlung der akuten bakteriellen Meningitis sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern wurde bis heute in vielen Studien und Tierexperimente untersucht (Van der Flier *et al.*, 2003). Mongelluzzo *et al.* (2008) haben in einer groß angelegten multizentrischen retrospektiven Kohortenstudie die Daten von insgesamt 2780 Kindern ausgewertet, die in den Jahren 2001-2006 in 27 US-amerikanischen Kliniken mit einer bakteriellen Meningitis behandelt wurden. Von diesen Kindern waren 248 (8,9%) initial adjuvant mit Kortikosteroiden behandelt worden. Die Daten wurden hinsichtlich eines Effektes der Steroidtherapie auf die Letalität und die

4. Diskussion

Dauer des Krankenhausaufenthaltes ausgewertet und u. a. nach Alter und Keimspektrum stratifiziert. Die häufigsten nachgewiesenen Erreger waren *S. pneumoniae* (18,1%), *Staphylokokken* (13,7%) und *Meningokokken* (10,1%), während *H. Influenzae* nur bei 4,3% der Kinder nachgewiesen wurde. Für keine Altersgruppe und für keinen der verursachenden Erreger konnte ein Effekt der adjuvanten Kortikosteroidtherapie auf die Letalität und auf die Dauer des Krankenhausaufenthaltes nachgewiesen werden. In diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translokation von *S. suis* durch Dexamethason nicht gehemmt werden kann (Abb. 11). Dieses Ergebnis unterstützt einerseits die klinischen Beobachtungen, die keinen Effekt einer Kortikosteroidtherapie auf den Verlauf einer Meningitis nachweisen konnten. Andererseits ist nicht unbedingt eine fehlende Hemmung der Translokation bei ausbleibender Schädigung der Barrierfunktion verwunderlich. Die Dexamethason-Effekte in unseren Experimenten könnten auf die Reduktion der Zytokinbildung durch die Bakterien zurückzuführen sein (van der Flier *et al.*, 2003). Außerdem haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass auch die transepitheliale Barriere nach der Präinkubation mit Dexamethason nicht beeinträchtigt wird (Abb. 12). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Zettl *et al.* (1992) in 31EG4 Brust-epithelialen Zellen der Maus zeigen, dass die Vorbehandlung mit Dexamethason zu einer Erhöhung der TEER führen kann. Weiterhin konnten Cucullo *et al.* (2004) eine Erhöhung der TEER bei Gliom- Zellen von Ratten nach der Vorbehandlung mit Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen (3 μ M, 10 μ M, 30 μ M und 100 μ M) nachweisen. Tenenbaum *et al.* (2008) aus unserer Arbeitsgruppe konnten einen Konzentrations- und Zeitabhängigen protektiven Effekt von Dexamethason auf die Barrierefunktion – und Morphologie von PCPEC nach Infektion mit *S. suis* beobachten. In der gleichen Arbeit wurden lebende, UV-inaktivierte und ultraschalllysierte Bakterien des *S. suis*-Stammes S735 eingesetzt und deren Effekte in der Normalkultur von PCPEC untersucht. Lebende *S. suis*-Bakterien verursachten einen signifikanten TEER-Abfall nach 8 Stunden. Die

4. Diskussion

Präinkubation mit 100µM, nicht aber 1µM Dexamethason, reduzierte den TEER-Abfall signifikant und verhinderte die *tight junction* Alteration. Auch im Fall von UV-inaktivierten und ultraschalllysierten Bakterien konnte eine schützende Wirkung von Dexamethason auf die Barrierefunktion und Morphologie von PCPEC in der Normalkultur festgestellt werden, hier jedoch war Dexamethason auch in der niedrigeren Konzentration protektiv. In den vorliegenden Ergebnissen war kein Einfluß auf die Barrierefunktion von PCPEC zu beobachten. Auch die Translokation sowohl vom *S. suis* Wildtyp als auch von der akapsulären Mutante wurde nicht inhibiert, unabhängig davon welche Dexamethason Konzentration verwendet wurde (Abb. 11). Der ausbleibende protektive Effekt ist möglicherweise durch die geringe Beeinträchtigung der Barrierefunktion durch die Bakterien in dem Versuchsaufbau bedingt. Dies verdeutlicht einmal mehr, dass *S. suis* in der Lage ist, eine intakte Barriere ohne deren Kompromittierung zu überwinden.

Insgesamt gesehen sind die bisher erhobenen Daten über Dexamethason-Therapien bei Kindern mit bakterieller Meningitis noch nicht ausreichend, um Schlußfolgerungen bzgl. ihrer Wirksamkeit zu ziehen. Weitere Daten sind nötig, um eine zuverlässige Antwort geben zu können, ob Dexamethason in der Therapie der bakteriellen Meningitis bei Kindern eingesetzt werden sollte.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) Einfluß auf die Barrierefunktion und Translokation von *S. suis* durch die PCPEC hat. Phosphatidylinositol-3-Kinasen sind Lipidkinasen, die in sämtlichen eukaryotischen Zellen zu finden sind. Diese Enzymgruppe kann über Phospholipide als Signalmediatoren in der Zelle verschiedenste Vorgänge beeinflussen wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion (Foster *et al.*, 2003). Die PI-3-Kinase ist verantwortlich für die Produktion von Second messenger-Molekülen. Als Lipidkinase katalysiert diese die Phosphorylierung des Membranbestandteils

