

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Untersuchung der Barrierschädigung des choroidalen Plexusepithels

durch *Streptococcus suis* und deren pharmakologischen

Beeinflussbarkeit

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

David Matalon

2016

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker  
Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Horst Schrotten  
Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

„Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis in vitro*“ (Tenenbaum T, Adam R, Eggelnpöhler I, Matalon D, Seibt A, K Novotny GE, Galla HJ, Schrotten H, FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Apr 1;44(1):25-34)

„Dexamethasone prevents alteration of *tight junction*-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis in vitro*“ (Tenenbaum T, Matalon D, Adam R, Seibt A, Wewer C, Schwerk C, Galla HJ, Schrotten H, Brain Res. 2008 Sep 10;1229:1-17)

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ARA-C	Cytosinarabinosid
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CCH – Platte	Blut-Agar-Platte
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CHX	Cycloheximide
CP	choroidaler Plexus
CPE	choroidales Plexusepithel
cpm	<i>counts per minute</i>
CPS	Kapsuläres Polysaccharid
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit, Liquor cerebrospinalis
DMEM / Hams F12	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
Dexa	Dexamethason
EF	<i>extracellular protein factor</i>
Ex 650	0,650nm Extinktion
FCS	Fötale Kälberserum
GC	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-γ
Konz.	Konzentration
Lsg.	Lösung

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRP	<i>muraminidase released protein</i>
ONC	<i>over night culture/ Übernachtkultur</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Plexus choroideus
PCP	porciner choroidaler Plexus
PCPEC	porcine choroidale Plexusepithelzellen
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SFM	serumfreies Medium
SOD	Superoxiddismutase
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> = Transepithelialer elektischer Widerstand
THB	Todd-Hewitt broth
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor - alpha
TJ	<i>Tight junction</i>
TJs	<i>Tight junctions</i> (Mehrzahl von TJ)
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO – 1	<i>Zonula occludens – 1</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Veröffentlichungen</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Akute bakterielle Meningitis</b>	<b>10</b>
1.1.1 Epidemiologie	11
1.1.2 Pathogenese	12
1.1.3 Klinik	14
1.1.4 Diagnostik	14
1.1.5 Komplikationen, Folgeschäden und Prognose	15
1.1.6 Medikamentöse Therapie	16
<b>1.2 Barrieren im ZNS</b>	<b>16</b>
1.2.1 Die Blut-Hirn-Schranke	17
1.2.2 Die Blut-Liquor-Schranke	17
1.2.3 Lokalisation und Aufbau des choroidalen Plexus	18
1.2.4 Eigenschaften und Kennzeichen der choroidalen Plexusepithelzellen	18
<b>1.3 <i>Streptococcus suis</i></b>	<b>20</b>
1.3.1 Charakterisierung von <i>S. suis</i>	20
1.3.2 Pathogenese der <i>S. suis</i> – Infektion	23
1.3.3 Pathogenitätsfaktoren von <i>S. suis</i>	26
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>29</b>
2.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial	29

2.1.2	Enzyme und Sera	32
2.1.3	Pharmaka und Agenzien	32
2.1.4	Instrumente und Geräte	32
2.1.5	Inhibitoren	35
<b>2.2</b>	<b>Das Filtermodell</b>	<b>39</b>
2.2.1	Isolierung von porcinen choroidalen Plexusepithelzellen (PCPEC)	40
2.2.2	Messung des Transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bei PCPEC	41
2.2.3	Messung des parazellulären Mannitolfusses bei PCPEC	42
<b>2.3</b>	<b><i>Streptococcus suis</i></b>	<b>45</b>
2.3.1	Serotyp 2 Stämme	45
2.3.2	Anzucht der Lebendkeime	46
2.3.3	Herstellung von UV - inaktivierten Keimen	47
2.3.4	Herstellung sterilfiltrierter US – Überstände	48
<b>2.4</b>	<b>Versuchsdurchführungen</b>	<b>49</b>
2.4.1	Aufbau der Vorversuche	49
2.4.2	Aufbau der Hauptversuche	51
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Schädigung der Barrierefunktion durch <i>S. suis</i> Lebendkeim</b>	<b>53</b>
3.1.1	Effekt auf den TEER	53
3.1.2	Effekt auf den parazellulären Mannitolfuss	53
<b>3.2</b>	<b>Schädigung der Barrierefunktion durch UV - inaktivierten <i>S. suis</i></b>	<b>53</b>
3.2.1	Effekt auf den TEER	54
3.2.2	Effekt auf den parazellulären Mannitolfuss	56

<b>3.3</b>	<b>Schädigung der Barrierefunktion durch US - sterilfiltrierte Überstände von <i>S. suis</i></b>	<b>58</b>
3.3.1	Effekt auf den TEER	58
3.3.2	Effekt auf den parazellulären Mannitoffluss	60
<b>3.4</b>	<b>Effekt von zellulären Inhibitoren auf das bakterielle Wachstum und die Barrierefunktion von PCPEC</b>	<b>61</b>
3.4.1	Einfluss von zellulären Inhibitoren auf das bakterielle Wachstum	61
3.4.2	Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC	62
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Infektion mit <i>S. suis</i></b>	<b>63</b>
3.5.1	Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Infektion mit <i>S. suis</i> - Lebendkeim	63
3.5.2	Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Stimulation mit UV - inaktivierten <i>S. suis</i>	63
3.5.3	Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Stimulation mit sterilfiltrierten US - Überständen von <i>S. suis</i>	63
<b>3.6</b>	<b>Einfluss des zellulären Inhibitors Dexamethason auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Stimulation mit <i>S. suis</i></b>	<b>64</b>
3.6.1	Einfluss von Dexamethason auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Infektion mit <i>S. suis</i> – Lebendkeim	64
3.6.1.1	Effekt auf den TEER	65
3.6.1.2	Effekt auf den parazellulären Mannitoffluss	66
3.6.2	Einfluss von Dexamethason auf die Barrierefunktion nach Stimulation mit UV - inaktiviertem <i>S. suis</i>	67
3.6.2.1	Effekt auf den TEER	67
3.6.2.2	Effekt auf den parazellulären Mannitoffluss	68



3.6.3	Einfluss von Dexamethason auf die Barrierefunktion nach Stimulation mit sterilfiltrierten US-Überständen des <i>S.suis</i>	70
3.6.3.1	Effekt auf den TEER	70
3.6.3.2	Effekt auf den parazellulären Mannitoffluss	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Schädigung der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke bei akuter bakterieller Meningitis	73
4.2	Mechanismen der Schädigung der Barrierefunktion von PCPEC durch <i>S.suis</i>	75
4.3	Rolle von Dexamethason bei Patienten mit akuter bakterieller Meningitis	78
4.4	Protektiver Effekt von Dexamethason auf die Barrierefunktion von PCPEC während einer <i>S. suis</i> -Meningitis	80
4.5	Potentielle alternative adjuvante Therapien bei akuter bakterieller Meningitis	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>109</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute bakterielle Meningitis

Die bakterielle Meningitis ist eine Entzündung der drei Hirn- und Rückenmarkshäute Pia mater, Arachnoidea und Dura mater. Durch die Einführung der Antibiotikatherapie in der Mitte des 20. Jahrhunderts (erste Anwendung der Sulfonamide 1937 und des Penicillins 1941) konnte die Letalität der akuten bakteriellen Meningitis von fast 100 % auf bis zu 10-20 % der Erkrankungsfälle altersabhängig gesenkt werden. Dennoch geht die akute bakterielle Meningitis mit einer hohen Rate an dauerhaften neurologischen Folgeschäden einher [Adam, 2004]. Die klinische Präsentation der Meningitis und ihr Verlauf sind vom Alter des Betroffenen, dessen Immunstatus und dem verursachenden Pathogen geprägt [Adam, 2004]. In früheren Untersuchungen zur Pathogenese der bakteriellen Meningitis zeigten sich Hinweise dafür, dass der Plexus choroideus (PC) einen der möglichen Eintrittspunkte von Meningitiserregern in das Gehirn darstellt, das an sich durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. die Blut-Liquor-Schranke (BLS) vor Eindringlingen geschützt wird [Tunkel et al., 1993; Koedel et al., 2002]. Die neurologischen Folgeschäden werden hierbei nicht nur direkt durch den Erreger verursacht, sondern entstehen auch aufgrund der inflammatorischen Reaktion des befallenen Organismus [Kaul et al., 1996]. Auf dieser Erkenntnis beruht u.a. der adjuvante Einsatz des Steroids Dexamethason (Dexa) in der Meningitis-Therapie [Chaudhuri, 2004, Brouwer et al., 2010].

*Streptococcus suis* (*S. suis*), der in dieser Arbeit eingesetzt wurde, besitzt die Eigenschaft, sowohl beim Schwein als auch beim Menschen eine akute bakterielle Meningitis auszulösen [Staats et al., 1997]. Die Erkrankung mit *S.suis* kann beim Menschen und beim Schwein fatale neurologische Komplikationen (siehe Kapitel

1.1.5 und 1.3.1) bis hin zum Tod, hervorrufen [Van Furth et al, 1996; Chaudhuri, 2004]. Aus diesen Gründen eignet sich *S. suis* und das *in vitro* porcine choroidale Plexusepithelzellen (PCPEC) - Modell der BLS zur Untersuchung der Meningitispathogenese. Durch die Untersuchung der Barrierschädigung des choroidalen Plexus (CP) und deren pharmakologischen Beeinflussbarkeit im Rahmen einer *S. suis*-Meningitis können neue medikamentöse Behandlungsstrategien entwickelt werden.

### 1.1.1 Epidemiologie

Die akute bakterielle Meningitis ist eine Erkrankung, die mit einer Inzidenz von 3-10/100.000/ Jahr (bei Kindern am höchsten) auftritt und weltweit vorkommt. In Europa treten 2-6 Erkrankungen /100.000 Einwohner /Jahr auf. In Nordamerika und im westlichen Europa wird sie am häufigsten durch die Erreger *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis* ausgelöst. Die durch *Neisseria meningitidis* ausgelöste Meningitis kommt insbesondere in Saudi-Arabien, Asien, Südamerika und im sogenannten Meningitisgürtel von (Zentral-)Afrika vor. *Neisseria meningitidis* kann Epidemien verursachen, im Gegensatz zu den anderen Meningitis-Erregern, die sich bei ihren Ausbrüchen auf einzelne Fälle oder kleine Cluster beschränken. Die durch den Erreger *Haemophilus influenzae B* ausgelösten Meningitiden sind durch den Einsatz von Konjugatimpfstoffen (insbesondere in Europa) deutlich zurückgegangen. Weitere Erreger sind *E. coli*, Gruppe B Streptokokken, *Listerien*, *Pseudomonas aeruginosa*, u.a.. Bei den Erregern der Meningitiden zeigt sich eine Altersabhängigkeit. So finden sich in Deutschland bis zum 3. Lebensmonat am häufigsten *Gruppe-B-Streptokokken (Streptococcus agalactiae)*. Daneben lassen sich *E. coli* sowie selten *Listerien* nachweisen. Bei älteren Säuglingen und Kindern treten die auch für das Erwachsenenalter typischen *Pneumokokken (Streptococcus*

*pneumoniae*) und *Meningokokken (Neisseria meningitidis)* als Hauptverursacher bakterieller Meningitiden in Erscheinung [Tunkel et al., 1993; Chaudhuri, 2004; Adam, Schroten, 2004]. Es gibt eine Reihe von prädisponierenden Faktoren für eine Meningitis, wie Pneumonie, Sichelzellanämie, Infekte im HNO-Bereich, Liquorlecks und ein geschwächter Immunstatus.

### **1.1.2 Pathogenese**

Die Infektion der Meningen läuft <sup>35</sup>klassischerweise <sup>16</sup>in einer typischen Folge von Ereignissen ab:

- Initiale Kolonisation von Schleimhäuten des oberen Respirations- oder des Gastrointestinaltrakts
- Durchbruch der Erreger und deren Eintritt in die Blutbahn mit folgender Bakteriämie und Dissemination,
- Penetration der Blut-ZNS-Schranken, Ausbreitung im Liquorraum, eigentliche leptomeningeale Entzündung. [Tunkel et al., 1993; Van Furth et al., 1996; Adam, Schroten, 2004]

Es besteht neben der hämatogenen Aussaat (z.B. bei Pneumokokkenpneumonie; infolge einer Sepsis) die Möglichkeit einer Infektionsausbreitung per continuitatem (z.B. aus einem Infektfokus aus dem HNO-Bereich) oder die direkte Infektion der Meningen durch einen Defekt von Dura mater oder Schädelknochen (z.B. angeboren bei Meningozele oder erworben bei offenem Schädel-Hirn-Trauma) [Adam, Schroten, 2004].

## Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis

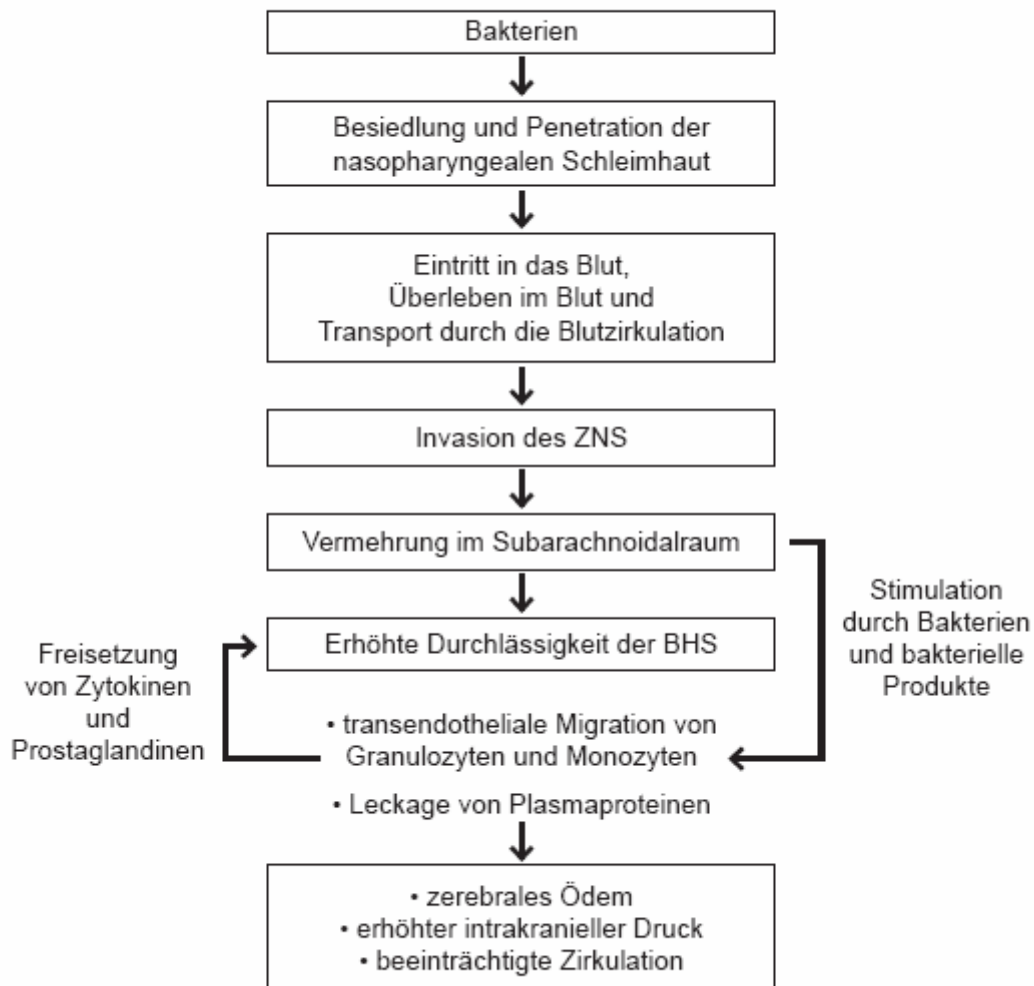


Abb.1 nach Van Furth et al., 1996, (siehe auch Tunkel et al., 1993; Chaudhuri, 2004)

Den weiteren Verlauf der leptomeningealen Inflammation stellt man sich schematisch in mehreren pathophysiologischen Schritten vor [Van Furth et al., 1996; Koedel et al., 2002; Chaudhuri, 2004; Adam, Schroten, 2004]:

1. Lokale intraventrikuläre Inflammation durch Freisetzung bakterieller Hüllprodukte und Toxine (insbesondere auch durch antibiotische Therapie) sowie die Aktivierung ortsansässiger Zellverbände (z. B. Mikroglia, Astrozyten, Plexusepithelien).
2. Zusammenbruch protektiver Schranken des ZNS durch proinflammatorische

Mediatoren mit Rekrutierung und Extravasation aktivierter Leukozyten.

3. Vollbild maximaler Inflammation mit letztendlich fatalen Folgen durch das Überschießen der intensiven Immunantwort des Wirtes.

### **1.1.3 Klinik**

Die typische Trias besteht aus Kopfschmerzen, Meningismus und hohem Fieber.

Der Erkrankungsbeginn ist plötzlich. Hinzu kommen ängstliche Erregung der

Betroffenen, Nackenschmerzen, Erbrechen, gestörtes Allgemeinbefinden,

Bewusstseinsstörungen, Verwirrtheit, Hautblutungen, Hyperästhesie, Reiz-

überempfindlichkeit (v.a. gegen Licht, Berührung und Schmerzreiz), Paresen und

Krampfanfälle. Typische meningeale Zeichen sind das Kernig, Brudzinski und

Lasegue Zeichen. Jedoch ist ein Auftreten dieser Zeichen nicht obligat für das

Vorliegen einer Meningitis [DGPI Handbuch 5. Auflage]. So stellt sich die Meningitis

bei Früh- und Neugeborenen oft unspezifisch dar und ist nicht von einer Sepsis zu

unterscheiden. Das klinische Bild wird erst nach dem 1. Lebensjahr und mit

zunehmendem Alter spezifischer bis hin zur oben genannten Trias. Es kann aber

auch beim Erwachsenen, z.B. bei älteren Menschen und bei Alkoholikern, ein

oligosymptomatischer Verlauf vorkommen, bei dem die typischen

Meningismuszeichen fehlen [Dijcks et al. 2011; Lucht, 2009].

### **1.1.4 Diagnostik**

Neben den klinischen Hinweisen auf das Vorliegen einer Meningitis sind als

diagnostische Maßnahmen die Liquorpunktion und Abnahme von Blutkulturen noch

vor dem sofortigen Einleiten einer Antibiotikatherapie entscheidend für den weiteren

Erfolg einer Behandlung. Die Liquorpunktion ist bereits bei dem Vorliegen eines

Verdacht auf Meningitis obligat. Durch sie kann eine bakterielle Meningitis bestätigt

werden, eine Erreger- und Resistenzbestimmung erfolgen und dann die Antibiotika-Therapie an das Resistogramm angepasst werden. Die bakteriologische Diagnostik besteht in der Mikroskopie des Ausstriches, der Kultur und der Resistenzprüfung. Um einen Fokus einer bakteriellen Meningitis aus dem HNO-Bereich identifizieren zu können, kann insbesondere bei Erwachsenen ein CT in Erwägung gezogen werden.

### **1.1.5 Komplikationen, Folgeschäden und Prognose**

In erster Linie sind die entzündlichen Reaktionen des Wirtes auf die Meningitis für die zerebralen Schäden verantwortlich [Tunkel et al., 1993; Nau et al., 2002; Lutsar et al., 2003; Chaudhuri, 2004]. Je nach Dauer und Intensität der meningealen Reizung führt die inflammatorische Reaktion des Wirtes zu der Ausbildung eines Hirnödems. Des Weiteren treten Perfusionsstörungen aufgrund des intrakraniellen Druckanstiegs, der Vasospasmen, der Thromben und der Begleitvaskulitis auf. Daraus folgen hypoxische und ischämische Läsionen, die sich in neurologischen Einschränkungen oder Ausfällen manifestieren. Außerdem besteht aufgrund des erhöhten Druckes eine Einklemmungsgefahr des ZNS im Tentoriumschlitz oder im Foramen magnum mit letalem Ausgang. Weiterhin können sich u. a. folgende Komplikationen ausbilden: Hydrozephalus, Hirnabszess, septische Sinusvenenthrombose, Hörschäden, Enzephalitis und im Rahmen einer Meningokokkenmeningitis ein fulminantes Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom mit Multiorganversagen (Nebennierennekrose, Disseminierte intravasale Gerinnungsstörung mit Haut- und Schleimhautpurpura und –blutungen, Schock) und mit einer Letalität bis 85%. Von den neurologischen Folgeschäden nach einer bakteriellen Meningitis sind bis zu 30 % der Kinder betroffen. Zu diesen Schäden gehören insbesondere Hörschäden, Intelligenzminderung und zerebrale Ausfälle [Maurizi, 1999; Klein et al., 2003; Kaul et al., 1996; Chaudhuri, 2004; Adam,

Schroten, 2004, Van de Beek et al., 2007; Brouwer et al., 2010]. Die Prognose wird im Wesentlichen bestimmt durch die Lokalisation und Größe der Läsionen im ZNS. Entscheidend für die Prognose ist das Erkennen der unspezifischen Erstsymptome und der schnelle Einsatz der Therapie [Koedel et al., 2002].

### **1.1.6 Medikamentöse Therapie**

Die Therapie muß sofort mit einer Antibiotika-Gabe eingeleitet werden, nachdem für die Diagnostik eine Blutkulturabnahme und eine Liquorpunktion durchgeführt wurden. Bei der Wahl des Antibiotikums wird zunächst das Alter des Patienten und die lokale Epidemiologie berücksichtigt. Nach der Bestimmung des Erregers durch Auswertung der Blutkultur und des Liquorpunktats erfolgt ggf. eine Anpassung der Therapie. Als Antibiotika-Therapie kommen ein 3.Generations-Cephalosporin, bei Neonaten und Erwachsenen zusätzlich Ampicillin, zur Anwendung. Des Weiteren erfolgt an den ersten zwei Tagen eine Dexamethason-Gabe (2x 0,4 mg/ kg KG/ d). Die Therapie mit Dexamethason sollte kurz vor oder gleichzeitig mit der Antibiotika-Gabe erfolgen [Chaudhuri, 2004; Brouwer et al., 2010].

## **1.2 Barrieren im ZNS**

Für eine normale Funktion der Neuronen im ZNS ist die Regulation und Aufrechterhaltung der cerebralen Homöostase eine Voraussetzung, die nicht durch Schwankungen in der Zusammensetzung der Substanzen, wie sie im Blutstrom stattfindet, beeinträchtigt werden darf [Haselbach et al, 2001; Lohmann et al., 2004]. Um diese Voraussetzung zu gewährleisten sind zwei Barriersysteme im Gehirn vorhanden, die die Verteilung bzw. Ausbreitung von Substanzen zwischen dem zirkulierenden Blutstrom und dem ZNS regulieren. Zum einen die BHS und zum anderen die BLS, mit der ich mich in dieser Arbeit befasse. Durch diese beiden



Systeme bildet das Gehirn ein eigenes, gegenüber dem Blutstrom abgeschlossenes Kompartiment [Haselbach et al, 2001; Lohmann et al., 2004, Engelhardt et al, 2001, Engelhardt et al., 2009].

### **1.2.1 Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)**

Die BHS wird von Endothelzellen, Astroglia, Perizyten und der Basallamina gebildet. Die Basis dieser Barriere sind die Endothelzellen mit ihren *Tight Junctions* (TJs) als interzellulären Verbindungen. Sie beschränken den Austausch von kleinen polaren Molekülen und von Makromolekülen zwischen dem Blut und der interstiellen Flüssigkeit [Hakvoort et al., 1998; Saunders 1999; Segal 2000, Hasselbach et al., 2001; Huber et al. 2001; Brown et al., 2003; Lohmann C. et al., 2004; Cucullo, 2003].

### **1.2.2 Die Blut-Liquor-Schranke (BLS)**

Die BLS wird durch das choroidale Plexusepithel, der Basallamina und dem Kapillarendothel der Blutgefäße gebildet. Die eigentliche Schrankenfunktion wird durch die TJs der Plexusepithelzellen ausgebildet. Im Gegensatz zur BHS ist die Basis dieser hochselektiven Barriere im Plexusepithel lokalisiert, während das Kapillarendothel gefenstert ist. Sie verhindert den freien Übertritt von Substanzen aus dem Blut in den Liquorraum, und damit auch in die interstielle Flüssigkeit des Gehirns. Nur für Wasser und gelöste Gase, wie Sauerstoff und Kohlendioxid, ist die BLS vollständig durchlässig, während sie für Elektrolyte kaum und für die meisten Moleküle überhaupt nicht passierbar ist. Diese können nur durch Transportsysteme über die Plexusepithelien, mit aktiver Aufnahme und Sekretion, die Schranke überwinden [Trepel, 1999; Strazielle et al., 2000; Haselbach et al, 2001]. Hierdurch wird ein unspezifischer Transport von Ionen, Proteinen, Zellen und Erregern stark eingeschränkt [Pardridge et al., 1999; Saunders 1999; Segal, 2000; Lippoldt et al.,

2000; Koedel et al., 2002; Angelow, 2005] und ein kontrollierter Stoffaustausch gewährleistet. Der Plexus choroideus wurde in früheren Studien als mögliche Eintrittspforte für Entzündungszellen und Pathogene in das ZNS identifiziert [Williams et al., 1990; Tunkel et al., 1993; Tuomanen, 1996; Koedel et al 2002, Engelhardt et al., 2001; Engelhardt et al., 2009]. Aus diesem Grund wurden für unsere Untersuchungen die PCPEC verwendet.

### **1.2.3 Lokalisation und Aufbau des choroidalen Plexus**

Die CP sind im ZNS in den beiden Seitenventrikeln, in dem dritten und dem vierten Ventrikel lokalisiert. Sie bestehen aus einem stark vaskularisiertem Gewebe, dessen Kapillaren fenestriert sind. Ein einschichtiges hochkuboides Epithel bedeckt sie, das einen großen apikalen bzw. ventrikulären Mikrovillisaum besitzt und als Lamina epithelialis choroidea bezeichnet wird. Zu den Seiten hin setzt sich das Plexusepithel kontinuierlich in das Ependym fort, das die Ventrikelwände bedeckt [Segal, 2000; Strazielle et al., 2000]. Die Epithelschicht liegt einer Basallamina an, die das Epithel von der Tela choroidea, einer gefäßführenden bindegewebigen Schicht, die aus der Pia mater stammt, abgrenzt. Untereinander werden die epithelialen Zellen im apikalen interzellulären Bereich fest durch spezielle Zell-Zell-Kontakte, den TJs, miteinander verbunden.

### **1.2.4 Eigenschaften und Kennzeichen der choroidalen Plexusepithelzellen**

Da in dieser Arbeit vorwiegend mit dem PCPEC gearbeitet wurde, wird im folgenden Text besonders auf die PCPEC eingegangen.

