

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Mayatepek

Einfluss von Scherkräften auf die Interaktion von  
*Streptococcus agalactiae* mit humanen Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Klein

2016

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

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Horst Schroten

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Walter Däubener

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Danke, dass ihr mich unterstützt und gefördert habt.

## **Zusammenfassung**

Das grampositive Bakterium *Streptococcus agalactiae* ist einer der häufigsten Erreger der neonatalen Sepsis und Meningitis. Diese klinisch relevanten Krankheitsbilder können zum Tod oder zu schweren Folgeerkrankungen von Neugeborenen führen und stellen nach wie vor eine Gefahr für das Kind dar. Die Infektionsmechanismen dieser Erreger sind in vielen Bereichen untersucht worden. Der Einfluss einer Flüssigkeitsströmung auf Gefäßzellen, in Hinblick auf die Adhäsion des Erregers an menschlichen Endothelzellen als wichtiger Schritt der Infektionspathogenese, ist bisher aber kaum untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Adhäsion von *Streptococcus agalactiae* an zuvor beströmten humanen umbilicalen Venenendothelzellen (HUVEC) und human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) mit der Adhäsion an unbeströmten Zellen verglichen. Hierzu wurden Zellkulturen der Endothelzellen über einen speziellen Kunststoffeinsatz (Flusskammer) einer definierten Schubspannung ausgesetzt und die Bakterienadhäsion im Anschluss an diesen Stimulus gemessen. Zusätzlich wurde der Effekt von TNF-alpha, als proinflammatorisches Zytokin, auf die Adhäsion gemessen und mit den Ergebnissen der Strömungsversuche verglichen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Expression des Zelloberflächenproteins ICAM-1, das auch bei Adhäsionsvorgängen an Zellen eine Rolle spielt, auf Endothelzellen ohne und nach Stimulation der Zellen durch TNF-alpha und Schubspannung untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen konnten keinen signifikanten Unterschied der Bakterienadhäsion an zuvor beströmten zu unbeströmten Endothelzellen aufzeigen. Auch die Stimulation durch TNF-alpha führte zu keiner signifikanten Adhäsionssteigerung. In der zweiten Versuchsreihe konnte der bereits in der Literatur beschriebene Effekt einer Flüssigkeitsströmung auf die ICAM-1-Expression von Endothelzellen reproduziert werden. Die vermehrte Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen führte aber nicht zu einer erhöhten Adhäsionsrate von *Streptococcus agalactiae*.

Einen Einfluss von Strömungskräften bzw. einer Schubspannung auf die Adhäsionsrate von *Streptococcus agalactiae* an Endothelzellen oder die Identifizierung von ICAM-1 als relevante Komponente der Adhäsion konnte in dieser Arbeit somit nicht nachgewiesen werden.

## Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                         |
|------------|---------------------------------------------------------|
| A          | Fläche                                                  |
| Abb.       | Abbildung                                               |
| Aqua dest. | Aqua destillata                                         |
| bzw.       | beziehungsweise                                         |
| °C         | Grad Celcius                                            |
| CDC        | Centers for disease control and prevention              |
| CD11a/CD18 | Cluster of differentiation 11a/18 (Dimer) = LFA-1       |
| CD49d/CD24 | Cluster of differentiation 49d/24 (Dimer) = VLA-4       |
| CD54       | Cluster of differentiation 54 = ICAM-1                  |
| CD62E      | Cluster of differentiation 62E = E-Selektin             |
| CD62L      | Cluster of differentiation 62L = L-Selektin             |
| CD106      | Cluster of differentiation 106 = VCAM-1                 |
| CFU        | colony-forming unit                                     |
| CRP        | C-reaktives Protein                                     |
| DAPI       | 4',6-diamidino-2-phenylindol                            |
| v          | velocity                                                |
| y          | Schichtdicke                                            |
| Dyn        | veraltete cgs-Einheit der Kraft (durch Newton ersetzt)  |
| E.Coli     | Escherichia coli                                        |
| EOD        | early onset disease                                     |
| et al.     | und andere                                              |
| etc.       | und so weiter                                           |
| F          | Kraft                                                   |
| FACS       | Fluorescent Activated Cell Scanner                      |
| FCS        | fetal calf serum                                        |
| FSC        | foreward scatter                                        |
| g          | Erdbeschleunigung (hier: Beschleunigung der Zentrifuge) |
| $\gamma$   | gamma, hier Scherrate                                   |
| GBS        | Gruppe-B-Streptokokken                                  |
| h          | Stunde(n)                                               |
| $\eta$     | eta, hier für Viskosität                                |
| HBMEC      | human brain microvascular endothelial cells             |
| HBSS       | Hank's Balanced Salt Solution                           |

|                |                                          |
|----------------|------------------------------------------|
| HUVEC          | human umbilical vein endothelial cells   |
| IL-1           | Interleukin 1                            |
| ICAM-1         | Intercellular adhesion molecule 1        |
| K              | Kelvin                                   |
| LFA-1          | Lymphocyte function-associated antigen-1 |
| LOD            | late onset disease                       |
| m              | Meter                                    |
| m <sup>2</sup> | Quadratmeter                             |
| MOI            | multiplicity of infection                |
| N              | Newton                                   |
| NO             | Stickstoffmonoxid                        |
| Nm             | Nanometer                                |
| Pa             | Pascal                                   |
| PBS            | phosphate buffered saline                |
| Prf            | phenol red free                          |
| Rip            | Receptor interacting protein             |
| s              | Sekunde                                  |
| SSC            | sideward scatter                         |
| SSW            | Schwangerschaftswoche                    |
| $\tau$         | tau, hier Schubspannung                  |
| TEER           | transendothelial electrical resistance   |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor $\alpha$              |
| THB            | Todd Hewitt broth                        |
| UK             | United Kingdom                           |
| VCAM-1         | Vascular adhesion molecule 1             |
| VLA-4          | Very late antigen 4                      |
| $\mu\text{m}$  | Micrometer                               |
| ZNS            | Zentrales Nervensystem                   |

# **Inhaltsverzeichnis**

|                        |            |
|------------------------|------------|
| <b>Zusammenfassung</b> | <b>-I-</b> |
|------------------------|------------|

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> | <b>-II-</b> |
|------------------------------|-------------|

|                      |            |
|----------------------|------------|
| <b>1. Einleitung</b> | <b>-1-</b> |
|----------------------|------------|

|     |                                                                |      |
|-----|----------------------------------------------------------------|------|
| 1.1 | <i>Streptococcus agalactiae</i>                                | -1-  |
| 1.2 | Neonatale Sepsis                                               | -3-  |
| 1.3 | Infektionspathogenese                                          | -5-  |
| 1.4 | Neonatale Meningitis                                           | -7-  |
| 1.5 | Endothelzellen und der Einfluss von Flüssigkeitsströmung       | -9-  |
| 1.6 | Flusskammern für Strömungsversuche                             | -14- |
| 1.7 | Quantifizierung der bakteriellen Adhäsion                      | -17- |
| 1.8 | Bakterielle Adhäsion und der Einfluss von Flüssigkeitsströmung | -18- |
| 1.9 | Zielsetzung der Arbeit                                         | -20- |

|                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| <b>2. Material und Methoden</b> | <b>-21-</b> |
|---------------------------------|-------------|

|         |                                            |      |
|---------|--------------------------------------------|------|
| 2.1     | Zellkultur                                 | -21- |
| 2.1.1   | Zelllinien                                 | -21- |
| 2.1.2   | Medien und Zusätze                         | -21- |
| 2.2     | Bakterien                                  | -23- |
| 2.2.1   | Bakterienstämme                            | -23- |
| 2.2.2   | Bakterienmedien                            | -23- |
| 2.3     | Puffer und Waschlösungen                   | -24- |
| 2.4     | Chemikalien und Antikörper                 | -24- |
| 2.5     | Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software | -24- |
| 2.6     | Zellkultur                                 | -25- |
| 2.6.1   | HUVEC-Kultivierung                         | -25- |
| 2.6.1.1 | Anzucht                                    | -25- |
| 2.6.1.2 | Passagieren adhärenter Zellen              | -25- |
| 2.6.1.3 | Kryokonservierung von HUVEC                | -26- |
| 2.6.2   | HBMEC-Kultivierung                         | -26- |
| 2.6.2.1 | Anzucht                                    | -26- |

|           |                                                                             |      |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.6.2.2   | Passagieren adhärenter Zellen                                               | -27- |
| 2.6.2.3   | Kryokonservierung von HBMEC                                                 | -27- |
| 2.7       | Ermittlung der Zelldichte mittels DAPI-Färbung                              | -27- |
| 2.8       | Bakterienkultur                                                             | -28- |
| 2.8.1     | Bakterienanzucht                                                            | -28- |
| 2.8.2     | Ermittlung von Wachstumskurven für B-Streptokokken                          | -28- |
| 2.8.3     | Bakterienvorbereitung für Adhäsionsversuche                                 | -29- |
| 2.9       | Flow-System                                                                 | -29- |
| 2.10      | Adhäsionsassay                                                              | -32- |
| 2.10.1    | Adhäsionsversuche an beströmten Endothelzellen                              | -32- |
| 2.10.2    | Adhäsionsversuche an TNF- $\alpha$ stimulierten Endothelzellen              | -33- |
| 2.11      | Viabilitätsmessung beströmter Endothelzellen                                | -34- |
| 2.12      | Durchflusszytometrie (FACS)                                                 | -34- |
| 2.12.1    | Funktionsprinzip                                                            | -34- |
| 2.12.2    | Semiquantitative Messung der ICAM-1 Expression<br>beströmter Endothelzellen | -35- |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                           | -37- |
| 3.1       | Wachstumskurve für Streptokokken Stamm G1                                   | -37- |
| 3.2       | Bestimmung der Zellzahl pro Fläche                                          | -38- |
| 3.3       | Nachweis intakter Zellen nach Strömungsversuch                              | -40- |
| 3.4       | Adhäsion des G1-Stammes an HBMEC                                            | -41- |
| 3.5       | Adhäsion des R1-Stammes an HBMEC                                            | -42- |
| 3.6       | Adhäsion des G1-Stammes an HUVEC                                            | -44- |
| 3.7       | ICAM-Messung an HBMEC                                                       | -45- |
| 3.8       | ICAM-Messung an HUVEC                                                       | -47- |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>                                                           | -50- |
| 4.1       | Versuchsplanung, Aufbau und Methodik                                        | -50- |
| 4.2       | Zellkultur und Bakterieninokulum                                            | -53- |
| 4.3       | ICAM-Messung                                                                | -54- |
| 4.4       | Adhäsionsversuche                                                           | -55- |
| 4.5       | Ausblick                                                                    | -57- |

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| <b>5. Literaturverzeichnis</b>      | -60- |
| <b>6. Abbildungsverzeichnis</b>     | -67- |
| <b>7. Tabellenverzeichnis</b>       | -68- |
| <b>8. Eidesstattliche Erklärung</b> | -69- |
| <b>9. Danksagung</b>                | -70- |
| <b>10. Lebenslauf</b>               | -71- |

## **1. Einleitung**

Das Bakterium *Streptococcus agalactiae*, auch als Gruppe-B-Streptokokken bezeichnet, ist einer der häufigsten Erreger der neonatalen Sepsis und Meningitis. Diese ernsten Krankheitsbilder führen häufig zu schweren Folgeschäden oder zum Tod des Neugeborenen (Heath et al. 2003, Harvey et al. 1999, Fleugge et al. 2006).

Die Inzidenz der Sepsis bei Neugeborenen lag in den USA bei etwa 0,3 Fällen auf 1000 Lebendgeburten im Jahr 2004. In Europa (England/UK) lag die Inzidenz der Gruppe-B-Streptokokken-Sepsis in den Jahren 2000-2001 bei etwa 0,72 Fällen auf 1000 Lebendgeburten (Heath und Schuchat 2007). In den Niederlande lag die Inzidenz von Gruppe-B-Streptokokken Infektionen in den Jahren 1997-1998 bei etwa 0,9 bis 1,9 Fällen auf 1000 Lebendgeburten (Trijbels-Smeulders et al. 2002). Für Indien wurde in einer Studie aus dem Jahr 2004 eine Inzidenz von ungefähr einem Fall pro 1000 Lebendgeburten beschrieben (Shet und Ferrieri 2004). Für Deutschland wird in einer im Jahr 2006 veröffentlichten Studie eine Inzidenz von 0,47 Fällen auf 1000 Lebendgeburten genannt (Fluegge et al. 2006). Bei einer Geburtenzahl von etwa 700 000 Neugeborenen / Jahr ergibt dies eine Fallzahl von etwa 329 jährlich. Aufgrund dieser Häufigkeit und der Schwere der Erkrankung hat die Infektion mit Gruppe-B-Streptokokken im Neugeborenenalter eine große Bedeutung, sodass die Untersuchung ihrer Mechanismen einen wichtigen Schritt hin zum Verständnis, zur Behandlung und zur Prävention dieser Erkrankung darstellt.

### **1.1 *Streptococcus agalactiae***

*Streptococcus agalactiae* ist ein Bakterium, das der Gattung *Streptococcus* angehört. Streptokokken sind grampositive Bakterien, die als Bestandteil der normalen Haut- und Schleimhautflora des Menschen vorkommen, aber auch als Krankheitserreger auftreten können. Die Unterteilung in die zwei großen Gruppen der Bakterien in grampositiv und gramnegativ wird anhand der Gramfärbung vorgenommen. Hier werden die Keime in einem ersten Schritt mit Gentianaviolett bläulich angefärbt. Durch die Zugabe von Lugol'scher Lösung entstehen stabilere Farbkomplexe. Im zweiten Schritt werden die Bakterien mit 96% Alkohol gewaschen. Hierbei werden die gramnegativen Bakterien wieder entfärbt. Im letzten Schritt können die gramnegativen Keime mit Safranin rötlich gegengefärbt werden, damit sie einen größeren Kontrast zu den blauen grampositiven Bakterien bilden (aus Hoff et al. 2005). Der Grund für die unterschiedliche Färbbarkeit der Bakterien ist der Aufbau ihrer Zellwand. Neben der Zytoplasmamembran der Bakterien, die wie menschliche Zellmembranen aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht, weisen sie eine unterschiedlich ausgeprägte Zellwand auf.

Diese Zellwand besteht aus Polysaccharidketten, die mit Proteinfäden vernetzt sind und das Peptidoglykan (Murein) bilden. Grampositive Keime weisen eine viel dickere Zellwand auf als die gramnegativen. Die unterschiedliche Zellwanddicke ist für den Unterschied in der Gramfärbung verantwortlich. Der Zellwand schließt sich bei den gramnegativen Bakterien eine zusätzliche äußere Phospholipidmembran an. Durch die Membranen und Mureinschichten spannen sich zusätzlich unterschiedliche Strukturen, wie Proteine, Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren, die der Interaktion des Bakteriums mit seiner Umwelt dienen. Darüber hinaus stellen diese Bakterienbestandteile für den Menschen exogene Pyrogene dar, die häufig Fieber und andere Entzündungsreaktionen hervorrufen. Manche Bakterien bilden eine äußere Kapsel aus Polysaccharidketten, die sie besser vor der Phagozytose durch das Wirtsimmunsystem schützt. Dadurch sind viele bekapselte Bakterienarten, wie *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae*, virulenter als vergleichbare, unbekapselte Stämme (Kass und Seastone 1944, Llull et al. 2001, Lindberg 1999).

Unterteilt werden die verschiedenen Streptokokkenarten üblicherweise serologisch anhand ihres Antigenmusters in der Bakterienwand, morphologisch aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf Blutagarplatten oder mittels Nachweis serotypischer Gencluster von Kapselgenen durch die Polymerase Kettenreaktion (Kong et al. 2002).

Die serologische Einteilung geht auf Rebecca C. Lancefield zurück, die vor allem ein Polysaccharid der Bakterienwand, das als C-Substanz bezeichnet wird, zur Differenzierung der Streptokokken nutzt. Anhand dieses Antigens wird zwischen den Serogruppen A-W sowie dem Fehlen des Antigens unterschieden (Lancefield 1933, Hoff et al. 2005).

*Streptococcus agalactiae* gehört dieser Einteilung nach zu der Serogruppe B, weshalb man im medizinischen Alltag auch von Gruppe-B-Streptokokken spricht. Andere Vertreter der Streptokokken sind z.B. Gruppe-A-Streptokokken (*Streptococcus pyogenes*), die Tonsillitis und Scharlach auslösen können und die Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*), ohne C-Substanz bzw. Gruppenantigen, die ebenfalls von großer medizinischer Relevanz sind, da sie häufige Erreger der Pneumonie (Lungenentzündung) sind.

Neben der eigentlichen Zellwand besitzt *Streptococcus agalactiae*, wie z.B. auch *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*, zusätzlich eine polysaccharidhaltige Bakterienkapsel, die eine Erkennung und Markierung des Erregers durch das Immunsystem des Wirtes erschwert und somit die Virulenz des Erregers erhöht. Anhand dieser Kapsel lassen sich bisher 9 verschiedene Serotypen (Ia, Ib, II-VIII) der Serogruppe B unterscheiden (Cieslewicz et al. 2005). Nach morphologischer Einteilung aufgrund des Hämolyseverhaltens gehört *Streptococcus agalactiae* zu den  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken. Diese Gruppe

zeichnet sich beim Wachstum auf Blutagarplatten durch die Ausbildung eines klaren, hellen Hofes um die Bakterienkolonien aus. Dieser entsteht durch die vollständige Lyse der Erythrozyten des Agars durch ein sezerniertes Hämolsin. Mit dem sogenannten CAMP-Test, nach den Erfindern Christie, Aktins und Munch-Petersen benannt, kann diese Hämolyse verstärkt werden (Christie et al. 1944). So kommt es beim Beimpfen einer Blutagarplatte mit B-Streptokokken zusammen mit *Staphylococcus aureus* zu einer vollständigen Erythrozytenhämolyse, welche als vollständiges Aufhellen des ansonsten roten Agars zu sehen ist. Der Grund für diese Hämolysereaktion ist ein synergistischer Effekt der Hämolsine beider Bakterien (Bae und Bottone 1980). Zu den Streptokokken, die ebenfalls durch eine  $\beta$ -Hämolyse auffallen, gehören auch die Gruppe-A-Streptokokken (*Streptococcus pyogenes*). Fehlt den Bakterien die Eigenschaft Erythrozyten zu zerstören, wie bei einigen Gruppe-D-Streptokokken (*Enterokokken*), wird keine Hämolyse beobachtet, dies wird als  $\gamma$ -Hämolyse bezeichnet. Die dritte Form des Bakterienwachstums auf Blutagarplatten ist die  $\alpha$ -Hämolyse. Sie ist an einer typisch grünen Farbe des Agars an der Stelle des Bakterienwachstums zu erkennen, welche auf die Bildung biliverdinähnlicher Substanzen in den Erythrozyten zurückzuführen ist. Durch Sekretion von  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid) wird das Hämoglobin reduziert und verändert sein Absorptionsspektrum, sodass die typische Farbe um die Bakterienkolonien entsteht. Zu den Streptokokken, die durch  $\alpha$ -Hämolyse auffallen, gehört unter anderem *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) sowie die „vergrünenden Streptokokken“, die auch als „Oralstreptokokken“ bezeichnet werden. Sowohl den Pneumokokken als auch den Oralstreptokokken fehlt in ihrer Bakterienwand das Lancefield-Gruppenantigen (Hoff et al. 2005).

## 1.2 Neonatale Sepsis

Die Neugeborenensepsis ist ein ernstes Krankheitsbild, das mit einer hohen Morbidität und Mortalität des Kindes verbunden ist. Neben Störungen des Atmungs- und Kreislaufsystems kann vor allem die neonatale Meningitis zum Tod oder zu neurologischen Folgeschäden führen (Fluegge et al. 2006)

Klinisch wird Sepsis definiert als systemische Reaktion des Körpers auf pathogene Keime (oder deren Toxine) mit starkem Anstieg oder Abfall der Leukozytenzahlen im Blut, einer erhöhten oder erniedrigten Körpertemperatur, einer beschleunigten Atmung (Tachypnoe) und Herzfrequenz (Tachykardie) sowie einer Erhöhung von Entzündungswerten im Blut (z.B. C-Reaktives Protein, Procalcitonin) (Levy et al. 2003).

Diesen Reaktionen liegt eine massive Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zugrunde. Durch aktivierte Leukozyten kommt es zur Bildung proinflammatorischer

Substanzen (z.B. Interleukine, TNF- $\alpha$ ), Beeinträchtigung des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems und Freisetzung bioaktiver Moleküle (NO, Sauerstoffradikale, Proteasen). Die Endstrecke dieser Immunantwort bilden dann zytotoxische und hypoxisch-ischämische Vorgänge, die zu Organschädigungen bis hin zum Organversagen führen können.

Die Neugeborenenroseptis wird nach klinischen Kriterien in eine frühe (early onset disease, EOD) und eine späte Form (late onset disease, LOD) eingeteilt. Von EOD spricht man bei einem Auftreten der Sepsis innerhalb der ersten sechs Lebenstage des Neugeborenen, wobei beinahe 80% dieser Infektionen bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt auftreten (Schuchat 1998). Die LOD tritt zwischen dem 7. Tag und den ersten zwei bis drei Monaten auf. Insgesamt liegt der Anteil der EOD bei fast 80% aller Sepsisfälle und nur etwas mehr als 20% ereignen sich nach der ersten Lebenswoche (Schuchat 1998, Heath und Schuchat 2007).

Voraussetzung für die EOD ist die Besiedlung des mütterlichen Genitaltraktes mit den Erregern. In einigen Studien wurde bei bis zu 40% der schwangeren Frauen eine B-Streptokokken-Besiedlung festgestellt (Doran und Nizet 2004). In einem Teil der Fälle kommt es dabei schon kurz vor der Geburt durch eine Aszension der Erreger über die Eihäute (Amnion und Chorion) zur Infektion. Weiterhin kann das Neugeborene unter der Geburt, beim Durchtritt durch den Geburtskanal, mit den Bakterien in Kontakt kommen. Dies führt zur Kolonisation des Kindes. Während man bei der EOD von einer vertikalen Infektion, von der Mutter auf das Kind spricht, scheint bei der LOD vor allem die horizontale Übertragung (z.B. durch Kontaktpersonen) eine Rolle zu spielen (Paredes et al. 1977, Kim et al. 2006). Daraus ergeben sich auch unterschiedliche Ansätze zur Prävention der beiden Sepsisformen. Liegt ein erhöhtes Risiko für eine EOD (z.B. nach vorzeitigem Blasensprung) vor, kann durch eine so genannte intrapartuale Chemoprophylaxe mit Antibiotika das Infektionsrisiko des Neugeborenen in vielen Fällen gesenkt werden. Zur Anwendung kommen verschiedene Strategien der Antibiotikaprofylaxe. Die erste sieht eine Behandlung der Mutter vor, wenn bei dieser eine Besiedlung mit Gruppe-B-Streptokokken durch einen mikrobiologischen Abstrich in der 36. bis 38. Schwangerschaftswoche bestätigt worden ist, und zusätzlich Risikofaktoren für eine GBS-Infektion vorliegen. Zu diesen Risikofaktoren gehören:

- eine hohe Keimdichte im Urogenitaltrakt der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt
- eine Dauer zwischen Blasensprung und Geburt von mehr als 18 h
- Fieber während der Geburt von über 38°C
- die Frühgeburt vor vollendeter 37. Schwangerschaftswoche
- eine GBS- Bakteriurie während der Schwangerschaft
- ein an GBS erkranktes Neugeborenes in der Anamnese der Schwangeren

Die zweite Strategie sieht eine Antibiotikagabe schon bei Auftreten der genannten Risikofaktoren vor, auch ohne dass ein Screeningabstrich des Urogenitaltraktes positiv ausfällt (Berner et al. 2009). In den deutschen S2-Leitlinien zur Prophylaxe der frühen Form der Neugeborenensepsis durch Gruppe-B-Streptokokken wurde, in der überarbeiteten Version (AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 024/020, 2008), die Empfehlung ausgesprochen, ein generelles Screening bei allen Schwangeren (in der 36.-38. SSW) durchzuführen. Allerdings wird auch hier die antibiotische Prophylaxe bei noch nicht vorliegendem Screeningergebnis, aber bestehenden Risikofaktoren empfohlen. Die Reduktion der Infektionswahrscheinlichkeit des Neugeborenen wird mit etwa 70 % angegeben (Morantz und CDC 2003). In der aktualisierten Leitlinie des CDC werden erweiterte und überarbeitete Angaben zur Chemotherapie, insbesondere Dosis- und Medikamentenwahl, sowie zum diagnostischen Vorgehen bezüglich Bakterienkultur und Nukleinsäureamplifikation-Tests (z.B. PCR) gemacht (Cagno et al. 2012).

Bei der LOD liegt der Schwerpunkt der Prävention in einem anderen Bereich. Aufgrund der angenommenen Übertragung der Bakterien über Kontakt mit besiedelten Personen als Hauptursache der Infektion, kann hier die strikte Einhaltung der Hygienestandards als wichtiger Ansatzpunkt gelten (Heath und Schuchat 2007).

### **1.3 Infektionspathogenese**

Kommen pathogene Erreger, wie Gruppe-B-Streptokokken mit den kindlichen Schleimhäuten in Kontakt, können die entscheidenden Schritte der Infektion stattfinden. Zu Beginn erfolgt die Adhäsion der Bakterien an der äußeren Haut und den Schleimhäuten des Körpers (Epithelien), dann die Invasion und Translokation durch die Epithelien hindurch, die initiale Überwindung des Immunsystems des Wirtes und schließlich die Ausbreitung über das Kreislaufsystem (Bakteriämie) (Rubens et al. 1992). Mit Einsetzen der systemischen Immunreaktion des infizierten Kindes lassen sich dann die klinischen Symptome der Sepsis beobachten, welche zu einer lebensbedrohlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes und der Organfunktionen führt (Henneke und Berner 2006).

Gelingt es den Erregern auch die Endothelbarrieren der Gefäße zu verlassen, können sie in verschiedene Gewebe- und Organkompartimente (z.B. das ZNS) eindringen und dort zur lokalen Entzündung führen (z.B. Meningitis). Adhäsion und Invasion von Epithelien und Endothelien (z.B. im ZNS) durch B-Streptokokken sind Gegenstand der Forschung zur Infektionspathogenese. Bei der Adhäsion des Bakteriums an der humanen Zelle spielt die Interaktion von Zellproteinen, wie Fibronectin, Fibrinogen und Laminin, sowie Oberflächenproteinen der Bakterienwand, z.B. das Laminin-bindende-Protein, Rip oder die

C5a-Peptidase, eine große Rolle (Doran und Nizet 2004, Spellerberg et al. 1999, Tamura und Rubens 1995, Cheng et al. 2002, Gutekunst et al. 2004).

