

Neurologische Klinik und Poliklinik Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Th. Brandt, FRCP

**Untersuchungen zur Pathophysiologie der
experimentellen Pneumokokkenmeningitis:**

**Mechanismen der Immuninduktion
(Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B)
und der Immunregulation
(Bedeutung von Mastzellen)**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Irene Bayerlein
aus Rosenheim

2005

**Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-W. Pfister

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Mitberichtersteller: PD Dr. U. Wintergerst

Prof. Dr. H. Ostermann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. U. Ködel

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 12. 2005

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Epidemiologie invasiver Pneumokokkenerkrankungen	1
1.2	Klinische Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis	1
1.3	Modelle der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	2
1.4	Pathophysiologie der intrakraniellen Komplikationen	4
1.4.1	Hirnödem und Steigerung des intrakraniellen Druckes	4
1.4.2	Meningitisassoziierte Gefäßkomplikationen und Veränderungen des zerebralen Blutflusses	5
1.5	Pathophysiologie der Entzündungskaskade der Pneumokokkenmeningitis	6
1.5.1	Immunaktivierung und Signaltransduktion	6
1.5.2	Zytokine und Chemokine	7
1.5.3	Mechanismen der Gewebeschädigung	8
1.6	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	10
1.7	Mastzellen und bakterielle Infektion	13
<u>2</u>	<u>Fragestellungen</u>	15
2.1	Fragestellung I	15
2.2	Fragestellung II	16
<u>3</u>	<u>Material und Methoden</u>	18
3.1	Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis	18
3.2	Versuchsaufbau	18
3.3	Messverfahren	21
3.3.1	Vitalparameter	21
3.3.2	Intrakranieller Druck	21
3.3.3	Messung des regionalen zerebralen Blutflusses	21
3.3.4	Messung der Kohlendioxidreaktivität der zerebralen Gefäße	22
3.3.5	Autoregulationskapazität der zerebralen Gefäße	22
3.3.6	Bestimmung der Bluthirnschrankenpermeabilität im Rattenmodell	23
3.3.7	Zellzahlbestimmung aus Liquor	23
3.3.8	Messung der IL-6 Konzentration im Liquor	24
3.4	Experimentelle Gruppen der NF- κ B-Studie in vivo	24

4.1.3.3	Zerebrale Autoregulation	42
4.1.3.4	Kohlendioxidreaktivität der zerebralen Gefäße	43
4.1.3.5	Mittlerer arterieller Blutdruck	43
4.1.4	Auswirkung eines pharmakologischen Eingriffs in die NF- κ B-Aktivierung auf die Entzündungsantwort des Wirtes	44
4.1.4.1	Liquorzellzahl	44
4.1.4.2	IL-6 Konzentration im <i>Liquor cerebrospinalis</i>	45
4.2	Die Rolle der Mastzelle in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	46
4.2.1	Nachweis von Mastzellaktivierung im Hirngewebe während experimenteller Pneumokokkenmeningitis	46
4.2.2	Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf den klinischen Status	48
4.2.3	Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf meningitisassoziierte zentralnervöse Komplikationen	48
4.2.4	Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf bakterielle Titer in ZNS und Blut	50
4.2.5	Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf die wirtseigene Abwehrreaktion	50
4.2.6	Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf meningitisassoziierte systemische Komplikationen	55
4.2.7	Auswirkung der Mastzellrekonstitution auf die Blutbildung	56
4.2.8	Auswirkung der experimentellen Pneumokokkenmeningitis auf die c-kit- und SCF-Proteinexpression	56

5 Diskussion **58**

5.1	Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	58
5.1.1	NF- κ B-Expression und -Aktivierung im ZNS während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	58
5.1.2	NF- κ B als Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie	61
5.1.2.1	Die Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung ALLN und BAY 11-7085	61
5.1.2.2	Eingriffe in die NF- κ B-Aktivierung bei der bakteriellen Meningitis	62
5.1.2.3	Probleme der NF- κ B-Inhibierung	64
5.2	Die Rolle der Mastzelle in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	66
5.2.1	Mastzellspezifische Erregererkennung und Mastzellaktivierung	66
5.2.2	Funktionelle Bedeutung der Mastzellen in Erregerabwehr und Neuroinflammation	68

5.2.3	Funktionelle Bedeutung der Mastzellen während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	69
5.2.3.1	Systemische Komplikationen	70
5.2.3.2	Zentralnervöse Komplikationen	71
5.2.4	Bedeutung der Mastzelle für die wirtseigene Immunreaktion bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis	72
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>76</u>
6.1	Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	76
6.2	Die Bedeutung der Mastzelle in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	77
<u>7</u>	<u>Ausblick</u>	<u>80</u>
<u>8</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>82</u>
<u>9</u>	<u>Danksagung</u>	<u>104</u>
<u>10</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>105</u>

Abkürzungsverzeichnis

ALLN	N-Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal
BAY 11-7085	(2E)-3-[[4-(1,1 Dimethylethyl)phenyl]sulfonyl]-2-propenenitril
BBB	Bluthirnschranke (<i>blood brain barrier</i>)
BMMC	<i>bone marrow-derived mast cell</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CLP	Caecum-Ligation- und Punktion (Modell der peritonealen Sepsis)
CSF	<i>Liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid)</i>
DPPI	Dipeptidyl-Peptidase I
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HDC	Histamindecarboxylase
ICP	intrakranieller Druck (<i>intracranial pressure</i>)
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
KBE	koloniebildende Einheiten
KG	Körpergewicht
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck (<i>mean arterial blood pressure</i>)
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PGN	Peptidoglykan
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss (<i>regional cerebral blood flow</i>)
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
W/W ^v	WBB6F1/J- <i>Kit</i> ^W / <i>Kit</i> ^{W-v} (mastzelldefizienter Mäusestamm)
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie invasiver Pneumokokkenerkrankungen

Streptococcus pneumoniae ist eines der bedeutendsten humanpathogenen Bakterien weltweit. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sterben jedes Jahr etwa 2 Millionen Menschen an den Folgen einer Pneumokokkeninfektion (WHO, 1998). Lebensbedrohliche klinische Manifestationen einer Pneumokokkeninfektion sind Pneumonie, Sepsis und Meningitis. Die Sterblichkeitsrate hängt dabei entscheidend von der klinischen Manifestation ab. So versterben in den USA über 20 %, in den Niederlanden sogar 30 % der erwachsenen Patienten, die an einer Pneumokokkenmeningitis erkranken (Schuchat et al. 1997; van De Beek et al. 2004), während die Letalität bei der Pneumokokkenpneumonie im Erwachsenenalter unter 8 % liegt (Robinson et al. 2001). Noch deutlicher werden die prognostischen Unterschiede zwischen Pneumonie und Meningitis, wenn man zurück in die Zeit vor Einführung des Penicillins blickt. Pneumokokkenmeningitiden verliefen damals fast ausnahmslos tödlich (Tripoli 1936), während eine Pneumokokkenpneumonie von zwei Drittel der Patienten überlebt wurde.