4. Diskussion

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an der 3'-OH Position des Inositolrings. Dabei entsteht das Lipidprodukt Phosphoinositol-3, 4,5-triphosphat (PIP₃), welches unter anderem von der Protein-Kinase-B (PKB) als Anker genutzt wird. Dieses Andocken der PKB an die Membran setzt eine Signaltransduktionskaskade in Gang, was zur Induktion der Transkription bestimmter Zielgene führt. Wichtige Downstream-Effektormoleküle der PI3K stellen das Aktin und Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Familie dar (Chan *et al.*, 1999; Newton, 1995). Segura *et al.* (2004) konnten zeigen, dass der bekapselte *S. suis* die Aktivierung des PI3K/Aktin/PKC-Signalweges, der in der Phagozytose involviert sind, hemmen kann. Bei den Untersuchungen von Tenenbaum *et al.* (2009) konnte in elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden, dass der *S. suis* gehäuft in Zellvakuolen lokalisiert war. Daraus kann vermutet werden, dass *S. suis* u.a. in Vakuolen die PCPEC durchwandert. Die Rolle von Phosphatidylinositol-3-Kinasen bei der Invasion von Zellen konnte bereits bei verschiedenen Bakterien demonstriert werden. So wurde bereits für die Invasion von Gruppe B Streptokokken in HeLa-Zellen gezeigt, daß die Präinkubation der HeLa-Zellen mit 30µM LY294002 die Invasion der B Streptokokken in den Zellen bis zu 75% hemmt (Burnham *et al.*, 2007). Auch für die Invasion von *E. coli* in mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (BMEC) scheint der PI3K-Weg eine wichtige Rolle zu spielen, denn auch in diesem Fall der LY294002 zu einer Hemmung der Invasion von *E. coli* in den BMEC führt (Kim, 2001). Verschiedene Studien haben an einer Vielzahl von Zelltypen gezeigt, dass PI3K an der intrazellulären Signaltransduktion mit nachfolgender IL-6 und IL-8 Expression beteiligt ist (Gobert *et al.*, 2007; Wrann *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die PCPEC mit dem spezifischen Inhibitor für Phosphatidylinositol-3-Kinase, LY294002, präinkubiert und anschließend wurde die Translokationsrate nach Stimulation mit *S. suis* und dessen akapsulären Mutante gemessen. Eine signifikante Hemmung der Translokation konnte nach der Vorbehandlung mit 1µM LY294002 nachgewiesen werden (Abb. 13). Weitere

4. Diskussion

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass LY294002 auch die Invasionsrate von *S. suis* in PCPEC signifikant inhibiert hat, in einem Zeitraum von 4 Stunden (Tenenbaum *et al.*, 2009). In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das inaktive Analogon LY303511 keinen Effekt auf die Invasions- und Translokationsrate von *S. suis* zeigte. Den genauen Weg dieser Inhibition haben wir im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Yeah *et al.* (2006) haben endotheliale Zellen mit Streptokokken der Viridans-Gruppe stimuliert und gezeigt, dass die PI3K-Inhibition die IL-6- und teilweise auch die IL-8-Expression blockiert. Diese Arbeit unterstützt die Bedeutung von PI3K für einen möglichen Signaltransduktionsweg, der an der Regulation der Genexpression von IL-6 und IL-8 beteiligt ist. Diese Regulation von IL-6 und IL-8 kann auch eine bedeutsame Rolle für die Invasion bzw. Translokation von *S. suis* durch PCPEC spielen. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die Zytoskelettregulation in PCPEC und den Mechanismus des bakteriellen Durchtritts von *S. suis* durch diese Zellen genauer zu untersuchen. Tenenbaum *et al.* (2009) aus unserer Arbeitsgruppe konnten außerdem zeigen, dass Cytochalasin D die Invasion von *S. suis* in PCPEC hemmt. Die Arbeitsgruppe untersuchte zusätzlich den Einfluss von Cytochalasin D auf die Invasion von *S. suis*, da die Substanz einen starken hemmenden Einfluss auf die Zytoskelettregulation besitzt. Besonders stark konnte durch die Präinkubation mit Cytochalasin D die Invasion der akapsulären Mutante in PCPEC gehemmt werden. Nach Cytochalasin D-Behandlung konnten fast keine invadierten Bakterien mehr beobachtet werden. Die meisten dieser Bakterien fanden sich entlang von Zell-Zell-Kontakten. In diesem Fall konnte allerdings eine vermehrte Translokation beobachtet werden, da der Inhibitor zu einer verstärkten parazellulären Permeabilität führte. Außerdem konnte eine höhere Adhäsionsrate der akapsulären Mutante im Vergleich zum Wild-Typ nach Cytochalasin D-Behandlung festgestellt werden. Cytochalasin D ist ein zellmembranpermeables Mykotoxin. Es bindet an die freien Enden von Aktinfilamenten und hemmt die Zusammenlagerung aber auch die Trennung von Aktinuntereinheiten. Es verursacht

4. Diskussion

die Zerstörung von Aktinfilamenten und hemmt außerdem die Neupolymerisation von Aktinfilamenten. Cytochalasin D vermindert möglicherweise durch Inhibition des Zytoskeletts die Adhäsion und vor allem die Invasion in PCPEC.

Bis heute ist der LY294002 pharmakologisch im Rahmen der Therapie einer bakteriellen Meningitis noch nicht eingesetzt worden. Vielleicht kann zukünftig das Einsetzen von LY294002 signifikant zur Therapie der bakteriellen Meningitis beitragen. Dafür sind weitere Studien notwendig.

