

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
der Heinrich-Heine-Universität

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Untersuchung der Mechanismen der Invasion von
Streptococcus suis an primären porcinen choroidalen
Plexusepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dorothee Gellrich

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. Schroten

Korreferent: Prof. Dr. MacKenzie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Die Blut-Liquor-Schranke	2
1.1.1	Aufbau	2
1.1.2	Funktion	4
1.2	Die bakterielle Meningitis	5
1.2.1	<i>Streptococcus suis</i> als Erreger der bakteriellen Meningitis	6
1.2.2	Bakterielle Mechanismen zur Überwindung zellulärer Barrieren	11
1.2.3	Pathogenese der bakteriellen Meningitis	15
1.3	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien und Reagenzien	21
2.1.1	Primäre porcine choroidale Plexusepithelzellen	21
2.1.2	Bakterien und Kulturmedien	21
2.1.3	Zellkulturmaterial und Inkubationsmedien	22
2.1.4	Pharmaka und Agenzien	24
2.1.5	Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper und Inhibitoren	25
2.1.6	Instrumente und Geräte	26
2.2	Präparation der Epithelzellen des Plexus choroideus aus dem Schweinehirn	26
2.2.1	Präparation des Primärmaterials	26
2.2.2	Zellpräparation	26
2.3	Die Umkehrkultur der Epithelzellen	28
2.3.1	Aussaat	29
2.3.2	Kultivierung	30
2.4	Barrierefunktionsuntersuchung	31
2.4.1	Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER)	31
2.5	Vorbereitungen der Versuche und Bakterieninkubation	31
2.6	Invasionsuntersuchung	33
2.6.1	Färbung der intra- und extrazellulären Bakterien	33
2.6.2	Messung der Adhäsion und Invasion mittels Doppelimmunfluoreszenz	34
2.7	Untersuchung zum intrazellulären von <i>S. suis</i> in PCPEC	35
2.7.1	Ablauf und Auswertung	35
2.8	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Übersicht	37
3.2	<i>S. suis</i> Invasion im Standard Transwell System und in der Umkehrkultur ...	38
3.2.1	Unterschiede in Bezug auf den TEER	38
3.2.2	Die polare Invasion von <i>S. suis</i> in PCPEC	38
3.3	Die Rolle der Kapsel bei der Invasion	43
3.4	Die Rolle von Suilysin bei der Invasion	46
3.5	Das intrazelluläre Überleben	50
3.6	Der Einfluss des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitors Ly294002 und Cytochalasin D	52

4	Diskussion	56
4.1	Polare Invasion von <i>S. suis</i> in PCPEC	56
4.2	Einfluss der Virulenzfaktoren Kapsel und Suilysin von <i>S. suis</i> auf die Invasion in PCPEC	58
4.2.1	Einfluss der Kapsel	58
4.2.2	Einfluss von Suilysin	59
4.3	Bedeutung des Zytoskeletts bei der Invasion von <i>S. suis</i> in PCPEC.....	62
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	67
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	76
8	Lebenslauf.....	78
9	Danksagung	79

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Das zentrale Nervensystem (ZNS) bestehend aus Gehirn und Rückenmark leistet im Körper des Menschen besondere Aufgaben. Es verarbeitet hochdifferenziert Sinneseindrücke, koordiniert komplexe Bewegungsabläufe und steuert alle Funktionen, die es unserem Organismus ermöglichen zu überleben und sich an seine Umwelt anzupassen. Somit stellt es den Hauptintegrationsort für alle Informationen dar, die der menschliche Körper verarbeiten muss. Um diese Aufgaben zu erfüllen, ist ein ausgeglichenes Milieu im ZNS eine unverzichtbare Voraussetzung [1]. Zu dieser Homöostase tragen die Blut-Hirn- und die Blut-Liquor-Schranke bei. Sie sind an der physiologischen Barriere beteiligt, die das zentrale Nervensystem vom restlichen Organismus trennt [2, 3].

Die Blut-Hirn-Schranke trennt die zerebralen Zellen von dem im Körperkreislauf zirkulierenden Blut. Sie besteht aus einem komplexen System aus Endothelzellen, Astroglia, Perizyten und einer Basallamina, die diese Zellen untereinander verbindet [4]. Die Grundlage der Schrankenfunktion bilden die Endothelzellen, die durch tight junctions spezielle Zell-Zell-Kontakte besitzen, die den Interzellularspalt abdichten [5, 6].

Die Blut-Liquor-Schranke ist die Barriere zwischen Blutsystem und Liquor cerebrospinalis. Sie wird gebildet durch die Plexus choroidei, die sich im Ventrikelsystem des Gehirns befinden. Die Plexusepithelzellen sind ebenso wie die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke untereinander durch tight junctions verbunden, um den Übertritt von hydrophilen Molekülen zu verhindern und bilden somit die anatomische Grundlage der Blut-Liquor-Schranke [7]. Eine weitere wichtige Funktion des Plexus choroideus ist die Sezernierung des Liquor cerebrospinalis. Dieser dient der Abpolsterung des Gehirns und des Rückenmarks sowie der Nährstoffversorgung innerhalb des zentralen Nervensystems [1]. Der Liquor cerebrospinalis steht in engem Kontakt mit der Interstitialflüssigkeit und ist von selbiger nur durch die durchlässige Schicht der Ependymzellen getrennt. Um ein konstantes Milieu aufrechtzuerhalten, ist eine Trennung vom Blutsystem nötig, in welchem die Konzentration der Inhaltsstoffe stark schwanken kann. Dies wird durch die oben beschriebenen Schrankensysteme gewährleistet [1].

Es ist bekannt, dass der Plexus choroideus bei verschiedenen neurologischen Funktionsstörungen involviert ist. Dazu zählen neurodegenerative (z. B. Morbus

Alzheimer), entzündliche (z. B. Multiple Sklerose), traumatische, neoplastische, systemische und infektiöse Erkrankungen [3]. So ist die Integrität der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke auch bedeutend bei der Abwehr von Bakterien. Studien haben gezeigt, dass verschiedene Mechanismen die Bakterien befähigen, diese Barriere zu überwinden. Für die Blut-Hirn-Schranke liegen bereits aufschlussreiche Ergebnisse vor [8-11]. An der Blut-Liquor-Schranke hingegen sind die Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. In einem *in vitro*-Modell wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von porcinen choroidalen Plexusepithelzellen untersucht, unter welchen Bedingungen gewissen Streptokokken die Überwindung der Schranke möglich ist.

1.1 DIE BLUT-LIQUOR-SCHRANKE

1.1.1 AUFBAU

Die Blut-Liquor-Schranke ist die Barriere zwischen Blutsystem und Liquor cerebrospinalis. Den ersten Hinweis auf eine solche Barriere zwischen Körperkreislauf und ZNS entdeckte Paul Ehrlich 1885, als ein ins Blut infundierter Farbstoff sich nicht im Gehirn anreicherte, jedoch den Plexus choroideus und die zirkumventrikulären Organe anfärbte. Im Gegensatz dazu fand sich derselbe Farbstoff intrathekal gegeben im Hirngewebe wieder, nicht aber in Plexus und zirkumventrikulären Organen [3].

Die Blut-Liquor-Schranke wird gebildet durch den Plexus choroideus, der in den beiden Seitenventrikeln der Hemisphären, im dritten Ventrikel in der Hirnmitte und im vierten Ventrikel an der Hirnbasis liegt. Die lateralen Plexus sind dünne, blattähnliche, gewellte Strukturen, die von der inneren Ventrikeloberfläche ausgehen. Im dritten Ventrikel befindet sich der Plexus am Ventrikeldach, der vierte Plexus liegt kaudal und ventral des Zerebellums [3]. Jeder Plexus ist ein epithelial-endotheliales vaskuläres Konvolut, bestehend aus stark verzweigten Zotten, von denen jede zarte Blutkapillaren enthält (Abbildung 1). Die Gefäße sind von einem einschichtigen Epithel umgeben, den Plexusepithelzellen. Diese sind neuroektodermalen Ursprungs und entwickeln sich primär aus Spongioblasten [12]. Sie sind definiert als ein Subtyp der Makroglia. Diese Zellen sind polar aufgebaut: an der basolateralen Seite haben sie Kontakt zum Blutplasma, das durch die fenestrierten Endothelien der Kapillaren hindurch tritt, und auf der apikalen Seite werden sie vom Liquor umspült (Abbildung

1). Die Epithelzellen sind ebenso wie die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke untereinander durch tight junctions verbunden, um den Übertritt von hydrophilen Molekülen zu verhindern. Sie bilden somit die anatomische Grundlage der Blut-Liquor-Schranke. Die apikale Epithelzellschicht ist ein zu kuboiden, kinozilienarmen Zellen modifiziertes Ependym. Die Endothelien der Blutgefäße im Plexus sind fenestriert, was durch die Ausschüttung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) induziert wird [3]. Diese Fenestrae sind jedoch mit einer 3-5 nm dicken Diaphragmamembran verschlossen. Zusätzlich wird diese Membran auf der luminalen Seite mit einer mindestens 300 nm dicken filamentösen anionischen Glykokalix bedeckt, welche proteinabstoßend wirkt. Auf diese Weise werden die Fenestrae der Endothelien, die einen Durchmesser von 60-80 nm haben, auf eine Größe von unter 5 nm verkleinert.

Durch villöse Ausläufer ergibt sich eine Oberflächenvergrößerung und damit eine größere Austauschfläche. Insgesamt beträgt die Oberfläche von allen vier Plexusgeflechten ca. 200 cm².

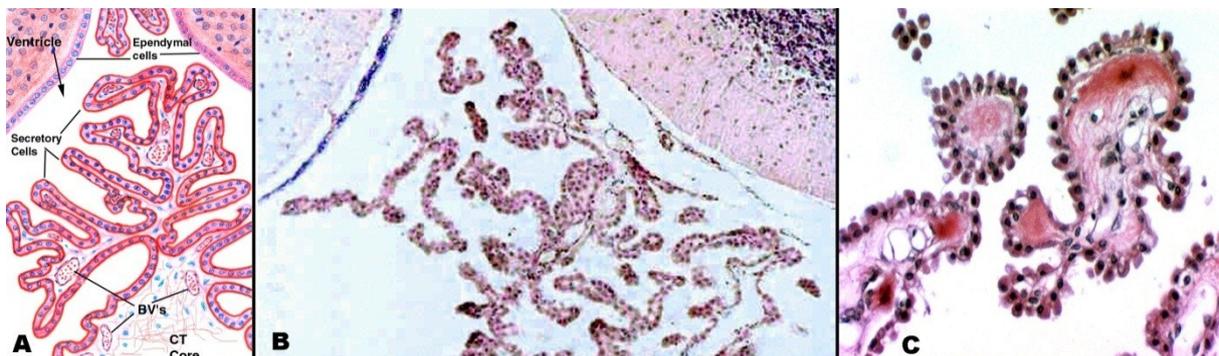


Abbildung 1: Der Plexus choroideus
A: Schematische Abbildung einer Zotte des Plexus choroideus.
B: Mikroskopische Aufnahme des Plexus choroideus.
C: Vergrößerte mikroskopische Aufnahme.

Da die tight junctions eine bedeutende Rolle für die Funktion der Blut-Liquor-Schranke spielen, soll hier kurz auf ihre Struktur und Zusammensetzung eingegangen werden. Durch die tight junction, die benachbarte Epithelzellen miteinander verbindet, ziehen Proteinstränge aneinandergereihter Occludin-Claudin-haltiger Vesikel (tight junction strands). Diese Stränge wiederum sind mit spezifischen membranständigen Proteinkomplexen der benachbarten Zellen verbunden. Die „peripheren“ tight junction-Proteine (ZO-1, ZO-2, Cingulin, p130, 7H6, rab13, Ras target protein u. a.) sind intrazellulär an das filamentöse Aktomyosin-

Netzwerk des Zytoskeletts der benachbarten Epithelzelle gekoppelt. Die tight junctions haben somit nicht nur lokale Bedeutung, sondern sind in den gesamten Zellverband integrierte Funktionseinheiten. Die Occludin-Claudin-haltigen Vesikelstränge, die wahrscheinlich noch andere bislang unentdeckte integrale Proteine enthalten, kommen mehr oder weniger anastomosierend in unterschiedlicher Anzahl vor (zwischen zwei und mehr als zehn Stränge). Ebenfalls verschieden in den einzelnen Organen treten sie blind endend oder mit Unterbrechungen unterschiedlicher Länge auf. An diesen Enden oder Unterbrechungen ebenso wie an Stellen, an denen drei Zellen zusammentreffen, befinden sich die sogenannten tricellular corners. Man unterscheidet verschiedene Grade der Dichtheit von tight junctions: „very tight“ z.B. in Endothelien zerebraler Kapillaren und postkapillärer Venulen bis „leaky“ z.B. in Epithelien des Plexus choroideus und „very leaky“ z.B. in zerebralen Sammelvenen. Dabei bedeutet „very tight“ eine hohe Anzahl an Strängen mit einer hohen Anastomosierung und wenig blind endende oder unterbrochene Stränge. Zahlreiche Faktoren regulieren das Netzwerk der tight junctions: Kalziumionen, G-Proteine, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Proteintyrosinkinase, Proteinkinase C, Phospholipase C, Zytokine (Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ)), Östrogene, integrale Komponenten benachbarter adherens junctions u. a. [12].

1.1.2 FUNKTION

Die Funktion des Plexus choroideus setzt sich zusammen aus der Aufrechterhaltung eines stabilen, nährstoffreichen Milieus, der Sekretion des Liquor cerebrospinalis und der Regulierung seiner Inhaltsstoffe sowie der Schrankenfunktion in Form der Blut-Liquor-Schranke, die schädliche Stoffe abhält. Spector und Johanson vergleichen den Plexus choroideus mit der Niere folgendermaßen: So wie die Niere die Zusammensetzung des Blutes reguliert, so sorgt der Plexus für Stabilität im Liquor [1].

Für die strenge Aufrechterhaltung des stabilen Milieus sind limitierte interzelluläre und transzelluläre Transportmechanismen vonnöten. Das Gleichgewicht des Stoffaustausches ist dabei sehr komplex und umfasst Aufnahme-, Strömungs-, Sekretions- und Resorptionsprozesse.

Die interzellulären bzw. parazellulären Schrankenfunktionssysteme trennen das Blut vom Liquorkompartiment vor allem in Bezug auf den Stofftransport hydrophiler

makromolekularer Solute, hauptsächlich Blutproteine. Die tight junctions zwischen den einschichtigen kinzilienarmen Ependymzellen des Plexus choroideus, zwischen dem ein- bis zweischichtigen Neurothel des Subarachnoidalraumes und zwischen den Endothelzellen leptomeningealer Gefäße bilden die strukturellen Korrelate der Blut-Liquor-Schranke.

Die Produktionsmenge des Liquors, der das Gehirn vor Stößen und Verletzungen schützt, beträgt ca. 500-600 ml pro 24 Stunden. Etwa 80-90 % des Liquors entstammen den fenestrierten Blutgefäßen des Plexus choroideus. Jedes Gramm Epithelgewebe scheidet pro Minute 0,4 ml Flüssigkeit ab. Dies genügt, um den gesamten Liquor (ca. 150 ml) eines erwachsenen Menschen in 3-4 Stunden zu erneuern [1]. Die Nährstoffe und andere Bestandteile des Liquors entnimmt der Plexus dem Blutplasma. Der Liquor cerebrospinalis besteht zu etwa 99 % aus Wasser. Die Konzentration der Elektrolyte bleibt aufgrund des wirksam gesteuerten Ionentransports unter allen Umständen nahezu konstant. Daher können sich die Ionenkonzentrationen im Blut und Liquor, z. B. bei Diät oder Mangelernährung, stark unterscheiden. Der Plexus choroideus hat nicht nur die Aufgabe die Zusammensetzung des Liquors zu kontrollieren, sondern auch Schadstoffe mittels aktiv transportierender Reinigungssysteme aus dem Liquor zu entfernen.

1.2 DIE BAKTERIELLE MENINGITIS

Die bakterielle Meningitis ist eine entzündliche Erkrankung der Hirnhäute und kommt in Europa mit einer Häufigkeit von 2-6 pro 100 000 Einwohner pro Jahr vor. Der erste Altersgipfel findet sich in den ersten beiden Lebensjahren, der zweite im jugendlichen Alter. Das Erregerspektrum unterscheidet sich je nach Alter der Patienten. Während bei Neugeborenen vorwiegend Streptokokken der Gruppe B, *Escherichia (E.) coli* und Listerien eine Meningitis auslösen, findet man bei älteren Kindern gehäuft Meningokokken, Pneumokokken und *Haemophilus (H.) influenzae b* (insbesondere in ungeimpften Populationen). Bei immunsupprimierten Personen kommen als mögliche Erreger die Enterobakterien hinzu. Die Symptome, die Patienten mit einer bakteriellen Meningitis präsentieren, sind altersabhängig und variieren je nach Virulenz des Erregers und Immunstatus des Wirts. In der Neugeborenenperiode stehen unspezifische Symptome wie Trinkschwäche, Berührungsempfindlichkeit, Temperaturinstabilität, schrilles Schreien und eine gespannte Fontanelle im Vordergrund. Erst ab dem Kleinkindalter zeigt sich die typische Trias mit Fieber,

Meningismus und Kopfschmerzen. Zusätzlich lassen sich im Blut häufig ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und eine Leukozytose nachweisen. Bei immuninkompetenten Patienten hängt das klinische Bild von der Grunderkrankung ab und kann deshalb in manchen Fällen auch nur sehr schwach ausgeprägt sein. Zur Diagnosesicherung dient in erster Linie die Lumbalpunktion. Im hierbei gewonnenen Liquor werden Zellzahl, Glukose und Protein bestimmt. Klassischerweise finden sich bei einer bakteriellen Meningitis im Liquor mehr als 1000 Zellen pro mm³, davon 80-95 % neutrophile Granulozyten. Der Glukosegehalt im Liquor ist erniedrigt und der Quotient zwischen Liquor und Serum ist von 0,6 auf weniger als 0,3 reduziert. Der Proteingehalt steigt auf mehr als 40 mg pro dl. Zur Bestimmung des auslösenden Agens ist die Abnahme einer Blutkultur unerlässlich. Dies sollte möglichst vor der ersten Antibiotikagabe erfolgen. Die Therapie muss rasch nach Aufnahme des Patienten beginnen. Da zu diesem Zeitpunkt der Erreger noch nicht bekannt ist, sollte eine altersabhängige empirische Antibiotikatherapie eingeleitet werden. Die endgültige Therapie richtet sich nach dem Antibiogramm und wird je nach Erreger zwischen 7 und 21 Tage lang durchgeführt. Die Patienten erhalten zusätzlich das Glukokortikoid Dexamethason, das die überschießende Entzündungsreaktion unterdrücken und somit die neurologischen Folgeschäden minimieren soll. Zur Prophylaxe werden aktuell die von der Ständigen Impfkommission (STIKO) empfohlenen Impfungen gegen *H. influenzae b* und Meningokokken C eingesetzt. Ebenfalls verfügbar ist eine Impfung gegen Pneumokokken. Für Personen, die engen Kontakt zu einer mit Meningokokken erkrankten Person hatten, wird die prophylaktische Einnahme von Rifampicin empfohlen. Trotz des Einsatzes von Antibiotika ist je nach Erreger mit einer Letalität von über 10 % zu rechnen [13].

1.2.1 *STREPTOCOCCUS SUIIS* ALS ERREGER DER BAKTERIELLEN MENINGITIS

Streptococcus (*S.*) *suis* ist ein relevanter weltweit vorkommender pathogener Erreger, der bei Schweinen neben Meningitis auch Sepsis, Pneumonie, Endokarditis, Enzephalitis, Polyserositis, Arthritis, Aborte und Abszesse hervorrufen kann [14].

Es handelt sich um Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken, die einzeln, paarweise oder als kurze Ketten vorkommen. Aufgrund seiner Zellwandantigene zählt das Bakterium zur Lancefield-Gruppe D. Die Kolonien von *S. suis* sind klein mit einem Durchmesser von 0,5-1,0 mm, erscheinen gräulich oder transparent und leicht

mukoid. Auf Schafsblutagarplatten bilden die meisten Stämme eine schmale α -Hämolysezone [14].

Das Genom von *S. suis* wurde vollständig entschlüsselt und enthält 20 074 917 bp mit einem Guanin+Cytosin-Gehalt von 41,3 %. Bisher ist die Funktion von 20-30 % der Gene noch unbekannt, weitere Forschungen sollen jedoch vor allem Einblicke in die Pathogenese erbringen [15].

Anhand der Kapselpolysaccharide wurden bis 1995 mittels Kapselreaktion, kapillärer Präzipitation oder Koagglutinationstest 35 Serotypen (Typ 1-34 und 1/2) identifiziert [16-20], jedoch werden die Serotypen 32 und 34 seit 2005 zur Familie *S. orisratti* gezählt [21]. Der Serotyp 2 spielt die bedeutendste Rolle bei Erkrankungen von Mensch und Schwein und wird weltweit am häufigsten isoliert [15].

S. suis Serotyp 2 ist ein gegenüber Umwelteinflüssen sehr widerstandsfähiges Bakterium und findet sich in Fäkalien, Staub und Wasser. Es überlebt 10 Minuten bei 60 °C, 2 Stunden bei 50 °C und 6 Wochen in Tierkadavern bei 10 °C. Bei 0° C überdauert es einen Monat in Staub und 3 Monate in Fäkalien, hingegen bei 25 °C 24 Stunden in Staub und 8 Tage in Fäkalien. *S. suis Serotyp 2* kann mit 5%-igem H₂O₂ bei einer Verdünnung von 1:800 abgetötet werden [22].

Auf einen Großteil der Antibiotika, einschließlich Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cephalosporine, reagiert *S. suis* normalerweise sensibel. Zur Behandlung von Infektionen genügt meistens Penicillin G, jedoch wurden bereits antibiotikaresistente Stämme beschrieben [15].

S. suis Typ 2 besiedelt hauptsächlich die Tonsillae palatinae und die Nasenhöhle sowohl von klinisch kranken als auch von scheinbar gesunden Schweinen und wird daher normalerweise nasal oder oral übertragen. Auch im Gastrointestinal- und Genitaltrakt von Schweinen konnte der Erreger nachgewiesen werden [23]. Die erkrankten Schweine oder die asymptomatischen Träger bilden die Infektionsquelle für die Herde und den Menschen [24]. Prädisponierende Faktoren beim Schwein sind das Alter (Ferkel), das Aufwachsen unter schlechten Bedingungen, Stress und damit verbunden eine schlechte Immunlage. Beim Menschen ist die Ursache der Infektion im Umgang mit Schweinen zu suchen, sei es durch direkten Kontakt oder durch den Genuss von rohem Schweinefleisch bei gleichzeitig bestehenden Wunden der Mund- oder Nasenschleimhaut. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht beschrieben und nur durch Kontakt mit infiziertem Material wie Blut möglich [15]. Schweinezüchter und -halter, Schlachter, Personen in der Fleisch verarbeitenden

Industrie und Tierärzte bilden folglich die Risikogruppe. Ebenfalls sind immunsupprimierte Personen einem erhöhten Risiko zu erkranken ausgesetzt.

Der erste Fall einer menschlichen *S. suis*-Infektion wurde 1968 in Dänemark beschrieben [25]. Seitdem sind in vielen Ländern mit intensiver Schweinezucht weitere Fälle bekannt geworden, mehr als 200 Fälle weltweit mit dem größten Vorkommen in Europa und Asien. 1998 und 1999 kam es zu einer Erkrankungswelle in China in der Provinz Jiangsu, ein weiterer Ausbruch ereignete sich in China in der Provinz Sichuan im Juli 2005. Im Zeitraum von 1998 bis 2006 wurden 237 Infektionen durch *S. suis* in China verzeichnet, wobei 53 der Erkrankten verstarben. Diese wiederholten Ausbrüche legen nahe, dass es sich bei *S. suis* um ein bedeutendes zoonotisches Agens handeln könnte [15].

Die Infektion durch *S. suis* verläuft beim Menschen meistens als purulente Meningitis, jedoch sind ebenfalls Fälle von septischem Schock mit Multiorganversagen, Endokarditis, Pneumonie, Arthritis und Peritonitis beschrieben. Die Symptome der akuten Meningitis äußern sich in hohem Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Erbrechen und Schwindel, gefolgt von mindestens einem der genannten Symptome: Hörverlust, Gangataxie, Koma, Nackensteifigkeit, Petechien, Gelenkschmerzen, periphere und faziale Paralysen, schwere Myalgie, subkutane Blutungen, Erytheme und Rhabdomyolyse. Bei einem akuten toxischen septischen Schock traten neben hohem Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Erbrechen, Schwindel und abdominellen Schmerzen auch Symptome wie Hypotension, Tachykardie, Leberdysfunktion, Purpura fulminans, disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC), akutes Nierenversagen und das Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) auf. Während bei der Meningitis der Hörverlust das häufigste Residuum ist, endet der septische Schock meistens mit dem Tod. Die Mortalität kann trotz adäquater Behandlung bei mehr als 70 % liegen [15].

Die am häufigsten beschriebenen pathologischen Befunde bei der Obduktion von mit *S. suis* infizierten Schweinen finden sich im Gehirn, in Lymphknoten und in der Lunge. Histopathologisch ist am häufigsten der Plexus choroideus betroffen. Man findet Läsionen im ZNS einhergehend mit Meningitis und Chorioiditis, wie Ödeme der Leptomeningen und der Dura mater, hyperämische meningeale Gefäße und eine erhöhte Liquormenge [14]. Am meisten charakteristisch für die Meningitis, die durch *S. suis* ausgelöst wurde, ist ein diffuses neutrophiles Infiltrat [14]. Obduktionen an Patienten, die am septischen Schocksyndrom oder an Meningitis verstorben waren,

ergaben schwerwiegende Läsionen mit ausgedehnten Hämorrhagien vor allem im Magen und den Nebennieren, Leptomeningeale Stauung, Hirnödem, Hyperämie des Myokards, DIC sowie Septikämie. Außerdem fand man eine Degeneration und Nekrose von Leber- und Nierenzellen. Die pathologischen Merkmale unterscheiden sich dabei nicht zwischen Schwein und Mensch [15].

Die Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren von *S. suis* ist schwierig. Sie ergibt oft uneinheitliche Ergebnisse und lässt bis heute noch viele Fragen ungeklärt. Die meisten Studien zu den Virulenzfaktoren wurden an *S. suis Typ 2* durchgeführt. Die Virulenz der Erreger unterscheidet sich stark zwischen den verschiedenen Stämmen. Nicht alle Serotypen sind krankheitserregend und nicht alle verursachen dieselbe Erkrankung [14]. Es herrscht Einigkeit darüber, dass es virulente und avirulente Stämme von *S. suis* gibt. Gottschalk et al. kritisieren jedoch, dass der Begriff der Virulenz für *S. suis* nicht einheitlich definiert ist und es somit zu Diskrepanzen kommt [23]. Die wichtigsten Virulenzfaktoren, auf die hier eingegangen werden soll, sind die Kapselpolysaccharide (CPS) und das Hämolysin (Suilyisin). Darüber hinaus gibt es Virulenz-assoziierte Proteine wie das muramidase-released-protein (MRP) und der extracellular protein factor (EF) [26] sowie Oberflächenproteine wie das AdiS Protein [27] oder der Serum Opacity Factor [28].