Neben der hohen Letalität stellt die hohe Rate neurologischer Folgeschäden nach überstandener Pneumokokkenmeningitis (durchschnittlich 30-50 %) ein großes medizinisches Problem dar. Zentrale neurologische Residuen sind beispielsweise fokalneurologische oder neuropsychologische Defizite, Hörschaden oder Hydrozephalus (Bohr et al. 1984; Auburtin et al. 2002; Kastenbauer und Pfister 2003). Diese Befunde machen deutlich, dass eine Infektion des Leptomeningealraumes mit *Streptococcus pneumoniae* weit gefährlicher für den Wirtsorganismus ist als eine periphere Infektion wie z. B. die der Lunge. Erwähnenswert ist ferner, dass die Pneumokokkenmeningitis heute mit 1,1 Erkrankten/100 000 Einwohnern die häufigste und gleichzeitig die gefährlichste Form der endemischen bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter ist (Schuchat et al. 1997; van De Beek et al. 2004).

1.2 Klinische Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis

Für die ungünstige Prognose der Pneumokokkenmeningitis werden in erster Linie die in der Akutphase auftretenden intrakraniellen Komplikationen verantwortlich gemacht. Aber auch systemische meningitisassoziierte Komplikationen wie septischer Schock, disseminierte

intravasale Gerinnung, ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) und dialysepflichtiges Nierenversagen sind für die hohe Letalität verantwortlich. Die häufigsten intrakraniellen Komplikationen sind zerebrovaskuläre Veränderungen, Hydrozephalus und Hirnödem.

In einer Studie zur Pneumokokkenmeningitis von Kastenbauer und Pfister (2003), die durch konsequentes intensivmedizinisches Monitoring und neuroradiologische Untersuchung für die Diagnostik zentralnervöser Komplikationen sehr sensitiv war, zeigten sich folgende Befunde: zerebrovaskuläre Komplikationen traten in 21,8 % als arterielle und in 10,3 % als venöse Veränderungen auf. Bei 28,7 % der Patienten trat ein diffuses Hirnödem auf, bei 16,1 % ein Hydrozephalus, Krampfanfälle in 27,6 % und intrakranielle Blutungen in 9,2 % der Fälle. 25,8 % erlitten einen meningitisassoziierten Hörverlust. Seltene Komplikationen waren Myelitis und Cerebritis. Insgesamt erlitten in dieser Studie 75 % der Patienten intrakranielle und 38 % systemische Komplikationen. 24,1 % der Patienten verstarben und nur 48 % konnten in gutem Gesundheitszustand entlassen werden.

1.3 Modelle der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Um die Pathomechanismen der Pneumokokkenmeningitis besser verstehen zu können, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt.

Prinzipiell kann man, abhängig von dem Ort der bakteriellen Inokulation, zwei Systeme von Tiermodellen unterscheiden (Täuber und Zwahlen 1994; Koedel und Pfister 1999a). Einmal wird der Keim intranasal (Zwijnenburg et al. 2001) oder intraperitoneal (Rodriguez et al. 1991) verabreicht. Diese Modelle sind gut geeignet die Pathogenese des hämatogenen Infektionsweges zu studieren. Die Stärke dieses Versuchsansatzes liegt in der Untersuchung der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt hinsichtlich Kolonisierung des Nasopharyngealraumes (bei intranasaler Inokulation), Eindringen und Überleben des Erregers in der Blutbahn sowie hinsichtlich des Erregereintritts in das ZNS (Zentralnervensystem). Die Probleme dieses Ansatzes liegen darin, dass in der Regel nur rund die Hälfte der Tiere eine Meningitis entwickeln, das Zeitintervall bis zur Erkrankung variiert und die Tiere überwiegend an septischem Schock versterben (Rodriguez et al. 1991; Quagliarello et al. 1986; Koedel und Pfister 1999a). Somit sind diese Modelle wenig geeignet, um Aussagen über die Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis treffen zu können. Das zweite Modellsystem, bei dem die Keime direkt in den Liquorraum eingebracht werden, ist dazu weit besser geeignet (Täuber und Sande 1984; Quagliarello et al. 1986; Koedel et al. 2001). Dieses Modell entspricht im

weitesten dem häufigsten Infektionsweg bei Pneumokokkenmeningitis, der Infektion *per continuitatem*, wie sie im Rahmen ZNS-naher Entzündungen (z. B. *Otitis media* und Sinusitis), neurochirurgischer Eingriffe und Schädel-Hirn-Traumata mit Liquorleckage vorkommt. Eine Bakteriämie entwickelt sich in diesem Modell sekundär zur ZNS-Infektion und die Versuchstiere sterben sowohl an neurologischen als auch an systemischen Komplikationen. Dieses Modell ist ungeeignet um die Vorgänge bis zum Eindringen des Erregers in das ZNS zu untersuchen. Doch lassen sich in diesem System die Induktion der meningealen Inflammation sowie die daraus resultierenden Komplikationen gut untersuchen. Zudem sind diese Modelle auch geeignet die Wirkung potentieller Therapeutika zu prüfen, da hier reproduzierbar eine unbehandelt letal verlaufende Erkrankung mit vorhersehbarem Zeitverlauf verursacht wird.

Momentan werden hauptsächlich zwei Modelle der Pneumokokkenmeningitis mit direkter Pathogeninokulation verwendet: das adulte Ratten- und das adulte Mausmodell. Zusätzlich existiert das 1974 von Dacey und Sande etablierte adulte Kaninchenmodell.

1986 führten Quagliariello et al. ein Modell der bakteriellen Meningitis an adulten Ratten ein, das die Grundlage vieler Experimente bildete und seit seiner Einführung vielfältig modifiziert wurde. Das aktuell in unserem Labor verwendete Modell ist ausführlich unter 3.2. beschrieben. Die Vorteile liegen: (i) in der relativ großen Körpergröße der Tiere, die es erlaubt, Liquor- und Blutproben in für Mehrfachbestimmungen ausreichender Menge zu gewinnen. (ii) in der Möglichkeit zahlreiche pathophysiologische Parameter zu bestimmen wie z. B. intrakraniellen Druck, zerebrovaskuläre Autoregulation und Kohlendioxidreagibilität sowie Blutdruck und Blutgasanalysen.