5. Zusammenfassung

Die strukturelle Basis der Blut-Liquor-Schranke wird von den Epithelzellen des Plexus choroideus gebildet. Ein Bakterium, das den Plexus choroideus potentiell als Eintrittspforte in den Liquor nutzt, ist *Streptococcus suis* (*S. suis*). *S. suis* ist ein Pathogen, welches eine Meningitis, Pneumonie oder Sepsis sowohl bei Schweinen als auch bei Menschen auslösen kann. Als *in vitro* Modell der Blut-Liquor-Schranke dienen primäre porcine choroidale Plexusepithelzell-Monolayer (PCPEC), die bisher konventionell auf Transwell-Filtern kultiviert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Umkehrkultur („inverted“ Transwell-Filter) entwickelt, die uns die Möglichkeit gab die Invasion und Translokation von physiologisch relevanter basolaterale (Blut-)Seite zur apikalen (Liquor-) Seite zu untersuchen. Das Kapselpolysaccharid (KPS) von *S. suis* ist bisher der einzige erwiesene Virulenzfaktor von *S. suis*. Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation von *S. suis* durch das Plexusepithel bevorzugt von der basolateralen Seite und abhängig von dem Virulenzfaktor Kapsel erfolgt. Die höhere Translokationsrate hat aber zu keiner Störung der epithelialen Barriere- Funktion geführt, die mittels TEER und Inulinflussmessung gemessen wurde. Als weiteres wurde die Rolle des thiol-aktivierten Hämolytins Suilysin auf die Translokation von *S. suis* durch PCPEC analysiert. Dafür wurden unterschiedliche Wildtypen von *S. suis* und deren Suilysin- defiziente Mutanten miteinander verglichen und es konnte gezeigt werden, dass alle 3 Suilysin defizienten Mutanten eine signifikant höhere Translokationsrate als die jeweiligen Wildtypen zeigen. Dabei kam es ebenso zu keiner Störung der epithelialen Barrierenfunktion. Ferner wurde die Rolle von Dexamethason, welches bereits klinisch während der Behandlung der bakteriellen Meningitis eingesetzt wird, auf die Translokationsrate untersucht. Es konnte jedoch keine Hemmung der Translokation sowohl bei *S. suis* als auch bei der akapsulären

5. Zusammenfassung

Mutante gezeigt werden. Der spezifische PI3-Kinase Inhibitor, LY294002 konnte jedoch signifikant die Translokationsrate von *S. suis* durch PCPEC hemmen, sowohl bei dem Wildtyp als auch bei der akapsulären Mutante. Unsere Daten unterstreichen die Relevanz der Blut-Liquor-Schranke als Eintrittspforte für Bakterien in das Zentralnervensystem und ermöglichen zum einen neue grundsätzliche Einblicke in die Pathogenese der Meningitis, eröffnen zum anderen aber auch Perspektiven für therapeutische, diagnostische und präventive Strategien.

6. 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. Previous experimental studies in a standard Transwell culture system have shown *S. suis* ability to compromise barrier function of porcine choroid plexusepithelial cells (PCPEC). The development of an „inverted“ Transwell filter system of PCPEC gave us the opportunity for the first time to investigate bacterial translocation from the physiologically relevant basolateral (blood) to the apical side (CSF). Most importantly, we observed specific translocation of *S. suis* across the PCPEC exclusively from the basolateral side. During this process, bacterial viability and the presence of a capsule as well as cytoskeletal regulation of PCPEC seemed to play an important role. Bacterial translocation could be significantly inhibited by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002, but not by its inactive analogon Ly303511 or dexamethasone. Furthermore we analyzed the effects of the thiol-activated hemolysin suilysin on *S. Suis* translocation rates across PCPEC. Surprisingly, we observed lower translocation rates in three different suilysin deficient mutants compared to the *S. suis* wild-type. Neither the suilysin mutants nor the wild-type significantly affected cell viability after infection. Taken together, our data underline the relevance of the blood-CSF barrier as a gate for bacterial entry into the CNS.

7. Anhang

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ω	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
Ab	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
As	Aminosäure
Ara-C	Cytosinarabinosid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
β -Hämolysin	β eta-Hämolysin
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BMEC	<i>Brain microvascular endothelial cells</i>
Brucella sp.	<i>Brucella spezies</i>
ca.	circa
CFU	Colonie Form Units
cps	<i>capsular polysaccharide</i>
DIV	Day <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbeco's modified eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure

7. Anhang

EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
<i>et al.</i>	und andere
EthD-1	Ethidium-homodimer-1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF	Extracellular Factor
ECM	Extracellular Matrix
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FBPS	Fibronectin-binding Protein
g	Gramm
GAS	<i>Gruppe A- Streptokokken</i>
GBS	<i>Gruppe B-Streptokokken</i>
h	Stunde
HBSS	Hank's buffered salt solution
HEPES	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
Hib	<i>Hämophilus influenzae vom Typ B</i>
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IL-1 β	Interleukin- 1 β
IL-6	Interleukin 6
JNK	c-Jun-N terminal Kinase
KPS	Kapselpolysaccharid
l	liter
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> strang <i>MG 1363</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LLO	Listeriolysin

7. Anhang

m	milli (10^{-3})
Mmolar	(mol/l)
MAP	mitogen-activated protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney Cells
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOI	multiple of infection
MRP	Muramidase released-Protein
NK	Normalkultur
PBS	Phosphate buffer saline
PC	<i>Plexus choroidei</i>
PCPEC	<i>Porcine choroid plexus epithelial cells</i>
PFO	Perfringolysin
PH	Pleckstrin homology
PIP3	Phosphoinositol-3, 4,5-triphosphat
PI3K-Inhibitor	Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor
PKB	Protein-Kinase B
PLY	Pneumolysin
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rpm	Rotation per minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
TNF-a	Tumornekrosefaktor-a

7. Anhang

TLR-2	Toll-like-Rezeptor 2
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SAR	Subarachnoidalraum
SFM/Ab	Serumfreies Medium mit Antibiotikum
SFM o AB	Serumfreies Medium ohne Antibiotikum
SHM/Ara-C	Serumhaltiges Medium mit Cytosinarabinosid
SLO	Streptolysin O
SLY	Suilylin
<i>Staph. Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SHM/ARAc	Serumhaltiges Medium mit Cytosinarabinosid
TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i> Transepithelialer elektrischer Widerstand
THB	Todd-Hewitt Broth
u.a	und andere
UK	Umkehrkultur
UV	Ultraviolett
w/v	Massenanteil
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
α -GT	α -Glutamyl-transpeptidase

7. Anhang

7.2 Literaturverzeichnis

Abbott, N. J. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200: 629-638.

Adam, R., K. S. Kim and H. Schrotten. 2007. Role of the blood-brain barrier and blood-CSF barrier in the pathogenesis of bacterial meningitis. In *Pediatric Infectious Diseases Revisited* (ed. H. Schrotten and S. Wirth), pp. 199-237. Birkenhäuser Verlag.

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

Ajuwon, K. M. and M. E Spurlock. 2005. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr.* 135: 1841-1846.