Neben der Beteiligung an der BLS produziert das Plexusepithel den Hauptanteil der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF). Die PCPEC besitzen eine charakteristische epitheliale Zellpolarität, die sich im morphologischen Aufbau der Zelle, in der Protein-

und Enzymverteilung und der Proteinsekretion widerspiegelt. Als spezielle Zell-Zellkontakte im apikalen Bereich des Interzellularspaltes besitzen die PCPEC TJs. Diese bedingen die charakteristische Ausbildung eines hohen elektrischen transepithelialen Widerstandes [Haselbach et al., 2001] und die starke Begrenzung der parazellulären Permeabilität, wodurch sich die PCPEC von den Epithelien und Endothelien anderer Gewebe unterscheiden. Ein weiteres Kennzeichen der PCPEC ist der geringe transzelluläre Flux bei einer fast fehlenden pinozytotischen Aktivität. Die ventrikulär gelegenen Mikrovilli und Zilien dienen zum einen der Oberflächenvergrößerung für die Absorption, den Transport und Diffusionsprozesse, andererseits helfen sie durch ihre Beweglichkeit die transportierten Proteine, Nucleoside und Ionen zu verteilen [Hakvoort et al., 1998b; Haselbach et al., 2001]. An der basolateralen bzw. dem Blut zugewandten Seite zeigen sich basale Einfaltungen [Maxwell and Pease, 1956; Hakvoort et al., 1998]. Weiteres Kennzeichen der PCPEC und ihrer polaren Ausrichtung ist ein spezifisches Carrier- und Transportsystem mit polarer Verteilung von Enzymen und Transportproteinen zwischen den Membrandomainen. Nur in der apikalen Membran ist eine  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase lokalisiert, die  $\text{Na}^+$  aus den Zellen und  $\text{K}^+$  Ionen in die Zellen pumpt. An der basolateralen Membranseite besitzen die PCPEC einen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ -Antiporter, der interne Protonen gegen externe  $\text{Na}^+$  Ionen austauscht [Murphy et al., 1989; Hakvoort et al., 1998; Wu et al., 1998]. Diese beiden Transportsysteme führen zur Ausbildung eines transzellulären Protonen-Gradienten, mit pH-Unterschied zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment [Hakvoort et al., 1998; Haselbach et al., 2001]. Der Organic Anionen Transporter, ein spezielles Transportprotein, wird durch die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase angetrieben und ist im *in vitro* Transwell-Filter-Modell für den aktiven Transport der Farbstoffe Fluorescein und Phenol red aus dem apikalen in das basolaterale Kompartiment verantwortlich [Hakvoort et al., 1998]. Des Weiteren

besteht die Eigenschaft der aktiven polaren Sekretion von CSF zur ventrikulären Seite (*in vivo*), begleitet von einer polaren Sekretion von Proteinen, wie z.B. Transthyretin [Haselbach M. et al., 2001] und Prealbumin.

### **Eigenschaften und Kennzeichen der choroidalen Plexusepithelzelle**

- Ausbildung von Tight junctions
- geringe parazelluläre Permeabilität
- Ausbildung eines hohen elektrischen Widerstandes
- epitheliale Zellpolarität
- apikaler Mikrovillisaum
- basolaterale Einfaltungen
- spezifische Carrier- und Transportsysteme
- transzellulärer Protonengradient
- polare Sekretion von Flüssigkeit bzw. Liquor und Proteinen

Tabelle 1 in Anlehnung an Hasselbach et al, Galla, 2001; Gloor et al., 2001; Kniessel et al, 2000; Pardridge et al., 1999; Hakvoort et al., 1998; Suzuki et al., 1987; Maxwell and Pease, 1956

## **1.3. *Streptococcus suis***

### **1.3.1 Charakterisierung von *S. suis***

*S. suis* ist ein gram-positiver, hämolysierender ( $\alpha$ -Hämolyse auf Schafsblut-Agar,  $\beta$ -Hämolyse auf Pferdeblut-Agar), fakultativ anaerober Kokkus, der zur Lancefield-Gruppe D, R und S gehört. Das Bakterium ist ovoid und tritt einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten auf [Staats et al., 1997]. Die Stämme von *S. suis* werden anhand ihrer Polysaccharidkapsel-Antigene nach Serotypen eingeteilt. Es wurden bereits 35 kapsuläre Serotypen (Typ 1 -34 und 1/2) identifiziert [Gottschalk et al., 1989, 1991a, b; Staats et al., 1997; Benga et al., 2004; Gottschalk et al., 2007]. Des Weiteren existiert eine wesentliche Zahl von nicht-typisierten Stämmen [Benga et al., 2004]. Unter den bekannten 35 Serotypen ist der Serotyp 2 sowohl beim Schwein als auch beim Menschen am häufigsten mit einer klinischen Erkrankung assoziiert. Die Serotyp 2-Stämme werden auch am häufigsten von erkrankten Tieren isoliert [Staats et al., 1997; Lalonde et al., 2000; Segura et al., 2004; Benga et al., 2004; Esgleas et

al., 2005]. Nicht alle der Serotypen und der Isolate innerhalb eines Serotypes führen zur Erkrankung. Unter den pathogenen Serotypen und Isolaten variiert die klinische Ausprägung der Erkrankung [Benga et al., 2004]. Das bedeutet für den Serotyp 2, dass nicht alle Isolate seines Typs pathogen sind und dass die Virulenz untereinander variiert [Staats et al., 1997]. Es ist allgemein akzeptiert, dass die Virulenz von *S. suis* nicht allein mit dem Serotyp assoziiert ist [Benga et al., 2004]. Zu den Faktoren, die den Ausbruch einer Erkrankung durch *S.suis* beim Schwein begünstigen oder deren Verlauf erschweren, gehören Stress und Koinfektionen bzw. konkurrierende Krankheiten. Als Stressfaktoren für das Schwein gelten z.B. Überfüllung, schlechte Ventilation, plötzliche Wetterwechsel, etc. [Staats et al. 1997].

### **S. suis -Infektion beim Schwein**

*S.suis* gehört weltweit zu den wichtigsten Pathogenen des Schweins. Hierbei ist der Serotyp 2 am häufigsten mit einer klinischen Manifestation assoziiert, wie es bereits oben in der Einleitung erwähnt wurde. [Staats et al., 1997; Benga et al., 2004; Segura et al., 2004; Esgleas et al., 2005]. Der wirtschaftliche Verlust für die Schweineindustrie durch *S. suis*-Infektionen ist enorm und wurde, nach Staats et al., 1997, allein in den USA auf eine Summe von über 300 Millionen Dollar geschätzt [Staats et al., 1997]. Die wichtigste klinische Erkrankung, die mit *S. suis* assoziiert ist, ist die Meningitis. Jedoch werden beim Schwein auch andere Krankheitssyndrome ausgelöst, wie Arthritis, Pneumonie, Septikämie, Endokarditis, Enzephalitis, Polyserositis, Aborte und Abszesse [Staats et al., 1997; Segura et al., 2004; Esgleas et al., 2005, Gottschalk et al., 2007]. Hierbei können die Infektionen von subklinischen Formen mit asymptomatischen Verläufen bis hin zu massiven klinischen Ausprägungen reichen [Gottschalk and Segura, 2000; Benga et al., 2004]. Schweine mit perakuter *S. suis*-Infektion können innerhalb von Stunden nach dem

Auftreten klinischer Anzeichen einer Erkrankung sterben [Staats et al., 1997]. Es ist auch nicht ungewöhnlich, dass der Tod ohne offensichtliche Zeichen einer Erkrankung eintritt [Staats et al., 1997]. Die Anwesenheit von klinischen Symptomen bei erkrankten Tieren geht mit einer hohen Anzahl an Bakterien im Blutstrom einher [Esgleas et al., 2005]. Der Trägerstatus des Schweins für den Serotyp 2 kann in seiner Manifestation variieren. Er kann mit oder ohne klinische Erkrankungszeichen einhergehen. Des Weiteren können Tiere nach einer manifesten Erkrankung zu Trägern werden [Clifton-Hadley, 1984; Staats et al., 1997]. Die Trägerrate korreliert nicht mit Erkrankungsintensivität, Herdgröße oder dem System des Schweine-Managements.

*S. suis* tritt nicht nur beim Schwein auf, sondern konnte auch bei Wiederkäuern, Katzen, Hunden, Hirschen und Pferden nachgewiesen werden [Devriese et al., 1993; Staats et al., 1997].

## **Pathologie**

Üblicherweise treten beim Schwein große Läsionen als Ansammlungen im Bereich der Meningen, der Lymphknoten und der Lungen auf, die durch *S. suis*-Infektionen ausgelöst wurden. Histopathologisch sind die häufigsten Befunde innerhalb des porcinen choroidalen Plexus (PCP) lokalisiert [Clifton-Hadley and Alexander, 1991; Staats et al., 1997]. Die charakteristischste histopathologische Läsion der akuten *S. suis*-Meningitis ist ein diffuses Neutrophilen-Infiltrat [Clifton-Hadley and Alexander, 1991; Staats et al., 1997]. Es können pathologische Veränderungen vorliegen, die mit Meningitis und Choroiditis assoziiert sind, wie z.B. Ödeme der Hirnhäute und hyperämische meningeale Blutgefäße. Es können aber auch Zeichen einer Enzephalitis auftreten [Windsor, 1977; Clifton-Hadley and Alexander, 1991; Staats et al., 1997].

## **S. suis-Infektion beim Menschen**

*S. suis* ist ein zoonotischer Erreger, der beim Menschen Erkrankungen hervorrufen kann. Es sind vor allem beruflich exponierte Personen betroffen, die im nahen Kontakt zu Schweinen oder Schweinefleisch stehen, wie z.B. Metzger, Schlachthofarbeiter und Schweinezüchter [Arends et al., 1988; Staats et al., 1997; Kopic et al., 2002; Benga et al., 2004]. Das klinische Erscheinungsbild der Infektion kann, ähnlich wie beim Schwein, variieren und bis zum Tod führen [Clarke et al., 1991; Trottier et al., 1991; Staats et al., 1997]. Bei Patienten mit purulenter Meningitis treten in 50 – 75% der Fälle Ataxie und Taubheit auf, die bei der Hälfte der Fälle persistieren [Dupas et al., 1992; Staats et al., 1997]. Des Weiteren wurde der Serotyp 2 bei Personen mit Arthritis, akuter Gastroenteritis, Endokarditis und Endophthalmitis isoliert. [Trottier et al., 1991; Staats et al., 1997].

### **1.3.2 Pathogenese der S. suis-Infektion**

Bei der Pathogenese von *S. suis* sind folgende Schritte bedeutsam: die Invasion in den Organismus (Schwein oder Mensch), das Überleben darin und die Überwindung der BHS bzw. der BLS [Gottschalk and Segura, 2000; Benga et al., 2004].

*S. suis* wird in der Regel nasal oder oral übertragen und besiedelt den oberen Respirationstrakt, v.a. die palatinen Tonsillen und die Nasenhöhlen [Staats et al., 1997; Segura et al., 2004; Gottschalk and Segura, 2000; Benga et al., 2004]. In der Krankheitsverbreitung kann die Hausfliege eine Rolle als Vektor spielen. Als weiterer möglicher Vektor kann die Maus dienen. Mäuse übertragen untereinander *S. suis* und es wird angenommen, dass *S. suis* von der Maus auf das Schwein übertragen werden kann [Staats et al., 1997]. *S. suis* besitzt die Fähigkeit sich an humane und porcine Endothel- und Epithelzellen anzuheften und in einigen Fällen in diese

einzufringen [Esgleas M. et al., 2005]. Durch die Studie von Esgleas et al., 2005, wurde gezeigt, dass eine Reihe von ECM-Proteinen (=Extrazellulären Proteinen) als potentielle Zellrezeptoren für *S. suis* dienen können. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die bakterielle Bindung an Plasmaproteine, wie das Fibronectin (und Fibrinogen), die *S. suis*-Bakterien vor der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes schützen kann, indem es die immunogenen Epitope der Bakterien maskiert [Esgleas et al., 2005]. Die palatinen Tonsillen gelten als Hauptort der Replikation von *S. suis* [Williams et al., 1973; Staats et al., 1997]. Der weibliche Genitaltrakt bei Säuen kann auch durch eine Infektion mit Serotyp 2 betroffen sein. Dadurch kann er zur Infektionsquelle für Ferkel während oder nach der Geburt werden [Staats et al., 1997]. Man geht davon aus, dass die Bakterien direkt oder über die Lymphwege in den Blutstrom gelangen, darin persistieren und das ZNS erreichen [Williams et al., 1973; Staats et al., 1997; Segura et al., 2004].

Es gibt mehrere Theorien über das Überleben von *S. suis* im Blutstrom und dessen Eindringen in das ZNS. Bei der „Trojan horse - Theorie“ wird *S. suis* von mononukleären Phagozyten aufgenommen, überlebt intrazellulär, und wird zum ZNS und zu anderen Orten im Körper, wie Gelenkhöhlen und seröse Höhlen, transportiert. Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass in Fällen von Meningitis die Bakterien, nachdem sie von den palatinen Tonsillen in das Blut übergetreten sind, von zirkulierenden Monozyten phagozytiert werden. Diese Monozyten differenzieren zu Kolmerzellen (= Makrophagen des Epilexus), die dann in den zerebrospinalen Liquor einwandern können [Williams et al. 1990; Staats et al., 1997; Segura et al., 2004]. Damit dieser Mechanismus funktioniert, muss *S. suis* die Fähigkeit besitzen in Makrophagen zu überleben. Es zeigte sich, dass die Pathogenität von Serotyp 2 - Isolaten mit dem Überstehen innerhalb von Makrophagen korreliert. So überleben pathogene Stämme in der intraphagosomalen Umgebung des Makrophagen,



während nicht-pathogene Stämme getötet werden [Williams, 1990; Staats et al., 1997]. Der Mechanismus, mit dem die pathogenen *S. suis* Serotyp 2 - Stämme der Tötung durch Makrophagen widerstehen, ist noch nicht geklärt. Das intrazelluläre Überleben korreliert nicht mit dem Vorkommen einer Kapsel, der Hämolysinexpression oder dem Niveau der SOD-Produktion [Langford et al., 1991], schließt aber eine Rolle dieser Faktoren in der Virulenz von *S. suis* nicht aus (für weitere Ausführungen über die Rolle der Pathogenitätsfaktoren siehe Kapitel 1.3.3). Die meisten Studien während der letzten Dekade deuteten laut Segura et al., 2004, darauf hin, dass *S. suis* auch andere Mechanismen zur Dissemination verwenden könnte. In einer „modifizierten Hypothese der *Trojan horse*-Theorie“ wird davon ausgegangen, dass der Schlüsselschritt für eine erfolgreiche Infektion die oberflächliche Adhäsion an Phagozyten (mit verhinderter Aufnahme) ist. Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass *S. suis* an Murine Makrophagen oberflächlich adhärert, ohne dass eine Phagozytose stattfindet. Diese Adhäsion wird, mindestens teilweise, durch die Sialic acid-Komponente des Kapsulären Polysaccharid (CPS) vermittelt [Segura et al., 2004]. Durch diesen Mechanismus der oberflächlichen Adhäsion könnte *S. suis* von den Makrophagen zum ZNS transportiert werden und die BHS bzw. die BLS überwinden.

*S. suis* könnte aber auch durch eine direkte Schädigung der BHS oder der BLS in das ZNS eindringen. So zeigten sich bei Williams et al. [1990] Läsionen im choroidalen Plexus nach Infektion mit *S.suis*. *S.suis* kann einen apoptotischen als auch einen nekrotischen Zelltod in PCPEC induzieren, und damit zu einem Verlust der Barrierefunktion der BLS führen [Tenenbaum et al., 2005]. Für die Unterbrechung der Barrierefunktion der BLS und der BHS kommt auch die durch *S.suis* ausgelöste körpereigene Entzündungsreaktion [Tenenbaum et al. 2008, Scheld et al. 2002] in Betracht. Eine weitere Möglichkeit, um in das ZNS einzudringen, besteht für *S. suis*

in der direkten Adhäsion an die PCPEC mit folgender Invasion in die PCPEC. Dieser Mechanismus konnte elektronenmikroskopisch durch unsere Forschungsgruppe nachgewiesen werden [Tenenbaum et al., 2005].

Wie bereits im Kapitel 1.3.1 beschrieben wurde, ist die Meningitis die wichtigste klinische Erkrankung, die mit *S. suis* assoziiert ist. Die weiteren Folgen einer Meningitis wurden im Kapitel 1.1.5 und Kapitel 1.3.1 aufgeführt.

### **1.3.3 Pathogenitätsfaktoren von *S. suis***

Unter den Serotyp 2-Stämmen des *S. suis* existieren sowohl virulente als auch avirulente Stämme. Diese unterscheiden sich durch das Vorhandensein bzw. Fehlen von Pathogenitätsfaktoren, wobei bei einem Teil dieser Faktoren die definitive Rolle als Virulenzfaktor noch unklar ist. Zu den Faktoren gehören folgende Strukturen: Kapsuläres Polysaccharid (CPS), Muraminidase-released protein (MRP), *Extracellular protein factor* (EF), Suilysin /Hämolysin, P-Adhäsion, Gal-alpha1-4 Gal Adhäsion, Immunglobulin-bindendes Protein, Fimbrien, Hämagglutinin, Superoxiddismutase (SOD), Plasmide und AdiS protein. Allerdings ist bisher das CPS der einzig gesicherte Virulenzfaktor.

#### *Kapsuläres Polysaccharid (CPS):*

Das CPS des *S. suis* Serotyp 2 ist aus fünf Zuckern aufgebaut, unter denen sich die Sialylsäure (= N-acetyl-Neuraminidase) befindet [Edwards, 1982]. Sialylsäure selbst wird als ein Virulenzfaktor eingestuft, weil es die Alternative Komplementkaskade inhibiert und sialylsäurehaltige Organismen vor Phagozytose bewahrt [Edwards et al. 1982, Staats et al., 1997]. Aber auch avirulente Stämme sind bekapselt und weisen die gleiche Größe und den gleichen Gehalt an Sialylsäure auf [Charland 1998]. Das CPS ermöglicht eine Resistenz gegen Phagozytose, wohingegen

nichtbekapselte isogene Mutanten vermehrt von murinen und porcinen Phagozyten aufgenommen werden [Charland 1998]. Während ein bekapselter avirulenter Stamm nach 48h aus der Blutbahn eliminiert ist, ist ein bekapselter virulenter Stamm noch nach mehr als 5 Tagen nachweisbar. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass noch andere Faktoren für die Virulenz eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren zeigte sich bei *S. suis* keine stärkere Invasion durch einen unbekapselten Stamm als durch einen bekapselten Stamm [Charland, 2000].

*Muraminidase-released protein (MRP) & Extracellular protein factor (EF):*

Während MRP eine Größe von 136 kDA besitzt, beträgt die Größe von EF 110 kDA. Die meisten virulenten Stämme besitzen diese Proteine. Dies führt zu der Vermutung, dass eine Assoziation zwischen dem Vorkommen der Proteine EF und MRP und der Virulenz eines Stammes existiert. Diese Vermutung beruht auf den Beobachtungen, dass EF<sup>+</sup> Stämme Meningoenzephalitis und Polyserositis in Schweinen hervorrufen, dass EF<sup>-</sup> Stämme nur milde Erkrankung bedingen, während MRP<sup>-</sup> und EF<sup>-</sup> Stämme gar keine klinischen Symptome induzieren [Vecht 1991, 1992]. Hierdurch sind MRP und EF vor allem als `Virulenzmarker` bei *S.suis*-Serotyp 2 [Staats et al., 1997] einsetzbar. Zwischen den europäischen und den nordamerikanischen Stämmen gibt es jedoch Unterschiede. Die Mehrzahl der nordamerikanischen Stämme produzieren im Rahmen von Septikämie oder Meningitis, im Gegensatz zu den europäischen Stämmen, keine Virulenz-assoziierten Proteine („*virulence-related proteins*“) [Vecht 1991, Gottschalk 1998, Chatellier 1999].

### *Hämolysin / Suilysin:*

Suilysin ist ein Cholesterin-bindendes zytolytisches Toxin [Gottschalk et al., 1995], das zur Familie der Thiol-aktivierten Hämolysine gehört [Staats et al., 1997]. Seine Wirkung zeigt sich in der Formierung transmembranöser Poren, dem sogenannten „*multi-hit-Mechanismus*“. Suilysin ist ein Pathogenitätsfaktor, der nicht zellgebunden ist, sondern in den Medienüberstand sezerniert wird [Gottschalk et al., 1995]. Suilysin besteht aus Hämolysinen, die 54 und 62 kDA wiegen [Staats et al.; 1997]. Die meisten europäischen Stämme sind Suilysin-positiv [Staats et al., 1999], (vergleichbar mit MRP und EF).

## **1.4. Fragestellung**

Es stellte sich die Frage, ob *S. suis* Serotyp 2 in den folgenden drei Präparationen (als Lebendkeim, UV-inaktiviert und als Ultraschalllysat) die Fähigkeit besitzt im PCPEC Modell der BLS *in vitro* die Barriereintegrität zu beeinträchtigen und ob diese Schädigung zeit-, dosis- und konzentrationsabhängig ist. Das weitere Ziel bestand darin, herauszufinden, ob sich eine Barrierschädigung, ausgelöst durch eine *S.suis*-Infektion, durch den Einsatz von zellulären Inhibitoren bzw. Substanzen hemmen lässt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- **Aqua dest. / Aqua ad iniectabilia**, Firma Braun, Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
- **DMEM / Hams F12** = Dulbecco`s modified Eagle`s medium, Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- **Filterplatte 12-well** (grau), Costar R 3401, Transwell R, 12mm diameter, 0,4µm pore size, Tissue culture treated, Polycarbonate Membrane, Polystyrene Plates, Sterile, (12/Plate, 48/Case), Firma Corning Incorporated, Corning (NY, USA)
- **Filterplatte 12-well** (durchsichtig), Costar R 3460, Transwell R, 12mm diameter, 0,4µm pore size, Tissue culture treated, Clear Polyester Membrane, Polystyrene Plates, Sterile, (12/Plate, 48/Case), Firma Corning Incorporated, Corning (NY, USA)
- **Filterplatte Multiwell 24**, tissue culture plate, flat bottom with low evaporation lid, sterile, polystyren, nonpyrogenic, Firma Falcon 35 3226, Firma Becton-Dickinson Labware (NY, USA)
- **Gelatine** Firma Serva, Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
- **Glutamin**, 4mM, Firma Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- **Insulin**, 5mg/l, **flüssig (oder Pulver)**, Firma Roche (Mannheim, Deutschland)
- **HBSS**, hank`s buffered salt solution, Firma Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- **Hepes Puffer** 1M in 0,85% NaCl, sterile filtered, for cell culture, (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure, Gewebeskulturpuffer)

Firma Cambrex BioScience (Verviers, Belgien)

- **Laminin, Mouse**, 1mg, 0,62mg/ml (enthält Bestandteile der Basallamina),

Firma BDBiosciences Discovery Labware (Bedford, MA, USA)

- **PBS-Puffer pH 7,3** , steril, 500ml, *Phosphate buffered saline*

Firma SERAG -Wiessner GmbH & Co. KG (Naila/Bayern, Deutschland)

- **Phenol red solution**, 0,5% in DPBS, 100ml, sterile, cell culture tested,

Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Die zum PCP-Transport, zur PCPEC Zellisolierung und zur Kultur der PCPEC-Monolayer und zur Versuchsdurchführung verwendeten Pufferlösungen wurden aus Stammlösungen hergestellt und setzten sich wie folgt zusammen:

#### Lösung 1

- **SFM o. AB** (= serumfreies Medium ohne Antibiotikum)

Bestehend aus:

500 ml DMEM/Hams F 12, 4mM Glutamin, 5µg/ml Insulin

Einsatz bei Konfluenz des Plexuszellmonolayers, ab dem 9. oder 10. Tag

#### Lösung 2

- **SFM + AB** (= serumfreies Medium mit Antibiotikum)

Bestehend aus:

500 ml DMEM/Hams F 12, 4mM Glutamin, 5µg/ml Insulin,

100 U Pen. + 100µg Strep./ ml (Pen. = Penicillin, Strep.= Streptomycin)

Einsatz als Transportmedium

#### Lösung 3

- **SHM + ARA-C** (= serumhaltiges Medium mit ARA-C)

Bestehend aus:

500 ml DMEM / Hams F12, 4mM Glutamin, 5µg/ml Insulin,

100 U Pen. + 100µg Strep./ ml, 10% FCS (hitzeinaktiviert),

20µM ARA-cell 100

Einsatz bei der Gewinnung von PCPEC und als Nährmedium bis zum

Erreichen der Konfluenz des Monolayers

#### Lösung 4

- **HBSS<sup>- - + +</sup>** (= HBSS ohne Ca<sup>2+</sup>, ohne Mg<sup>2+</sup>, mit Pen./Strep., mit HEPES)

Einsatz bei der Gewinnung von PCPEC (bei dem Waschen der Plexus)

Bestehend aus:

500 ml HBSS<sup>- -</sup>, 100 U Pen. + 100µg Strep./ ml, 20mM HEPES

#### Lösung 5

- **HBSS<sup>+ + + +</sup>** (= HBSS mit Ca<sup>2+</sup>, mit Mg<sup>2+</sup>, mit Pen./Strep., mit HEPES)

Bestehend aus:

500ml HBSS<sup>+ +</sup>, 100 U Pen.+100µg Strep./ ml und 10ml HEPES

#### Lösung 6

- **HBSS<sup>- - - -</sup>** (= HBSS ohne Ca<sup>2+</sup>, ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Pen/Strep., ohne HEPES)

Einsatz bei der Herstellung der Trypsinlösung

#### Lösung 7

- **Trypsinlösung (0,2%ig w/v), steril**

Bestehend aus: 100mg Trypsinpulver und 50ml HBSS<sup>- - - -</sup> Lösung

Einsatz bei der enzymatischen Verdauung der PCP mit

20ml Trypsinlg./1g Plexus-Nassgewicht

#### Lösung 8

- **Laminin-Aqua-bidest Lösung**

Hergestellt aus Laminin zur Beschichtung der Filterplatten vor der Zellaussaat.

Es werden 62 µg Laminin pro Filter verwendet.