Um zusätzlich die Möglichkeiten genetisch veränderter Tiere nutzen zu können, wurde von Koedel et al. (2001) ein Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis entwickelt (vgl. Abschnitt 3.6). Die Verwendung von transgenen bzw. knockout Mäusen bietet Vorteile für die Untersuchung inflammatorischer Wirtsfaktoren, die an den komplexen pathophysiologischen Abläufen bei bakterieller Meningitis beteiligt sind: (i) Probleme pharmakologischer Eingriffe, wie unzureichende Spezifität, fehlende ZNS-Gängigkeit oder Nebenwirkungen von Pharmaka, entfallen. (ii) Für viele molekularbiologische Untersuchungen stehen für Mäusegewebe kommerziell erhältliche Materialien wie Antikörper oder DNA-Arrays zur Verfügung. (iii) Der Versuchsaufbau ist weniger aufwendig und somit rascher durchzuführen. Probleme ergeben sich vor allem durch die kleine Körpergröße: (i) Man erhält lediglich geringe Probenvolumina, Liquoruntersuchungen sind dadurch auf die Zellzahlbestimmung begrenzt. (ii) Die Untersuchung pathophysiologischer Parameter wie zerebrovaskuläre Autoregulation und Kohlendioxidreagibilität sowie Monitoring von Vitalparametern wäre nur unter großem Aufwand

durchführbar. Neben dem Problem der Körpergröße ergibt sich aufgrund der genetischen Veränderung die Problematik flankierender Gene und des genetischen Hintergrundes, die die Befundinterpretation in manchen Fällen erschweren kann.

1.4 Pathophysiologie der intrakraniellen Komplikationen

Während der akuten Phase der bakteriellen Meningitis kommt es u. a. durch Proteasen und Oxidantien zu einer Endotheldysfunktion, die zu einem Verlust der zerebralen Autoregulation, der CO₂-Reaktivität der Hirngefäße und der Integrität der Bluthirnschranke führt und somit eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der intrakraniellen Komplikationen bei bakterieller Meningitis spielt.

1.4.1 Hirnödem und Steigerung des intrakraniellen Druckes

In der Regel ist der Hauptanteil des zerebralen Ödems bei Pneumokokkenmeningitis durch ein vasogenes Ödem verursacht. Hierbei treten im Rahmen der Bluthirnschranken(BBB)störung osmotisch wirksame Plasmabestandteile in das ZNS über (Fishman 1975; Koedel et al. 1994). Doch auch zytotoxisches und interstitielles Ödem können eine Rolle spielen. Das zytotoxische Ödem wird durch eine Störung des zellulären Energiestoffwechsels aufgrund bakterieller und granulozytärer Toxine sowie durch Ischämie ausgelöst. Ein interstitielles Ödem entsteht durch transependymale Liquorverschiebung von den Liquorräumen ins Parenchym, ausgelöst durch eine Liquorresorptionsstörung im Bereich der Arachnoidalzotten oder durch einen obstruktiven Hydrozephalus (Pfister et al. 1993; Scheld et al. 1980; Quagliarello und Scheld 1992). Alle drei Mechanismen können zu einem Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) führen. Experimentell zeigte sich allerdings, dass Ödem und ICP nicht immer gekoppelt sind; so verminderte eine Therapie mit Methylprednisolon zwar das Hirnödem, konnte aber den ICP nicht senken (Täuber et al. 1985). Des Weiteren kann der ICP aufgrund erhöhten intrakraniellen Blutvolumens ansteigen, ausgelöst durch gestörte zerebrale Autoregulation, entzündliche Hyperämie (Tureen et al. 1990) oder im Rahmen einer Abflußstörung bei septischer Sinusvenenthrombose (Pfister et al. 1993).

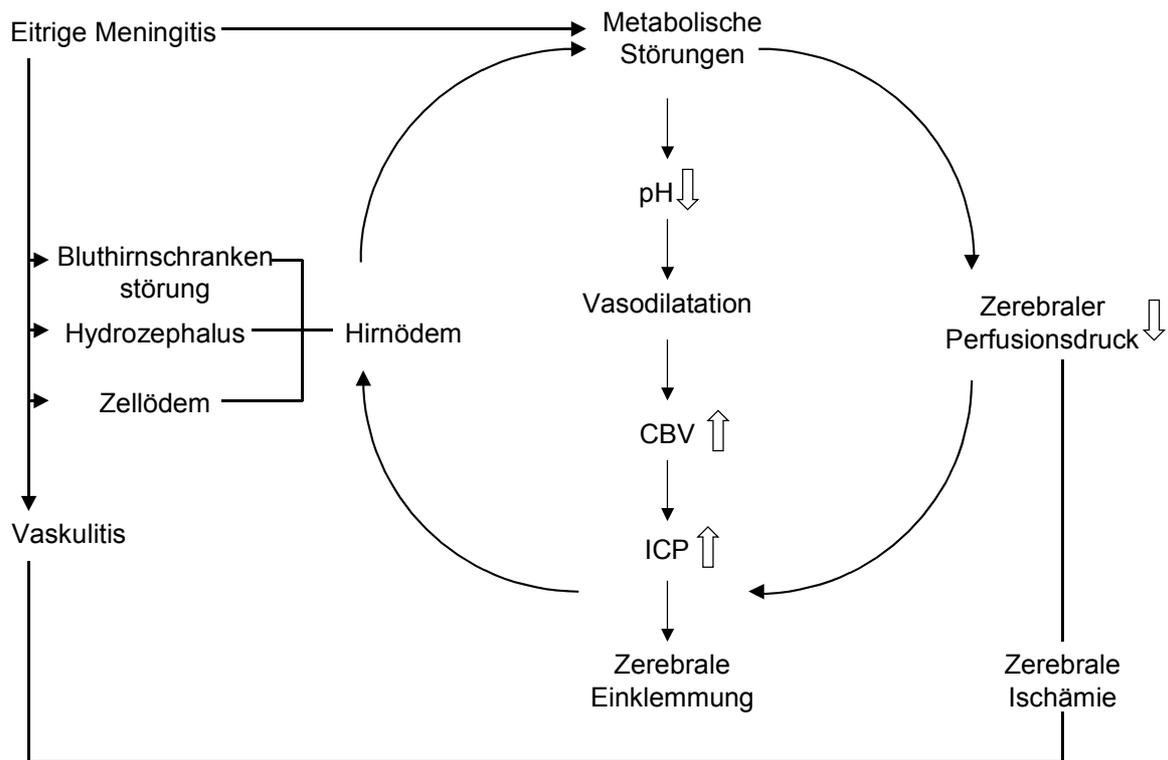


Abbildung 1 Circulus vitiosus der ZNS-Komplikationen bei bakterieller Meningitis. CBV: zerebrales Blutvolumen. ICP: intrakranieller Druck (nach Pfister 1989).

1.4.2 Meningitisassoziierte Gefäßkomplikationen und Veränderungen des zerebralen Blutflusses

Die zerebralen Gefäße sind bei der bakteriellen Meningitis in vielfältiger Weise betroffen. Neben der oben beschriebenen Erhöhung der Kapillarpermeabilität, kann es zu Arteriitiden und Thrombophlebitiden kommen, wie in Autopsiestudien gezeigt wurde (Cairns et al. 1946; Dodge et al. 1965). Angiographisch und dopplersonographisch konnte man Wandunregelmäßigkeiten, Vasospasmen, arterielle Gefäßverschlüsse, kortikale Venenthrombosen und Sinusthrombosen nachweisen (Pfister et al. 1992; Ries et al. 1997).