Allgaier, A., R. Goethe, H. J. Wisselink, H. E. Smith and P. Valentin-Weigand. 2001. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *J. Clin. Microbiol.* 39:445–453.

7. Anhang

Arends, J. P., N. Hartwig, M. Rudolphy, 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.

Benga, L., R. Goethe, M. Rohde and P. Valentin-Weigard. 2004. Non encapsulated strains reveal novel insights in Invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cellular microbiology* 6(9): 867-881.

Benga, L., M. Fulde, C. Neis, R. Goethe and P. Valentin-Weigand. 2008. Polysaccharide capsule and Suiysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes. *Veterinary Microbiology* 132:211-219.

Bliska J. B., J. E. Galan and S. Falkow. 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73:903-920.

Bonsu, B.K. and M. B. Harper. 2001. Fever interval before diagnosis, prior antibiotic treatment and clinical outcome for young children with bacterial meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 32:566-572.

Brandtzaeg, P., A. Halstensen, P. Kierulf, T. Espevik and A. Waage. 1992. Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal Meningitis or septic shock. *Microb. Pathology* 13:423-431.

7. Anhang

Burghard, R.C, R. Barhoumi, D. Doolittle and T. Phillips. 1994. Application of cellular fluorescence imaging for in vitro toxicology testing. Principles and methods of Toxicology, 3rd Edition, Chapter 34.

Burnham, C-A., S. Shokoples and G. Tyrrell. 2007. Invasion of HeLa cells by group B Streptococcus requires the phosphoinositide-3-kinase signalling pathway and modulates phosphorylation of hostcell Akt and glycogen synthase kinase-3. Microbiology 153: 4240–4252.

Burstein, L. and GN. Breningstal. 1986. Movement disorders in bacterial Meningitis. J. pediatrics 109:260-264.

Butt, A., H. C. Jones and N. J. Abbot. 1990. Electrical Resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental Study. J. Physiol. 429:47-62.

Carpenter, C. L. and L. C. Cantley. 1996. Phosphoinositide kinases. Curr. Opin. Cell. Biol. 8:153-158.

Chan, T.O., S. E. Rittenhouse and P. N. Tsichlis. 1999. Akt/PKB and other D3 Phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu. Rev. Biochem.68:965-1014.

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

7. Anhang

Charland, N., M. Jacques, S. Lacouture and M. Gottschalk. 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1,2. *Microbiology* 143: 3607-3614.

Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture and M. Gottschalk. 2000. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 68:637-643.

Chaudhuri A. 2004. Adjuvative dexamethasone treatment in acute bacterial Meningitis. *The Lancet Neurology* 3:54-62.

Clifton-Hadley F. A. 1983. *Streptococcus suis* type 2 Infections. *Br. Vet. J.* 139:1-5.

Clifton-Hadley, F. A. and T. J. L. Alexander. 1980. The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type II in pigs. *Vet. Rec.* 107:40-41.

Cornford, E. M. and S. Hyman. 1999. Blood-brain barrier permeability to small and large molecules. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36: 145-163.

Cucullo, L., K. Hallene, G. Dini, R. Dal Toso and D. Janigro. 2004. Glycerophosphoinositol and dexamethasone improve transendothelial electrical resistance in an in vitro study of the blood-brain barrier. *Brain. Research* 997:147-151.

7. Anhang

Davies, P .R. and C. J. Ossowicz. 1991. Evaluation of methods used for detecting *Streptococcus suis* type 2 in tonsils and Investigation of the carrier state in pigs. Research in Vet. Science 50:190-194.

De Greeff, A., H. Buys, J. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alpen and H. E. Smith. 2002. Contribution of Fibronectin-binding protein to Pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. 70: 1319-1325.

Demeule, M., A. Regina, J. Jodoin, A. Laplante, C. Dagenais, F. Berthelet, A. Moghrabi and R. Beliveau. 2002. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P - glycoprotein in the blood-brain barrier. Vascul. Pharmacol. 38: 339-348.

Deuren van, M., P. Brandtzaeg and Meer JW. van der. 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. Clin. Microbiol. Rev. 13:144-166.

Drerets, D. A. and P. J. Leenen. 2000. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. Microbes Infect. 2:1609-1618.

Dresch, P. 2002. Zelluläre Invasion: Eine bakterielle Überlebensstrategie. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch –Gesundheitsschutz 45:577-582.

Elliott, S. D. and J. Y. Tai. 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. J. Exp. Med. 48: 1699-1704.

7. Anhang

Esgleas, M., S. Lacouture and M. Gottschalk. 2005. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins. FEMS Microbiol. Lett. 244:33-40.

Fauci A. S. 2001. Infections diseases: Considerations for the 21th century. Clinical infections diseases 32:675-685.

Finlay, B. and P. Cossart. 1997. Exploitation of mammalian host cell Functions by bacterial pathogens. Science 276:718-725.

Fittipaldi, N., T. Sekizaki, D. Takamatsu, J. Harel, M. de la Cruz Dominguez-Punaro, S. Von Aulock, C. Draing, C. Marois, M. Kobisch and M. Gottschalk. 2008. D-Alanylation of Lipoteichoic Acid Contributes to the Virulence of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 76: 3587-3594.

Fleiszig, S. M., D. J. Evans, N. Do, V. Vallas, S. Shin and K. E. Mostov. 1997. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* Invasion and Cytotoxicity. Infect. Immun. 65:2861-2867.

Foster, F. M., C. J. Traer, S. M. Abraham and M. J. Fry. 2003. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. J. Cell. Sci. 116: 3037–3040.

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

7. Anhang

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.

Ghyslaine, V., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture and M. Gottschalk. 2004. Invasion of Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells by *Streptococcus suis* Serotype 2. *Infect. Immun.* 72:1441-1449.

Gobert A. P, M. Varielle ,A. L. Glasser,T. Hindre, T. de Sablet and C.

Martin.2007.Shiga toxinproduced by enterohemorrhagic Escherichia coli inhibits PI3K/NF-kappaB signalingpathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 178: 8168-8174.