Die Kapsel von *S. suis Typ 2* ist der einzige bewiesene kritische Virulenzfaktor, basierend auf Studien mit unbekapselten isogenen Mutanten [29]. Sie besteht aus fünf Zuckern, darunter auch N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Je nach Isolat kann die Dicke der Kapsel variieren [30]. *In vitro* konnte eine Veränderung der Kapseldicke je nach Kulturbedingungen gezeigt werden [31]. Der Genlocus (*cps2* locus) wurde 1999 isoliert und charakterisiert, außerdem gelang die Beschreibung verschiedener Gene, die die Aktivitäten von Glukosyl-, Galaktosyl-, N-Acetylglukosaminy- und Rhamnosyltransferase kodieren [29]. In verschiedenen Modellen konnte Folgendes gezeigt werden: Fehlt die Kapsel, so ist dies mit einer erhöhten Hydrophobizität und Phagozytose durch Makrophagen assoziiert; zusätzlich waren unbekapselte Mutanten avirulent [29, 32]. Trotz dieser Ergebnisse bleibt festzustellen, dass auch die meisten avirulenten *S. suis*-Stämme eine Kapsel tragen, die sich in Größe und Sialinsäurekonzentration von der Kapsel der virulenten Stämme kaum unterscheidet [33]. Es müssen also weitere Virulenzfaktoren hinzukommen, die ein Eindringen des Erregers und das Überleben in der Blutbahn ermöglichen.

Das Hämolyysin von *S. suis* ist das sogenannte Suilyysin. Es ist ein Thiol-aktiviertes Toxin, das zur Familie der antigen-assoziierten Cholesterol-bindenden Toxine gehört und transmembranöse Poren verursacht. Das zugehörige Gen weist eine große Ähnlichkeit mit dem des Pneumolysins von *S. pneumoniae* auf [34]. Bisher konnten noch keine avirulenten Suilyysin-positiven *S. suis* Typ 2-Stämme isoliert werden, was die Rolle bei der Pathogenität der Erreger unterstreicht.

Für die Pathogenese gilt Ähnliches wie für die Virulenzfaktoren: noch längst sind nicht alle Entstehungswege von Infektionen durch *S. suis* verstanden. Sind die Tonsillen bei Schweinen besiedelt, müssen die Bakterien zunächst die Schleimhautbarriere überwinden. Die Mechanismen zur Überwindung zellulärer Barrieren werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Hierbei und im weiteren Verlauf der Erregerverbreitung könnten die CPS eine wichtige Rolle spielen. Möglicherweise verändert sich die Kapsel je nach Infektionsstadium. Dies würde bedeuten, dass die Produktion der CPS während der Kolonisation der Epithelzellen herunterreguliert und in der Phase der Dissemination in der Blutbahn die Kapsel wieder verstärkt ausgebildet wird. Somit entstünde ein Schutz vor phagozytierenden Zellen und gleichzeitig bliebe weiterhin die Möglichkeit bestehen, an Zellen zu adhären [35]. Für diese Theorie spricht, dass *S. suis in vivo* größere Mengen an CPS produziert als *in vitro* [33]. Jedoch gibt es hierfür zurzeit keinen direkten Beweis. Auch das Überleben im Blutstrom erfordert besondere Eigenschaften der Bakterien. Eine Theorie ist die des trojanischen Pferdes. Das Bakterium wird von Monozyten aufgenommen, kann intrazellulär überleben und gelangt so ins ZNS [36]. Die Phagozytose kann zum einen bereits in den Tonsillen erfolgen oder erst in der Blutbahn. Trotz der beobachteten Phagozytose ist es jedoch so, dass die meisten Bakterien extrazellulär bleiben [36]. Es muss also noch weitere Disseminationswege geben. Die „modified Trojan horse theory“ besagt, dass sich an phagozytierenden Zellen adhären, jedoch nicht phagozytierte Bakterien finden, die möglicherweise für die persistierende Bakteriämie und disseminierte Infektion verantwortlich sind [23]. Eine zweite epitheliale Barriere muss an der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke überwunden werden. Hier gibt es wiederum verschiedene Mechanismen wie die Transmigration der Erreger innerhalb von Leukozyten und die direkte Interaktion mit den Epithelzellen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die letztlich zur Entzündung der Meningen und des Gehirns führende Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen (TNF- α ,

Interleukin (IL)-6, IL-1, IL-8, monocyte chemotactic protein-1) auch durch *S. suis* induziert wird [23].

1.2.2 BAKTERIELLE MECHANISMEN ZUR ÜBERWINDUNG ZELLULÄRER BARRIEREN

Das Endothel der Blut-Hirn-Schranke und das Epithel der Blut-Liquor-Schranke stellen eine Barriere für Bakterien dar, die sie nur mithilfe besonderer Eigenschaften überwinden können.

Drei Wege können unterschieden werden, um über eine zelluläre Barriere zu gelangen: die transzelluläre Passage, die para- bzw. interzelluläre Passage und das Modell des trojanischen Pferds (Abbildung 2).

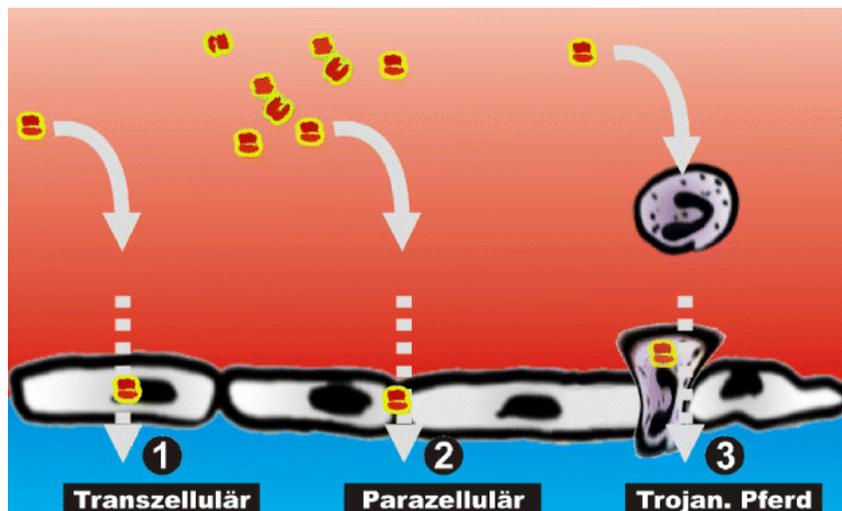


Abbildung 2:
Penetrationswege von
Bakterien (Erläuterungen
siehe Text)

Bei der transzellulären Passage wandern die Bakterien direkt durch die Zelle hindurch, indem Interaktionen zwischen verschiedenen Wirtsfaktoren und bakteriellen Bestandteilen (Ligand-Rezeptor-Interaktionen) genutzt werden. Die Transzytose an der Blut-Hirn-Schranke konnte für Streptokokken der Gruppe B, *E. coli* K1, *S. pneumonia*, *Listeria monocytogenes* und *Citrobacter freundii* gezeigt werden [8]. Dabei verändert sich die Integrität einer einzelligen Schicht aus mikrovaskulären endothelialen Zellen des Gehirns (brain microvascular endothelial cells, BMEC) bei den drei erstgenannten Bakterien nicht [10, 37-39]. *S. pneumoniae* nutzt für seinen Übertritt in das Liquorsystem die Bindung zwischen dem Phosphorylcholin der Zellwand und dem Plättchen-aktivierenden-Faktor-Rezeptor der BMEC, initiiert somit die Internalisierung des Rezeptors und gelangt in die Zelle [38]. In den Phagosomen geht zwar ein Teil der Pneumokokken zugrunde, der Rest wird

jedoch mittels Transzytose durch die Schranke geschleust. Listerien werden Internalin B-vermittelt in die Zelle geschleust [40], Meningokokken invadieren an der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls durch die Interaktion mit Oberflächenproteinen in zerebrale Endothelzellen [41]. Für *E. coli* K1 konnte gezeigt werden, dass zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke eine hohe Konzentration an lebenden Bakterien im Blut vorhanden sein muss. Darüber hinaus sind die Invasion der BMECs und Veränderungen des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle mit ihren zugehörigen Signalwegen erforderlich [42]. *E. coli* bindet durch Kapsel und Fimbrienepitope an die Endothelien, dringt in die Zelle ein und gelangt am Zytoskelett der Zelle entlang und durch Hemmung lysosomaler Fusionsmechanismen über die Barriere [43].

Eine weitere Zugangsmöglichkeit ist die para- bzw. interzelluläre Passage. Dies setzt eine Endothelschädigung voraus, welche beispielsweise durch das β -Hämolyysin der Streptokokken der Gruppe B oder das Pneumolysin der Pneumokokken entsteht [8, 44]. Ebenso verhält es sich mit dem Suilysin von *S. suis*. Es konnte nachgewiesen werden, dass Suilysin-positive Stämme zytotoxisch auf Zellen wirkten, während Suilysin-negative Stämme sich als nicht toxisch erwiesen [45]. Für *H. influenzae b* gibt es Hinweise dafür, dass es die interzellulären Verknüpfungen direkt angreift und aufbricht [46]. Ähnliches gilt für Bakterien der Familie der *E. coli*, die mit den Cadherinen der tight junctions interagieren [47]. Eine Erhöhung der Permeabilität von Endothel oder Epithel kann auch durch proinflammatorische Zytokine hervorgerufen werden, deren Produktion durch Anheften der Bakterien an die Blut-Hirn-Schranke induziert wird [23]. Zusätzlich könnte die Ausschüttung der Zytokine dazu führen, dass neue Rezeptoren an der Endothelzelloberfläche präsentiert werden und somit die Invasion erleichtern. Dies konnte bereits für *S. pneumoniae* gezeigt werden [48].

Eine Sonderform des interzellulären Transports stellt die Migration von Blutzellen in die Liquor führenden Räume dar. Der Durchtritt durch kapilläres Endothel scheint interzellulär zwischen den tight junctions zu erfolgen, wobei sich die penetrierende Blutzelle länglich verformt. Dieser Migrationsprozess findet u. a. an den Stellen statt, an denen drei Endothelzellen aneinander grenzen (tricellular corners) [49, 50]. Leukozyten sind dabei befähigt Endothelien auch transzellulär zu überwinden [51].

Schließlich wurde die Theorie des trojanischen Pferdes entwickelt, die eine Transmigration der Erreger via Leukozyten postuliert. Hierfür müssen die Pathogene die Fähigkeit besitzen, in Phagozyten zu überleben, wozu beispielsweise *Listeria monocytogenes*, *Brucella species* oder *Mycobacterium tuberculosis* in der Lage sind

[52]. In Makrophagen können auch Streptokokken und *E. coli* überleben, sodass sich bei diesen Pathogenen ebenfalls die Möglichkeit einer solchen Passage ergibt [47, 53, 54].

Zunächst wird das Bakterium durch die phagozytierenden Zellen aufgenommen. Normalerweise kommt es anschließend zu einer Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen, sodass die Bakterien zerstört werden. Jedoch haben die intrazellulär überlebenden Erreger Mechanismen entwickelt, dieser Destruktion zu entgehen. *Mycobacterium tuberculosis* gelingt dies, indem es die Fusion mit dem Lysosom blockiert. Einige Bakterien besitzen das Enzym Arginindeiminase, das die Umwandlung von Arginin in Citrullin katalysiert. Hierbei wird Ammoniak frei, welches wiederum einen sauren pH neutralisiert und somit die Bedingungen in den Phagolysosomen verändert. Dieser Mechanismus konnte für Pseudomonaden in Form des AdiS Proteins nachgewiesen werden [55]. Auch bei *S. pyogenes* ist die Arginindeiminase mit einem verbesserten Überleben im sauren Milieu assoziiert [56]. Wie oben beschrieben konnte mit dem AdiS Protein eine ähnliche Substanz auch für *S. suis* isoliert werden. Wenn Erreger also innerhalb der phagozytierenden Zellen überleben können, ist dies auch ein Weg, um sich über Zellbarrieren hinwegzusetzen. Ein erster Hinweis hierfür war die Erkenntnis, dass zirkulierende Monozyten möglicherweise unter entzündlichen Bedingungen über die üblichen Wege ins ZNS gelangen und dabei gleichzeitig phagozytierte Bakterien transportieren [36].

Auf die Rolle des Zytoskeletts und dessen Beeinflussung bzw. Nutzung durch die invadierenden Erreger soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

So wie *E. coli* nutzen viele weitere Bakterien, aber auch Viren und Protozoen, das Zytoskelett der Wirtszelle für ihre Invasion und Transmigration. Bei *E. coli* K1 sind die fokale Adhäsionskinase (FAK), Paxillin (ein Protein des Zytoskeletts, das mit der FAK verknüpft ist), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Rho-Guanosintriphosphatasen (GTPasen) und die zytosolische Phospholipase A₂ (PLA₂) an der Invasion in BMEC beteiligt [42]. Anhand von Studien mit Salmonellen ergaben sich neue Einblicke in die verschiedenen Interaktionen mit dem Zytoskelett [57]. Während der Phagozytose und Makropinozytose werden die Vorgänge an der Zelloberfläche durch das Zytoskelett kontrolliert [58, 59]. Dies stellt einen geeigneten Angriffspunkt für invadierende Bakterien dar. Salmonellen aktivieren auf direktem Weg die Rho-GTPase mittels Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) und dessen sezernierten

Effektoren, die als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) für die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac fungieren [60]. Weitere Effektoren haben Einfluss auf Aktin, ein wichtiges Protein des Zytoskeletts [60]. Salmonellen beeinflussen das Aktingerüst aber auch über Veränderungen der Phosphoinositide, von denen der enge Kontakt zwischen Plasmamembran und Zytoskelett abhängt. Am Ort der Invasion von *Salmonella* wird die Phosphoinositolphosphatase aktiv, induziert eine Abnahme des Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphats und erreicht so eine Elastizitätszunahme der Plasmamembran, was das Eindringen des Erregers erleichtert [61]. Es gibt Hinweise, dass Effektoren von *Salmonella* auch mit Intermediärfilamenten wie Vimentin und Zytokeratin interagieren, jedoch bleiben hier noch viele Fragen unbeantwortet [57].

Befindet sich der Erreger in der Zelle, muss er Mechanismen vorweisen, um darin zu überleben. Einige können sich anpassen und überstehen das Milieu in den Phagolysosomen, andere lysieren ihre Vakuole und überleben im Zytoplasma der Wirtszelle und eine dritte Gruppe verändert die Vakuole nach ihren Bedürfnissen [62]. Letztere verhindern die Fusion mit bestimmten Kompartimenten und fördern die Verbindung mit anderen. In all diese Vorgänge ist das Aktinzytoskelett involviert und wird durch den Erreger verändert. Bei Salmonellen ist hierfür ein zweiter TTSS verantwortlich, dessen Effektoren *Salmonella*-induzierte Filamente (Sif) angrenzend an die Salmonellen-enthaltenden Vesikel induzieren [63]. In Makrophagen und Mausmodellen verloren Mutanten ohne Sif ihre Vesikelmembran, gelangten so ins Zytosol und ihre Zahl wurde vermindert [64, 65]. Dies deutet darauf hin, dass Salmonellen mittels Sif Mikrotubuli nutzen, um Membranvesikel zum Salmonellen-enthaltenden Vesikel zu transportieren. Ein weiterer Effekt des zweiten TTSS ist die Bildung eines Aktinnetzwerks rund um die Salmonellen-enthaltenden Vesikel. Unter Zugabe einer Aktin-depolarisierenden Substanz verloren die Erreger ihre Vesikelmembran [66]. Die Veränderung der Vesikelmembran, ihre Vergrößerung und ihre Fusion mit anderen Vesikeln, erfordert sowohl Mikrotubuli als auch Aktin [57]. Auch für Mykobakterien konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion des erregerehaltigen Vesikels mit dem Aktingerüst der Wirtszelle stattfindet, um ein Überleben in der Zelle zu gewährleisten [57]. Andere Bakterienspezies, die frei und ohne Vesikel im Zytoplasma vorkommen wie Listerien und Shigellen, nutzen das Zytoskelett für ihre Bewegungen in der Zelle und für die Ausbreitung in angrenzende

Zellen. Dabei aktiviert ein Komplex bestehend aus 7 Proteinen, der so genannte Arp2/3 Komplex, eine de novo Aktinpolymerisation [67].

Auch beim parazellulären Weg findet man eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts. Wie bereits beschrieben, ist es über ZO-1 und ZO-2 eng mit den tight junctions verbunden. Pathogene Erreger finden hier eine weitere Möglichkeit, um in die Integrität der Zellbarriere einzugreifen. Einige binden direkt an die Strukturen der Zellverbindungen und verändern sie, andere erzielen den Effekt durch Modellierung des Aktingerüsts, welches wiederum die tight junctions kontrolliert. Viele Bakterien, z.B. *Clostridium difficile*, produzieren ein Toxin, das Rho-GTPasen angreift, die für die Anordnung und Aufrechterhaltung der tight junctions sorgen [57]. Bei *E. coli* sind verschiedene Wege bekannt, die Dichte der zellulären Barriere über Manipulation des Zytoskeletts zu beeinflussen. Eine Abnahme des transepithelialen Widerstands korrelierte mit Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung, Ezrin-Phosphorylierung, Occludin-Dephosphorylierung und der Dissoziation von Occludin sowie ZO-1 von den tight junctions [57].

Insgesamt wird deutlich, dass das Zytoskelett der Wirtszelle eine große Bedeutung für Invasion und Transmigration besitzt und in Zukunft sicher noch viele neue Erkenntnisse gewonnen werden.

1.2.3 PATHOGENESE DER BAKTERIELLEN MENINGITIS

Die bakterielle Meningitis läuft nach einem bestimmten Muster ab (Abbildung 3) [68]. Klassischerweise beginnt die Infektion mit der Kolonisierung von Schleimhäuten im oberen Respirations- und Gastrointestinaltrakt. Gelingt den Bakterien der Durchbruch in die Blutbahn, kommt es zur Bakteriämie und Dissemination. Auf diese Weise gelangen die Erreger zur Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke, überwinden diese und besiedeln den Liquorraum. Hier kommt es zur bakteriellen Vermehrung und Freisetzung von proinflammatorischen und toxischen Substanzen, die wiederum die Entzündung des ZNS sowie die Komplikationen der bakteriellen Meningitis hervorrufen. Letztere sind hauptsächlich verursacht durch die inflammatorische Hirnschädigung. Auch eine direkte Infektion der Meningen ist möglich. Direkten Zugang erlangen die Bakterien bei knöchernem Durchbruch in die Schädelgrube über lokale Infektionen der Nasennebenhöhlen oder über die Mastoiditis. Durch einen Defekt der Dura und des Schädelknochens ist ebenfalls ein direktes Einwandern der Erreger möglich. Die Ursache kann wie bei der Meningomyelozele

oder dem Dermalsinus angeboren, aber auch durch ein Schädel-Hirn-Trauma oder eine Operation erworben sein.

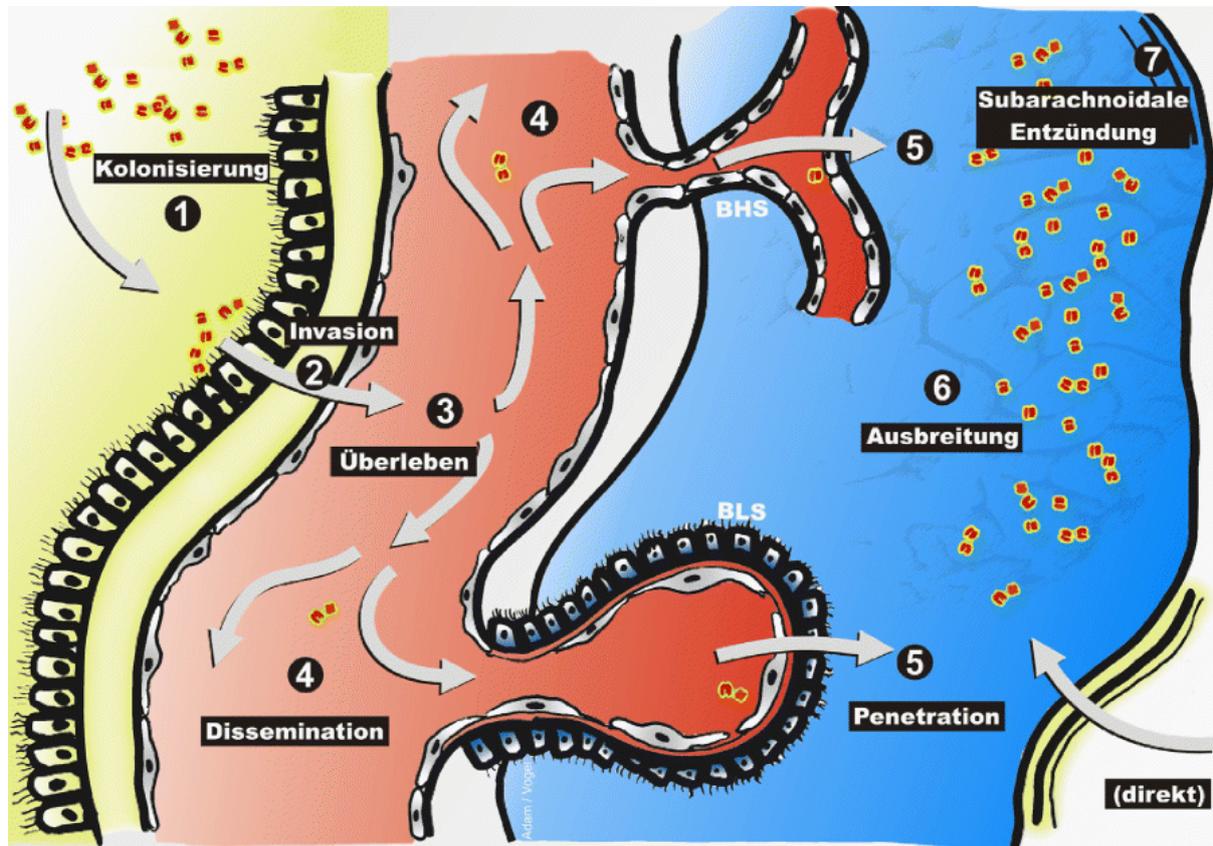


Abbildung 3: Pathogenese der bakteriellen Meningitis (Erläuterungen siehe Text)
 BHS = Blut-Hirn-Schranke, BLS = Blut-Liquor-Schranke.

Der erste Schritt der Pathogenese der Meningitis ist die Kolonisierung der Schleimhäute des Nasenrachenraums und des Darms. Bakterien überwinden die Epithelbarriere, die außer dem mechanischen Schutz noch über weitere Protektoren wie das sekretorische Immunglobulin A (IgA), Zilienschlag und Schleimsekretion verfügt, mittels IgA-Proteasen, Adhäsion, Toxinen und Tarnung mit wirtseigenen Oberflächenmolekülen wie Phosphorylcholin. Prädisponierend für die Invasion in die Blutbahn ist eine gestörte Integrität der Schleimhaut, welche meist durch eine witterungsbedingte Beeinträchtigung der Epithelbarriere hervorgerufen wird. Meningokokken überwinden die Schleimhautbarriere mittels von ihnen initiiertes „induzierter Transzytose“. Nach der Endozytose an der apikalen Membran werden die Erreger basolateral wieder ausgeschleust. Um diesen Vorgang zu ermöglichen wird die Expression der Kapsel herunterreguliert sowie die Gene für das Lipopolysaccharid, spezifische Membranproteine und Pili variabel exprimiert. Nach

Durchquerung der Zellen ist die erneute Expression dieser Schutzmechanismen sehr bedeutsam für das Überleben der Meningokokken in der Blutbahn [69]. Ebenfalls durch die Initiierung ihrer eigenen Transzytose gelingt Pneumokokken der Übertritt in die Blutbahn [38]. Im Gegensatz dazu invadiert *H. influenzae b* mittels parazellulärer Passage. Der Mechanismus, der hierbei zur Anwendung kommt, ist jedoch noch unklar [70]. In der Blutbahn schützen sich die Erreger vor der wirtseigenen Immunabwehr unter anderem durch eine bakterielle Polysaccharidkapsel, die protektiv gegenüber der Opsonophagozytose und der komplementmedierten Lyse wirkt. Grundsätzlich entwickelt sich eine bakterielle Meningitis erst, wenn die Virulenzfaktoren des Erregers die Abwehrmechanismen des Wirts übertreffen. Daher führt auch eine Abwehrschwäche beim Menschen zur Verbreitung bekapselter Bakterien mit folgender Bakteriämie. Die Infektion der Meningen ist abhängig von der bakteriellen Konzentration und der Dauer der Bakteriämie. Dies gilt für *E. coli K1*, Streptokokken der Gruppe B, *H. influenzae b* und Pneumokokken [43].

Der entscheidende Schritt bei der Entstehung der bakteriellen Meningitis ist die Überwindung der Schrankensysteme, die das ZNS vor äußeren Einflüssen schützen. Die genaue Eintrittspforte in das Liquorsystem ist noch weitgehend unbekannt und unterscheidet sich möglicherweise bei den verschiedenen Erregern. Die Blut-Hirn-Schranke bildet wie bereits beschrieben durch die mit tight junctions besonders abgedichtete Endothelzellschicht und die fehlende Fenestrierung eine Barriere für das Eindringen der Erreger. Ihre Permeabilität wird unter physiologischen Bedingungen mittels Umkleidung der Kapillaren durch die Endfüßchen der Astrozyten reguliert. In Tiermodellen zeigte sich, dass *E. coli* sowohl über das zerebrale Endothel in das Liquorsystem eindringt [71] als auch über den Plexus choroideus [72]. Ebenso wurde ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke für Pneumokokken gezeigt [8]. Das direkte Durchbrechen der Endothelbarriere erfordert die Adhäsion an die zerebrale Endothelzellschicht, ihre Penetration und schließlich die Durchwanderung von Basalmembran und perizytärer Scheide. Beim Durchqueren der Blut-Liquor-Schranke hingegen müssen die Pathogene zunächst am fenestrierten Plexusendothel oder an der extrazellulären Matrix adhären und anschließend die epitheliale Grenzschicht von der basalen Seite her durchwandern. Grenzflächen zwischen Liquor- und Blutsystem finden sich außer im Plexus choroideus auch in den so genannten zirkumventrikulären Organen (Neurohypophyse, Zirbeldrüse oder Subfornikalorgan). Eine Blut-Liquor-Schranke

befindet sich auch zwischen Arachnoidea und Dura, wobei die Plexusepithel- mit der Neurothelzellschicht korreliert.

Bei einem akut an einer Meningokokkensepsis gestorbenen Säugling konnte histopathologisch *Neisseria (N.) meningitidis* primär im Bereich des Plexus nachgewiesen werden [73]. Dies deutet daraufhin, dass die Blut-Liquor-Schranke als Eintrittsort für Meningokokken dienen könnte. Auch bei Schweinen konnte gezeigt werden, dass der Plexus für das primäre Eindringen von *S. suis* eine entscheidende Rolle spielt. Tiere, die erste Anzeichen einer Meningitis präsentierten und bei denen folglich noch nicht von einer massiven Ausbreitung der Bakterien auszugehen war, wiesen ausschließlich im Bereich der Plexusepithelien Streptokokken auf [36]. Ebenfalls als primäre Eintrittspforte konnte der Plexus choroideus in Primaten für *H. influenzae b* identifiziert werden [74]. Im Liquorraum selbst finden die Erreger ein Milieu mit optimalen Wachstums- und Vermehrungsbedingungen vor, sodass rasch hohe Bakterienkonzentrationen erreicht werden können. Ebenfalls begünstigend für die Ausbreitung der Pathogene wirkt eine unzureichende Immunabwehr mit geringen Konzentrationen an Komplement und Immunglobulinen sowie niedrige Leukozytenzahlen ($<5/\mu\text{l}$) [68]. Abwehrmechanismen im Liquorsystem sind intraventrikuläre Makrophagen (Epiplexus- oder Kolmerzellen), die zur Phagozytose der Bakterien fähig sind, Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle exprimieren und Granulozyten rekrutieren. Zusätzlich entziehen die Plexusepithelien dem Liquor Tryptophan und hemmen somit das Wachstum einiger Bakterien. Sie produzieren außerdem proinflammatorische Zytokine zur Rekrutierung immunkompetenter Zellen [75].