In Tiermodellen der Pneumokokkenmeningitis lässt sich schon nach 6 Stunden ein Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF) und eine Erweiterung der pialen Arteriolen (Pfister et al. 1995; Pfister et al. 1990; Koedel et al. 1995) feststellen, in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung kann es zu einem Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation und

CO₂-Reaktivität sowie zu zerebraler Ischämie kommen (Tureen et al. 1990; Koedel und Pfister 1997).

Durch die Autoregulation wird unter physiologischen Bedingungen der zerebrale Blutfluss unabhängig vom arteriellen Mitteldruck in einem Bereich von 50 bis 150 mmHg konstant gehalten. Wird dieser Mechanismus gestört, ist die Hirnperfusion direkt vom Blutdruck abhängig. Blutdruckschwankungen können daher sowohl zu vermehrtem CBF und daraus resultierend zu steigendem ICP führen, als auch zu einer Minderperfusion und damit zu Unterversorgung des Gewebes bis hin zur zerebralen Ischämie. Auch beim Menschen konnte man eine Autoregulationsstörung während eitriger Meningitis nachweisen (Paulson et al. 1974).

Die CO₂-Reaktivität, ein weiterer Regulationsmechanismus der zerebralen Durchblutung, dient der Konstanthaltung des pH-Wertes zerebraler Flüssigkeiten. Ein Anstieg des arteriellen CO₂-Partialdrucks [Pa_{CO₂}] führt über Kohlensäurebildung zu erhöhter Protonenkonzentration, die eine Vasodilatation auslöst. Auch andere Säuren wie Laktat oder Pyruvat führen über diesen Mechanismus zu einem Anstieg des zerebralen Blutflusses (Jones et al. 1989).

1.5 Pathophysiologie der Entzündungskaskade der Pneumokokkenmeningitis

1.5.1 Immunaktivierung und Signaltransduktion

Damit eine Entzündungsreaktion im Liquorraum in Gang gesetzt wird, ist ein beträchtliches bakterielles Wachstum im Liquor notwendig, da die Akutphaseantwort des Wirts erst bei einer bakteriellen Konzentration von mehr als 10⁵ koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml Liquor beginnt (Tuomanen 1996). Allerdings können sich Pneumokokken im Liquorraum ziemlich ungestört vom Immunsystem des Wirtes vermehren. Die Mechanismen dafür sind noch weitgehend unklar. Man geht davon aus, dass im Liquorraum ein Defekt der Phagozytose besteht, bedingt durch unzureichende Funktion zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen, insbesondere von Neutrophilen, Antikörpern und Komplement (Quagliarello und Scheld 1992; Koedel et al. 2002a).

Als Folge der hohen Pneumokokkenkonzentrationen können bei der bakteriellen Autolyse und/oder der Antibiotika-induzierten Lyse große Mengen an subkapsulären bakteriellen Komponenten freigesetzt werden.

Obwohl man davon ausgeht, dass diese Pneumokokkenzellwandbestandteile, v. a. Peptidoglykan (PGN) und Teichonsäure, die Entzündungsreaktion des Wirtes auslösen, sind die

Rezeptoren für *S. pneumoniae* und seine Bestandteile auf der Wirtsseite und die nachfolgende membranassoziierte Signaltransduktionskaskade noch weitgehend unbekannt.

Ein sehr früher bekannter Schritt in der Immunaktivierung ist die Bindung von PGN und Teichonsäure an membranständiges CD14 (mCD14), einem Mustererkennungsrezeptor (*pattern recognition receptor*); allerdings besitzt mCD14 nur eine extrazelluläre Domäne und kann das Signal allein nicht in die Zelle weiterleiten. Aufgrund von *in vitro* Studien kam TLR (*toll-like receptor*)-2 als potentieller Kandidat für die Signalweiterleitung in Frage, auch eine tierexperimentelle Studie spricht für eine TLR-2-abhängige zelluläre Erkennung von *S. pneumoniae*, doch scheinen daneben auch andere Rezeptoren wie z. B. TLR-4, allein oder im Zusammenspiel, die bakterielle Erkennung zu vermitteln (Koedel et al. 2003).

Hinsichtlich der intrazellulären Signaltransduktion liegen *in vitro*-Studien vor. Die bei Entzündungen häufig aktivierten Signaltransduktionskaskaden, der IKK-NF- κ B-Weg (IKK: Kinasen der NF- κ B Inhibitoren I κ B; NF- κ B: nukleärer Faktor κ B) und die Signaltransduktion über mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) scheinen durch Pneumokokken in verschiedenen Zelltypen aktiviert zu werden. Pneumokokkenzellwandbestandteile konnten in Mausmakrophagen die MAP-Kinasen ERK (extrazelluläre signalregulierte Kinase)-1, ERK-2 und in geringem Maß p38 aktivieren (Schumann et al. 1998). Die Zyto- und Chemokinausschüttung mit Pneumokokkenzellwandbestandteilen stimulierter Mikroglia ist von p38 und ERK-2/ERK-1 MAP-Kinase-Aktivierung abhängig (Hanisch et al. 2001). Spellerberg et al. zeigten, dass Pneumokokken NF- κ B in undifferenzierten humanen und differenzierten Mausmonozyten aktivieren können (Spellerberg et al. 1996).

1.5.2 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind wichtige Koordinatoren der Entzündungsreaktion; ihre Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis wurde in zahlreichen Studien belegt (Koedel et al. 2002a). Nach Inokulation von Pneumokokken kann man innerhalb kurzer Zeit die Zytokine der frühen Immunantwort – Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin(IL)-1 β und IL-6 - im Liquor nachweisen, die der Einwanderung von Entzündungszellen und der Bluthirnschrankenstörung vorangehen (Saukkonen et al. 1990). Produziert werden diese Zytokine im ZNS u. a. von Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen. In Liquorproben von Patienten mit bakterieller Meningitis konnten erhöhte TNF- α -, IL-1 β - und IL-6-Spiegel nachgewiesen wer-

den, wobei allerdings allein die Höhe des IL-1 β -Spiegels mit der Schwere der Erkrankung korrelierte (van Furth et al. 1996; Täuber und Moser 1999).

Eine wichtige Rolle in der Initiierung und der Verstärkung der Entzündungsreaktion bei einer Pneumokokkenmeningitis scheint das IL-1 β -Converting-Enzyme (ICE oder Caspase 1) zu spielen, das die inaktiven Vorläufer von IL-1 β und IL-18 in ihre aktive Form umwandelt. Möglicherweise führt es über NF- κ B-Aktivierung zur Aufrechterhaltung der Entzündung. Eine pharmakologische Blockierung dieses Enzyms im Tiermodell und Versuche an Caspase-1-defizienten Mäusen zeigten einen starken antiinflammatorischen Effekt, der mit Verringerung der meningitisassoziierten Komplikationen und besserem klinischen Status der Tiere einherging (Koedel et al. 2002b).

IL-1 β und TNF- α stimulieren die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die die Leukozytenmigration in den Liquorraum begünstigen.