Gottschalk, M., R. Higgins and S. Quessy. 1999. Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis*. *J. clin. Microbiol.* 37: 4202-4203.

Gottschalk, M., S. Lacouture and J. D. Dubreuil. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 hämolysin. *Microbiology* 141: 189-195.

Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, D. Dubreuil, H. Smith and U. Vecht. 1998. Production of virulence-related proteins by canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can. J. Vet. Res.* 62:75-79.

Gottschalk, M. and M. Segura. 2000. The Pathogenesis of the Meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary microbiology* 76:259-272.

7. Anhang

Grimwood, K., V. A. Anderson, L. Bond *et al.* 1995. Adverse outcomes of bacterial Meningitis in schoolage survivors. *Pediatrics* 95:646-656.

Hakvoort, A., M. Haselbach, J. Wegener, D. Hoheisel and H.-J. Galla. 1998. The Polarity of choroid Plexus epithelial cells in vitro is improved in Serum-Free-Medium. *J. Neurochem.* 71:1141-1150.

Hasselbach, M., J. Wegener, S. Decker, S. Engelbertz and H.-J. Galla. 2001. Porcine choroid plexusepithelial cells in culture: Regulation of Barrier Properties and Transport Processes. *Microscopy Research and Technique* 52:137–152.

Hu, J., L. Qiao, S. Wang, S. B. Rong, E. J. Meuillet, M. Berggren, A. Gallegos, P. Powis and A. P. Kozikowski. 2000. 3-(Hydroxumethyl)-bearing Phosphatidylinositol ether lipid analogues and carbonate surrogates block PI3-Kinase, Aktivities and cell growth. *J. Med. Chem.* 43:3045-3051.

Huang, SH., MF. Stins and KS. Kim. 2000. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal Meningitis. *Microbes Infect.* 2:1237-1244.

Huang, FM., CH. Tsai, YJ. Chen, MY. Chou and YC. Chang. 2006. Examination of the signal transduction pathways leading to upregulation of tissue type plasminogen activator by interleukin-1 alpha in human pulp cells. *J. Endod.* 32:30-33.

7. Anhang

Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg and P. K. Storm. 1994. Identification, purification and characterization of a thiol-activated Hämolysin (Suilysin) of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 62: 1742-1748.

Jacobs, A. A., A. J. van den Berg and P.L.W. Loeffen. 1996. Protection of experimentally infected pigs by Suilysin, the thiol – activated Hämolysin of *Streptococcus suis*. Vet. Rec. 139: 225 – 228.

Jedrzejak, M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: Structure and Function. Microbiol. Mol. Biol. 65:187-207.

Jones, A. T. and M. J. Clague. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for early endosome fusion. Biochem. J 311:31-34.

Kaufhold, A., R. Luetticken and S. Litterscheid. 1988. Systemische Infektionen durch *Streptococcus suis*. Deutsche med. Wochenschrift 113:1642-1643.

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.

Kierbel, A., A. Gassama-Diagne, K. Mostov and J. N. Engel. 2005. The Phosphoinositol-3-Kinase-Proteinkinase B/ Akt. Pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAK Internalization. Molecular Biology of the Cell. 16:2577-2585.

7. Anhang

Kilpper-Baelz, R. and K. H. Schleifer. 1987. *Streptococcus suis*. Sp. nom. Rev. Int. J. Sys. Bacteriol. 37:160-162.

Kim, K. S. 2003. Pathogenesis of bacterial Meningitis: from Bacterämia to neuronal injury. Nat. Rev. Neurosc. 4:376-385.

Kim, K. S. 2001. *Escherichia coli* Translocation at the Blood-Brain Barrier. Infect. Immun. 69: 5217-5222.

Kim, K. S. 2002. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. J Infect. Dis. (Suppl 2) 186:S220–S224.

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

Kopic, J., M. T. Paradzik and N. Pandak. 2003. *Streptococcus suis* infection: a zoonosis we should have in mind-2 case reports. Lijec Vjesn. 125:134-137.

Kornelisse, R. F., C. M. Westerbeek, A. B. Spoor *et al.* 1995. Pneumococcal Meningitis in children: prognostic Indicators and Outcome. Clin. Infect dis. 21:1390-1397.

Lalonde, M., M. Segura, S. Lacouture and M. Gottschalk. 2000. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. Microbiology 146:1913-1921.

7. Anhang

Lasa, M., S. M. Abraham, C. Boucheron, J. Saklatvala and A. R. Clark. 2002. Dexamethasone causes Sustained Expression of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase 1 and Phosphatase-mediated Inhibition of MAPK p38. *Molecular and Cellular Biology*. 22:7802-7811.

Lasa, M., J. Saklatvala and A. R. Clark. 2001. Dexamethasone destabilizes Cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein Kinase p38. *Molecular and Cellular Biology*. 21:771-780.

Leib, S. L. and M. G. Täuber. 2000. Suche nach Strategien zur Verhinderung des Hirnschadens als Folge von bakterieller Meningitis. *Schweiz Med. Wochenschrift* 130:928-935.

Li, G., C. D'Souza-Scorey, M. A. Barbieri, R. L. Roberts and A. Klippel. 1995. Evidence for phosphatidylinositol 3-Kinase as a regulator of Endocytosis via activation of Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(10):207-11.

Lun, S., J. Perez-Casal, W. Connor and P. J. Willson. 2003. Role of sulysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microbial Pathogenesis*. 34:27-37.

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.

7. Anhang

Mackarel, A. J., D. C. Cottell, M. X. Fitzgerald and C. M O'Conor. 1999. Human endothelial cells cultured on microporous filters used for leukocyte transmigration studies from monolayers on both sides of the Filter. *In vitro cell Dev. Biol.* 35(6):346-351.

Madara, J. L. 1998. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60:143-159.

Madsen, L. W., B. Svensmark, K. Elvestad, B. Aalbaek and H. E. Jensen. 2002. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J. Comp. Pathol.* 126:57-65.