Ist im Liquor eine kritische bakterielle Konzentration erreicht oder ist eine Antibiotikatherapie begonnen worden, kommt es zur Freisetzung bakterieller Proteine wie Hüllstrukturen, Toxine und DNA. Dies hat wiederum zur Folge, dass Makrophagen, Mikroglia, Plexusepithelien, Ependymzellen, Endothelien oder Astrozyten mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6) beginnen [43, 69, 76]. Diese schädigen die Blut-Hirn-Schranke und es kommt zu einer erhöhten Permeabilität. Zusätzlich werden Selektine und später vor allem das Inter-Cellular Adhesion Molekül (ICAM)-1 heraufreguliert, was die Adhäsion von Granulozyten erleichtert [69]. Desweiteren werden die Leukozyten aktiviert und die entsprechenden Integrine wie der passende Ligand zu ICAM-1, das Makrophagenantigen MAC1, vermehrt produziert. Durch das Eindringen von

aktivierten Phagozyten und Granulozyten in Endothelien, Plexuszellen und Gliazellen und die Freisetzung der zytotoxischen Substanzen entsteht erst das Vollbild der meningealen Inflammation und als Folge die Hirnschädigung. Je nach Intensität und Dauer der inflammatorischen Phase kann es zum Hirnödem mit Hirndrucksteigerung kommen. Eine Hirnschädigung entsteht außerdem durch ischämische Läsionen aufgrund von Perfusionsstörungen.

1.3 FRAGESTELLUNG

In den vergangenen Jahren wurde die Überwindung der zellulären Barriere im Rahmen der Meningitis hauptsächlich an Zellen der Blut-Hirn-Schranke untersucht. Wie bereits erwähnt, ist die Pathogenese der Meningitis durch *S. suis* im Zusammenhang mit der Blut-Liquor-Schranke noch wenig erforscht. Daher liegt das Interesse nun besonders auf dieser Barriere, einem wichtigen Zugang für die Bakterien in den Subarachnoidalraum und somit ins ZNS.

Bisher konnte gezeigt werden, dass *S. suis* die Barrierefunktion und Integrität von porcinen choroidalen Plexusepithelzellen schädigt. Dafür kommen verschiedene Mechanismen in Frage, am bedeutendsten scheinen jedoch die Alteration der tight junctions und der Verlust der Zellintegrität zu sein.

Das bereits bestehende Modell basierend auf PCPEC wurde in der vorliegenden Arbeit moduliert, sodass die physiologischen Verhältnisse besser abgebildet werden konnten. Dazu dient die Umkehrkultur, anhand derer die polare Invasion von *S. suis* untersucht werden konnte.

Es stellt sich auch die Frage, welchen Einfluss die Virulenzfaktoren von *S. suis* auf die Plexusepithelzellen haben. Die vorliegende Arbeit geht insbesondere auf die Kapsel und das Toxin Suilysin ein.

Ein weiterer Bereich, der untersucht wurde, ist die Interaktion von *S. suis* mit dem Zytoskelett in Rahmen der Invasion.

Folgende Fragen wurden formuliert:

1. Ist die Polarität der Plexusepithelzellen entscheidend für die Invasion der *S. suis*? Welche Unterschiede ergeben sich aus dem Vergleich zwischen der Invasion im Standard Transwell System und der Umkehrkultur?
2. Welchen Einfluss haben die Virulenzfaktoren Kapsel und Suilysin auf die Invasion?
3. Welche Bedeutung hat das Zytoskelett für die Invasion? Welchen Einfluss haben hierbei der Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase-Inhibitor Ly294002 und Cytochalasin D?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN UND REAGENZIEN

2.1.1 PRIMÄRE PORCINE CHOROIDALE PLEXUSEPITHELZELLEN

Für alle Versuche wurden primäre porcine choroidale Plexusepithelzellen verwendet. Die Plexus wurden zweimal wöchentlich im Schlachthof Duisburg präpariert und die Epithelzellen im Infektiologielabor der Universitätskinderklinik Düsseldorf isoliert.

2.1.2 BAKTERIEN UND KULTURMEDIEN

Die Invasions- und Transmigrationsversuche erfolgten mit dem hochvirulenten *Streptococcus suis* MRP/EF/SLY/OFS-positiven Serotyp 2 Stamm 10 sowie dessen kapsellose Mutante Stamm 10 Δ cpsEF. Zusätzlich kamen die Stämme 9657573 und SX 332 mit ihren Suilysin-defizienten Mutanten zum Einsatz (Tabelle 1). *S. suis* Stamm 10 wurde aus einem an Meningitis erkrankten Schwein isoliert. Alle Bakterien wurden in Form von Arbeitsaliquots in Todd-Hewitt broth (THB) mit 20%iger Glycerinlösung bei -80 °C aufbewahrt.

<i>S. suis</i> Wildtyp Stamm 10
<i>S. suis</i> Stamm 10 Δ cps EF
<i>S. suis</i> Wildtyp Stamm 9657573
<i>S. suis</i> Δ suilysin Stamm SX 917
<i>S. suis</i> Wildtyp Stamm SX 332
<i>S. suis</i> Δ suilysin Stamm SX 932

Tabelle 1: verwendete Stämme von *S. suis*

2.1.3 ZELLKULTURMATERIAL UND INKUBATIONSMEDIEN

Material	Hersteller
12 well-Platten, Tissue Culture Treated	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
24 well-Platten, Tissue Culture Treated	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Cell Culture Inserts 3,0 µm Porengröße HD, 0,33 cm ² , PET, 24 well-Format	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Instrumentenschalen mit Deckel aus Edelstahl 28x16x6 cm	Welabo, Düsseldorf
Sterilfilter Porengröße 0,2 µm	Welabo, Düsseldorf
Zentrifugenröhrchen, 8 ml	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	BD Bioscience, Falcon, Heidelberg

Tabelle 2: Zellkulturmaterialien

Folgende Inkubationsmedien wurden verwendet:

Medium	Hersteller
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) ohne und mit Phenolrot DMEM/F12 (+HEPES,+ Pyridoxine)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) ohne Ca/Mg (HBSS \ominus)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
HBSS mit Ca/Mg	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure (HEPES), 1mM	BioWhittaker, Apen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf

Tabelle 3: Inkubationsmedien

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

Gebrauchslösungen	Herstellung
Serumhaltiges Selektionsmedium mit Ara-C (SHM/AB/Ara-C)	500 ml DMEM/F12 + L-Glutamin, 4 mM + Penicillin/Streptomycin (100 U P + 100 µg S/ml) + Insulin, 5 mg/ml + Ara-C, 20 µM (5 ml 1%ige Stocklösung) + FCS, 10 %, hitzeinaktiviert
Serumhaltiges Medium (SHM/AB)	500 ml DMEM/F12 + L-Glutamin, 4 mM + Penicillin/Streptomycin (100 U P + 100 µg S/ml) + Insulin, 5 mg/ml + FCS, 10 %, hitzeinaktiviert
Serumfreies Medium mit Antibiotika (SFM/AB)	500 ml DMEM/F12 + L-Glutamin, 4 mM + Penicillin/Streptomycin (100 U P + 100 µg S/ml) + Insulin, 5 mg/ml
Serumfreies Medium ohne Antibiotika (SFM)	500 ml DMEM/F12 + L-Glutamin, 4 mM + Insulin, 5 mg/ml
HBSS/HEPES/AB	500 ml HBSS + 10 ml HEPES + 12 ml Penicillin/Streptomycin
HBSSØ/HEPES/AB	500 ml HBSSØ + 10 ml HEPES + 12 ml Penicillin/Streptomycin

Tabelle 4: Gebrauchslösungen Zellkultur

2.1.4 PHARMAKA UND AGENZIEN

Produkt	Hersteller
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA) Solution 35 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytosinarabinosid (Ara-C)	Cell Pharm GmbH, Hannover
Ethanol 70 %	Apotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf
Foetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Biochrom KG seromed, Berlin
Formalin 4 %	Apotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf
Insulin, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Laminin, Maus, 1 mg	R&D Systems, USA
L-Glutamin, 200 mM	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin, 50x	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
ProLongAntifadeReagent	Invitrogen, Paisley, UK
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsinlösung (0,2 %)	Belger Biochemie, Kleinmachnow

Tabelle 5: Pharmaka und Agenzien

2.1.5 FLUORESCENZFARBSTOFFE, ANTIKÖRPER UND INHIBITOREN

Produkt	Hersteller
4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) Stocklösung (5 mg/ml)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Alexa Fluor® 488 Huhn-anti-Kaninchen (grün)	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa Fluor® 594 Huhn-anti-Kaninchen (rot)	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 Esel-anti-Ziege (grün)	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa Fluor® 594 Esel-anti-Ziege (rot)	Molecular Probes, Karlsruhe
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ziege-anti- <i>S. suis</i> -Antiserum	eigene Herstellung
Ly294002	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Phalloidin Alexa Fluor® 660	Invitrogen, Paisley, UK
Kaninchen-anti- <i>S. suis</i> -Antiserum	eigene Herstellung

Tabelle 6: Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper und Inhibitoren

Folgende Gebrauchslösungen wurden vor der Doppelimmunfluoreszenzfärbung frisch angesetzt:

Gebrauchslösungen	Herstellung
PBS/1 % BSA	1,4 ml BSA ad 50 ml PBS
Serumfreies Medium ohne Antibiotika (SFM)	500 ml DMEM/F12 + L-Glutamin, 4 mM + Insulin, 5 mg/ml
SFM/1 % BSA	1,4 ml BSA ad 50 ml PBS
10 % Triton X 100	5 g Triton X 100 ad 50 ml PBS
PBS/0,5 % Triton/1 % BSA	1,4 ml BSA 2,5 ml 10 % Triton X 100 ad 50 ml PBS

Tabelle 7: Gebrauchslösungen Doppelimmunfluoreszenz

2.1.6 INSTRUMENTE UND GERÄTE

CO ₂ -Brutschrank Hera cell 240	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Epithelgewebe-Voltometer (EVOM)	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Mikroskop AxioObserver Z1 + Kamera + ApoTome Axiovision Software	Carl Zeiss, Göttingen
Photometer UV-Mini-1240 230V CE/LV Marking	Shimadzu, Duisburg
Sicherheitswerkbank KSP 12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
STX-2 Elektrode	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Transmissionselektronenmikroskop: Tecnai G2 Spirit Twin	Fei company, Eindhoven, Niederlande
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen: - Rotixa 120 RS - Rotanta 460 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tabelle 8: Instrumente und Geräte

2.2 PRÄPARATION DER EPITHELZELLEN DES PLEXUS CHOROIDEUS AUS DEM SCHWEINEHIRN

Die Präparation und Isolation der Epithelzellen erfolgte nach dem modifizierten Verfahren entsprechend Gath et al. [77], Crook et al. [78] sowie Haselbach et al. [4].

2.2.1 PRÄPARATION DES PRIMÄRMATERIALS

Im Schlachthof wurden gut durchblutete Plexusstränge mit einer sterilen Pinzette aus den Hirnhälften von frisch geschlachteten Schweinen präpariert. Dabei wurde der meist schon sichtbare Plexus choroideus mit der Pinzette aus dem lateralen und vierten Ventrikel herausgezogen und sofort in ein steriles Einmalgefäß mit 50 ml HBSS/HEPES/AB überführt. Für einen Versuch benötigte man ca. 10 Stränge. Vor dem Transport in das Labor wurden die Stränge mit einer neuen, sterilen Pinzette in das Transportgefäß mit 50 ml SFM/AB überführt.

2.2.2 ZELLPRÄPARATION

Im Labor erfolgte die Zellpräparation unter sterilen Bedingungen. Die Plexusstränge wurden in eine sterile Petrischale überführt, die mit frischem HBSS θ /HEPES/AB

gefüllt war. Damit die Plexusstränge ausbluten konnten, wurden die Stränge einzeln am dünneren Ende mit einer sterilen Pinzette gefasst und am dickeren Ende ca. 0,5 cm des Plexus mit einer sterilen Präparierschere abgeschnitten. Anschließend wurde der Plexusstrang mit dem gekürzten Ende über die Kante der Petrischale gezogen, sodass das Blut aus den Kapillaren herauslief. Der gewaschene Strang wurde in eine neue Petrischale mit HBSS Θ /HEPES/AB gegeben. Dieser Vorgang wurde mit jedem Strang dreimal wiederholt. War der letzte Waschvorgang beendet, wurden die Plexusstränge aus der Flüssigkeit in eine leere sterile Petrischale überführt und herauslaufende Restflüssigkeit abpipettiert. Nun wurde das Nassgewicht der gezählten Plexusstränge bestimmt. Die Lösung der Plexusepithelzellen von den Plexussträngen erfolgte durch einen enzymatischen Verdau mit Trypsin. Dafür wurde eine 0,2%ige Trypsinlösung in HBSS Θ hergestellt. Pro 1 g Nassgewicht benötigte man 20 ml Trypsinlösung. Diese Suspension wurde für 45 Minuten bei 4 °C inkubiert, wodurch ein gleichmäßiges Durchdringen des Gewebes mit der Enzymlösung erzielt wurde. Der anschließende enzymatische Verdau fand über 20 Minuten bei 37 °C und leichtem automatischen Schwenken im Wasserbad statt. Zwischendurch wurden die Plexusstränge kräftig von Hand geschwenkt, um die Ablösung der Epithelzellen vom darunter liegenden Stroma zu erleichtern. Der Verdau wurde durch die Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) im gleichen Volumen wie die Trypsinlösung gestoppt. Nach nochmaligem Waschen der jetzt deutlich ausgedünnten Gewebestränge zum Lösen noch anhaftender Epithelzellen wurden die Stromareste mit einer sterilen Pinzette entfernt. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. In serumhaltigem Medium (26,3 ml pro 1 g Plexusgewebe), dem zur Unterdrückung des Wachstums von kontaminierenden Fibroblasten-ähnlichen Zellen 20 μ M Ara-C zugegeben wurde, erfolgte anschließend eine vorsichtige Resuspension, sodass die meisten Zellen in Verbänden von ca. 10-20 Zellen vorlagen. Für die vitale Aussaat war es wichtig, dass die Zellen in Clustern verblieben.

Für die Umkehrkultur musste die Zellsuspension dreifach konzentriert werden. Dazu wurden ca. 12 ml Zellsuspension 10 Minuten lang bei 300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und in 4 ml SHM/AB/Ara-C vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Aussaat auf den Filtersystemen.

2.3 DIE UMKEHRKULTUR DER EPITHELZELLEN

Mit dem Standard Transwell System ist es möglich die Invasion und Transmigration von Bakterien in PCPEC zu untersuchen. Während der Kultivierung differenzieren sich die Zellen so, dass die *in vivo* dem Blut zugewandte Seite basolateral und die vom Liquor umspülte Seite apikal liegt. Bei einem Infektionsversuch werden die Bakterien in das apikale Filterkompartiment gegeben und transmigrieren durch die einzellige Epithelzellschicht in das basolaterale Kompartiment. Werden die Vorgänge im Standard Transwell System auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen, so würden Bakterien aus dem Liquor über die Blut-Liquor-Schranke in die Blutbahn gelangen. Bei einer Infektion der Meningen verhält es sich jedoch wie in der Einleitung beschrieben gegensätzlich: Die im Blut disseminierten Bakterien überwinden die Blut-Liquor-Schranke, erreichen so den Liquor und verursachen eine Meningitis. Um diese Verhältnisse *in vitro* besser abbilden zu können, wurde das Standard Transwell System modifiziert und als Umkehrkultur etabliert. Nachdem die PCPEC soweit ausdifferenziert waren, dass sie die Eigenschaften der apikalen und basolateralen Zellseite ausgebildet hatten, wurden die Filter gedreht. Nun wies die basolaterale Zellseite nach oben und die apikale Seite nach unten. Wie in der folgenden Abbildung erkenntlich, war es nun bei Zugabe von Bakterien ins apikale Filterkompartiment möglich, die Invasion und Transmigration von der Blut- auf die Liquorseite zu untersuchen (Abbildung 4)

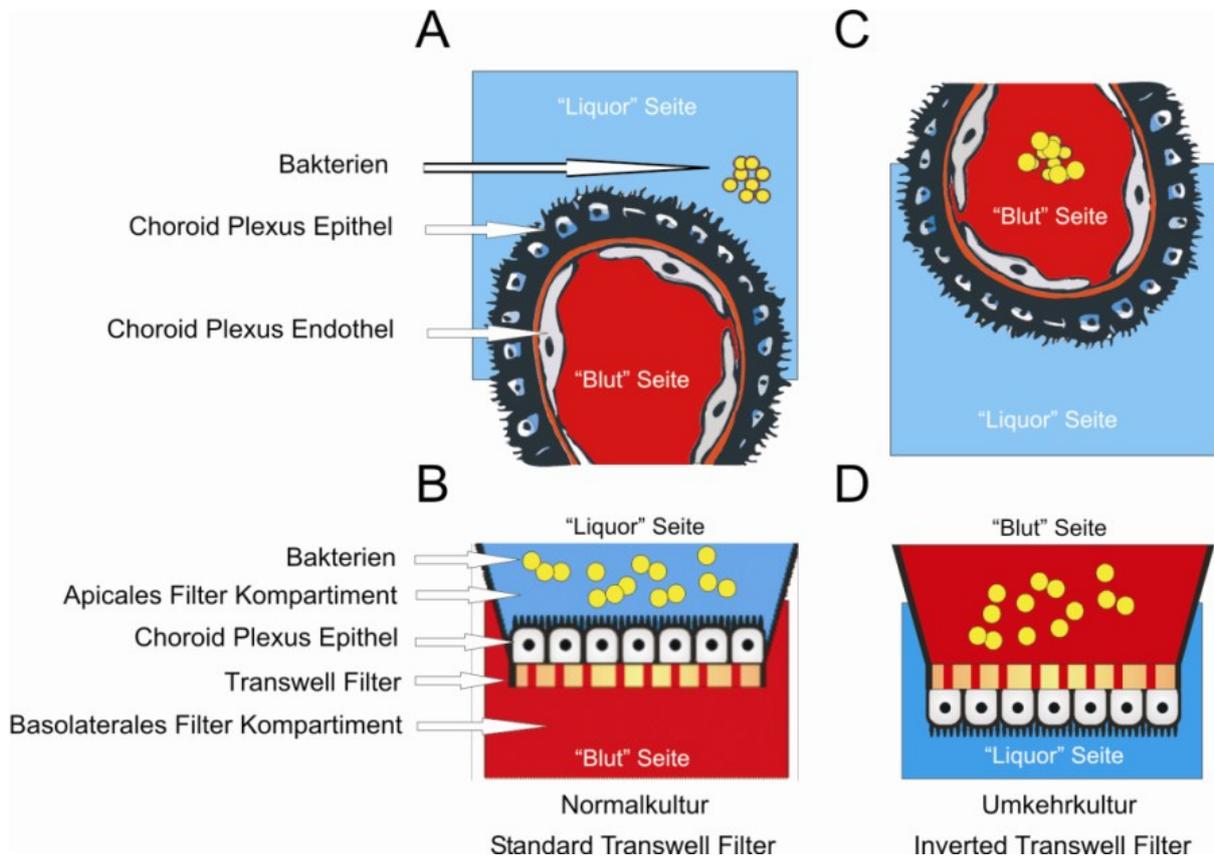


Abbildung 4: Entwicklung der Umkehrkultur als Modell der Blut-Liquor-Schranke.
 Im Standard Transwell System kann die direkte bakterielle Interaktion mit den Plexusepithelzellen nur an der apikalen Zellmembran (Liquorseite) untersucht werden. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Umkehrkultur eine Untersuchung der bakteriellen Interaktionen mit der basolateralen Zellmembran (Blutseite).

2.3.1 AUSSAAT

Sowohl im Standard Transwell System als auch bei der Umkehrkultur wurde am Tag vor der Aussaat jeder Filter mit Laminin beschichtet. Bei der Umkehrkultur wurde je ein 24-well-Filterbecher über Kopf mit der Filterseite nach oben in ein well einer 12-well-Platte gestellt, im Standard Transwell System wurden die 12-well-Filterbecher wie vorgesehen in 12-well-Platten eingesetzt. Die Platten befanden sich alle in einer sterilen Box. Die nun jeweils nach oben zeigende Filterseite wurde mit Laminin beschichtet. Dazu wurde eine wässrige Lamininlösung der Konzentration 50 µg/ml hergestellt, wovon auf jeden Filter 35 µl gegeben wurden. Um ein gleichmäßiges Benetzen zu erreichen, wurde der Tropfen mit einer 5 ml Pipette auf der Filterseite verteilt. Die Filter verblieben in der geschlossenen Box bei Raumtemperatur zur Inkubation und Trocknung unter der Sterilbank.

Direkt vor dem Auftragen der Zellsuspension wurde bei der Umkehrkultur jedes well soweit mit SHM/AB/Ara-C gefüllt, dass die Filtermembran von unten mit Medium

benetzt wurde. Um ein Überlaufen des nun überfüllten wells zu vermeiden, wurden anschließend ca. 1,5 ml Medium wieder entfernt und die am Vortag mit Laminin beschichtete Oberfläche mit Medium benetzt.

Auf jeden der auf diese Weise vorbereiteten Filter wurden 100 µl der 3-fach-konzentrierten Zellsuspension pipettiert, sodass sich diese auf der lamininbeschichteten Seite möglichst gleichmäßig verteilte.

Beim Standard Transwell System war ein Vorfüllen der Filter nicht notwendig. Auf die mit Laminin inkubierte Oberfläche wurden 300 µl der Zellsuspension pipettiert und in das basolaterale Filterkompartiment 1 ml Medium eingefüllt.

Die 300 µl Zellsuspension und entsprechend die 100 µl der 3-fach-konzentrierten Zellsuspension auf den jeweiligen Filtern entsprach einer Aussaatdichte von 60 cm² Wachstumsfläche pro Gramm Plexusgewebe (Nassgewicht).

2.3.2 KULTIVIERUNG

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Einen Tag nach der Aussaat wurden die Filter mit SHM/AB/Ara-C gewaschen, um Erythrozyten und nicht anhaftende Epithelzellen zu entfernen. Bei der Umkehrkultur wurde dafür je Filter ca. 1 ml SHM/AB/Ara-C auf die nach oben weisende Filterseite pipettiert.

Beim Standard Transwell System wurde das alte Medium abpipettiert, die Filter einmal mit Medium gewaschen (0,3 ml im apikalen, 1 ml im basolateralen Filterkompartiment) und anschließend in frischem Medium weiter kultiviert (0,3 ml im apikalen, 1 ml im basolateralen Filterkompartiment).

Am dritten Tag wurden die Filter der Umkehrkultur gedreht und in 24-well-Platten mit frischem Medium weiterkultiviert. Das basolaterale Filterkompartiment wurde mit 1 ml und das apikale Filterkompartiment mit 500 µl SHM/AB/Ara-C gefüllt. Von nun an erfolgte der Wechsel des Mediums sowohl beim Standard Transwell System als auch bei der Umkehrkultur alle 2 Tage.

Nach 7 Tagen war meist der Zeitpunkt der vollständigen Konfluenz erreicht und die Zellen konnten zur Ausdifferenzierung auf serumfreies Medium umgestellt werden. Dies hatte zur Folge, dass sich die Polarität der Plexusepithelzellen deutlicher ausbildete und verbesserte [79]. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die PCPEC eine Aussaatdichte von ca. 1x10⁵ Zellen/cm² auf, die mittels Immunfluoreszenz durch Färbung der Zellkerne mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) ermittelt wurde. Es fanden 2 Mediumwechsel mit SFM ohne Antibiotika statt, wobei der erste Wechsel

dem Waschen diene. Die weiteren Wechsel des Mediums wiederholten sich erneut alle 1-2 Tage. Für die Versuche konnten die Zellen am dritten bis fünften Tag nach Umstellung verwendet werden, wenn der gemessene transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) $300 \Omega\text{cm}^2$ überstieg. Der letzte Mediumwechsel fand am Vortag des Versuches statt. Dabei wurden die für den Versuch benötigten Volumina an Medium apikal und basolateral vorgelegt.

2.4 BARRIEREFUNKTIONSUNTERSUCHUNG

Änderungen des TEER entsprechen Variationen der tight junction-Integrität [80]. Gleichzeitig zeigen sie wahrscheinlich auch Veränderungen in der Permeabilität einer zellulären Membran [81]. Die Messung des TEER ist somit ein geeignetes Werkzeug, um die Dichte einer Zellschicht zu erfassen.

2.4.1 DER TRANSEPITHELIALE ELEKTRISCHE WIDERSTAND (TEER)

Der TEER wurde mit einem Epithelgewebe-Voltmeter (EVOM) gemessen. Nach gründlicher Desinfektion in 70%igem Ethanol wurde das EVOM so für die Messung platziert, dass sich je eine Elektrode im apikalen und eine im basolateralen Filterkompartiment befand. Die Elektrodenspitzen tauchten in das Medium ein, berührten den Boden des Wells jedoch nicht. Die gemessenen Werte wurden notiert und anschließend der Widerstand, der dem Leerwert des Filters im Medium entspricht, subtrahiert. Diese Messungen erfolgten mittels eines STX-2-Elektrodensystems während der Kultivierung zur Überprüfung von Wachstum und Konfluenz der Zellschicht. Außerdem kamen sie zu Beginn, während und am Ende der Versuche zum Einsatz. Als negative Kontrollwerte wurden dabei die Widerstandswerte an den Filtern ermittelt, in denen sich nur die PCPEC im Medium befanden. Sie blieben während aller Versuche über $300 \Omega\text{cm}^2$.

2.5 VORBEREITUNGEN DER VERSUCHE UND BAKTERIENINKUBATION

Am Vortag des Versuches fand der letzte Mediumwechsel statt. Dabei wurden apikal $450 \mu\text{l}$ und basolateral $1000 \mu\text{l}$ Medium vorgelegt. Vor Versuchsbeginn wurde der TEER gemessen.

Für die Versuche wurden die bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrten Arbeitsaliquots mit *S. suis* in THB-Flüssigmedium kultiviert. Zu 10 ml THB wurden $50 \mu\text{l}$ aufgetaute Bakteriensuspension pipettiert und im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 6-8 Stunden

inkubiert, bis die mittlere log-Phase erreicht war. Bei den Sulisysin-defizienten Mutanten wurden zusätzlich 10 µl des Antibiotikums Spectinomycin zugesetzt. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 Minuten bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml SFM gewaschen. Nach weiterem zehnmütigem Zentrifugieren bei 3500 rpm und 4 °C wurde der Überstand erneut dekantiert und das Bakteriensediment in 1 ml SFM resuspendiert. Die Einstellung der Bakterienkonzentration erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Zu 2 ml SFM in der Küvette wurde solange Bakteriensuspension zugegeben bis eine optische Dichte von 0,65 erreicht war. Dies entsprach einer durchschnittlichen Bakterienkonzentration von 1×10^8 Bakterien/ml. Für die gewünschte Multiplicity of infection (MOI) 10, die bei allen Infektionsversuchen zur Anwendung kam, wurde die eingestellte Bakteriensuspension mit SFM 1:10 auf 1×10^7 Bakterien/ml verdünnt.