In der Arbeit der Arbeitsgruppe von Lione wird die Interaktion von Gruppe-B-Streptokokken mit dem endothelialen Adhäsionsprotein *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) beschrieben (Lione et al. 2005). ICAM-1 spielt bei der Einwanderung von Leukozyten aus der Blutbahn ins Gewebe als Adhäsionsprotein eine wichtige Rolle (s. unten). Die Invasion und anschließende Translokation der Bakterien stellt nach der Adhäsion der Erreger am Endothel den entscheidenden Schritt zur Überwindung der Schleimhautbarrieren und Gefäßgrenzen dar. In vielen Untersuchungen konnte durch Verwendung von Bakterien ohne diese Proteine (Laminin-bindende-Protein, Rip, C5a-Peptidase, ICAM-1) oder das Blockieren der Interaktion mittels Antikörpern eine Verringerung der Adhäsion und Invasion durch die Erreger gezeigt werden (Doran und Nizet 2004, Spellerberg et al. 1999, Tamura und Rubens 1995, Cheng et al. 2002, Gutekunst et al. 2004, Lione et al. 2005). Zusätzlich konnten Pezzicoli und Mitarbeiter nachweisen, dass Gruppe-B-Streptokokken auch parazellulär, das heißt zwischen den Epithelzellen hindurch die Schleimhautbarrieren überwinden können (Pezzicoli et al. 2008). Die in *in vitro* Experimenten verwendeten Zelltypen, z.B. Lungenepithelzellen, Zervix-Epithelzellen oder Gefäßendothelien, dienen als Modell für die Verhältnisse *in vivo* und können für verschiedenste Fragestellungen benutzt werden.

Neben der Interaktion von Erregern und dem Endothel ist vor allem die Leukozytenadhäsion und -migration am aktivierten Endothel einer der Schlüsselpunkte bei der Ausbildung und Unterhaltung der Entzündung, z.B. im ZNS (Steinmann et al. 2013).

Durch das Einwandern dieser immunkompetenten Zellen werden weitere Mechanismen in Gang gesetzt (z.B. Sauerstoffradikalbildung, Ödembildung etc.) und es kommt zur Elimination der Erreger, aber auch zur Gewebsschädigung. Verschiedene Oberflächenmoleküle sowohl auf den Leukozyten als auch auf den Endothelzellen wurden identifiziert, die für die Interaktion und Einwanderung der Abwehrzellen verantwortlich sind. Hierzu zählen auf endothelialer Seite ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1, CD54), E-Selektin (auch CD62E genannt), I-Selektin (auch CD62L) und VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1, CD106). Diese Oberflächenmoleküle interagieren mit verschiedenen Integrinen, z.B. VCAM mit VLA-4 (CD49d/CD29) und ICAM mit LFA-1 (CD11a/CD18), auf der Membranoberfläche der Leukozyten und vermitteln deren Adhäsion am Endothel (Rahman und Fazal 2009, Yonekawa und Harlan 2004).

An den Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke liegt das Endothel unmittelbar den gewebe- bzw. organotypischen Zellen an. Die Grenze zwischen dem Intravasalraum und dem ZNS ist hier sehr schmal. Erreger, wie Gruppe-B-Streptokokken, können durch Überwindung dieser

wenigen Zellschichten schnell vom Blut ins ZNS übertreten und eine Entzündung auslösen (Huang et al. 2000). Auf die Infektionspathogenese an der Blut-Hirn-Schranke wird näher im folgenden Abschnitt eingegangen.

## **1.4 Neonatale Meningitis**

Die neonatale Meningitis ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild, das sich als Komplikation aus einer Sepsis oder Bakteriämie heraus entwickeln kann. Auch hier sind Gruppe-B-Streptokokken einer der häufigsten auslösenden Erreger. Daneben kommen auch gramnegative Bakterien, wie *E.coli*, sowie einige grampositiven Erreger, wie Listerien oder Enterokokken, als Auslöser der Meningitis in Betracht (Heath et al. 2003). Die klinischen Zeichen der Meningitis sind im Neugeborenenalter unspezifisch. Dazu zählen z.B. Temperaturstabilität, Atemnot, Unruhe oder Lethargie, Berührungsempfindlichkeit, Krämpfe, Nackensteife, eine gespannte Fontanelle, schrilles Schreien und laborchemische Entzündungszeichen (CRP-Anstieg, Leukozytose, PCT-Anstieg, Anstieg von Il-6 und Il-8, Zellzahlerhöhung im Liquor, usw.). Die Infektion ist mit einer hohen Letalität (bis zu 25%) und der großen Gefahr neurologischer Folgeschäden, wie Taubheit, Hydrozephalus oder geistiger Behinderung, verbunden (Bedford et al. 2001, Franco et al. 1992, Mulder und Zanen 1984).

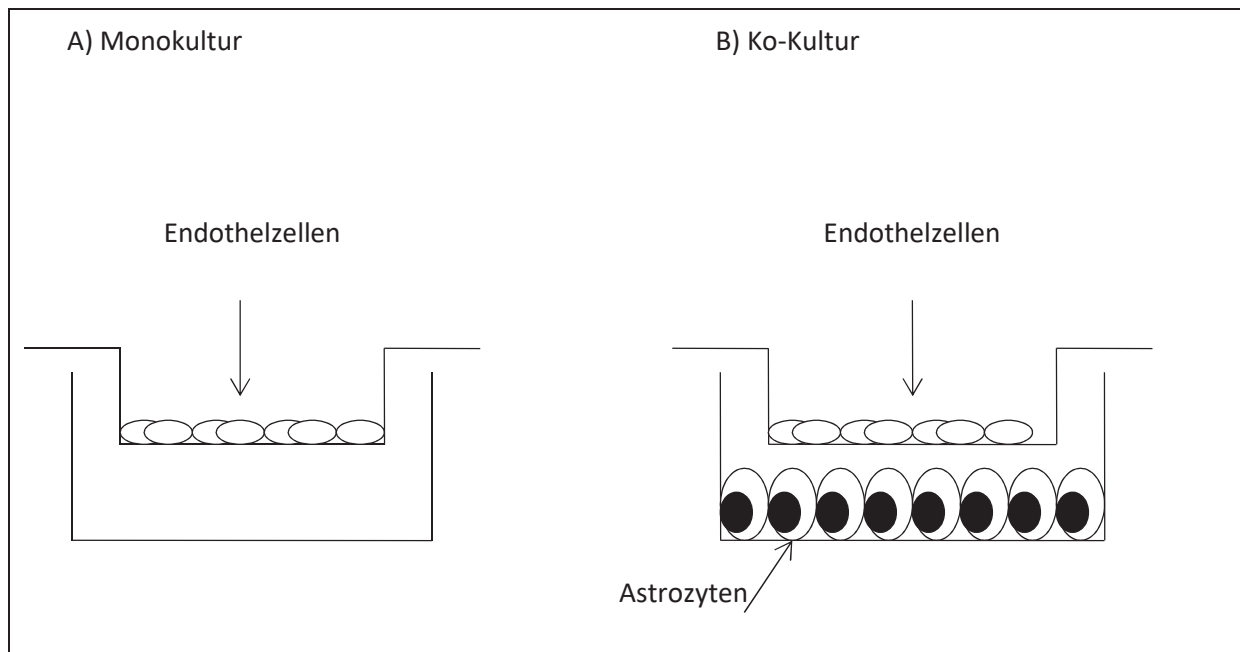
Die wichtigste Hürde in der Infektionspathogenese stellt für die Bakterien die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar, nachdem sie zuvor durch Überwindung der Haut- oder Schleimhautbarrieren in den Blutstrom gelangt sind (Adam et al. 2007).

Die so genannte Blut-Hirn-Schranke ist aus dem Gefäßendothel hirnversorgender Kapillaren und den sie umhüllenden Zellausläufern von (ZNS-typischen) Astrozyten aufgebaut und entspricht der anatomischen Grenze zwischen dem Systemkreislauf und dem eigentlichen ZNS (Reese und Karnovsky 1967). Hinzu kommen Perizyten, die an der vom Lumen abgewandten Seite des Endothels eingestreut sind. Ihre genaue Funktion ist bisher noch nicht völlig geklärt, es gibt allerdings Hinweise auf ihre Beteiligung bei vielen biochemischen Prozessen, wie der Stabilisierung des Endothels und seiner Permeabilität und dem Metabolismus von Neurotransmittern. Die Astrozyten bilden eine strukturelle, vor allem aber physiologische Barriere, die der Aufrechterhaltung des biochemischen Milieus innerhalb des ZNS über einen selektiven Stoffaustausch dient (Ramsauer et al. 1998). Ein anerkanntes Modell zum Studium der Erregeradhäsion von der Blutseite stellen konfluente Endothelzellkulturen von menschlichen Hirngefäßen dar. Hierfür stehen immortalisierte (durch Einbringen eines Virusgenoms) oder direkt aus einem Tumor gewonnene Zellen zur Verfügung, die unproblematisch zu kultivieren und passagieren sind und als *human brain*

*microvascular endothelial cells* (HBMEC) bezeichnet werden (Stins et al. 1997, Gumbleton und Audus 2001). An diesen Endothelzellen können die zentralen Schritte der Adhäsion und Invasion von pathogenen Organismen, wie Gruppe-B-Streptokokken, und die Entzündungsantwort durch Migration körpereigener Immunzellen ins ZNS, *in vitro* untersucht werden (Tenenbaum et al. 2005, Doran et al. 2005, Maisey et al. 2006). Wichtige Charakteristika der Blut-Hirn-Schranke sollten dabei erhalten bleiben. Zu diesen charakteristischen Merkmalen zählen z.B. der anatomische Aufbau der Blut-Hirn-Schranke aus Endothelzellen und Astrozyten, aber auch der intrazelluläre und interzelluläre Aufbau aus spezifischen Zellproteinen. So kommt an der Blut-Hirn-Schranke, besonders den sogenannten Tight junctions, einer Gruppe von Verbindungsmolekülen zwischen den Gewebszellen, eine Bedeutung zur Regulation des parazellulären Stofftransportes zu. Zusätzlich sind sie am Aufbau eines transepithelialen elektrischen Widerstandes (engl.: transepithelial electrical resistance) beteiligt (Hawkins and Davis 2005). Die *in vivo* gemessenen Widerstände an Hirnendothelien liegen nach Messungen mehrerer Arbeitsgruppen im Bereich mehrerer tausend Ohm (Crone and Olsen 1982, Butt et al. 1990). In vergleichbaren *in vitro* Modellen werden aber meist viel niedrigere Widerstände (wenige hundert Ohm) gemessen (Rubin et al. 1991), sodass jene Modelle (siehe unten) einer Einschränkung bezüglich ihrer externen Validität, also dem Unterschied zwischen physiologischer *in vivo* Funktionalität und *in vitro* Funktion unterliegen.

Neben der Verwendung von Zelllinien, wie den HBMEC, ist auch die Verwendung einer Primärzellkultur möglich. Hierfür werden direkt dem Gehirngewebe entnommene Endothelzellen der untersuchten Spezies verwendet und ohne Immortalisierung kultiviert (Bowman et al. 1983, Bowman et al. 1981, Shi und Audus 1994). In manchen Ansätzen werden neben den Endothelzellen auch kultivierte Astrozyten in einem Kulturwell zusammengebracht (Cecchelli et al. 1999, Bénistant et al. 1995). Entweder werden die Endothelien auf einer Seite des verwendeten Filters kultiviert und auf der anderen Seite die Astrozyten, oder die Astrozyten werden im verwendeten Well und die Endothelien auf dem Filter getrennt kultiviert (**Abb. 1**). Diese Modelle können nicht nur für Fragestellungen aus dem Bereich der Infektiologie, sondern auch in der Arzneimittelforschung zur Untersuchung von Aufnahme und Penetration von Arzneimitteln und chemischen Stoffen in bzw. durch die Blut-Hirn-Schranke benutzt werden.

Die hier vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung der Endothelzellen.



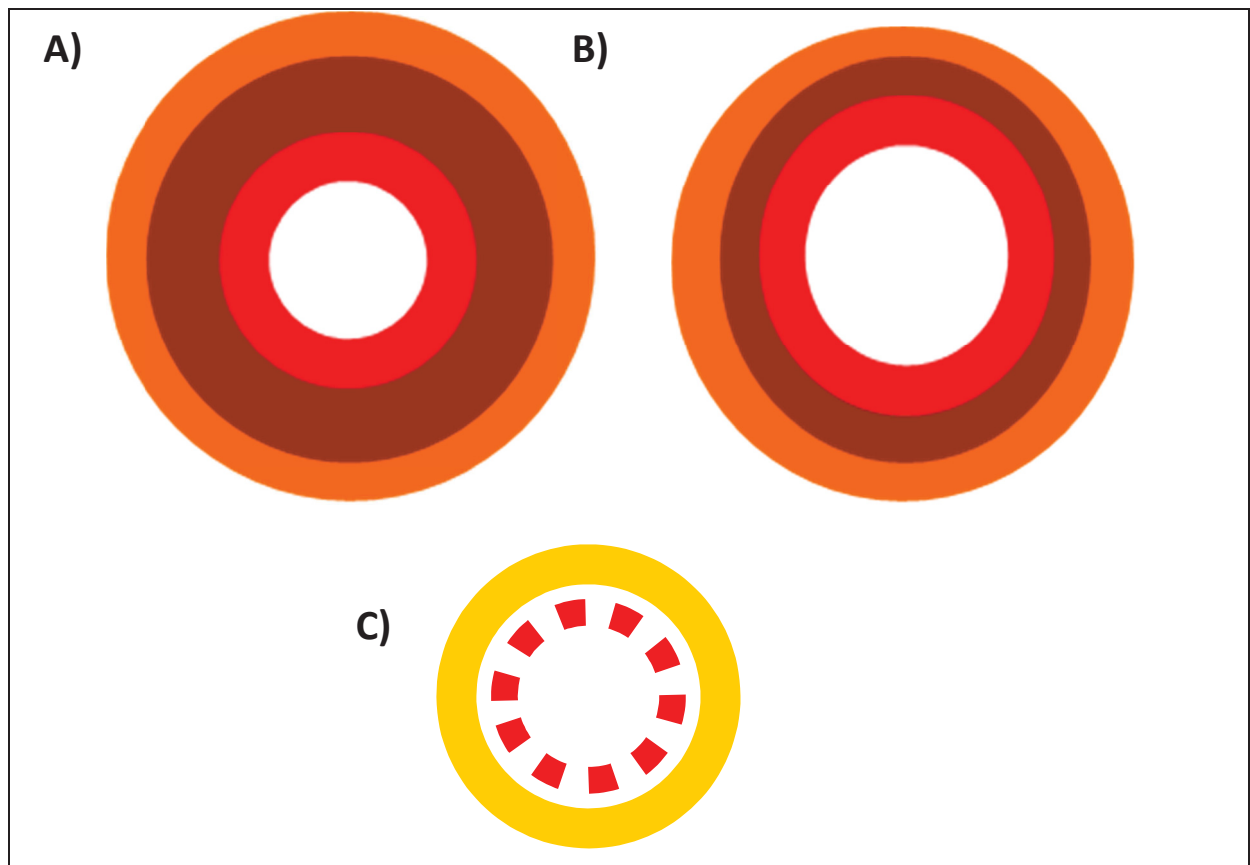
**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Monokultur (A) mit Endothelzellen auf einem permeablen Filter und Nährmedium (nicht eingezeichnet) allein und der Ko-Kultur (B) mit Endothelzellen auf einem permeablen Filter und Astrozyten im unteren Well.

## 1.5 Endothelzellen und der Einfluss von Strömung

Das Lumen aller Blutgefäße im menschlichen Körper wird von einer einschichtigen Zellschicht (Monolayer) aus Endothelzellen ausgekleidet, die auf einer proteinfaserreichen Basalmembran sitzen. Sie und eine variabel ausgebildete *subendotheliale Schicht* aus wenigen Zellen und Bindegewebe bilden die so genannte *Intima* der Gefäße. Daran schließen sich je nach Art und Größe des Gefäßes weitere Zellschichten aus Muskel- und Bindegewebszellen an (**Abb. 2**). Die Muskelschichten sind am stärksten in den großen Gefäßen ausgeprägt und dort stärker in Arterien als in Venen. Diese Muskelzellschicht, auch als *Tunica muscularis* bezeichnet, kann den Gefäßdurchmesser durch Kontraktion oder Relaxation verändern. Damit nimmt sie Einfluss auf die Durchblutung bzw. Durchblutungsgeschwindigkeit der verschiedenen Gewebeabschnitte. In der angrenzenden Gefäßwandschicht, der *Adventitia*, findet sich Bindegewebe, das die äußere Begrenzung des Gefäßes darstellt. An den Grenzen von *Intima* zu *Media* bzw. *Media* zu *Adventitia* kann, je nach Gefäßart und Gefäßgröße eine Lamelle aus elastischen Proteingerüsten liegen. Sie wird als *Membrana elastica interna* bzw. *externa* bezeichnet. Abweichend von diesem Grundaufbau kommen in den Venen der Extremitäten zusätzlich Venenklappen vor. Hierbei handelt es sich um *Intimaduplikaturen*, die durch ihre Ausrichtung wie ein Ventil wirken und den Blutstrom zum Herzen freigeben (Lüllmann-Rauch 2003). Ein Blutstrom zurück in die Extremität wird durch Zuschlagen der Klappen verhindert. Je kleiner die Gefäße werden, desto weniger ausgeprägt sind auch

*Muskularis* und *Adventitia*. In den kleinsten Blutgefäßen, den Kapillaren, mit einem Durchmesser von einigen  $\mu\text{m}$  ist nur noch das Endothel mit seiner Basalmembran erhalten. Neben der Abgrenzung zum Blutkompartiment (Intravasalraum) kommt dem Endothel auch eine bedeutende regulative Rolle bei der Blutgerinnung, dem Stoff- und Flüssigkeitsaustausch und der Migration körpereigener Immunzellen zu, die für die Infektionsabwehr eine entscheidende Rolle spielen. Damit tragen die Endothelien maßgeblich zur Homöostase der versorgenden Gewebe bei. Ist diese physiologische Funktion gestört, resultieren daraus mehr oder weniger bedeutende Zell- und Gewebeschäden. So führen z.B. chemische Entzündungsmediatoren (IL-1, TNF- $\alpha$ ) aus aktivierten Immunzellen oder dem Endothel selbst zu einer Endothelzellantwort aus Permeabilitätssteigerung, Leukozytenmigration und Gerinnungsaktivierung. Auslöser dieser initialen Entzündungsvorgänge können mikrobiologische Erreger (Viren und Bakterien), körpereigene Substanzen (Autoantikörper), entartete oder zerstörte Körperzellen (maligne Tumore, Nekrosen) und Fremdkörper sowie physikalische Prozesse sein.

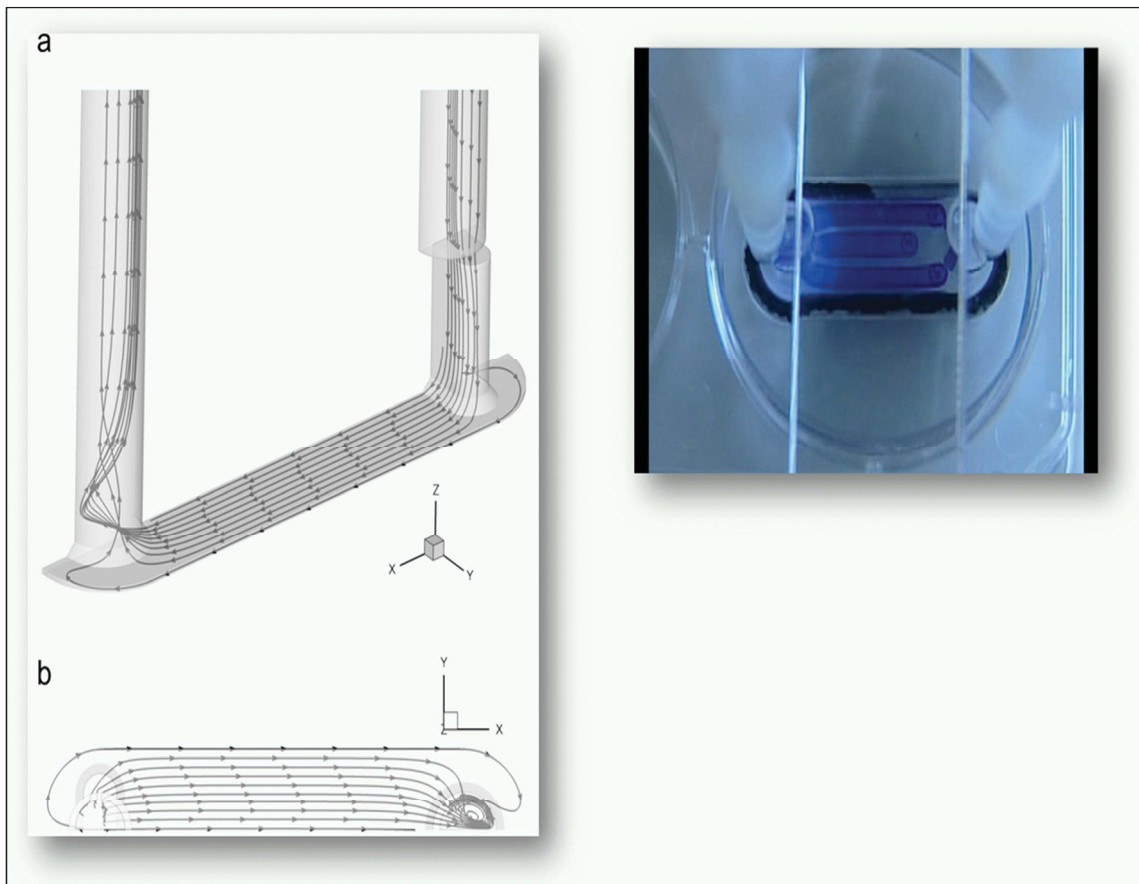
*In vivo* sind die Endothelzellen einem ständigen Blutfluss ausgesetzt. Diese lokalen Bedingungen werden durch physikalische Gesetzmäßigkeiten und Beobachtungen aus dem Bereich der Strömungslehre beschrieben. Die Blutströmung selbst führt zu resultierenden Kräften, die auf Gefäßwände bzw. Endothelzellen, Immunzellen und Bakterien Auswirkungen haben (s. unten). In den meisten Abschnitten des Gefäßsystems tritt eine laminare Strömung des Blutes auf. Die laminare Strömung ist definiert als Bewegung von Flüssigkeiten und Gasen, bei der keine Turbulenzen (Verwirbelungen/Querströmungen) auftreten (**Abb. 3**). Die Flüssigkeit (oder das Gas) strömt in Schichten, die sich nicht vermischen. Im Gegensatz dazu tritt bei turbulenter Strömung eine Verwirbelung der Flüssigkeitsschichten unterschiedlicher Richtungen und Größen auf.



**Abb. 2:** Schematischer Aufbau von Arterie A), Vene B) und Kapillare C) (modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2003): A) Arterienwand mit Adventitia (Orange), Media (Braun) und Endothel. (Rot) B) Venenwand mit deutlich kleinerer Media (Braun) als in der Arterienwand, ansonsten prinzipiell ähnlicher Aufbau. C) Kapillare mit gefenestertem Endothel (Rot) und umgebener Schicht aus Bindegewebe und Perizyten (gelb). (Membrana elastica interna, Membrana elastica externa und Intima hier nicht angedeutet)

Turbulente Strömungen können im Anfangsteil der Aorta während der Austreibungsphase des Blutes aus dem Herzen beobachtet werden. Dort führen die sehr hohen Geschwindigkeiten der Blutströmung zur Ausbildung von Turbulenzen. Zu den Kräften, die unter der laminären Strömung auftreten, zählen der hydrostatische Druck des Blutes selbst (Blutdruck), die Dehnungskräfte auf die Gefäßzellen senkrecht zur Blutströmung und die Scher- oder Schubspannung (*shear stress*) in Strömungsrichtung (Sato und Ohashi 2005).

Physikalisch handelt es sich bei der Schubspannung ( $\tau$ ) um den Quotienten aus der in Flussrichtung wirkenden Kraft (F) und der Fläche (A) der bewegten Flüssigkeitsschicht, also um eine Druckgröße in  $\text{N/m}^2 = 1 \text{ Pascal} = 1 \text{ Pa}$ . Die Schubspannung kann auch in Form der Viskosität ( $\eta$ ) und der Scherrate ( $\gamma$ ) beschrieben werden. Viskosität ist ein Maß für die Zähigkeit einer Flüssigkeit. Sie hängt sowohl von der Stoffeigenschaft als auch von der Temperatur des Fluids ab.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung einer laminären Strömung (a und b) und Foto einer gefärbten Flüssigkeit, die laminar in einer Apparatur fließt (rechtes Bild). (Aus Vogel et al. 2007)

So hat Wasser generell eine niedrigere Viskosität als Paraffinöl, warmes Wasser aber auch eine geringere Viskosität als kaltes Wasser. Je visköser das Fluid ist, desto mehr Kraft muss aufgewendet werden, um zwei Flüssigkeitsschichten gegeneinander zu verschieben.

Die dabei auftretende Verschiebung pro Zeiteinheit ( $dv$  in m/s) im Verhältnis zur Schichtdicke ( $dy$ ) wird als Scherrate bezeichnet (**Abb. 4**).