Martin, T. F. J. 1998. Phosphoinositide Lipids as signaling molecules: Common themes for signal Transduction, cytoskeletal Regulation and Membrane Trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:231-264.

McIntyre, P. B., C. S. Berkey, S. M. King *et al.* 1997. Dexamethasone as adjunctive Therapy in bacterial Meningitis: meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *J AMA* 278:925-931.

Mongelluzzo, J., M. Zeinab, T. Ten Have and S. Shah. 2008. Corticosteroids and Mortality in Children with Bacterial Meningitis. *JAMA* 299 (17): 2048-2055.

7. Anhang

Monteville, M. R., and M. E. Konkel. 2002. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral Cell surface. *Infect. Immun.* 70:6665-71.

Moreno, M. T., S. Vargas, R. Poveda *et al.* 1994. Neonatal Sepsis and Meningitis in developing Latin American Country. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13:516-520.

Mounier, J., T. Vasselon, R. Hellio, M. Lesourd and P. Sansonetti. 1992. *Shigella flexneri* enters human Caco-2 epithelial cells through the basolateral Pole. *Infect. Immun.* 60:237–248.

Nassif, X., S. Bourdoulous, E. Eugene and P. O. Cauraud. 2002. How do extracellular pathogens cross the blood-brain-barrier? *Trends in Microbiology* 10 (5): 227-232.

Nau, R. and W. Bruck. 2002. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci.* 25:38–45.

Newton, A. C. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270: 28495-28498.

Norton, P. M., C. R. Rolph, P. N. Ward, R. W. Bentley and J. A. Leigh. 1999. Epithelial Invasion and Cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the Presence of Suilysin. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 26:25-35.

7. Anhang

Oettel, M. 1996. Endokrinpharmakologie. In: Frey, H-H. und W. Löscher (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Verlag Enke, Stuttgart, S. 370-423.

Odio, C. M., I. Faingezicht, M. Paris *et al.* 1991. The beneficial effects of early dexamethasone administration in infant and children with bacterial Meningitis. *N engl. Med.* 324:1525-1531.

Okwumabua, O., O. Abdelmagid and M. M. Chengappa. 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a Hämolysin (Suilysin) of *Streptococcus suis* type 2 :Evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiology Letters* 181:113-121.

Oosterbrink, R., M. Maas, K. G. Moons *et al.* 2002. Sequelae after bacterial Meningitis in childhood. *Scand. J. Infect. Dis.* 34:379-382.

Parkkinen, J., T. K. Korhonen, A. Pere, J. Hacker and S. Soynila. 1988. Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. 81:860-865.

Perch, B., K. B. Pedersen and J. Henrichsen. 1983. Serology of capsulated *Streptococci* pathogenic for pigs: Six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 17:993-996.

Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124: 715-727.

7. Anhang

Pomeroy, S. L., S. J. Holmes, P. R. Dodge *et al.* 1990. Seizures and other neurologic sequelae of bacterial Meningitis in children. *N. Engl. J. med.* 323:1651-1657.

Prasadarao, N. V., A. M. Blom, B. O. Villoutreix *et al.* 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.

Pron, B., M. K. Taha, C. Rambaude *et al.* 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of P1C. *J. Infect. Dis.* 176:1285–1292.

Purushothaman, S., B. Wang and P. Cleary. 2003. M1 Protein Triggers a Phosphoinositide Cascade for Group A Streptococcus Invasion of Epithelial cells. *Infect. Immun.* 71(10): 5823-5830.

Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead *et al.* 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.

Risau, W., S. Esser and B. Engelhardt. 1998. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol. Biol.* 46: 171-175.

7. Anhang

Saez-Llorens, X. and G. H. Jr. McCracken. 2003. Bacterial meningitis in children. *Lancet* 361:2139–2148.

Saklatvala, J. 2002. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res.* 4:146-150.

Schaad, U. 1999. Meningitis im Kindesalter. *Therapeut. Umschau* 56:653-658.

Schermann, J. M. 2002. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascular pharmacology*38: 349-354.

Schmitt, B. 2004. Folgen der bakteriellen Meningitis. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 152:391-395.

Schmutzhard, E. 2000. Entzündliche Erkrankungen des Nervensystems. Thieme Verlag, Stuttgart.

Schroten, H. 2004. Diagnostik und Therapie der bakteriellen Meningitis. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 152:382-390.

Segers, R. P., L. Kenter, A. de Haan and A. A. Jacobs. 1998. Characterization of the gene encoding Suilysin from *Streptococcus suis* and expressions in field strains. *FEMS Microbiol. Letters* 167: 255-261.

7. Anhang

Segura, M., P. Cleroux and M. Gottschalk. 1998. *Streptococcus suis* and Group B Streptococcus differ in their interactions with murine macrophages. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 3:189-195.

Segura, M. and M. Gottschalk. 2002. *Streptococcus suis* Interactions with the Murine Makrophages Cell Line J 774: Adhesion and Cytotoxicity. Infect. Immun. 70:4312-4322.

Segura, M., M. Gottschalk and M. Olivier. 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. Infect. Immun. 72:5322-5230.

Segura, M., J. Stankova and M. Gottschalk. 1999. *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. Infect. Immun. 67 (9): 4646-4654.

Segura, M., G. Vanier, D. Al-Numani, S. Lacouture, M. Olivier and M. Gottschalk. 2006. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 47(1): 92-106.

Sell, S. H. W. 1983. Long term sequelae of bacterial meningitis in children. Pediatr. Infect. Dis. 2:90-93.

Shapiro, S., A. Miller, N. Lahat *et al.* 2003. Expression of matrix metalloproteinases, sICAM-1 and IL-8 in CSF from children with Meningitis. J. Neurol. Sci. 206:43-48.

7. Anhang

Shichum, L., J. Perez-Casal, C. Wayne and P. J. Willson. 2003. Role of Suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microbial pathogenesis* 34:27-37.

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(4): 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., P. Brandon, G. Stewart and M. Chengappa. 1999. Presence of the *Streptococcus suis* Suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Vet. Microbiol.* 70: 201-211.