Chemokine sind eine große Familie chemotaktischer Zytokine, die bei der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten eine wichtige Rolle spielen. Die stärkste chemotaktische Wirkung im Rahmen der bakteriellen Meningitis besitzen IL-8 und MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) (Spanaus et al. 1997; Sprenger et al. 1996) sowie die funktionellen Homologe des menschlichen IL-8 in der Maus: MIP- (*macrophage inflammatory protein*)-2 und KC (*keratinocyte-derived cytokine*).

1.5.3 Mechanismen der Gewebeschädigung

Im Rahmen der Abwehrreaktion setzen aktivierte Effektorzellen eine Reihe von Substanzen frei, u. a. Oxidantien und Proteasen, die neben den Krankheitserregern auch gesundes Gewebe zerstören können.

Matrixmetalloproteasen (MMPs), zinkabhängige Endoproteasen, können Bestandteile der Extrazellulärmatrix degradieren. In Tierversuchen der bakteriellen Meningitis zeigte sich, dass insbesondere MMP-9 zu BBB-Störung und neuronaler Zellschädigung beiträgt (Paul et al. 1998; Leib et al. 2000). Auch bei Patienten mit hohen MMP-9 Liquorspiegeln entwickelten sich häufiger neurologische Spätschäden (Leppert et al. 2000).

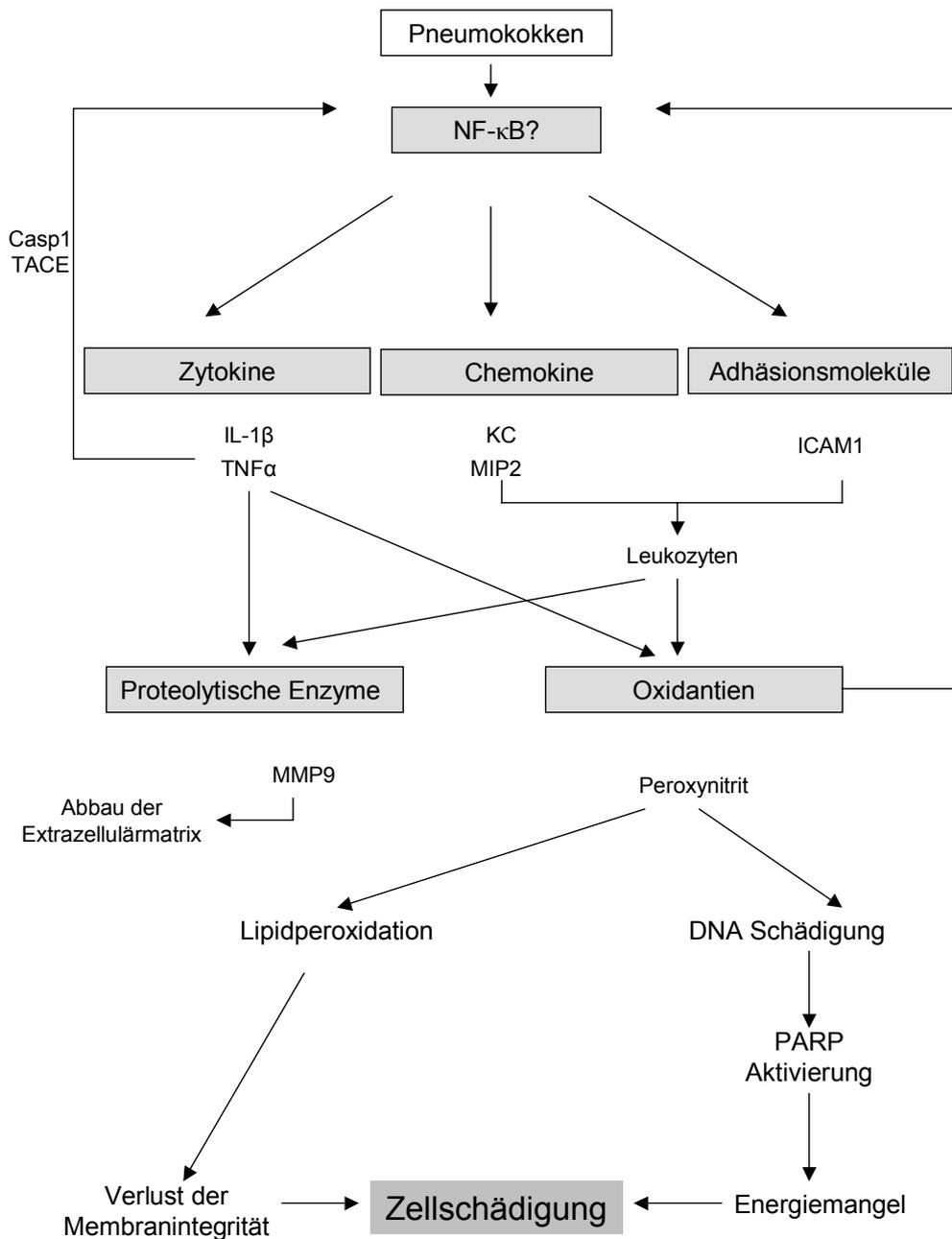


Abbildung 2 Mechanismen der Hirnschädigung bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis. Ausgelöst durch subkapsuläre Komponenten der Pneumokokken kommt es zur Induktion zentraler Wirtsfaktoren, wie Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Die inaktiven Vorläufer der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α werden durch die Proteasen Caspase 1 (Casp 1) und TNF- α konvertierendes Enzym (TACE) aktiviert. IL-1 β und TNF- α in ihrer Wirkform sind potente NF- κ B Aktivatoren, dieser Weg könnte durch überschießende NF- κ B-Aktivierung zu einer unkontrollierten Expression von Entzündungsmediatoren führen. Chemokine und Adhäsionsmoleküle sind entscheidend an der massiven neutrophilen Liquorpleozytose beteiligt. Aktivierte Neutrophile schütten zahlreiche potentiell zytotoxische Substanzen aus, darunter Oxidantien wie Peroxynitrit und proteolytische Enzyme wie MMP. MMP können über Degradierung der Extrazellulärmatrix zur Bluthirnschrankenstörung beitragen. Die Peroxidation ungesättigter Fette der Zellmembran durch Peroxynitrit kann zu einem Verlust der Membranintegrität führen. Oxidantieninduzierte DNA-Schädigung kann zur Aktivierung von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und in der Folge zu intrazellulärem Energiemangel führen (nach Koedel et al. 2002a).