### 2.1.2 Enzyme und Sera

- **FCS** = fetal bovine serum = Fötale Kälberserum,  
10% FCS (hitzeinaktiviert), steril; es wurde 30 min. lang bei 56°C im  
Wasserbad inaktiviert, Firma Biochrom (Berlin, Deutschland)
- **THB** = Todd-Hewitt broth, Firma Oxoid (Wesel, Deutschland)
- **Trypsin**, Firma Biochrom (Berlin, Deutschland)

### 2.1.3 Pharmaka und Agenzien

- **ARA- cell 100**, Wirkstoff: Cytarabin, Lösung 20mg/ml, Firma cellpharm GmbH  
(Hannover, Deutschland)
- **Cytochalasin D**, Firma Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)
- **Insulin**, aus Rinderpankreas; lyophilisiert, steril, Firma Biochem. Roche  
(Mannheim, Deutschland)
- **Mannitol - <sup>3</sup>H** – Tritium, water-soluble radioactive compound (<sup>3</sup>H)-mannitol,  
Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland)
- **Pen/Strep.** 100 U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin,  
Firma ICN Biochemicals GmbH (Meckenheim, Deutschland)
- **Szintillatorflüssigkeit** Quicksafe A, Firma Zinsser Analytik (Frankfurt,  
Deutschland)

### 2.1.4 Instrumente und Geräte

- **Becherglas**, steril
- **Brutschrank HERAcCell** (Einstellungen: 37°C, 5.0 % CO<sub>2</sub>), Firma Heraeus  
(Hanau, Deutschland)
- **CCH- Platten**, Blutagarplatten, hergestellt im Mikrobiologielabor,



Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland)

- **Cuvetten** (Photometer), 10 x 10 x 45 mm, Firma Sarstedt AG & Co.  
(Nümbrecht, Deutschland)
- **Cuvetten** (Photometer), 10 x 4 x 45 mm, Firma Sarstedt AG & Co.  
(Nümbrecht, Deutschland)
- **ependorf-Pipetten**, Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- **ependorf Safe-Lock Tubes** (Reaktionsgefäß), 1,5ml, farblos, steril,  
Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- **Feinwaage - sartorius analytic A200s**, Firma sartorius AG  
(Göttingen, Deutschland)
- **Gefrierschrank HERAfreeze** (Einstellung: - 78°C), Firma Heraeus  
(Hanau, Deutschland)
- **Handschuhe**, Peha-taft R, puderfreie sterile OP-Handschuhe aus  
Naturkautschuk, Firma Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
- **Injektionskanülen** B-D R , Microlance TM 3, sterile, 0,3mm x 13mm, 30 G ½  
und 0,8mm x 40mm, 21 G 1 ½, Firma Becton- Dickinson GmbH (Deutschland)
- **Kompressen**, steril, Firma Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland))
- **Liquidszintillationscounter**, Firma Phillips (Hamburg, Deutschland)
- **Multipetten – Aufsatz** (Combi-Tip), Plastibrand R, 1 entspricht 100µl, 5ml,  
Firma Brand GmbH + CoKG (Wertheim, Deutschland)
- **PD-Tips** = Präzisions Dispenser Tips, Positive Displacement Tips  
PP/PE – HD, steril, Firma Brand GmbH + CoKG (Wertheim, Deutschland)
- **Petrischalen**, bakteriologisch 100x15mm, aus Polystyrol, Firma Falcon  
(Le Pont de Claix, Frankreich)
- **Photometer** UVmini1240, UV – VIS Spectrophotometer, Firma Shimadzu  
Europa GmbH (Duisburg, Deutschland)

- **Pinzette**, steril, Aeskulap GmbH (Aachen, Deutschland)
- **Pipettenspitzen** Tip One R, 1-200µl Natural Bevelled Tips, RNase, DNase, DNA & Pyrogenfree, Firma STARLAB GmbH (Ahrensberg, Deutschland)
- **Pipettos 5ml, 10ml, 25ml** Costar R , Stripette R, non-pyrogenic, serological pipet, Firma Corning Inc. Corning (NY, USA);
- **Präparierschere**, steril, Aeskulap GmbH (Aachen, Deutschland)
- **Reagenzröhrchen** Cellstar R, PP-test tubes, sterile, **15ml**, Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
- **Reagenzröhrchen** Falcon R , 35-2070, blue max TM, **50ml** Konisches Röhrchen Polypropylen, 30 x 115mm style, non-pyrogenic, sterile, Firma Becton Dickinson Labware and Company (NJ., USA)
- **Schraubverschlussgefäß**, steril
- **Skalpell**, Feather, Disposable Scalpel, sterile, Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Divison, PFM, Produkte für die Medizin AG (Köln, Deutschland)
- **Spritze, 5ml**, steril, Firma Braun (Melsungen, Deutschland)
- **Sterilfilter 0,22µM** Millex R- GV, Syringe Driven Filter Unit, steril, PVDF (low protein Binding Durapore), Membrane for Sterilization of Aqueous, 0,22µM, 13mm, Firma Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)
- **Sterilfilter 0,20µM (blau) und 0,45µM (gelb)**, Minisart R, single use syringe filter, Sterile-ED, non-pyrogenic, hydrophilic, Porengröße 0,20 µM und 0,45µM, Firma Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
- **Szintillationsröhrchen**, Firma Phillips (Hamburg, Deutschland)
- **Tegaderm TM**, steriler Transparentverband mit Dokumentationsstreifen, 1626 W 50, 10cm x 12cm, Firma 3M Health Care, U.S.A., St. Paul (D, Borken, Deutschland)
- **UV-Lampe**, 254nm Wellenlänge, Heraeus (Hanau, Deutschland)

- **US-Sonotrode SONOPLUS**, Firma Bandelin (Berlin, Deutschland)
- **Vortexgerät Press-to-mix**, 34524, 220/240 volt – 50Hz, Firma Snijders (Tilburg, Niederlande)
- **Wasserbad**, Firma Biochrom (Berlin, Deutschland)
- **Werkbank HERAsafe**, steril, Firma Heraeus (Hanau, Deutschland)
- **Widerstandsmessgerät EVOM TM- G** (= Endohm-Messgerät), mit Messelektrode, Firma WPI = World Precision Instruments, Inc. (Sarasota, FL, USA)
- **Zentrifuge ROTIXA 120 RS** Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- **Zentrifuge Hettich Universal 30 RF** (Tuttlingen, Deutschland)

### 2.1.5 Inhibitoren

Um die resultierenden Schäden auf die Barriereigenschaften des PCPEC durch die *S. suis*-Stämme potentiell zu beeinflussen, setzten wir die im folgenden Abschnitt genannten Substanzen bzw. zellulären Inhibitoren ein. Die Anwendung der Inhibitoren sollte zeigen, ob sie einen hemmenden Einfluss auf den TEER-Abfall oder auf die Verstärkung des parazellulären Mannitolflusses, ausgelöst durch *S.suis*, ausüben. Bei der Wahl der Dosierung orientierten wir uns, wenn vorhanden, an bereits in der Literatur beschriebenen Dosierungen der einzelnen Substanzen bzw. wir orientierten uns an *in vivo* bereits angewendeten Dosierungen, wie z.B. bei Dexamethason an den Standards für adjuvante Therapie der akuten bakteriellen Meningitis. Es wurde auch die Wirkung von DMSO auf die PCPEC und den TEER untersucht. DMSO ist eine Substanz, die bei einer Reihe von Inhibitoren als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass DMSO in den verwendeten Konzentrationen (24h-, 48h-Wert) zu keinem TEER-Abfall führt (Daten nicht gezeigt).

**BAPTA**, Synonym: [1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid Tetra (acetoxymethyl)Ester]; Firma Calbiochem<sup>R</sup>, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS., Deutschland). BAPTA wurde in den Konzentrationen 5 und 50µM ausgetestet. Es ist ein Calciumchelator, der Ca<sup>2+</sup>, einen wichtigen Kofaktor in Signalkaskaden bindet.

**Bisindolylmaleimide** , Synonyme: GF 109203X; Gö 6850;

2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3- (1H-indol-3-yl)-maleimide;

Firma Calbiochem<sup>R</sup>, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS., Deutschland).

Bisindolylmaleimide wurde in den Konzentrationen von 10, 100 und 1000 nMolar verwendet. Es ist ein hoch selektiver zellpermeabler Inhibitor der PKC, der als ein kompetitiver Hemmstoff für die ATP-Bindungsstelle von PKC wirkt.

**Catalase bovine liver** (=Catalase aus der Rinderleber); Synonyme: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidoreductase; Firma Sigma-Aldrich Co. (Aldrich, Deutschland). Catalase wurde in den Konzentrationen 500, 1000 und 2000 U/ml angewendet. Es aktiviert die Spaltung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub>. Dadurch wirkt es als ein natürliches Antioxidanz, das die Zellen vor oxidativer Schädigung ihrer Proteine, Lipide und Nucleinsäuren schützt.

**Cycloheximide**, Firma Calbiochem<sup>R</sup> , Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS., Deutschland). CHX wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Es hemmt die Proteinsynthese in Eukaryonten, indem es direkt mit dem Translocase-Enzym interagiert und hierbei den Translokationsschritt stört.

**Dexamethason**- wasserlöslich; Firma Sigma, Saint Louis, Missouri, USA.

Dexamethason wurde in einer Konzentration von 1, 10 und 100µM verwendet. Es gehört zu den Glukokortikoiden. Glukokortikoide wirken über verschiedene Mechanismen auf eine Entzündungsreaktion ein. Dies erfolgt unter anderem durch Bindung an einen spezifischen zytoplasmatischen Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Der

GR transloziert im aktivierten Zustand zum Nucleus der Zelle. Dort bindet er direkt an die DNA an und agiert (positiv oder negativ) als Transkriptionsfaktor. Entweder steigert er die Expression von „responsive genes“ oder er vermindert sie (siehe Tabelle 2). Der andere Weg ist abhängig von der Bindung des aktivierten GR an andere Transkriptionsfaktoren und deren Beeinträchtigung. Beide Mechanismen können der Unterdrückung von Entzündungsreaktionen dienen [Adcock et al., 2001; Saklatvala 2002, Chivers et al., 2004].

### Glukokortikoid-regulierte/sensible Gene

#### Gesteigerte Gen-Transkription

- Lipocortin-1 /Annexin-1 (phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor)
- Clara cell protein (CC-10, phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor)
- β<sub>2</sub>-adrenoceptor
- Secretory leucocyte inhibitory protein (SLPI)
- IL-1 receptor antagonist
- IL-1R2 (decoy receptor)
- IκB-alpha ( inhibitor of NF-κB)
- CD163 (scavenger receptor)
- MAP Inase phosphatase 1 (MKP-1)

#### Verminderte Gen-Transkription

- *Chemokines:*  
IL-8, RANTES, macrophage Inflammatory protein-1<sup>α</sup>, monocyte chemoattractant protein (MCP) -1, MCP-3, MCP-4, eotaxin
- *Cytokine:*  
Interleukins-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9, -11, -12, -13, -16, -17, -18,  
TNF-alpha, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), stem cell factor
- *Inducible enzymes:*  
Inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)
- *Endothelin-1 receptors:*  
Neurokinin NK<sub>1</sub>-receptors, NK<sub>2</sub>-receptors
- *Adhesion molecules:*  
intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin

Tabelle 2, nach Hayashi et al., 2004

Die Repression der inflammatorischen Transkriptionsfaktoren ist der Hauptmechanismus der Glukokortikoid-Aktivität bei der Expression von inflammatorischen Genen. So verringert der aktivierte GR die Wirkung der Inflammations-Transkriptionsfaktoren AP-1 (activator protein-1) und NF-κB eine Gen-Transkription zu induzieren, indem er sie bindet und hemmt. Der GR-Komplex induziert aber auch direkt antinflammatorische Gene, wie die, die IκB-alpha (den

Inhibitor von NF- $\kappa$ B) verschlüsseln. Sowohl NF- $\kappa$ B als auch AP-1 spielen eine wichtige Rolle bei einem entzündlichen Ereignis, da sie die Expression von den meisten immunmodulatorischen Genen kontrollieren. So ist ihre Aktivität und ihre Expression bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie Asthma, erhöht [De Bosscher et al., 1997; Dumont et al, 1998; Adcock et al., 2001; Saklatvala 2002; Chivers et al, 2004]. Bei Wissink et al., 1998, zeigt sich, dass die Repression der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression eine von den Schlüssel-Charakteristika ist, durch die die Glukokortikoide ihre antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekte ausüben. Wissink kommt zu dem Ergebnis, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch einen dualen Mechanismus unterdrückt wird. Dieser beinhaltet sowohl die Protein-Protein Interaktion von GR und NF- $\kappa$ B als auch die Induktion von I $\kappa$ B $\alpha$  durch GR. Des Weiteren zeigt sich bei Lutsar et al., 2003, dass Dexamethason mit der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 interagiert und hierbei die sekundäre inflammatorische Antwort, die einer antibakteriellen Therapie folgt, abschwächen bzw. vermindern kann [Lutsar. et al. 2003]. Glukokortikoide inhibieren auch Signale in den „*mitogen-activated protein kinase pathways*“. Diese vermitteln die Expression von inflammatorischen Genen. Die Inhibition beruht auf „*de novo*“ Genexpression [Saklatvala, 2002].

**Herbimycin A**, *Streptomyces* sp.; Firma Calbiochem<sup>R</sup>, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS., Deutschland). Herbimycin wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt. Es ist ein potenter Inhibitor von Protein-Tyrosin-Kinasen, indem es irreversibel an die Sulfhydrylgruppe der Kinase bindet. Des Weiteren hemmt Herbimycin dosisabhängig eine PDGF-induzierte Phospholipase D- Aktivierung.

**MnTBAP**, Synonym: Mn(III)tetrakis(4-Benzoic acid)porphyrin Chloride; Firma Calbiochem<sup>R</sup>, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS, Deutschland). MnTBAP wurde in den Konzentrationen von 25 und 50  $\mu$ M angewendet. Es ist ein

zelldurchgängiges Superoxid-Dismutase Analogon und ein Peroxinitrit-Fänger. Als Antioxidanz schützt es Zellen vor der Schädigung ihrer Bestandteile durch Oxidation.

**PBN**, Synonym: N-*tert*-Butyl- alpha-phenylnitron; Firma Calbiochem<sup>R</sup>, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS., Deutschland). PBN wurde in den Konzentrationen von 100 und 1000µM angewendet. Es ist ein Peroxinitrit-Fänger bzw. ein Freie-Radikale-Fänger. PBN hemmt die Lipidperoxidation in Mikrosomen der Rattenleber. Des Weiteren verhindert es die Induzierung von induzierbarer Nitric Oxid Synthase (iNOS) durch reaktive Oxygen Spezies.

**PMA**, Synonym: Phorbol-12-myristate-13-acetate; Firma Calbiochem<sup>R</sup>, Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/ TS., Deutschland). PMA wurde in den Konzentrationen 10, 100 und 1000nM eingesetzt. Es ist ein Aktivator der Proteinkinase C.

## 2.2 Das Filtermodell

Zur Untersuchung der Barrierschädigung des choroidalen Plexusepithels durch *S. suis* und deren pharmakologischen Beeinflussbarkeit wurde ein etabliertes *in vitro* Modell der BLS in den Versuchen verwendet. Es wurden hierbei Transwell-Filterplatten (12-well Costar R, Nr.3401, siehe Kapitel 2.1.1) mit 0,4µm Porengröße eingesetzt. Diese Platten bestanden aus 12 Well, in die jeweils ein Transwell - Filter eingehängt wurde. Durch die Transwell-Filter wurde jedes Well der Filterplatte in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment unterteilt. Die PCPEC befanden sich im apikalen Filterkompartiment. Apikal wurden 500 µl Medium hinzugefügt, basolateral, bzw. in das 12-well, 1ml. In diesem Modell stellte das apikale Kompartiment die CSF-Seite dar, der PCPEC-Monolayer repräsentierte die BLS und das basolaterale Kompartiment entsprach der Blut-Seite.

## Filtermodell der Blut-Liquor-Schranke

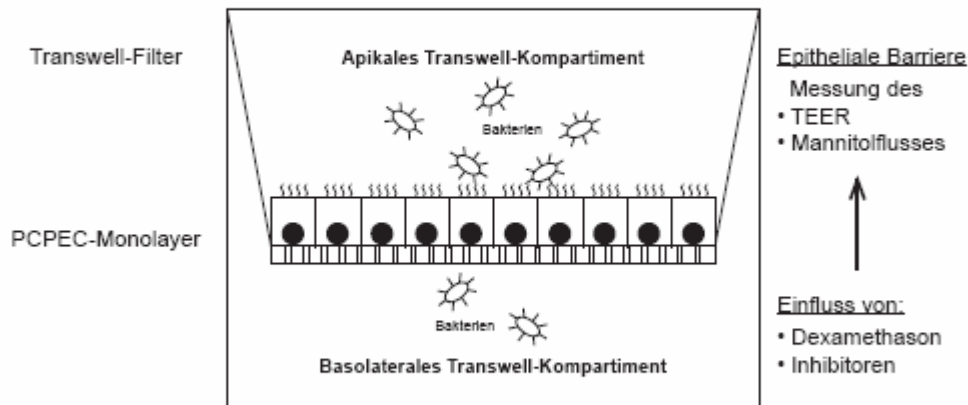


Abb. 2 in Anlehnung an Haselbach M. et al., 2001,

Das apikale Transwell-Kompartiment entspricht *in vivo* der Liquorseite und das basolaterale Transwell-Kompartiment der Blutseite

Um die Anzucht von PCPEC-Monolayern auf den Transwell-Filtern zu ermöglichen, wurden die einzelnen Filter unter sterilen Bedingungen (HERAsafe sterile Werkbank) apikal mit 62µg Laminin beschichtet. Um eine gleichmäßige Verteilung zu erhalten, wurden die Filterplatten mehrmals geschwenkt. Am Tag nach der Laminin-Beschichtung wurden die Filterplatten unter der sterilen Werkbank geöffnet und über Nacht zum Trocknen offen stehengelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Aussaat der PCPEC auf den lamininbeschichteten Filterplatten.

### 2.2.1 Isolierung von porcinen choroidalen Plexusepithelzellen (PCPEC)

Zur Materialgewinnung vom Versuchstier Schwein, zur PCP-Präparation und Kultivierung der PCPEC wurde eine modifizierte Präparationsmethode, wie sie bei Haselbach et al., 2001 beschrieben wurde, angewendet.

Kurzbeschreibung:



Bei frisch geschlachteten Schweinen wurden die CP unter semisterilen Bedingungen aus den Seitenventrikeln entnommen und dann sowohl mit kalter als auch mit warmer Trypsin behandelt (0,2% Trypsinlsg. 45min bei 4°C, 20 min bei 37°C). Die hierdurch gewonnenen Zellen wurden bei 20g zentrifugiert und mit DMEM/HAM's F12 1:1, ergänzt mit 4mM L-Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem FCS, 5µg/ml Insulin und Penicillin (100U/ml)/ Streptomycin (100µg/ml), resuspendiert.

Um das Wachstum von kontaminierenden Zellen zu unterdrücken, wurde 20µM ARA-cell100 (=Cytarabin) hinzugefügt. Die PCPEC wurden auf Laminin beschichteten Transwell-Filtern (Porengröße 0,4µm, Durchmesser 12mm) ausgesät. Hierbei wurde eine Saaddichte von 50cm<sup>2</sup>g / Nassgewicht von CP-Gewebe verwendet.

## **2.2.2 Messung des Transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bei PCPEC**

Anhand dieser Methode wird auf die Konfluenz des PCPEC-Monolayers und dessen Barriereeigenschaft geschlossen.

### 1. Kultivierung der PCPEC und TEER

Zwei bis drei Tage nach der Aussaat der PCPEC auf den Transwell-Filtern wurde der TEER mit der TEER-Messelektrode des Endohm-Messgerätes gemessen. Die Messung erfolgte nach zweiminütigem Akklimatisieren der Filterplatten bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen, bevor das Nährmedium erneuert wurde. Vor der Durchführung der Messung an den Filtern einer Filterplatte wurde die Messelektrode für mindestens 2min in 70%igem Ethanol desinfiziert und dann mit SFM gründlich abgespült, um einer Kontamination der Filter vorzubeugen. Die Messungen wurden in einem zweitägigen Abstand bis zu dem Erreichen eines

konfluenten Zellmonolayers durchgeführt. Nach dem Erreichen eines konfluenten Zellmonolayers bei einem Widerstand von 180-250 Ohm x cm<sup>2</sup>, 4 bis 5 Tage nach der Aussaat, wurde das Medium von SHM+ARA-C auf SFM o. AB umgestellt. Sobald die PCPEC-Monolayer, nach der Umstellung des Mediums, einen Widerstand von >700 Ohm x cm<sup>2</sup> erreichten (7. bis 10. Tag nach der Aussaat), wurden sie in Versuchen eingesetzt.

## 2. TEER-Messung bei PCPEC nach Infektion mit *S.suis*

Der Ablauf der Messung mit vorheriger Akklimationisierung und Desinfektion erfolgte wie oben beschrieben. Jedoch wurde die Desinfektion der Messelektrode zwischen den Messungen an den einzelnen Filtern einer Filterplatte durchgeführt, um eine Keimverschleppung von einem Well in das nächste zu verhindern.

Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Messungen variierten je nach der Vorgabe des jeweiligen Versuchsprotokolls (je nach Verwendung von lebendem *S. suis*, von UV-inaktiviertem *S. suis* oder von sterilfiltrierten US-Überständen).

So wurden in der Regel entweder die 0h-, 2h-, 4h-, 6h-, 8h-, 24h- und 48h-Werte oder die 0h-, 8h-, 24h- und 48h-Werte während der laufenden Versuche ermittelt.

### **2.2.3 Messung des parazellulären Mannitoflusses bei PCPEC**

Die Mannitoflussmessung ist eine Methode zur Messung der parazellulären Permeabilität. Sie lässt Rückschlüsse auf die Barrierefunktion des PCPEC-Monolayers zu, bei der die TJs zwischen den Zellen eine wichtige Rolle spielen.

#### Erstellung des neuen <sup>3</sup>H-Mannitol-Stocks

Zu Beginn des jeweiligen Versuches wurde ein neuer <sup>3</sup>H-Mannitol-Stock hergestellt.

Der <sup>3</sup>H-Mannitol-Stock hatte eine Konzentration von 250 µ Ci / 0,25 ml.

Um einen  $^3\text{H}$ -Mannitol-Stock als Versuchslösung von 1ml zu erhalten, wurden 3  $\mu\text{l}$  der  $^3\text{H}$ -Mannitol-Ausgangslösung auf 1ml Aqua dest. gegeben. Das Cup mit der erhaltenen Lsg. wurde kurz gevortext, bevor der neue  $^3\text{H}$ -Mannitol-Stock zur Verwendung im Versuch bereitstand. Für jedes Well auf der Filterplatte wurden 20 $\mu\text{l}$  des neuen Stocks benötigt, in denen 100.000 cpm pro Filter enthalten waren. Zur Kontrolle, dass in 20 $\mu\text{l}$  des Stocks 100.000 cpm enthalten waren, wurde eine 20 $\mu\text{l}$  Probe im  $\beta$ -Counter gemessen.

#### Vorbereitung der Transwell-Filterplatten für den Versuch

Die Transwell-Filterplatten wurden am Vorabend eines Versuchs apikal mit 500 $\mu\text{l}$  und basal mit 1000 $\mu\text{l}$  SFM o. AB exakt gefüttert. Am Versuchstag wurden zuerst die Widerstände der Filterplatten gemessen. Es folgte die Inokulation des Stimulus. Je nach Versuchsprotokoll wurde *S. suis* als Lebendkeim, als UV-inaktivierter Keim oder als sterilfiltrierter US-Überstand mit der vorgesehenen MOI verwendet. Dabei wurde der Stimulus je nach Versuchsprotokoll in das apikale oder in das basolaterale Kompartiment appliziert. Im Anschluss wurde im Isotopenlabor  $^3\text{H}$ -Mannitol mit der Konzentration von 100.000 cpm in das apikale Kompartiment gegeben.

Bei allen TEER- und Mannitol-Versuchen wurden 100 $\mu\text{l}$  des vorbereiteten Stimulus auf einer CCH- Platte ausplattiert und nach einer ONC im Brutschrank ausgewertet, um eine Kontamination des eingesetzten Stimulus (Lebend-, UV- oder US-Stimulus) durch Fremdkeime auszuschließen und die Inokulationsdosis zu bestimmen.

#### Probenentnahme und Messung mit dem $\beta$ -Counter

Nach der apikalen Applikation von  $^3\text{H}$ -Mannitol auf die Filterplatten wurden im zeitlichen Verlauf basolaterale Mediumproben entnommen und diese mit dem  $\beta$ -Counter gemessen (nach 8h, 24h und 48h bzw. je nach gewünschter Zeitvorgabe).

Als Mediumprobe wurde 100µl aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und in ein Szintillationsröhrchen gefüllt. Dann wurden 2ml Szintillationsflüssigkeit dazugegeben, das Szintillationsröhrchen gut verschlossen und kurz geschüttelt. Anschliessend wurde die Messung der Probe mit dem  $\beta$ -Counter durchgeführt. Zusammen mit den aus dem Versuch gewonnenen Proben wurde eine Counter-Kontrollprobe gemessen. Diese Counter-Kontrollprobe bestand aus einem mit 100.000cpm gefülltem Szintillationsröhrchen (=> 20µl aus dem neu erstellten Mannitol-Stock), um einen cpm-Vergleichswert auf dem Messprotokoll des Counters zu erhalten. Nach jeder basolateralen Probenentnahme wurde 100µl SFM o. AB basal hinzugefügt. Der dadurch entstehende Verdünnungseffekt wurde bei der Auswertung der Messergebnisse berücksichtigt. Unverzüglich nach dem Versuchsbeginn und zwischen den einzelnen Probenentnahmen wurden die stimulierten Filterplatten im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

#### Kontrollfilter mit größtmöglicher $^3\text{H}$ -Mannitoldurchflussrate als Referenzwert

Cytochalasin wurde je Versuchsreihe in einer Konzentration von 1µg/ml in das apikale Kompartiment eines Wells der Versuchs-Filterplatte gegeben. Cytochalasin D hemmt das Zellzytoskelett und führt zur Abrundung der Zellen. Dies hat die Öffnung der Interzellularspalte zur Folge, sodass der  $^3\text{H}$ -Mannitoffluss vom apikalen in das basolaterale Kompartiment im Wesentlichen nur noch von der Porengröße des Filters und des Flüssigkeitsgradienten abhängig ist.

Es wurden Proben aus dem basolateralen Kompartiment parallel zu den anderen Probenentnahmen (= den Proben mit Stimulus) entnommen und im  $\beta$ -Counter gemessen. Der gemessene Wert stand für die größtmögliche  $^3\text{H}$ -Mannitoldurchflussrate über den Filter zu dem jeweils gemessenen Zeitpunkt. Er diente den im Versuch gewonnenen Werten als Referenzwert. Hierdurch erhielt man

ein Maß für den größtmöglichen Durchfluss von  $^3\text{H}$ -Mannitol aus dem apikalen in das basolaterale Kompartiment.