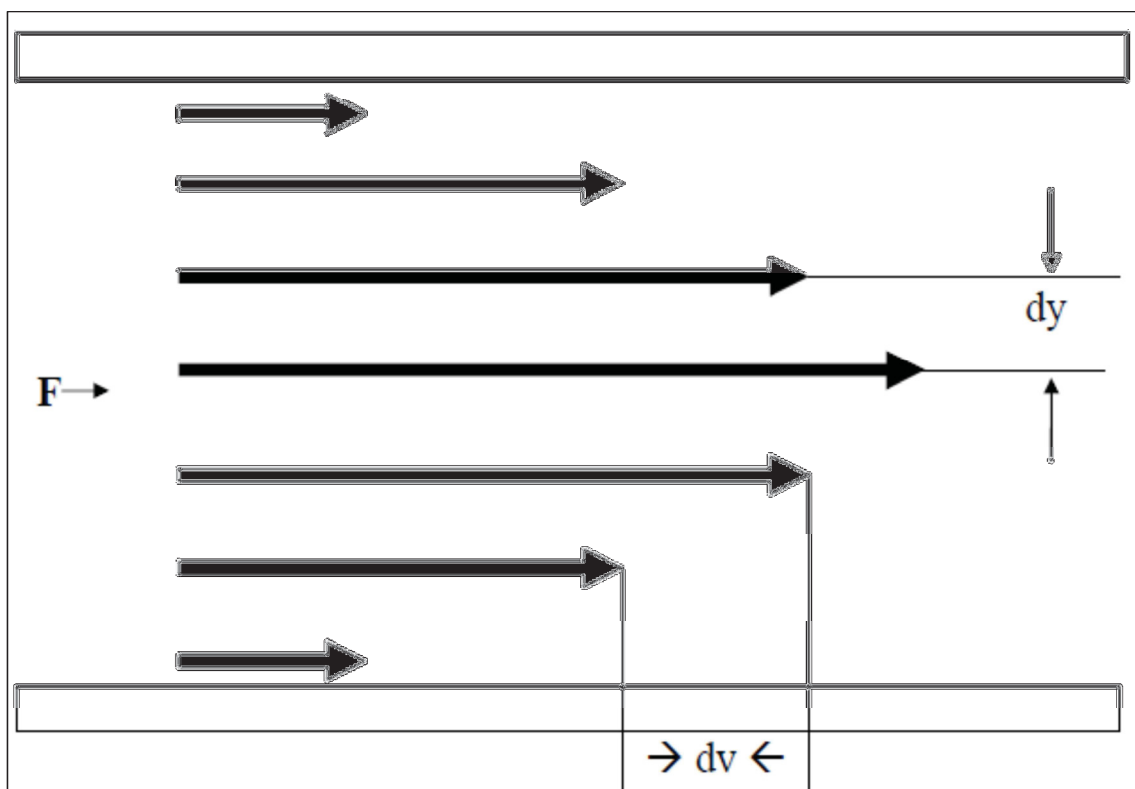
Dabei verhalten sich Schubspannung und Scherrate zueinander proportional. Die Proportionalitätskonstante ist die Viskosität.

$$\tau = F / A \quad [1 \text{ N} / \text{m}^2 = 1 \text{ Pa}] \quad \text{oder}$$

$$\tau = \eta \times \gamma \quad [1 \text{ Pa s} \times \text{s}^{-1}]$$

Mit Hilfe der genannten Größen ist es möglich, die rheologischen Parameter in den Blutgefäßen zu beschreiben. Zu berücksichtigen ist dabei, dass die beschriebenen Zusammenhänge nur für Newtonsche Flüssigkeiten gelten. Bei Newtonschen Flüssigkeiten ist die Viskosität für gegebene physikalische Untersuchungsparameter wie Druck und

Temperatur eine Materialkonstante. Nicht-Newtonsche Flüssigkeiten zeigen dagegen zusätzlich ein zeit- und scherratenabhängiges Verhalten. Blut gehört zu den Nicht-Newtonschen Fluiden, da es bei hoher Scherrate eine geringere Viskosität aufweist, als bei niedriger Scherrate. Der Grund dafür ist die Tatsache, dass Blut eine Suspension aus Plasma und Blutzellen (hauptsächlich Erythrozyten) darstellt. Durch die Fließeigenschaften der Erythrozyten, bedingt durch ihre Verformbarkeit und variable Quervernetzung, wird die Viskosität verändert. So tritt durch eine Verformung der Erythrozyten und eine verringerte Quervernetzung dieser Blutzellen bei steigender Scherrate eine Verringerung der Viskosität auf.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung einer Röhrenströmung: Unter der einwirkenden Kraft ( $F$ ) bildet sich ein Flussprofil der Strömungsschichten aus (dicke Pfeile). Für jede Schicht kann man die relative Verschiebung bzw. Geschwindigkeitsdifferenz ( $dv$ ) und die Schichtdicke ( $dy$ ) bestimmen und so den Schergrad ( $\gamma$ ) bestimmen. (modifiziert nach Klinke und Silbernagel 2005)

Dagegen steigt die Viskosität mit steigendem Hämatokrit des Blutes (Whittaker und Winton 1933). Auch der Gefäßdurchmesser hat Einfluss auf die Viskosität des Blutes, da sich die Erythrozyten in den Kapillaren zur Gefäßmitte hin orientieren und die Viskosität sinkt (Fahraeus und Lindqvist 1931). Im menschlichen Körper treten, je nach Art (arteriell oder venös), Größe (Gefäßdurchmesser) und Lage (verzweigt oder unverzweigt) des untersuchten Gefäßabschnittes, *shear stress* Werte zwischen 0,1 Pa und 6 Pa (entspricht 1 und 60 dyn/cm<sup>2</sup>)

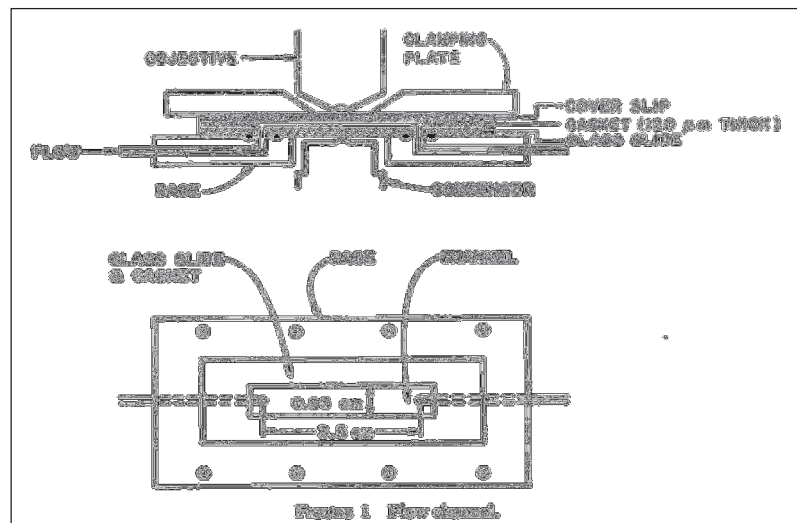
auf. Die Einheit Dyn stammt aus einem heute veralteten Einheitensystem, das die Grundeinheiten Zentimeter, Gramm und Sekunde beinhaltet (kurz auch cgs-System). 1 Pa entspricht 10 dyn/cm<sup>2</sup>. Heute wird das SI- Einheitensystem benutzt. Dort sind die Grundgrößen unter anderem Meter, Kilogramm und Sekunde. Auf die heute verwendete Druckgröße in Pa bezogen ergibt sich eine Schubspannung zwischen 0,1 Pa und 6 Pa in den Blutgefäßen (Malek et al. 1999, Nerem et al. 1998). Die Auswirkungen der Schubspannung auf das Endothel ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Dazu gehören beispielsweise die Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung, Veränderungen im Zytoskelett der Zellen und deren Genexpression von Adhäsionsmolekülen, der Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose sowie Permeabilitätsänderungen der Endothelschicht (Vogel et al. 2007, Fisher et al. 2001).

Ein bestimmter Grad an Schubspannung hat einen gefäßprotektiven Effekt in Hinblick auf die Entstehung von Atherosklerose (Traub und Berg 1998). Demgegenüber treten atherosklerotische Plaques (subendotheliale Vermehrung von Bindegewebe, Lipiden und Muskelzellen) gehäuft an Gefäßverzweigungen auf, die hoher Schubspannung und oft turbulenter Strömung ausgesetzt sind. Verstärkte Schubspannung stimuliert das Endothel zur Expression einer Reihe von Genen, von denen v.a. Adhäsionsmoleküle für Entzündungsgeschehen von Bedeutung sind. So geht die Beaufschlagung des Endothels mit einer erhöhten Schubspannung mit einer gesteigerten Expression von ICAM-1 einher (Mckinney et al. 2006). Dieses Adhäsionsmolekül auf der Endothelzellenoberfläche führt zum Kontakt mit zirkulierenden Leukozyten und letztlich zum Einwandern der Entzündungszellen über das Endothel ins Gewebe. Eine Änderung des physiologischen Stimulus der Blutströmung führt also zu Zellantworten, die zu Funktionsänderungen oder sogar Schädigungen des Gefäßes führen können. Das Endothel reagiert somit nicht nur auf chemische Veränderungen, wie auf proinflammatorische Zytokine während einer Entzündungsreaktion, sondern auch auf Änderungen der Durchblutung oder der Gefäßweite und somit der Schubspannung.

## 1.6 Flusskammern für Strömungsversuche

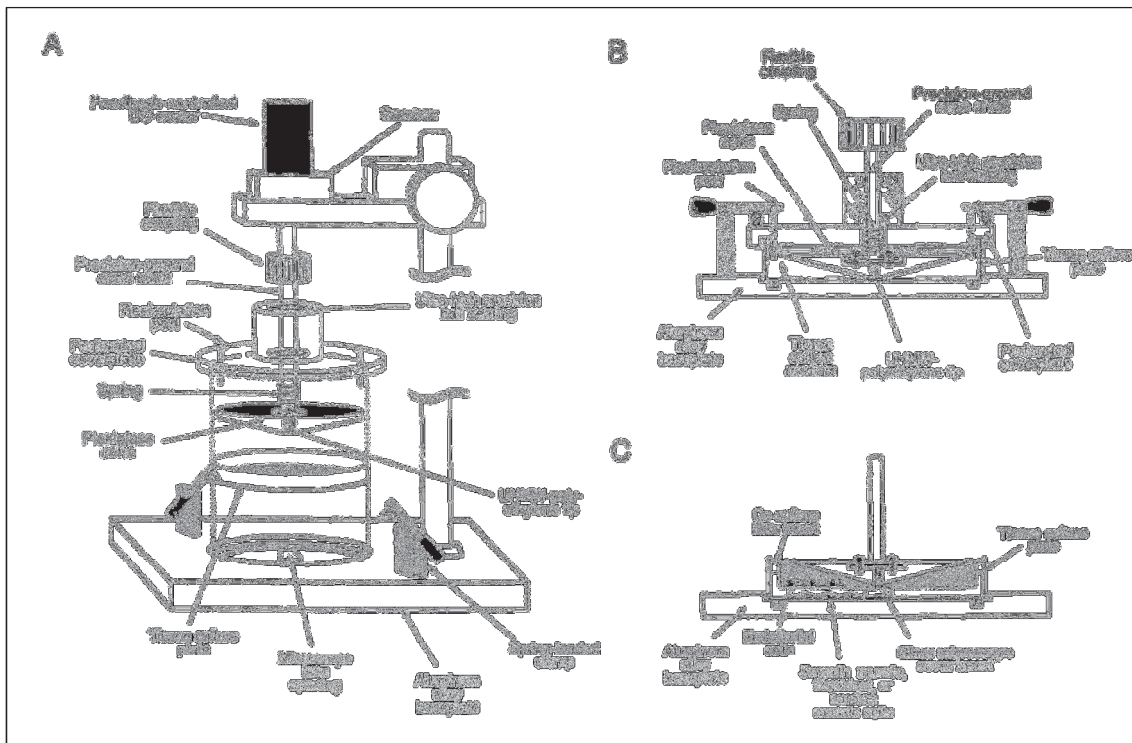
Die Gefäßendothelien sind, wie bereits erwähnt, einem ständigen Blutfluss ausgesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses einer Flüssigkeitsströmung auf *in vitro* kultivierte Zellen sind verschiedene Methoden bzw. Flusskammern entwickelt worden. Die zwei am häufigsten verwendeten Flusskammern sind die *parallel plate flow chamber* und der *cone and plate apparatus*. Bei der *parallel plate flow chamber* (Abb. 5) wird ein mit adhären Zellen

vorbereiteter Glas- oder Kunststoffobjektträger zwischen zwei Platten geklemmt, sodass auf der Zellseite ein definierter Kanal übrig bleibt. Durch zwei Löcher an den Enden des Kanals kann dann Flüssigkeit bzw. Zellkulturmedium ein- und ausgelassen werden (Hochmuth et al. 1973). Durch Anschluss an einen Flüssigkeitskreislauf und eine Pumpe, die die Flüssigkeit zirkulieren lässt, wird so eine Flüssigkeitsströmung bzw. eine Schubspannung auf die Zellen ausgeübt. Die resultierende Schubspannung hängt dabei von der Geometrie des Flusskanals, der Mediumbeschaffenheit (Dichte, Viskosität, Temperatur) und der Fördergeschwindigkeit der Pumpe ab.



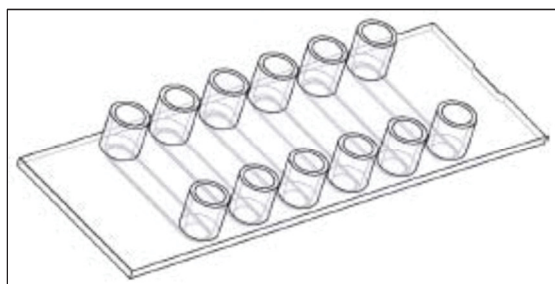
**Abb. 5:** Schema der parallel plate flow chamber (aus Hochmuth et al., 1973).

Der *cone and plate apparatus* (**Abb. 6**) ist ein rotierender Kegel, der über eine Halterung in eine Zellkulturschale eingetaucht werden kann. Über die Rotation des Kegelkopfes wird die Flüssigkeit in der Kulturschale in Bewegung versetzt und erzeugt eine Schubspannung über dem Zellrasen (Malek et al. 1995).



**Abb. 6:** Schema eines cone-and-plate apparatus (aus Malek et al. 1995). (A) Darstellung der gesamten Apparatur. (B) Seitensicht mit Darstellung der Positionierung einzelner Komponenten. (C) Darstellung mit Einbezug einer Zellkultur und möglicher Ko-Kultur.

Eine Abwandlung der *parallel plate flow chamber* sind kleine Röhrenkammern (tubes), die als fertige Flusskammern direkt mit den Zellen beimpft werden. Hier sind die (Glas)objektträger bereits mit einem vorgeschliffenen Flusskanal ausgestattet und weisen einen Ein- und einen Auslasskonus auf (**Abb. 7**). Durch Anschluss eines zirkulierenden Flüssigkeitssystems wird dann eine Schubspannung in dem bewachsenen Röhrchen erzeugt.

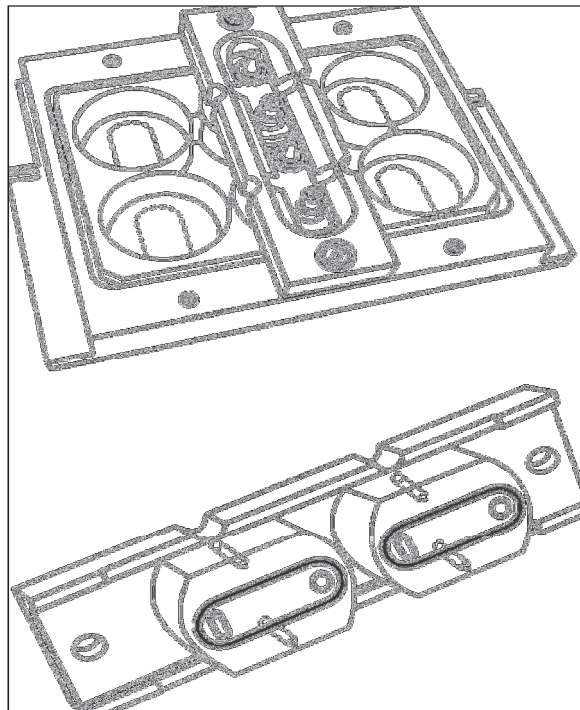


**Abb. 7:** Schema vorgefertigter Flusskammern auf Objektträgern der Firma IBIDI (aus Koelsch et al. 2007).

Die in dieser Arbeit verwendete Flusskammer besteht aus einem Silikoneinsatz, der in ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte eingelegt werden kann. Am Boden des Einsatzes ist ein Flusskanal ausgespart. Zudem sind zwei Kanäle als Ein- und Auslass an den Enden der Kammer eingearbeitet (**Abb. 8**).

Durch Verbindung mit einem pumpengetriebenem Flüssigkeitskreislauf kann hier eine Strömung auf die im Flusskanal liegenden Zellen erzeugt werden. Für die jeweils verwendeten Flusskammern (-systeme) muss vorher aber festgelegt sein, wie das Strömungsprofil aussieht, das heißt welche Art von Strömung auf die Zellen wirkt (laminär oder turbulent) und ob diese gleichmäßig über den Flusskanal verteilt ist oder nicht.

Für die hier verwendete Kammer liegen detaillierte Angaben vor (Vogel et al. 2007). Für die Versuche wird eine laminäre Strömung über (fast) den gesamten Flusskanal erzeugt. Ausnahme hiervon bilden hauptsächlich die Areale, die im Bereich des Ein- und Auslasskanals liegen (**vergleiche Abb. 3**). Im Bereich dazwischen entsteht eine gleichmäßige Schubspannung auf die kultivierten Zellen.



*Abb. 8:* Schematische Darstellung zweier Kammereinsätze mit Metallsteg und Metallrahmen sowie Luer-lock Anschlüssen. Zu sehen ist im unteren Bild die Ansicht von unten auf die Einsätze mit angedeutetem Flusskanal und Ein- bzw. Auslassöffnung (aus Vogel et al. 2007).

## 1.7 Quantifizierung der bakteriellen Adhäsion

Die meisten Erkenntnisse zu den Abläufen und Mechanismen von Adhäsion und Invasion am Endothel wurden an nicht beströmten Zellen gewonnen. Dabei werden sowohl die Bakterien als auch die Endothelzellen ohne Strömungseinfluss im Labor angezüchtet. Nach einer Inkubation der Erreger mit dem Endothellayer kann dann die Zahl der adhärenenten bzw. invadierten Organismen ermittelt werden. Hierzu sind verschiedene Methoden gebräuchlich, wobei grundsätzlich mikroskopisch-bildgebende Verfahren (nach Markierung der Bakterien

mit Antikörpern oder Färbungen) und so genannte Adhäsionsassays benutzt werden können. Letztere Verfahren beinhalten das Waschen des Endothelzelllayers zur Entfernung nicht adhärenter Keime, das Zerstören der Endothelzellen unter Schonung der Bakterien und die Aussaat von Verdünnungsreihen der gewonnenen Bakteriensuspension auf Agarplatten. Nach der anschließenden Inkubation kann die Anzahl der adhärenenten Keime anhand der sichtbaren Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) bestimmt werden (Ogawa et al. 1985). Mit Hilfe dieser Techniken kann das Adhäsionsverhalten praktisch jedes kultivierbaren Erregers untersucht werden. In einem ersten Schritt kann so die Frage beantwortet werden, ob das gewählte Bakterium überhaupt an den Endothelzellen bindet. Die Variation von Erregern, Inkubationszeit, spezifischen Antikörpern, genetisch veränderten Endothel- oder Bakterienzellen sowie Wachstums- oder Entzündungsmediatoren erlaubt es, anschließend detaillierte Fragen zu untersuchen. So können Bakterien mit fehlenden Adhäsionsmolekülen (natürliche Mangelmutante oder genetisch veränderte Erreger) benutzt werden, um die Bedeutung der Adhäsine zu ermitteln. Antikörper gegen diese bakteriellen oder gegen die endothelialen Proteine können zielgerichtet eingesetzt werden, um die Rolle der jeweiligen Oberflächenmoleküle einzeln zu untersuchen. Versuche unter Zugabe von Entzündungsmediatoren können helfen, die Bedeutung dieser chemischen Immunantwort für die bakterielle Adhäsion zu verstehen.

## **1.8 Bakterielle Adhäsion und der Einfluss von Strömung**

Ob und wie Bakterien an menschlichen Endothelzellen, die zuvor einer Flüssigkeitsströmung ausgesetzt waren, adhäreren, ist bislang kaum untersucht worden.

Es gibt aber Hinweise auf einen Einfluss von physikalischen Kräften auf die Adhäsion von Bakterien mit der Wirtszelle. In einem Minireview von Isberg und Barnes wurde die Interaktion von bakteriellen Fimbrien und deren Bindungsregionen (Lectin-Adhäsine) mit den Kohlenhydraten der Wirtszelle betrachtet. Unter Berücksichtigung verschiedener Studien wurde dabei das Phänomen eines unterschiedlichen Bindungsverhaltens der Bakterien (vor allem *E.coli*) bzw. ihrer Adhäsine mit Wirtszellen unter Bedingungen mit unterschiedlicher Schubspannung berichtet. Demnach gibt es Hinweise dafür, dass ein Schwellenwert an Schubspannung manchen Erregern die Interaktion mit der Wirtszelle (z.B. Endothelzelle) ermöglicht und eine Infektion erleichtert (Isberg und Barnes 2002).

Des Weiteren sind Versuche zur scherkraftabhängigen Bakterienadhäsion an unbelebten oder zuckerbeschichteten Oberflächen durchgeführt worden (Busscher und van der Mei 2006).

Wendy E. Thomas und Mitarbeiter (2004) konnten einen Einfluss der Schubspannung auf die

Bindung von *E. coli* an mannosebeschichtete Oberflächen zeigen. Typ-I- Fimbrien des Bakteriums, die mit der Mannose eine spezifische Bindung eingehen und die Adhäsion vermitteln, reagieren auf verschiedene Strömungsraten und resultierender Schubspannung mit einer unterschiedlichen Bindungsstärke. Entgegen früherer Untersuchungen, die zeigten, dass die Rezeptor-Liganden-Bindung vieler Bakterien mit Gewebeoberflächen unter dem Einfluss von Schubspannung verringert wird, konnten Thomas et al. zeigen, dass es auch Bindungen zwischen *E.coli* und mannosebeschichteten Oberflächen gibt, die eine verstärkte Bindung der Bakterien unter steigender Schubspannung erlauben. Letztere Rezeptor-Liganden-Bindung wurde als „catch-bonds“, der sich unter Schubspannung abschwächenden Bindungen „slip-bonds“ gegenüber gestellt. So wird für die „catch-bonds“ eine Änderung der wichtigen Bindungsregionen für Mannose unter dem Einfluss erhöhter Schubspannung angenommen. In weiteren Untersuchungen zeigte Thomas eine Adhäsionserhöhung von *E. coli* an Erythrozyten bei hoher Schubspannung (Thomas et al. 2002). Für *Staphylococcus aureus* (Stamm 8325-4) wurde von Reddy und Ross die Adhäsion der Bakterien an Endothelzellen unter dem Einfluss einer definierten Schubspannung beschrieben. Dabei ließen sie zunächst die Bakterien über das Endothel fließen und stoppten dann die Bestromung für 30 Minuten. Anschließend wurden die Endothelzellmonolayer gewaschen und erneut für 5 Minuten beströmt. Die adhären und zuvor mit Farbstoff markierten Bakterien konnten anschließend mittels eines Fluoreszenzmikroskopes erfasst werden. In einer zweiten Bedingung wurde dann die Adhärenz der Bakterien unter ständiger Bestromung für 10 Minuten durchgeführt. Hier konnten keine adhären Bakterien nachgewiesen werden. Eine Adhäsion unter Bestromung fand also nicht statt oder führte zu keiner festen Bindung der Bakterien an die Endothelzellen, die im Mikroskop zu sehen gewesen wäre (Reddy und Ross 2001).

Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Adhäsion und Schubspannung zeigen auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Mairey, die sich mit der Adhäsion von *Neisseria meningitidis* an der Blut-Hirn-Schranke beschäftigte. Hier wurde eine Verringerung der Bakterienadhäsion an den verwendeten HUVEC mit steigender Schubspannung beobachtet. Am größten war die Bakterienbindung in diesen Untersuchungen bei  $0,04 \text{ dyn/cm}^2$  ( $0,004 \text{ Pa}$ ). Bei Steigerung der Schubspannung verringerte sich die Zahl adhärenter Bakterien bis schließlich bei etwa  $0,7 \text{ dyn/cm}^2$  ( $0,07 \text{ Pa}$ ) keine Adhäsion mehr beobachtet wurde (Mairey et al. 2006).

Für *Streptococcus agalactiae* sind bisher keine Untersuchungen zur Adhäsion oder Invasion unter Strömungsbedingungen, noch zur Bindung an beströmt Endothelzellen beschrieben. Die bisher genannten Untersuchungen zum Einfluss der Schubspannung weisen aber darauf

hin, dass die *in vivo* herrschende Blutströmung bzw. deren Änderung einen Einfluss auf das Infektionsgeschehen durch Bakterien haben kann.

## **1.9 Zielsetzung der Arbeit**

Der Einfluss von Flüssigkeitsströmung auf die Adhäsion von Gruppe-B-Streptokokken an menschlichen Endothelzellen ist bisher nicht untersucht worden.

Frühere Ergebnisse aus Strömungsuntersuchen mit Endothelien und anderen Bakterienspezies (*E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*) lassen aber vermuten, dass die Adhäsion von Bakterien an Wirtszellen und künstlichen Oberflächen durch Strömung bzw. Schubspannung beeinflussbar ist. Lione und Mitarbeiter konnten in einer Untersuchung zeigen, dass der Gruppe-B-Streptokokken-Typ III mit dem Adhäsionsprotein ICAM-1 von Endothelzellextrakten interagiert bzw. eine Bindung eingeht (Lione et al. 2005). Da ICAM-1 auch vermehrt auf beströmtem Endothel exprimiert wird, ergibt sich die Hypothese, dass die Kombination aus beströmtem Endothel und Bakterienadhäsionsassay neue Ergebnisse zur Adhäsion von Streptokokken liefern kann.

Diese Arbeit soll daher den Einfluss einer Flüssigkeitsströmung auf menschliche Endothelzellen (HUVEC und HBMEC) und auf die anschließende Adhäsion von Gruppe B-Streptokokken an diesen Zellen untersuchen. Dazu werden Adhäsionsassays mit zwei Gruppe-B-Streptokokken-Serotypen an HUVEC und HBMEC durchgeführt, die zuvor einer konstanten Schubspannung ausgesetzt bzw. gänzlich ohne Strömungsstimulus oder mit TNF- $\alpha$ , einem Zytokin mit belegtem Einfluss auf die Expression von ICAM-1 (Pober 1987), kultiviert wurden. Die Strömungsversuche werden mit einer Flusskammer durchgeführt, die ein laminares Strömungsprofil über einen definierten Zellrasen appliziert.

Zusätzlich soll die ICAM-1 Expression auf HBMEC und HUVEC nach Applikation einer definierten Schubspannung oder einer TNF- $\alpha$  Stimulation quantifiziert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinien**

HUVEC      *human umbilical vein endothelial cells*

Die humanen Zellen wurden bei der Firma PromoCell GmbH (69126 Heidelberg, Deutschland) unter der Produktbeschreibung: HUVEC-c, (Katalognummer C-12200) bestellt. Für die beschriebenen Versuche wurden die Zellen in Passage 3 und 4 verwendet.

HBMEC      *human brain microvascular endothelial cells*

Die humanen Zellen entstammen einer Zelllinie, die aus Hirnbiopsien von 4 bis 7-jährigen Kindern gewonnen wurde (*Stins et al., 1997*). Unserem Labor wurden die Zellen freundlicherweise von Prof. Dr. K.S. Kim (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt. Für die beschriebenen Versuche wurden die Zellen in Passage 22-30 verwendet.

#### **2.1.2 Medien und Zusätze**

|                                     |                                        |
|-------------------------------------|----------------------------------------|
| Accutase / Alphasym                 | PAA Laboratories GmbH, Cölbe           |
| BSA (bovin serum albumin)           | Sigma Chemical CO., USA                |
| Cryo-SFM (serum free medium)        | PromoCell GmbH, Heidelberg             |
| Dimethyl Sulfoxid (DMSO)            | Sigma-Aldrich, Steinheim               |
| Endothelial Cell Basal Medium       | PromoCell GmbH, Heidelberg             |
| Endothelial Cell Basal Medium (prf) | PromoCell GmbH, Heidelberg             |
| FCS (fetal calf serum)              | Biochrom AG, Berlin                    |
| Gelatine                            | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| L-Glutamin 2 mM                     | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| MEM-Vitamine (100X)                 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| MEM-non essential-amino-acids       | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| MEM Natrium-Pyruvat 100mM           | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| NU-Serum                            | BD, Heidelberg                         |
| RPMI 1640 Grundmedium               | Biochrom AG, Berlin                    |
| RPMI 1640 Grundmedium (prf)         | Biochrom AG, Berlin                    |

|                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| SupplementPack             | PromoCell GmbH, Heidelberg |
| - ECGS/H-2 ml (0,4%)       |                            |
| - FCS-10 ml (2%)           |                            |
| - hGEF-0.05 µg / 0,5 ml    |                            |
| - hbFGF-0.5 µg / 0,5 ml    |                            |
| - HC-500 µg / 0,5 ml       |                            |
| Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) | Biochrom AG, Berlin        |

#### HUVEC-Medium

|                                    |                            |
|------------------------------------|----------------------------|
| Endothelial Cell Growth Medium Kit | PromoCell GmbH, Heidelberg |
| Endothelial Cell Basal Medium      |                            |
| SupplementPack                     |                            |
| - FCS-10                           |                            |
| - ECGS/H-2                         |                            |
| - hGEF-0.05                        |                            |
| - hbFGF-0.5                        |                            |
| - HC-500                           |                            |

|          |                            |
|----------|----------------------------|
| Cryo-SFM | PromoCell GmbH, Heidelberg |
|----------|----------------------------|

#### HBMEC-Medium

|                 |                                 |
|-----------------|---------------------------------|
| RPMI 1640       | RPMI 1640 Grundmedium           |
|                 | 10% FCS                         |
|                 | 10% NU-Serum                    |
|                 | 2 mM L-Glutamin                 |
|                 | Penicillin/Streptomycin 100U/ml |
|                 | 1% MEM Vitamine (100X)          |
|                 | 1% MEM Aminosäueren (100X)      |
|                 | 1 mM Na-Pyruvat                 |
| Cryoreservation | FCS                             |
|                 | 10% DMSO                        |

## **2.2 Bakterien**

### **2.2.1 Bakterienstämme**

#### **B-Streptokokken**

GBS 6313

Serotyp III, hier mit G1 bezeichnet,  
Wildtyp.

Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. Barbara  
Spellerberg

Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene,  
Universitätsklinikum Ulm

GBS 090R

Serotyp Ia, hier mit G5 bezeichnet,  
Wildtyp.

Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr.  
Barbara Spellerberg

Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene,  
Universitätsklinikum Ulm

GBS 90356

Serotyp III, hier mit R1 bezeichnet,  
Wildtyp.

Zur Verfügung gestellt von Viviane O.F.  
Lione, Departamento de Biologia Celular e  
Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara  
Gomes, Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Brazil

### **2.2.2 Bakterienmedien**

#### Einfriermedium

Glycerol

Sigma-Aldrich, Steinheim

#### Wachstumsmedien

Todd-Hewitt Broth

Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

Columbia Agar (Schafsblut)

Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

## 2.3 Puffer und Waschlösungen

|                                                            |                             |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| PBS-Puffer pH 7,3                                          | Serag-Wiessner GmbH, Naila  |
| Hank's Balanced Salt Solution HBSS (+Ca,+Mg)<br>(= HBSS++) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe  |
| Aqua dest                                                  | DeltaSelectt GmbH, Dreieich |

## 2.4 Chemikalien und Antikörper

|                                                |                                                      |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Calcein AM                                     | Molecular probes (Invitrogen), Eugene<br>Oregon, USA |
| DAPI                                           | Calbiochem, Darmstadt                                |
| Ethidium homodimer-1                           | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                           |
| Formaldehyd 4%                                 | Fischer GmbH & CO KG, Saarbrücken                    |
| Prolong Gold (Antifade reagent)                | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                           |
| ICAM-Antikörper<br>(PE Mouse Anti-human CD-54) | BD Bioscience, Heidelberg                            |
| Triton (X-100)                                 | Sigma-Aldrich, Steinheim                             |
| TNF- $\alpha$ (human)                          | R&D Systems, Minneapolis, USA                        |

## 2.5 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

|                                      |                                        |
|--------------------------------------|----------------------------------------|
| Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup> | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup> | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| 6-well multidish (unbeschichtet)     | Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc.    |
| 12-well multidish (unbeschichtet)    | Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc.    |
| Brutschrank Kendro                   | Thermo Fisher Scientific Inc.          |
| Zentrifuge Rotanda 460 RS            | Hettich-Zentrifugen, Mühlheim          |
| Photometer UV-mini 1240              | Schimadzu Deutschland GmbH, Duisburg   |
| Wasserbad                            | Köttermann, Uetze/Hänigsen             |
| Deckgläschen (rund, 18mm, Nr.1)      | Marienfeld GmbH, Lauda-<br>Königshofen |
| Mikroskop                            | Zeiss GmbH, Jena                       |
| Infusionsbeutel 250 ml („EVA“)       | Neo Care, Lüdenscheid                  |
| Infusomat®- Leitung (mit Dorn)       | B. Braun Melsungen AG, Melsungen       |
| Dämpfersystem                        | B. Braun Melsungen AG, Melsungen       |
| Perfusor®-Leitung (30 cm)            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen       |

|                                              |                                                                     |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Perfusor®-Leitung (150 cm)                   | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Combidyn®-Adapter (luer lock w/w)            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Combifix®-Adapter (luer lock m/m)            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Omnifix®-F (1ml Spritze)                     | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Sterican® (Kanüle für Spritze, gelb)         | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Perfusor®compact (Perfusor für 50ml Spritze) | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Infusomat®fm (Pumpe Typ: 871942/0)           | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Perfusor®-Spritze (50 ml, mit luer lock)     | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                                    |
| Mikroskop CK 40-F200                         | <i>Olympus</i> Optical Company Ltd, Tokyo                           |
| FACS Calibur                                 | BD Bioscience, Heidelberg                                           |
| FACS –Röhrchen                               | Sarstedt, Nümbrecht                                                 |
| Strömungskammern (offen)                     | Aus Polyethylen, transparent                                        |
| Strömungskammern (geschlossen)               | Aus Polyethylen, transparent                                        |
| Axiovision Release 4.8.3                     | Bildverarbeitungssoftware der Firma<br>Carl Zeiss MicroImaging GmbH |

## **2.6 Zellkultur**

### **2.6. 1 HUVEC – Kultivierung**

#### **2.6.1.1 Anzucht**

Die HUVEC wurden in flüssigem Stickstoff bei -200° Celsius (73° K) gelagert. Im Wasserbad wurden alle Flüssigmedien (HBSS, Gelatine, Promocell-Kulturmedium inklusive Zusätze) auf 37°C erwärmt. Vor dem Auftauen der Zellen wurde eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 7 ml Gelatine (1%) benetzt. Nach 5 Minuten wurde die Gelatine abpipettiert und nach weiteren 5 Minuten die Kulturflasche mit 15 ml HBSS gewaschen.

Anschließend erfolgte das rasche Auftauen der Zellen aus dem Stickstoff im Wasserbad und die Zugabe von 15 ml Kulturmedium in die Kulturflasche. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub>.

Nach einem Tag wurde das Kulturmedium gewechselt. Danach erfolgte das regelmäßige Wechseln des Mediums alle 2-3 Tage unter mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums.

#### **2.6.1.2 Passagieren adhärenter Zellen**

Bei 90% Konfluenz des Zellmonolayers erfolgte die Passage in eine neue Kulturflasche oder, je nach Versuchsaufbau, in 6- bzw. 12- Well Platten. Dazu wurden die benötigten Medien, mit

Ausnahme des Trypsins, das nur auf Raumtemperatur (ca. 20°C) gebracht wurde, im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Vor der Passage erfolgte die Beschichtung der Kulturflaschen oder Wells mit Gelatine wie in 2.6.1.1 beschrieben. Danach wurde das Kulturmedium entfernt und die Flasche einmal mit 15 ml HBSS(++) gewaschen, um möglichst viele Proteinreste zu entfernen. Dann wurden 7 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) in die Kulturflasche gegeben und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Die abgelösten Zellen wurden, zum Stoppen der Trypsinreaktion und Binden des EDTA, in 5 ml Kulturmedium gegeben und anschließend bei 22°C und 300 g (1180 Umdrehungen/min.) für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellkonzentration in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Dichte von 5.000-10.000/cm<sup>2</sup> in die neuen Kulturflaschen oder Wells gegeben und im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden in Passage 2-4 für die Versuche verwendet.

### **2.6.1.3 Kryokonservierung von HUVECs**

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 95% erreicht hatten, wurden sie mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Dann wurden sie in (10 ml) kaltes (4°C) Kulturmedium gegeben und mit 300 g (1180 Umdrehungen/min.) bei 22°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kalter Cryo-SFM Lösung resuspendiert und anschließend zu je 1 ml in kühlen Kryoröhrchen bei -20°C für 2 Stunden eingefroren. Danach wurden sie für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Für längere Aufbewahrung wurden die Zellen dann in flüssigem Stickstoff bei -200°C eingefroren.

## **2.6.2 HBMEC – Kultivierung**

### **2.6.2.1 Anzucht**

Die HBMEC Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -200°C (73° K) gelagert. Vor dem Auftauen der Zellen wurden alle benötigten Medien im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Dann wurden die Zellen rasch im Wasserbad aufgetaut und in 15 ml Kulturmedium (RPMI) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche gegeben und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt. Danach erfolgte der Wechsel des Mediums alle 2-3 Tage unter mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums.

### **2.6.2.2 Passagieren adhärenter Zellen**

Sobald die HBMEC 90% Konfluenz erreicht hatten, erfolgte die Passage in neue Kulturflaschen oder in 6- bzw. 12-Well-Platten (für die entsprechenden Versuche). Dazu wurden alle benötigten Medien zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach mikroskopischer Kontrolle des Monolayers wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen einmal mit HBSS(++) gewaschen, um zurückgebliebene Proteinreste zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit 7 ml Trypsin/EDTA für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in 12 ml Kulturmedium aufgenommen und mit 300 g bei 22°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Es erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels Neubauer Zählkammer und die Verdünnung auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml. Dann wurden die Zellen auf die neuen Kulturflaschen bzw. 6-Well-Platten verteilt. Die Zellen, die für einen Versuch benutzt wurden, stammten aus derselben Passage. Es wurden HBMEC in Passage 22-30 verwendet.

### **2.6.2.3 Kryokonservierung von HBMEC**

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 95% erreicht hatten, wurden sie mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Dann wurden sie in (10 ml) kaltes (4°C) Kulturmedium gegeben und mit 300 g (1180 Umdrehungen/min.) bei 22°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde das Zellpellet mit kaltem Kulturmedium, das 10% DMSO enthielt, resuspendiert und zu je 1 ml in Kryoröhrchen gegeben. Danach erfolgte das Einfrieren auf -20°C für 2 Stunden und anschließend eine 24 Stunden Lagerung bei -80°C. Für eine längere Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -200°C gelagert.

## **2.7 Ermittlung der Zelldichte mittels DAPI-Färbung**

Zur Bestimmung der tatsächlichen Zelldichte der Endothelzellmonolayer wurden HUVEC und HBMEC in 12-Well-Platten bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die Zellen zeichnen sich mikroskopisch in der Zellkultur bei Konfluenz durch ein pflastersteinähnliches Aussehen im Mikroskop aus. Nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen mit HBSS wurde für 15 Minuten in jedes Well 1 ml Formaldehyd (4%) gegeben. Anschließend wurde das Formaldehyd entfernt und die Wells dreimal mit HBSS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Triton (X-100) pro Well wurden die Zellmembranen destabilisiert und permeabilisiert. Nach 30 Minuten wurde das Triton entfernt. Anschließend wurden je 2 ml

DAPI, ein Fluoreszenzfarbstoffes, der die Zell-DNA anfärbt und bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert, in die Wells gegeben und 5 Minuten auf den Zellen belassen. Es folgten drei Waschschrte mit HBSS, um das DAPI zu entfernen. Nach Zugabe von 1 bis 2 Tropfen einer Fixationslösung (Prolong Gold) wurden die Wells mit einem kreisrunden Deckgläschen versehen. Die Fixationslösung verlangsamt das Ausbleichen des Farbstoffes, sodass eine mikroskopische Betrachtung für längere Zeit (Tage) möglich ist. Unter dem Mikroskop konnten dann, nach Anregung des Farbstoffes mit ultraviolettem Licht und speziellen Farbfiltern, die Zellkerne der einzelnen Zellen gut abgegrenzt und gezählt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Fläche wurden 10 Gesichtsfelder pro Well und je zwei Wells (entspricht 20 Gesichtsfeldern) der jeweiligen Endothelzellart betrachtet. Bei bekannter Größe des Gesichtsfeldausschnittes und Bildung des Mittelwertes der gezählten Zellkerne, konnte die mittlere Zellzahl/cm<sup>2</sup> ermittelt werden.

## **2.8 Bakterienkultur**

### **2.8.1 Bakterienanzucht**

Für die entsprechenden Adhäsionsversuche wurden die kryokonservierten Bakterienstämme aufgetaut und mit Nährmedium inkubiert. Dazu wurden die verwendeten Bakterienröhrchen aus dem Gefrierschrank genommen und für wenige Sekunden im Wasserbad bei 37°C oder wenige Minuten bei Raumtemperatur erwärmt. Die Bakteriensuspension wurde dann in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml THB-Flüssignährmedium gegeben und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Inkubation dient der Vermehrung bzw. Expansion der Bakterien auf höhere Konzentrationen. Die Dauer der Inkubation wurde so gewählt, dass sich die Bakterienkolonie sicher in der log-Phase des Bakterienwachstums befindet, es also in der Kultur noch zu einer exponentiellen Teilungsrate kommt.

### **2.8.2 Ermittlung von Wachstumskurven für B-Streptokokken**

Die verwendeten Bakterienstämme wurden nach dem Auftauen (wie unter 2.8.1 beschrieben) in THB-Flüssignährmedien bei 37°C kultiviert. Um die optimale Wachstumsphase zu ermitteln, wurden stündlich Proben der Bakteriensuspension im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und die entsprechenden Messwerte notiert. Anschließend wurde diese Probe schrittweise verdünnt und dann auf Agarplatten kultiviert, um die zugehörige Bakterienkonzentration zur entsprechend gemessenen Extinktion zu erhalten. Dazu wurde zu Beginn in eine Photometer-Küvette das THB-Medium (1 ml) zur Leerwertbestimmung gemessen. Nach einer Stunde erfolgte dann die Messung des THB-

Mediums mit Bakteriensuspension. Die gemessene Extinktion wurde notiert und die Bakteriensuspension nach schrittweiser Verdünnung, von  $10^{-1}$  auf  $10^{-4}$  der Ausgangskonzentration auf Blutagar ausplattiert. Dafür wurde eine dünne Metallöse in die Bakteriensuspension getaucht und die so befeuchtete Öse dann in vorsichtigen, gleichmäßigen Bewegungen über die Agarplatte geführt.

Analog wurde zu jeder weiteren Stunde mit der inkubierten Bakteriensuspension verfahren. Allerdings wurde die Verdünnung der Bakteriensuspension aufgrund der durch Bakterienvermehrung nun angestiegenen Konzentration erweitert, ab der dritten Stunde bis  $10^{-6}$ , ab der 4. Stunde bis auf  $10^{-7}$ . Nach Auszählen der sichtbaren Bakterienkolonien auf den Agarplatten und Zuordnung zu der gemessenen Extinktion konnten die Wachstumsphasen des jeweiligen Bakterienstammes in einem Diagramm dargestellt werden. Anhand dieser Diagramme, aufgeführt im Ergebnisteil unter 3.1, wurde die Zeit ermittelt, nach der sich die Bakteriensuspension in der log-Phase befindet. Für die Versuche wurden die Bakterien stets bis zu dieser Wachstumsphase inkubiert.

### **2.8.3 Bakterienvorbereitung für Adhäsionsversuche**

Für die Adhäsionsversuche an Endothelzellen wurden die Bakterienstämme am Versuchstag bis zur log-Phase ihres Wachstums inkubiert. Dann wurde die Bakteriensuspension bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 3500U/min für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend mit 10 ml HBSS (++) bei  $4^{\circ}\text{C}$  (Eiswasser) resuspendiert. Nach Wiederholung der Zentrifugation wurde der Bakterienüberstand entfernt. Im Photometer wurden 2 ml Zellkulturmedium (prf) der entsprechenden Endothelzellart ohne Bakterien als Nullwert eingestellt. Danach wurden solange kleine Mengen der Bakterien zu der Photometerküvette gegeben, bis eine Extinktion von 650 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD600) eingestellt war. Bei dieser Extinktion beträgt die Bakterienkonzentration in der Küvette etwa  $10^8$  Keime/ml.

Für die Adhäsionsversuche wurde diese Bakteriensuspension dann weiter zur gewünschten Konzentration verdünnt, je nach benötigter Inokulationsmenge bzw. MOI (multiplicity of infection = Anzahl der infektiösen Erreger pro Wirtszelle).

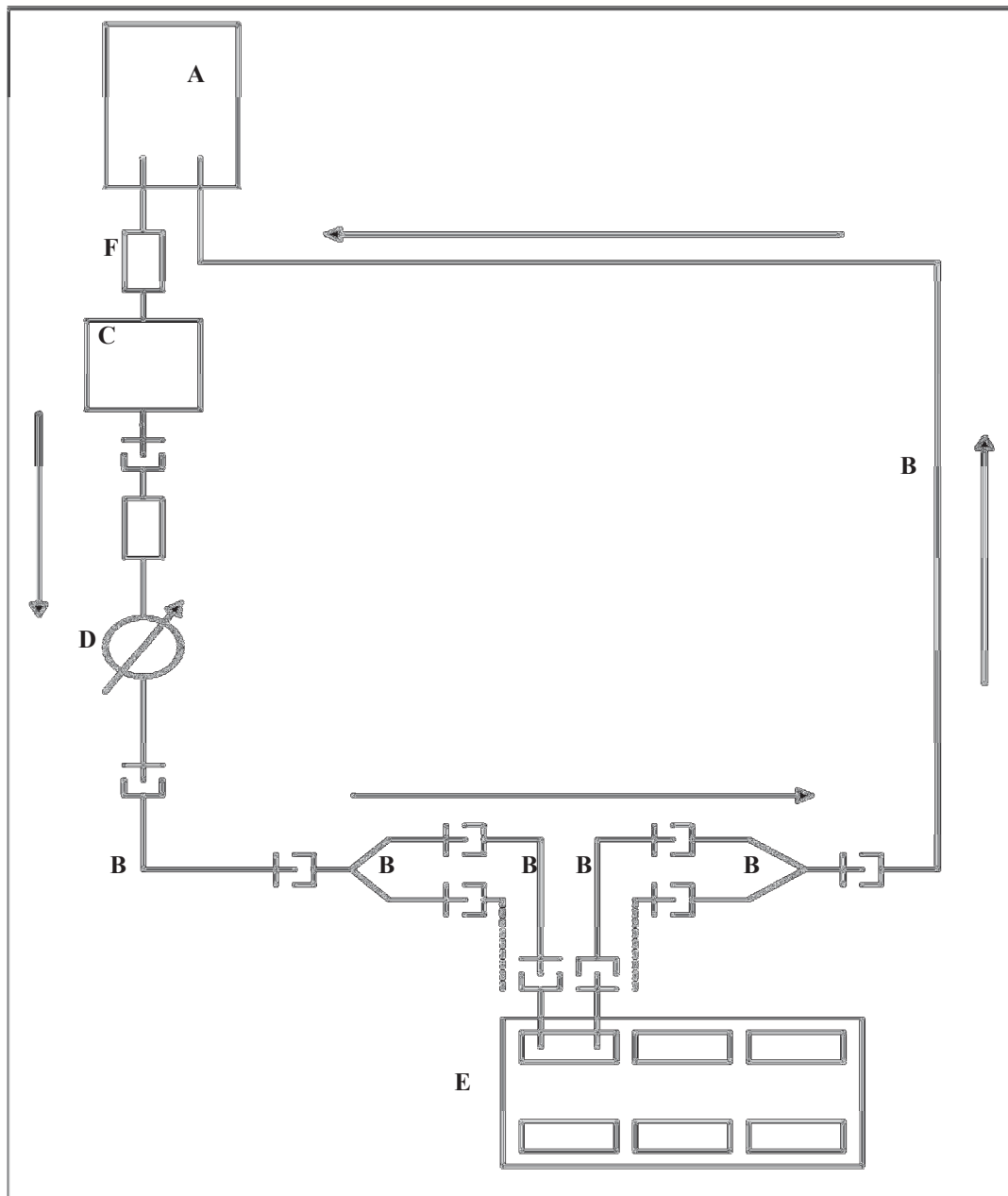
Die Bakteriensuspension wurde auf Eis gelagert bis der Adhäsionsversuch an den Endothelzellen begann.

## **2.9 Flow-System**

Um auf die kultivierten Endothelzellen eine definierte laminare Strömung, und damit eine definierte Schubspannung wirken zu lassen, wurde eine Flusskammer benutzt, die von Vogel

et al. entwickelt und im Detail beschrieben wurde (Vogel et al. 2007). Diese Kammer bildet mit ihrer Unterseite im 6-Well einen Flusskanal aus, der an seinen Enden mit einem Einfluss- bzw. Ausflusskanal verbunden ist. Über Luer-Anschlüsse können diese Kanäle mit einem Schlauchsystem verbunden werden, das über eine Pumpe das gewünschte Medium durch die Flusskammer treibt. Das gesamte Flow-System ist in **Abb. 9** schematisch dargestellt. In **Abb. 8** (siehe Einleitung) sind das verwendete 6-well mit Metallrahmen zur Fixierung und die Kammereinsätze im Schema festgehalten.

Für die Versuche wurden am Vortag die benötigten Einzelteile des Flow-Systems, ohne Einschaltung der Well-Platte mit Flusskammer montiert und der Infusionsbeutel mit 50 ml Kulturmedium gefüllt. Dann wurde die Pumpe für einige Minuten gestartet, um den Kreislauf zu entlüften und mit dem Medium zu füllen. Das gesamte Flow-System, mit Ausnahme der Pumpe, wurde anschließend bis zum Versuchstag etwa 24h zur CO<sub>2</sub>-Äquilibration im Brutschrank gelagert. Am Versuchstag wurden die 6-Well-Platten mit den kultivierten Endothelzellen einer Passagereihe in einen Metallrahmen fixiert und die Flusskammern auf den Zellrasen gedrückt. Ein Metallsteg mit Bohrungen für eine Verschraubung mit dem Metallrahmen wurde zur Stabilisierung der Kammern verschraubt. Zum Konnektieren der Kammern mit dem Kreislauf wurden Luer-Adapter aus rostfreiem Edelstahl in die Einlass- und Auslassöffnungen gesteckt und mit den Schlauchleitungen verbunden. Zwei Flusskammern wurden dabei über eine kurze Perfusorleitung miteinander verbunden und somit in Reihe geschaltet. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luft im System befindet. Das übrige Medium im Well außerhalb der Kammer wurde entfernt und die Pumpe gestartet.



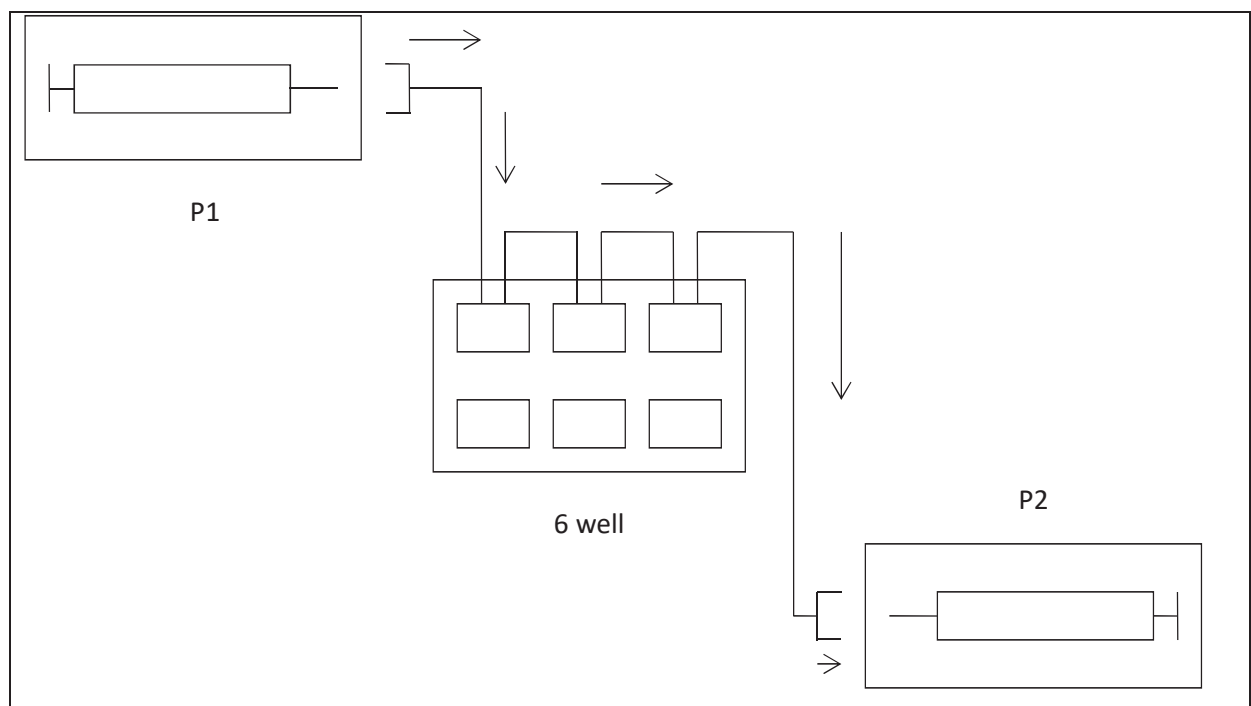
**Abb. 9:** Skizze des Strömungsversuches mit Rollerpumpe

|   |                                 |  |                        |
|---|---------------------------------|--|------------------------|
| A | Infusionsbeutel mit Medium      |  | Luer Lock („weiblich“) |
| B | Infusionsleitung                |  |                        |
| C | Rollerpumpe                     |  |                        |
| D | Dämpfer                         |  |                        |
| E | Well-Platte mit Kammereinsätzen |  |                        |
| F | Einstichdorn mit Tropfkammer    |  |                        |
|   |                                 |  | Luer Lock („männlich“) |

Konnte kein fehlerhafter Austritt von Medium beobachtet werden, wurde das gesamte Flow-System (Pumpe, Infusionsbeutel mit Schlauchsystem und konnektierte 6-Well-Platten) für 4h im Brutschrank inkubiert. Die Pumpeneinstellung betrug für die Rollerpumpe 400 ml/h, was bei 37°C und einer Viskosität von  $7.860 \times 10^{-4} \text{ Ns/m}^2$  etwa einer Schubspannung von 1 Pa entspricht.

Für langsamere Flussgeschwindigkeiten von 0,01 Pa (etwa 5 ml/h) wurde eine Pumpe mit

Spindelantrieb verwendet, um einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom zu erzielen. Dafür wurde ein modifizierter Aufbau des Flow-Systems benutzt (**Abb. 10**). Hier wurde der Infusionsbeutel durch zwei Perfusorspritzen ersetzt. Eine wurde mit 30 ml Medium gefüllt und über eine lange Infusionsleitung und die Schlauchverzweigungen an die kurzen Leitungen und die Flusskammern angeschlossen. Dieser Aufbau wurde am Kammerauslass wiederholt und am Ende der langen Leitung eine leere Perfusorspritze angeschlossen, die das nicht-zirkulierende Medium auffängt. Nach Einsatz der Fluskammern in die Wells und Anschluss der Pumpen und Leitungen wurde auch hier das gesamte System für die Dauer der Beströmung (4h) in einem Brutschrank platziert.



**Abb. 10:** Skizze des Strömungsversuches mit Spindelpumpe (Perfusor®. P1) Perfusor mit Perfusorspritze (50 ml) und Zellmedium. P2) Perfusorspritze (50 ml) allein als Auffangreservoir. Dazwischen 6-Well

## 2.10 Adhäsionsassay

### 2.10.1 Adhäsionsversuche an beströmten Endothelzellen

Nach 4 Stunden wurden die 6-Well-Platten aus dem Brutschrank entnommen und die Flusskammern entfernt.

Nach vorsichtigem Waschen der Wells mit HBSS (++) wurden in alle Wells neue, offene Kammereinsätze platziert und mittels Metallsteg fixiert, ohne dabei den Endothelzellrasen zu beschädigen.