Neben den Proteasen sind reaktive Sauerstoffabkömmlinge [ROS] und reaktive Stickstoffintermediärverbindungen [RNI] wie Stickstoffmonoxid wichtige Effektormoleküle der Abwehrzellen. Experimente der letzten Jahre zeigen, dass sie zu den Schlüsselmediatoren der pathophysiologischen Veränderungen der bakteriellen Meningitis gehören (Koedel und Pfister 1999b; Koedel et al. 1995; Buster et al. 1995; Koedel und Pfister 1997; Kastenbauer et al. 1999b). ROS konnten im Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis detektiert werden und Antioxidantien reduzierten oder verhinderten meningitisassoziierte Komplikationen (Leib et al. 1996; Dirnagl et al. 1993; Koedel und Pfister 1997; Klein et al. 2003). Bekannte Mechanismen der oxidativen Schädigung im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis umfassen z. B. die Peroxidation ungesättigter Fette der Zellmembran durch Peroxynitrit mit folgendem Verlust der Membranintegrität (Kastenbauer et al. 2002) oder oxidantieninduzierte DNA-Schädigung, die über Aktivierung von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) zu einem intrazellulären Energiemangel mit resultierender Zelldysfunktion und Nekrose führt (Koedel et al. 2002c). Verschiedene experimentelle Daten weisen darauf hin, dass NF- κ B in bestimmten Zelltypen sowohl durch oxidativen Stress aktiviert wird, als auch eine funktionelle Assoziation zwischen PARP und NF- κ B besteht. Dies könnte durch Aufrechterhalten der Entzündungsreaktion einen weiteren möglichen Schädigungsmechanismus von ROS und RNS darstellen (Li und Karin 1999; Janssen-Heininger et al. ; Oliver et al. 1999) (siehe **Abbildung 2**).

1.6 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Transkriptionsfaktoren sind ein wichtiges Bindeglied zwischen extrazellulären Signalen und Veränderungen der Genexpression. Sie sind genspezifisch und regulieren die Transkription der Zielgene indem sie an spezifische Erkennungselemente der DNA binden. Meist erhöhen sie die Transkriptionsrate und damit die Proteinsynthese. Einige davon sind zellspezifisch und wichtig für Zelldifferenzierung und zelluläre Prozesse, wie z. B. Proliferation. Andere kommen ubiquitär vor und können damit Wirkung auf ein ganzes System, wie z. B. die Immunantwort, entfalten.

NF- κ B wurde 1986 erstmals beschrieben und zwar als nukleärer Faktor, daher NF, der die Expression des κ -Leichtkettengenes in B-Lymphozyten der Maus reguliert, daher κ B (Sen und Baltimore 1986). Dieser Name ist allerdings irreführend, da NF- κ B in einer Vielzahl von Zellen, wie zum Beispiel in Lymphozyten, Granulozyten und Zellen des ZNS exprimiert wird,

an der Transkription zahlreicher Gene beteiligt ist und im inaktiven Zustand in der Regel im Zytoplasma und nicht im Kern vorliegt.

Mittlerweile kennt man verschiedene NF- κ B Proteine. Der Prototyp der induzierbaren Form von NF- κ B ist ein Heterodimer aus zwei Proteinen: die p65 Untereinheit (auch relA genannt) und die p50 Untereinheit. Andere Untereinheiten wie rel, relB, ν -rel und p52 können auch Teil des aktivierten NF- κ B sein und es ist wahrscheinlich, dass die verschiedenen Formen von NF- κ B unterschiedliche Gruppen von Zielgenen aktivieren (Baeuerle und Baltimore 1996; Siebenlist et al. 1994; Li und Verma 2002).

NF- κ B wird durch eine Vielzahl von Stimuli, die auch bei der bakteriellen Meningitis von Bedeutung sind, sehr schnell (innerhalb von Minuten) aktiviert; so z. B. durch Bakterien oder Zytokine und ROS. Anders als die meisten anderen Transkriptionsfaktoren liegt NF- κ B in seiner inaktiven Form nicht im Zellkern an DNA gebunden vor, sondern befindet sich im Zytoplasma unstimulierter Zellen. Er ist dort an zytoplasmatische inhibitorische Proteine, sogenannte I κ Bs, gebunden (Baldwin 1996). Mindestens sechs verschiedene I κ B Proteine kontrollieren die Aktivität der NF- κ B Dimere; I κ B α , - β , und - ϵ sind stimulusabhängige Regulatoren (Ghosh et al. 1998). I κ B Moleküle maskieren das nukleäre Lokalisierungssignal von NF- κ B und verhindern die nukleäre Translokation des Faktors. Als Antwort auf proinflammatorische Stimuli wird I κ B zuerst an seiner N-terminalen Domäne durch den I κ B-Kinase-Komplex IKK zweifach phosphoryliert. Im Rahmen der Entzündung ist die Untereinheit IKK- β hauptverantwortlich für IKK- und NF- κ B-Aktivierung. Danach wird I κ B polyubiquitinyliert und zuletzt durch 26S Proteasomen degradiert (Baeuerle und Henkel 1994; Karin und Ben Neriah 2000). Die Degradierung von I κ B durch das Proteasom ist essentiell für die NF- κ B-Aktivierung, da 26S Proteasominhibitoren die nukleäre Translokation von NF- κ B effizient blockieren, was darauf hinweist, dass weder Phosphorylierung noch Ubiquitinylierung allein für die Dissoziation von I κ B und NF- κ B ausreichen.

Nach der Lösung von I κ B gelangt NF- κ B sehr schnell in den Zellkern und somit können bestimmte durch NF- κ B regulierte Gene innerhalb von Minuten nach Zellstimulation transkriptionell aktiviert werden. Im Kern initiiert NF- κ B schnell eine Transkription von mRNA der Gene, die hochaffine Bindungsmotive für NF- κ B in ihren Enhancer- oder Promotorregionen besitzen (Konsensussequenz: 5'-GGGRNNYYCC-3') (Grimm und Baeuerle 1993). Für mehr als 60 proinflammatorische Gene, die an der Kontrolle von Zelladhäsion, Immunstimulation, Apoptose, Chemoattraktion, Differenzierung, Degradierung extrazellulärer Matrix, Redox-

metabolismus und Mediatorproduktion beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass sie durch NF- κ B reguliert werden (Barnes und Karin 1997; Tak und Firestein 2001).