Die Infektion der Zellen erfolgte im apikalen Filterkompartiment mit 50 µl Bakteriensuspension der Konzentration 1×10^7 Bakterien/ml entsprechend einer MOI von 10. Zur Kontrolle der Bakterienkonzentration wurden je 3x10 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen auf Schafsblutagarplatten ausplattiert.

Parallel zur Infektion der Zellen wurden zur Wachstumskontrolle der Bakterien 4 wells einer 24-well-Platte mit 450 µl SFM und 50 µl Bakteriensuspension gefüllt und in den Brutschrank gestellt (37 °C, 5% CO₂). Die Ausplattierung von je 3x10 µl der Verdünnungsstufen erfolgte nach 2 bzw. 4 Stunden.

Für die UV-Inaktivierung wurde eine UV-Lampe mit 254 nm Wellenlänge verwendet. Unter der sterilen Werkbank wurden Petrischalen mit jeweils 5 ml der Keimsuspension gefüllt und in einem Abstand von 15 cm zwischen der UV-Lampenoberfläche und dem Petrischalenboden aufgestellt. Während der 20-minütigen Bestrahlung wurden in einem zeitlichen Abstand von 5 min die Petrischalen geschwenkt, um eine gleichmäßige Bestrahlung der Keimsuspension zu erhalten. Nach der Bestrahlung wurde der Inhalt der Petrischalen in einen 50 ml Falcon gefüllt und gevortext. Die UV-inaktivierte Keimsuspension (20 ml) wurde in einer Menge von jeweils 100 µl bzw. 200 µl in sterile Eppendorf-Tube gefüllt und zur Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -80 °C eingefroren.

Bei den Versuchen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002 sowie Cytochalasin D wurden die Zellen 2 Stunden vor der Infektion apikal mit 5 µl der jeweiligen Substanz

und basal mit 10 µl inkubiert. Dabei wurde für Ly294002 eine Konzentration von 1 µM und für Cytochalasin D 1 mg/ml verwendet.

2.6 INVASIONSUNTERSUCHUNG

2.6.1 FÄRBUNG DER INTRA- UND EXTRAZELLULÄREN BAKTERIEN

Die Färbung von intra- und extrazellulären Bakterien erfolgte nach dem modifizierten Verfahren nach Benga et al. [82]. In jedem Versuch wurden die Werte in dreifacher Ausführung getestet und jeder Versuchsansatz wurde mindestens viermal wiederholt. 2 und 4 Stunden nach der Infektion wurde die Inkubation mit den Bakterien und je nach Versuch mit Ly294002 oder Cytochalasin D durch dreimaliges Waschen mit 4 °C kaltem SFM/1 % BSA, dem so genannten blocking buffer, beendet. Dabei befanden sich 500 µl Puffer im apikalen und 1000 µl im basolateralen Kompartiment. Anschließend wurde 20 Minuten bei 4 °C mit SFM/1 % BSA geblockt, um unspezifische freie Bindungsstellen abzusättigen.

Der erste Schritt der Färbung der extrazellulär gebundenen Bakterien erfolgte mit dem Antiserum gegen *S. suis* von der Ziege, das vor der Inkubation 1:100 mit SFM/1 % BSA verdünnt und steril filtriert wurde. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten und fand bei 4 °C statt. Nach zweimaligem Waschen mit 4 °C kaltem SFM/1 % BSA und einem Waschvorgang mit 4 °C kaltem SFM wurden die Zellen in 4 % Formalin 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS/1 % BSA gewaschen, je 1000 µl im apikalen und 1500 µl im basolateralen Filterkompartiment. Jetzt konnte die Filtermembran mit einem spitzen Skalpell ausgeschnitten werden. Mit der Zellseite nach unten wurden die Membranen in je ein well der 24-well-Platte überführt und die wells mit 500 µl PBS/1 % BSA gefüllt. Dabei war darauf zu achten, dass die Membranen nicht am Boden des wells hafteten, sondern frei in der Flüssigkeit schwammen. Es folgten 3 Waschvorgänge mit PBS/1 % BSA bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten zwischen jedem Vorgang. Jeder weitere Waschvorgang im Folgenden wurde so ausgeführt, wie hier beschrieben. Danach konnten die Filter bis zur weiteren Färbung bei 4 °C aufbewahrt werden.

Im zweiten Schritt der Färbung der extrazellulären Streptokokken wurden die Zellen auf den Filtermembranen mit dem Zweitantikörper donkey-anti-goat Alexa Fluor 594 (rot) für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem dunklen Raum inkubiert. Der Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung mit PBS/1 % BSA von 1:500 eingesetzt.

Von jetzt an war darauf zu achten, dass die Filter möglichst dunkel standen, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen begann die Permeabilisation der fixierten Epithelzellen mit PBS/0,5 % Triton/1 % BSA für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgten weitere 3 Waschvorgänge, an die sich die Färbung der extra- und intrazellulären Bakterien anschloss. Dafür benötigte man im Verhältnis 1:100 in PBS/1 % BSA verdünntes Antiserum gegen *S. suis* vom Kaninchen. Die Inkubation fand 30 Minuten lang bei Raumtemperatur statt. Auf das dreimalige Waschen folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper chicken-anti-rabbit Alexa Fluor 488 (grün) 1:500 in PBS/1 % BSA verdünnt über 20 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur. Gleichzeitig wurden die Zellkerne der Plexusepithelzellen mit im Verhältnis 1:20'000 verdünntem DAPI gefärbt. Nach 3 Waschvorgängen wurden die Zellen mit 5 µl Phalloidin Alexa Fluor 660 in 300 µl PBS/1 % BSA pro Filter 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Phalloidin bindet an Aktin und erlaubt somit bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop das Erkennen des Zytoskeletts der Zellen.

Abschließend wurden die Filter dreimal gewaschen und die auf Objektträgern mit ProLongAntifadeReagent mit der Zellseite nach oben fixiert.

2.6.2 MESSUNG DER ADHÄSION UND INVASION MITTELS DOPPELIMMUNFLUORESZENZ

Die Aufnahmen am Mikroskop wurden mit einem Apotom und der Axiovision Software von Carl Zeiss, Jena, Deutschland angefertigt, wobei ein 63x/1,4 Objektiv verwendet wurde. Auf diese Weise konnten optische Schnitte der fluoreszierenden Proben erstellt werden. Die Apotombilder zeigten eine Aufsicht auf den Monolayer in der xy-Ebene und eine Projektion mit maximaler Intensität entlang der z-Achse. Solche Stapel konnten auch in der xz- und yz-Ebene erstellt werden. Die Erfassung der Bilder erfolgte mit der Scan-Software Axiovision 4.6 und dem Axiovision Modul Inside 4D von der Firma Zeiss.

Die invadierten Bakterien wurden in vordefinierten Feldern gezählt, wobei pro Filter 10 Felder ausgezählt wurden. Der Prozentsatz der invadierten Bakterien wurde wie folgt berechnet: Die durchschnittliche Anzahl der invadierten Bakterien in den 10 Feldern wurde mit einem Flächenkoeffizienten multipliziert. Das Ergebnis war die Gesamtanzahl der Bakterien auf einem 0,33 cm² großen Transwell-Filter. Diese Zahl wiederum wurde durch die Anzahl der Bakterien geteilt, die während des Versuchs

im Medium nach 2 bzw. 4 Stunden gewachsen waren. Somit wurde das Ergebnis als Invasion in Prozent angegeben.

2.7 UNTERSUCHUNG ZUM INTRAZELLULÄREN ÜBERLEBEN VON *S. SUIIS* IN PCPEC

2.7.1 ABLAUF UND AUSWERTUNG

Der Versuchsaufbau beinhaltete 4 verschiedene Konstellationen, die für die Bakterien *S. suis* Wildtyp Stamm 9657573 und seine Suilysin-defiziente Mutante *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 917 ausgeführt wurden. Je 3 Filter pro Erreger wurden 2 bzw. 4 Stunden mit den jeweiligen Bakterien inkubiert und anschließend wie bei der Invasionsuntersuchung gefärbt. Bei je 6 weiteren Filtern wurde nach zweistündiger Inkubation mit *S. suis* das erregerhaltige Medium aus beiden Kompartimenten entfernt. Die Filter wurden mit SFM/AB gewaschen und mit frischem SFM/AB für 2 bzw. 4 weitere Stunden in den Brutschrank gestellt. Somit wurden die Erreger, die in das apikale Filterkompartiment bei Versuchsbeginn zugegeben wurden, ebenso wie möglicherweise transmigierte Bakterien entfernt. Auf diese Weise wurde eine weitere Invasion nach den erwünschten 2 Stunden vermieden. Nach der entsprechenden Zeit im Brutschrank im antibiotikahaltigen Medium wurden die Filter dreimal mit SFM/1 % BSA gewaschen und anschließend der Färbung der intra- und extrazellulären Bakterien zugeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde zur Kontrolle das Medium aus dem apikalen und aus dem basolateralen Filterkompartiment auf Schafsblutagarplatten ausplattiert. Die Proben, die nach dem Waschen auf den Agarplatten bebrütet wurden, zeigten in allen Versuchen kein Bakterienwachstum. Die Auswertung der Versuche erfolgte wie bei den Invasionsuntersuchungen am Mikroskop mit Hilfe des Apotoms und der Axiovision Software.

2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwerts oder Standardabweichung angeben. Die Ergebnisse wurden einem Student's t-Test unterzogen. Das Signifikanzniveau wurde bei $P < 0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei jeder Wert durch dreifache Ausführung pro Versuch ermittelt wurde.

3 ERGEBNISSE

3.1 ÜBERSICHT

Alle Experimente in dieser Dissertation dienten der Untersuchung der Interaktion von verschiedenen *S. suis*-Stämmen mit PCPEC. Dies erfolgte zum einen im Standard Transwell System, bei dem die Applikation der Bakterien auf der apikalen Seite des Monolayers entsprechend der Liquorseite *in vivo* erfolgte. Dabei zeigte sich eine verminderte Adhäsionsrate für kapseltragende *S. suis* im Vergleich zur kapsellosen Mutante. Insgesamt blieb die Invasionsrate jedoch deutlich unter der in der Umkehrkultur. In der Doppelimmunfluoreszenz zeigte sich, dass die Bakterien bevorzugt in Clustern adhärirten. Das Modell der Umkehrkultur bildet das pathophysiologische Vorbild des Plexus choroideus besser ab, indem eine Applikation der Bakterien von der basolateralen Seite, also der Blutseite, aus möglich ist. Hier konnte die Annahme, dass die Kapsel bei der Invasion hinderlich ist, bestätigt werden.

Die Rolle der Kapsel bei der Invasion wurde anschließend noch genauer untersucht. Es zeigte sich, dass kapsellose Mutanten verstärkt in PCPEC invadieren können. Dabei war stets ein intakter Monolayer während der gesamten Versuche gegeben, was anhand der TEER ermittelt wurde.

Ein weiterer Virulenzfaktor, der in Bezug auf seinen Einfluss auf die Invasion von *S. suis* in PCPEC analysiert wurde, war das Suilysin. Stämme, die fähig sind, Suilysin zu produzieren, wiesen eine geringere Invasionsrate auf, als ihre entsprechenden Mutanten, die dazu nicht in der Lage waren. Genau dieselben Suilysin-defizienten Stämme zeigten in weiteren Versuchen ein intrazelluläres Überleben.

Ein dritter Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung der Interaktionen von *S. suis* mit dem Aktinzytoskelett bei der Invasion. Die Beeinflussung des Zytoskeletts bzw. der PI 3-Kinase-Signalkaskade durch den PI 3-Kinaseinhibitor Ly294002 und Cytochalasin D hatte zur Folge, dass die Invasionsraten im Vergleich zu unbehandelten PCPEC deutlich vermindert waren. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien das Zytoskelett nutzen, um die epithelialen Barrieren zu überwinden.

3.2 *S. suis* INVASION IM STANDARD TRANSWELL SYSTEM UND IN DER UMKEHRKULTUR

Bisher musste für Untersuchungen bezüglich der Überwindung der Blut-Liquor-Schranke durch Bakterien ein *in vitro*-Modell verwendet werden, das nur in Ansätzen den pathophysiologischen Bedingungen entsprach. Beim Standard Transwell System entspricht das apikale Filterkompartiment der Liquorseite *in vivo*. Analog dazu repräsentiert die Seite des Monolayers, die direkt der Filtermembran aufliegt, die basolaterale Seite der Plexusepithelzellen. Bei Infektionsversuchen zur Untersuchung von Adhäsion, Invasion und Transmigration gelangten die Bakterien somit von der Liquorseite auf die Blutseite. Aus bisherigen Studien zur Pathogenese der bakteriellen Meningitis ist bekannt, dass ein möglicher Weg, der die Ausbreitung der Erreger im ZNS zur Folge hat, über die Blut-Liquor-Schranke führt. Mit dem entwickelten *in vitro*-Modell der Umkehrkultur ist es nun möglich diesen Weg annähernd pathophysiologisch zu untersuchen. 3 Tage nach der Aussaat sind die Zellen soweit ausdifferenziert, dass sie ihre Polarität auch nach dem Drehen der Filter beibehalten. Auf diese Weise entspricht die Applikation der Bakterien in das obere Filterkompartiment dem Vorhandensein der Erreger im Blut.

Die Umkehrkultur ergab im Vergleich mit der bisherigen Standard Transwell Kultur diverse Unterschiede.

3.2.1 UNTERSCHIEDE IN BEZUG AUF DEN TEER

Nach Umstellung auf das serumfreie Medium am siebten Tag nach Aussaat konnte in der Umkehrkultur ein deutlicher Anstieg des TEER gemessen werden, der den Widerstand, der im Standard Transwell System erreicht wurde, deutlich übertraf (mittlerer TEER im Standard Transwell System $165 \pm 59 \Omega \text{cm}^2$, $n=35$; mittlerer TEER in der Umkehrkultur $317 \pm 45 \Omega \text{cm}^2$, $n=30$). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Zell-Zell-Kontakte sich stärker ausbildeten und somit eine undurchlässigere Zellschicht entstehen konnte.

3.2.2 DIE POLARE INVASION VON *S. suis* IN PCPEC

Zum Vergleich der Invasion im Standard Transwell System und in der Umkehrkultur wurde der Wildtyp *S. suis* Stamm 10 und sein Tochterstamm Stamm 10 Δ cps EF, der keine Kapsel ausbildet, verwendet. Nach Infektionszeiten von 2 und 4 Stunden

im apikalen Filterkompartiment wurde die Adhäsion und Invasion mittels Doppelimmunfluoreszenz im jeweiligen System ausgewertet. An dieser Stelle sollen hauptsächlich die Differenzen zwischen der Umkehrkultur und dem Standard Transwell System betrachtet werden. Die Unterschiede, die sich aufgrund der Kapsel ergaben, werden hier nur kurz dargestellt. Das Kapitel 3.3 „Die Rolle der Kapsel bei der Invasion“ geht später näher darauf ein.

Während *S. suis* Stamm 10 sich durch eine geringe Adhäsion und Invasion in der Umkehrkultur auszeichnete (Abbildung 5 A + B), zeigte sich für die kapsellose Mutante eine deutliche Invasion (Abbildung 5 C + D). Es kam selten vor, dass extrazelluläre, adhärenente Bakterien basolateral gefunden wurden. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die basolaterale Oberfläche durch die Filtermembran nur schwer für die Bakterien zugänglich ist. Für beide *S. suis*-Stämme scheint zu gelten, dass sie gehäuft in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten invadieren.

Bei der Analyse von Adhäsion und Invasion im Standard Transwell System fiel auf, dass die Invasionsrate deutlich unterhalb derjenigen in der Umkehrkultur lag. Wie bereits für letztere gezeigt, invadierte *S. suis* Stamm 10 (Abbildung 5 E + F) fast nicht im Vergleich zu Streptokokken ohne Kapsel (Abbildung 5 G + H). Auffällig war bei beiden Keimen, dass die Bakterien im Standard Transwell System hauptsächlich als adhärenente Cluster vorlagen.

Es lässt sich also aus den Versuchsergebnissen schließen, dass eine deutliche Präferenz für die Invasion der Bakterien auf der basolateralen Seite vorliegt. Dies gilt sowohl für die bekapselte als auch für die unbekapselte Spezies der untersuchten *S. suis*-Stämme.

Interessanterweise hatte nur die apikale Infektion eine Veränderung der Aktinfilamente, nämlich die basolaterale Stress-Faser-Bildung („stress-fibre“), zur Folge, während bei der basolateralen Infektion in der Umkehrkultur keine Strukturveränderungen im Aktingerüst gefunden werden konnten.

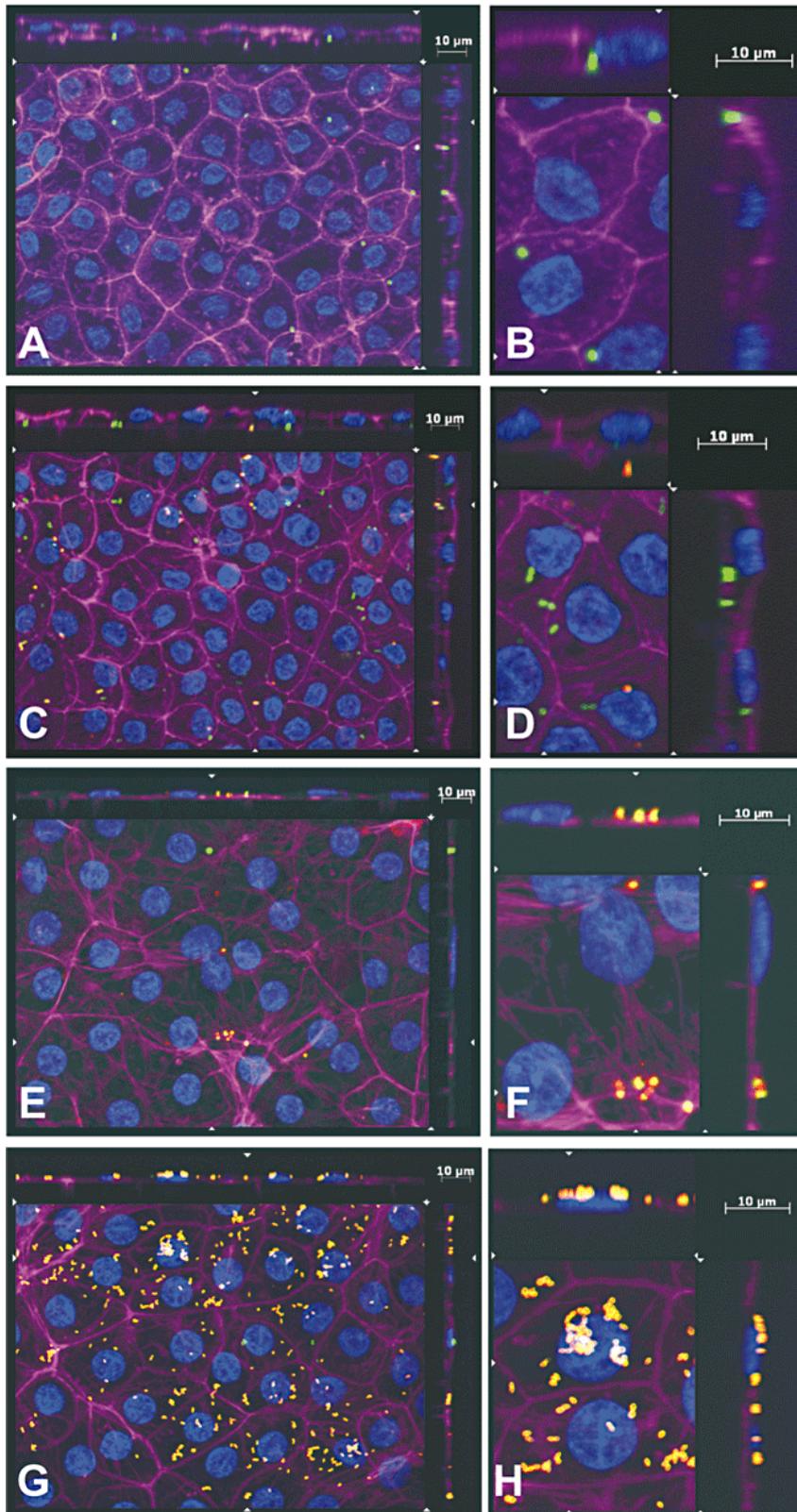


Abbildung 5: Adhäsion und Invasion von bekapselten *S. suis* (A + B) und unbekapselten (C + D) an bzw. in PCPEC, kultiviert als Umkehrkultur (E + F) und als Standard Transwell System (G + H), dargestellt mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie. Die konfluenten Monolayer der PCPEC wurden mit *S. suis* (MOI 10) infiziert und nach 4 h für die Mikroskopie gefärbt, sodass intrazelluläre (grün) von extrazellulären (gelb-rot) Bakterien unterschieden werden konnten. Zellkerne (blau), DAPI-Färbung; Aktgerüst (violett), Phalloidinfärbung. Die Schnittaufnahmen erfolgten mittels Apotom. A: *S. suis*-Stamm 10 zeigt eine geringe Adhäsion und Invasion in der Umkehrkultur. B: Vergrößerung von A: Inviadierte *S. suis* Stamm 10 lassen sich in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten erkennen. C: *S. suis* Stamm 10 Δ *cps EF* weist eine starke Invasion in der Umkehrkultur auf. D: Vergrößerung von C: Man sieht nur sehr wenig extrazelluläre Bakterien. E: Im Standard Transwell System zeigt sich für Stamm 10 ebenfalls eine niedrige Adhärenz und Invasion. F: Vergrößerung von E: *S. suis* Stamm 10 adhärert bevorzugt in Clustern. G: *S. suis* Stamm 10 Δ *cps EF* lässt eine starke Adhärenz, jedoch eine geringe Invasion im Standard Transwell System erkennen. H: Vergrößerung von G: Es zeigt sich die starke Adhärenz anhand einzelner Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispiele aus 4 unabhängigen Experimenten, die alle ähnliche Ergebnisse aufwiesen. Maßstab 10 μ m.

Eine Bestätigung der Ergebnisse im Doppelimmunfluoreszenzmikroskop gelang mittels Elektronenmikroskopie. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie der Heinrich Heine Universität

Düsseldorf erstellt. Jeweils nach 2 und 4 Stunden konnte ein enger Kontakt zwischen Bakterien und Zellen gesehen werden. Beide Keime adhärten im Standard Transwell System zunächst an den apikalen Mikrovilli, nachdem die Infektion von apikal aus stattgefunden hatte (Abbildung 6 A + B). Bei der bakteriellen Inkubation von der basolateralen Seite aus (Umkehrkultur), zeigte sich eine primäre Invasion sowohl für die Mutante als auch für den parentalen Stamm (Abbildung 6 C + D). Desweiteren konnte beobachtet werden, dass die Invasion beider Keime teilweise in der Nähe von tight junctions stattfand. Es fanden sich jedoch keine Hinweise darauf, dass sich Bakterien auch parazellulär in den tight junctions befanden.

Eine weitere Auffälligkeit bei der Auswertung der Adhäsion und Invasion im Elektronenmikroskop war das häufige Vorliegen von beiden *S. suis*-Stämmen in intrazellulären Vakuolen (Abbildung 6 E + F). Dabei befanden sich die Bakterien entweder einzeln darin oder aber bis zu 3 Bakterien gemeinsam. In den Abbildung 6 G + H sind verschiedene Stadien der Aufnahme des Bakteriums in die Vakuolen festgehalten.

In nicht infizierten Plexusepithelzellen zeigte sich sowohl im Standard Transwell System als auch bei der Umkehrkultur eine normale Zellmorphologie (Abbildung 6 I + J).

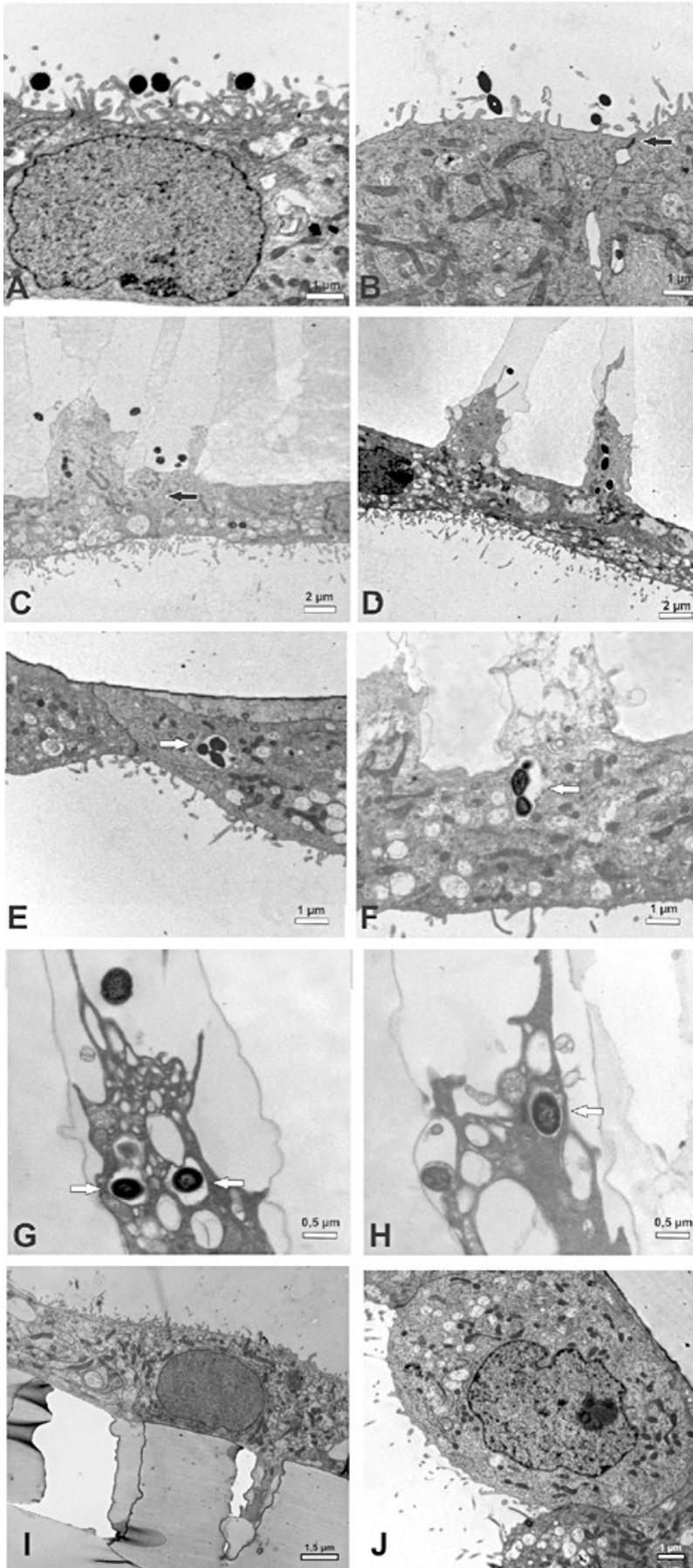


Abbildung 6:
 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Invasion von *S. suis* Stamm 10 und seiner unbekapselten Mutante im Standard Transwell System und in der Umkehrkultur. Die Abbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von vertikalen Schnitten durch PCPEC Monolayer, die zuvor *S. suis* (MOI 10) ausgesetzt waren. Die Pfeile weisen auf die Bakterien.
 A und B: Im Standard Transwell System adhären *S. suis* Stamm 10 (A) und seine akapsuläre Mutante Stamm 10 Δ cps EF (B) primär in den apikalen Mikrovilli nach apikaler Infektion.
 C und D: Bei der basolateralen Infektion in der Umkehrkultur zeigt sich die Invasion von *S. suis* Stamm 10 (C) und seiner akapsulären Mutante Stamm 10 Δ cps EF (D) in die PCPEC, teilweise in der Nähe der tight junctions, aber nie durch diese hindurch.
 E und F: Beide Stämme, *S. suis* Stamm 10 (E) und Stamm 10 Δ cps EF (F), können oftmals in intrazellulären Vakuolen gefunden werden, was zu der Annahme der Transmigration in Phagolysosomen führt.
 G und H: Diese Abbildungen zeigen die Aufnahme von Stamm 10 Δ cps EF in Vakuolen von PCPEC-Ausstülpungen zu verschiedenen Zeitpunkten.
 I und J: Abgebildet sind nicht infizierte Kontrollzellen im Standard Transwell System (I) und in der Umkehrkultur (J).