## 2.3 *Streptococcus suis*

### 2.3.1 Serotyp 2 Stämme

Es wurden verschiedene virulente *S. suis* - Serotyp 2 - Stämme in dieser Arbeit verwendet, die freundlicherweise durch Gottschalk M. (Faculte de Medecine Veterinaire, Quebec, Canada) und Smith H. (DLO-Institute for Animal Science and Health, Lelystad, The Netherlands) bereitgestellt wurden.

Stamm	Herkunftsland	Klinischer Ursprung	MRP	EF	Suilysin	Suilysin Aktivität (%) <sup>a</sup>
T 15	Niederlande, Lelystad	Gesundes Schwein	negativ	negativ	positiv	21
S735	Niederlande, Lelystad	Krankes Schwein	positiv	positiv <sup>b</sup>	positiv	172
99-734 723	Canada, Quebec	Mensch, Septikämie	negativ	negativ	negativ	0
10	Niederlande, Lelystad	Krankes Schwein	positiv	positiv	positiv	58
10cps $\Delta$ EF <sup>c</sup>	Niederlande, Lelystad	Krankes Schwein	positiv	positiv	positiv	82

Tabelle 3

Anmerkungen:

a Ergebnisse werden als prozentualer Wert der mittleren relativen Hämolysin-Aktivität von der Suilysin-Referenz-Stamm P 1/7- Aktivität dargestellt.

b Variante des EF Proteins mit höherem molekularem Gewicht

c Bei der isogenen akapsulären Mutante 10cps $\Delta$ EF wurden Teile der Gene cps2E und cps2F durch ein Antibiotikaresistenzgen ersetzt.

(siehe auch Tenenbaum et al., 2005)

### 2.3.2 Anzucht der Lebendkeime

Zur Anzucht von Lebendkeimen wurden Übernachtkulturen (ONC) von *S. suis* (aus dem *S. suis*-Stock; Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ) in 10 ml THB –Lsg. angelegt. Die Keime wurden für 6 Stunden in ein Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$ , mit einer Schwenkstufe von 3-4, gegeben. Es folgte das dreifache Waschen der Keime, das folgendermaßen durchgeführt wurde. Die Falcons mit den Keimen wurden zentrifugiert, für die Dauer von 10min. mit der Einstellung Rotor 195, 3000 RZB, bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Danach wurde der Überstand dekantiert und das Bakterien-Pellet mit 10ml SFM o. AB resuspendiert. Es folgte eine zweite und eine dritte Zentrifugation (mit den o.g. Einstellungen) mit erneuter Dekantierung des Überstandes und Resuspendierung mit SFM o. AB. Nach der letzten Dekantierung wurde das Bakterien-Pellet mit 1ml SFM o. AB resuspendiert. Die erhaltene Keimsuspension wurde unter Verwendung des Photometers, mit der Einstellung Ex 650 und OD 600, auf die Konzentration  $1 \times 10^8$  Keime/ml eingestellt. (Ex 650 = 0,650nm Extinktion). Hierbei entsprachen 0,650nm Extinktion am Photometer einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^8$  Keimen/ml für die Keime T15 und 99-734723. Bei dem Keim S735 lag dagegen bei 0,650nm eine Bakterienkonzentration von  $5 \times 10^8$  Keimen/ml vor. Um eine Keimsuspension von  $1 \times 10^8$  Keime/ml zu erhalten wurde 0,1ml der am Photometer auf 0,650nm eingestellten S735-Keimsuspension mit 0,4ml SFM o. AB verdünnt. Die Konzentration  $1 \times 10^8$  Keime/ml entsprach einer MOI 100. (MOI = „multiplicity of infection“). Die auf MOI 100 (=  $1 \times 10^8$  Keimen/ml) eingestellten Keimsuspensionen wurden als Stimulus in den Versuchen verwendet, oder entsprechend der für einen Versuch benötigten MOI konzentriert oder verdünnt eingesetzt.

### **2.3.3 Herstellung von UV-inaktivierten Keimen**

Zur Bestrahlung wurde eine UV-Lampe mit 254nm Wellenlänge verwendet. Unter der sterilen Werkbank wurden vier Petrischalen mit jeweils 5ml 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 (20ml) wurde in einer Menge von jeweils 100µl bzw. 200µl in sterile Eppendorf-Tube gefüllt und zur Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -80°C eingefroren.

Es wurden zwei Formen der Kontrolle durchgeführt, um eine vollständige Inaktivierung der Bakterien sicherzustellen. Als erste Kontrolle wurden 100µl der UV-bestrahlten Keimsuspension auf einer CCH- Platte ausgebracht. Es folgte die ONC im Brutschrank und die Auswertung der CCH- Platte am nächsten Tag.

Als zweite Kontrolle wurden 1ml der UV-bestrahlten Keimsuspension in einen Falcon mit 10ml THB gegeben. Dieses wurde in ein Wasserbad für 6h (ONC) gestellt, bei 37°C und einer Schwenkstufe von 3 - 4. Danach wurde das Falcon zentrifugiert (Zentrifugeneinstellung: s.o.), der Überstand dekantiert und das Bakterien-Pellet mit der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Es wurden 100µl des resuspendierten Pellets auf einer CCH- Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die CCH- Platten nach einer ONC im Brutschrank, ausgewertet.

### 2.3.4 Herstellung sterilfiltrierter US-Überstände

Eine definierte Menge an Lebendkeimsuspension wurde für die Dauer von 30 min. mit der kurzen Sonotrode mit *high-intensity* mit 100 W ultraschalllysiert. Vor der Durchführung des Ultraschalls wurde die kurze Ultraschallsonotrode zur Desinfektion in ein Falcon mit 70%igem Ethanol getaucht und mit den Einstellungen von US `20 sec, - Cycle und 100 W Power aktiviert. Nach der Desinfektion wurde die Sonotrode mit einer sterilen Kompresse abgetrocknet. Die Sonotrode wurde 0,5 cm tief in die Keimsuspension eingetaucht und dann wurde die Beschallung durchgeführt. Während der Ultraschallbehandlung befand sich der Falcon mit der Keimsuspension in einem Eiswasserbad, um ein Überhitzen der Keimsuspension zu verhindern. Zusätzlich wurden 5-minütige Abkühlpausen in 10 minütigen Abständen eingelegt, um eine Inaktivierung der Keime durch die entstehende Hitze zu vermeiden. Das Falcon Röhrchen war bis auf einen kleinen Schlitz, als Einlass für die Sonotrode, durch eine Tegadermfolie verschlossen. Hierdurch sollte einerseits eine Kontamination der Umgebung mit der Keimsuspension und andererseits eine Kontamination der Keimsuspension durch die Umgebung vermieden werden. Nach 30-minütiger Ultrabeschallung wurde die Keimsuspension in sterile 2ml-Eppendorf-Tube abgefüllt und für 30min. zentrifugiert (bei einer Einstellung von 12000g und 4°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer 5ml-Spritze aus den Eppendorf-Tube entnommen, ohne dabei die Pellets aufzuwirbeln. Der gesamte Überstand aller zentrifugierten Eppendorf-Tube wurde in einem 50 ml Falcon gesammelt, während die übrig gebliebenen Pellets entsorgt wurden. Es folgt die Sterilfiltration des Überstandes unter Verwendung von Sterilfiltern der Porengröße 0,22µm. Aus dem sterilfiltrierten Überstand wurden in sterilen



Eppendorf-Tube Aliquots (a 200µl) erstellt. Diese Aliquots wurden bis zur Anwendung in Versuchen bei - 80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche US-Inaktivierung der Bakterien wurden 100µl der ultraschalllysierten Keimsuspension auf eine CCH- Platte gegeben. Es folgte die ONC im Brutschrank mit der Auswertung am nächsten Tag.

## **2.4 Versuchsdurchführungen**

### **2.4.1 Aufbau der Vorversuche**

#### **Verwendung von Inhibitoren mit *S. suis***

Die Versuche wurden auf einer Multiwell 24-Platte durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 4h im Brutschrank. Hierbei wurden Bakterien mit einer MOI 10 verwendet. In jedes Well wurden 100µl Keimsuspension auf 400µl SFM o. AB gegeben. Die verwendeten Inhibitoren wurden direkt nach Applikation der Bakterien in den folgenden Dosierungen in die Wells hinzugegeben: Dexamethason 1, 10 und 100µM, BAPTA 5 und 50µM, Bisindolylmaleimide 10, 100 und 1000nM, Catalase 500, 1000 und 2000 U, MnTBAP 25 und 50 µM, PBN 100 und 1000µM, PMA 10, 100 und 1000nM.

Je Versuchsreihe lief ein Well als Kontrolle nur mit Bakterien (ohne den Zusatz von Inhibitoren) mit, um einen Referenzwert zu erhalten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100µl Proben je Well entnommen. Aus diesen Proben wurden Verdünnungsreihen bis  $10^{-6}$  mit PBS erstellt. Die letzten vier Verdünnungen wurden auf CCH- Platten ausplattiert (ONC im Brutschrank) und es erfolgte die Auswertung am nächsten Tag.

Die Vorbereitung der Bakterien für den Versuch wurde, wie in dem Kapitel 2.3 beschrieben, durchgeführt. Die am Photometer auf 0,650 nm bzw. MOI 100 eingestellte Keimsuspension wurde mit SFM o. AB auf eine MOI 10 verdünnt. Als

Kontrolle wurde je Keim aus einer Probe mit MOI 10 eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-5}$  mit PBS erstellt, und die letzten 4 Verdünnungen auf CCH- Platten ausgestrichen (ONC im Brutschrank, die Auswertung erfolgte am nächsten Tag).

### **Verwendung von Inhibitoren mit PCPEC - TEER-Messung**

Die Versuche wurden auf Transwell-Filterplatten mit konfluenten PCPEC-Monolayern durchgeführt (zur Vorbereitung der Transwell-Filterplatten und Überprüfung auf Konfluenz der PCPEC-Monolayer siehe Kapitel 2.2). Hierbei wurden die auszutestenden Inhibitoren in den folgenden Dosierungen in das apikale Kompartiment der Transwell-Filterplatten gegeben: Dexamethason 1, 10 und  $100\mu\text{M}$ , BAPTA 5 und  $25\mu\text{M}$ , Bisindolylmaleimide  $1000\text{nM}$ , Catalase  $500\text{ U/ml}$ , CHX  $10\mu\text{g/ml}$ , Herbimycin  $1\mu\text{M}$ , MnTBAP  $25\mu\text{M}$ , PBN  $1000\mu\text{M}$  und PMA  $100\text{nM}$ .

Es erfolgte die TEER-Messung zu folgenden Zeitpunkten: 0h-2h-4h-6h-8h-24h-48h. Je Versuchsreihe lief ein Well pro Transwell-Filterplatte ohne den Einsatz von Inhibitoren als Kontrolle mit, um einen Referenzwert zu erhalten.

### **Stimulation von PCPEC mit *S. suis*- Serotyp 2 Stämmen**

Hierbei wurden die *S.suis*-Stämme T15, S735 und 99-734723 in der MOI 10, 50 und MOI 100 eingesetzt. Da es sich bei dem *S.suis*-Keim S735 um einen europäischen *S.suis* Referenzstamm handelt und dieser in den Vorversuchen ein günstiges Effektprofil zeigte, wurden fast alle weiteren Experimente mit S735 durchgeführt. Zur Untersuchung des Effektes auf den TEER wurden als Lebendkeime T15, S735 und 99-734723 in einer MOI 50 apikal eingesetzt. Um den Effekt auf den parazellulären Mannitolfloss zu untersuchen, wurde als Lebendkeim S735 in einer MOI 50 apikal verwendet.

Als UV-inaktivierte Keime und US-inaktivierte Überstände (Ultraschalllysate) wurden T15, S735, 10, 10cps $\Delta$ EF und 99-734723 mit einer MOI 100 apikal und basal und einer MOI 500 apikal eingesetzt.

Bei der Wahl der MOI sollte eine Dosis mit mittlerer Zytotoxizität untersucht werden. Bei Lebendkeimen war eine MOI 10 schwach zytotoxisch und eine MOI 100 stark zytotoxisch, sodass wir uns für die weiteren Versuche mit Lebendkeimen für die MOI 50 mit mittlerer Zytotoxizität entschieden. Bei den Versuchen mit UV-inaktivierten Keimen und US-Lysaten entschieden wir uns, eine MOI von 100 und 500 zu verwenden.

#### **2.4.2 Aufbau der Hauptversuche**

##### **Stimulation von PCPEC mit *S. suis*-Lebendkeimen unter Anwendung der Inhibitoren – TEER- und Mannitofluss-Messung**

Die Versuche wurden auf Transwell-Filterplatten mit konfluenten PCPEC-Monolayern durchgeführt. Die TEER- und Mannitoflussmessungen erfolgten nach 0h, 2h, 4h, 6h und 8h. Nach der Messung des 0h-Wertes Applikation der Inhibitoren mit folgenden Dosierungen: Dexamethason 1 $\mu$ M, 10 und 100 $\mu$ M, BAPTA 5 und 25 $\mu$ M, Bisindolymaleimide 1000nM, CHX 10 $\mu$ g/ml, Herbimycin 1 $\mu$ M, MnTBAP 25 $\mu$ M, PBN 1000 $\mu$ M, PMA 100nM. Nach 1h Vorinkubationszeit für die Inhibitoren wurde *S.suis*-Lebendkeim mit der gewünschten MOI in das apikale bzw. in das basale Kompartiment der Transwell-Filterplatten zugegeben.

Die TEER-Messung wurde wie in Kapitel 2.2.2 und die Mannitoflussmessung wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben durchgeführt.

## **Stimulation von PCPEC mit UV-inaktiviertem *S.suis* und sterilfiltrierten US-Überständen unter Anwendung der Inhibitoren - TEER- und**

### **Mannitolflussmessung:**

Die Versuche wurden auf Transwell-Filterplatten mit konfluenten PCPEC-Monolayern durchgeführt. Die TEER- und Mannitolflussmessungen erfolgten nach 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h und 48h. Nach der Messung des 0h-Wertes Applikation der Inhibitoren mit folgenden Dosierungen: Dexamethason 1, 10 und 100µM, BAPTA 5 und 25µM, Bisindolymaleimide 1000nM und MnTBAP 25µM. Nach 1h Vorinkubationszeit für die Inhibitoren wurde entweder der UV-inaktivierte *S.suis* oder der sterilfiltrierte Überstand mit der gewünschten MOI in das apikale bzw. in das basale Kompartiment der Transwell-Filterplatten zugegeben. Für die Versuche wurde der UV-inaktivierte S735 und der sterilfiltrierte Überstand von S735 mit einer MOI 100 und MOI 500 verwendet. Hierbei wurde die Anwendung der MOI 500 nur mit dem Inhibitor Dexamethason ausgetestet.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) oder als Standardabweichungen dargestellt. Die Daten wurden durch einen Student's t Test analysiert. Ein P- Wert von < 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt.

Zur näheren Erläuterung, TEER- Daten wurden in Graphiken im time-course Format als prozentualer Wert bezogen auf die Kontrollwerte, zu Beginn von jeder Versuchsreihe, dargestellt. Daten des <sup>3</sup>H-Mannitolfusses wurden als prozentualer Wert des Tracers im basolateralen Kompartiment dargestellt, bezogen auf den Referenzwert des Kontrollfilters, der bei jeder Versuchsreihe erhoben wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Schädigung der Barrierefunktion durch *S. suis* Lebendkeim

Zunächst wurden die Effekte auf die Barrierefunktion von PCPEC durch die *S. suis*-Stämme T15, S735 und 99-734723, in der MOI 10 und MOI 100, mit einer MOI 50 verglichen. Da es sich bei dem *S. suis*-Keim S735 um einen europäischen *S. suis* Referenzstamm handelt, er in allen drei angewendeten Präparationen (lebend, US – und UV-behandelt) zur Schädigung der Barriereigenschaften des PCPEC-Monolayers führte und er in den Vorversuchen ein günstiges Effektprofil zeigte, wurden fast alle weiteren Experimente mit diesem durchgeführt.

#### 3.1.1 Effekt auf den TEER

Die Lebendkeime T15, S735 und 99-734723 führten, apikal appliziert in der Konzentration MOI 50, zu einem signifikanten TEER-Abfall. So führte T15 bereits nach 4h, aber vor allem nach 6h zu einem signifikanten TEER-Abfall. S735 führte dagegen erst nach 8h zum signifikanten TEER-Abfall. Der Lebendkeim 99-734723 führte nach 6h, besonders jedoch nach 8h zu einem signifikanten TEER-Abfall (für S735 siehe Abb. 11, Daten für T15 und 99-734723 werden nicht gezeigt).

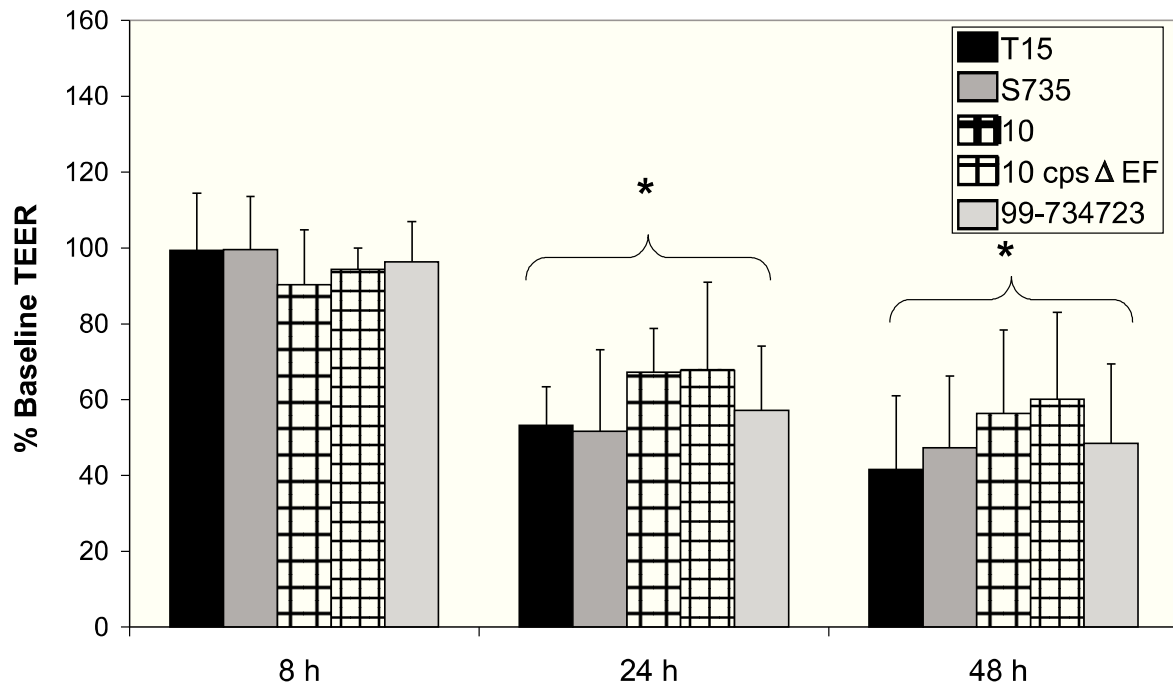
#### 3.1.2 Effekt auf den parazellulären Mannitofluss

Der Lebendkeim S735 führte apikal appliziert in der Konzentration MOI 50 erst ab dem 8h-Wert zu einer signifikanten Permeabilitätssteigerung im Vergleich zur Kontrolle (4,5 % des Markers im basolateralen Kompartiment 8h nach Infektion mit S735 im Vergleich zu 2,5 % der Kontrolle) (siehe auch Abb. 12).

### 3.2 Schädigung der Barrierefunktion durch UV-inaktivierten *S. suis*

Als Stimulus auf den PCPEC-Monolayern kamen bei den TEER- und Mannitol-Versuchen die mit UV-inaktivierten Keime T15, S735, 10, 10cps $\Delta$ EF und 99-734723 zum Einsatz. Mit den TEER- und den Mannitoflussmessungen wurden die 8h-, 24h- und 48h-Werte ermittelt.

### 3.2.1 Effekt auf den TEER



**Abb. 3 Apikale Stimulation von PCPEC mit UV-inaktivierten *S. suis* Präparationen (MOI 100).**

Effekte von apikal applizierten UV-inaktivierten *S. suis*-Stämmen (MOI 100) auf den TEER von PCPEC. Die TEER-Ergebnisse sind als Prozentsatz der Basiswerte (= TEER-Werte vor der Infektion;  $1133 \pm 231 \text{ Ohm cm}^2$ ) angezeigt. Die TEER-Werte der nichtinfizierten Kontrollen blieben nahezu konstant über den Zeitraum von 48h ( $1174 \pm 181 \text{ Ohm cm}^2$ ). Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt.

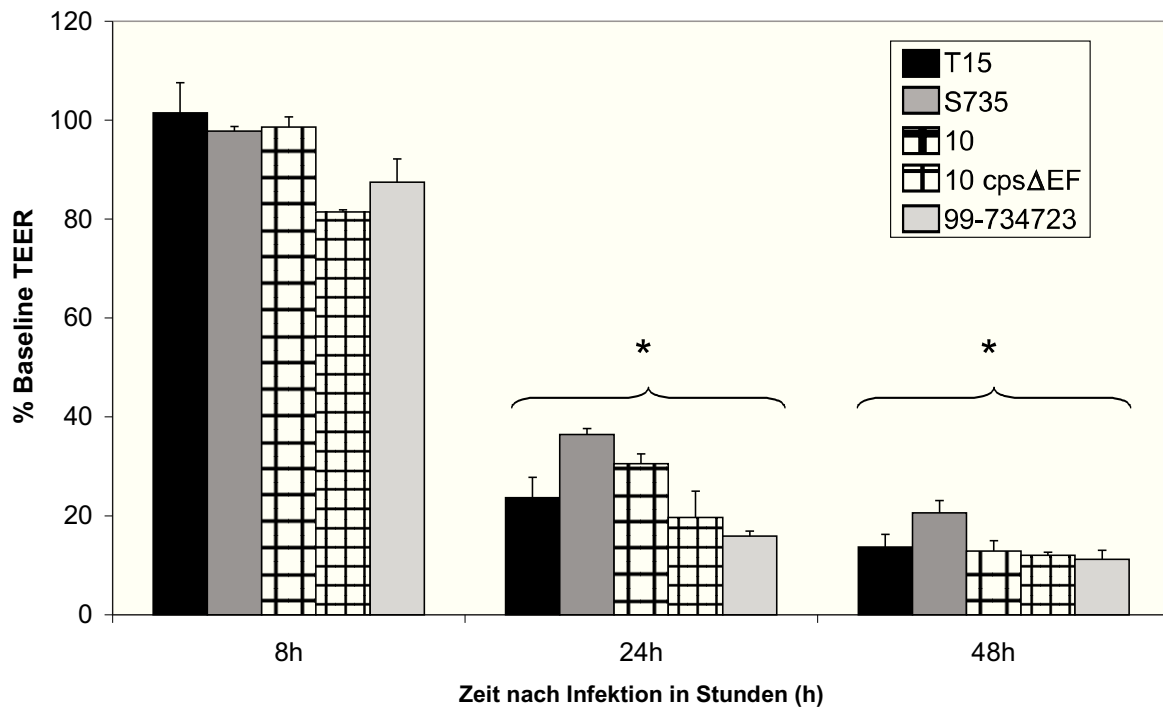
Die Daten wurden durch einen Student's t Test analysiert. Ein P- Wert von  $< 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung.

Alle apikal eingesetzten UV- Stimuli mit der MOI 100 führten zu signifikanten TEER-Abfällen der 24h- und 48h-Werte, siehe Abb. 3.

Hierbei zeigten sich für die UV-Keime T15, S735 und 99-734723 signifikante TEER-Abfälle nach 24h auf teils unter 60% und nach 48h auf teils unter 50% des Ausgangswertes.

Bei den UV-Keimen 10 und 10cps $\Delta$ EF ließen sich TEER-Abfälle beobachten, die nach 24h bei 65% und nach 48h bei 60% des Ausgangswertes lagen.

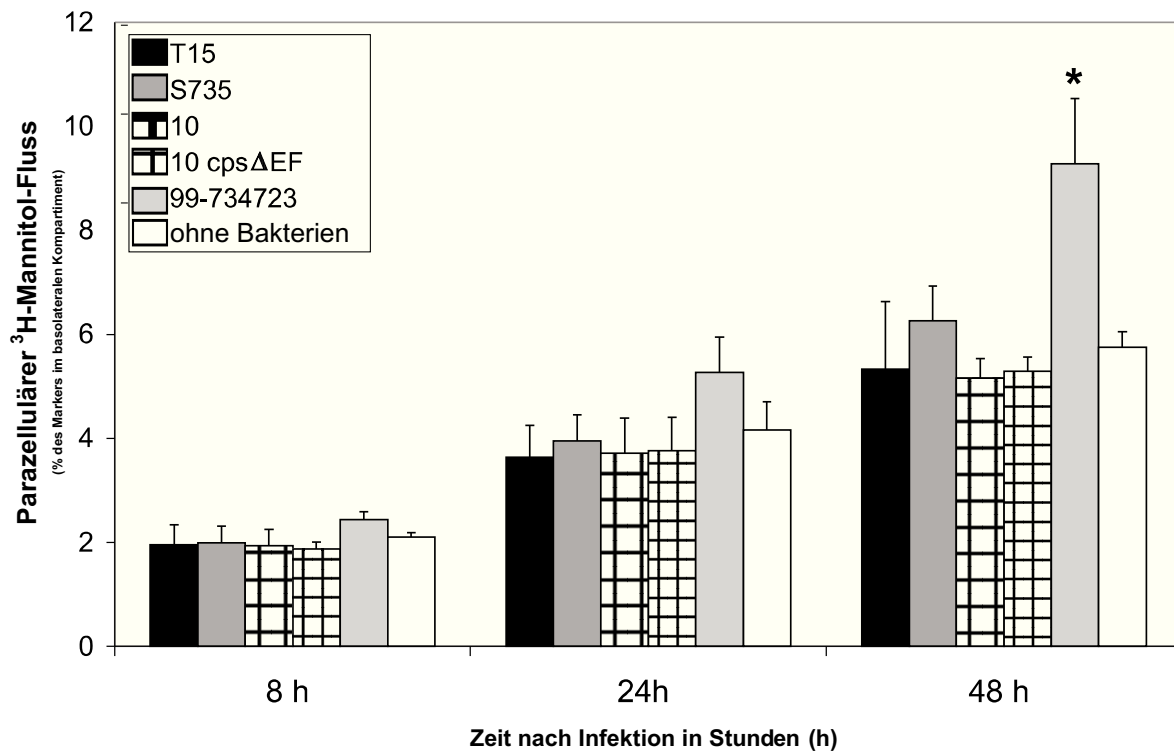
Kein TEER-Abfall zeigte sich in den Versuchen mit den basal eingesetzten UV-Keimen T15, S735, 10, 10cps $\Delta$ EF und 99-734723, MOI 100 (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4 Apikale Stimulation von PCPEC mit UV-inaktivierten *S. suis* Präparationen (MOI 500).** Effekte von apikal applizierten UV-inaktivierten *S. suis*-Stämmen (MOI 500) auf den TEER von PCPEC-Monolayern. Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. \* P- Wert von  $< 0,05$ , verglichen zur uninfizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Bei der Anwendung der MOI 500 zeigten sich für die UV-Keime 10cps $\Delta$ EF und 99-734723 bereits nach 8h ein TEER-Abfall auf 80% bzw. 85% des Ausgangswertes. Ab dem 24h-Wert bewirkten alle ausgetesteten UV-Keime einen signifikanten TEER-Abfall auf unter 40% und nach 48h auf unter 20% des Ausgangswertes.