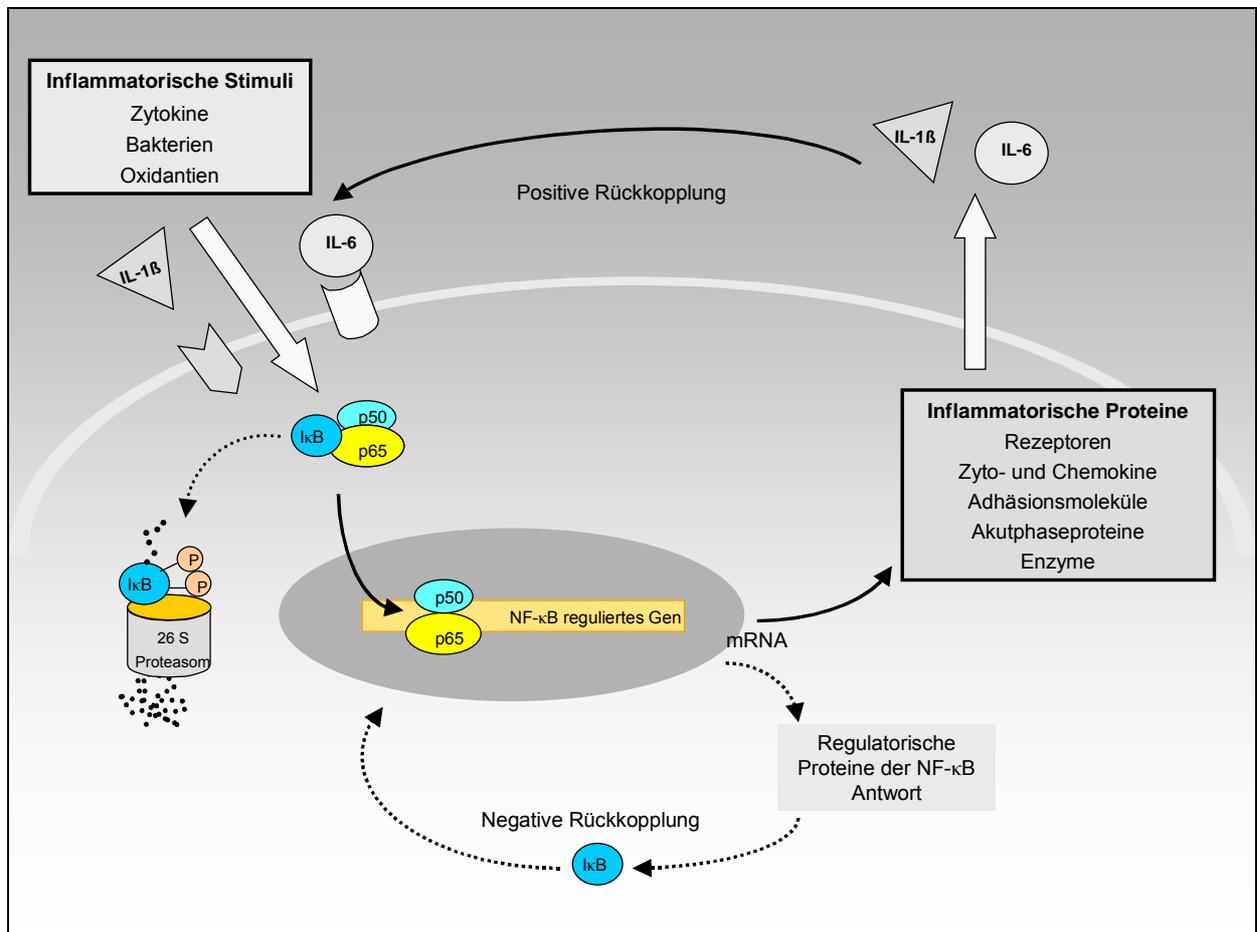


Abbildung 3 Schematische Darstellung von NF- κ B als Schaltstelle in der Entzündungsreaktion

Im Rahmen der Aktivierung von NF- κ B kommt es zu einer Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und einem proteolytischen Abbau des inhibitorischen Proteins I κ B durch I κ B-Kinasen und 26 S Proteasomen. Freies NF- κ B (p50/p65) dringt dann in den Kern ein und initiiert die Transkription von Genen mit entsprechender Konsensussequenz in ihrer Promotorregion. Die Aktivierung von NF- κ B kann durch eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren erfolgen und führt in der Folge zur Genexpression zahlreicher inflammatorischer Proteine. Da einige dieser Proteine – wie hier für IL-1 β und IL-6 gezeigt – sowohl NF- κ B aktivieren als auch durch NF- κ B reguliert sind, kann es zu einer positiven Rückkopplung auf die Transkription für Entzündungsmediatoren kodierender Gene kommen. Eine Regulierung der NF- κ B-Antwort kann durch die NF- κ B-abhängige Expression von I κ B erfolgen.

Warum ist es sinnvoll Transkriptionsfaktoren, im besonderen die Rolle von NF- κ B im Rahmen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis zu untersuchen?

Bei der Pneumokokkenmeningitis kommt es schnell zu einer starken entzündlichen Reaktion, während dieser man einen deutlichen Anstieg inflammatorischer Zyto- und Chemokine (z. B. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8) sowie reaktiver Sauerstoffspezies beobachten kann (Koedel et al.

2002a; Koedel und Pfister 1999b). NF- κ B ist sowohl an der Initiierung der Genexpression dieser Faktoren und damit der Entzündungsinitiierung beteiligt, als auch an der Aufrechterhaltung und Verstärkung ihrer Synthese, da einige Mediatoren, vor allem TNF- α und IL-1 β zu einer positiven Rückkopplung auf die NF- κ B Aktivierung führen. Damit kann NF- κ B eine Schlüsselrolle in diesem Entzündungsgeschehen spielen.

Während der letzten zehn Jahre fanden sich zahlreiche Hinweise darauf, dass eine übermäßige Aktivierung von NF- κ B zur unkontrollierten Expression proinflammatorischer Mediatoren führen kann und damit zur Pathogenese entzündlicher Krankheiten beiträgt. Untersuchte Beispiele sind rheumatoide Arthritis, Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis, experimentelle Kolitis sowie septischer Schock. Auch bei Erkrankungen des ZNS einschließlich Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose, traumatischer ZNS-Schädigung und zerebraler Ischämie konnte eine NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden. Wie oben erwähnt, weiß man bereits, dass Pneumokokken NF- κ B in undifferenzierten humanen und differenzierten Mausmonocyten aktivieren können (Spellerberg et al. 1996). Außerdem konnten Ichiyama et al. NF- κ B-Aktivierung in Zellen aus dem Liquor an Pneumokokkenmeningitis erkrankter Patienten nachweisen (Ichiyama et al. 2002).

Daher scheint die Kontrolle der NF- κ B-Aktivierung ein interessanter therapeutischer Angriffspunkt im Rahmen der eitrigen Meningitis zu sein, um die durch exzessive Ausschüttung von Entzündungsmediatoren entstehende Gewebeschädigung zu verringern.

1.7 Mastzellen und bakterielle Infektion

Während der kaiserlichen Herrschaft war die chinesische Mauer leicht überwunden und sie war an und für sich keine gute Wehreinrichtung gegen resolute Angreifer. Es war mehr eine Kommunikationsroute weit entfernt vom Zentrum des Kaiserreiches. Eine Kette von einsamen Wächtern, die die Eindringlinge schnell angriffen und ihr Fortschreiten bremsten, während sie stärkere Unterstützung anforderten (Benoist und Mathis 2002).

Mastzellen, an Grenzflächen zwischen Körper und Umwelt angesiedelt, scheinen eine ähnliche Aufgabe zu erfüllen (Galli et al. 1999). Bekannt sind sie als die essentiellen ortsständigen Effektorzellen der allergischen Immunantwort. Doch die strategische Lage von Mastzellen und zahlreiche ihrer Fähigkeiten, darunter Phagozytose, Antigenpräsentation sowie Produktion und Sekretion eines breiten Spektrums von Entzündungsmediatoren, weisen auf eine

potentielle Rolle von Mastzellen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort auf Bakterien hin.