Durch die durchgehend offenen Kammereinsätze wurde das HBSS-Medium aus den Wells

entfernt und je 0,4 ml Bakteriensuspension zugegeben. Für die HBMEC-Versuche wurden Konzentrationen von  $5 \times 10^6$  Bakterien/ml, für die HUVEC-Versuche Konzentrationen von  $2 \times 10^6$  Bakterien/ml benutzt. Beide Konzentrationen entsprechen einer MOI von 10, entsprechend der unterschiedlichen Zelldichte der beiden Endothelzellarten. Die Wells wurden dann mit sterilen medizinischen Kompressen abgedeckt im Brutschrank für 1 Stunde inkubiert. Zusätzlich erfolgte die separate Inkubation von je zwei Proben zu 0,4 ml der zur Adhäsion eingesetzten Bakteriensuspension als Kontrolle des Bakterienwachstums nach 1 Stunde. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells 4 bis 5 mal vorsichtig mit HBSS (++) gewaschen, um alle nicht adhärenen Bakterien von den Endothelzellen zu entfernen. Nach Zugabe von 0,4 ml Aqua dest. für 20 Minuten erfolgte die Ablösung des Zellrasens durch kräftiges Spülen der Lösung im Well. Die gelösten Zellen wurden dann in 1 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und schrittweise bis auf  $10^{-5}$  verdünnt. Die Kontrollbakteriensuspensionen wurden bis auf  $10^{-6}$  verdünnt. Die verdünnten Adhäsionsproben wurden in vier Schritten zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-2}$  auf Blutagarplatten zu je 10 µl ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Analog wurden die Kontrollbakteriensuspensionen in Stufen als Verdünnungsreihe zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-3}$  zu je 10 µl ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zählung der Bakterienkolonien für jede Verdünnung und die Umrechnung in CFU/ml. Eine Ausgangslösung von Bakterien in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  CFU/ml (Inkubationskonzentration) ergibt nach Verdünnung bis zu  $10^{-6}$  dann eine Konzentration von  $10^2$  CFU/ml. Bei einer Probe von 10 µl sollten also etwa 1 CFU auf der Agarplatte erscheinen. Zudem sollte bei einer CFU von z.B. 5 auf der Agarplatte und einer Verdünnung von z.B.  $10^{-4}$  eine Bakterienkonzentration von etwa  $5 \times 10^6$  CFU/ml vorliegen.

### **2.10.2 Adhäsionsversuche an TNF- $\alpha$ stimulierten Endothelzellen**

Für diese Versuche wurde dem Endothelzellmedium humanes TNF- $\alpha$  in einer Endkonzentration von 10 ng/ml hinzugefügt. Nach Entfernen des alten Mediums wurden 2 ml des TNF- $\alpha$ -Mediums zu den Wells gegeben. Zur Kontrolle wurden andere Wells mit 2 ml regulärem Medium ohne TNF- $\alpha$ -Zusatz befüllt. Alle Wells wurden anschließend für 4h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation folgten die Schritte des Adhäsionsassays wie unter Kapitel 2.10.1 beschrieben, aber ohne die Kammereinsätze und dementsprechend nicht mit 0,4 ml Bakteriensuspension, sondern mit je 2 ml der benötigten Konzentration ( $2 \times 10^6$  für HUVEC bzw.  $5 \times 10^6$  für HBMEC), um die gleiche MOI zu erzielen.

## **2.11 Viabilitätsmessung beströmter Zellen**

Zur Bestätigung, dass die Endothelzellen durch die Strömungsversuche nicht zerstört werden, wurde nach der 4-stündigen Bestromung ein Life/Dead-Assay durchgeführt. Dabei werden zwei fluoreszierende Farbstoffe, Calcein Acetoxymethyl (Calcein AM) und Ethidium homodimer 1, den Zellen zugegeben. Calcein AM selbst zeigt keine Fluoreszenz, kann aber die Zellmembran vitaler Zellen permeieren und ins Zellinnere gelangen. Dort wird es durch eine enzymatische Abspaltung der Acetoxymethylgruppe in Calcein umgewandelt. Durch die Bindung von Ca-Ionen entsteht eine messbare Fluoreszenz. Im mikroskopischen Bild sind vitale Zellen grün gefärbt erkennbar. Ethidium homodimer 1 färbt nur tote oder stark geschädigte Zellen an, indem es durch die zerstörten Membranen avitaler Zellen gelangt. Es bindet dann an DNA und produziert eine rötliche Fluoreszenz. Im mikroskopischen Bild lassen sich so auf einfache Weise die roten, avitalen von den grünen, vitalen Zellen unterscheiden. Zu Beginn der Färbung wurden die zuvor beströmten Zellen nach Entfernen der Flusskammern dreimal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurden 2 µl Calcein AM und 1 µl Ethidium in 1 ml prf-Kulturmedium hergestellt. Es wurde gerade so viel von der Farbstofflösung in die Wells gegeben, bis der Boden gerade mit Flüssigkeit bedeckt ist. Es folgt ein Inkubationsschritt von 15 Minuten im Brutschrank, und nach dem Entfernen der Farblösung und Zugabe von prf-Kulturmedium wurden die Wells mikroskopiert.

## **2.12 Durchflusszytometrie (FACS)**

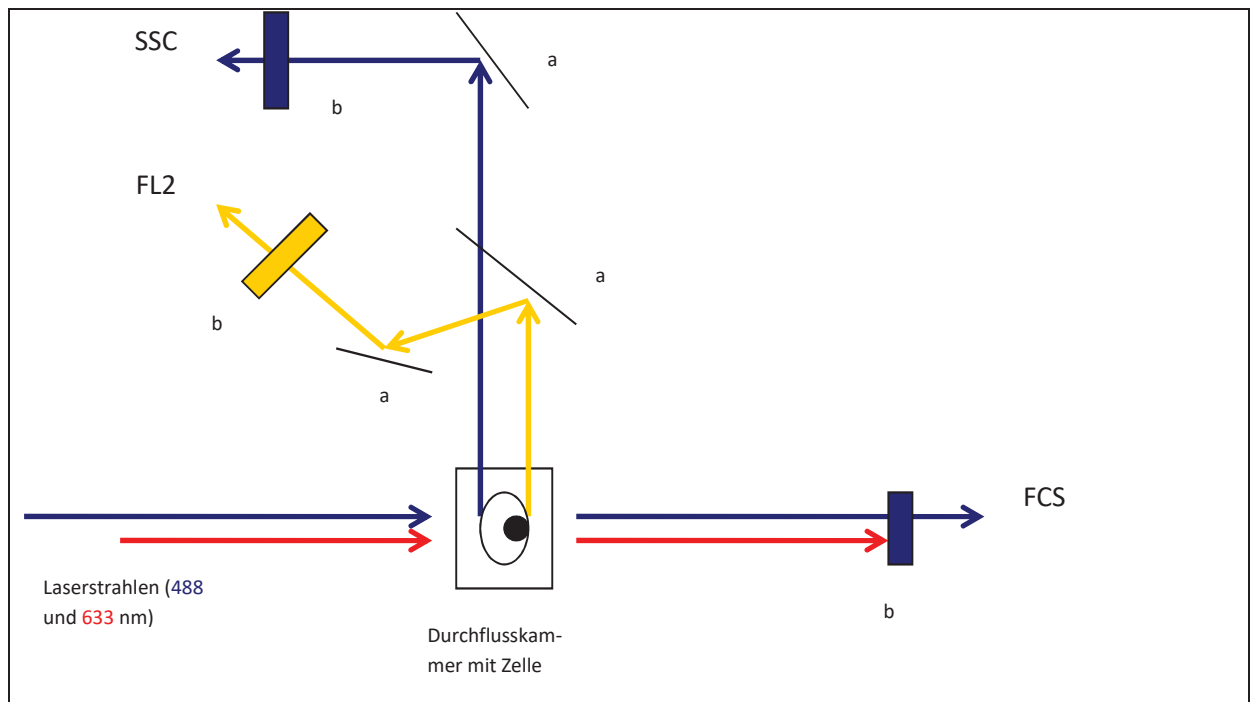
### **2.12.1 Funktionsprinzip**

Bei der Durchflusszytometrie mit dem FACS-Calibur (FACS = Fluorescent Activated Cell Scanner) werden in Flüssigkeit suspendierte Zellen, die vereinzelt durch eine Kapillare fließen, von zwei Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge getroffen. Die dabei entstehende Lichtstreuung wird gemessen. Unterschieden werden dabei die Vorwärtsstreuung (FSC= forward scatter) und die Seitwärtsstreuung (SSC= sideward scatter). Der FSC korreliert mit der Zellgröße, der SSC mit der Menge und Dichte der Zellgranula und des Zellkernes. Durch zusätzliche Farbdetektoren (im Schema mit FL2 bezeichnet) können auch fluoreszierende Farbstoffe der Zelle bzw. markierter Zellstrukturen gemessen werden, da sie nach Anregung durch das Laserlicht ihre charakteristische Fluoreszenzstrahlung emittieren (**Abb. 11**). Somit konnte im Versuch die Menge der markierten ICAM-1 Proteine unter den jeweiligen Bedingungen semi-quantitativ verglichen werden.

## **2.12.2 Semiquantitative Messung der ICAM-Expression beströmter**

### **Endothelzellen**

Zur Ermittlung der Menge von ICAM-1 auf den Endothelzellen wurde wie folgt vorgegangen. Konfluente Wells mit HUVEC und HBMEC wurden für 4 h einer Schubspannung von 1 Pa (400 ml/h) oder 0,01 Pa (Kontrolle) ausgesetzt, 4 h mit 20ng/2ml TNF- $\alpha$  oder nativ inkubiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) wurden die antikörpermarkierten ICAM-1 Adhäsionsproteine gemessen. Dazu wurden nach der Beströmung die Flusskammern entfernt und die Wells zweimal mit PBS gewaschen. Nach Einsetzen der offenen Kammern wurden in jedes Well 0,5 ml Accutase zur schonenden Ablösung der Endothelzellen zugegeben und die Zellen für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Wells, die mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, konnten mit 2 ml Accutase und ohne Kammereinsätze abgelöst werden. Anschließend wurden die Wells mit PBS-Lösung (10% FCS) mehrmals gespült und die Zellsuspension in 12 ml Falcon-Röhrchen mit PBS (10% FCS) aufgefangen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 300g für 5 Minuten und Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml PBS (1% FCS) resuspendiert. Nach der Verteilung von je 300  $\mu$ l der Zellen auf FACS-Röhrchen und erneuter Zugabe von 1 ml PBS (1% FCS) wurden die Zellen nochmals zentrifugiert (4°C, 300g, 5 min.). Nach Dekantieren des Überstandes wurde den Röhrchen 20  $\mu$ l des farbstoffgekoppelten ICAM-Antikörpers (PE Mouse Anti-human CD-54) zugegeben und die Proben 15 Minuten dunkel auf Eis inkubiert. Anschließend wurden den Proben 2 ml PBS (1% FCS) zugegeben und sie wurden nochmals zentrifugiert (4°C, 300g, 5 min.). Nach Dekantieren des Überstandes und Resuspension der Proben in je 300  $\mu$ l PBS (1% FCS) konnten die Proben, ständig dunkel und gekühlt gelagert, durchflusszytometrisch gemessen werden.



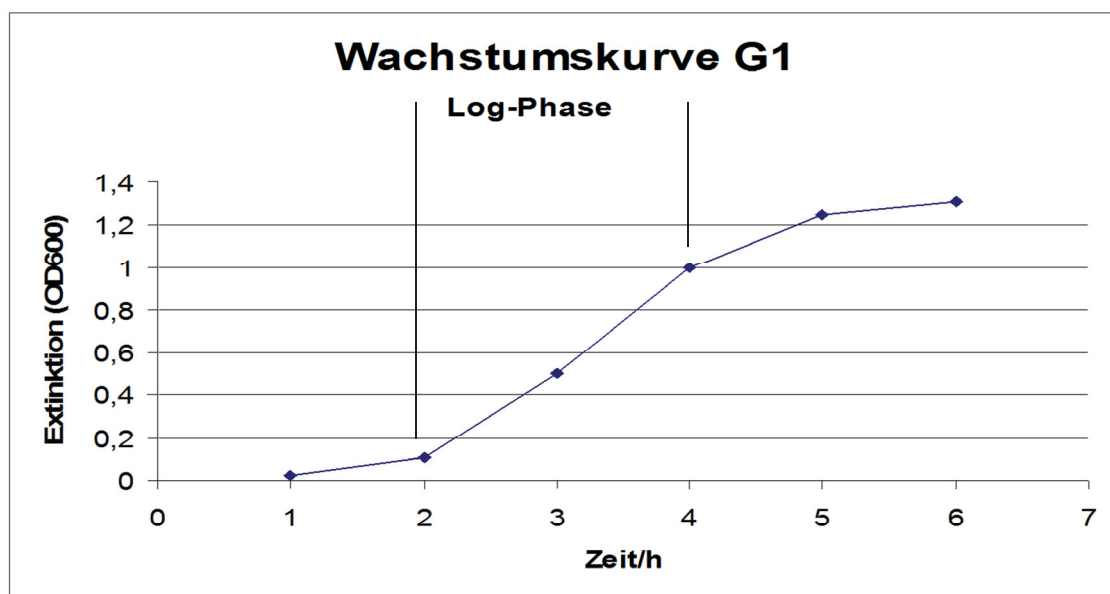
**Abb. 11:** Schema des FACS-Prinzips. Blauer Pfeil entspricht dem blauen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm, roter Pfeil entspricht dem roten Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 633 nm. Spiegel zur Lenkung der Laserstrahlen bzw. des Streulichtes sind mit (a) gekennzeichnet. Verschiedene Lichtfilter sind in den Strahlengang eingeschaltet und mit (b) bezeichnet. SSC, FCS und FL2 sind Detektoren. (Modifiziert nach Nunez, Rafael 2001)

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei Endothelien (HUVEC und HBMEC) zum einen zur Quantifizierung der Adhäsion von Gruppe B- Streptokokken der Serogruppe Ia und III, zum anderen zur Analyse der ICAM-1 Expression mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Scanner) verwendet. Die Zellen wurden mit einer Schubspannung beaufschlagt. Alle Versuche wurden um eine zweite Bedingung, die stimulatorische Gabe von TNF- $\alpha$  zu den Zellen, erweitert. Als Kontrolle wurden native Endothelzellen, die ohne Stimulus in eigenen Wells mitkultiviert wurden, untersucht.

#### 3.1 Wachstumskurven für Streptokokken Stamm G1

Um die optimale Wachstumsphase der verwendeten Bakteriensuspension des Streptokokkenstammes G1 zu ermitteln, wurde wie unter 2.8.2 beschrieben eine Wachstumskurve für die G1 - Keime erstellt.

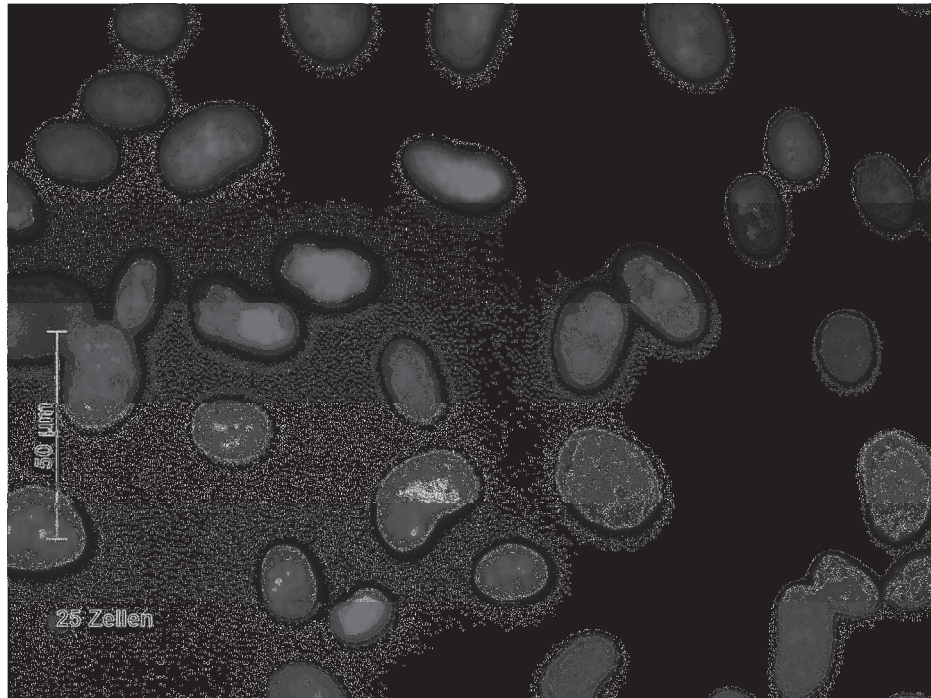


*Abb. 12: Wachstumskurve GBS 6313 (G1). Aufgetragen sind die im Photometer gemessenen Extinktionswerte im zeitlichen Verlauf.*

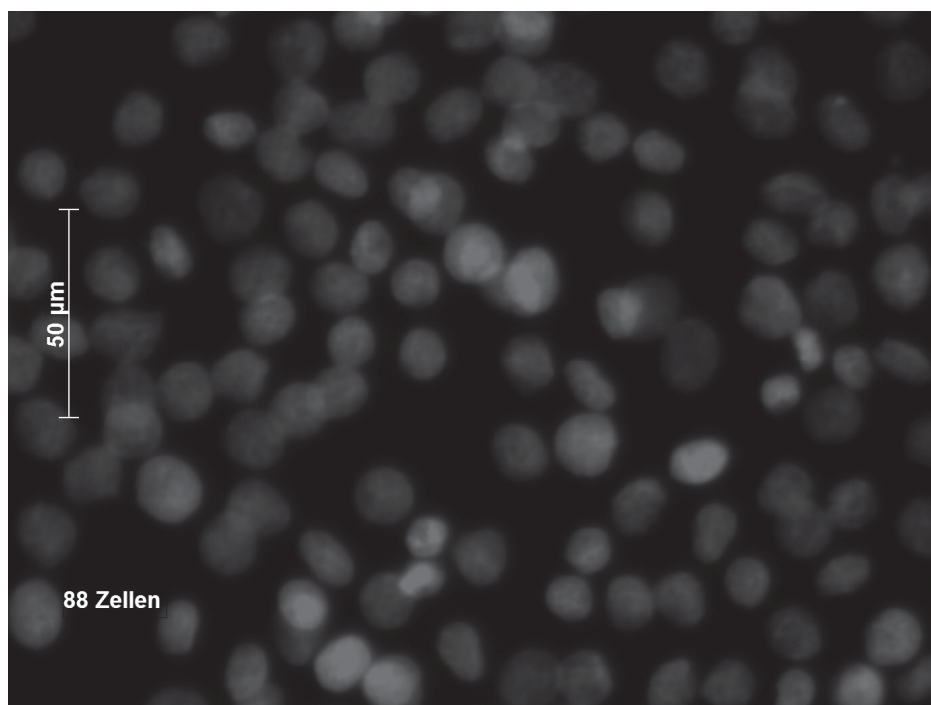
In **Abb. 12** sind die Extinktionswerte einer Bakteriensuspension des G1 Stammes bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD600) im zeitlichen Verlauf über 6 Stunden dargestellt. Zwischen 2 und 4 Stunden Inkubation befinden sich die Bakterien in der log-Phase ihres Wachstums. G1 Streptokokken wurden daher für diese Arbeit immer 2 Stunden inkubiert und dann in der so ermittelten log-Phase für die Versuche benutzt. Analog wurde für die Bakterien des R1 Stammes verfahren.

### 3.2 Bestimmung der Zellzahl pro Fläche

Zur Bestimmung der Zelldichte in den verwendeten Wells, wurden HBMEC und HUVEC bis zur Konfluenz kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Färbung von mehreren 6-Wells mit DAPI.



*Abb. 13: DAPI-Färbung HUVEC. Mikroskopisches Bild (P4-062)*



*Abb. 14: DAPI-Färbung HBMEC. Mikroskopisches Bild (P32-043)*

Die dann fluoreszenzmikroskopisch deutlich erkennbaren Zellkerne konnten unter dem

Mikroskop gezählt werden (Abb. 13 und 14). Hierfür wurden je Gesichtsfeld nur die Zellkerne gezählt, die mit ihrem kompletten Umfang im Bildausschnitt zu sehen waren. Sobald ein Teil des Kernes außerhalb des Gesichtsfeldes lag, wurde der Kern nicht berücksichtigt.

Die Auszählung von zwei Wells mit je 10 Gesichtsfeldern ergab folgende Werte:

| <b>DAPI-Färbung HBMEC</b> |              |                   |
|---------------------------|--------------|-------------------|
| <b>Gesichtsfeld</b>       | <b>Kerne</b> | <b>Mittelwert</b> |
| Bild 24 (1):              | 100          |                   |
| Bild 25 (2):              | 89           |                   |
| Bild 26 (3):              | 98           |                   |
| Bild 27 (4):              | 99           |                   |
| Bild 28 (5):              | 89           |                   |
| Bild 29 (6):              | 81           |                   |
| Bild 30 (7):              | 89           |                   |
| Bild 31 (8):              | 83           |                   |
| Bild 32 (9):              | 82           |                   |
| Bild 33 (10):             | 67           | <b>82</b>         |
| Bild 34 (11):             | 34           |                   |
| Bild 35 (12):             | 45           |                   |
| Bild 36 (13):             | 66           |                   |
| Bild 37 (14):             | 66           |                   |
| Bild 38 (15):             | 124          |                   |
| Bild 39 (16):             | 68           |                   |
| Bild 40 (17):             | 69           |                   |
| Bild 41 (18):             | 102          |                   |
| Bild 42 (19):             | 101          |                   |
| Bild 43 (20):             | 88           |                   |

| <b>DAPI-Färbung HUVEC</b> |              |                   |
|---------------------------|--------------|-------------------|
| <b>Gesichtsfeld</b>       | <b>Kerne</b> | <b>Mittelwert</b> |
| Bild 44 (1):              | 17           |                   |
| Bild 45 (2):              | 12           |                   |
| Bild 46 (3):              | 24           |                   |
| Bild 47 (4):              | 20           |                   |
| Bild 48 (5):              | 25           |                   |
| Bild 49 (6):              | 12           |                   |
| Bild 51 (7):              | 19           |                   |
| Bild 52 (8):              | 10           |                   |
| Bild 53 (9):              | 13           |                   |
| Bild 54 (10):             | 9            | <b>17</b>         |
| Bild 55 (11):             | 13           |                   |
| Bild 56 (12):             | 23           |                   |
| Bild 57 (13):             | 12           |                   |
| Bild 58 (14):             | 20           |                   |
| Bild 59 (15):             | 32           |                   |
| Bild 60 (16):             | 13           |                   |
| Bild 61 (17):             | 16           |                   |
| Bild 62 (18):             | 25           |                   |
| Bild 63 (19):             | 9            |                   |
| Bild 64 (20):             | 16           |                   |

Bei einer Größe des Gesichtsfeldes von  $37533 \mu\text{m}^2$  ergeben sich, nach unten aufgeführter Rechnung, folgende Zelldichten:

HBMEC:

$$82 / 37533 \mu\text{m}^2 = X / 1 \text{ cm}^2$$

$$\rightarrow 82 / 37533 \mu\text{m}^2 \times 1 \text{ cm}^2 = X$$

$$\rightarrow 218.474 \approx X$$

Also: 218.474 Zellen /  $\text{cm}^2$

HUVEC:

$$17 / 37533 \mu\text{m}^2 = X / 1 \text{ cm}^2$$

$$\rightarrow 17 / 37533 \mu\text{m}^2 \times 1 \text{ cm}^2 = X$$

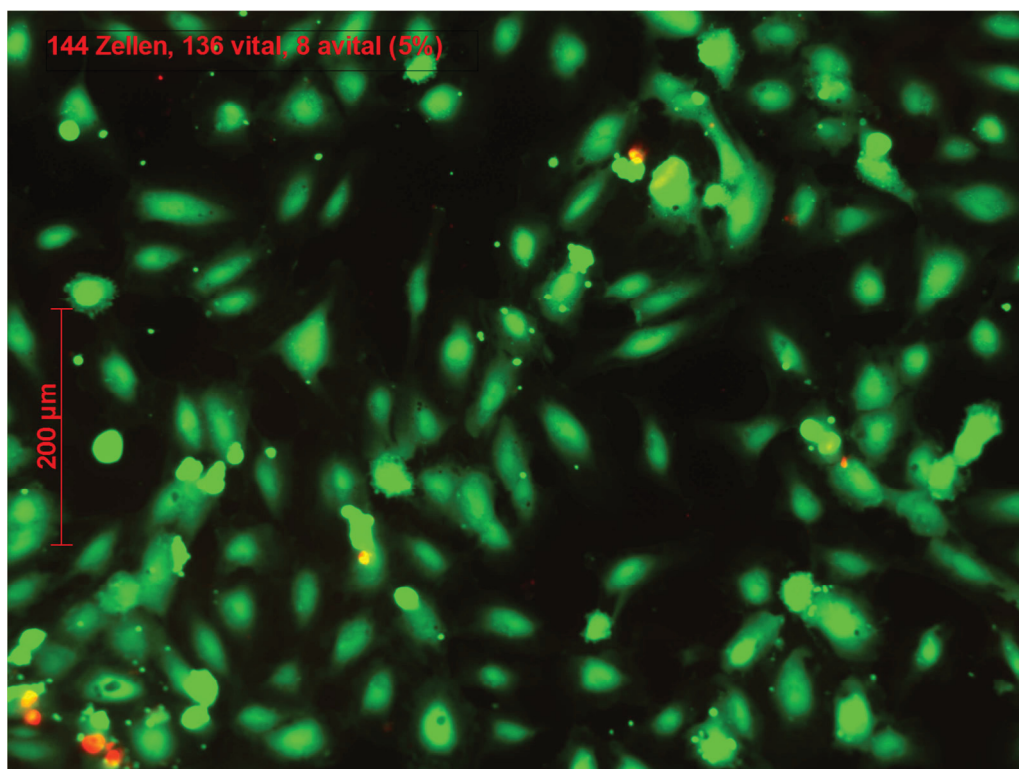
$$\rightarrow 45.293 \approx X$$

Also: 45.293 Zellen /  $\text{cm}^2$

Anhand dieser Zelldichtenbestimmung konnten dann die gewünschten Bakterienzahlen pro Zelle als MOI 10 eingesetzt werden.

### 3.3 Nachweis intakter Zellen nach Strömungsversuchen

Um zu zeigen, dass die beströmten Zellen nach dem Stimulus noch intakt bzw. lebensfähig sind, wurden exemplarisch Vitalfärbungen angefertigt (**Abb 15**).



**Abb. 15:** Life/Dead-Färbung HUVEC. Mikroskopisches Bild (Kontrolle-0008) von HUVEC in Zellkultur nach Beströmung von 4 Stunden. Grün sind vitale Zellen angefärbt, rot sind tote oder zerstörte Zellen markiert.