Staats, J., B. L. Plattner, J. Nietfeld, S. Dritz and M. M. Chengappa. 1998. Use of ribotyping and hemolysin activity to identify highly virulent *Streptococcus suis* type 2 Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:15 – 19.

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

7. Anhang

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.

Strangmann, E., H. Froleke and K. P. Kohse. 2002. Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205:385-392.

Strazielle, N. and J. F. Ghersi-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. Prasadaras. 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.

Tang, P., V. Foubister, M. G. Pcciarelli and B. Finlay. 1993. Methods to study bacterial Invasion. *J. Microbiol.* 18: 227-240.

Tang, P., C. L. Sutherland, M. Gold and F. Brett. 1998. *Listeria monocytogenes* Invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Infect. Immun.* 66(3):1106-1112.

Tenenbaum, T., R. Adam, I. Eggenpöhler, D. Matalon, A. Seibt, G. Novotny, H-J. Galla and H. Schrotten. 2005. Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* in vitro. *FEMS Immunology and medical microbiology* 44(1):25-34.

7. Anhang

Tenenbaum, T., F. Essmann, R. Adam, A. Seibt, R. U. Jänicke, G. E. Novotny, H-J. Galla and H. Schroten. 2006. Cell death, caspase activation and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. Brain Res. 1100 (1):1-12.

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 (CSF) barrier in vitro. Cell. Microbiol. 11: 323-336.

Tunkel, A. R., B. Wispelwey, V. J. Quagliarello *et al.* 1992. Pathophysiology of blood-brain barrier alterations during experimental *Haemophilus influenzae* meningitis. J. Infect. Dis. (Suppl 1) 165:119–120.

Tweten, R. K. 1995. Pore-forming toxins of gram-positive bacteria. Washington DC: American Society for microbiology 207-229.

Ungemach, F. R. 2002. Pharmaka zur Beeinflussung von Entzündungen.

7. Anhang

In: Löscher, W., F.R. Ungemach und R. Kroker (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus und Nutztieren. 5. Aufl., Verlag Parey, Berlin, S. 333-355.

Unkmeir, A., K. Latsch, G. Dietrich *et al.* 2002. Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 46:933–946.

Vadeboncoeur, N., M. Segura, D. Al-Numani, G. Vanier and M. Gottschalk. 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 49-58.

Valentin-Weigand, P. 2007. *Streptococcus suis* als Zoonoseerreger beim Schwein. *Der Praktische Tierarzt* 88, 8: 636-640.

Valentin-Weigand, P., P. Benkel, M. Rohde *et al.* 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 Macrophages. *Infect. Immun.* 64:2467-2473.

Van de Beek, D., J. deGans, P. McIntyre *et al.* 2003. Corticosteroids in acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD 004305.

Van de Beek, D., J. deGans, P. McIntyre and K. Prasad. 2004. Steroids in adults with acute bacterial meningitis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 4:139-143.

7. Anhang

Van de Beek, D., J. deGans, P. McIntyre and K. Prasad. 2007. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. Cochrane Database Syst. Rev. CD 004405.

Van de Beek, D., J. Farrar, J. deGans, N. Thi Hoang Mai, E. Molyneux, H. Peltola, T. E. Peto, I. Roine, M. Scarborough, C. Schultsz, G. E. Thwaites, P. Quoc Tuan and A. H. Zwinderman. 2010. Adjuvative dexamethasone in bacterial meningitis: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol.* 9(3):254-263.

Van der Flier, M., S. P. Geelen, J. L. Kimpen, I. M. Hoepelman and E. I. Tuomanen. 2003. Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome? *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 415-429.

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.

Vanhaesebroek, B. and D. R. Aless. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346:561-576.

Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture and M. Gottschalk. 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* 72(3): 1441-1449.

7. Anhang

Vanier, G., M. Segura and M. Gottschalk. 2007. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. The Canadian Journal of Veterinary research 71:81-89.

Vieusseux, G. 1805. Memoire sur la maladie qui a regne Geneve au printemps de 1805. J. med. Chir. Pharmacol. 11:163-182.

Vecht, U., L. A. M. G. Van Leengoed and E. R. M. Verheyen. 1985. *Streptococcus suis* infection in pigs in the Netherlands (part one). Vet. Q. 7:315-321.

Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema and H. E. Smith. 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. Infect. Immun. 59:3156-3162.

Vecht, U., H. J. Wisselink, J. E. Van Dijk and H. E. Smith. 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. Infect. Immun. 60:550-556.

Vercellotti, G. M., D. Lussenhop, P. K. Peterson, L. T. Furcht, J. B. McCarthy, H. S. Jacob and C. F. Moldow. 1984. Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism. J. Lab. Clin. Med. 103:34-43.

Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui and R. F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-Kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-Phenyl-4-H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J. Biol. Chem. 269:5241-48.

7. Anhang

Wakabayashi, Y., Y. Chua and J. M Larkin. 2007. Four dimensional imaging of Filter-grown polarized epithelial cells. *Histochem Cell. Biol.* 127(5):463-472

Walia, B., F. E. Castaneda, L. Wang, V. L. Kolachala, R. Bajaj, J. Roman, D. Merlin, A. T. Gewirtz and S. V. Sitaraman. 2004. Polarized fibronectin secretion induced by adenosine regulates bacterial epithelial interaction in human intestinal epithelial cells. *Biochem.* 382:589-596.

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

Wisselink, H. J., H. E. Smith, N. Stockhofe-Zurwieden, K. Peperkamp and U. Vecht. 2000. Distribution of capsular types and production of murimidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet. Microbiol.* 74:237-248.

Wissink, S., E. C. Van Heerde, B. Van der Burg and P. T. Van der Saag. 1998. A dual mechanism mediates Repression of NF- κ B Activity by Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology* 12(3):355-363.

Weiser, J. N., D. Bae, C. Fashing *et al.* 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4215-4220.