3.3 DIE ROLLE DER KAPSEL BEI DER INVASION

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, gibt es bisher nur einen kritisch überprüften Virulenzfaktor bei *S. suis*, nämlich die Kapsel. Daher wurde auch bei der Untersuchung der Invasion auf diesen Virulenzfaktor eingegangen. Mittels Doppelimmunfluoreszenz wurde die Adhäsion und Invasion des Wildtypstammes *S. suis Stamm 10* und seines Tochterstammes *Stamm 10 Δ cps EF*, der keine Kapsel ausbildet, beurteilt und verglichen. Die Infektionszeit betrug 2 und 4 Stunden, sodass es möglich war, den Invasionsverlauf über diesen Zeitraum zu beurteilen. Nach 4 Stunden war ein signifikanter Anstieg der Invasionsrate im Vergleich zu 2 Stunden nach der Infektion zu erkennen (Abbildung 7 A). Eine Steigerung der Invasionsrate durch das bakterielle Wachstum wurde durch parallel zum Versuch erstellte Wachstumskurven der Erreger ausgeschlossen, was sich in der dargestellten Form in Invasion % ausdrückt. Die unbekapselte Mutante zeigte eine frühere und stärkere Invasion als ihr parentaler Stamm (Abbildung 7 A). Da beide Stämme aufgrund ihres Genoms fähig sind, das zytotoxische Suilysin zu bilden, wurde eine Untersuchung zur Bestimmung von lebenden und toten Zellen durchgeführt. Unter den genannten Experimentalbedingungen konnte im untersuchten Zeitraum keine Zytotoxizität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Rolle der Kapsel noch genauer zu beurteilen, wurde die Invasion von kapseltragenden und kapsellosen *S. suis*-Stämmen auch untersucht, nachdem die Bakterien zuvor durch ultraviolette (UV)-Strahlen inaktiviert worden waren. Bei einer MOI von 10 wurde ein signifikanter Anstieg der Invasionsrate während des beobachteten Zeitraums für beide *S. suis*-Stämme in der Umkehrkultur nachgewiesen, nicht jedoch im Standard Transwell System (Abbildung 7 A + B). Die unbekapselte Mutante zeigte eine frühere Invasion und eine höhere Invasionsrate als der bekapselte Wildtyp (Abbildung 7 B). Die Kapsel scheint also an sich eine inhibierende Wirkung auf die Invasion zu haben. Insgesamt war die Invasionsrate in PCPEC bei beiden UV-inaktivierten Stämmen signifikant niedriger als bei den lebenden Bakterien (Abbildung 7 B). Dies deutet daraufhin, dass verschiedene Faktoren bei der Invasion von *S. suis* in PCPEC beteiligt sind, die zum Teil von den Bakterien aktiv produziert werden oder durch die UV-Inaktivierung verloren gegangen sind.

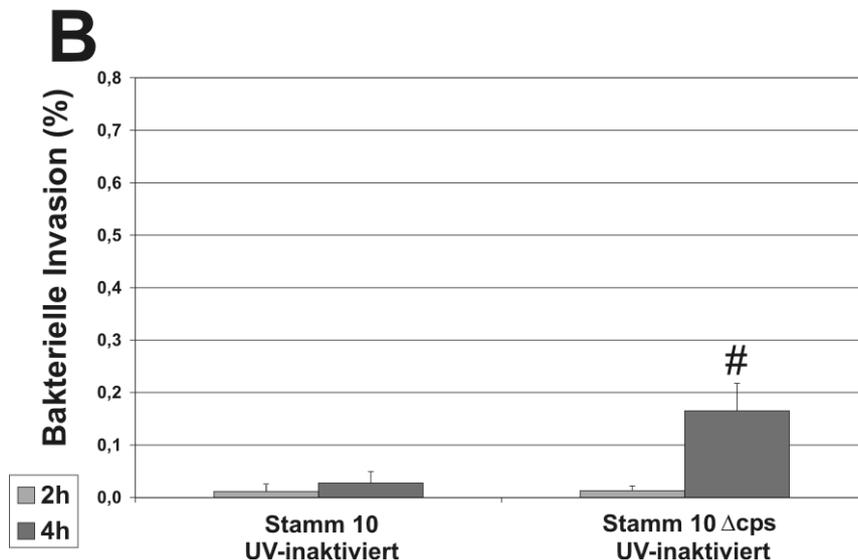
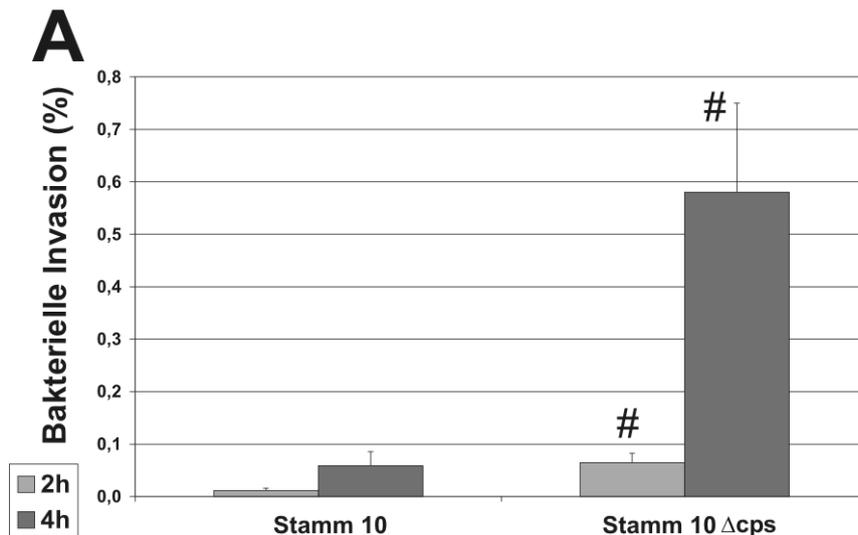


Abbildung 7: Mittels Doppelimmunfluoreszenz ermittelter Vergleich der Invasion zwischen lebenden und UV-inaktivierten *S. suis* in PCPEC.

Die einschichtige geschlossene Epithelzellschicht der Umkehrkultur wurde mit lebenden (A) und UV-inaktivierten (B) Bakterien von *S. suis* Stamm 10 und *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF versehen und die Invasion nach 2 h und 4 h mittels ermittelt. Die invadierten Bakterien wurden wie im Methodenteil beschrieben erfasst und gezählt und schließlich als Invasion (%) festgehalten. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert + Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils dreifache Werte erhoben wurden. #, P-Wert < 0,05 verglichen mit bekapselten *S. suis* nach 2 h und 4 h.

Die Invasion der kapsellosen Mutante *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF wurde wie beschrieben mit Doppelimmunfluoreszenz bestimmt. Dabei ist es möglich, mittels Apotom und Schnittbildaufnahmen die Adhäsion und Invasion dreidimensional zu rekonstruieren. Abbildung 8 A zeigt zunächst die zweidimensionale Ansicht einiger PCPEC mit adhärerten (gelb) und invadierten (grün) kapsellosen Bakterien. In der dreidimensionalen Darstellung (Abbildung 8 B) lässt sich die räumliche Zuordnung von adhärerten und invadierten Bakterien zur Zelle auf den verschiedenen Höhen

erkennen. Schließlich wird auch die räumliche Beziehung zum Aktinzytoskelett der adhärenenden und invadierenden Bakterien sichtbar, die sich bevorzugt in der Nähe und in Kontakt mit dem Zytoskelett finden lassen.

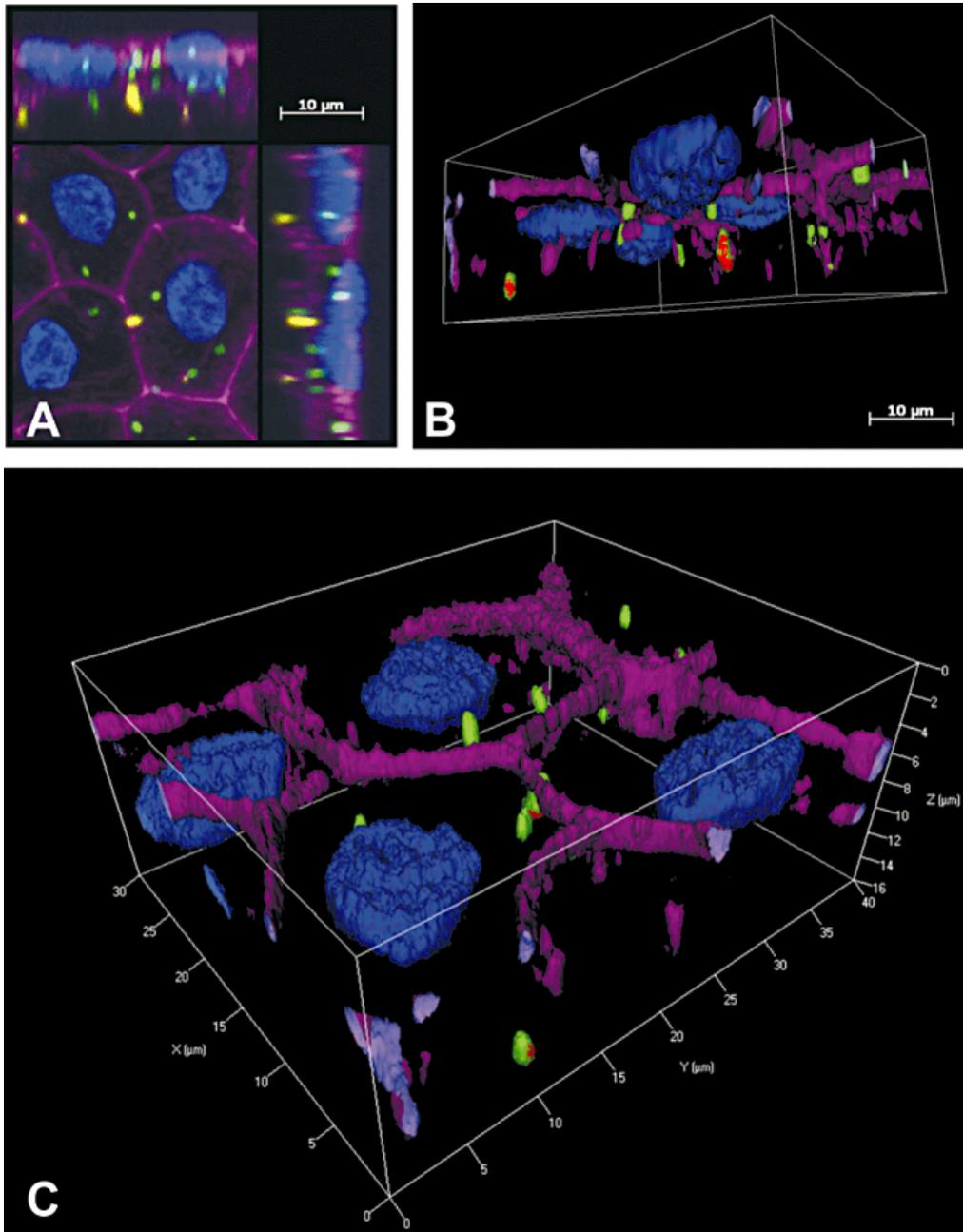


Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung der Invasion von *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF durch PCPEC. Die konfluenten Monolayer der PCPEC wurden mit *S. suis* (MOI 10) infiziert und nach 4 Stunden für die Mikroskopie gefärbt, sodass intrazelluläre (grün) von extrazellulären (grün-rot) Bakterien unterschieden werden konnten. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt und das Aktinergüst (violett) wurde durch die Phalloidininfärbung sichtbar. Die dreidimensionalen rekonstruierten Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen wurden von 0,3 μ m dicken optischen Schnitten des Apotoms erstellt mit der Zeiss Software Inside 4D.

A: Apotomaufnahme, die die Adhäsion und Invasion von *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF zeigt.

B: Der Blick von unten zeigt die basolaterale Position der adhärenenten (grün-rot) und der invadierten Bakterien (grün) auf verschiedenen Höhen.

C: Der Blick von oben auf infizierte PCPEC zeigt die Invasion und Transmigration in engem Kontakt zum Aktinzytoskelett.

3.4 DIE ROLLE VON SUILYSIN BEI DER INVASION

Ein weiterer Virulenzfaktor, der bei der Invasion von *S. suis* in epitheliale Zellen eine Rolle zu spielen scheint, ist das Hämolysin Suilysin. In den Versuchen wurden zur Überprüfung des Einflusses dieses Zytotoxins 2 Wildtypstämme mit ihren jeweiligen Suilysin-negativen Mutanten (*S. suis* Wildtyp Stamm 9657573 und *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 917, sowie *S. suis* Wildtyp Stamm SX 332 und *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 932) verwendet. Die Inkubationszeit betrug entsprechend den vorangegangenen Invasionsversuchen auch 2 bzw. 4 Stunden. Unter dem Mikroskop wurden die mit dem Verfahren der Doppelimmunfluoreszenz gefärbten Bakterien, die invadiert waren, ausgezählt. Interessanterweise zeigte sich, dass die Erreger, die nicht befähigt sind Suilysin zu bilden, eine höhere Invasionsrate aufwiesen als ihre entsprechenden Wildtypen (Abbildung 9).

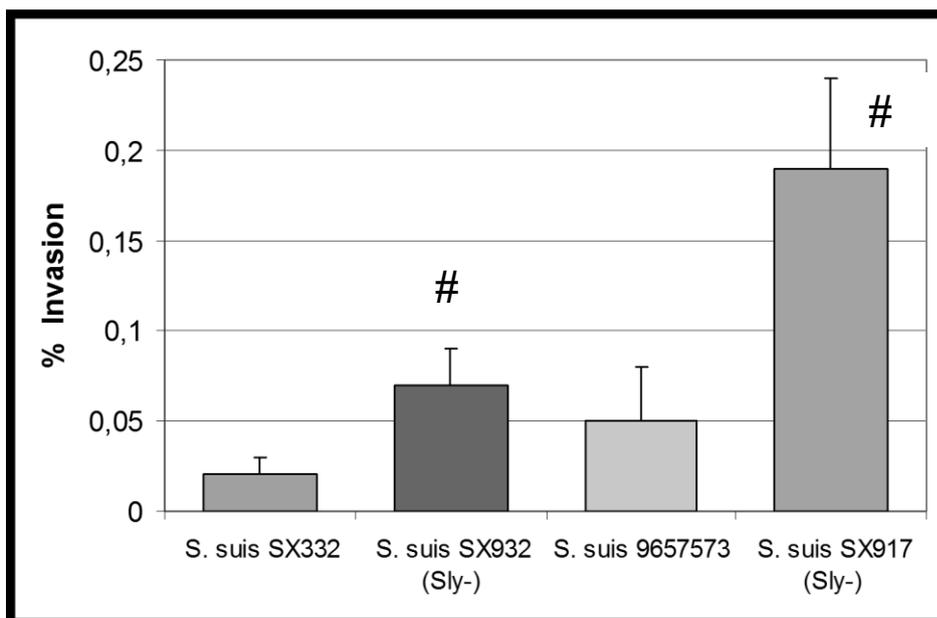


Abbildung 9: Invasion in PCPEC zweier verschiedener *S. suis*-Stämme mit ihren jeweiligen Suilysin-defizienten Mutanten nach 4 Stunden Infektion.

Sie ist bei Suilysin-produzierenden Stämmen inhibiert im Vergleich zu den jeweiligen Stämmen ohne Suilysin-Produktion. Dargestellt ist die Invasionsrate in Prozent nach 4 Stunden Infektion. Die Auswertung erfolgte mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie. Die invadierten Bakterien wurden gezählt und als prozentuale Invasion angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten, wobei jeder Versuch dreifach ausgeführt wurde. #, P-Wert < 0,05 verglichen mit bekapselten *S. suis* nach 2 h und 4 h.

Auf den mikroskopischen Aufnahmen mit dem Apotom lässt sich deutlich erkennen, dass die Stämme ohne Suilysin vermehrt intrazellulär (Abbildung 10 B + D) zu finden sind im Vergleich zu den Suilysin-produzierenden Stämmen (Abbildung 10 A + C).

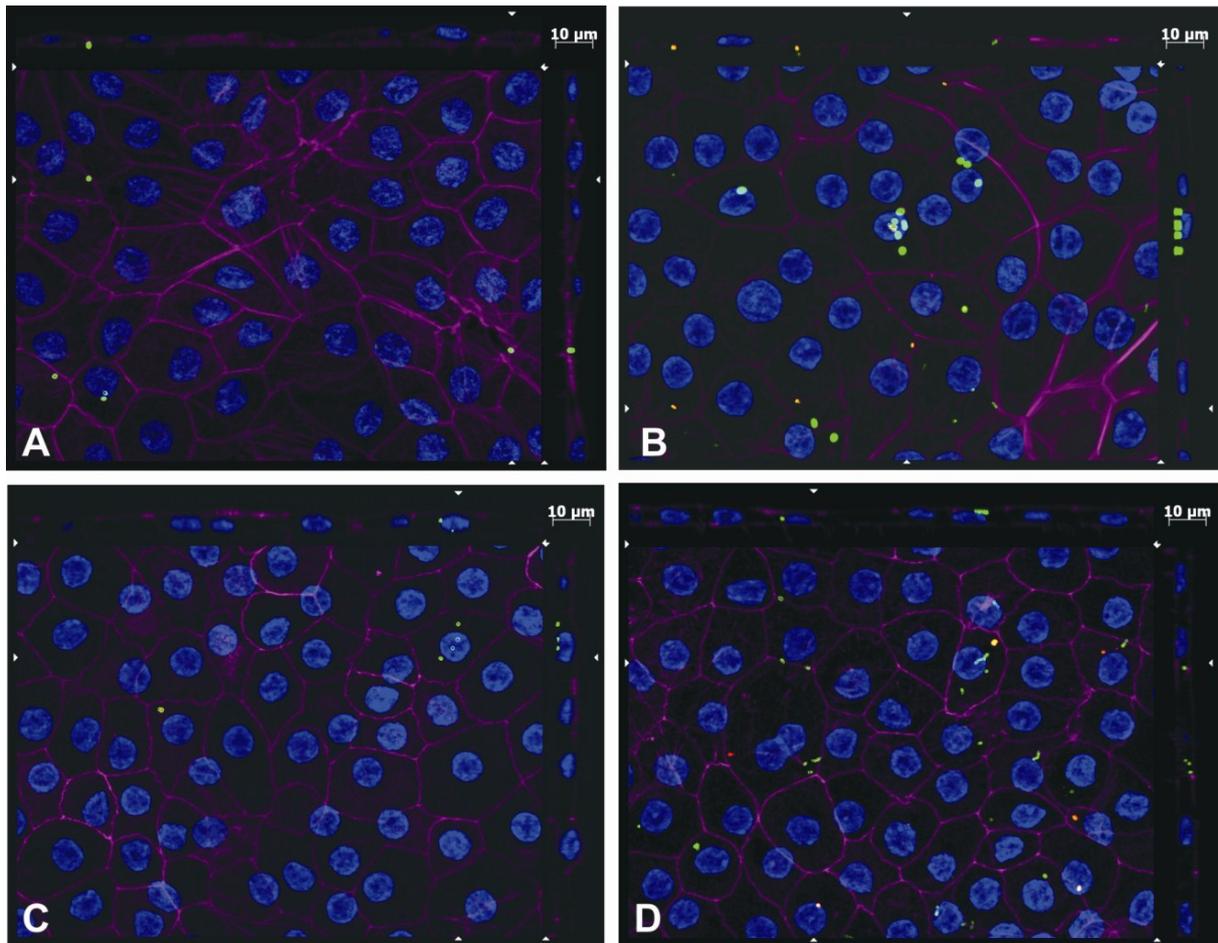


Abbildung 10: Invasion von Suilysin-positiven (A + C) versus Suilysin-negativen (B + D) *S. suis*-Stämmen. In der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie stellen sich intrazelluläre Bakterien grün und extrazelluläre Bakterien rot bzw. gelb dar. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt und das Aktingerüst durch Phalloidin violett. Die Schnittaufnahmen erfolgten mittels Apotom.

A: Es zeigen sich vereinzelt *S. suis Wildtyp Stamm 9657573* intrazellulär.

B: Es lassen sich mehrere invadierte und adhärenierte *S. suis Δ suilysin Stamm SX 917* erkennen. **C:** Analog zur Abbildung A wird hier die nur gering ausgeprägte Invasion von *S. suis Wildtyp Stamm SX 332* gezeigt. **D:** Die Mutante *S. suis Δ suilysin Stamm SX 932* weist wie die in Abbildung B genannte Mutante eine deutlich höhere Invasionsrate auf.

Die dreidimensionale Rekonstruktion der Immunfluoreszenzaufnahmen ermöglicht eine Einschätzung, an welchen Stellen des Zytoskeletts Bakterien bevorzugt invadieren. Am Beispiel von *S. suis Wildtyp Stamm SX 332* lässt sich erkennen, dass das Bakterium in der Nähe der Zell-Zell-Kontakte in die Zelle eindringt (Abbildung 11).

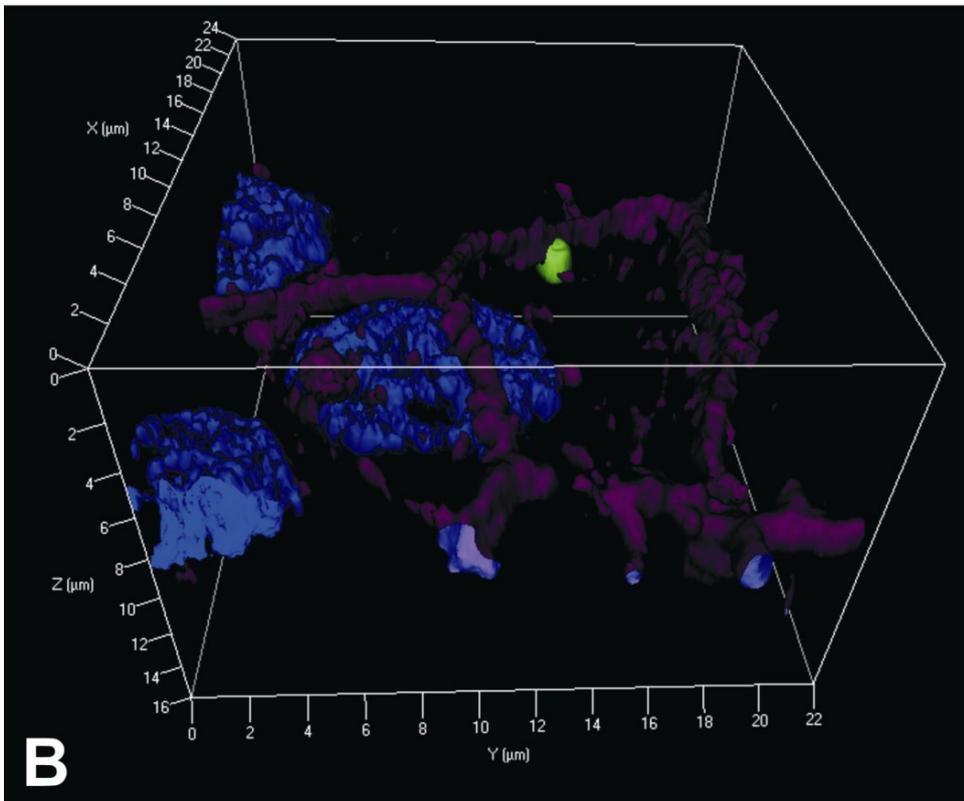
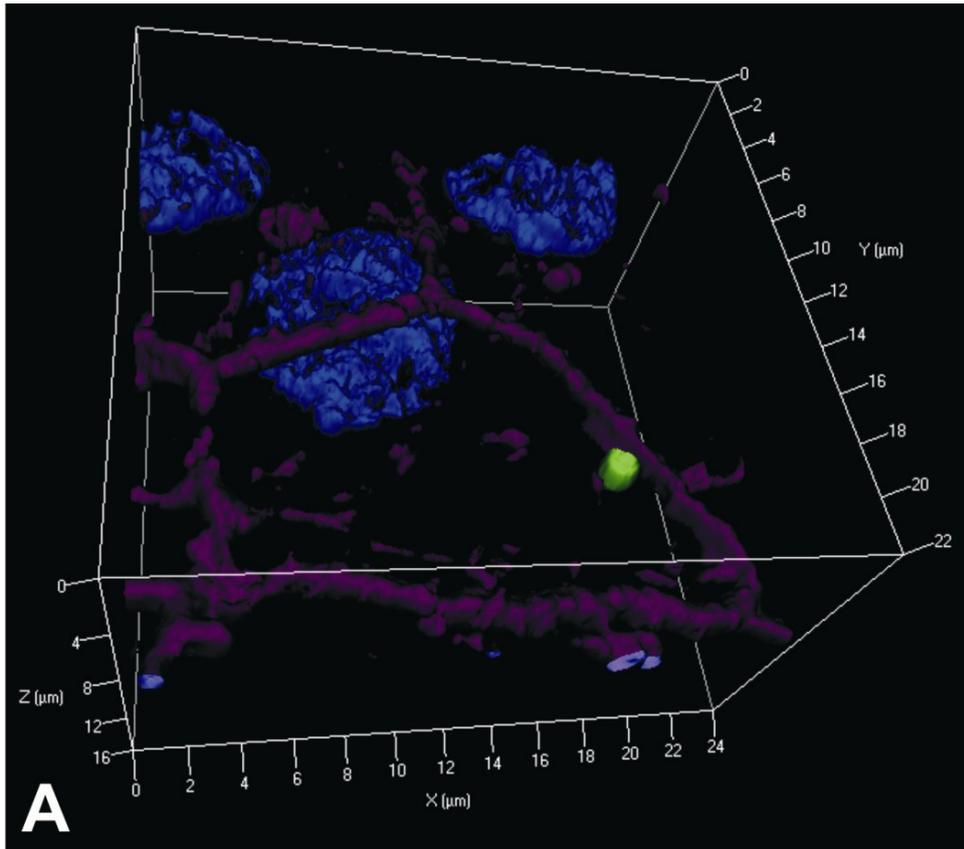


Abbildung 11: Dreidimensionale Darstellung der Invasion von *S. suis Wildtyp Stamm SX 332* durch PCPEC. In der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie stellen sich intrazelluläre Bakterien grün dar. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt und das Aktingerüst mit Phalloidin violett. Die dreidimensionalen Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen wurden von 0,3 μm dicken optischen Schnitten des Apotoms mittels der Zeiss Software Inside 4D erstellt. A: Blick von oben auf das invadierende Bakterium *S. suis Wildtyp Stamm SX 332* in der Nähe eines Zell-Zell-Kontaktes. B: Der Blick von der Seite lässt den engen Kontakt zum Aktinzytoskelett noch genauer erkennen.