Anhand eines Life/Dead-Assays konnte gezeigt werden, dass der Zellrasen nahezu vollständig aus vitalen Zellen bestand. Der Anteil avitaler Zellen betrug ca. 5% (8 von 144 Zellen). Die Morphologie vor Scherkraft-Applikation war gekennzeichnet von polygonaler Zellform und pflastersteinartigem Aussehen. Durch Applikation der Scherkraft kam es zu einer Elongation

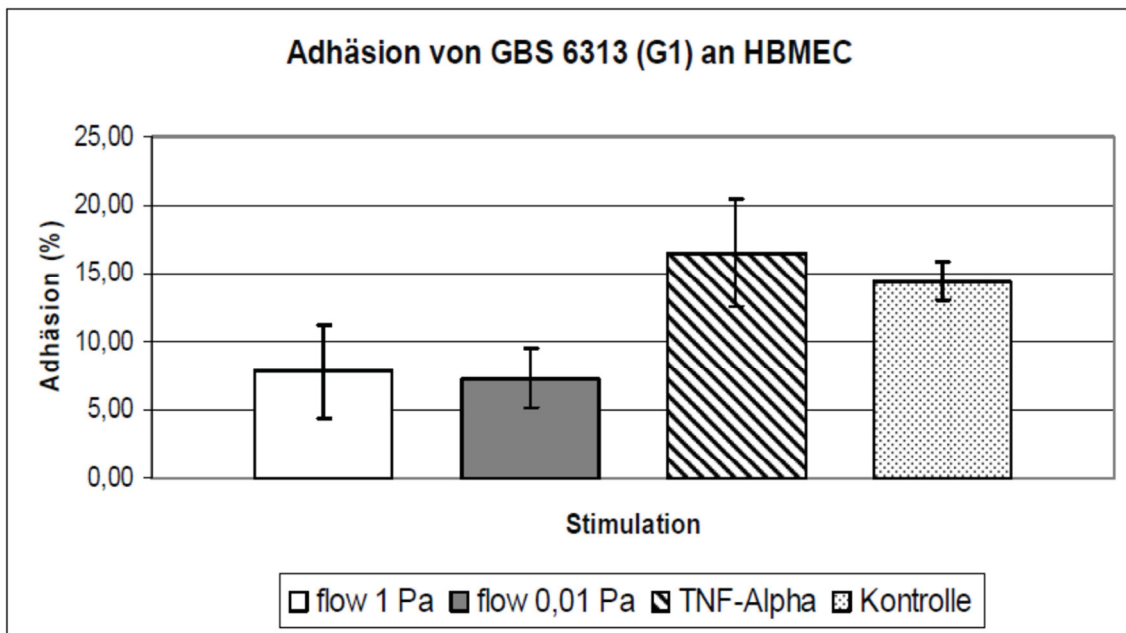
und Ausrichtung in Strömungsrichtung (qualitative Beobachtung ohne Messung).

### 3.4 Adhäsion des G1-Stammes an HBMEC

Es wurden Adhäsionsversuche an HBMEC mit Gruppe B-Streptokokken des Serotyps III (G1-Stamm) durchgeführt (n=3). Bestimmt wurde die Anzahl adhärenter (und invadierter) Bakterien entweder nach Stimulation der Zellen durch 4 Stunden Beströmung mit einer Scherkraft von 1 Pa, einer Beströmung von 4 Stunden mit 0,01 Pa (Kontrolle flow), einer Stimulation durch 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 4 Stunden oder aus Wells ohne jegliche Intervention (Kontrolle TNF). Gezeigt sind die Mittelwerte der 3 Versuche, wobei bei jedem einzelnen Versuch mindestens Doppelwerte für die jeweilige Bedingung erstellt wurden (**Abb. 16**). Die einzelnen Adhäsionswerte sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

| <b>Datentabelle Adhäsion von GBS 6313 (G1) an HBMEC</b><br><br>Adäsion nach 1h in<br>CFU/ml<br>(Prozent Adhäsion bezogen auf Mittelwert<br>Bakterienwachstum) |                |               |                    |               |                  |               |              |               |                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|---------------|--------------|---------------|-------------------------|
| Versuch<br>(n)                                                                                                                                                | 4h flow<br>1Pa |               | 4h flow 0,01<br>Pa |               | 4h TNF-<br>alpha |               | 4h Kontrolle |               | Bakterienwachstum<br>1h |
|                                                                                                                                                               | CFU/ml         | %<br>Adhäsion | CFU/ml             | %<br>Adhäsion | CFU/ml           | %<br>Adhäsion | CFU/ml       | %<br>Adhäsion |                         |
| 1                                                                                                                                                             | 5,10E+06       | 11,50         | 3,10E+06           | 6,99          | 8,30E+06         | 18,72         | 6,70E+06     | 15,11         | 4,60E+07                |
|                                                                                                                                                               | 5,05E+06       | 11,39         | 3,15E+06           | 7,11          | 1,07E+07         | 24,14         | 7,00E+06     | 15,79         | 3,40E+07                |
|                                                                                                                                                               | 5,40E+06       | 12,18         | 4,50E+06           | 10,15         |                  |               |              |               |                         |
| 2                                                                                                                                                             | 2,75E+06       | 6,20          | 3,05E+06           | 6,88          | 7,50E+06         | 16,92         | 7,00E+06     | 15,79         | 6,50E+07                |
|                                                                                                                                                               | 2,00E+06       | 4,51          | 4,80E+06           | 10,83         | 6,40E+06         | 14,44         | 5,50E+06     | 12,41         | 5,40E+07                |
|                                                                                                                                                               | 1,85E+06       | 4,17          | 3,00E+06           | 6,77          | 6,20E+06         | 13,98         | 6,40E+06     | 14,44         |                         |
| 3                                                                                                                                                             | 3,60E+06       | 8,12          | 2,45E+06           | 5,53          | 5,30E+06         | 11,95         | 6,60E+06     | 14,89         | 3,50E+07                |
|                                                                                                                                                               | 2,00E+06       | 4,51          | 1,95E+06           | 4,40          | 6,90E+06         | 15,56         | 5,60E+06     | 12,63         | 3,20E+07                |
| Mittel-<br>wert:                                                                                                                                              | 3,47E+06       | 7,82          | 3,25E+06           | 7,33          | 7,33E+06         | 16,53         | 6,40E+06     | 14,44         | 4,43E+07                |

**Tabelle 1:** Datentabelle Adhäsion GBS 6313 (G1) an HBMEC. Adhäsionswerte unter den 4 verschiedenen Stimulationsarten (1 Pa, 0,01 Pa, TNF-alpha 10 ng/ml und unbehandelte Kontrollen) an HBMEC. Gezeigt sind die Prozentwerte der Adhäsion bezogen auf den Mittelwert der Bakterienzahl, die sich insgesamt nach 1h Inkubation ergibt. Zusätzlich Mittelwert.



**Abb. 16:** Adhäsion GBS 6313 (G1) an HBMEC. Säulendiagramm der Mittelwerte der Adhäsion. Dargestellt sind die 4 Bedingungen flow 1 Pa, flow 0,01 Pa, TNF-alpha und unbehandelte Kontrollen.

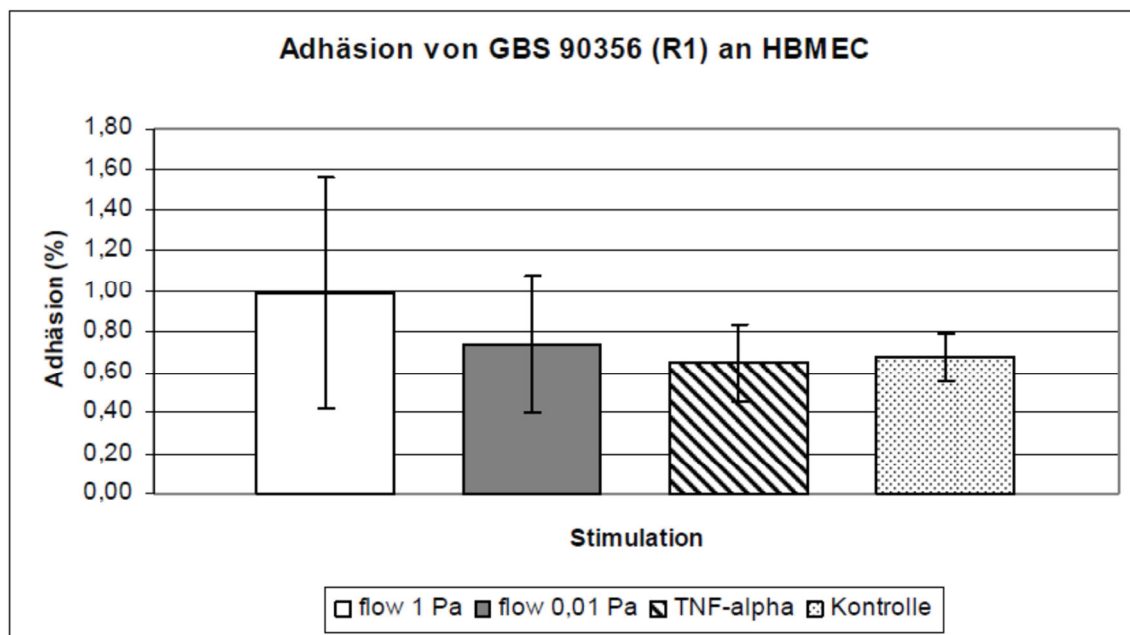
Der Mittelwert der mit 1 Pa beströmten Zellen mit 7,82 % Adhäsion unterscheidet sich nicht signifikant zu den mit unbeströmten Zellen (Kontrollen) mit 7,33 % Adhäsion. Die Berechnung des zweiseitigen T-Tests ergibt einen p-Wert von 0,65 und erreicht somit nicht das Signifikanzniveau von 0,05. Auch die Mittelwerte der TNF-alpha stimulierten Zellen (16,53 % Adhäsion) zu den mit unbeströmten Zellen (Kontrollen) (7,33% Adhäsion) ergaben im zweiseitigen T-Test keinen signifikanten Unterschied (p-Wert von 0,18).

### 3.5 Adhäsion des R1-Stammes an HBMEC

Es wurden weitere Ädhäsionsversuche an HBMEC mit Gruppe-B Streptokokken (hier R1-Stamm) durchgeführt. Hier wurde ebenfalls die Bakterienadhäsion nach 4 Stunden Beströmung mit 1 Pa, 0,01 Pa (Kontrolle flow), 4 Stunden Stimulation mit TNF- $\alpha$  und an unbehandelten Zellen (Kontrolle TNF) gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchen (**Abb. 17**), wobei pro Versuch mindestens Doppelwerte für die jeweiligen Bedingungen gemessen wurden. Die einzelnen Adhäsionswerte sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

| <b>Datentabelle Adhäsion von GBS 90356 (R1) an HBMEC</b><br><br>Adäsion nach 1h in<br>CFU/ml<br>(Prozent Adhäsion auf Mittelwert<br>Bakterienwachstum) |                |               |                    |               |                  |               |                 |               |                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------|--------------------|---------------|------------------|---------------|-----------------|---------------|--------------------------------|
| Versuch<br>(n)                                                                                                                                         | 4h flow<br>1Pa |               | 4h flow 0,01<br>Pa |               | 4h TNF-<br>alpha |               | 4h<br>Kontrolle |               | Bakterienwachstum 1h<br>CFU/ml |
|                                                                                                                                                        | CFU/ml         | %<br>Adhäsion | CFU/ml             | %<br>Adhäsion | CFU/ml           | %<br>Adhäsion | CFU/ml          | %<br>Adhäsion |                                |
| 1                                                                                                                                                      | 9,00E+05       | 1,44          | 7,50E+05           | 1,20          | 6,00E+05         | 0,96          | 5,60E+05        | 0,90          | 9,00E+07                       |
|                                                                                                                                                        | 2,50E+05       | 0,40          | 7,00E+05           | 1,12          | 5,40E+05         | 0,87          | 4,10E+05        | 0,66          | 1,07E+08                       |
|                                                                                                                                                        | 4,00E+05       | 0,64          | 1,15E+05           | 0,18          |                  |               |                 |               |                                |
| 2                                                                                                                                                      | 4,50E+05       | 0,72          | 5,50E+05           | 0,88          | 3,30E+05         | 0,53          | 4,20E+05        | 0,67          | 1,80E+07                       |
|                                                                                                                                                        | 3,00E+05       | 0,48          | 3,00E+05           | 0,48          | 2,90E+05         | 0,47          | 4,10E+05        | 0,66          | 1,80E+07                       |
|                                                                                                                                                        | 5,00E+05       | 0,80          | 5,50E+05           | 0,88          | 3,40E+05         | 0,55          | 4,50E+05        | 0,72          |                                |
| 3                                                                                                                                                      | 9,00E+05       | 1,44          | 4,00E+05           | 0,64          | 4,00E+05         | 0,64          | 3,50E+05        | 0,56          | 7,10E+07                       |
|                                                                                                                                                        | 1,25E+06       | 2,01          | 3,50E+05           | 0,56          | 3,10E+05         | 0,50          | 3,40E+05        | 0,55          | 7,00E+07                       |
| Mittel-<br>wert:                                                                                                                                       |                | 0,99          |                    | 0,74          |                  | 0,65          |                 | 0,67          | 6,23E+07                       |

**Tabelle 2:** Datentabelle für die Versuche mit GBS 90356 (R1) und die Adhäsionswerte unter den 4 verschiedenen Stimulationsarten (1 Pa, 0,01 Pa, TNF-alpha 10 ng/ml und unbehandelte Kontrollen) an HBMEC. Gezeigt sind die Prozentwerte der Adhäsion bezogen auf den Mittelwert der Bakterienzahl, die sich insgesamt nach 1h Inkubation ergibt. Zusätzlich Mittelwert und Standardabweichung ( $\sigma$ )



**Abb. 17:** Adhäsion GBS 90356 (R1) an HBMEC. Säulendiagramm der Mittelwerte der Adhäsion. Dargestellt sind die 4 Bedingungen flow 1 Pa, flow 0,01 Pa, TNF-alpha und unbehandelte Kontrollen.

Der Mittelwert der mit 1 Pa beströmten Zellen liegt bei 0,99 % Adhäsion, der Mittelwert der mit 0,01 Pa beströmten Zellen bei 0,74 % Adhäsion. Der auf diese Bedingungen angewendete T-Test ergibt einen p-Wert von 0,15. Der Mittelwert der TNF stimulierten Zellen liegt bei 0,64 %, der Mittelwert der unbehandelten Kontrollen bei 0,67 %. Der T-Test ergibt hierbei einen p-Wert von 0,37. Somit sind die Unterschiede beider Bedingungen nicht als signifikant zu werten.

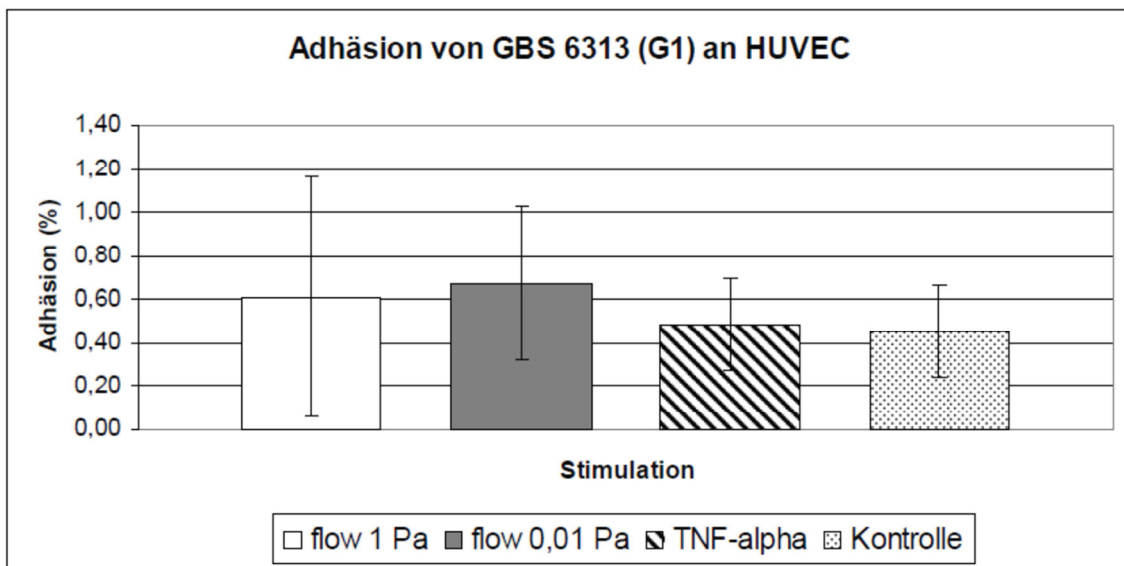
### 3.6 Adhäsion des G1-Stammes an HUVEC

Analog den Adhäsionsversuchen an HBMEC wurden für HUVEC Adhäsionsversuche mit Gruppe-B Streptokokken Serotyp III (hier als G1 bezeichnet) und den 4 Bedingungen (flow 1Pa, flow Kontrolle, TNF- $\alpha$ , unbehandelt) durchgeführt. In den einzelnen Versuchen wurden jeweils Doppelwerte für die Bakterienadhäsion jeder Versuchsbedingung bestimmt (**Tabelle 3 und Abb. 18**)

| <b>Datentabelle Adhäsion von GBS 6313 (G1) an HUVEC</b><br><br>Adäsion nach 1h in CFU/ml<br>(Prozent Adhäsion bezogen auf Mittelwert Bakterienwachstum) |                       |            |                           |            |                        |            |                        |            |                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------|---------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|--------------------------------|
| Versuch (n)                                                                                                                                             | 4h flow 1Pa<br>CFU/ml | % Adhäsion | 4h flow 0,01 Pa<br>CFU/ml | % Adhäsion | 4h TNF-alpha<br>CFU/ml | % Adhäsion | 4h Kontrolle<br>CFU/ml | % Adhäsion | Bakterienwachstum 1h<br>CFU/ml |
| 1                                                                                                                                                       | 4,00E+04              | 0,25       | 1,00E+05                  | 0,62       | 6,00E+04               | 0,37       | 9,00E+04               | 0,56       | 1,80E+07                       |
|                                                                                                                                                         | 2,00E+04              | 0,12       | 3,00E+04                  | 0,19       | 7,00E+04               | 0,43       | 3,00E+04               | 0,19       | 1,60E+07                       |
| 2                                                                                                                                                       | 2,50E+05              | 0,02       | 2,00E+05                  | 1,24       | 1,15E+05               | 0,71       | 1,30E+05               | 0,80       | 1,30E+07                       |
|                                                                                                                                                         | 1,60E+05              | 0,99       | 1,40E+05                  | 0,87       | 1,20E+05               | 0,74       | 7,00E+04               | 0,43       | 2,20E+07                       |
| 3                                                                                                                                                       | 5,10E+04              | 0,32       | 9,00E+04                  | 0,56       | 7,50E+04               | 0,46       | 5,00E+04               | 0,31       | 1,40E+07                       |
|                                                                                                                                                         | 6,60E+04              | 0,41       | 9,00E+04                  | 0,56       | 3,30E+04               | 0,20       | 6,70E+04               | 0,41       | 1,40E+07                       |
| Mittelwert:                                                                                                                                             | 9,78E+04              | 0,61       | 1,08E+05                  | 0,67       | 7,88E+04               | 0,49       | 7,28E+04               | 0,45       | 1,62E+07                       |

**Tabelle 3:** Datentabelle für die Versuche mit GBS 6313 (G1) und die Adhäsionswerte unter den 4 verschiedenen Stimulationsarten (1 Pa, 0,01 Pa, TNF-alpha 10 ng/ml und unbehandelte Kontrollen) an HUVEC. Gezeigt sind die Prozentwerte der Adhäsion bezogen auf den Mittelwert der Bakterienzahl, die sich insgesamt nach 1h Inkubation ergibt.

Der Mittelwert für die Bedingung 1 Pa liegt hier bei 0,61 %, der Mittelwert der Bedingung ohne Beströmung (Kontrolle) liegt bei 0,45 %. Der p-Wert nach Anwendung des T-Tests auf diese Bedingungen ergab einen p-Wert von 0,56. Der Mittelwert der Versuche für die TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen liegt bei 0,49 %, der Mittelwert der Adhäsion unbehandelter Zellen liegt bei 0,45 %. Beim Vergleich dieser Bedingungen auf einen signifikanten Unterschied mittels T-Tests, ergibt sich ein p-Wert von 0,77. Somit sind bei der Adhäsion an HUVEC keine signifikanten Unterschiede unter den verschiedenen Bedingungen zu erfassen.



**Abb. 18:** Adhäsion GBS 6313 (G1) an HUVEC. Dargestellt sind die 4 Bedingungen flow 1 Pa, flow 0,01 Pa, TNF-alpha und unbehandelte Kontrollen.

### 3.7 ICAM-Messung an HBMEC

Zur Messung des Zelloberflächenproteins ICAM-1 wurde wie in Kapitel 2.12.2 verfahren. Hier wurde der Effekt der vier zuvor gewählten Bedingungen (0,01 Pa, 1 Pa, TNF- $\alpha$ , unbehandelt) auf die Expression dieses Moleküls gemessen. Dafür wurden 6 Versuche durchgeführt, in denen innerhalb eines Versuches alle 4 Bedingungen erhoben wurden. Die im FACS gemessenen Fluoreszenzwerte der Versuche sind in **Tab. 4** als Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

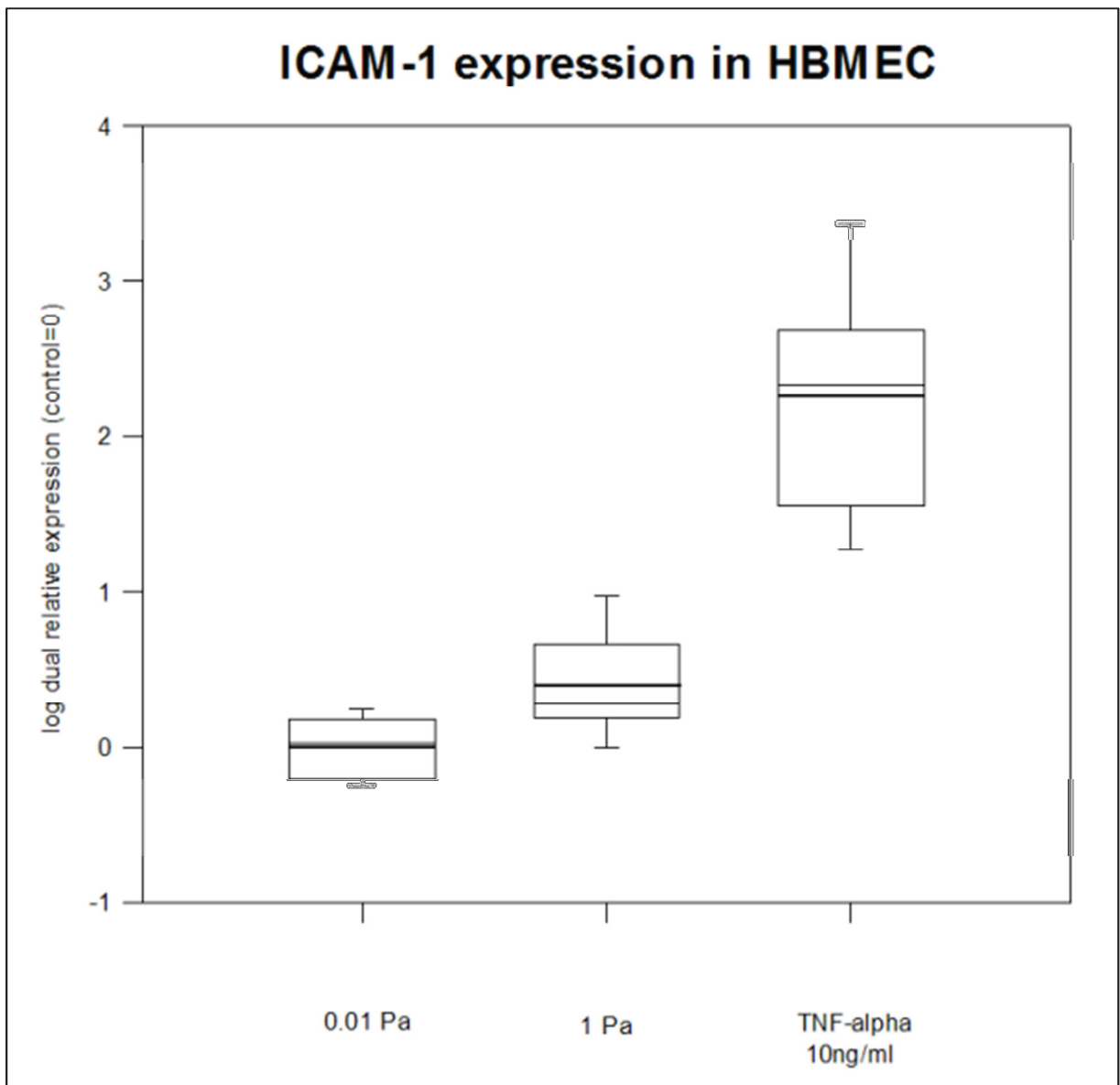
| ICAM-1 Expression in HBMEC |             |                 |              |              |
|----------------------------|-------------|-----------------|--------------|--------------|
| Versuch (n)                | 4h flow 1Pa | 4h flow 0,01 Pa | 4h TNF-alpha | 4h Kontrolle |
| 1                          | 6,20E+02    | 4,62E+02        | 9,43E+02     | 3,92E+02     |
| 2                          | 5,34E+02    | 3,57E+02        | 1,20E+03     | 4,11E+02     |
| 3                          | 8,64E+02    | 4,53E+02        | 4,57E+03     | 4,40E+02     |
| 4                          | 5,96E+02    | 6,00E+02        | 3,50E+03     | 5,98E+02     |
| 5                          | 3,52E+02    | 2,60E+02        | 1,99E+03     | 3,10E+02     |
| 6                          | 4,09E+02    | 4,07E+02        | 1,55E+03     | 3,59E+02     |
| Mittelwert:                | 5,62E+02    | 4,23E+02        | 2,29E+03     | 4,18E+02     |
| Standardabweichung:        | 1,81E+02    | 1,14E+02        | 1,43E+03     | 9,88E+01     |

**Tabelle 4:** ICAM-Expression in HBMEC nach Simulation. Werte der FACS-Messung der fluoreszenzmarkierten ICAM-1 Moleküle auf HBMEC nach Beströmung mit 1 Pa, 0,01 Pa, Stimulation mit TNF-alpha und unbehandelter Kontrollen.

Es zeigt sich eine Zunahme des Mittelwertes und des Median bei den Zellen, die mit 1 Pa beströmt wurden im Vergleich mit den unbeströmt Kontrollen und den Zellen, die mit 0,01 Pa beströmt wurden. Nach TNF- $\alpha$ - Stimulation mit 10 ng/ml zeigten sich die höchsten Expressionswerte.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen wurden mittels nicht-parametrischem Wilcoxon-Test auf Signifikanz überprüft. Dabei ergab der Vergleich der ICAM-Expression der unbehandelten Kontrollen zu den mit 0,01 Pa beströmt Zellen keinen signifikanten Unterschied (P-Wert von 0,99). Somit zeigten weder die mit langsamer Strömung, noch die nativen Zellkulturen eine relevant unterschiedliche ICAM-Expression. Nach einer vierstündigen Applikation einer Schubspannung in der Höhe von 1 Pa, kam es zu einem signifikanten Anstieg der ICAM-1 Expression gegenüber der nativen Bedingung von im Mittel etwa 4.184 Einheiten auf etwa 5.622 Einheiten (P-Wert von 0,04).