7. Anhang

Wrann, C. D., N. A. Tabriz, T. Barkhausen, A. Klos, M. van Griensven, H. C. Pape, D. O. Kendoff, R. Guo, P. A. Ward, C. Krettek and N. C. Riedemann. 2007. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J Immunol.* 178: 5940-5948.

Yadav M., L. Clark and J. S. Schorey. 2006. Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* 176: 5494-5503.

Yeh, C. Y., J. Y. Chen and J. S. Chia. 2006. Glucosyltransferases of viridians group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence. *Infect Immun.* 74: 1273-1283.

Zettl, K.S., M. D. Sjaastad, P. M. Riskin, G. Parry, T. E. Machen and G. L. Firestone. 1992. Glucocorticoid induced-formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9069-9073.

7. Anhang

7.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: A) Kolonien von *S. suis* auf Blutagar. B) Gramfärbung

Abb. 2: a) Schematisches Diagramm der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und b) der Blut-Liquor-Schranke (BLS) mit den spezifischen tight junctions, die die parazelluläre Diffusion ins ZNS verhindern. Im Vergleich dazu c) der relativ freie Stoffaustausch in Endothelien anderer Gewebe (Kusuhara and Sugiyama, 2001)

Abb. 3: Darstellung der Hirnkapillare, bestehend aus Endothelzelle und aufsitzenden Perizyten. Das Kapillarrohr wird von den Endfüßchen der Astrozyten umschlossen

Abb.4: Schema der Blut-Liquor Schranke (nach Spector & Johanson, 1991)

Abb. 5: chemische Struktur von LY294002

Abb. 6: chemische Struktur von Dexamethason

Abb. 7: Schematische Darstellung der Normal- (A und B) und Umkehrkultur (C und D)

Abb. 8: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) über 9 Tage unter SHM in der Umkehrkultur

Abb. 9: Einfluss der Infektion mit *S. suis* Stamm 10 und dessen akapsulärer Mutante auf die Barrierefunktion der PCPEC in der Umkehrkultur

Abb. 10: Translokationsraten von *S. suis*-Stamm 10, dem nicht-bekapselten Stamm Δ 10 und von *L. lactis* durch PCPEC in der Umkehrkultur nach 5 min, 30 min, 2h und 4h

7. Anhang

Abb. 11: Translokationsraten von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps in der Umkehrkultur, nach der Präinkubation mit Dexamethason (Dexa) (1 μ M und 100 μ M).

Abb. 12: Barrierefunktion der PCPEC während der Translokation von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps in der Umkehrkultur nach der Vorbehandlung mit Dexamethason (Dexa) (1 μ M und 100 μ M)

Abb. 13: Translokationsraten von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps in der Umkehrkultur, nach der Präinkubation mit LY294002 (1 μ M)

Abb. 14: Translokationsraten von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps in der Umkehrkultur, nach der Präinkubation mit LY294002 (10 μ M und 50 μ M)

Abb. 15: Barrierefunktion der PCPEC während der Translokation von *S. suis* Stamm 10 und Stamm 10 Δ cps in der Umkehrkultur nach der Vorbehandlung mit LY294002 (1 μ M)

Abb. 16: Einfluss von *S. suis* auf die Zellvitalität in der Umkehrkultur 4 Stunden nach Infektion

Abb. 17: Einfluss der Infektion mit den *S. suis* Wildtypen SX332, 9657573 und 31533 und deren entsprechenden Sulysin Mutanten (Sly-): SX932, SX917 und SX911 auf die Barrierefunktion der PCPEC in der Umkehrkultur

Abb. 18: Translokationsraten von *S. suis* Wildtypen SX332, 9657573 und 31533 und deren entsprechenden Sulysin Mutanten (Sly-): SX932, SX917 und SX911 durch PCPEC in der Umkehrkultur nach 30 min, 2h und 4h

7. Anhang

7.4 Publikationsverzeichnis

- 2009** 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 (CSF) barrier in vitro. Cell. Microbiol. 11: 323-336.

7. Anhang

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Thalia Papandreou

Max-Joseph-Str. 11

68167, Mannheim

geb. am 06. Dezember 1982 in Athen

ledig

Schulbildung

1988 - 1994 Grundschule in Athen/ Griechenland

1994 – 1997 „Tositsio-Arsakio“ Gymnasium in Athen/ Griechenland

1997 - 2000 „Tositsio-Arsakio“ Lyzeum in Athen/ Griechenland

September 2000: Abitur, Note 1.3

Studium

seit 04/2001 Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2003 Ärztliche Vorprüfung, Note 2.0

2007 Staatsexamen, Note 2.5

7. Anhang

Praktisches Jahr

02/ 2006-01/2007 1.Tertial: Chirurgie in das AIMS, New Delhi, Indien

2.Tertial: Augenheilkunde, „Georgios-Gennimatas“ Krankenhaus von Athen

3.Tertial: Innere Medizin (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf)

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

seit 09/2007 an der Universitätskinderklinik: Medizinische Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg

Forschungsbereich: Infektiologie mit Schwerpunkt die Meningitispathogenese in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schrotten

Sprachkenntnisse

Deutsch und Englisch fließend in Wort und Schrift

Griechisch: Muttersprache

EDV: Anwendungsorientierte Kenntnisse in Word und Excel

7.6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im infektiologischen Labor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt.

Auf diesem Weg möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. Schrotten für das sehr interessante Thema
- Herrn PD Dr. Tenenbaum für seine Unterstützung, seine gute Betreuung und seine Geduld
- der gesamten infektiologischen Arbeitsgruppe für die kompetente Einarbeitung, die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere bei: Fr. M-L. Mölleken, Fr. Dr. U. Friedrichs, Fr. A. Seibt
- den Mitarbeitern des Schachthofs Duisburg für die Bereitstellung des Arbeit-Materials
- meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meines Studiums weit weg von zu Hause in meinen Höhen und besonders auch Tiefen unterstützt haben
- allen, die mich während des Studiums in Düsseldorf begleitet, immer wieder aufgemuntert haben und immer für mich da waren, ganz besonders Philipp, Oli, Cornelius und Moronaki.