Auch bei der *Suilysin*-defizienten Mutante zeigt sich ein enger Kontakt zum Aktinzytoskelett in der dreidimensionalen Rekonstruktion (Abbildung 12 A + B). Es finden sich jedoch deutlich mehr Bakterien innerhalb einer Zelle.

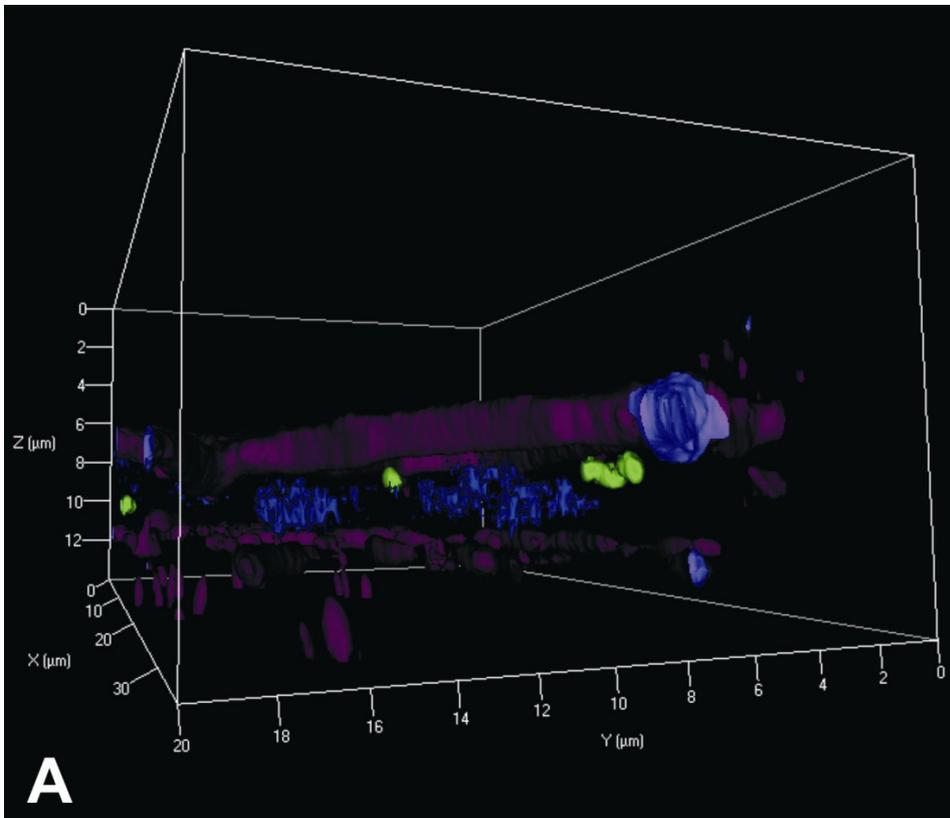
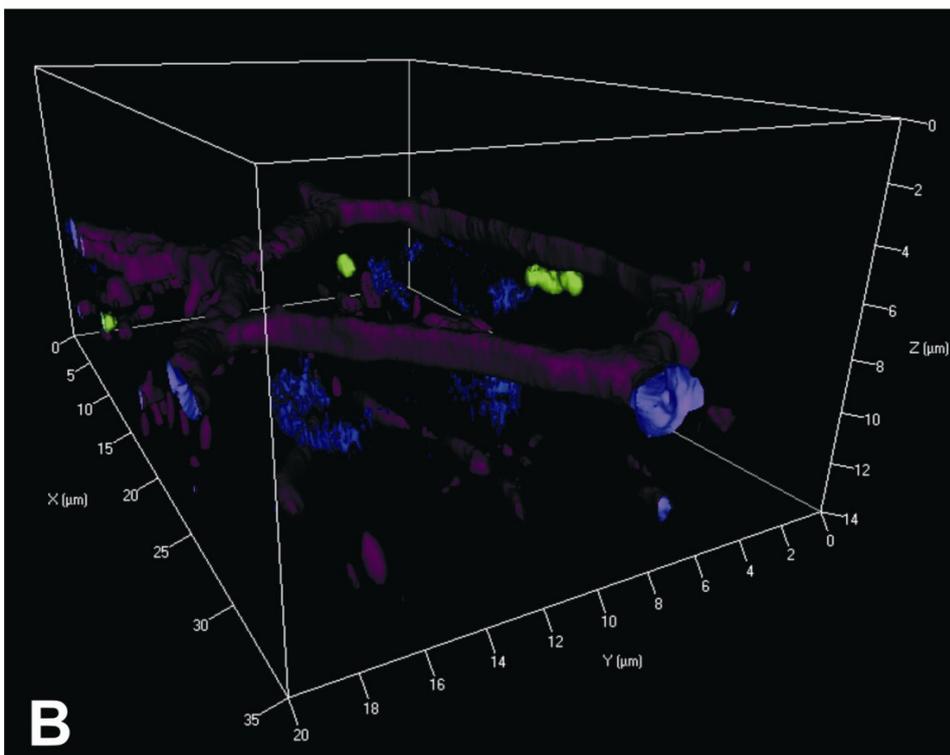


Abbildung 12: Dreidimensionale Aufnahme der Invasion von *S. suis* Δ *Suilysin* Stamm SX 917. In der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie stellen sich intrazelluläre Bakterien grün dar. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt und das Aktingerüst mit Phalloidin violett. Die dreidimensionalen Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen wurden von 0,3 μ m dicken optischen Schnitten des Apotoms mittels der Zeiss Software Inside 4D erstellt. A und B: Ansicht einer porcinen Plexusepithelzelle aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Im Vergleich zu Abbildung 11 invadieren deutlich mehr Bakterien der *Suilysin*-negativen Mutante. Ebenfalls gut erkennbar sind der enge Kontakt zum Aktinzytoskelett insbesondere an Zell-Zell-Kontakten und die Lokalisation innerhalb der Zellebene.



Ebenso wie bei den bekapselten *S. suis*-Stämmen ist der Nachweis von adhärenierten Bakterien und invadierten Bakterien auf unterschiedlichen Höhen auch für das Suilysin-defiziente Bakterium *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 917 gelungen (Daten nicht gezeigt).

In allen Versuchen mit *S. suis* Wildtyp Stamm 9657573 und *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 917, sowie *S. suis* Wildtyp Stamm SX 332 und *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 932 konnte eine Schädigung der Barrierefunktion der PCPEC mittels TEER-Messungen ausgeschlossen werden. Der transepitheliale Widerstand blieb im Vergleich zum Versuchsbeginn nach 2 und 4 Stunden konstant und war vergleichbar mit den Kontrollwerten (Abbildung 13).

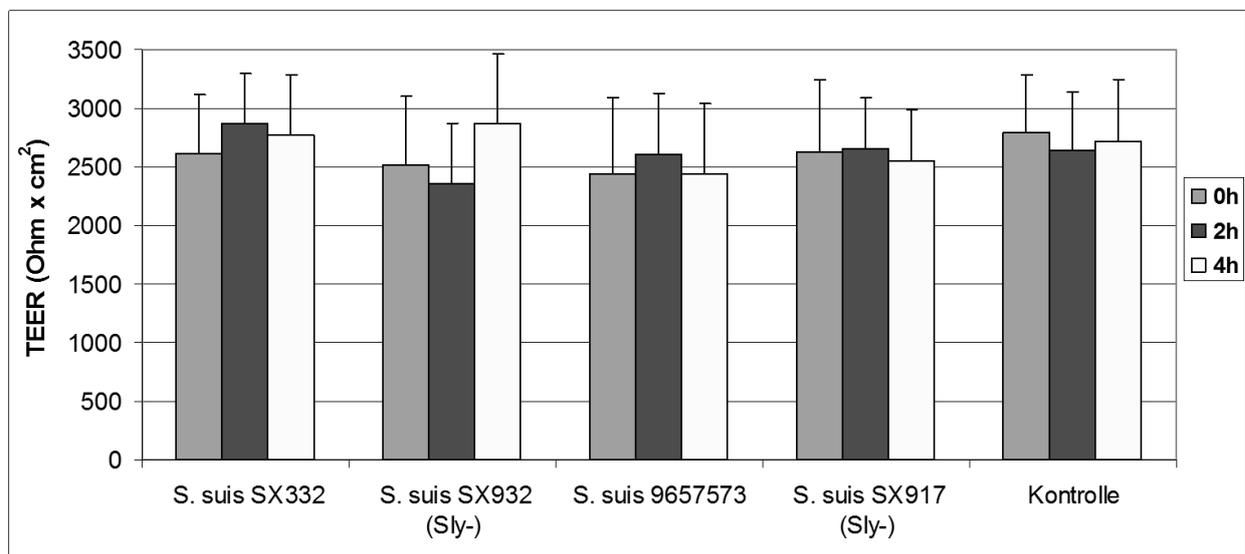


Abbildung 13: TEER bei der Invasion von *S. suis* und seinen Suilysin-defizienten Mutanten in PCPEC. Der TEER blieb während der vierstündigen Versuche konstant und spiegelt die intakte Barrierefunktion der PCPEC Monolayer wider. Die Ergebnisse sind ausgedrückt in Ohm x cm² zu den Zeitpunkten 0h, 2h und 4h nach Infektion.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten, wobei jeder Versuch dreifach durchgeführt wurde.

3.5 DAS INTRAZELLULÄRE ÜBERLEBEN

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Suilysin-defiziente *S. suis*-Stämme überraschenderweise vermehrt in die PCPEC eindringen können, wurde das Interesse auf die Vorgänge innerhalb der Zellen während der Invasion gelenkt. Es wurde untersucht, inwieweit sich Unterschiede im intrazellulären Überleben zwischen den *S. suis*-Stämmen zeigten. Dazu wurden die Filter nach zweistündiger Infektion mit SFM/AB gewaschen und in frischem antibiotikahaltigem Medium weiterkultiviert.

Auf diese Weise konnte eine weitere Invasion von *S. suis* über 2 Stunden hinaus vermieden werden und ein extrazelluläres Wachstum war nicht weiter möglich. Während der Wildtyp so gut wie keine Invasion zeigte und somit auch eine Beurteilung des intrazellulären Überlebens nicht möglich war (Abbildung 14), ergaben sich bei seiner Suilysin-negativen Mutante folgende Ergebnisse. Nach 2 Stunden und nach 4 Stunden Kultivierung im antibiotikahaltigen Medium wurde keine verminderte Anzahl an invadierten Streptokokken verzeichnet (Abbildung 14), was für ein intrazelluläres Überleben der Bakterien innerhalb der Zelle spricht. Darüber hinaus kam es zu einer intrazellulären Zunahme der Bakterienanzahl. Eine weitere Invasion von neuen Bakterien aus dem Medium war durch den Zusatz des Antibiotikums nicht möglich; die Aussaat der Medien aus allen Kompartimenten ergab kein Wachstum auf Schafsblutagarplatten. Der Suilysin-negative Stamm *S. suis* Δ *suilysin* Stamm SX 917 ist also befähigt innerhalb von PCPEC zu überleben.

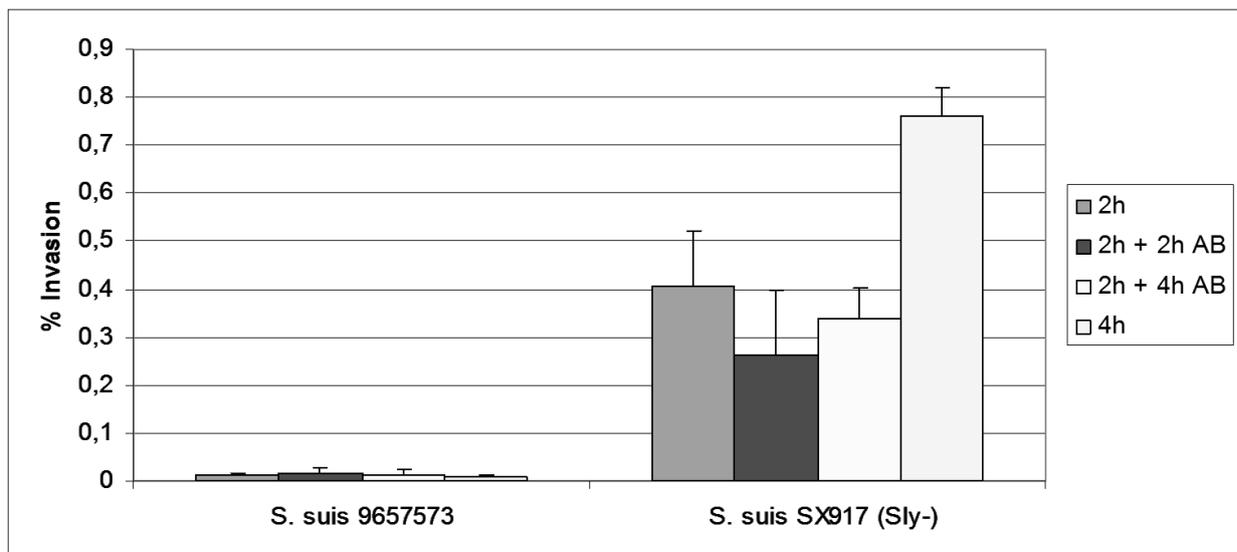


Abbildung 14: Das intrazelluläre Überleben von *S. suis* 9657573 und *S. suis* SX917 (Sly-) in PCPEC. Dargestellt ist die Invasionsrate in Prozent nach 2 h und 4 h Infektion sowie nach zweistündiger Infektionsdauer mit anschließender Weiterkultivierung in antibiotikahaltigem Medium für 2 h bzw. 4 h. Nach der jeweiligen Zeit wurde die Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt und eine Auswertung am Doppelimmunfluoreszenzmikroskop konnte erfolgen. Die invadierten Bakterien wurden gezählt und als prozentuale Invasion angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten, wobei jeder Versuch dreifach ausgeführt wurde.

Im Vergleich zum intrazellulären Wachstum wurde auch das extrazelluläre Wachstum beurteilt. Dies zeigte, dass die eingesetzten Bakterien während der gesamten Zeit in gleicher Weise wachstumsfähig waren (Abbildung 15).

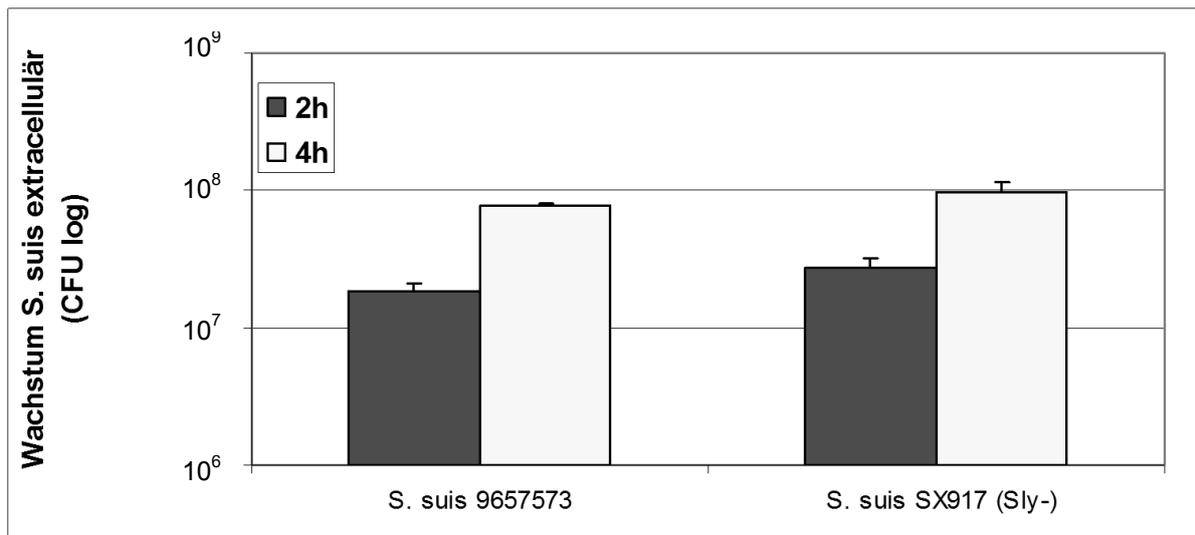


Abbildung 15: Das extrazelluläre Wachstum von *S. suis* 9657573 und *S. suis* SX917 (*Sly*-) zu den Zeitpunkten 2 h und 4 h in SFM bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten, wobei jeder Versuch dreifach ausgeführt wurde.

3.6 DER EINFLUSS DES PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE-INHIBITORS LY294002 UND CYTOCHALASIN D

Zur Untersuchung der Rolle des Zytoskeletts für die Invasion von *S. suis* wurde das Aktingerüst der PCPEC durch Ly294002 und Cytochalasin D vor den Invasionsversuchen an Umkehrkulturen verändert.

Ly294002 ist ein wirksamer und spezifischer Inhibitor der PI 3-Kinase, der ungehindert in die Zelle gelangt. Ly294002 gehört zu den Benzylpyranonen und ist chemisch ausgedrückt das 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on. Es hat die Strukturformel C₁₉H₁₇NO₃ und ein Molekulargewicht von 307,343 g/mol. Bei *in vitro*-Versuchen, bei denen reine PI 3-Kinase verwendet wurde, zeigte Ly294002 eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von 1.4 µM [83] und inhibierte alle Isoformen gleichermaßen [84]. Andere Kinasen wie Proteinkinase C, Proteinkinase A, MAP-Kinase, S6 Kinase, EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase, c-src-Kinase, PI 4-Kinase, Diazylglyzerolkinase oder rabbit kidney ATPase wurden bei einer Konzentration von 50 µM nicht inhibiert. In intakten Neutrophilen, die mit fMet-Leu-Phe stimuliert worden waren, konnte ein kompletter Verlust der PI 3-Kinase-Aktivität bei 50 µM ohne Zelltoxizität beobachtet werden. Es induziert die Apoptose in vielen Zellarten, indem es den antiapoptotischen Weg über die PI 3-Kinase/Aktin hemmt [85, 86]. Ly294002 ist auch geeignet, um zelluläre Signaltransduktionsprozesse zu identifizieren, die beispielsweise durch die PI 3-Kinase/Aktin-Achse reguliert werden [87, 88]. Wie in

der Einleitung bereits erläutert, ist der PI 3-Kinase-Signaltransduktionsweg für viele Bakterien ein Angriffspunkt während der Invasion von Zellen. Aus diesen Gründen wurde der Einfluss des Inhibitors auf die Invasion von *S. suis Wildtyp Stamm 10* und den entsprechenden kapsellosen Stamm *S. suis Stamm 10 Δ cps EF* untersucht. Die Daten zeigten eine Inhibition der Invasion von *S. suis* in PCPEC, wenn die Zellen 4 Stunden vor Infektion mit Ly294002 präinkubiert wurden. Dieser Effekt konnte sowohl für den Stamm mit Kapsel als auch den kapsellosen erzielt werden (Abbildung 16).

Ein weiterer Inhibitor des Aktinzytoskeletts ist das Cytochalasin D. Es ist ein Mykotoxin mit einem Molekulargewicht von 507,618 g/mol. Cytochalasin D kann ungehindert in die Zelle gelangen und inhibiert dort die Aktinpolymerisation. Es zerstört Aktinmikrofilamente und aktiviert den p53-abhängigen Weg, der ein Sistieren des Zellzyklus in der G1-S-Phase verursacht. So wird die Durchlässigkeit von Zell-Zell-Verbindungen über Aktin gesteuert; durch Zerstörung der Aktinfilamente mit Cytochalasin D werden die Verbindungen auch für größere Proteine durchlässig. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Cytochalasin D dienen dem Vergleich mit den erhobenen Daten aus den Invasionsexperimenten mit Ly294002. Es ergab sich unter dem Einfluss von Cytochalasin D eine fast identische Verminderung der Invasion für *S. suis Wildtyp Stamm 10*, bei seiner akapsulären Mutante hingegen zeigte sich eine stärkere Abnahme der Invasionsrate (Abbildung 16). Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass die unbekapselten Bakterien generell eine höhere Invasionsrate aufweisen als die bekapselten. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre der breitere Wirkungsgrad von Cytochalasin D in Bezug auf den Einfluss am Zytoskelett.

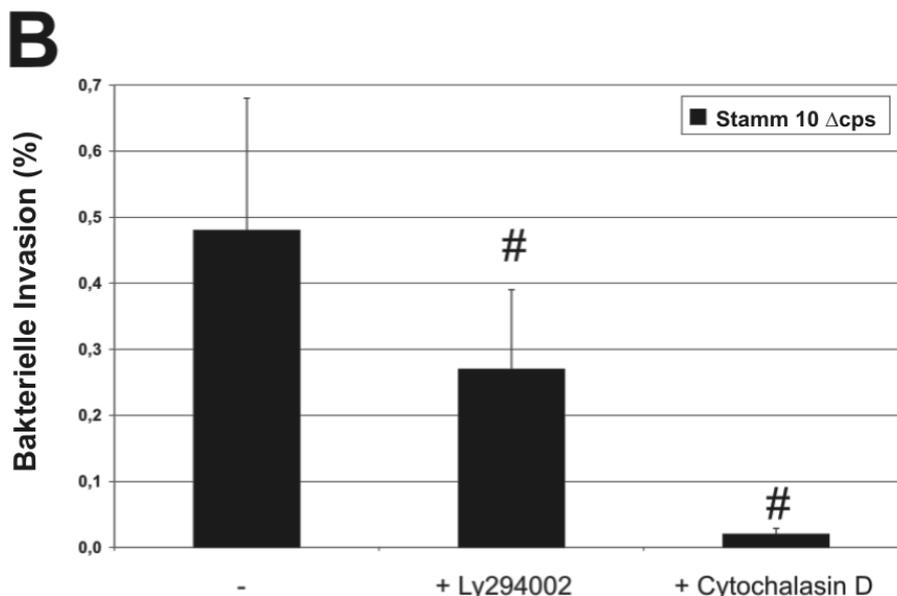
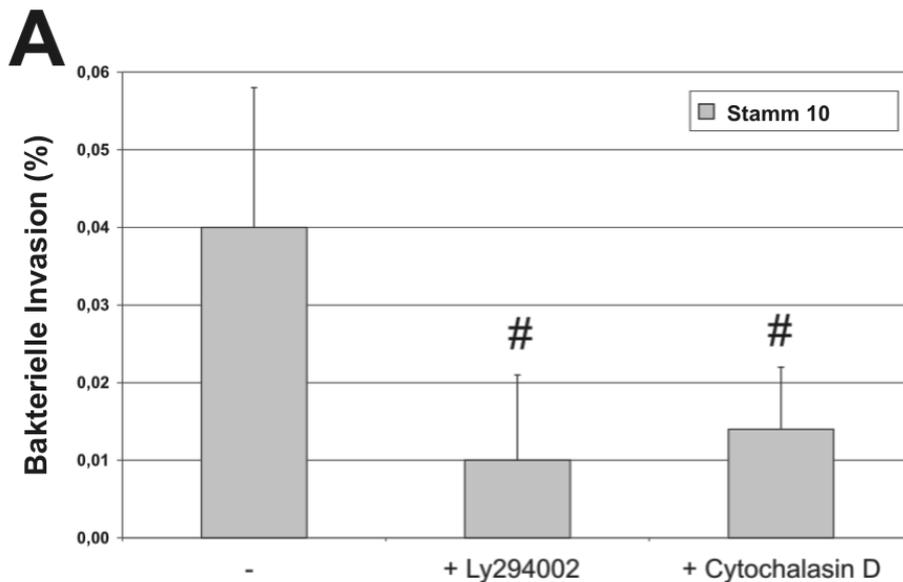


Abbildung 16: Mittels Doppelimmunfluoreszenz ermittelte Inhibition der Invasion von *S. suis* in PCPEC durch Ly294002 und Cytochalasin D.

Die Zellmonolayer wurden mit *S. suis* Stamm 10 (A) und Stamm 10 Δ cps EF (B) für 4 h infiziert, nachdem die Zellen mit Ly294002 (1 μ M) und Cytochalasin D (1 mg/ml) für 2 h inkubiert worden waren. Die invadierten Bakterien wurden gezählt und als prozentuale Invasion angegeben. Die Daten zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten, wobei jeder Versuch dreifach ausgeführt wurde. #: P-Wert <0,05 im Vergleich mit den durch *S. suis* infizierten PCPEC ohne Inhibitor.

In den mikroskopischen Aufnahmen nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde die quantitative Auswertung (Abbildung 16) auch bildlich dargestellt. Es zeigte sich fast keine Invasion nach Präinkubation von PCPEC mit Ly294002 (vgl. Abbildung 5 A + C). In den mit Cytochalasin D behandelten Zellen konnten keine intrazellulären Bakterien gefunden werden (Abbildung 17 C + D). Außerdem befanden sich nahezu alle extrazellulären bzw. adhärenen Streptokokken entlang und zwischen den

Zellkontakten. Dies könnte auf die Öffnung der tight junctions durch Cytochalasin D zurückzuführen sein.

Es stellte sich heraus, dass der mutierte *Stamm 10 Δ cps EF* eine stärkere Adhärenz aufwies als sein Wildtyp.

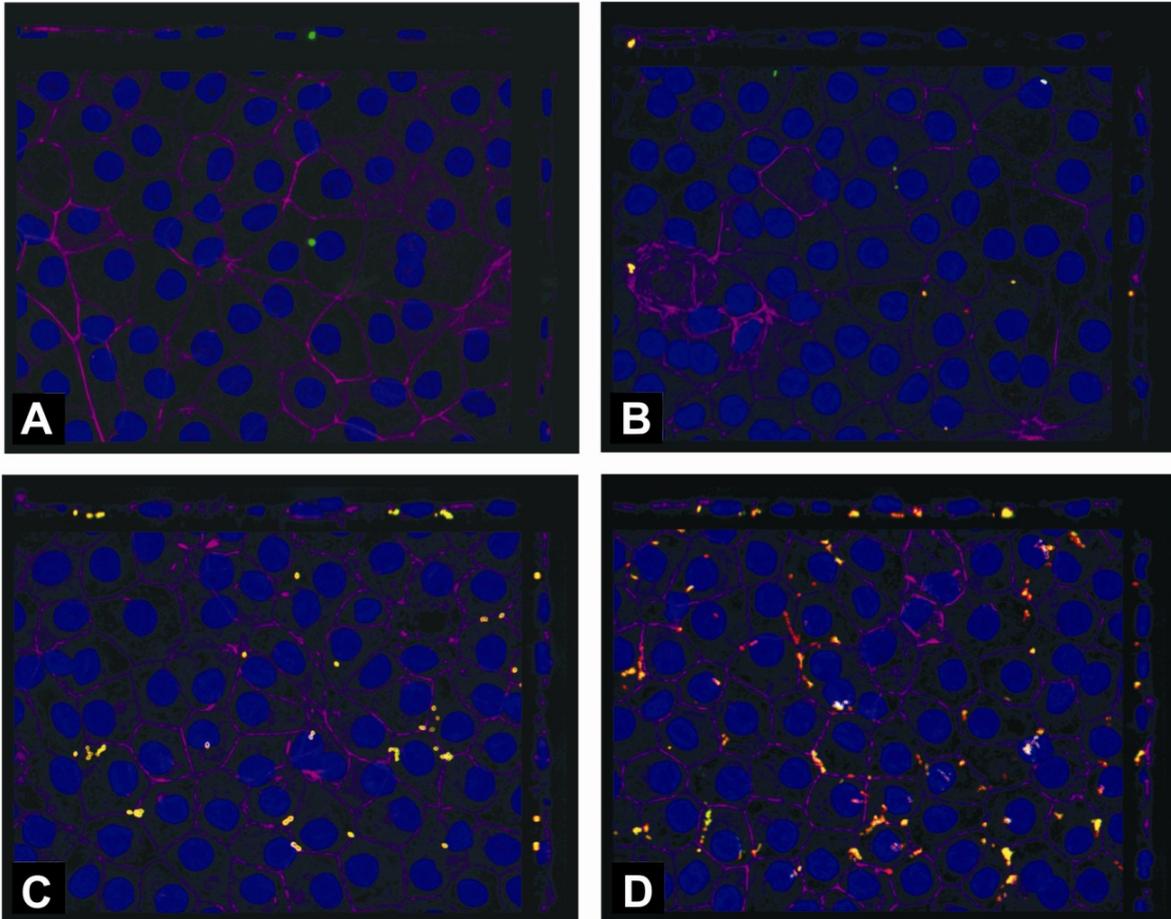


Abbildung 17: Inhibition der Invasion von *S. suis* in PCPEC durch Ly294002 und Cytochalasin D, erhoben mittels Doppelimmunfluoreszenz.