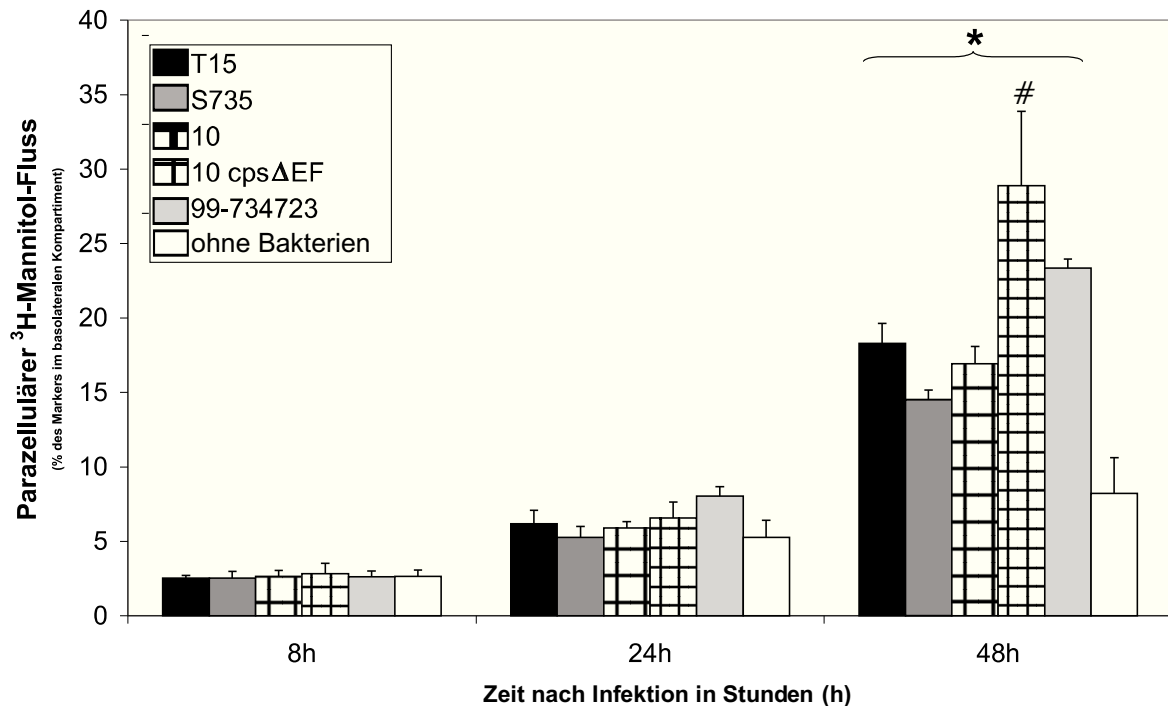
### 3.2.2 Effekt auf den parazellulären Mannitolfluss



**Abb. 5 Apikale Stimulation von PCPEC mit UV-inaktivierten *S. suis* Präparationen (MOI 100).** Effekte von apikal applizierten UV-inaktivierten *S. suis*-Stämmen (MOI 100) auf den <sup>3</sup>H-Mannitolfluss von PCPEC. Der <sup>3</sup>H-Mannitolfluss wurde in der apikalen-zu-basolateralen Richtung gemessen, mit oder ohne *S. suis* Infektion, und ist als Prozentangabe des Markers im basolateralen Kompartiment dargestellt. Die Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*). Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung.

Nach der Infektion mit der MOI 100 ließ sich keine Steigerung der parazellulären Permeabilität durch die UV-Keime T15, S735, 10 und 10cpsΔEF im Vergleich zur Kontrolle (ohne Bakterien) beobachten. Bei Stimulation mit dem UV-Keim 99-734723 stellte sich bereits nach 24h eine leichte Permeabilitätszunahme dar, die nach 48h im Vergleich zur Kontrolle signifikant war (Abb. 5). So kam es zu einem fast 10% gesteigerten Mannitolfluss nach 48-stündiger Einwirkung des UV-Keimes 99-734723.



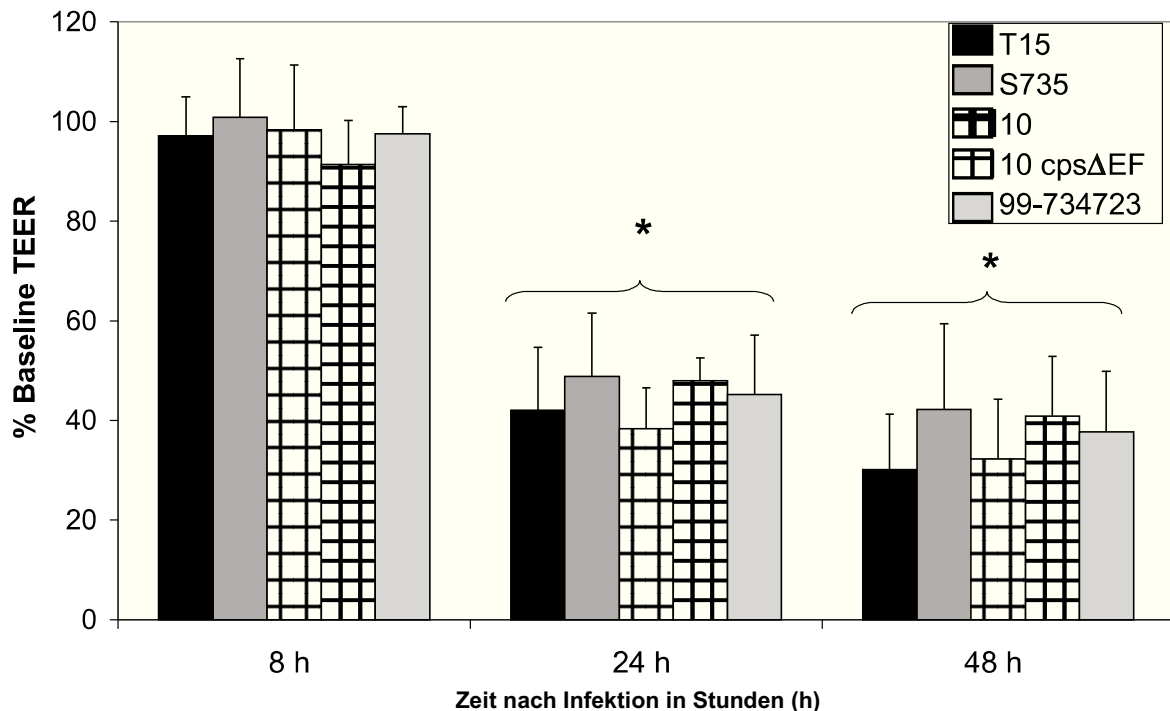


**Abb. 6 Apikale Stimulation von PCPEC mit UV-inaktivierten *S. suis* Präparationen (MOI 500).** Effekte von apikal applizierten UV-inaktivierten *S. suis* -Stämmen (MOI 500) auf den  $^3\text{H}$ -Mannitolfluss von PCPEC. Die Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. \* P-Wert von  $< 0,05$ , verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Bei dem Einsatz der MOI 500 zeigte sich nach 24h bei UV-99-734723 mit  $\sim 7,5$  % die größte, aber noch nicht signifikante Steigerung des Mannitolfusses im Vergleich zu den anderen UV-Keimen und der Kontrolle, die im Bereich von 5 – 6 % lagen. Ein sprunghafter Anstieg der Permeabilität ließ sich nach 48h bei allen verwendeten UV-Keimen beobachten. Die stärkste signifikante Permeabilitätszunahme bewirkte UV-10cps $\Delta$ EF, mit  $\sim 28$  % des Markers im basolateralen Kompartiment, gefolgt von UV-99-734723 mit  $\sim 23$ %. Die UV-Keime T15, S735 und 10 zeigten eine signifikante Steigerung des Mannitolfusses auf 14 – 17 %. Im Vergleich lag bei der Kontrolle nur  $\sim 8$  % des Markers im basolateralen Kompartiment.

### 3.3 Schädigung der Barrierefunktion durch US-sterilfiltrierte Überstände von *S.suis*

#### 3.3.1 Effekt auf den TEER



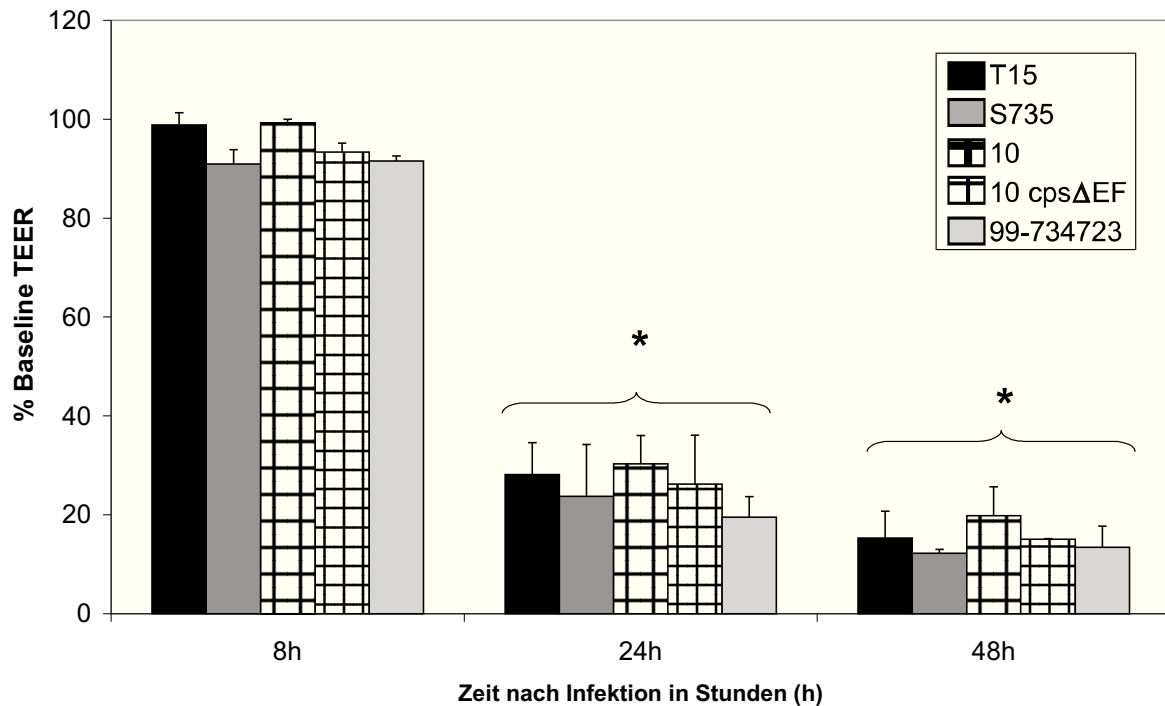
**Abb. 7 Apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Ultraschall-Lysaten (MOI 100).**

Effekte von apikal applizierten US-Überständen von *S. suis*-Stämmen (MOI 100) auf den TEER von PCPEC. Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion.

Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Alle apikal applizierten US- Stimuli mit der MOI 100 führten zu signifikanten TEER-Abfällen der 24h- und 48h-Werte im Vergleich zu dem 8h-Wert. Es zeigten sich nach 24h für alle US-Lysate der Keime in Abb. 7 TEER-Abfälle auf unter 50 % und nach 48h auf unter 42% des Ausgangswertes. Hierbei bewirkten die US-Keime T15 und 10 mit ~ 30 % und 32 % nach 48h die stärksten TEER-Abfälle in den Versuchen.

Unter der basolateralen Stimulation mit den oben genannten US-Lysaten, MOI 100, kam es zu keinem TEER-Abfall.



**Abb. 8 Apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Ultraschall-Lysaten (MOI 500).**

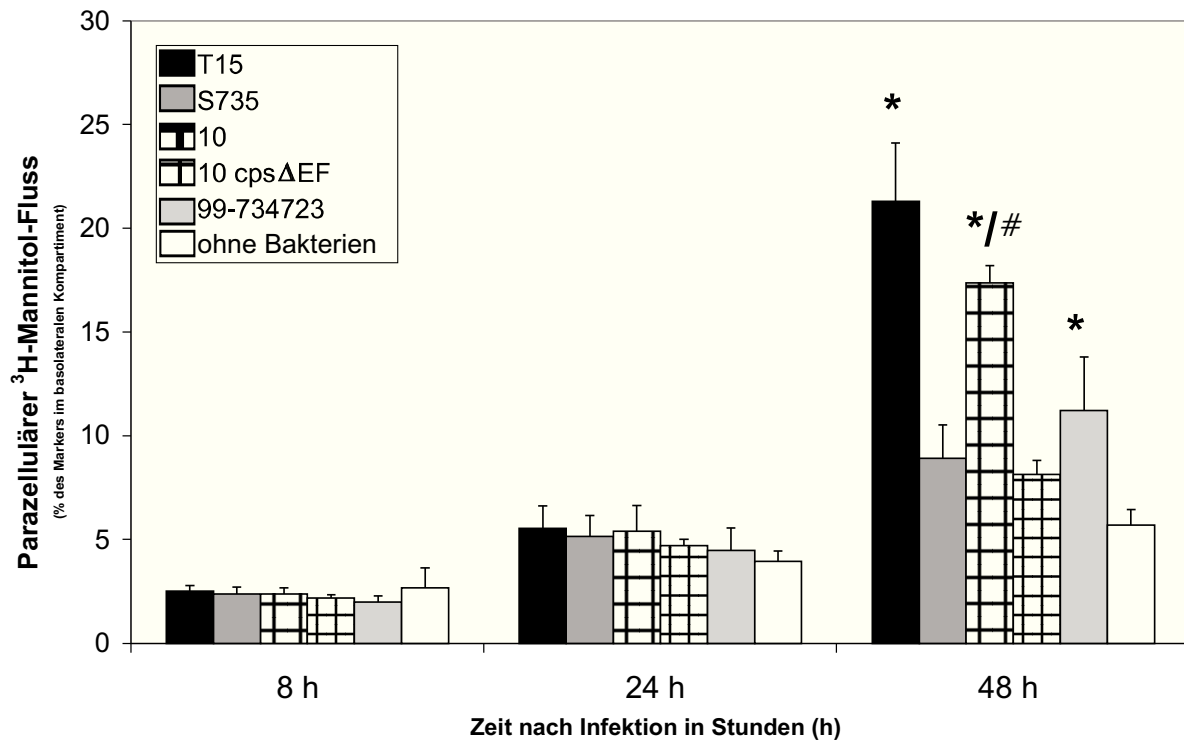
Effekte von apikal applizierten US-Überständen von *S. suis* -Stämmen (MOI 500) auf den TEER von PCPEC. Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion.

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. \* P- Wert von  $< 0,05$ , verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

In den Versuchen mit den apikal applizierten US-Lysaten von *S. suis* mit einer MOI 500 zeigten sich für die US-Keime S735, 10cps $\Delta$ EF und 99-734723 bereits bei dem 8h-Wert ein TEER-Abfall auf  $\sim 90$  % des Ausgangswertes.

Ab dem 24h-Wert bewirkten alle US-Keime einen signifikanten TEER-Abfall auf unter 30 % und nach 48h auf unter 20 % des Ausgangswertes. Hierbei ließen sich für S735 und 99-734723 die stärksten TEER-Abfälle beobachten.

### 3.3.2 Effekt auf den parazellulären Mannitolfluss



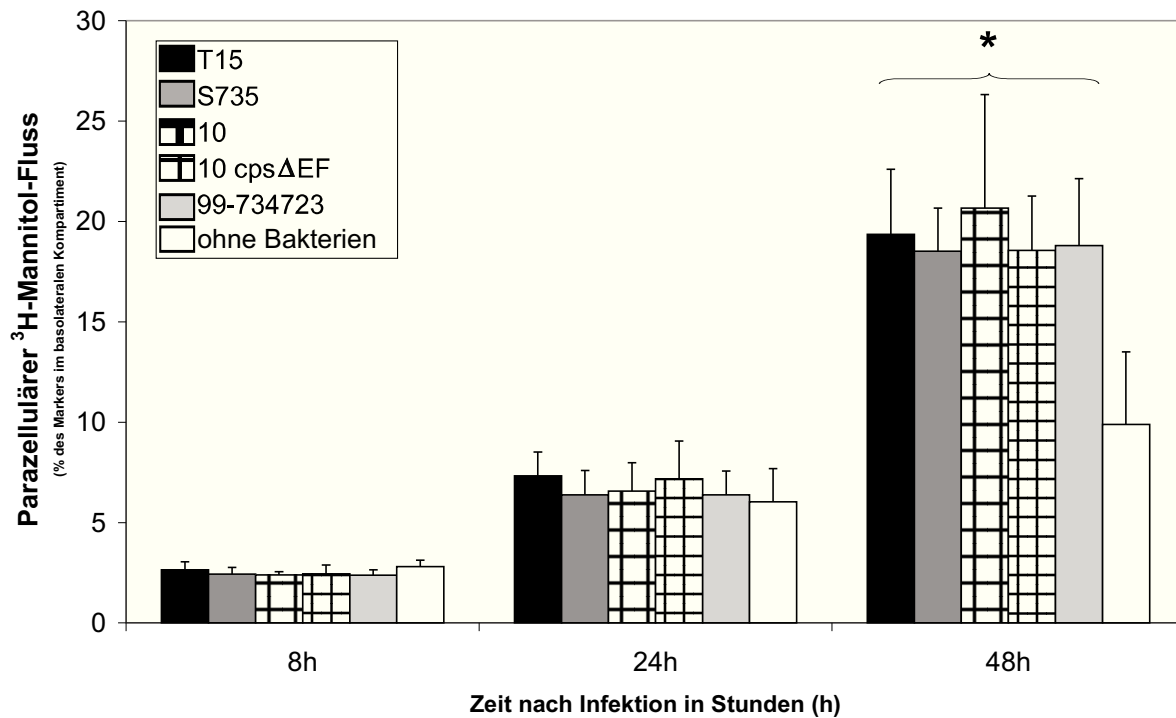
**Abb. 9 Apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Ultraschall-Lysaten (MOI 100).**

Effekte von apikal applizierten US-Überständen von *S. suis* –Stämmen (MOI 100) auf den [<sup>3</sup>H]-Mannitolfluss von PCPEC. Die Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Für die Mannitolversuche wurden als apikale Stimuli auf den PCPEC-Monolayern die Ultraschall-Lysate der Keime T15, S735, 10, 10cpsΔEF und 99-734723 verwendet. Nach der Infektion mit der MOI 100 ließ sich eine signifikante Permeabilitätssteigerung nach 48h durch alle eingesetzten US-Keime im Vergleich zur Kontrolle (ohne Bakterien) beobachten.

Es zeigte sich die größte signifikante Steigerung unter dem Einfluss von US-T15 mit ~ 21 % des Markers im basolateralen Kompartiment, gefolgt von US-10 mit ~ 17 % und 99-734723 mit 11 %. Im Vergleich dazu lag die Kontrolle bei ~ 5%.

Keine Permeabilitätssteigerung ließ sich für die basal applizierten US-Stimuli T15, S735, 10, 10cpsΔEF und 99-734723 mit der MOI 100, beobachten.



**Abb. 10 Apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Ultraschall-Lysaten (MOI 500).**

Effekte von apikal applizierten US-Überständen der *S. suis*-Stämmen (MOI 500) auf den [<sup>3</sup>H]-Mannitolfluss. Die Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. \* P-Wert von < 0,05, verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt.

Unter dem Einsatz der MOI 500 kam es nach 48h zu einer ausgeprägten und signifikanten Permeabilitätssteigerung bei allen verwendeten US-Keimen im Vergleich zu den 8h- und 24h-Werten und im Vergleich zur Kontrolle (ohne Bakterien) (siehe Abb. 10). Während die 8h-Werte der US-Keime mitsamt der Kontrolle im Bereich von 2,5 % und die 24h-Werte um 6 % lagen, zeigte sich für die 48h-Werte der Keime eine signifikante Permeabilitätssteigerung auf 18 – 21 % (die größte Zunahme der Permeabilität hatte hierbei US-10), im Vergleich zu der Kontrolle mit nur 10% des Markers im basolateralen Kompartiment nach 48h.

### 3.4 Effekt von zellulären Inhibitoren auf das bakterielle Wachstum und die Barrierefunktion von PCPEC

#### 3.4.1 Einfluss von zellulären Inhibitoren auf das bakterielle Wachstum

Als Lebendkeime wurden *S.suis* T15, S735 und 99-734723 mit der MOI 10 in den Versuchen untersucht. Zu den Inhibitoren, die zu keiner Beeinflussung des

bakteriellen Wachstums führten, gehörten: Bisindolylmaleimide, Dexamethason, PBN und PMA. Dagegen zeigte der Inhibitor BAPTA einen nicht-signifikanten (zum Teil hemmenden) Einfluss auf das bakterielle Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Der Inhibitor Catalase förderte signifikant das bakterielle Wachstum, v.a. bei den Keimen S735 und 99-734723. Auch unter dem Einfluss des Inhibitors MnTBAP zeigte sich eine Steigerung des bakteriellen Wachstums des Keimes 99-734723. Aus diesen Gründen wurden die Inhibitoren BAPTA, Catalase und MnTBAP nur unter Vorbehalt in den folgenden Versuchen eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.2 Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC**

Wir setzten folgende Substanzen bzw. zellulären Inhibitoren ein: BAPTA, Bisindolylmaleimide, Catalase, CHX, Dexamethason, Herbimycin, MnTBAP, PBN und PMA. Bevor die Inhibitoren nach einer Stimulation mit *S.suis* auf den PCPEC-Monolayern ausgetestet wurden, wurde eine Reihe von Vorversuchen (siehe Kapitel 2.4.1) durchgeführt. Die Vorversuche dienten dazu, schädigende Einflüsse durch die Inhibitoren auf die PCPEC (wie z.B. das Auslösen eines TEER-Abfalls oder die Steigerung des parazellulären Mannitofflusses) und auf die *S.suis*-Lebendkeime auszuschliessen (siehe 3.4.1).

In den Vorversuchen konnte mittels TEER-Messung über 48h eine direkte Schädigung des PCPEC-Monolayers durch folgende Inhibitoren ausgeschlossen werden: BAPTA (5 und 25 $\mu$ M), Bisindolylmaleimide (1000nM), CHX (10 $\mu$ g/ml), Dexamethason (1, 10 und 100 $\mu$ M), Herbimycin (1 $\mu$ M), MnTBAP (25 $\mu$ M) und PBN (1000 $\mu$ M). Des Weiteren konnte eine direkte Schädigung durch das Lösungsmittel DMSO ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Inhibitoren Catalase (500U/ml; TEER-Abfall nach 24h) und PMA (100nM, TEER-Abfall nach 2h) führten jedoch zu einem Abfall des TEER der PCPEC-Monolayer (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der direkten Barrierschädigung des PCPEC-Monolayers durch diese Substanzen waren diese für Inhibitionsversuche ungeeignet. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Anwendung dieser Inhibitoren in Versuchen abgesehen.

### **3.5 Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Infektion mit *S.suis***

#### **3.5.1 Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Infektion mit *S.suis*-Lebendkeim**

Dexamethason zeigte in den Versuchen mit dem Lebendkeim S735, MOI 50 und MOI 100, eine Hemmung des TEER-Abfalls. Dexamethason führte jedoch zu keiner Hemmung des durch die Lebendkeime T15 und 99-734723 bedingten TEER-Abfall (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Versuche mit dem Einsatz des Inhibitors Dexamethason wurden für die MOI 50 in dem Kapitel 3.6, in den Abb. 11 und 12, dargestellt. Die Inhibitoren BAPTA, Bisindolylmaleimide, CHX, Herbimycin, MnTBAP und PBN zeigten keine Hemmung des TEER-Abfalls in den Versuchen mit den Lebendkeimen T15, S735 und 99-734723 (MOI 10, 50 apikal appliziert, Daten nicht gezeigt). Der Inhibitor PMA bewirkte durch seinen Einsatz eine Verstärkung des TEER-Abfalls (Daten nicht gezeigt). Auf diesen Beobachtungen beruhte die Entscheidung, die oben genannten Inhibitoren, außer Dexamethason, nicht mehr in den folgenden Mannitol-Versuchen anzuwenden.

#### **3.5.2 Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Stimulation mit UV-inaktivierten *S.suis***

Die apikale Infektion mit dem UV-S735 (MOI 100, 500) löste einen TEER-Abfall aus, der ebenso durch die Anwendung des Inhibitors Dexamethason signifikant gehemmt wurde. Der Einfluss des Inhibitors Dexamethason wird in den Abb. 13 und 14 (Kapitel 3.6.2) dargestellt. Die Inhibitoren BAPTA (5 und 25 $\mu$ M) und Bisindolylmaleimide (1 $\mu$ M) führten dagegen zu keiner Hemmung des TEER-Abfalls nach einer apikalen Infektion mit UV-S735, MOI 100 (Daten nicht gezeigt).

#### **3.5.3 Einfluss von zellulären Inhibitoren auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Stimulation mit sterilfiltrierten US-Überständen von *S.suis***

Die apikale Infektion mit dem US-S735 (MOI 100, 500) löste einen TEER-Abfall aus, der nur durch die Anwendung des Inhibitors Dexamethason signifikant gehemmt wurde. Der Einfluss von Dexamethason in TEER- und Mannitol-Versuchen nach Infektion durch US-S735, mit der MOI 500 wird in den Abb. 15 und 16 (Kapitel 3.6.3) dargestellt. Die Inhibitoren BAPTA (25 $\mu$ M), Bisindolylmaleimide (1 $\mu$ M) und MnTBAP (25 $\mu$ M) führten zu keiner Hemmung. In den Versuchen mit dem Inhibitor PMA (100nM) ließ sich ein

stärkerer TEER-Abfall, als bei Versuchen mit US-S735 auf PCPEC ohne Inhibitor, beobachten.