Nach vierstündiger Stimulation mit TNF-alpha zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ICAM-1 Expression von etwa 4.184 auf 22.915 Einheiten (P-Wert von < 0,001). Die Verteilung der Daten und deren Beziehung zueinander sind in einem Boxplot graphisch dargestellt (**Abb. 19**).



*Abb. 19: ICAM-Expression in HBMEC nach Stimulation. Boxplot mit Darstellung der gemessenen ICAM-1 Expression nach Beströmung mit 1 Pa, 0,01 Pa, nach TNF-alpha Stimulation und bei unbehandelten Kontrollen.*

### 3.8 ICAM- Messung an HUVEC

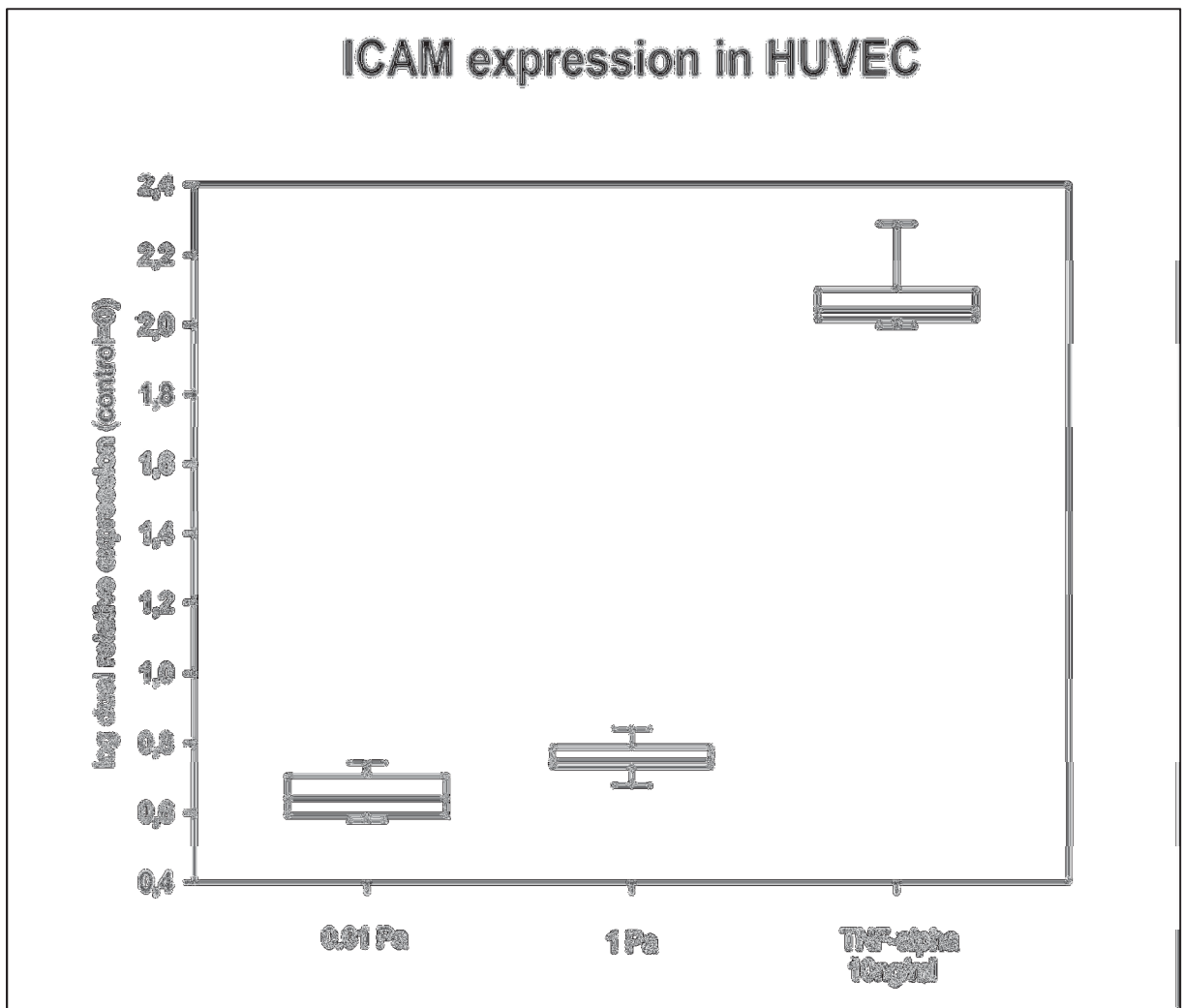
Die Messungen der ICAM-Expression an HUVECs wurden, wie oben, unter 4 verschiedenen Bedingungen gemessen. Es wurden hierfür 8 Versuche durchgeführt, die in die Auswertung eingingen. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung in **Tabelle 5** zusammengefasst.

| ICAM-1 Expression in HUVEC |             |                 |              |              |
|----------------------------|-------------|-----------------|--------------|--------------|
| Versuch (n)                | 4h flow 1Pa | 4h flow 0,01 Pa | 4h TNF-alpha | 4h Kontrolle |
| 1                          | 3,63E+01    | 3,40E+01        | 7,74E+02     | 2,21E+01     |
| 2                          | 3,30E+01    | 2,62E+01        | 8,98E+02     | 2,30E+01     |
| 3                          | 3,86E+01    | 2,36E+01        | 1,20E+03     | 2,05E+01     |
| 4                          | 6,87E+01    | 5,51E+01        | 1,06E+03     | 3,30E+01     |
| 5                          | 5,84E+01    | 4,59E+01        | 1,08E+03     | 3,62E+01     |
| 6                          | 7,61E+01    | 5,54E+01        | 1,48E+03     | 4,28E+01     |
| 7                          | 6,72E+01    | 5,34E+01        | 1,27E+03     | 3,97E+01     |
| 8                          | 7,01E+01    | 6,10E+01        | 1,27E+03     | 4,12E+01     |
| Mittelwert:                | 5,61E+01    | 4,43E+01        | 1,13E+03     | 3,23E+01     |
| Standardabweichung:        | 1,74E+01    | 1,45E+01        | 226,4680055  | 9,167727168  |

**Tabelle 5:** Werte der FACS-Messung der fluoreszenzmarkierten ICAM-1 Moleküle auf HUVEC nach Beströmung mit 1 Pa, 0,01 Pa, Stimulation mit TNF-alpha und unbehandelte Kontrollen.

Hier zeigt sich ein Zuwachs der Mittelwerte bei einem shear stress von 1 Pa im Vergleich zu 0,01 Pa. Die Expressionswerte für die TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen zeigen deutlich höhere Werte als unstimulierte Zellen. **Abb. 20** zeigt die Werte in graphischer Darstellung als Boxplot.

Nach vierstündiger Beströmung der Zellen mit einer Schubspannung von 1 Pa kam es zu einer signifikanten Steigerung der ICAM-1 Expression im Vergleich zu den nicht beströmten Zellen (P-Wert von  $<0,01$ ). Im Vergleich zu den vierstündigen mit 0,01 Pa beströmten Zellen stieg die ICAM-1 Expression signifikant nach Applikation von 1 Pa über diesen Zeitraum (P-Wert von 0,002). Nach vierstündiger Stimulation der Zellen mit TNF-alpha wurde eine signifikante Steigerung der ICAM-Expression im Vergleich zu den mit 0,01 Pa stimulierten Zellen gemessen (P-Wert von  $<0,001$ ).



**Abb. 20:** ICAM-Expresion in HUVEC nach Stimulation. Boxplot mit Darstellung der gemessenen ICAM-1 Expression nach Beströmung mit 1 Pa, 0,01 Pa, nach TNF-alpha Stimulation und bei unbehandelten Kontrollen.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Versuchsplanung, Aufbau und Methodik**

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss einer physiologischen Scherkraft auf die Adhäsion von Gruppe-B-Streptokokken an humanen Endothelzellen aufzudecken. Wie einleitend dargestellt, spielen die Interaktionen der Bakterien mit den Endothelien des Gefäßsystems eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Infektion. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurde hierzu ein experimentelles Setup entwickelt.

Ein Vorteil des hier verwendeten Systems besteht in der Anwendbarkeit mit gewöhnlichen Zellkulturschalen. Der hier verwendete Einsatz kann durch einfaches Einsetzen in die 6-well-multidishes platziert werden. Dabei bildet er am Boden des Wells einen Flusskanal, der über die ebenfalls bereits im Einsatz befindlichen Öffnungen an einen Flüssigkeitskreislauf angeschlossen werden kann. Zudem erlaubt das transparente Material des Einsatzes eine mikroskopische Beobachtung der Zellen unter Flussbedingungen.

Andere Flusskammern, wie z.B. die Parallel-Platten-Flusskammer, arbeiten im Unterschied dazu mit Objektträgern, auf denen ein Zellrasen angezüchtet wird. Transparenz und „real-time“-Beobachtungen sind aber auch hier möglich (Lane et al. 2012, Hochmuth et al. 1973).

Der große Vorteil des hier verwendeten Ansatzes liegt in der Wiederholung und gleichzeitigen Verwendung z.B. mehrerer Einsätze auf einer multi-well-Zellkulturplatte.

So konnten in dieser Arbeit 4-6 Wells einer 6-well-Kulturplatte gleichzeitig unter Strömungsbedingungen untersucht werden. Zudem ist eine parallele oder auch hintereinander „geschaltete“ Bestromung möglich.

Theoretisch kann dies auch mit der Parallel-Platten-Flusskammer erfolgen, erfordert aber zum einen die Präparation mehrere Objektträger mit Zellrasen, zum anderen sind die bisherigen Parallel-Platten-Flusskammern noch relativ groß proportioniert und kaum für eine gleichzeitige Anwendung mehrerer Kammern geeignet.

Der Nachteil der hier verwendeten Flusskammer ist allerdings, dass der ursprüngliche Zellrasen im Well definitiv beschädigt wird. Der Anteil des Zellrasens, der außerhalb des Flusskanals liegt, wird dabei im Normalfall beschädigt und stirbt ab. Zudem könnte der Zelluntergang direkt auf der Auflagefläche des Kammereinsatzes zu einer Freisetzung chemischer Mediatoren führen, deren Einfluss auf die übrigen Zellen im Flusskanal noch nicht durch Studien untersucht wurde.

Hier hat die Methode der Parallel-Platten-Flusskammer den Vorteil, dass alle Zellen auf dem Objektträger auch im Flusskanal liegen und durch den passgenauen Zusammenbau keine wesentlichen Schäden am Zellrasen auftreten sollten.

Beide Flusskammern müssen nach Benutzung gesäubert und sterilisiert werden. Die hier verwendeten Kammereinsätze zeigen dabei nach mehreren Säuberungs- und Sterilisationsvorgängen eine zunehmende Abnutzung und Transparenzminderung, sodass die optische Qualität begrenzt ist. Zusammenfassend liegt der große Vorteil für die in dieser Arbeit benutzten Kammereinsätze in der einfachen Nutzung ohne aufwendige Vorbereitungen der zu untersuchenden Zellen (wie etwa das Anzüchten auf Objektträgern) und der hohen Anzahl an durchführbaren Untersuchungen, teilweise parallel auf einer Well-Platte.

Erwähnt werden sollte, dass auch die *cone-and-plate* Flusskammer Vorteile, aber auch Nachteile für Strömungsuntersuchungen bietet. Von Vorteil ist hier sicherlich der geringe Kulturmedienverbrauch, da es hier keinen Kreislauf braucht, der über ein Pumpensystem in Gang gehalten wird. Auch die Anzucht der zu untersuchenden Zellen ist einfach und praktisch, da sie direkt in einer Kulturschale gelingt, die ohne weitere Behandlung für die Untersuchung verwendet werden kann. Einer der größten Nachteile besteht allerdings im Flussprofil über dem Zellrasen. Es konnte gezeigt werden, dass es je nach Entfernung von der rotierenden Spitze Areale mit unterschiedlichen Schubspannungswerten gibt (Buschmann et al. 2005). Somit kann man nur einen Teilbereich der Zellkultur mit ein und derselben Schubspannung beaufschlagen.

Auch die Beobachtung der Zellen unter Strömung in Echtzeit (z.B. durch ein Mikroskop oder eine Kamera) ist durch den Kegel behindert. Ein weiterer Nachteil ist die fehlende Möglichkeit wiederholter Probeentnahmen aus dem Well. Will man z.B. Zellkulturmedium auf mögliche Zytokine untersuchen, ist dies sowohl beim Parallel-Platten-Aufbau als auch bei den hier verwendeten Flusskammern ohne Weiteres aus dem Kreislauf möglich (z.B. am Auslass der Kammern). Beim *cone-and-plate apparatus* reduziert eine Probeentnahme nicht nur die Mediumsmenge, welche sich ggf. auf das Strömungsprofil auswirkt, sondern ist auch technisch schwieriger zu realisieren.

Letztendlich hängt die Wahl der verwendeten Flusskammer von der Fragestellung, der Berücksichtigung von Vor- und Nachteilen der jeweiligen Apparatur, und auch von der Erfahrung im Umgang mit den Systemen ab.

Grundlegend für die eigentliche Durchführung der Untersuchung ist die Definition der zu kontrollierenden Nebenbedingungen bzw. Außenbedingungen (Kontrollvariablen), die möglichst konstant gehalten werden müssen und der Interventionsvariable (unabhängige Variable) sowie des zu messenden Effektes (abhängige Variable). Die Kontrolle möglichst aller Außenbedingungen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Effekt auf die vom Untersucher eingesetzte unabhängige Variable zurückzuführen ist (Bortz und Döring

2002). Bei der Versuchsplanung wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass alle bekannten und potentiellen Variablen, die als Moderatorvariable den Einfluss der unabhängigen auf die abhängige Variable verändern könnten, ausgeschaltet oder konstant gehalten wurden. Schon bei der Anzucht der Endothelzellen in den Kulturschalen und den 6-Well-Platten wurde immer nach demselben Protokoll vorgegangen, sodass sich die verwendeten Zellen (und Bakterien) immer in einer ähnlichen Zellpassage (HBMEC Passage 22-30, HUVEC Passage 3-4) und Wachstumsphase (Wachstum bis zur Konfluenz) befanden. Ein Überschreiten des Passageintervalls oder ein länger als 24 Stunden bestehendes konfluentes Wachstum wurde vermieden.

Der Versuchsaufbau erfolgte standardisiert anhand von Protokollen und Aufbauskizzen (s. 2. Methoden). Die verwendeten Materialien waren entweder sterile Einmalartikel in entsprechender Verpackung und vom Hersteller als baugleich ausgewiesen, oder sie wurden steril neu verpackt. Die Versuchsdurchführung erfolgte ebenfalls nach festen Protokollen und in gleicher Weise. Versuche, die während der Durchführung Störungen aufwiesen (Pumpendefekt, Zellkontamination, u.ä.), wurden vermerkt und für die späteren Auswertungen nicht verwendet. Eine strenge zeitliche Planung aller Versuche, beispielsweise immer zu einem vergleichbaren Zeitpunkt am Vormittag, gab es nicht. Zwar wird nicht von einem grundsätzlichen circadianen Rhythmus der Zellkultur ausgegangen, doch ist ein möglicher Einfluss der Tageszeit auf die abhängige Variable nicht auszuschließen. Andere Störvariablen, wie sie im lebenden Organismus Mensch (oder Tier) vorkommen, sind dagegen durch die beschriebene Versuchsanordnung ausgeschlossen. Dazu zählen unter anderem unterschiedliche Zusammensetzungen des fließenden Mediums Blut, die individuelle Ausstattung des Individuums mit Zellen des Immunsystems oder nicht-zellulären Immunkomponenten (z.B. Komplementfaktoren) und das unbekannte Ausmaß eventuell vorbestehender Endothelzellschädigung (Arteriosklerose, Infektionen, etc.). Die genannten Störgrößen sind durch den experimentellen Ansatz der Zellkultur ausgeschaltet. Die im Vergleich zu Versuchen im oder am Menschen bzw. Tier dargestellten Vorteile, zu denen neben einer hohen internen Validität auch der Wegfall möglicher ethischer Probleme zählt, stehen aber Nachteile gegenüber. So ist die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse von Laboruntersuchungen, also die externe Validität, schwierig zu beantworten. Im Allgemeinen wird bei Laborversuchen von einer niedrigeren externen Validität ausgegangen, als bei klinischen Versuchen bzw. Feldversuchen (Bortz und Döring 2002). Die Tatsache, dass es sich bei den HBMEC um eine Zelllinie handelt, die mit einem Virus (SV40-Large-T-Antigen) immortalisiert wurde, schränkt die Übertragbarkeit auf physiologische Bedingungen per se weiter ein. Durch den Vergleich der genetischen und phänotypischen sowie funktionellen

Charakteristika der Primärkultur von HBMEC mit den dann SV40-infizierten Zellen, konnte aber eine ausreichende Übereinstimmung belegt werden. So sind auch die transfizierten Zellen z.B. Faktor VIII-related Antigen-positiv, besitzen beide die Enzyme GGTP und ALP (Marker von Geweben der Blut-Hirn-Schranke) und zeigen z.B. beide ähnliche transendotheliale elektrische Widerstände (engl. TEER), als Ausdruck der hohen Rate an tight-junctions (Muruganandam et al. 1997). HBMEC werden deshalb in vielen Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke verwendet.

Da bisher die Frage nach dem Einfluss der Schubspannung auf die Adhäsion von Gruppe B-Streptokokken an HBMEC und HUVEC nicht untersucht wurde, eignet sich zunächst der Versuchsaufbau im Labor gut zur Überprüfung von Hypothesen zur Infektionspathogenese.

## **4.2 Zellkultur und Bakterieninokulum**

In dieser Arbeit wurden zwei wichtige Parameter der Zellkultur untersucht. Zum einen wurde mit Hilfe der DAPI-Färbung die Zelldichte in den 6-Well-Platten ermittelt. Zum anderen wurde mit Hilfe des LIFE/DEAD-Assays der Nachweis erbracht, dass der Zellmonolayer sowohl ohne Beströmung als auch nach der Beströmung mit max. 1 Pa noch intakt und lebendig ist. Die Zelldichte ist für die Ermittlung der MOI (= Multiplicity of Infection) wichtig. Die exakte Zellzahl pro  $\text{cm}^2$  unterliegt einer natürlichen Schwankung, sodass die genaue, in den durchgeführten Versuchen vorliegende Zelldichte unbekannt war, da keine gesonderten Messungen durchgeführt wurden. Hinzu kommt eine Schwankung der photometrisch bestimmten Bakterienzahl, die dann zu einer Schwankung der MOI geführt hat. Für die Adhäsionsversuche mit HBMEC und HUVEC ergaben sich in allen gewerteten Versuchen dabei Bakterienkonzentrationen von  $1,30 \times 10^6$  /ml bis hin zu  $3,40 \times 10^7$  /ml. Diese Schwankung um das gewünschte Bakterieninokulum hat vor allem zwei Gründe. Erstens muss die photometrisch gemessene Bakterienprobe weiter auf die gewünschte Bakteriendichte verdünnt werden, wobei es durch Pipettierfehler bzw.- Ungenauigkeiten zu Abweichungen der Konzentrationen kommen kann. Zweitens kommen selbst in zwei Proben aus einer einzigen Bakteriensuspension Unterschiede in den dann auf der Agarplatte zu sehenden CFUs (colony forming unit) um den Faktor zwei vor ( $6 \times 10^6$  zu  $1 \times 10^7$ ). Auch hier sind Pipettierfehler und Stichprobenfehler durch inhomogene Bakterienverteilung in der Suspensionen mögliche Gründe für die Abweichungen. Zusammenfassend sind die eingesetzten MOI als Richtwerte zu betrachten. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass in den Versuchen tatsächlich auf jede Endothelzelle genau 10 bzw. 2,5 Bakterien kommen. Vielmehr muss mit einem MOI-Intervall zwischen etwa 30-300 % des gewünschten

Wertes gerechnet werden. Diese Ungenauigkeit der eingesetzten MOI wird allerdings durch die Messwertbetrachtung relativiert, da hierbei die relative Adhäsion als Anteil der tatsächlichen MOI unter den verschiedenen Bedingungen verglichen wird, nicht die absoluten Adhäsionswerte (genauere Betrachtung der Adhäsionsergebnisse siehe unten).

Ein wichtiger Hinweis auf eine biologische Wirkung der applizierten Scherkraft ist die Veränderung der Zellmorphologie. Für endotheliale Zellen ist nach Scherkraft-Applikation eine Elongation um das 3,7-fache beschrieben, was einer deutlich sichtbaren Veränderung entspricht. Somit ist die, mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau andernorts (Vogel et al. 2007) beobachtete morphologische Änderung eine valide qualitative Bestätigung der Scherkraft-Applikation durch das verwendete System (Dartsch et al. 1989).

### **4.3 ICAM- Messungen**

In anderen Untersuchungen wurde bereits auf einen Zusammenhang der endothelialen ICAM-1-Expression mit Strömungsstimuli hingewiesen (Nagel et al. 1994, Chen et al. 2001, Morigi et al. 1995). In den genannten Studien konnten die Untersucher zeigen, dass Endothelzellen (jeweils HUVEC) auf definierte Schubspannungen mit einer vermehrten Expression von ICAM-1-Molekülen reagieren. Auch nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  sind solche Effekte schon mehrfach beschrieben worden (Stins et al. 1997, Wong und Dorovini-Zis 1992, Bernot et al. 2005). In dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse für beide Zellreihen bestätigt und der Versuchsaufbau damit verifiziert. Für HBMEC konnte erstmals die vermehrte Expression von ICAM-1 nach Stimulation gezeigt werden. Nach Inkubation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  zeigte sich eine deutliche Erhöhung der ICAM-1-Expression im Vergleich zu den anderen Bedingungen. In den Versuchen mit 1 Pa Schubspannung zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der ICAM-Moleküle, wenn auch die Größe des Effektes deutlich unter der Effekststärke des TNF-Stimulus blieb. TNF- $\alpha$  als proinflammatorisches Protein hat erwartungsgemäß diesen deutlichen Einfluss auf die Endothelzellen. Der vergleichsweise geringe Effekt der Schubspannung kann daran liegen, dass das gewählte Zeitintervall vor der Messung, noch zu kurz war. Es ist durchaus möglich, dass mit einer längeren Strömungsdauer (> 4h) auch ein größerer Effekt auf die Bildung des ICAM-Proteins erzielt werden kann. Dennoch konnte anhand der gewonnen Daten ein signifikanter Anstieg der ICAM- Oberflächenproteine nach Beströmung mit 1 Pa nachgewiesen werden. Wichtig ist dieses Ergebnis in Hinblick auf die Aussagekraft der durchgeführten Adhäsionsversuche. Bei gleichem Versuchsaufbau zur Beströmung der Zellen kann also von einem definierten Stimulus in Form der Schubspannung ausgegangen werden. Zudem liefern die Ergebnisse der FACS-Analysen zugleich einen möglichen Interaktionsfaktor für die Adhäsion von Bakterien an Endothelzellen, nämlich das

ICAM-1. Für körpereigene Immunzellen, die Leukozyten, sind solche Interaktionen zur Adhäsion und Transmigration bekannt (Springer 1994, Smith et al. 1989). Für Gruppe B-Streptokokken sind Adhäsionen, die auf der Interaktion mit dem ICAM-1-Molekül beruhen, bisher nur unzureichend untersucht worden. Es gibt aber Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen der Adhäsion (und Invasion) von Bakterien und der Anwesenheit bzw. der Anordnung dieses Oberflächenproteins auf Endothelzellen (z.B. endothelial ECV 304 cell, HUVEC) vermuten lassen (Lione et al. 2005, Dehio et al. 1997).

#### **4.4 Adhäsionsversuche**

In den Adhäsionsassays dieser Arbeit wurde untersucht, ob die gewählte Schubspannung einen Einfluss auf die Adhäsion von Gruppe B-Streptokokken an Endothelzellen hat. Die dafür durchgeführten Adhäsionsassays sind eine etablierte Nachweismethode zur Überprüfung der Adhäsion von Bakterien (Gutekunst et al. 2003, Schubert et al. 2004). Aufgrund der hier verwendeten Flusskammern ist der Adhäsionsassay für die hier durchgeführten Versuche modifiziert worden. Durch den Einsatz der Kammer wird nicht das gesamte Well beströmt, sondern nur eine begrenzte Fläche (ca. 2 cm<sup>2</sup>). Der Zellrasen im übrigen Well wird beim Einsatz der Kammer und während der Beströmung kalkuliert zerstört. Zur Quantifizierung der Adhäsion der Bakterien an intakten Endothelzellen bleibt die Fläche des Flusskanals übrig. Dies macht es notwendig, für den Adhäsionsassay einen zweiten Kammereinsatz zu verwenden, der zur Oberseite hin geöffnet ist. Somit sind die noch vitalen, beströmten Zellen vom Zelldetritus abgegrenzt. Diese Separierung innerhalb des Wells dient der Ausschaltung dreier Faktoren. Zum einen könnte der Zelldetritus völlig anders mit den Bakterien interagieren, als dies bei lebenden Zellen der Fall ist. Zweitens könnten intrazelluläre Stoffe, die beim Zelltod freigesetzt werden, einen messbaren Effekt auf die Adhäsion an den noch übrigen Zellen ausüben. Drittens würde der Effekt der Schubspannung auf die Adhäsion ohne die offenen Einsätze möglicherweise unterschätzt. Dies könnte geschehen, wenn die Bakterienadhäsion an den Zellen des gesamten Wells gemessen wird, obwohl nur ein Teil der Zellen einem Stimulus ausgesetzt war. Eine mögliche Steigerung (oder Verringerung) der Adhäsion an den intakten Zellen wäre unter Umständen bei Betrachtung der 5-fachen Fläche nur minimal, eventuell gar nicht messbar. Bei Nutzung der hier beschriebenen Flusskammer mussten daher auch die offenen Kammereinsätze verwendet werden.

Für HBMEC und HUVEC konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Bakterienadhäsion nach Stimulation mit 1 Pa im Vergleich zu der Stimulation mit 0,01 Pa gemessen werden. Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser Ergebnisse ergeben sich vor

allem durch die große Schwankungsbreite der gemessenen Adhäsionswerte. Für die Adhäsion des G1-Stammes an den HBMEC wurde ein Mittelwert von 7,82 % für eine Schubspannung von 1 Pa, und 7,33 % für die 0,01 Pa beströmten Zellen errechnet. Dabei schwanken die Werte für die Bedingung 1 Pa zwischen 4,51 % und 12,18 % Adhäsion. Noch ausgeprägter zeigte sich die Variabilität der Messwerte bei der Adhäsion des R1-Stammes an den HBMEC. Hier lag der Mittelwert bei 0,99 % (für die Bedingung 1 Pa) und bei 0,74 % Adhäsion für die 0,01 Pa beströmten Zellen. Die Schwankung der Adhäsion bei 1 Pa Schubspannung lag hier zwischen 0,4 % und 2,01 %. Im Vergleich dazu schwankten die Adhäsionswerte bei den 0,01 Pa beströmten Zellen zwischen 0,18 % und 1,20 %. Auch die prozentuale Adhäsion bei den Versuchen mit HUVEC zeigte eine ähnliche Schwankungsbreite innerhalb der jeweiligen Schubspannung.