Die Zellmonolayer wurden mit *S. suis* Stamm 10 (A + C) und Stamm 10 Δ cps EF (B + D) für 4 Stunden infiziert, nachdem die Zellen mit Ly294002 (1 μ M) und Cytochalasin D (1 mg/ml) für 2 Stunden inkubiert worden waren. In der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie stellen sich intrazelluläre Bakterien grün und extrazelluläre Bakterien rot bzw. gelb dar. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt und das Aktingerüst durch Phalloidin violett.

A und B: *S. suis* Stamm 10 und seine Mutante *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF lassen kaum Adhäsion an und Invasion in PCPEC erkennen, die als Umkehrkultur kultiviert wurden und mit Ly 294002 für 2 Stunden präinkubiert waren.

C und D: *S. suis* Stamm 10 und seine Mutante *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF lassen nach zweistündiger Vorbehandlung mit Cytochalasin D keine Invasion in der Umkehrkultur der PCPEC erkennen. Die Bakterien befinden sich jedoch extrazellulär entlang und zwischen den tight junctions.

Die Bilder zeigen repräsentative Beispiele von 3 unabhängigen Experimenten, die alle ähnliche Ergebnisse aufwiesen. Maßstab 10 μ m.

4 DISKUSSION

4.1 POLARE INVASION VON *S. suis* IN PCPEC

Der entscheidende Schritt, der zu Infektionen im geschützten Milieu des ZNS führt, ist die Überwindung der zellulären Barrieren von Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke durch die Erreger. Dabei erfolgt der Übertritt am Plexus choroideus zunächst durch die fenestrierten Kapillaren. Die eigentliche Barriere stellen die Plexusepithelzellen dar, die durch tight junctions einen engen Zell-Zell-Kontakt aufweisen. Ein unreguliertes Übertreten von Molekülen und Organismen wird dadurch verhindert. Die basolaterale Seite der Plexusepithelzellen ist somit ein wichtiges und frühes Hindernis, mit dem die Bakterien an der Blut-Liquor-Schranke in Berührung kommen. Mit dem entwickelten *in vitro*-Modell der Umkehrkultur ist es nun gelungen, diesen Infektionsweg anhand eines Modells zu untersuchen, das den pathophysiologischen Verhältnissen sehr nahe kommt. Die Bakterien, in diesem Fall *S. suis*, gelangen von der basolateralen, also der Blut zugewandten Seite, durch den Zellmonolayer in Richtung der apikalen Seite, die *in vivo* der Liquor umspült. Gestützt wird diese Theorie dadurch, dass in der Umkehrkultur im Vergleich zum Standard Transwell System eine verstärkte Invasion von der basolateralen Seite aus erfolgt.

Sicherlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere regulative Funktionen durch das Endothel oder die zirkumventrikulären Organe für die Barrierefunktion eine Rolle spielen, jedoch ist davon auszugehen, dass die entscheidende Komponente der Zellbarriere die PCPEC mit den tight junctions ist [4, 77].

Mit diesem Modell ist es nun möglich *in vitro* die Invasion und Transmigration von *S. suis* über die Blut-Liquor-Schranke darzustellen, die sowohl bei natürlich als auch bei experimentell infizierten Fällen mit *S. suis*-Meningitis als entscheidende Schritte angesehen werden [36, 89, 90]. Auch für andere Erreger wurde die Relevanz des Plexus choroideus für die Infektion im ZNS in Betracht gezogen. So wurde für *N. meningitidis* [73], *H. influenzae b* [74, 91, 92], *E. coli* [93] und *Listeria monocytogenes* [94] eine Beteiligung des Plexus beim Eindringen in das ZNS angenommen.

Dass die Polarität der Epithelzellen relevant für die bakterielle Infektion ist, konnte schon für mehrere Zellarten und verschiedene Erreger gezeigt werden. Die Invasion von *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelzellen zeigte sich verstärkt auf der basolateralen Seite, sodass Fleiszig et al. vermuteten, dass sich auf der basolateralen Seite der Epithelzellen Faktoren befinden, die eine Interaktion mit

diesem Erreger erleichtern [95]. Auch für *Listeria monocytogenes* konnte eine Bevorzugung der basolateralen Seite für die Invasion in Enterozyten-ähnlichen Caco-2 Zellen gezeigt werden [96]. An der gleichen Zelllinie wurde für *Shigella flexneri* dasselbe beobachtet [97]. Als Faktoren für die vermehrte Invasion über die basolaterale Membran erwähnten Mournier et al. interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie I-CAM und L-CAM an der Zonula adherens, die als Rezeptoren für die Pathogene dienen könnten. Selbst für einige Viren konnte der Nachweis erbracht werden, dass sie vermehrt basolateral invadieren [98-100]. Diese Literaturangaben unterstreichen, dass die Präferenz zur Invasion über die basolaterale Seite von Epithelzellen für die selektive Aufnahme von Erregern in Zellen einen wichtigen Pathomechanismus darstellt. Einige der erwähnten Studien verwendeten jedoch semikonfluente Monolayer, behandelten die Zellen mit Agenzien wie Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) und griffen auf hohe Bakterienkonzentrationen zurück, um den Eintritt der Pathogene über die basolaterale Membran zu erleichtern. Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass die Mechanismen an einem nicht intakten Monolayer sich von einer funktionierenden Barriere unterscheiden. Der Vorteil des entwickelten *in vitro*-Modells der Umkehrkultur liegt demgegenüber darin, dass zu jedem Zeitpunkt eine Konfluenz der Zellschicht gegeben war (vgl. TEER-Messung). *S. suis* war dennoch fähig, diese Barriere zu überwinden und es ist anzunehmen, dass dieser Prozess aufgrund der Polarität spezifisch für die Plexusepithelzellen ist [101].

An der basolateralen Membran von Endothel- und Epithelzellen befindet sich die Basallamina. Sie gehört zur extrazellulären Matrix und stabilisiert die Zellschicht. Sie wird freigelegt, wenn das Gewebe zerstört wird wie beispielsweise durch Läsionen oder Traumata. Wenn Bakterien auf die basolaterale Seite von Epithelzellen appliziert werden, könnten sie direkten Kontakt zu den Komponenten der Extrazellulärmatrix erhalten. Möglicherweise ist die Bindung an diese Strukturen Teil des Invasionsprozesses. Vercellotti et al. zeigten als mögliche Grundlage für die Invasion, dass *S. pyogenes* und *Staphylococcus aureus* an endotheliale Zellen und an Fibronectin-bedeckte Oberflächen binden [102]. Eine Studie von Esgleas et al. evaluierte, dass die unbekapselte Mutante im Gegensatz zu ihrem Wildtyp besser an die extrazelluläre Matrix band, was auf eine störende Wirkung der Kapsel auf die Bindung hinzuweisen schien [103]. Die untersuchten Proteine der Extrazellulärmatrix, für die dies galt, waren dabei plasmatisches und zelluläres Fibronectin sowie die

Kollagene Typ III und V; die kapsellosen Bakterien zeigten auch eine Bindungsbereitschaft gegenüber Vitronektin und Laminin im Gegensatz zum kapseltragenden Stamm. Es ist jedoch zu beachten, dass eine bessere Adhäsion nicht automatisch eine stärkere Invasion bedeutet. In der Doppelimmunfluoreszenzuntersuchung konnte keine positive Korrelation nachgewiesen werden.

4.2 EINFLUSS DER VIRULENZFAKTOREN KAPSEL UND SUILYSIN VON *S. suis* AUF DIE INVASION IN PCPEC

4.2.1 EINFLUSS DER KAPSEL

Die Kapsel von *S. suis* besteht aus 5 verschiedenen Zuckern, unter anderem Sialinsäure. Sowohl virulente als auch avirulente Keime können eine Kapsel tragen. Sie spielt bei der Infektion eine entscheidende Rolle, wenn auch die genauen Mechanismen noch unklar sind.

In den Versuchen zur Invasion zeigte der unbekapselte Stamm eine größere Bereitschaft in die PCPEC einzudringen. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass diese Bakterien besser an die Extrazellulärmatrix binden, wie Esgleas et al. es für eine kapsellose Mutante zeigten, die an Fibronektin, Kollagen Typ III und V sowie im Gegensatz zum Wildtyp an Vitronektin und Laminin adhärirten [103]. Ein weiterer Grund für die höhere Invasionsrate könnte der im Vergleich zum Bakterium mit Kapsel geringere Durchmesser sein.

Transmigrationsversuche mit *S. suis* durch einen Monolayer aus PCPEC ergaben vergleichbare Daten: Der kapsellose Stamm *S. suis* Stamm 10 Δ cps EF zeigte eine signifikant höhere Transmigrationsrate als der Wildtyp-Stamm ohne eine Schädigung des Monolayers hervorzurufen [101].

Unterstützt werden die Versuchsergebnisse auch durch eine Studie von Benga et al.: Sie konnten darstellen, dass alle getesteten *S. suis*-Stämme des Serotyp 2 eine geringe Adhäsion und Invasion zeigten, während alle Stämme ohne Kapsel die laryngeale Epithelzelllinie HEp-2 stärker invadierten [82]. Bei Lalonde et al. hingegen konnte für keinen *S. suis*-Stamm eine Invasion in verschiedenste Epithelzellreihen nachgewiesen werden, auch nicht für unbekapselte Mutanten [104]. Aber letztere erwiesen sich als stärker adhärent und eine Präinkubation der Zellen mit Zellwandmaterial von *S. suis* verhinderte die Adhäsion nahezu vollständig für einen

homologen Stamm. Es gibt weitere Berichte, denen zufolge *S. suis* an HEp-2-Zellen adhärte und auch gering invadierte, wobei virulente Stämme eine stärkere Adhäsion und Invasion präsentierten als weniger virulente [45].

Vanier et al. gelang es zu zeigen, dass *S. suis* in BMEC, die aus Schweinehirnen stammten, invadierten [11]; ein Eindringen von *S. suis* in BMEC menschlichen Ursprungs konnte jedoch nicht gezeigt werden [105]. Obwohl viel dafür spricht, dass die Kapsel einen inhibitorischen Einfluss auf die Invasion hat, wurde dennoch auch gezeigt, dass Kapsel-defiziente Mutanten avirulent sind und im Blutkreislauf von Mäusen und Schweinen schnell eliminiert werden [29, 32].

Die genannten Studienresultate weisen darauf hin, dass die Kapsel bei der Invasion hinderlich ist, da sie ein Adhärenz an und damit das Invadieren in die Zellen erschwert. Im Blut dagegen bildet sie einen wichtigen Schutz vor phagozytierenden Zellen [35] und stellt somit einen wichtigen Virulenzfaktor dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Kapsel *S. suis* davor schützt, von neutrophilen Granulozyten phagozytiert und eliminiert zu werden [106]. Möglicherweise wird der Aufbau der Kapsel im Verlauf der Infektion zur Überwindung der Epithelbarriere herunterreguliert, aber hochreguliert, während sich das Bakterium im Blutstrom oder Gewebe befindet, sodass sich die Ausprägung der Kapsel den Bedingungen des infizierten Wirtes anpasst.

Die Rolle der Kapsel als Virulenzfaktor von *S. suis* wird kontrovers diskutiert. Es besteht also noch ein großer Bedarf an weiterer Forschung auf diesem Gebiet, um zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der *S. suis*-Meningitis zu gelangen.

4.2.2 EINFLUSS VON SUILYSIN

Suilyisin ist ein Thiol-aktiviertes Toxin und gehört zur Familie der antigen-assoziierten Cholesterin-bindenden Toxine. Es ist das Hämolyisin von *S. suis* und weist Ähnlichkeiten mit dem Pneumolysin von *S. pneumoniae* auf. Es spielt bei der Infektion durch *S. suis* als Virulenzfaktor eine Rolle, die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar. Bisher ist es nicht gelungen einen avirulenten *S. suis* Typ 2 Stamm zu isolieren, der zur Produktion von Suilyisin befähigt ist [34].

Suilyisin-positive Stämme haben eine zytotoxische Wirkung, während dies für Suilyisin-negative Stämme nicht gezeigt werden konnte [45]. Überraschenderweise ergaben die Experimente zur Invasion mit Suilyisin-positiven *S. suis* eine geringere Invasionsrate als mit den Suilyisin-negativen Stämmen. Dabei blieb die Integrität des

Zellmonolayers erhalten, was anhand der TEER erkennbar war. Es lag bei der verwendeten MOI von 10 also kein relevanter zytotoxischer Effekt durch Suilysin auf die PCPEC vor, da sich dies in einer deutlich verminderten TEER niedergeschlagen hätte. Vanier et al. konnten zeigen, dass die Zytotoxizität von Suilysin-positiven Stämmen konzentrationsabhängig ist, was durch das Austesten von reinem Suilysin, durch Elektronenmikroskopie und durch den Nachweis der fehlenden Toxizität von Suilysin-negativen Mutanten bestätigt wurde [11]. Erst ab einer Konzentration von 10^8 Bakterien/ml waren die Bakterien, die Suilysin produzierten, toxisch für PBMEC. Wahrscheinlich war die bakterielle Konzentration von 10^7 Bakterien/ml, die in den beschriebenen Versuchen dieser Dissertation verwendet wurde, zu gering oder die Exposition zu kurz um den zytotoxischen Effekt zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Es könnte sein, dass Suilysin-positive *S. suis*-Stämme nicht die direkte zelluläre Invasion nutzen, um eine Überwindung der epithelialen Barrieren zum ZNS zu erzielen, sondern dies mittels Adhärenz und zytotoxischer Zellzerstörung im Rahmen eines komplizierten und mehrstufigen Prozesses erreichen [104, 105]. Charland et al. zeigten 2006, dass Suilysin-positiv *S. suis*-Stämme nicht in BMEC invadierten, jedoch adhärten [105]. Sie postulierten, dass nach der Bindung an der Zelloberfläche die Produktion von Suilysin zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führe und so die Überwindung der Schranke ermöglicht werde. Dies wurde anhand der steigenden Zytotoxizität bei längerer Exposition und erhöhter Bakterienkonzentration belegt. Darüber hinaus verhindert freies Cholesterin als kompetitiver Inhibitor die Bindung des Toxins an die Zelloberfläche und Anti-Suilysin-Antikörper vermindern ebenfalls die Zytotoxizität von Suilysin-positiven *S. suis*-Stämmen auf BMEC [105].

Es gibt zudem Hinweise, dass die Zerstörung der Epithelbarriere durch Suilysin-produzierende Stämme auch indirekt durch die Beeinflussung von inflammatorischen Prozessen zustande kommt. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass *S. suis* die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 in PBMEC induziert [107]. Dabei war hauptsächlich das Suilysin für die Stimulation der Zellen verantwortlich und nur in geringerem Ausmaß bakterielle Wandbestandteile. Auch die Analyse von rekombinantem Suilysin zeigte, dass es nicht nur Zellen lysiert, sondern auch eine starke Entzündungsreaktion sowie eine Schädigung der Immunzellen verursacht, die zum Ort der Entzündung rekrutiert werden [108]. Durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren werden Leukozyten angelockt, die einen Zusammenbruch

der Blut-Hirn- [109], aber auch der Blut-Liquor-Schranke [110] verursachen können und damit die bakterielle Überwindung der Schranken erleichtern, was schließlich zur *S. suis*-Meningitis führt. Möglicherweise ist *S. suis* sogar fähig, diese Immunreaktion zu modulieren, indem es IL-8 abbaut, was eine Verzögerung der Rekrutierung von Immunzellen und damit ein erleichtertes Überleben des Bakteriums zur Folge hat [109].

Für Listeriolysin O, das Hämolysin von *Listeria monocytogenes* und ebenfalls ein Cholesterol-abhängiges Zytolysin, konnte gezeigt werden, dass es die extra- und intrazelluläre Signaltransduktion sowie die Zytoskelettregulation beeinflusst [111]. Es kann proinflammatorische Prozesse induzieren und erleichtern, bei denen die NF- κ B-Signalkaskade eine wichtige Rolle spielt. In Kombination mit Phospholipasen verändert es die kalzium- und lipidabhängigen Signalwege, die einen Umbau des Aktingerüsts zur Folge haben und somit die Invasion der Bakterien erleichtern. Die Ausschüttung von Kalzium wird zur intrazellulären Kommunikation gebraucht, um die Sekretion von Enzymen oder die Genexpression anzustoßen. Daher stellt die Listeriolysin-abhängige Kalziumausschüttung möglicherweise die molekulare Basis für die intrazelluläre Signaltransduktion während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* dar.

Das Suilysin scheint weiterhin eine wichtige Funktion beim Überleben im Blutstrom zu haben. Es ist auch für neutrophile Granulozyten toxisch, was bedeutet, dass *S. suis* auf diese Weise dem Immunsystem entgeht [106]. Darüber hinaus konnten in derselben Studie Hinweise darauf gefunden werden, dass Suilysin die komplementabhängige Elimination der Bakterien beeinflusste, indem es die Oponisierung von *S. suis* verminderte. Desweiteren resultierte aus dem Vergleich der Ko-Kultivierung eines Suilysin-positiven Stammes und seiner Suilysin-defizienten Mutante mit polymorphnukleären Zellen ein geringeres Überleben der Mutante [112]. Durch den Einsatz von Anti-Suilysin-Antikörpern und rekombinantem Suilysin konnte die Inhibition der Phagozytose unterstrichen werden. Benga et al. beschreiben außerdem, dass kinetische Experimente mit Granulozyten ergaben, dass das reduzierte Überleben der Mutante eventuell mit einer verstärkten Aufnahme in die polymorphnukleären Zellen einhergeht, wohingegen beide Stämme in ähnlichem Umfang adhärten [112].

Eine weitere mögliche Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse könnte sein, dass Suilysin eine Reaktion der PCPEC auslöst, die ein Invadieren von *S. suis* erschwert.

Bei Versuchen mit *Staphylococcus aureus* konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung der Produktion von α -Toxin eine gesteigerte bakterielle Adhäsion und Invasion in humane Lungenepithelzellen (A549) zur Folge hatte [113]. Gleichzeitig adhärten und invadierten die Bakterien sowohl bei einer erhöhten Produktion von α -Toxin als auch bei einer Zugabe von α -Toxin ins Kulturmedium weniger. Das α -Toxin interagiert dabei mit β 1-Integrin, einem Rezeptorprotein der Extrazellulärmatrix der Epithelzelle, und führt somit zu einer Integrin-vermittelten Interaktion zwischen Pathogen und Zelle. Es ist zu diskutieren, ob die Produktion des Hämolytins eher zu einem anderen Zeitpunkt des Infektionsgeschehens als bei der Überwindung der Epithelbarriere einen Vorteil für das Bakterium darstellt [113].

Die vorliegenden Ergebnisse mit einer höheren Invasionsrate der Suilysin-negativen Stämme spiegeln möglicherweise wieder, dass diese Stämme andere Mechanismen ohne direkte Zellschädigung nutzen, um in die Zelle zu gelangen. Interessanterweise sind die virulenten Stämme in Nordamerika nicht in der Lage Suilysin zu bilden [105]. Charland et al. beobachteten in der bereits erwähnten Studie keine Zytotoxizität der Suilysin-negativen Stämme, jedoch ebenfalls eine signifikant höhere Adhäsion [105]. Für Meningokokken und Pneumokokken wurde gezeigt, dass die Adhäsion an Endothelzellen zu einer Erweiterung oder Zerstörung der interzellulären Verbindungen führte, wofür jedoch nicht die Zytotoxinproduktion verantwortlich war [114, 115]. Auch für manche Suilysin-defiziente *S. suis*-Stämme konnte nachgewiesen werden, dass sie gehäuft in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten invadieren [101].

4.3 BEDEUTUNG DES ZYTOSKELETTS BEI DER INVASION VON *S. SUIS* IN PCPEC

Die Zelle erhält ihre Form und Stabilität durch das Zytoskelett, das unter anderem aus Aktinfilamenten aufgebaut ist. Diese Strukturen haben sich Bakterien zunutze gemacht, um in die Zelle zu gelangen oder um sie zu durchqueren. Ein spezieller Angriffspunkt ist die durch PI 3-Kinase vermittelte Signalkaskade. Sie moduliert viele Prozesse in der Zelle, die das Zytoskelett beeinflussen. Dazu zählen die Adhäsion, die Ausbreitung, die Makropinozytose und die Phagozytose [116, 117]. In den Invasionsexperimenten für die vorliegende Dissertation konnte eine Inhibition der Invasionsrate gezeigt werden, wenn das Aktinzytoskelett zuvor durch den PI 3-Kinase-Inhibitor Ly294002 moduliert wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass

sich *S. suis* ebenso wie beispielsweise *E. coli* diesen zelleigenen Mechanismus für die Infektion zunutze macht [42]. In einer anderen, vorhergehenden Dissertation an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie in Düsseldorf wurde die Transmigration von *S. suis*, also das Durchwandern der PCPEC, im Zusammenhang mit Ly294002 untersucht [101]. Nachdem die PCPEC ebenfalls 2 Stunden vor Infektion mit dem Inhibitor inkubiert worden waren, folgte der Transmigrationsversuch. Ly294002 inhibierte dabei signifikant die Transmigration der untersuchten Bakterienstämme. Außerdem wurde eine dosisabhängige Inhibition der Transmigration beobachtet, die 4 Stunden nach der Infektion zu 94 % ± 6 % (*S. suis Stamm 10*) und 82 % ± 5 % (*S. suis Stamm 10 Δ cps EF*) Inhibition führte, wenn eine Konzentration von 1 µM für Ly294002 verwendet wurde. Darüber hinaus kam es jedoch bei höheren Konzentrationen zu einem Verlust der Barrierefunktionen der PCPEC und es resultierte eine verminderte Inhibition der Transmigration. Zur Bestätigung der gefundenen Hemmwirkung durch Ly294002 auf die Transmigration wurde untersucht, ob das inaktive Analogon Ly303511 oder das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) einen Einfluss auf die Transmigration haben. Es ergab sich jedoch keinerlei inhibitorische Wirkung bei diesen Versuchen, womit die spezifische Wirkung von Ly294002 belegt wurde. Um zu bestätigen, dass der parazelluläre Weg von *S. suis* in dieser experimentellen Anordnung nicht zur Transmigration genutzt wurde, erfolgten dieselben Versuche mit Dexamethason. Dabei wurde keine signifikante Inhibition sowohl für den Wildtyp als auch für seine Kapsel-defiziente Mutante beobachtet. Für alle verwendeten Agenzien wurde im Vorfeld ein inhibitorischer Einfluss auf das Wachstum von *S. suis* ausgeschlossen. Ebenso zeigte sich in den Kontrollen keine signifikante Verminderung der TEER durch Ly294002 oder Ly303511 sowie Dexamethason. Störende Einflüsse durch die eingesetzten Agenzien auf die Versuche konnten somit sowohl für die Transmigrations- als auch für die in dieser Dissertation beschriebenen Invasionsversuche ausgeschlossen werden. Es kann also daraus geschlossen werden, dass sich eine Störung der PI 3-Kinase-Signalkaskade negativ auf die Invasion und Transmigration von *S. suis* in PCPEC auswirkt.

Ein weiterer Inhibitor, der in den Versuchen zum Einsatz kam, war das Cytochalasin D. Es hemmt die Aktinpolymerisation und induziert die Depolymerisation von Aktinfilamenten. Damit greift es in den Aufbau des Zytoskeletts der Zelle ein und schädigt es. In den Invasionsversuchen mit Cytochalasin D war eine verminderte

Invasionsrate für *S. suis* festzustellen, sowohl für den bekapselten als auch für den unbekapselten Stamm. Dies legt nahe, dass das Aktinzytoskelett der Zelle eine Rolle bei der Invasion der Bakterien spielt. Unglücklicherweise war eine Untersuchung der Transmigration mit Cytochalasin D nicht möglich, da die Substanz eine Öffnung der tight junctions und somit eine Beeinträchtigung der Epithelbarrierefunktion zur Folge hat.

Für *E. coli* K1, Streptokokken der Gruppe B und *Listeria monocytogenes* konnte in verschiedenen Studien an BMEC gezeigt werden, dass Veränderungen am Zytoskelett eine Voraussetzung für die Invasion sind, jedoch bei der Transmigration durch die Zelle Unterschiede bestehen [42]. So ergab sich für *E. coli* in Versuchen, bei denen unter anderem der Einfluss von Ly294002 untersucht wurde, dass die Aktivierung der PI 3-Kinase, die assoziiert ist mit der fokalen Adhäsionskinase (FAK), für die Invasion in BMEC erforderlich ist [118].

Weitere Effektormoleküle, die Teil der PI 3-Kinase-Signalkaskade sind und bei zellulären Prozessen wie Umbauvorgängen des Zytoskeletts und Aktivierung von Makrophagen beteiligt sind, sind die Proteinkinase Akt und die Enzyme, die zu der Familie der Proteinkinase C zählen [119, 120]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es in Makrophagen von Mäusen zu einer Hemmung der Aktivierung der PI 3-Kinase/Aktin/Proteinkinase C-Signalkaskade durch unbekapselte *S. suis* kam, die an den Mechanismen der Phagozytose beteiligt ist [121]. Die Untersuchungen am Elektronenmikroskop (siehe Abbildung 6) zeigten, dass die Aufnahme von *S. suis* in die PCPEC häufig in membrangebundenen Vakuolen stattfindet. Außerdem scheint *S. suis* die Zellen in diesen Vakuolen zu durchqueren. In Hep-2-Zellen, die mit *S. suis* infiziert wurden, hielten sich die intrazellulären Streptokokken deutlich sichtbar in Phagolysosomen-ähnlichen Vakuolen auf [82]. In diesen Prozess der Transzytose ist die PI 3-Kinase involviert. Sie spielt eine Rolle für die Bereitstellung der frühen Endosomenproteine und anschließend für die Bewegung entlang der Mikrotubuli [116, 117]. Auch für andere Epithelzellen ist die PI 3-Kinase zur Invasion und Transzytose von verschiedenen Bakterien vonnöten.