Die eingesetzten Inhibitoren, die zu keiner Hemmung oder zu einer Verstärkung des durch *S.suis* bedingten TEER-Abfalls führten, wurden nicht mehr in weiterführenden Untersuchungen angewendet.

### **3.6 Einfluss des zellulären Inhibitors Dexamethason auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Stimulation mit *S.suis***

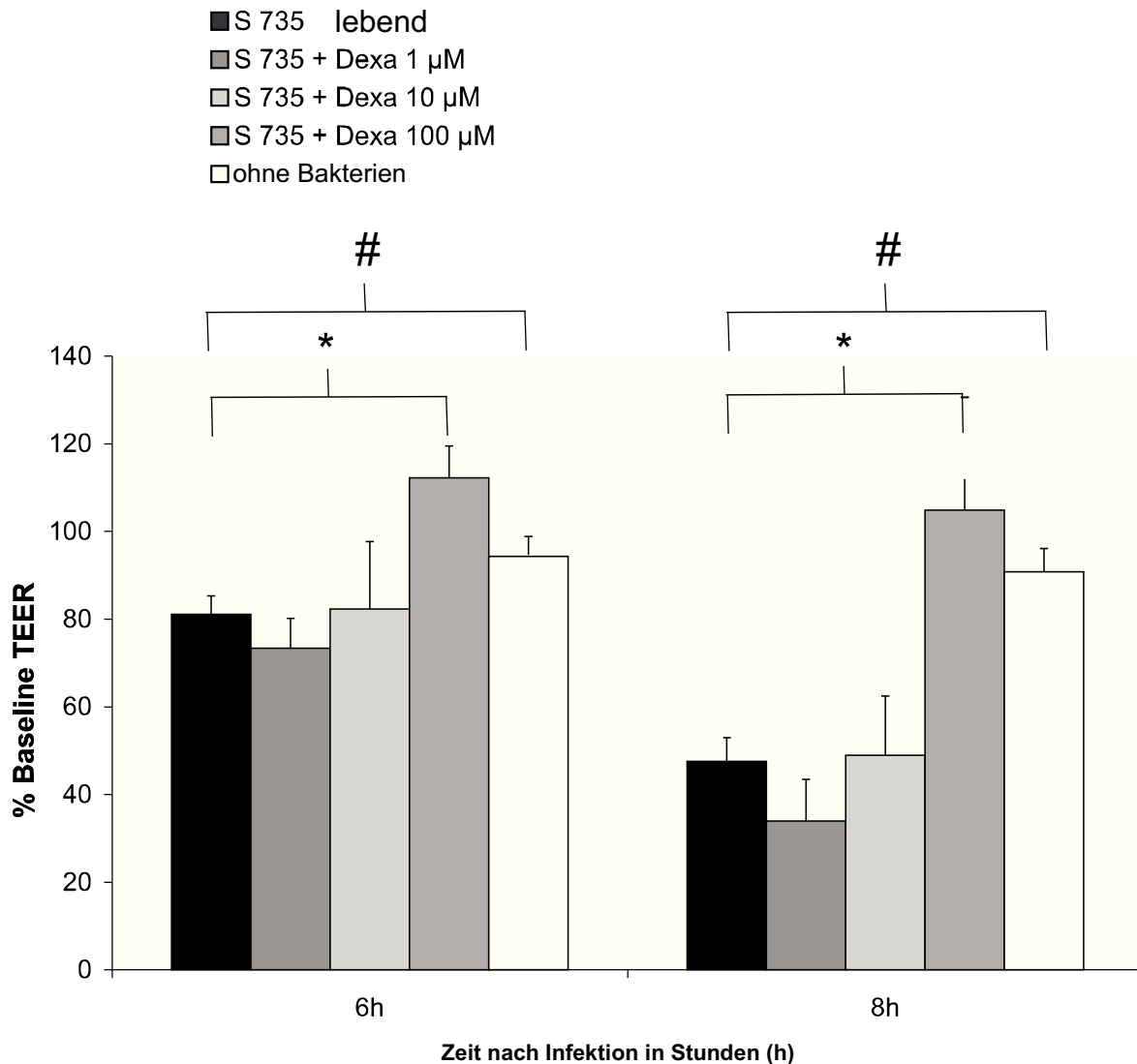
#### **3.6.1 Einfluss von Dexamethason auf die Barrierefunktion von PCPEC nach Infektion mit *S.suis* - Lebendkeim**

Es wurden in den TEER – und in den Mannitol-Versuchen die 2h-, 4h-, 6h- und die 8h-Werte für den Lebendkeim *S. suis* S735 ermittelt, wobei in den Abb. 11 und 12 nur die 6h- und 8h-Werte gezeigt werden.

Dexamethason führte zu einer signifikanten (fast vollständigen) Hemmung des durch den Lebendkeim S735 (MOI 50, apikal appliziert) bedingten TEER-Abfalls in der Konzentration von 100µM. Dagegen kam es bei den Filtern ohne Dexamethason und mit den Konzentrationen von 1 und 10µM Dexamethason zu TEER-Abfällen der 6h-Werte auf 80% des Ausgangswiderstandes und der 8h-Werte auf unter 45 %. (siehe Abb. 11)



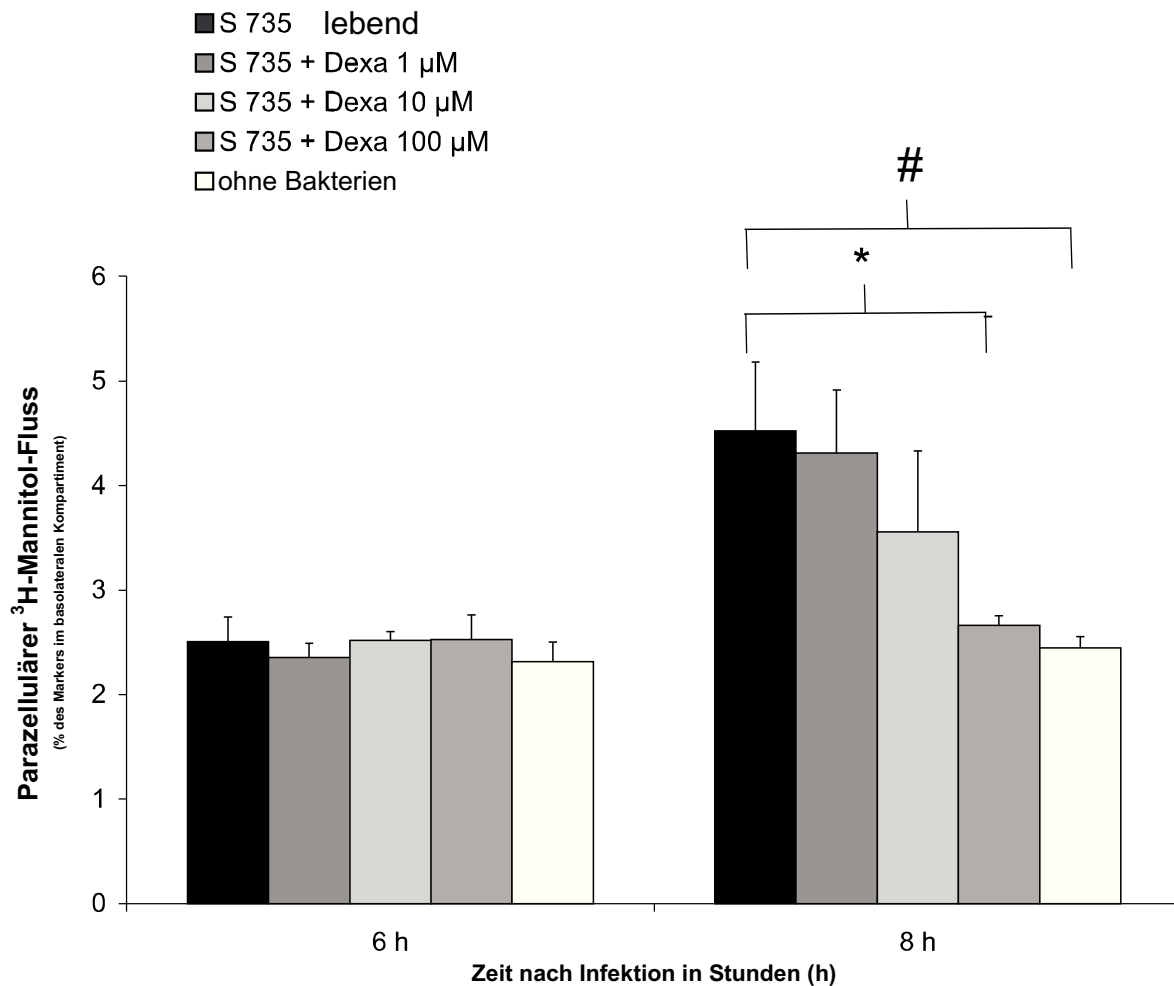
### 3.6.1.1 Effekt auf den TEER



**Abb. 11 Apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Lebendkeim (MOI 50).**

Effekte von apikal appliziertem *S. suis* -Typen (MOI 50) auf den TEER von PCPEC unter dem Einfluss von Dexamethason (1, 10, 100µM). Die TEER-Werte der nichtinfizierten Kontrollen blieben nahezu konstant über den Zeitraum von 48h. Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. # P- Wert von < 0,05, verglichen zur uninfizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zu *S. suis* stimulierten PCPEC zum jeweiligen Zeitpunkt.

### 3.6.1.2 Effekt auf den parazellulären Mannitolfluss



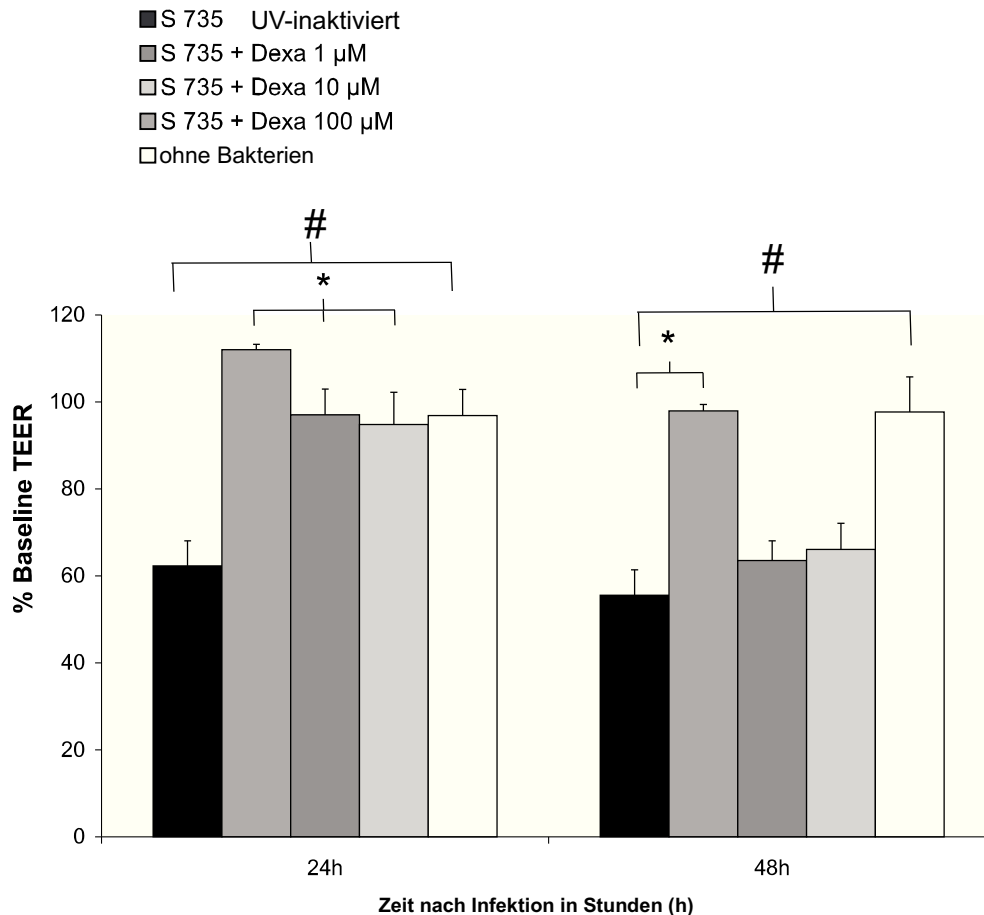
**Abb. 12 Apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Lebendkeim (MOI 50).**

Effekte von apikal appliziertem *S. suis* –S735 (MOI 50) auf den [<sup>3</sup>H]-Mannitolfluss von PCPEC unter dem Einfluss von Dexamethason (1, 10, 100μM). Die Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. # P- Wert von < 0,05, verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zu *S. suis* stimulierten PCPEC zum jeweiligen Zeitpunkt.

In den Mannitolversuchen mit dem Lebendkeim S735, MOI 50, zeigte sich eine deutliche parazelluläre Permeabilitätssteigerung nach 8h, die sich nur durch Dexamethason in der Konzentration von 100μM signifikant hemmen ließ (siehe Abb. 12).

## 3.6.2 Einfluss von Dexamethason auf die Barrierefunktion nach Stimulation mit UV-inaktiviertem *S.suis*

### 3.6.2.1 Effekt auf den TEER



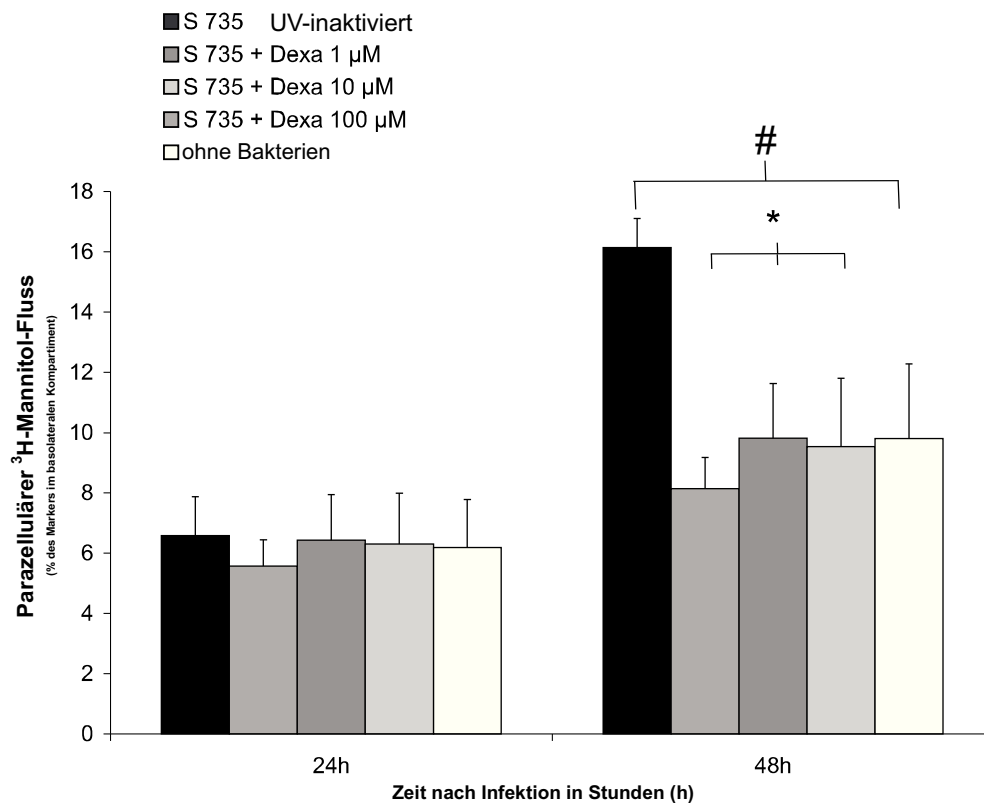
**Abb. 13 Effekt von Dexamethason auf die apikale Stimulation von PCPEC mit UV-inaktivierten *S. suis* Präparationen (MOI 500).**

Effekte von apikal applizierten UV-inaktivierten *S. suis* –S735 (MOI 500) auf den TEER von PCPEC unter dem Einfluss von Dexamethason. Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. # P- Wert von < 0,05, verglichen zur uninfizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zu *S. suis* stimulierten PCPEC zum jeweiligen Zeitpunkt.

Die apikale Anwendung von UV-S735, MOI 500, führte bereits nach 24h zu einem TEER-Abfall auf 60 %, der durch alle drei verwendeten Konzentrationen von Dexamethason signifikant gehemmt werden konnte. Eine alleinige Applikation von Dexamethason (1, 10 und 100µM) auf die PCPEC führte zu keiner TEER-Beeinträchtigung und folglich zu keiner Schädigung der Barrierefunktion des PCPEC (Daten nicht gezeigt). Bei den 48h-Werten zeigte sich nur bei Dexamethason in der Konzentration von 1µM eine vollständige

und signifikante Hemmung des TEER-Abfalls. Die Dexamethason-Konzentrationen 10 und 100µM konnten dagegen TEER-Abfälle auf unter 65% des Ausgangswertes nicht verhindern (siehe Abb. 13).

### 3.6.2.2 Effekt auf den parazellulären Mannitolfluss



**Abb. 14 Effekt von Dexamethason auf die apikale Stimulation von PCPEC mit UV-inaktivierten *S. suis* Präparationen (MOI 500).**

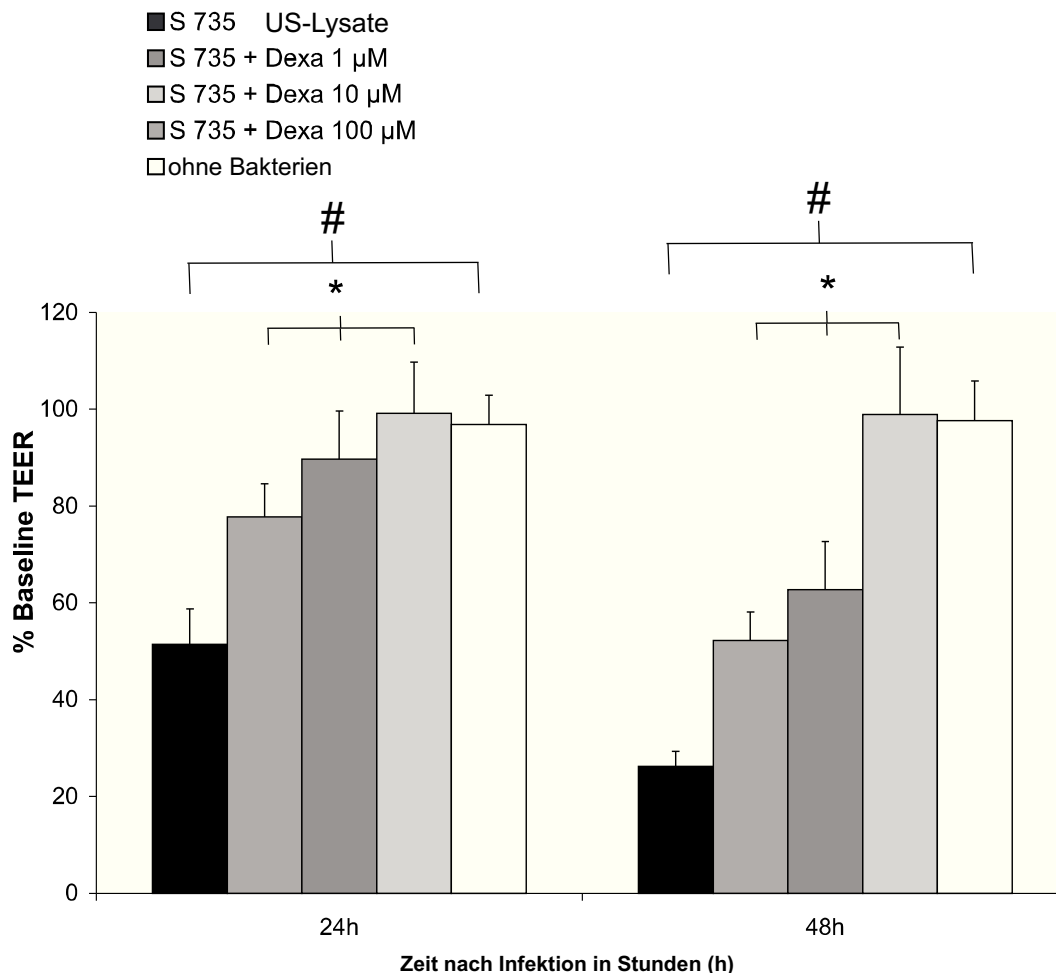
Effekte von apikal appliziertem UV-inaktiviertem *S. suis* –S735 (MOI 500) auf den [<sup>3</sup>H]-Mannitolfluss von PCPEC unter dem Einfluss von Dexamethason (1, 10, 100µM). Die Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. # P- Wert von < 0,05, verglichen zur uninfizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zu *S. suis* stimulierten PCPEC zum jeweiligen Zeitpunkt.

In den Mannitolversuchen mit der apikalen Infektion durch den UV-Keim S735, MOI 500, kam es nach 48h im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Steigerung des parazellulären Mannitolflusses um ~ 6 % auf 16% (d.h. zu einer Schädigung der Barrierefunktion des PCPEC). Durch die Anwendung des Inhibitors Dexamethason in den drei Konzentrationen 1, 10 und 100µM konnte eine signifikante Hemmung der durch die

Infektion mit UV-S735 bedingten parazellulären Permeabilitätssteigerung beobachtet werden (siehe Abb. 14).

### 3.6.3 Einfluss von Dexamethason auf die Barrierefunktion nach Stimulation mit sterilfiltrierten US-Überständen des *S.suis*

#### 3.6.3.1 Effekt auf den TEER



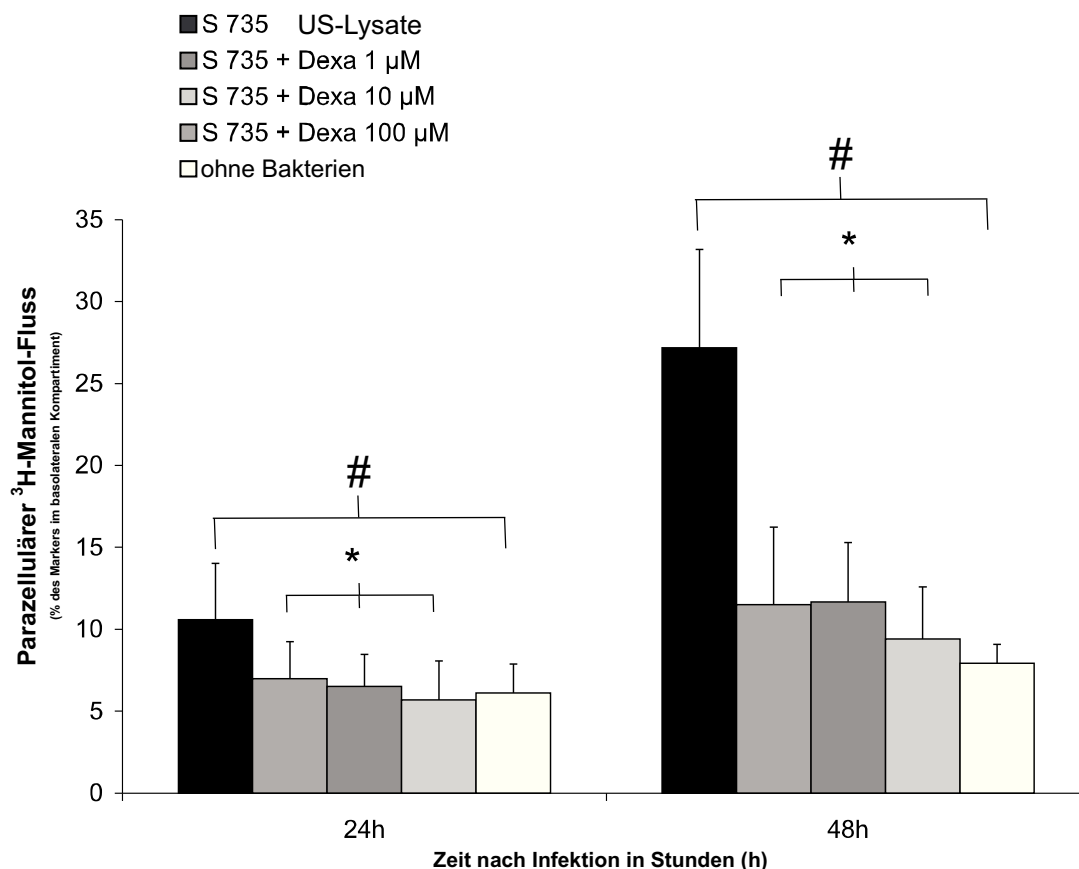
**Abb. 15 Effekt von Dexamethason auf die apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Ultraschall-Lysaten (MOI 500).**

Effekte von apikal applizierten US-Überstand der *S. suis* -Typen (MOI 500) auf den TEER von PCPEC. Die TEER-Messungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. # P- Wert von  $< 0,05$ , verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. \* P- Wert von  $< 0,05$ , verglichen zu *S. suis* stimulierten PCPEC zum jeweiligen Zeitpunkt.

Die apikale Infektion mit dem US-S735, MOI 500, löste nach 24h einen TEER-Abfall auf 50 % des Ausgangswertes aus, der durch die Anwendung des Inhibitors Dexamethason in den drei ausgetesteten Konzentrationen signifikant gehemmt werden konnte. Hierbei zeigte sich die stärkste Hemmung durch 100µM, gefolgt von 10µM und dann 1µM Dexa.

Nach 48h kam es zu einem TEER-Abfall durch US-S735 auf 25% des Ausgangswertes, der sich durch 100µM Dexamethason am stärksten hemmen ließ. Aber auch 1µM und 10µM Dexamethason führten zu einer Hemmung des durch US-S735 ausgelösten TEER-Abfall. (d.h. TEER-Abfall nach 48h nur auf ~ 50% und ~ 63 % des Ausgangswertes im Gegensatz zu dem Abfall auf 25% ohne Inhibitor (siehe Abb. 15).

### 3.6.3.2 Effekt auf den parazellulären Mannitolfluss



**Abb. 16 Effekt von Dexamethason auf die apikale Stimulation von PCPEC mit *S. suis* Ultraschall-Lysaten (MOI 500).**

Effekte von apikal appliziertem US-Überstand des *S. suis*-S735 (MOI 500) auf den <sup>3</sup>H-Mannitolfluss von PCPEC unter dem Einfluss von Dexamethason (1, 10, 100µM). Die <sup>3</sup>H-Mannitolflussmessungen erfolgten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion. Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Alle Assays wurden mindestens vier Mal wiederholt, jeweils in doppelter Ausführung. # P- Wert von < 0,05, verglichen zur unifizierten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. \* P- Wert von < 0,05, verglichen zu *S. suis* stimulierten PCPEC zum jeweiligen Zeitpunkt.