Interessanterweise gibt es aber auch Versuchsreihen, die eine vergleichsweise kleine Streuung der gemessenen Adhäsionswerte zeigten. Dazu gehören die Adhäsionsversuche an HBMEC nach TNF- $\alpha$  Stimulation. Hier zeigte sich bei der Adhäsion von G1 an HBMEC nach einer vierstündigen Stimulation mit TNF-alpha eine Schwankung der Werte zwischen 11,95 % und 24,14 %. Die Adhäsionswerte der unbehandelten Kontrollen schwankten zwischen 12,41 % und 15,79 %. Bei der Adhäsion des R1-Stammes an TNF-alpha stimulierten HBMEC zeigte sich eine Schwankung zwischen 0,47 % und 0,96 % Adhäsion, bei den unbehandelten Kontrollen Adhäsionswerte zwischen 0,55 % und 0,90 %. Da die Adhäsionsversuche, wie oben beschrieben, für beide Bedingungen in gleicher Weise durchgeführt wurden, ist die Ursache für die geringere Schwankung mancher Adhäsionswerte mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der Versuchsdurchführung begründet. Die Adhäsionsversuche wurden alle von einer einzigen Person durchgeführt. Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Versuche sind also nicht auf interindividuelle Versuchsleiterfehler bezüglich des Ablaufes zurückzuführen. Durch eine erhebliche Anzahl an Vorversuchen ist auch von einer ausreichenden Übung bei der Versuchsdurchführung auszugehen. Dadurch sollten Schwankungen, die sich auf unterschiedliche Handhabung zurückführen lassen, vermieden worden sein. Neben Störfaktoren bei der Versuchsdurchführung sind natürlich auch Fehler bzw. Ungenauigkeiten bei der eigentlichen Messung der Adhäsion denkbar. Diese wurde nach Ausplattieren der Bakterien-Zell-Suspension auf Agarplatten ausgezählt. Auch hier war die auszählende Person immer dieselbe, nämlich wiederum der Verfasser der vorliegenden Arbeit. Ein möglicher, unbewusster Fehler beim Auszählen, im Sinne einer Tendenz zu erwünschten Werten, lässt sich hier nicht ausschließen. Diese, auch als Versuchsleiter-Artefakt bekannte Störgröße, wurde nicht kontrolliert. Allerdings würde man in diesem Fall eher eine Tendenz der Messwerte erwarten, die einen eindeutigeren Zusammenhang zwischen der unabhängigen

und der abhängigen Variable aufzeigt. Zudem waren die zu zählenden Bakterienkolonien auf den Agarplatten in den meisten Fällen gut voneinander abgrenzbar und von geringer Anzahl (zwischen 1-30 Kolonien). Ein Verzählen war hierbei ohne Absicht unwahrscheinlich. Trotzdem können Messungenauigkeiten durch diese Störgröße nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Eine Möglichkeit der Lösung des Problems ist die Anzahl der Adhäsionsversuche zu erhöhen. Eine Kumulation der überwiegenden Zahl, der dann erhobenen Messwerte um den Mittelpunkt, könnte helfen, Extremwerte als „Ausreißer“ zu erkennen und die Streubreite der Messwerte zu verringern.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen bleiben also ohne Hinweis für den Zusammenhang zwischen der Adhäsion von Gruppe B-Streptokokken an zuvor beströmten Endothelzellen. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen ICAM- Messungen an beströmten und TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen, lässt sich darüber hinaus die Vermutung anstellen, dass die Adhäsion dieser Bakterienspezies nicht über ICAM-1 vermittelt wird. Gerade die hohen ICAM-Werte nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und die fehlende Steigerung der Adhäsion mit demselben Stimulus unterstützen diese Aussage. Im Gegensatz dazu gibt es eine Untersuchung, die eine Interaktion von Gruppe B-Streptokokken mit ICAM-1 nachweisen konnte (Lione et al. 2005). Hier wurden allerdings Zellextrakte aus Endothelzellen gewonnen und diese dann mit den Bakterien inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung mit Antikörpern gegen ICAM-1. Ob diese Interaktion, aber einen direkten Einfluss auf die Adhäsion der Bakterien an den Endothelzellen hat bleibt auch in dieser Arbeit unklar.

## **4.5 Ausblick**

Bakterielle Infektionen sind auch heute noch eine häufige Ursachen für Krankheit und Tod. Gerade in wenig entwickelten Ländern der Erde spielen sie eine bedeutende Rolle. Nach Informationen der WHO aus dem Jahr 2004 fanden sich unter den 10 häufigsten Ursachen für Tod in sogenannten low-income countries 6 Infektionskrankheiten, davon mindestens 4 mit bakterieller Beteiligung. Neonatale Infektionen allein lagen dabei auf Platz 8. Die Untersuchung von den Mechanismen der Infektionspathogenese ist eine interessante und relevante Aufgabe der Forschung. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten keinen Effekt von laminarer Strömung und Schubkräften auf die Adhäsion von Gruppe B-Streptokokken an Endothelzellen nachweisen. Dennoch konnte in dem verwendeten flow-System eine Endothelantwort auf einen Strömungsstimulus reproduziert werden. Die hier gewählten Operationalisierungen der Strömungsversuche waren also in der Lage, verlässliche und

reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Neben der hier durchgeführten ICAM-1-Messung können mit Hilfe des verwendeten Versuchsaufbaues noch eine Vielzahl anderer Membranproteine von Endothelzellen und deren Reaktion auf den Stimulus Schubkraft untersucht werden. Es gilt diejenigen Oberflächenproteine zu identifizieren, deren Anzahl sich auf der Endotheloberfläche messbar verändert und die mit Membranrezeptoren der Bakterien interagieren könnten.

Der Identifizierung solcher Membranstrukturen müssen dann Versuche folgen, die diejenige Schubspannung ermitteln, die eine maximale Expression dieses Moleküls zur Folge hat. Daran könnten sich dann wiederum Adhäsionsversuche mit der entsprechenden Schubspannung anschließen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, direkt mit Adhäsionsversuchen zu beginnen. Dabei würden für jede untersuchte Endothelzellart fein abgestufte Strömungsraten untersucht und der Effekt auf die Adhäsion (und gegebenenfalls Invasion) gemessen. Zunächst kann damit nicht ein spezielles Oberflächenprotein auf den Endothelzellen identifiziert werden. Allerdings würde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Schubspannung und der Bakterienadhäsion die Existenz solcher Strukturen nahelegen und weitere Anstrengungen zu deren Entdeckung rechtfertigen.

Viele weitere Modifikationen bei Versuchen zu Effekten der Schubspannung sind denkbar. So ist auch die Auswahl an anderen Infektionserregern groß. Neben den Gruppe B-Streptokokken können andere relevante Bakterienarten untersucht werden. Auch die Verwendung von Viren oder Pilzen ist denkbar.

In dieser Arbeit wurden zwei Arten von Endothelzellvarianten beströmt und anschließend die Adhäsion der Gruppe B-Streptokokken gemessen. Einige Studien geben aber Hinweise darauf, dass die Scherrate nicht nur auf die Endothelzellen, sondern auch auf die Bakterien selbst einen relevanten Einfluss haben könnte. So konnte in einer Arbeit von Wendy E. Thomas (2004) gezeigt werden, dass *E.coli*-Bakterien mit steigender Schubspannung vermehrt an mannosebeschichteten Oberflächen haften. Auch in dem hier vorgestellten Versuchsaufbau können Bakterien in den Flüssigkeitskreislauf eingebracht werden. Dadurch ist eine Kombination von beströmtem Endothel mit strömenden Infektionserregern möglich, die sich den physiologischen Gegebenheiten noch weiter annähert.

Zur Messung der Bakterienadhäsion könnten, neben den hier benutzten Adhäsionsassays, auch mikroskopische Verfahren eingesetzt werden. Fluoreszierende Antikörper könnten zur Markierung der adhären und invadierten Erreger und zur quantitativen Messung benutzt werden. Die apparative Messung hätte hier vor allem den Vorteil der wahrscheinlich objektiveren Messung der tatsächlichen Adhäsionswerte.

In dieser Arbeit wurde nur ein orientierender Blick auf einen kleinen Ausschnitt der Infektionsmechanismen unter den Einflüssen von Schubspannung geworfen. Es bleiben noch viele weitere Versuchsbedingungen und Versuchsmöglichkeiten zu untersuchen, bis wir eine genauere Vorstellung von den tatsächlichen Effekten von Flüssigkeitsströmungen und den dann entstehenden Scherkräften haben. Der Vorteil der Einbeziehung des Faktors Schubspannung in die Abläufe der Infektionspathogenese ist aber eine Annäherung an die physiologischen bzw. pathophysiologischen Gegebenheiten, die tatsächlich im lebenden Organismus herrschen. Damit kann im besten Fall nicht nur eine Steigerung der externen Validität, sondern auch der Validität insgesamt erreicht werden.

## **5. Literaturverzeichnis**

1. Adam, K.S.Kim, H. Schroten: Role of the blood brain barrier and blood-CSF barrier in the pathogenesis of bacterial meningitis. *Pediatric Infectious Diseases Revisited*, Eds: H. Schroten, S. Wirth, Birkhäuser Verlag, Basel, **2007**, S. 199-237.
2. Bae BH, Bottone EJ.: Modified Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) test for direct identification of hemolytic and nonhemolytic group B streptococci on primary plating. *Can J Microbiol.* **1980** Apr;26(4):539-42.
3. Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D: Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ.* **2001** Sep 8;323(7312):533-6.
4. Bénistant C, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R, Lagarde M: Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes. *J Lipid Res.* **1995** Nov;36(11):2311-9.
5. Berner R, Herting E, Henneke P, Martius J, Roos R: Infektionen durch  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B (GBS), In: DGPI (Hrsg.): Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. 5. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart (**2009**), S. 488-491.
6. Bernot D, Peiretti F, Canault M, Juhan-Vague I, Nalbone G: Upregulation of TNF-  $\alpha$ -induced ICAM-1 surface expression by adenylate cyclase-dependent pathway in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* **2005** Feb;202(2):434-41.
7. Bowman PD, Betz AL, Ar D, Wolinsky JS, Penney JB, Shivers RR, Goldstein GW: Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro.* **1981** Apr;17(4):353-62.
8. Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, Betz AL, Goldstein GW: Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol.* **1983** Oct;14(4):396-402.
9. Bortz J, Döring N: Forschungsmethoden und Evaluation: für Human- und Sozialwissenschaftler. 3. Aufl. Springer-Verlag, Berlin (**2002**), S. 57-62.
10. Buschmann MH, Dieterich P, Adams NA, Schnittler HJ: Analysis of flow in a cone-and-plate apparatus with respect to spatial and temporal effects on endothelial cells. *Biotechnol Bioeng.* **2005** Mar 5;89(5):493-502.
11. Busscher HJ, van der Mei HC: Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin Microbiol Rev.* **2006** Jan;19(1):127-41.
12. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ: Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.* **1990** Oct;429:47-62.
13. Cagno CK, Pettit JM, Weiss BD: Prevention of perinatal group B streptococcal disease: updated CDC guideline. *Am Fam Physician.* **2012** Jul 1;86(1):59-65.

14. Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buée-Scherrer V V, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G, Dehouck MP: In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* **1999** Apr 5;36(2-3):165-178.
15. Chen Y, Chen H, Liu X, Lei S, Mao Y, Zhang W: Effect of flow shear stress on the expression of adhesion molecules of endothelial cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* **2001** Jun;18(2):201-5.
16. Cheng Q, Stafslie D, Purushothaman SS, Cleary P: The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun.* **2002** May;70(5):2408-13.
17. Christie, R., Atkins, NE and Munch-Petersen, E: A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22, 197-200, **1944**.
18. Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, Fahey J, Wessels MR, Rubens CE: Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect Immun.* **2005** May;73(5):3096-103.
19. Crone C, Olesen SP: Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* **1982** Jun 3;241(1):49-55.
20. Dartsch PC, Betz E: Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation. *Basic Res Cardiol* **1989**;84:268–81.
21. Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C: Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci.* 1997 Sep;110 ( Pt 18):2141-54.
22. Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, Maisey HC, Fedtke I, Equils O, Michelsen KS, Arditi M, Peschel A, Nizet V: Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J Clin Invest.* **2005** Sep;115(9):2499-507.
23. Doran KS, Nizet V: Molecular pathogenesis of group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol Microbiol.* **2004** Oct;54(1):23-31.
24. Fahraeus R, Lindqvist T: The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *Am. J. Physiol.* 96: 562-568, **1931**.
25. Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM: Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2001** Sep;281(3):L529-33.
26. Fluegge K, Siedler A, Heinrich B, Schulte-Moenting J, Moennig MJ, Bartels DB, Dammann O, von Kries R, Berner R: Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics.* 2006 Jun;117(6):e1139-45. Epub **2006** May 8.
27. Franco SM, Cornelius VE, Andrews BF: Long-term outcome of neonatal meningitis. *Am J Dis Child.* **1992** May;146(5):567-71.

28. Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, Deutsche Gesellschaft für Perinatale Medizin (DGPM). Prophylaxe der Neugeborenssepsis (frühe Form) durch Streptokokken der Gruppe B. AWMF-Leitlinien-Register, Nr 024/020, Erstellungsdatum **12/1996**, letzte Überarbeitung **07/2008**, pdf-Aktualisierung **13.01.2012** [zitiert am 10.08.2014]; URL: [http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-020l\\_S2k\\_Neugeborenssepsis\\_Streptokokken.pdf](http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-020l_S2k_Neugeborenssepsis_Streptokokken.pdf).
29. Gumbleton M, Audus KL: Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci.* **2001** Nov;90(11):1681-98.
30. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: Analysis of *RogB*-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* **2003** Sep;71(9):5056-64.
31. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: The novel fibrinogen-binding protein *FbsB* promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun.* **2004** Jun;72(6):3495-504.
32. Harvey D, Holt DE, Bedford H: Bacterial meningitis in the newborn: a prospective study of mortality and morbidity. *Semin Perinatol.* **1999** Jun;23(3):218-25.
33. Hawkins BT, Davis TP: The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* **2005** Jun;57(2):173-85.
34. Heath P T, Nik Yusoff N K, Baker C J: Neonatal Meningitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* **2003** May;88(3):F173-8.
35. Heath P T, Schuchat A: Perinatal group B streptococcal disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* **2007** Jun;21(3):411-24.
36. Henneke P, Berner R: SIRS and group-B streptococcal sepsis in newborns: pathogenesis and perspectives in adjunctive therapy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct;11(5):333-42.
37. Hochmuth RM, Mohandas N, Blackshear PL: Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys J* 13:747–762, **1973**.
38. Hoff H, Dörries R, Geginat G: *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Aufl. Thieme-Verlag, Duale Reihe, Stuttgart (**2005**), Seite: 27, 307-318.
39. Huang SH, Stins MF, Kim KS: Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect.* **2000** Aug;2(10):1237-44.
40. Isberg RR, Barnes P: Dancing with the host; flow-dependent bacterial adhesion. *Cell.* **2002** Jul 12;110(1):1-4.
41. Kass E H, Seastone C V: The role of mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence of group A haemolytic streptococci. *J Exp Med.* **1944** Mar 1;79(3):319-30.
42. Kim HJ, Kim SY, Seo WH, Choi BM, Yoo Y, Lee KH, Eun BL, Kim HJ: Outbreak of late-onset group B streptococcal infections in healthy newborn infants after discharge from a maternity hospital: a case report. *J Korean Med Sci.* **2006** Apr;21(2):347-50.

43. Klinke R, Silbernagel S: Lehrbuch der Physiologie. 4. Auflage. Thieme-Verlag Stuttgart (2005), Seite: 158.
44. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL: Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol.* **2002** Jan;40(1):216-26.
45. Lancefield R C: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *J Exp Med.* **1933** Mar 31;57(4):571-95.
46. Lane, W.O., Jantzen, A.E., Carlon, T.A., Jamiołkowski, R.M., Grenet, J.E., Ley, M.M., Haseltine, J.M., Galinat, L.J., Lin, F.H., Allen, J.D., Truskey, G.A., Achneck, H.E: Parallel-plate Flow Chamber and Continuous Flow Circuit to Evaluate Endothelial Progenitor Cells under Laminar Flow Shear Stress. *J. Vis. Exp.* (59), e3349, DOI : 10.3791/3349 (2012).
47. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference: 200 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003 Apr;29(4):530-8.
48. Lindberg AA: Polysides (encapsulated bacteria). *C R Acad Sci III.* **1999** Nov;322(11):925-32.
49. Lione VO, Santos GS, Hirata Júnior R, Mattos-Guaraldi AL, Nagao PE: Involvement of intercellular adhesion molecule-1 and beta1 integrin in the internalization process to human endothelial cells of group B Streptococcus clinical isolates. *Int J Mol Med.* **2005** Jan;15(1):153-7.
50. Llull D, López R, García E: Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenetic streptococci. *Curr Mol Med.* **2001** Sep;1(4):475-91.
51. Lüllmann-Rauch R: Histologie. 1. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart (2003), Seite: 207-219
52. Mairey E, Genovesio A, Donnadieu E, Bernard C, Jaubert F, Pinard E, Seylaz J, Olivo-Marin JC, Nassif X, Duménil G: Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp Med.* 2006 Aug 7;203(8):1939-50.
53. Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS: Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol.* **2007** Feb;189(4):1464-7.
54. Malek AM, Ahlquist R, Gibbons GH, Dzau VJ, Izumo S: A cone-plate apparatus for the in vitro biochemical and molecular analysis of the effect of shear stress on adherent cells. *Methods in Cell Science* **1995**; 17: 165-176.
55. Malek AM, Alper SL, Izumo S: Hemodynamic shear stress and its role in Atherosclerosis. *JAMA.* **1999** Dec 1;282(21):2035-42.
56. McKinney VZ, Rinker KD, Truskey GA: Normal and shear stresses influence the spatial distribution of intracellular adhesion molecule-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to sudden expansion flow. *J Biomech.* **2006**;39(5):806-17.

57. Morantz CA; CDC: CDC updates guidelines for prevention of perinatal group B streptococcal disease. *Am Fam Physician*. **2003** Mar 1;67(5):1121, 1125-6, 1129-30.
58. Morigi M, Zoja C, Figliuzzi M, Foppolo M, Micheletti G, Bontempelli M, Saronni M, Remuzzi G, Remuzzi A: Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood*. **1995** Apr 1;85(7):1696-703.
59. Mulder CJ, Zanen HC: Neonatal group B streptococcal meningitis. *Arch Dis Child*. **1984** May;59(5):439-43.
60. Muruganandam A, Herx LM, Monette R, Durkin JP, Stanimirovic DB: Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J*. **1997** Nov;11(13):1187-97.
61. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr: Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. **1994** Aug;94(2):885-91.
62. Nerem RM, Alexander RW, Chappell DC, Medford RM, Varner SE, Taylor WR: The study of the influence of flow on vascular endothelial biology. *Am J Med Sci*. **1998** Sep;316(3):169-75.
63. Nunez R: Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr Issues Mol Biol*. **2001** Apr;3(2):39-45.
64. Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher VB, Levitt MA, Lowy FD: Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun*. **1985** Oct;50(1):218-24.
65. Paredes A, Wong P, Mason EO Jr, Taber LH, Barrett FF: Nosocomial transmission of group B Streptococci in a newborn nursery. *Pediatrics*. **1977** May;59(5):679-82.
66. Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, Rosini R, Rinaudo D, Grandi G, Telford JL, Soriani M: Pilus backbone contributes to group B Streptococcus paracellular translocation through epithelial cells. *J Infect Dis*. **2008** Sep 15;198(6):890-8.
67. Pober JS: Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp*. **1987**;131:170-84.
68. Rahman A, Fazal F: Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid Redox Signal*. **2009** Apr;11(4):823-39.
69. Ramsauer M, Kunz J, Krause D, Dermietzel R: Regulation of a blood-brain barrier-specific enzyme expressed by cerebral pericytes (pericytic aminopeptidase N/pAPN) under cell culture conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*. **1998** Nov;18(11):1270-81.
70. Reddy K, Ross JM: Shear stress prevents fibronectin binding protein-mediated Staphylococcus aureus adhesion to resting endothelial cells. *Infect Immun*. **2001** May;69(5):3472-5.
71. Reese TS, Karnovsky MJ: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. **1967** Jul;34(1):207-17.
72. Rubens CE, Smith S, Hulse M, Chi EY, van Belle G: Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. *Infect Immun*. **1992** Dec;60(12):5157-63.

73. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, et al.: A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* **1991** Dec;115(6):1725-35.
74. Sato M, Ohashi T: Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli. *Biorheology.* **2005**;42(6):421-41.
75. Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect Immun.* **2004** Nov;72(11):6197-205.
76. Schuchat A: Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev.* **1998** Jul;11(3):497-513.
77. Shet A, Ferrieri P: Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. *Indian J Med Res.* **2004** Sep; 120(3):142-50.
78. Shi F, Audus KL: Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. *Neurochem Res.* **1994** Apr;19(4):427-33.
79. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC: Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest.* **1989** Jun;83(6):2008-17.
80. Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Lütticken R, Podbielski A: Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun.* **1999** Feb;67(2):871-8.
81. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* **1994** Jan 28;76(2):301-14.
82. Steinmann U, Borkowski J, Wolburg H, Schröppel B, Findeisen P, Weiss C, Ishikawa H, Schwerk C, Schrotten H, Tenenbaum T: Transmigration of polymorphnuclear neutrophils and monocytes through the human blood-cerebrospinal fluid barrier after bacterial infection in vitro. *J Neuroinflammation.* **2013** Feb 28;10:31.
83. Stins MF, Gilles F, Kim KS: Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* **1997** Jun;76(1-2):81-90.
84. Tamura GS, Rubens CE: Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol Microbiol.* **1995** Feb;15(3):581-9.
85. Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schrotten H: Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* **2005** Jul;73(7):4404-9.
86. Thomas WE, Nilsson LM, Forero M, Sokurenko EV, Vogel V: Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **2004** Sep;53(5):1545-57.
87. Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V, Sokurenko EV: Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell.* **2002** Jun 28;109(7):913-23.

88. Traub O, Berk BC: Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1998** May;18(5):677-85.
89. Trijbels-Smeulders M, Gerards LJ, M PC, de Jong P, van Lingen RA, Adriaanse AH, de Jong GA, Kollée LA: Epidemiology of neonatal group B streptococcal disease in the Netherlands 1997 – 1998. *Paediatr Perinat Epidemiol.* **2002** Oct;16(4):334-41.
90. Vogel M, Franke J, Frank W, Schroten H: Flow in the well: computational fluid dynamics is essential in flow chamber construction. *Cytotechnology.* **2007** Sep;55(1):41-54. Epub 2007 Oct 13.
91. Whittaker SR, Winton FR: The apparent viscosity of blood flowing in the isolated hindlimb of the dog, and its variation with corpuscular concentration. *J Physiol.* **1933** Jul 10;78(4):339-69.
92. Wong D, Dorovini-Zis K: Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* **1992** Jul;39(1-2):11-21.
93. Yonekawa K, Harlan JM: Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol.* **2005** Feb;77(2):129-40.

## **6. Abbildungsverzeichnis**

|                                                                                                                                       | <u>Seite</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Abb. 1: Schematische Darstellung von Endothelzellen in Monokultur und in Ko-Kultur mit Astrozyten als Modell einer Blut-Hirn-Schranke | -9-          |
| Abb. 2: Schematische Darstellung von Arterien, Venen und Kapillaren                                                                   | -11-         |
| Abb. 3: Laminare Strömung schematisch und <i>in vitro</i>                                                                             | -12-         |
| Abb. 4: Schematische Darstellung einer Rohrströmung                                                                                   | -13-         |
| Abb. 5: Schema der parallel plate flow chamber                                                                                        | -15-         |
| Abb. 6: Schema des cone and plate apparatus                                                                                           | -16-         |
| Abb. 7: Ibidi Flusskammer                                                                                                             | -16-         |
| Abb. 8: Schema der Flusskammereinsätze                                                                                                | -17-         |
| Abb. 9: Skizze des Strömungsversuches mit Rollerpumpe                                                                                 | -31-         |
| Abb. 10: Skizze des Strömungsversuches mit Spindelpumpe (Perfusor <sup>®</sup> )                                                      | -32-         |
| Abb. 11: FACS-Prinzip                                                                                                                 | -36-         |
| Abb. 12: Wachstumskurve GBS 6313 (G1)                                                                                                 | -37-         |
| Abb. 13: DAPI-Färbung HUVEC                                                                                                           | -38-         |
| Abb. 14: DAPI-Färbung HBMEC                                                                                                           | -38-         |
| Abb. 15: Life/Dead-Färbung HUVEC                                                                                                      | -40-         |
| Abb. 16: Adhäsion GBS 6313 (G1) an HBMEC                                                                                              | -42-         |
| Abb. 17: Adhäsion GBS 90356 (R1) an HBMEC                                                                                             | -43-         |
| Abb. 18: Adhäsion GBS 6313 (G1) an HUVEC                                                                                              | -45-         |
| Abb. 19: ICAM-1 Expression in HBMEC nach Stimulation                                                                                  | -47-         |
| Abb. 20: ICAM-1 Expression in HUVEC nach Stimulation                                                                                  | -49-         |

## **7. Tabellenverzeichnis**

|                                                          | <u>Seite</u> |
|----------------------------------------------------------|--------------|
| Tabelle 1: Datentabelle Adhäsion GBS 6313 (G1) an HBMEC  | -41-         |
| Tabelle 2: Datentabelle Adhäsion GBS 90356 (R1) an HBMEC | -43-         |
| Tabelle 3: Datentabelle Adhäsion GBS 6313 (G1) an HUVEC  | -44-         |
| Tabelle 4: ICAM-1 Expression in HBMEC nach Stimulation   | -46-         |
| Tabelle 5: ICAM-1 Expression in HUVEC nach Stimulation   | -48-         |

## **8. Eidesstattliche Versicherung**

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

14.11.2016, Sebastian Klein

## **9. Danksagung**

**Mein besondere Dank gilt Prof. Dr. med. Schrotten und Dr. med. Markus Vogel für die Unterstützung bei der Themensuche für die Dissertation, der Hilfe bei der praktischen Durchführung im Labor und der Erstellung der Dissertationschrift.**

**Für die Hilfe bei der Arbeit im Labor möchte ich besonders auch Frau Marie-Luise Mölleken und Frau Annete Seibt, sowie Frau Dr. Corinna Wewer danken.**

**Zusätzlich gilt mein Dank allen Freunden und meiner Familie, die immer interessiert Anteil an diesem Projekt genommen haben, und für das private Begleiten und Ertragen der arbeitsreicheren Tage im Labor, und bei der schriftlichen Erstellung der Dissertation.**

**Vielen Dank**

## **10. Lebenslauf**

Name: Sebastian Klein  
Geburtsdatum: 25.10.1982  
Geburtsort: Duisburg  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Schulische Laufbahn, Zivildienst, Hochschullaufbahn und Anstellung:**

|                   |                                                                                                                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1989 – 1993       | Humboldt Grundschule<br>Duisburg-Hamborn                                                                       |
| 1993 – 2002       | Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium Duisburg<br>(Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)                                  |
| 2002 – 2003       | Zivildienst<br>Im Ev. Krankenhaus Duisburg-Nord                                                                |
| 2003 – 2009       | Medizinstudium<br>Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf<br>(Abschlussexamen November 2009)                     |
| 2006 – 2008       | Wissenschaftliche Tätigkeit im Labor der Kinderklinik der<br>Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Promotion) |
| 01/2010 – 05/2016 | Assistenzarzt in Weiterbildung Innere Medizin und Kardiologie<br>Kreiskrankenhaus Grevenbroich                 |
| Seit 05/2016      | Facharzt für Innere Medizin und Kardiologie<br>Im Kreiskrankenhaus Grevenbroich                                |