Für *S. agalactiae*, Streptokokken der Gruppe B, konnte gezeigt werden, dass das Aktin des Zytoskeletts bei der Invasion in HeLa-Zellen, eine Epithelzellreihe, involviert ist [122]. Tyrrell et al. fanden heraus, dass dieser Invasionsprozess durch Cytochalasin D unterbrochen werden kann und Wortmannin, ein dem Ly294002 ähnlicher PI 3-Kinasehemmer, die Invasion der HeLa-Zellen inhibiert. Auch *Listeria*

monocytogenes benötigt für die Invasion die PI 3-Kinase [123]. Kwok et al. präsentierten eine Studie mit *Helicobacter pylori* und Magenepithelzellen, in der Wortmannin die Invasion inhibierte ebenso wie der Proteinkinase C-Hemmer Calphostin C [124].

Aufgrund der oben geschilderten Ergebnisse und der Belege in zahlreichen Studien ist ein Einfluss von *S. suis* auf das Zytoskelett der PCPEC sehr wahrscheinlich. Es müssen jedoch weitere Studien folgen, um die genauen Mechanismen der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts zu verstehen und herauszufinden, welchen Weg *S. suis* durch die Zelle nimmt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

S. suis Serotyp 2 ist ein wichtiges weltweit vorkommendes Bakterium, das unter anderem Meningitis bei Schweinen und als Zoonose auch bei Menschen verursacht. Den Zugang zum ZNS erlangt *S. suis* nach Überwindung der epithelialen Barrieren, der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke. Bei der Infektion spielen die Virulenzfaktoren Kapsel und Suilysin eine wichtige Rolle. Darüber hinaus scheint der Erreger, das Zytoskelett der porcinen Plexusepithelzellen für die Invasion zu nutzen. Erstmals konnte mit der Umkehrkultur ein *in vitro*-Modell etabliert werden, das die pathophysiologischen Verhältnisse der Überwindung der Blut-Liquor-Schranke abbildet; die über das apikale Filterkompartiment applizierten Bakterien gelangen von der basolateralen Zellseite von der Blut- auf die apikale Liquorseite. Dabei invadierten kapsellose Bakterien weniger als die bekapselten, sodass die Kapsel bei der Überwindung der epithelialen Barriere eher störend erscheint, ihre Funktion im Blutstrom jedoch für das Bakterium von Vorteil ist.

S. suis-Stämme, die befähigt sind das Hämolysin Suilysin zu bilden, zeigten eine signifikant geringere Invasionsrate als ihre Mutanten, die kein Suilysin produzieren. Möglicherweise nutzen Suilysin-produzierende Stämme die direkte und über inflammatorische Prozesse indirekte Zytotoxizität, um über die Blut-Liquor-Schranke hinweg zu gelangen, während die dazu nicht befähigten Stämme diese Barriere transzellulär überwinden. Die *S. suis*-Stämme ohne Suilysin waren fähig intrazellulär zu überleben.

Zur Betrachtung der Invasion bei Veränderungen des Zytoskeletts der PCPEC wurden Ly294002, ein spezifischer Inhibitor der PI-3-Kinase, und Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktinpolymerisation, verwendet. Die Experimente ergaben eine signifikant geringere Invasionsrate bei mit den genannten Inhibitoren vorbehandelten Zellen als bei unbehandelten Plexusepithelzellen. Dies weist darauf hin, dass das Aktinzytoskelett maßgeblich an der Invasion von *S. suis* in PCPEC beteiligt ist.

Die Daten zeigen, dass *S. suis* über verschiedene Mechanismen befähigt ist, die Blut-Liquor-Schranke zu überwinden. Weitere Studien sind nötig um Erkenntnisse zu gewinnen, die dazu beitragen, Erkrankungen wie die Meningitis besser zu verstehen und somit auch besser therapieren zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Spector, R. and C.E. Johanson, *The mammalian choroid plexus*. Scientific American, 1989. 261(5): p. 68-74.
2. Ballabh, P., et al., *The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications*. Neurobiol Dis, 2004. 16(1): p. 1-13.
3. Wolburg, H. and W. Paulus, *Choroid plexus: biology and pathology*. Acta Neuropathologica, 2009. 119: p. 75-88.
4. Haselbach, M., et al., *Porcine Choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes*. Microscopy Research and Technique, 2001. 52(1): p. 137-152.
5. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier biology and methodology*. J Neurovirol, 1999. 5(6): p. 556-569.
6. Wegener, J. and H.J. Galla, *The role of non-lamellar lipid structures in the formation of tight junctions*. Chemistry and Physics of Lipids, 1996. 81: p. 229-255.
7. Leonhardt, H., *Ependym und circumventriculäre Organe*, in *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, A. Oksche and L. Vollrath, Editors. 1980, Springer: Berlin. p. 177-666.
8. Huang, S.H., et al., *Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis*. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 2000. 2(10): p. 1237-1244.
9. Kim, K.S., *Microbial translocation of the blood-brain barrier*. International Journal for Parasitology, 2006. 36(5): p. 607-614.
10. Kim, K.S., et al., *Blood-brain barrier permeability during the development of experimental bacterial meningitis in the rat*. Experimental Neurology, 1997. 145(1): p. 253-257.
11. Vanier, G., et al., *Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by Streptococcus suis serotype 2*. Infection and Immunity, 2004. 72(3): p. 1441-1449.
12. Zheng, W., Chodobski, A., *The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier*. 2005: CRC Press.
13. Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, *Handbuch, Infektionen bei Kindern und Jugendlichen*, 5. Auflage, 2009, Thieme: Stuttgart.
14. Staats, J.J., et al., *Streptococcus suis: past and present*. Veterinary Research Communications, 1997. 21(6): p. 381-407.
15. Lun, Z.R., et al., *Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen*. The Lancet Infectious Diseases, 2007. 7(3): p. 201-209.
16. Gottschalk, M., et al., *Description of 14 new capsular types of Streptococcus suis*. Journal of Clinical Microbiology, 1989. 27(12): p. 2633-2636.

17. Gottschalk, M., et al., *Characterization of six new capsular types (23 through 28) of Streptococcus suis*. Journal of Clinical Microbiology, 1991. 29(11): p. 2590-2594.
18. Gottschalk, M., et al., *Immunomagnetic isolation of Streptococcus suis serotypes 2 and 1/2 from swine tonsils*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. 37(9): p. 2877-2881.
19. Gottschalk, M., et al., *Isolation and characterization of Streptococcus suis capsular types 9-22*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1991. 3(1): p. 60-65.
20. Higgins, R., et al., *Description of six new capsular types (29-34) of Streptococcus suis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1995. 7(3): p. 405-406.
21. Hill, J.E., et al., *Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that Streptococcus suis serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are Streptococcus orisratti*. Veterinary Microbiology, 2005. 107(1-2): p. 63-69.
22. Clifton-Hadley, F.A. and M.R. Enright, *Factors affecting the survival of Streptococcus suis type 2*. The Veterinary Record, 1984. 114(24): p. 584-586.
23. Gottschalk, M. and M. Segura, *The pathogenesis of the meningitis caused by Streptococcus suis: the unresolved questions*. Veterinary Microbiology, 2000. 76(3): p. 259-272.
24. Higgins, R., et al., *Streptococcus suis infection in swine. A sixteen month study*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1990. 54(1): p. 170-173.
25. Arends, J.P. and H.C. Zanen, *Meningitis caused by Streptococcus suis in humans*. Reviews of Infectious Diseases, 1988. 10(1): p. 131-137.
26. Smith, H.E., et al., *Virulence markers of Streptococcus suis type 1 and 2*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1997. 418: p. 651-655.
27. Winterhoff, N., et al., *Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of Streptococcus suis with high homologies to members of the Arginine Deiminase system of Streptococcus pyogenes*. Journal of Bacteriology, 2002. 184(24): p. 6768-6776.
28. Courtney, H.S., et al., *Serum opacity factor, a streptococcal virulence factor that binds to apolipoproteins A-I and A-II and disrupts high density lipoprotein structure*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(9): p. 5515-5521.
29. Smith, H.E., et al., *Identification and characterization of the cps locus of Streptococcus suis serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor*. Infection and Immunity, 1999. 67(4): p. 1750-1756.
30. Jacques, M., et al., *Ultrastructural study of surface components of Streptococcus suis*. Journal of Bacteriology, 1990. 172(6): p. 2833-2838.
31. Gottschalk, M., et al., *Production of capsular material by Streptococcus suis serotype 2 under different growth conditions*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1993. 57(1): p. 49-52.

32. Charland, N., et al., *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, 1998. 144 (Pt 2): p. 325-332.
33. Charland, N., et al., *Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of Streptococcus suis capsular type 2*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1996. 14(4): p. 195-203.
34. Segers, R.P., et al., *Characterisation of the gene encoding suilysin from Streptococcus suis and expression in field strains*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998. 167(2): p. 255-261.
35. St Geme, J.W., 3rd and D. Cutter, *Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by Haemophilus influenzae type b*. *Molecular Microbiology*, 1996. 21(1): p. 21-31.
36. Williams, A.E. and W.F. Blakemore, *Pathogenesis of meningitis caused by Streptococcus suis type 2*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1990. 162(2): p. 474-481.
37. Nizet, V., et al., *Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci*. *Infection and Immunity*, 1997. 65(12): p. 5074-5081.
38. Ring, A., et al., *Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. 102(2): p. 347-360.
39. Stins, M.F., et al., *Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells*. *Microbial Pathogenesis*, 2001. 30(1): p. 19-28.
40. Greiffenberg, L., et al., *Interaction of Listeria monocytogenes with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells*. *Infection and Immunity*, 1998. 66(11): p. 5260-5267.
41. Unkmeir, A., et al., *Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of Neisseria meningitidis in human brain microvascular endothelial cells*. *Molecular Microbiology*, 2002. 46(4): p. 933-946.
42. Kim, K.S., *Emerging molecular targets in the treatment of bacterial meningitis*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2003. 7(2): p. 141-152.
43. Kim, K.S., *Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2003. 4(5): p. 376-385.
44. Jedrzejewski, M.J., *Pneumococcal virulence factors: structure and function*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001. 65(2): p. 187-207 ; first page, table of contents.
45. Norton, P.M., et al., *Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of Streptococcus suis is enhanced by the presence of suilysin*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999. 26(1): p. 25-35.
46. Tunkel, A.R., et al., *Pathophysiology of blood-brain barrier alterations during experimental Haemophilus influenzae meningitis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1992. 165 Suppl 1: p. 119-120.

47. Sukumaran, S.K. and N.V. Prasadarao, *Escherichia coli K1 invasion increases human brain microvascular endothelial cell monolayer permeability by disassembling vascular-endothelial cadherins at tight junctions*. The Journal of Infectious Diseases, 2003. 188(9): p. 1295-1309.
48. Cundell, D.R., et al., *Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor*. Nature, 1995. 377(6548): p. 435-438.
49. Burns, A.R., et al., *Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners*. Journal of Immunology, 1997. 159(6): p. 2893-2903.
50. Dejana, E., et al., *Adhesive proteins at endothelial cell-to-cell junctions and leukocyte extravasation*. Haemostasis, 1996. 26 Suppl 4: p. 210-219.
51. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Review Immunology, 2007. 7(9): p. 678-689.
52. Drevets, D.A. and P.J. Leenen, *Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system*. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 2000. 2(13): p. 1609-1618.
53. Valentin-Weigand, P., et al., *Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages*. Infection and Immunity, 1996. 64(7): p. 2467-2473.
54. Weiser, J.N., et al., *Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. 100(7): p. 4215-4220.
55. Gamper, M., et al., *Anaerobic regulation of transcription initiation in the arcDABC operon of Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 1991. 173(15): p. 4742-4750.
56. Degan, B.A., et al., *Characterization of an isogenic mutant of Streptococcus pyogenes Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein*. Infection and Immunity, 2000. 68(5): p. 2441-2448.
57. Gruenheid, S. and B.B. Finlay, *Microbial pathogenesis and cytoskeletal function*. Nature, 2003. 422(6933): p. 775-781.
58. May, R.C. and L.M. Machesky, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. Journal of Cell Science, 2001. 114(Pt 6): p. 1061-1077.
59. Amyere, M., et al., *Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis*. International Journal of Medical Microbiology, 2002. 291(6-7): p. 487-494.
60. Zhou, D. and J. Galan, *Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins*. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 2001. 3(14-15): p. 1293-1298.
61. Terebiznik, M.R., et al., *Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella*. Nature Cell Biology, 2002. 4(10): p. 766-773.

62. Meresse, S., et al., *Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death*. Nature Cell Biology, 1999. 1(7): p. E183-188.
63. Brumell, J.H., et al., *SifA permits survival and replication of Salmonella typhimurium in murine macrophages*. Cellular Microbiology, 2001. 3(2): p. 75-84.
64. Beuzon, C.R., et al., *Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA*. The EMBO Journal, 2000. 19(13): p. 3235-3249.
65. Ruiz-Albert, J., et al., *Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the Salmonella typhimurium vacuolar membrane*. Molecular Microbiology, 2002. 44(3): p. 645-661.
66. Meresse, S., et al., *Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella*. Cellular Microbiology, 2001. 3(8): p. 567-577.
67. Caron, E., *Regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and related molecules*. Current Opinion in Cell Biology, 2002. 14(1): p. 82-87.
68. Adam, R. and H. Schroten, *Pathogenese der bakteriellen Meningitis*. Monatszeitschrift Kinderheilkunde, 2004. 152: p. 362-370.
69. van Deuren, M., et al., *Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management*. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1): p. 144-166, table of contents.
70. van Schilfgaarde, M., et al., *Cloning of genes of nontypeable Haemophilus influenzae involved in penetration between human lung epithelial cells*. Infection and Immunity, 2000. 68(8): p. 4616-4623.
71. Kim, K.S., *Strategy of Escherichia coli for crossing the blood-brain barrier*. The Journal of Infectious Diseases, 2002. 186 Suppl 2: p. 220-224.
72. Zelmer, A., et al., *Differential expression of the polysialyl capsule during blood-to-brain transit of neuropathogenic Escherichia coli K1*. Microbiology, 2008. 154(Pt 8): p. 2522-2532.
73. Pron, B., et al., *Interaction of Neisseria meningitidis with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PtlC*. The Journal of Infectious Diseases, 1997. 176(5): p. 1285-1292.
74. Smith, A.L., *Pathogenesis of Haemophilus influenzae meningitis*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 1987. 6(8): p. 783-786.
75. Adam, R.A., et al., *Porcine choroid plexus epithelial cells induce Streptococcus suis bacteriostasis in vitro*. Infection and Immunity, 2004. 72(5): p. 3084-3087.
76. Koedel, U., et al., *Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis*. The Lancet Infectious Diseases, 2002. 2(12): p. 721-736.
77. Gath, U., et al., *Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components*. European Journal of Cell Biology, 1997. 74(1): p. 68-78.

78. Crook, R.B., et al., *Culture and characterization of epithelial cells from bovine choroid plexus*. Journal of Neurochemistry, 1981. 37(4): p. 845-854.
79. Hakvoort, A., et al., *The polarity of choroid plexus epithelial cells in vitro is improved in serum-free medium*. Journal of Neurochemistry, 1998. 71(3): p. 1141-1150.
80. Garrod, D. and J. Collins, *Intercellular Junctions and Cell Adhesion in Epithelial Cells*, in *Epithelial Organization and Development*, T.P. Flemming, Editor. 1992, Chapman and Hall: London. p. 1-53.
81. Lewis, S.A., et al., *Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules*. Physiological Reviews, 1995. 75(3): p. 561-589.
82. Benga, L., et al., *Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of Streptococcus suis in epithelial cells*. Cellular Microbiology, 2004. 6(9): p. 867-881.
83. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. The Journal of Biological Chemistry, 1994. 269(7): p. 5241-5248.
84. Vanhaesebroeck, B., et al., *P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. 94(9): p. 4330-4335.
85. Majka, M., et al., *Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis*. Blood, 2000. 96(13): p. 4142-4151.
86. Gagnon, A., et al., *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate is required for insulin-like growth factor 1-mediated survival of 3T3-L1 preadipocytes*. Endocrinology, 2001. 142(1): p. 205-212.
87. Nesterov, A., et al., *Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(14): p. 10767-10774.
88. Bilderback, T.R., et al., *Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways*. Journal of Neurochemistry, 2001. 76(5): p. 1540-1551.
89. Sanford, S.E., *Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by Streptococcus suis in pigs. II. Central nervous system lesions*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1987. 51(4): p. 486-489.
90. Madsen, L.W., et al., *Streptococcus suis serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects*. Journal of Comparative Pathology, 2002. 126(1): p. 57-65.
91. Daum, R.S., et al., *Ventricular involvement in experimental Haemophilus influenzae meningitis*. The Journal of Pediatrics, 1978. 93(6): p. 927-930.
92. Smith, A.L., et al., *Experimental meningitis in the rat: Haemophilus influenzae*. Infection, 1984. 12 Suppl 1: p. 511-522.

93. Parkkinen, J., et al., *Binding sites in the rat brain for Escherichia coli S fimbriae associated with neonatal meningitis*. The Journal of Clinical Investigation, 1988. 81(3): p. 860-865.
94. Prats, N., et al., *Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with Listeria monocytogenes*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1992. 11(8): p. 744-747.
95. Fleiszig, S.M., et al., *Epithelial cell polarity affects susceptibility to Pseudomonas aeruginosa invasion and cytotoxicity*. Infection and Immunity, 1997. 65(7): p. 2861-2867.
96. Gaillard, J.L. and B.B. Finlay, *Effect of cell polarization and differentiation on entry of Listeria monocytogenes into the enterocyte-like Caco-2 cell line*. Infection and Immunity, 1996. 64(4): p. 1299-1308.
97. Mounier, J., et al., *Shigella flexneri enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole*. Infection and Immunity, 1992. 60(1): p. 237-248.
98. Fuller, S., et al., *Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK*. Cell, 1984. 38(1): p. 65-77.
99. Basak, S. and R.W. Compans, *Polarized entry of canine parvovirus in an epithelial cell line*. Journal of Virology, 1989. 63(7): p. 3164-3167.
100. Topp, K.S., et al., *Herpes virus infection of RPE and MDCK cells: polarity of infection*. Experimental Eye Research, 1997. 64(3): p. 343-354.
101. Tenenbaum, T., et al., *Polar bacterial invasion and translocation of Streptococcus suis across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro*. Cellular Microbiology, 2009. 11(2): p. 323-336.
102. Vercellotti, G.M., et al., *Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism*. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1984. 103(1): p. 34-43.
103. Esgleas, M., et al., *Streptococcus suis serotype 2 binding to extracellular matrix proteins*. FEMS Microbiology Letters, 2005. 244(1): p. 33-40.
104. Lalonde, M., et al., *Interactions between Streptococcus suis serotype 2 and different epithelial cell lines*. Microbiology, 2000. 146 (Pt 8): p. 1913-1921.
105. Charland, N., et al., *Streptococcus suis serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells*. Infection and Immunity, 2000. 68(2): p. 637-643.
106. Chabot-Roy, G., et al., *Phagocytosis and killing of Streptococcus suis by porcine neutrophils*. Microbial Pathogenesis, 2006. 41(1): p. 21-32.
107. Vanier, G., et al., *New putative virulence factors of Streptococcus suis involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells*. Microbial Pathogenesis, 2009. 46(1): p. 13-20.
108. Du, H., et al., *[Biological profiles of recombinant Suilysin]*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2009. 49(6): p. 792-798.

109. Vanier, G., et al., *Porcine brain microvascular endothelial cell-derived interleukin-8 is first induced and then degraded by Streptococcus suis*. *Microbial Pathogenesis*, 2009. 46(3): p. 135-143.
110. Tenenbaum, T., et al., *Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by Streptococcus suis in vitro*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2005. 44(1): p. 25-34.
111. Kayal, S. and A. Charbit, *Listeriolysin O: a key protein of Listeria monocytogenes with multiple functions*. *FEMS Microbiol Rev*, 2006. 30(4): p. 514-529.
112. Benga, L., et al., *Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of Streptococcus suis co-cultivated with primary porcine phagocytes*. *Veterinary Microbiology*, 2008. 132(1-2): p. 211-219.
113. Liang, X. and Y. Ji, *Alpha-toxin interferes with integrin-mediated adhesion and internalization of Staphylococcus aureus by epithelial cells*. *Cellular Microbiology*, 2006. 8(10): p. 1656-1668.
114. Virji, M., et al., *Variations in the expression of pili: the effect on adherence of Neisseria meningitidis to human epithelial and endothelial cells*. *Molecular Microbiology*, 1992. 6(10): p. 1271-1279.
115. Geelen, S., et al., *The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells*. *Infection and Immunity*, 1993. 61(4): p. 1538-1543.
116. Gaullier, J.M., et al., *FYVE fingers bind PtdIns(3)P*. *Nature*, 1998. 394(6692): p. 432-433.
117. Nielsen, E., et al., *Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules*. *Nature Cell Biology*, 1999. 1(6): p. 376-382.
118. Reddy, M.A., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase activation and interaction with focal adhesion kinase in Escherichia coli K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(47): p. 36769-36774.
119. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(48): p. 28495-28498.
120. Chan, T.O., et al., *AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation*. *Annual Review of Biochemistry*, 1999. 68: p. 965-1014.
121. Segura, M., et al., *Encapsulated Streptococcus suis inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis*. *Infection and Immunity*, 2004. 72(9): p. 5322-5330.
122. Tyrrell, G.J., et al., *Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by Streptococcus agalactiae*. *Microbiology*, 2002. 148(Pt 12): p. 3921-3931.
123. Ireton, K., et al., *A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion*. *Science*, 1996. 274(5288): p. 780-782.

124. Kwok, T., et al., *Specific entry of Helicobacter pylori into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism*. Infection and Immunity, 2002. 70(4): p. 2108-2120.

7 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: verwendete Stämme von <i>S. suis</i>	21
Tabelle 2: Zellkulturmaterialien	22
Tabelle 3: Inkubationsmedien	22
Tabelle 4: Gebrauchslösungen Zellkultur	23
Tabelle 5: Pharmaka und Agenzien	24
Tabelle 6: Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper und Inhibitoren	25
Tabelle 7: Gebrauchslösungen Doppelimmunfluoreszenz	25
Tabelle 8: Instrumente und Geräte	26
Abbildung 1: Der Plexus choroideus <i>aus</i> http://education.vetmed.vt.eduCurriculumVM8054LabsLab9Lab9.htm	3
Abbildung 2: Penetrationswege von Bakterien (Erläuterungen siehe Text) <i>aus Adam, R. und H. Schroten, Pathogenese der bakteriellen Meningitis. Monatszeitschrift Kinderheilkunde, 2004. 152: p. 362-370.</i>	11
Abbildung 3: Pathogenese der bakteriellen Meningitis (Erläuterungen siehe Text) <i>aus Adam, R. and H. Schroten, Pathogenese der bakteriellen Meningitis. Monatszeitschrift Kinderheilkunde, 2004. 152: p. 362-370.</i> BHS = Blut-Hirn-Schranke, BLS = Blut-Liquor-Schranke.	16
Abbildung 4: Entwicklung der Umkehrkultur als Modell der Blut-Liquor-Schranke, <i>Abbildung modifiziert aus Tenenbaum, T., et al., Polar bacterial invasion and translocation of Streptococcus suis across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. Cellular Microbiology, 2009. 11(2): p. 323-336.</i>	29
Abbildung 5: Adhäsion und Invasion von bekapselten <i>S. suis</i> (A + B) und unbekapselten (C + D) an bzw. in PCPEC, kultiviert als Umkehrkultur (E + F) und als Standard Transwell System (G + H), dargestellt mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie.	40
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Invasion von <i>S. suis</i> Stamm 10 und seiner unbekapselten Mutante im Standard Transwell System und in der Umkehrkultur.	42
Abbildung 7: Mittels Doppelimmunfluoreszenz ermittelter Vergleich der Invasion zwischen lebenden und UV-inaktivierten <i>S. suis</i> in PCPEC.	44
Abbildung 8: Dreidimensionale Darstellung der Invasion von <i>S. suis</i> Stamm 10 Δ <i>cps</i> <i>EF</i> durch PCPEC.	45
	76

Abbildung 9: Invasion in PCPEC zweier verschiedener <i>S. suis</i> -Stämme mit ihren jeweiligen Suilysin-defizienten Mutanten nach 4 Stunden Infektion.	46
Abbildung 10: Invasion von Suilysin-positiven (A + C) versus Suilysin-negativen (B + D) <i>S. suis</i> -Stämmen.	47
Abbildung 11: Dreidimensionale Darstellung der Invasion von <i>S. suis</i> Wildtyp Stamm SX 332 durch PCPEC.	48
Abbildung 12: Dreidimensionale Aufnahme der Invasion von <i>S. suis</i> Δ <i>Suilysin</i> Stamm SX 917.	49
Abbildung 13: TEER bei der Invasion von <i>S. suis</i> und seinen Suilysin-defizienten Mutanten in PCPEC.	50
Abbildung 14: Das intrazelluläre Überleben von <i>S. suis</i> 9657573 und <i>S. suis</i> SX917 (<i>Sly</i> -) in PCPEC.	51
Abbildung 15: Das extrazelluläre Wachstum von <i>S. suis</i> 9657573 und <i>S. suis</i> SX917 (<i>Sly</i> -) zu den Zeitpunkten 2 h und 4 h in SFM bei 37 °C und 5 % CO ₂ .	52
Abbildung 16: Mittels Doppelimmunfluoreszenz ermittelte Inhibition der Invasion von <i>S. suis</i> in PCPEC durch Ly294002 und Cytochalasin D.	54
Abbildung 17: Inhibition der Invasion von <i>S. suis</i> in PCPEC durch Ly294002 und Cytochalasin D, erhoben mittels Doppelimmunfluoreszenz.	55

8 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Dorothee Gellrich
Anschrift	Weierhofgasse 13 9500 Wil Schweiz
E-Mail	dorothee.gellrich@web.de
Geburtsdatum	25.11.1983
Geburtsort	Düsseldorf
Zivilstand	ledig

Schulbildung

09/93 – 06/03	Gymnasium Eppingen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/90 – 07/93	Grundschule Massenbachhausen

Hochschulbildung

10/03 – 12/09	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
05.09.2005	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppO),
08.12.2009	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
13.01.2010	Erteilung der Approbation als Ärztin

Dissertation

Titel:	Untersuchung der Mechanismen der Invasion von <i>Streptococcus suis</i> an primären porcinen choroidalen Plexusepithelzellen
--------	--

Beruflicher Werdegang

seit 01.03.2011	Assistenzärztin Innere Medizin, SRFT, Spital Wil SG, Schweiz
03/10 – 02/11	Assistenzärztin Chirurgie, SRFT, Spital Wil SG, Schweiz

9 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. An erster Stelle geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. med. Horst Schroten und Herrn PD Dr. med. Tobias Tenenbaum für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende fachliche Unterstützung. Vielen Dank auch an das Team des Infektiologielabors der Universitätskinderklinik Düsseldorf, allen voran Annette Seibt, die mir bei allen Experimenten und deren Auswertungen mit Rat und Tat zu Seite stand, ebenso wie Marie-Luise Mölleken und Corinna Wewer.

Meinen Eltern danke ich für das stete Aufmuntern am Ball zu bleiben und den Rückhalt, den sie mir während des gesamten Studiums gaben. Bei meinen Geschwistern, allen Freunden und Verwandten bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und ein offenes Ohr bei Erfolgen und Rückschlägen.