In den Mannitolversuchen führte die apikale US-S735-Infektion, MOI 500, zu einer Steigerung des parazellulären Mannitolflusses, d.h. zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion des PCPEC. Hierbei stellte sich die Steigerung bereits nach 24h dar, wobei sie sich erst nach 48h ausgeprägt manifestierte (10% des Markers sind nach 24h im basolateralen Kompartiment im Vergleich zu ~ 27% nach 48h [bei der 48h-Kontrolle sind es nur 7%]). Es zeigte sich für alle drei verwendeten Dexamethason-Konzentrationen eine signifikante Hemmung dieser parazellulären Permeabilitätszunahme nach 24h und 48h. (siehe Abb. 16). Die Konzentration von 100µM Dexamethason zeigte eine etwas stärkere Hemmung als die Konzentrationen 1 und 10µM.



## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Schädigung der Barrierefunktion von porcinen choroidalen Plexusepithelzellen (PCPEC) durch *S. suis* Serotyp 2. Es wurden drei unterschiedliche *S. suis* Präparationen (als Lebendkeim, UV-inaktiviert und als Ultraschalllysat) verwendet. Hierbei war zunächst das Ziel, zum einen eine MOI mit einer mittleren Toxizität und zum anderen einen repräsentativen Keim für die weiteren Versuche zu finden. Es wurden besonders die Effekte von *S. suis* Typ S735 untersucht, da es sich bei ihm um einen europäischen *S. suis* Referenzstamm handelt. In den Experimenten stellte sich die Barrierschädigung des PCPEC in einem signifikanten Abfall des TEER und einem signifikant erhöhten parazellulären Mannitolfluss dar.

Um die Barrierschädigung pharmakologisch zu hemmen, wurden eine Reihe von Inhibitoren bzw. Substanzen eingesetzt, mit einem Schwerpunkt auf der Wirkung von Dexamethason.

### 4.1 Schädigung der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke bei akuter bakterieller Meningitis

Für die Schädigung der BHS und der BLS im Rahmen einer akuten bakteriellen Meningitis werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Zum einen ist die Virulenz des Bakteriums, das die Meningitis auslöst, maßgebend, zum anderen die wirtseigene inflammatorische Abwehrreaktion auf das Bakterium. Die inflammatorische Abwehrreaktion kann neben den protektiven Eigenschaften für den Wirt auch eine Schädigung der wirtseigenen Zellen bewirken. Durch Adhäsion, Invasion, Induktion von apoptischen oder nekrotischem Zelltod und durch Veränderungen der interzellulären Verbindungen (TJ) kann es zu einer

Beeinträchtigung der zellulären Integrität und / oder zur Überwindung der BHS bzw. der BLS von Seiten des Bakteriums kommen [Tenenbaum et al., 2008; Tenenbaum et al., 2006; Koedel et al., 2002; Tunkel et al., 1993; Brouwer et al., 2010; Chaudhuri, 2004; Adam, Schroten, 2004; Lutsar et al., 2003; Nau et al., 2002; ; Kaul et al., 1996; Van Furth et al., 1996].

Unter dem Einsatz von Antibiotika wird der inflammatorische Prozess durch eine vermehrte Freisetzung von bakteriellen Endotoxinen oder Zellwandkomponenten verstärkt [Lutsar et al. 2003, Scheld et al., 2002; Tenenbaum et al., 2008]. Potentiell wirtseigene Schädigungsmechanismen sind das Auftreten von oxidativem Stress (O<sub>2</sub>-Radikale), die Induktion einer Signalkaskade mit Ca<sup>2+</sup> als Kofaktor, die Beeinflussung der Proteinsynthese in PCPEC, die Beeinflussung des PKC-Signalweges und die Desorganisation der TJ durch eine Hochregulation der Produktion von TNF-alpha und MMP-3. Auf diese Mechanismen wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen (siehe Kapitel 4.2 und 4.5) [Christen et al., 2001; Kastenbauer et al., 2002; Boardman et al., 2004; Rosenberg, 2002; Strazielle et al., 2003; Zeni et al., 2007; Lohmann et al., 2004; Tenenbaum et al., 2008].

In unserer Arbeitsgruppe konnte andererseits auch gezeigt werden, dass der Plexus choroideus eine aktive Rolle in der Verteidigung des Wirtes gegen eine bakterielle Meningitis einnimmt. Er ist verantwortlich für die Unterdrückung des Wachstums von *S. suis* durch Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen (IFN gamma und TNF alpha) durch Schaffung eines für Bakterien ungünstigen Mikromilieus [Tenenbaum et al. 2008].

## 4.2 Mechanismen der Schädigung der Barrierefunktion von PCPEC durch

### *S. suis*

Die Barrierefunktion des choroidalen Plexus wird im Wesentlichen durch die *tight junctions* (TJ) der Plexusepithelzellen gebildet. Elektronenmikroskopisch wurde beobachtet, dass lebende *S. suis* Isolate an PCPEC adhären und in diese eindringen können [Tenenbaum T. et al., 2005]. In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass eine Infektion mit *S. suis* zu einer direkten Schädigung der PCPEC durch Induktion eines apoptotischen oder nekrotischen Zelltodes führt. Die Folge ist ein Verlust der Integrität der BLS [Tenenbaum et al. 2006, Tenenbaum et al., 2008]. Außerdem kann durch eine Schädigung der TJ-Zellverbindung die Barrierefunktion beeinträchtigt oder aufgehoben werden. Experimentell fanden sich Hinweise auf eine proteolytischen Degradierung der TJ Proteine nach bakterieller Stimulation und, dass möglicherweise die Modifikation von Proteinen auf der Ebene der TJ und des Aktinzytoskeletts eine Veränderung der Barrierefunktion auslöst (Tenenbaum et al. 2008).

*S. suis* produziert Proteasen, die an den Effekten auf die TJs und das Zytoskelett [Jobin and Grenier, 2003] beteiligt sein könnten. Bei Jobin et al., 2005, zeigte sich, dass *S. suis* eine Plasmin-Aktivität induziert, die an der Unterbrechung der PCPEC Barriere mitwirken könnte [Jobin et al., 2005]. Dies könnte durch eine Aktivierung von MMPs [Rosenberg, 2002] zustande kommen.

Außerdem könnten *S. suis* und sekundäre inflammatorische Mediatoren wie TNF alpha direkt eine MMP Produktion auslösen und hierdurch zu einer PCPEC Barriereunterbrechung führen [Rosenberg, 2002, Strazielle et al., 2003]. Es ist bereits bekannt, dass proinflammatorische Zytokine die Sekretion von Matrix Metalloproteasen und den Organic-Anion Transport an der BLS modulieren [Strazielle et al., 2003]. Dass in PCPEC das TNF alpha zu einer starken

Hochregulation von MMP-3 Expression führt, wurde bereits bei Zeni et al. 2007 gezeigt [Zeni et al., 2007]. Auch in den Experimenten unserer Forschungsgruppe [Tenenbaum et al., 2008] wurde dies dargestellt. Zusätzlich wurde eine Regulation der TJ Proteine Occludin und Claudin-1 durch *S. suis* und Dexamethason beobachtet [Tenenbaum et al., 2008]. Eine Exposition mit *S. suis* in den drei Präparationen (lebend, UV-inaktiviert und US-Lysate) führt zu einer Dephosphorylierung von Occludin. Da die funktionelle Assoziation von Occludin mit TJs eine Phosphorylierung erfordert [Sakakibara et al., 1997; Wong, 1997], könnte eine solche Dephosphorylierung direkt mit einem Verlust der TJ Integrität einhergehen.

Auch für andere bakterielle Erreger konnte ein Einfluss auf die TJ Proteine und die Barrierefunktion *in vitro* nachgewiesen werden. So konnte Grab et al., 2005, zeigen, dass im Rahmen einer Infektion von Hirnendothelzellen mit *Borrelia burgdorferi* das fibrinolytische System an der Degradierung von TJ Proteinen beteiligt ist. Auch beim *Clostridium perfringens* Toxin, *Clostridium difficile* Toxin und einer Infektion mit enteropathogenem *Escherichia coli* wurde beschrieben, dass diese einen Effekt auf den TEER, die parazelluläre Permeabilität und die zelluläre Verteilung der TJ-Proteine in epithelialen Zellen haben [Sonoda et al., 1999 (*Clostridium perfringens* Enterotoxin); Nusrat et al., 2001 (*Clostridium difficile* Toxin); Muza-Moons et al., 2004 (*enteropathogene Escherichia coli*-Infektion)].

Bereits bei Simonovic et al., 2000, und Sakaguchi et al., 2002, zeigte sich, dass *EPEC* und *Shigella* die TJ-Verbindung durch Dephosphorylierung und Dissoziation des Occludins von den TJs stören können. Lohmann et al., 2004, hat beobachtet, dass eine höhere Aktivität von MMP zu einer Degradation von Occludin führt, begleitet von niedrigeren TEER-Werten und einer erhöhten zellulären Durchlässigkeit von Hirnendothelzellen. Jedoch zeigte Saitou et al., 1998, dass Occludin-defiziente Zellen weiterhin TJ ausbilden. Es ist möglich, dass die MMP-induzierten

Veränderungen an einem anderen TJ-Protein, wie dem Tricellulin [Ikenouchi et al., 2005, Tenenbaum et al., 2008], für den TEER Abfall in PCPEC verantwortlich sind.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Barrierefunktion von PCPEC nach einer Stimulation mit unterschiedlichen *S. suis* Präparationen beeinträchtigt werden kann. [Tenenbaum et al., 2005, Tenenbaum et al., 2006].

Die lebenden *S. suis* Stämme T15, S735 und 99-734723 führten apikal appliziert zu einem signifikantem TEER-Abfall als Zeichen der Barrierschädigung. Bei der apikalen Applikation kommt es zum direkten Kontakt zwischen Bakterium und PCPEC. Die *S. suis* Stämme S 735 und T15 führten auch basal appliziert zur Schädigung der Barrierefunktion. Die Daten weisen daraufhin, dass nicht nur der direkte Bakterien-Zell-Kontakt, sondern auch lösliche Virulenzfaktoren die Dichte der PCPEC Barriere beeinträchtigen können.

Des Weiteren führten apikal applizierte UV-inaktivierte *S. suis* Isolate und US-Lysate von *S. suis* zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion der PCPEC. Jedoch war die Effektivität, durch UV-inaktivierte Bakterienpräparate oder US-Lysate einen TEER-Abfall und einen  $^3\text{H}$ -Mannitofluss zu induzieren, signifikant niedriger als durch lebende Stämme. Die UV-inaktivierten Stämme und die US-Lysate könnten wichtige Virulenzfaktoren verloren haben oder ihre Fähigkeit, diese zu produzieren, könnte reduziert sein, weshalb es nur in einem geringeren Ausmaß zur Beeinträchtigung der PCPEC-Barrierefunktion kommt. Dieses Argument wird unterstützt durch die Tatsache, dass in unserer Forschungsgruppe keine Hämolytin-Aktivität von Suilysin in den Hämolytin Assays mit UV-inaktivierten *S. suis* und Ultraschalllysaten festgestellt werden konnten [Tenenbaum et al., 2005, 2008].

Weil der TEER-Abfall nicht im Allgemeinen von einem signifikanten  $^3\text{H}$ -Mannitofluss begleitet wurde, könnte dieser Effekt durch Veränderungen in der Membrankonduktion oder des Ionenflusses über die apikale und basolaterale

PCPEC Membran, durch Zytoskelett-Veränderungen oder durch Induktion von allgemeinen Signalwegen verursacht werden. Während einer verlängerten Infektionszeit waren UV-inaktivierte *S.suis* Isolate und Ultraschalllysate noch fähig die TJ-Funktion zu beeinträchtigen.

Suilyisin, Hämolyisin und andere bekannte Virulenzfaktoren wie EF und MRP können eine Rolle im Verlauf der Infektion spielen, aber sie scheinen nicht essentiell in der Induktion des Verlustes der Barrierefunktion in PCPEC zu sein.

Aufbauend auf die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Untersuchungen unserer Forschungsgruppe in der Studie von Tenenbaum et al., 2008, den Nachweis für die Schädigung der Funktion der Zellverbindungen der PCPEC auf der Ebene der TJ erbringen. Hierbei wurde gezeigt, dass Lebendkeime, UV-inaktivierte und US-Lysate von *S.suis* zu einer Alterierung der Morphologie von den TJ-Proteinen Occludin, ZO-1 und Claudin-1 in PCPEC führen können [Tenenbaum et al., 2008].

#### **4.3 Rolle von Dexamethason bei Patienten mit akuter bakterieller Meningitis**

Die Glukokortikoide sind effektive antiinflammatorische Substanzen, die sowohl bei akuten (z.B. bakterieller Meningitis) als auch bei chronischen Entzündungsreaktionen (z.B. Asthma) in der klinischen Medizin zum Einsatz kommen.

Dexamethason hat mehrere Eigenschaften und Wege, über die es seine antiinflammatorische Wirkung erzielt, jedoch sind bisher nicht alle Mechanismen vollständig bekannt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass bei einer bakteriellen Meningitis die schnelle Reduktion/Abwehr von Bakterien durch Antibiotika mit einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion des Wirts auf die Freisetzung von Endotoxinen oder Zellwandkomponenten und mit einer Verschlechterung des klinischen *Outcomes* einhergehen kann [Tuomanen, 1995 und 1996; Lutsar et al,

2003; Scheld et al., 2002]. So führt die wirtseigene gesteigerte inflammatorische Reaktion zur Aggravierung von neurologischen Folgeschäden.

Dexamethason könnte durch die Hemmung der überschießenden inflammatorischen Reaktion einen Teil der wirtseigenen Schädigung verhindern.

Die Einführung von Dexamethason als supportive Therapiemaßnahme reduzierte im Rahmen einer *Haemophilus influenzae*- und einer Pneumokokken-Meningitis das Auftreten von neurologischen Folgeschäden, v.a. Hörschäden, die auf einer anfangs überschießenden Entzündungsreaktion des Wirts beruhen [Chaudhuri, 2004, Van de Beek et al., 2007; Brouwer et al., 2010]. So konnte Lutsar et al, 2003, nachweisen, dass das *Outcome* bei Kindern mit einer *Haemophilus*-bedingten Meningitis durch die Dexamethason-Therapie verbessert wird [Lutsar et al. 2003]. Dies wird auf eine Verhinderung der wirtseigenen überschießenden inflammatorischen Reaktion zurückgeführt.

Es gibt Hinweise, dass Dexamethason die epitheliale BLS auf der Ebene ihrer Zell-Zell-Verbindungen beeinflusst, indem es diese Verbindungen gegen den Angriff durch *S. suis* bestärkt. So konnte in experimentellen Studien gezeigt werden, dass eine Kortikosteroidbehandlung die TJ-Durchlässigkeit bei Brustepithelzellen und Hirnendothelzellen modulieren kann [Zettl et al., 1992; Hoheisel et al., 1998; Romero et al., 2003; Weidenfeller et al., 2005]. Dexamethason erhöht hierbei den TEER und führt zu einer Senkung der parazellulären Permeabilität für Mannitol und Inulin. In Hirnendothelien der Ratte konnte Dexamethason die parazelluläre Permeabilität vermindern und die Expression der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin erhöhen [Romero et al., 2003]. In einem *in vitro* Modell der BHS konnte Cucullo, 2004, zeigen, dass die Anwendung von Dexamethason zu einer Verbesserung des TEER führte. Bei Brouwer et al., 2010, führte die supportive Dexamethason-Gabe sowohl zu einer

signifikanten Reduktion des Hörverlustes und von neurologischen Schäden, als auch zu einem insgesamt besseren klinischen *Outcome*.

#### **4.4 Protektiver Effekt von Dexamethason auf die Barrierefunktion von PCPEC während einer *S. suis*-Meningitis**

Die Untersuchung von potentiell protektiven Effekten von Dexamethason nach bakterieller Stimulation von PCPEC erschien uns vielversprechend, da Dexamethason nicht nur antiinflammatorisch auf die wirtseigene Reaktion einwirkt, sondern auch eine positive Wirkung auf die Zell-Zell-Verbindungen in experimentellen Epithel- und Endothel-Modellen gezeigt hat. Ein weiteres Argument für diese Hypothese ist, wie Harkness et al., 2000, gezeigt hat, dass Dexamethason die Zytokin-induzierte Expression von MMP-9 und Veränderungen von ZO-1 verhindert [Harkness et al., 2000]. Bei Förster et al., 2005, wurde in einem Modellsystem gezeigt, dass Occludin ein direktes Ziel für eine glukokortikoid-induzierte Verbesserung der Eigenschaften der endothelialen Zellen der BHS ist [Förster et al., 2005]. Nur wenige Publikationen haben sich bisher mit der Barrierefunktion des Plexus choroideus unter inflammatorischen Bedingungen, ausgelöst durch *S. suis*, beschäftigt. Dexamethason konnte in der hier vorliegenden Arbeit den TEER - Abfall und die Zunahme des parazellulären Mannitolfusses signifikant hemmen (siehe Ergebnisteil). Wie bereits im Kapitel 4.3 ausgeführt wurde, könnte Dexamethason auf der Ebene der TJ einer infektionsbedingten Dephosphorylierung von Occludin und damit einem Verlust der PCPEC-Integrität entgegenwirken. So konnte in weiterführenden Immunfloreszenz-Versuchen unserer Forschungsgruppe gezeigt werden, dass *in vitro* die Stimulation von PCPEC mit *S. suis* (in den drei o.g. genannten Präparationen) eine Reorganisation der TJ Proteine und Veränderungen am Aktinzytoskelett induziert. Diese Veränderungen, die von



einem Verlust der Barrierefunktion begleitet wurden, konnten durch den Einsatz von Dexamethason verhindert werden [Tenenbaum et al. 2008].

#### **4.5 Potentielle alternative adjuvante Therapien bei akuter bakterieller Meningitis**

Es kommen eine Reihe von weiteren Mechanismen in Frage, die bei einer bakteriellen Meningitis zu einem Verlust der PCPEC-Barrierefunktion führen könnten:

- die Induktion von oxidativem Stress
- die Induktion einer Signalkaskade (z.B. mit Involvierung von  $Ca^{2+}$  als Kofaktor)
- die Beeinflussung der Proteinsynthese
- die Induktion des PKC-Signalweges.

Im Rahmen einer bakteriellen Meningitis kommt es zu einem Auftreten von oxidativem Stress [Christen et al., 2001; Kastenbauer et al., 2002] mit Entstehung von  $H_2O_2$ , das zur Gruppe der ROS gehört. Die ROS werden von Neutrophilen, Makrophagen und anderen Zellen des Wirtes während einer inflammatorischen Reaktion produziert. Sie besitzen die Fähigkeit, Bakterien anzugreifen, die Integrität wirtseigener Epithelzellen zu zerstören [Boardman et al., 2004] und als Mediatoren des neuronalen Schadens in einer bakteriellen Meningitis aufzutreten [Auer et al., 2000; Klein et al., 2003].  $O_2$ -Metabolite können aber auch von Bakterien produziert werden, die sie als Überlebensvorteil im Wirtsorganismus nutzen. Die Anwendung von Antioxidantien führte bei Auer et al., 2000, zu einer Verminderung der Größe von kortikalen Schäden. Der adjuvante Einsatz von Antioxidanzien und Peroxinitrit-Fänger MnTBAP und NAC führte zu einer signifikanten Reduzierung des Meningitis-assoziierten akuten und langzeitigen Hörverlustes [Klein et al., 2003; Maurizi, 1999]. Bei Koedel et al., 2002, senkte der Einsatz des Antioxidanz PBN das Auftreten kortikaler Nekrosen und die zerebrale Hypoperfusion. Wir setzten die Antioxidantien

Catalase, MnTBAP und PBN ein, um abzuklären, ob *S. suis* über den Mechanismus der oxidativen Stressproduktion die Integrität der PCPEC Monolayer schädigt. In den vorliegenden Versuchen ließen sich der durch *S. suis* induzierte TEER-Abfall und der parazelluläre Mannitolflossanstieg jedoch durch Catalase, MnTBAP und PBN nicht signifikant hemmen.

Wir setzten außerdem den Calciumchelator BAPTA ein, ausgehend von der Hypothese, dass *S. suis* über die Induktion einer Signalkaskade mit  $\text{Ca}^{2+}$  als Kofaktor zu einem Verlust der TJ-Barriereintegrität bei PCPEC-Monolayern führen könnte. Durch Komplexierung des  $\text{Ca}^{2+}$  kann BAPTA eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Signalkaskade hemmen und die TJ-Integrität bewahren. So zeigte Jepson et al., 2000, dass die TJ-modulierenden Effekte von EPEC und EHEC bei Infektion von intestinalen Epithelzelllayern zu einer Minderung der Barrierefunktion führt. Diese wurde durch die Aktivität von Aktinomyosin, sekundär durch die PKC Aktivierung und möglicherweise durch die Mobilisierung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt. BAPTA zeigte jedoch in unseren Versuchen keine signifikante Hemmung der Barrierschädigung durch *S. suis*.

Cycloheximide (CHX) besitzt die Eigenschaft, die Proteinsynthese in Eukaryonten zu hemmen. Bei Zettl et al., 1992, wurden sowohl CHX als auch Dexamethason eingesetzt, um den Einfluss auf TJ und den TEER von epithelialen Brustzellen der Maus („mouse mammary epithelial cells“) zu untersuchen. Dexamethason führte dabei zu einem Anstieg des TEER durch Stimulierung der Formation von TJs. Der Einsatz von CHX verhinderte den positiven Dexamethason Effekt auf den TEER [Zettl et al, 1992]. In unseren Versuchen zeigte sich bei der Anwendung von CHX jedoch keine signifikante Hemmung der durch *S.suis* verursachten PCPEC - Barrierschädigung.

Ausgehend von der Hypothese, dass der PKC-Signalweg bei der Durchlässigkeitssteigerung des PCPEC-Monolayers durch *S. suis* involviert sein könnte, kamen in der vorliegenden Arbeit sowohl Inhibitoren als auch Aktivatoren der PKC zum Einsatz. Die PKC ist beteiligt an der Phosphorylierung von Occludin. Dabei stellt der phosphorylierte Zustand von Occludin in TJ einen wichtigen Bestandteil für die Aufrechterhaltung der TJ-Integrität dar [Tenenbaum et al., 2005, 2006; Andreeva et al., 2001]. Die Zugabe von den PKC-Agonisten 1,2 dioctanoylglycerol zusammen mit PMA zu Epithelzellen resultiert bei Andreeva et al., 2001, in einer Occludinphosphorylierung und einer partiellen Zusammensetzung der TJs. Hinzu kommt, dass diese zelluläre Antwort durch PKC-spezifische Inhibitoren [Andreeva et al., 2001] gehemmt wird. Clarke et al., 2000, hat gezeigt, dass die PKC-Aktivierung zu einer zeitabhängigen Dephosphorylierung von Occludin führt und in Folge einen Anstieg der TJ-Durchlässigkeit in der LLC-PK1- Epithelzellschicht bewirkt [Clarke et al., 2000]. Dieser Mechanismus der Schädigung der TJ-Integrität könnte auch bei den PCPEC-Monolayern während einer *S. suis* - Infektion zu einem TEER-Abfall und einem parazellulären Mannitolflossanstieg beitragen. Um eine solche mögliche Schädigung zu hemmen, setzten wir Bisindolylmaleimide und Herbimycin in unseren Versuchen ein. Coyne et al., 2002, hat gezeigt, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und Interferon- $\gamma$  tiefreichende Effekte auf die TJ-Barrierefunktion und damit auf die TJ-Integrität induzieren. Es ist bekannt, dass diese Zytokine im Rahmen einer Entzündung auftreten [Coyne et al, 2002] und dass sie durch Inhibitoren der PKC gehemmt werden. Angelow et al. 2005, untersuchte den Einfluss von PKC aktivierender PMA auf die Barriereigenschaften von einem PCPEC *in vitro* Modell. Er analysierte Mechanismen, die in die Regulation der Barrierestärke involviert sind. PMA, in einer Konzentration von 5-25nM eingesetzt, induzierte einen schnellen und anhaltenden Abfall der TEER in PCPEC. Die Beeinträchtigung der

Barriereintegrität wurde von der Dephosphorylierung von Occludin und der Formation von Aktinbündeln begleitet. In der Anwesenheit von mindestens 25nM PMA, wurden sowohl Veränderungen der Zellform als auch eine Diskontinuität der TJ-Stränge beobachtet, die auf eine Unterbrechung der Zell-Zell-Kontakte hinweisen. Die Exposition der PCPEC mit PMA für 1-2 Tage führte außerdem zu einer Herunterregulation von Claudin-2 und Hochregulation der Barriere modulierenden MMP-9. In Untersuchungen von Lippolt et al., 2000, wurde gezeigt, dass PMA eine Umverteilung von Claudin-1, einem TJ-Protein, von der Membran in das Zytoplasma choroidaler Plexusepithelzellen von Ratten induziert. Diese Resultate zeigen, dass PMA verschiedene interagierende Mechanismen freisetzt, die direkt und indirekt auf die TJ zielen und *in vitro* zu einem sowohl kurzzeitigen als auch langzeitigen Abfall des TEER sowie zu einer Öffnung der BLS führen [Angelow et al., 2005]. Contreras et al., 2002, hat gezeigt, dass die Verknüpfung bzw. Verbindung heterotoper TJ abhängig von E-Cadherin ist, dass aber diese Abhängigkeit durch eine Kaskade von chemischen Reaktionen vermittelt wird, in die unterschiedliche G-Proteine verwickelt sind: PLC, PKC und Calmodulin. Durch Aktivierung der PKC über eine Signalkaskade könnte *S. suis* Einfluss auf die TJ und deren Integrität nehmen und in Folge eine Schädigung verursachen. In der Literatur kamen BAPTA 2µM und PMA 500nM bei Brückener et al, 2003, zur Anwendung. Brückner et al. zeigten hierbei, dass die PKC entscheidend für den Pertussistoxin-induzierten Signalweg ist, der zu einer Durchlässigkeit von cerebralen endothelialen (BCEC-) Monolayern führt. PMA reduzierte bei Brückener et al. signifikant den durch Pertussis-Toxin induzierten Durchlässigkeitsanstieg von BCEC-Monolayern. Ähnlich zu dem Pertussistoxin könnte auch *S.suis* die Steigerung der Durchlässigkeit im PCPEC-Monolayer über Beteiligung des PKC-Signalweges bewirken. Ausgehend von der Hypothese, dass PMA über die Aktivierung der PKC oder Bisindolylmaleimide und Herbimycin über die

Inhibierung der PKC im PCPEC-Monolayers zu einer Verminderung der Barrierschädigung durch *S.suis* führen könnten, setzten wir diese Substanzen ein. Die o.g. Substanzen erzielten in unseren Versuchen keine signifikante Hemmung. Somit scheint eine Schädigung durch bakterielle oder wirtseigene O<sub>2</sub>-Metabolite, eine durch *S. suis* bedingte Induktion einer Ca<sup>2+</sup> vermittelten Signalkaskade in PCPEC, eine Induktion der Proteinsynthese in PCPEC und eine Beteiligung des PKC-Signalweges in PCPEC keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der Barrierschädigung der BLS im Rahmen einer durch *S.suis* verursachten Meningitis *in vitro* zu spielen.

Inwieweit die hier dargestellten Mechanismen im Einzelnen für den protektiven Effekt von Dexamethason dennoch mit verantwortlich sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass ein komplexes Zusammenspiel der dargestellten, aber auch möglicher anderer Faktoren den protektiven Effekt von Dexamethason erklären. Die Anwendung der o.g. anderen Inhibitoren bzw. Agenzien führte nicht zu einer protektiven Wirkung auf die Barrierschädigung des PCPEC durch *S. suis*.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Dexamethason die Fähigkeit besitzt, die PCPEC-Barrierefunktion nach einer Stimulation mit *S.suis* in den drei angewendeten Präparationen (lebend, UV-inaktiviert und US-Lysate) zu schützen. Das Ausmaß des Schutzes ist größer bei einer Stimulation mit UV –inaktivierten Bakterien und Ultraschalllysaten.

Weitere Studien sind nötig, um

(1) die Moleküle zu identifizieren, die für die Pathogenität von *S. suis* Serotyp 2 in PCPEC verantwortlich sind,

(2) die Mechanismen der PCPEC-Barrierschädigung aufzuklären

(3) weitere Agenzien zu identifizieren, die vor einer Barrierschädigung der BLS während einer bakteriellen Meningitis und vor möglichen neurologischen Langzeitfolgen schützen.

## 5 Zusammenfassung

*S. suis*, ein weltweit häufig auftretender Erreger, besitzt die Eigenschaft, beim Schwein und beim Menschen Infektionen auszulösen. Insbesondere Berufsgruppen, die mit Schweinen arbeiten, sind gefährdet, eine schwere Infektion durch *S. suis*, wie eine Sepsis oder Meningitis, zu erleiden. Eine akute *S. suis* Meningitis kann zu neurologischen Folgeschäden bis hin zum Tod führen. Die neurologischen Folgeschäden scheinen zum Teil durch die wirtseigene inflammatorische Reaktion zu entstehen.

In früheren Untersuchungen zur Pathogenese der bakteriellen Meningitis zeigten sich Hinweise, dass die BLS / der choroidale Plexus eine mögliche Eintrittspforte für Erreger in das Gehirn darstellt. Da es sich bei *S. suis* um einen zoonotischen Erreger handelt, eignet sich *S. suis* zur Untersuchung der Barrierschädigung der BLS in einem porcinen Meningitismodell. Hierzu wurde das etablierte *in vitro*-Modell der BLS mit primären porcinen choroidalen Plexusepithelzellen (PCPEC) in den Versuchen verwendet. Als Parameter der Barrierefunktion wurden der TEER und der parazelluläre <sup>3</sup>H-Mannitolfluss analysiert. Es kamen *S. suis* als Lebendkeim, als UV-inaktivierter *S. suis* und Ultraschall-Lysate von *S. suis* zum Einsatz. Die Experimente wurden schwerpunktmässig mit dem europäischen *S.suis* Referenzstamm S735 durchgeführt. Die Stimulierung mit den drei unterschiedlichen *S. suis* Präparationen führte jeweils zu einer signifikanten Schädigung der PCPEC Barriereigenschaften. So wurde eine signifikante Reduktion des TEER und eine signifikante Steigerung des parazelluläre <sup>3</sup>H-Mannitolflusses nach Stimulation mit *S. suis* beobachtet. Die Beeinträchtigung der Barrierefunktion durch *S. suis* war hierbei zeit-, dosis- und von der eingesetzten Präparation abhängig. Um die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Barrierschädigung von PCPEC im Rahmen einer Infektion mit *S. suis* zu

untersuchen, wurde die mögliche protektive Eigenschaft verschiedener Agenzien untersucht. Schwerpunkt­mässig wurde in der vorliegenden Arbeit Dexamethason eingesetzt, da es bereits Hinweise aus publizierten experimentellen Arbeiten gibt, dass Dexamethason zum einen die wirtseigenen überschießende inflammatorische Reaktion hemmt, und zum anderen auf der Ebene der TJ einem bakteriell bedingten Integritätsverlust der Barrierefunktion entgegenwirkt.

Bedeutsamstes Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass Dexamethason signifikant vor einer Barrierschädigung von PCPEC nach Stimulation mit *S. suis* S735 schützt. Dieser Effekt war dosisabhängig. Bei höherer Dexamethasondosis war der protektive Effekt ausgeprägter, beim Einsatz höherer Bakterienmengen bzw. höherer Konzentration der bakteriellen Präparationen geringer. Eine Schädigung durch O<sub>2</sub>-Metabolite, eine durch *S. suis* bedingte Induktion einer Ca<sup>2+</sup> vermittelten Signalkaskade, eine Induktion der Proteinsynthese und eine Beteiligung des PKC-Signalweges in PCPEC scheinen jedoch keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der Barrierschädigung der BLS im Rahmen einer durch *S.suis* verursachten Meningitis *in vitro* zu spielen, da entsprechende Inhibitoren keinen protektiven Effekt zeigten.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde in weiterführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe der Nachweis erbracht, dass *S. suis* Veränderungen auf der Ebene der TJ bewirkt und dass Dexamethason diese Veränderungen verhindern kann. Weitere Studien sind nötig, um die Moleküle zu identifizieren, die für die Pathogenität von *S. suis* Serotyp 2 in PCPEC verantwortlich sind. Weitere Mechanismen der PCPEC-Barrierschädigung sind aufzuklären, sowie weitere Agenzien zu identifizieren, die vor einer Barrierschädigung der BLS während einer bakteriellen Meningitis und vor möglichen neurologischen Langzeitfolgen schützen.



## 6 Literaturverzeichnis

Adam R, Schroten H; „Pathogenese der bakteriellen Meningitis“; Monatsschrift Kinderheilkunde, Volume 152, Number 4, April 2004 , pp. 362-370(9), Publisher: Springer

Adcock IM, Caramori G; „Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids.“; Immunol Cell Biol. 2001 Aug; 79(4):376-84. Review.

Anderson JM; “Molecular structure of *tight junctions* and their role in epithelial transport”; News Physiol Sci. 2001 Jun; 16:126-30.

Andreeva AY, Krause E, Müller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI.; „Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin“; J Biol Chem. 2001 Oct 19; 276(42):38480-6. Epub 2001 Aug 13.

Angelow S, Zeni P, Höhn B, Galla HJ.; “Phorbol ester induced short- and long-term permeabilization of the blood-CSF barrier *in vitro*”; Brain Res. 2005 Nov 30; 1063(2):168-79. Epub 2005 Nov 3.

Arends JP, Zanen HC; “Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans”; Rev Infect Dis. 1988 Jan-Feb; 10(1):131-7.

Auer M, Pfister LA, Leppert D, Täuber MG, Leib SL.; „Effects of clinically used antioxidants in experimental *pneumococcal* meningitis“; J Infect Dis. 2000 Jul; 182(1):347-50. Epub 2000 Jul 6.

Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P; „Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells”; Cell Microbiol. 2004 Sep; 6(9):867-81.

Boardman KC, Aryal AM, Miller WM, Waters CM; “Actin re-distribution in response to hydrogen peroxide in airway epithelial cells”; J Cell Physiol. 2004 Apr; 199(1):57-66.

Brouwer MC, Heckenberg SG, de Gans J, Spanjaard L, Reitsma JB, van de Beek D; “Nationwide implementation of adjunctive dexamethasone therapy for *pneumococcal* meningitis”; Neurology. 2010 Oct 26; 75(17):1533-9. Epub 2010 Sep 29.

Brouwer MC, McIntyre P, de Gans J, Prasad K, van de Beek D; “Corticosteroids for acute bacterial meningitis”; Cochrane Database Syst Rev. 2010 Sep 8; (9):CD004405.

Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Davis TP; „Protection against hypoxia-induced blood-brain barrier disruption: changes in intracellular calcium”; Am J Physiol Cell Physiol. 2004 May; 286(5):C1045-52. Epub 2003 Dec 18.

Brückener KE, el Bayâ A, Galla HJ, Schmidt MA; “Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP”; J Cell Sci. 2003 May 1; 116(Pt 9):1837-46.

Cantin M, Harel J, Higgins R, Gottschalk M; "Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Streptococcus suis* isolates"; J Vet Diagn Invest. 1992 Apr; 4(2):170-4.

Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M; "*Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression"; Microbiology. 1998 Feb; 144 ( Pt 2):325-32.

Charland N, Nizet V, Rubens CE, Kim KS, Lacouture S, Gottschalk M; "*Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells"; Infect Immun. 2000 Feb; 68(2):637-43.

Chatellier S, Gottschalk M, Higgins R, Brousseau R, Harel J; "Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping"; J Clin Microbiol. 1999 Feb; 37(2):362-6.

Chaudhuri A; „Adjunctive dexamethasone treatment in acute bacterial meningitis“; Lancet Neurol. 2004 Jan; 3(1):54-62. Review.

Chivers JE, Cambridge LM, Catley MC, Mak JC, Donnelly LE, Barnes PJ, Newton R; "Differential effects of RU486 reveal distinct mechanisms for glucocorticoid repression of prostaglandin E release"; Eur J Biochem. 2004 Oct; 271(20):4042-52.

Christen S, Schaper M, Lykkesfeldt J, Siegenthaler C, Bifrare YD, Banic S, Leib SL, Täuber MG; „Oxidative stress in brain during experimental bacterial meningitis:

differential effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine treatment”;  
Free Radic Biol Med. 2001 Sep 15; 31(6):754-62.

Clarke D, Almeyda J, Ramsay I, Drabu YJ; “Primary prevention of *Streptococcus suis* meningitis”; Lancet. 1991 Nov 2; 338(8775):1147-8.

Clarke H, Soler AP, Mullin JM; „Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and *tight junction* permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets”; J Cell Sci. 2000 Sep; 113 ( Pt 18):3187-96.

Clifton-Hadley FA, Enright MR; “Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2”; Vet Rec. 1984 Jun 16; 114(24):584-6.

Clifton-Hadley FA, Enright MR, Alexander TJ; “Survival of *Streptococcus suis* type 2 in pig carcasses”; Vet Rec. 1986 Mar 8; 118(10):275.

Clifton-Hadley F and Alexander T; “Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs”; 1991, In: E. Boden (ed.), Swine Practice, (Bailliere Tindall, London), 115-126

Contreras RG, Shoshani L, Flores-Maldonado C, Lázaro A, Monroy AO, Roldán ML, Fiorentino R, Cereijido M; “E-Cadherin and *tight junctions* between epithelial cells of different animal species”; Pflugers Arch. 2002 Jul; 444(4):467-75. Epub 2002 Apr 5.

Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG; “Regulation of airway *tight junctions* by proinflammatory cytokines”; Mol Biol Cell. 2002 Sep; 13(9):3218-34.

Cucullo L, Hallene K, Dini G, Dal Toso R, Janigro D; "Glycerophosphoinositol and dexamethasone improve transendothelial electrical resistance in an *in vitro* study of the blood-brain barrier"; Brain Res. 2004 Feb 6; 997(2):147-51.

De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G; "Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation"; Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 9; 94(25):13504-9.

Devriese LA, Desmidt M, Roels S, Hoorens J, Haesebrouck F; "*Streptococcus suis* infection in fallow deer"; Vet Rec. 1993 Mar 13; 132(11):283.

DGPI Handbuch, „Infektionen bei Kindern und Jugendlichen“,  
Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI) e.V., 5. Auflage 2009.

Dijcks R, Derks M, Verwijnen M, de Jongh TO; "Meningeal irritation"; Ned Tijdschr Geneesk. 2011; 155(18):A2661.

Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN; "Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells"; Infect Immun. 1993 Oct; 61(10):4392-7.

Dumont A, Hehner SP, Schmitz ML, Gustafsson JA, Lidén J, Okret S, van der Saag PT, Wissink S, van der Burg B, Herrlich P, Haegeman G, De Bosscher K, Fiers W;

“Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language?”; Trends Biochem Sci. 1998 Jul; 23(7):233-5.

Dupas D, Vignon M, Géraut C; “*Streptococcus suis* meningitis. A severe noncompensated occupational disease”; J Occup Med. 1992 Nov; 34(11):1102-5.

Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A; “Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, *group B streptococci*”; J Immunol. 1982 Mar; 128(3):1278-83.

Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H; “Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation”; Microsc Res Tech. 2001 Jan 1; 52(1):112-29.

Engelhardt B, Sorokin L; “The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction”; Semin Immunopathol. 2009 Nov; 31(4):497-511. Epub 2009 Sep 25.

Esgleas M, Lacouture S, Gottschalk M; “*Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins”; FEMS Microbiol Lett. 2005 Mar 1; 244(1):33-40.

Feliu JX, Cubarsi R, Villaverde A; “Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells”; Biotechnol Bioeng. 1998 Jun 5; 58(5):536-40.

Förster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D;

“Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system”; J Physiol. 2005 Jun 1; 565(Pt 2):475-86. Epub 2005 Mar 24.

Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J; “Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*”; J Clin Microbiol. 1989 Dec; 27(12):2633-6.

Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J; „Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22”; J Vet Diagn Invest. 1991 Jan; 3(1):60-5.

Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J; “Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*”; J Clin Microbiol. 1991 Nov; 29(11):2590-4.

Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD; “Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin”; Microbiology. 1995 Jan; 141 ( Pt 1):189-95.

Gottschalk M, Segura M; “The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions”; Vet Microbiol. 2000 Oct 1; 76(3):259-72.

Gottschalk M, Segura M, Xu J; „*Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America”; Anim Health Res Rev. 2007 Jun; 8(1):29-45.

Hakvoort A, Haselbach M, Wegener J, Hoheisel D, Galla HJ; „The polarity of choroid plexus epithelial cells *in vitro* is improved in serum-free medium.“; J Neurochem. 1998 Sep; 71(3):1141-50.

Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, Davies-Jones GA, Greenwood J, Woodroffe MN; “Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium”; Brain. 2000 Apr; 123 ( Pt 4):698-709.

Haselbach M, Wegener J, Decker S, Engelbertz C, Galla HJ; „Porcine Choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes“; Microsc Res Tech. 2001 Jan 1; 52(1):137-52. Review.

Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM; „Effects of glucocorticoids on gene transcription“; Eur J Pharmacol. 2004 Oct 1; 500(1-3):51-62.

Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, Galla HJ; „Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system“; Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jun 18; 247(2):312-5.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP; “Molecular physiology and pathophysiology of *tight junctions* in the blood-brain barrier”; Trends Neurosci. 2001 Dec; 24(12):719-25. Review.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S, 2005; “Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells”; J. Cell. Biol. 171, 939-945.



Jepson MA, Schlecht HB, Collares-Buzato CB; "Localization of dysfunctional *tight junctions* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium-infected epithelial layers"; Infect Immun. 2000 Dec; 68(12):7202-8.

Jobin MC, Grenier D, 2003; "Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*"; FEMS Microbiol. Lett. 220, 113-119.

Jobin MC, Fortin J, Willson PJ, Gottschalk M, Grenier D, 2005; "Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells"; FEMS Microbiol. Lett. 252, 105-111.

Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW; "Oxidative stress in bacterial meningitis in humans"; Neurology. 2002 Jan 22; 58(2):186-91.

Kaul A, Chandwani S; "Dexamethasone in bacterial meningitis: to use or not to use?"; Indian J Pediatr. 1996 Sep-Oct; 63(5):583-9.

Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM und Haller von Thieme O; „Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie“; Thieme-Verlag Stuttgart, 2010

Kim KS; "Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury"; Nat Rev Neurosci. 2003 May; 4(5):376-85.

Klein M, Koedel U, Pfister HW, Kastenbauer S; „Meningitis-associated hearing loss: protection by adjunctive antioxidant therapy“; Ann Neurol. 2003 Oct; 54(4):451-8.

Koedel U, Scheld WM, Pfister HW; „Pathogenesis and pathophysiology of *pneumococcal* meningitis“; Lancet Infect Dis. 2002 Dec; 2(12):721-36. Review.  
PMID: 12467688 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Kopić J, Paradzik MT, Pandak N; „*Streptococcus suis* infection as a cause of severe illness: 2 cases from Croatia“; Scand J Infect Dis. 2002; 34(9):683-4.

Lalonde M, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M; “Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines“; Microbiology. 2000 Aug; 146 (Pt 8):1913-21.

Langford P, Williams AE, Kroll JS; “Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates“; FEMS Microbiol Lett. 1991 Jan 15; 61(2-3):347-50.

Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Tauber MG, 1996; “Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to *group B streptococci*“; J. Clin. Investig. 98, 2632–2639.

Lippoldt A, Liebner S, Andbjer B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K;  
“Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell *tight junctions* and

regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C"; Neuroreport. 2000 May 15; 11(7):1427-31.

Liukkonen J, Haataja S, Tikkanen K, Kelm S, Finne J; "Identification of N-acetylneuraminyl alpha 2-->3 poly-N-acetyllactosamine glycans as the receptors of sialic acid-binding *Streptococcus suis* strains"; J Biol Chem. 1992 Oct 15; 267(29):21105-11.

Lohmann C, Krischke M, Wegener J, Galla HJ; „Tyrosine phosphatase inhibition induces loss of blood-brain barrier integrity by matrix metalloproteinase-dependent and -independent pathways"; Brain Res. 2004 Jan 9; 995(2):184-96.

Lucht F; "Sensitivity and specificity of clinical signs in adults"; Med Mal Infect. 2009 Jul-Aug; 39(7-8):445-51. doi: 10.1016/j.medmal.2009.06.015. Epub 2009 Jul 24.

Lutsar I, Friedland IR, Jafri HS, Wubbel L, Ahmed A, Trujillo M, McCoig CC, McCracken GH Jr.; "Factors influencing the anti-inflammatory effect of dexamethasone therapy in experimental *pneumococcal* meningitis."; J Antimicrob Chemother. 2003 Oct; 52(4):651-5. Epub 2003 Sep 1.

Madsen LW, Svensmark B, Elvestad K, Aalbaek B, Jensen HE; "*Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects"; J Comp Pathol. 2002 Jan; 126(1):57-65.

Maurizi CP; „Could antioxidant therapy reduce the incidence of deafness following bacterial meningitis?"; Med Hypotheses. 1999 Jan; 52(1):85-7.

Maxwell DS, Pease DC; "The electron microscopy of the choroid plexus"; J Biophys Biochem Cytol. 1956 Jul 25; 2(4):467-74.

Murphy VA, Johanson CE; "Acidosis, acetazolamide, and amiloride: effects on <sup>22</sup>Na transfer across the blood-brain and blood-CSF barriers"; J Neurochem. 1989 Apr; 52(4):1058-63.

Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA, 2004; "Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant *tight junctions* strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells"; Cell Microbiol. 6, 783-793.

Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA, 2001; "*Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of *tight junction* proteins"; Infect. Immun. 69, 1329-1336.

Nau R, Brück W; „Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy“; Trends Neurosci. 2002 Jan; 25(1):38-45. Review.

Pardridge WM; "Blood-brain barrier biology and methodology"; J Neurovirol. 1999 Dec; 5(6):556-69.

Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, Adamson P; „Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells“; Neurosci Lett. 2003 Jun 26; 344(2):112-6.

Rosenberg GA, 2002; „Matrix metalloproteinases in neuroinflammation“; *Glia* 39, 279-291.

Rothstein RP, Lewinson SP, 2002; “Damage to the choroid plexus, ependyma and subependyma as a consequence of perinatal hypoxia/ischemia”; *Dev. Neurosci.* 24, 426-436.

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, 1998; “Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing *tight junctions*”; *J. Cell Biol.* 141, 397-408.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S, 2000; “Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of *tight junction strands*”; *Mol. Biol. Cell.* 11, 4131-4142.

Sakaguchi T, Kohler H, Gu X, McCormick BA, Reinecker HC, 2002; „*Shigella flexneri* regulates *tight junction*-associated proteins in human intestinal epithelial cells”; *Cell Microbiol.* 4, 367-381.

Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S, 1997; “Possible involvement of phosphorylation of occludin in *tight junction* formation”; *J. Cell Biol.* 137, 1393–1401.

Saklatvala J; “Glucocorticoids: do we know how they work?”; *Arthritis Res.* 2002;4(3):146-50. Epub 2002 Jan 21.

Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM; „Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain”; Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999 Jan; 26(1):11-9.

Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW; „Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury”; J Infect Dis. 2002 Dec 1; 186 Suppl 2:S225-33.

Segal MB; „The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid”; Cell Mol Neurobiol. 2000 Apr; 20(2):183-96. Review.

Segura M, Gottschalk M, Olivier M; “Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis”; Infect Immun. 2004 Sep; 72(9):5322-30.

Serhir B, Higgins R, Foiry B, Jacques M; “Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*”; J Gen Microbiol. 1993 Dec; 139(12):2953-8.

Serhir B, Dubreuil D, Higgins R, Jacques M; “Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2”; J Bacteriol. 1995 Jul; 177(13):3830-6.

Simonovic I, Rosenberg J, Koutsouris A, Hecht G, 2000; “Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions”; Cell Microbiol. 2, 305–315.

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S, 1999; “*Clostridium perfringens* Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from *Tight Junction* Strands. Evidence for direct involvement of claudins in *tight junction* barrier”; J. Cell Biol. 147, 195–204.

Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM.; “*Streptococcus suis*: past and present.”; Vet Res Commun. 1997 Aug;21(6):381-407.

Staats JJ, Plattner BL, Stewart GC, Changappa MM; „Presence of the *Streptococcus suis* suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates”; Vet Microbiol. 1999 Dec; 70(3-4):201-11.

Strazielle N, Ghersi-Egea JF; “Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology”; J Neuropathol Exp Neurol. 2000 Jul; 59(7):561-74.

Strazielle N, Khuth ST, Murat A, Chalon A, Giraudon P, Belin MF, Ghersi-Egea JF, 2003; “Pro-inflammatory cytokines modulate matrix metalloproteinase secretion and organic anion transport at the blood– cerebrospinal fluid barrier”; J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62, 1254– 1264.

Strupp M, 2008; “Inflammatory CNS disorders: use of dexamethasone in bacterial meningitis and new insights in multiple sclerosis”; J. Neurol. 255, 149-151.

Tenenbaum T, Adam R, Eggelpöhler I, Matalon D, Seibt A, K Novotny GE, Galla HJ, Schrotten H; „Strain-dependent disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier by

*Streptococcus suis in vitro* ; FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Apr 1; 44(1):25-34.PMID: 15780575 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Tenenbaum T, Essmann F, Adam R, Seibt A, Jänicke RU, Novotny GE, Galla HJ, Schrotten H; „Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection *in vitro*“; Brain Res. 2006 Jul 19; 1100(1):1-12. Epub 2006 Jun 15.

Tenenbaum T, Matalon D, Adam R, Seibt A, Wewer C, Schwerk C, Galla HJ, Schrotten H; „Dexamethasone prevents alteration of *tight junction*-associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis in vitro*“; Brain Res. 2008 Sep 10;1229:1-17. Epub 2008 Jul 8.; PMID: 18644352

Trottier S, Higgins R, Brochu G, Gottschalk M; „A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America“; Rev Infect Dis. 1991 Nov-Dec; 13(6):1251-2.

Tunkel AR, Scheld WM, „Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis“; Clin Microbiol Rev. 1993 Apr; 6(2):118-36.

Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR; “Pathogenesis of pneumococcal infection”; N Engl J Med. 1995 May 11; 332(19):1280-4.

Tuomanen E; “Entry of pathogens into the central nervous system”; FEMS Microbiol Rev. 1996 Jul; 18(4):289-99.



Van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K, "Corticosteroids for acute bacterial meningitis"; Cochrane Database Syst Rev. 2007 Jan 24;(1):CD004405.

Van Furth AM, Roord JJ, van Furth R; "Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy"; Infect Immun. 1996 Dec; 64(12):4883-90.

Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE; „Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2"; Infect Immun. 1991 Sep; 59(9):3156-62.

Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, Smith HE; „Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype"; Infect Immun. 1992 Feb; 60(2):550-6.

Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ; "Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone"; Brain Res. 2005 Aug 16; 1053(1-2):162-74.

Williams AE, Blakemore WF; "Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2"; J Infect Dis. 1990 Aug; 162(2):474-81.

Williams DM, Lawson GH, Rowland AC; "*Streptococcal* infection in piglets: the palatine tonsils as portals of entry for *Streptococcus suis*"; Res Vet Sci. 1973 Nov; 15(3):352-62.

Windsor RS; "Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type II"; Vet Rec. 1977 Nov 5; 101(19):378-9.

Winterhoff N, Goethe R, Gruening P, Rohde M, Kalisz H, Smith HE, Valentin-Weigand P; "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*"; J Bacteriol. 2002 Dec; 184(24):6768-76.

Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B, van der Saag PT; „A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids"; Mol Endocrinol. 1998 Mar; 12 (3):355-63.

Wong V, 1997; "Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the *tight junction*"; Am. J. Physiol. 273, C1859–C1867.

Wu Q, Delpire E, Hebert SC, Strange K; „Functional demonstration of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter activity in isolated, polarized choroid plexus cells"; Am J Physiol. 1998 Dec; 275(6 Pt 1):C1565-72.

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

Zettl KS, Sjaastad MD, Riskin PM, Parry G, Machen TE, Firestone GL;

“Glucocorticoid-induced formation of *tight junctions* in mouse mammary epithelial cells *in vitro*”; Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 1; 89(19):9069-73.PMID: 1409603

## 7 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. H. Schrotten und Herrn Prof. Dr. T. Tenenbaum für die Bereitstellung des Themas und für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit in dem Laborbereich der pädiatrischen Infektiologie der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universitätsklinik bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Annette Seibt und Marie-Luise Mölleken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit eine große Hilfe waren. Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Laborteam bedanken, das mich bei meiner Arbeit unterstützt hat und mit dem ich sehr gerne im Team zusammengearbeitet habe.

Dank an die Betreiber des Schlachthofs Duisburg und ihre Schlachthofarbeiter, die es mir in ihrer freundlichen Art ermöglichten, porcine Plexus choroidei für meine Versuche zu gewinnen.

Dank an all meine Freunde, die mich auf meinem Weg diese Arbeit fertigzustellen unterstützt und motiviert haben.

Besonderen Dank an meine Eltern und meine Geschwister, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und mich stets motiviert haben.

## **8 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

13.12.2016 David Matalon