Mit Hilfe des Vergleichs zwischen mastzelldefizienten Mäusen, entsprechenden Kontrolltieren und initial mastzelldefizienten, mit kultivierten Mastzellen selektiv rekonstituierten Tieren, konnte auch *in vivo* die Beteiligung von Mastzellen an verschiedenen Entzündungsreaktionen evaluiert werden.

So konnte zum Beispiel in Tiermodellen zur Peritonitis gezeigt werden, dass mastzelldefiziente Mäuse gegenüber Kontrolltieren und mastzellrekonstituierten Mäusen eine deutlich höhere Mortalität sowie geringere Neutrophilen- und höhere Bakteriendichte am Entzündungsort aufweisen. Da man diese Unterschiede durch Injektion mastzellkompetenter Tiere mit Antikörpern gegen TNF- α teilweise aufheben konnte, geht man davon aus, dass von Mastzellen sezerniertes TNF- α eine wichtige Rolle in der Neutrophilenrekrutierung spielt (Malaviya et al. 1996; Echtenacher et al. 1996; Prodeus et al. 1997).

Zudem fand man heraus, dass zahlreiche Entzündungsmediatoren, darunter bakterielle Bestandteile, Komplement, Zytokine wie IL-1 β , Kinine oder Substanz P zu einer Mastzellaktivierung und -degranulierung führen können (Malaviya und Abraham 2001; Mekori und Metcalfe 2000). Zu den zahlreichen Mediatoren, die von Mastzellen synthetisiert bzw. sezerniert werden können, gehören neben Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen auch Zytokine, Chemokine, Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies. Zudem können sie spezifische Proteasen – Chymasen und Trypsasen - freisetzen, die Endotheline und Matrixmetalloproteinasen aktivieren können (Krishnaswamy et al. 2001).

Aufgrund ihres Potentials auf u. a. oben angeführte Stimuli multiple Mediatoren freizusetzen, nimmt man an, dass Mastzellen essentielle Regulatoren des Gefäßtonus, der Gefäßintegrität und der Leukozytenrekrutierung sind (Theoharides 1990).

Intrakraniell findet man Mastzellen bei Säugetieren an Grenzflächen zwischen ZNS und Peripherie: in den weichen und harten Hirnhäuten, im Plexus choroideus und im Hirnparenchym vorwiegend perivaskulär (Kiernan 1976; Dropp 1976; Dropp 1979). Zur ihrer Bedeutung bei Entzündungen des ZNS gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich vorwiegend mit ihrer Rolle bei der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis und bei ZNS-Parasitosen beschäftigen (Secor et al. 2000; Masliniska et al. 2001; Tanzola et al. 2003). Zu bakteriellen Erkrankungen des ZNS liegen noch keine Befunde vor.

2 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Fragestellungen zur Pathophysiologie der experimentellen Pneumokokkenmeningitis bearbeitet.

Der erste Teil befasst sich mit der Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B (I), der zweite mit der Bedeutung der Mastzelle (II) im Rahmen dieser Erkrankung.

2.1 Fragestellung I

Experimentelle und klinische Studien hatten, wie im vorangehenden Abschnitt (1.6, Seite 10) ausführlich beschrieben, gezeigt, dass eine Reihe proinflammatorischer Faktoren, die in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis und ihrer Komplikationen eine wichtige Rolle spielen, unter der Kontrolle von NF- κ B stehen und NF- κ B daher wahrscheinlich ein zentraler Transkriptionsfaktor in der Pathogenese dieser Erkrankung ist. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

- 1) Kommt es während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis zur Aktivierung von NF- κ B im Gehirn von Versuchstieren? In welchen makro- und mikroanatomischen Strukturen findet diese Aktivierung statt?
- 2) Da wir eine deutliche meningitisassoziierte Zunahme der NF- κ B-Aktivität zeigen konnten, versuchten wir die Aktivierung von NF- κ B während einer Pneumokokkenmeningitis durch pharmakologischen Eingriff zu unterdrücken. Wir untersuchten dazu zwei an unterschiedlichen Stellen in die Aktivierung eingreifende Substanzen: einen Inhibitor der I κ B-Phosphorylierung BAY 11-7085 und den Proteasominhibitor N-Acetyl-Leucinyl-Leucinylnorleucinal (ALLN) (siehe **Abbildung 5**, Seite 25).
 - 2a) Kann man durch pharmakologischen Eingriff die NF- κ B-Aktivierung während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis im Gehirn hemmen?
 - 2b) Wirkt sich diese Inhibierung auf die wirtseigene Entzündungsreaktion aus?
- 3) Werden klinische Symptome und ZNS-Komplikationen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis durch pharmakologischen Eingriff in die NF- κ B-Aktivierung moduliert?

Die experimentellen Untersuchungen wurden an einem Rattenmodell mit einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden durchgeführt, die Meningitis wurde durch die intrazisternale Injektion von Pneumokokken induziert. Die Messparameter umfassten neben dem klinischen Status, Vitalparameter, intrakraniellen Druck, Autoregulation und Kohlendioxidreagibilität der zerebralen Gefäße, Bluthirnschrankenstörung und Liquorzellzahl. An Hirnschnitten und Hirnhomogenat wurden verschiedene immunchemische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5, Seite 26).

2.2 Fragestellung II

Über die Bedeutung von Mastzellen bei der bakteriellen Meningitis existieren bisher keine Daten, doch es sprechen verschiedene Befunde für eine Beteiligung der Mastzellen und ihrer Produkte in der Pathophysiologie bakterieller Meningitiden: (1) die Lage von Mastzellen im ZNS an den primären Orten des Entzündungsgeschehens. (2) zu den Stimuli der Mastzelldegranulierung gehören bakterielle Toxine, Komplement und Zytokine wie IL-1 β , bekannte Mediatoren bakterieller Meningitiden. (3) aktivierte Mastzellen produzieren zahlreiche Substanzen, die im Rahmen der meningitisassoziierten überschießenden Immunreaktion und der ZNS-Komplikationen eine wichtige Rolle spielen, darunter Zytokine, Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies (vergleiche Abschnitt 1.7, Seite 13).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von Mastzellen im Rahmen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis untersucht werden. Dabei stellten sich folgende Fragen:

- 1) Kommt es während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis im ZNS zu einer Aktivierung von Mastzellen?
- 2) Bestehen Unterschiede in der meningitisassoziierten Entzündungsantwort zwischen mastzelldefizienten Mäusen und Wildtyptieren?
- 3) Hat die Mastzelldefizienz einen Einfluss auf die meningitisassoziierten intrakraniellen und systemischen Komplikationen sowie den klinischen Status der Tiere?

- 4) Da wir signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellten, untersuchten wir die Auswirkung einer Mastzellrekonstitution.
- 5) In den bisherigen Studien zu bakteriellen Infektionen führte die Mastzelldefizienz generell zu einem Defekt der Neutrophilenrekrutierung. Wir fanden jedoch eine signifikante Zunahme der Liquorpleozytose bei mastzelldefizienten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung.
 - 5a) Es stellte sich die Frage, ob dieser Befund ZNS-spezifisch ist oder erregerbeziehungsweise modellbedingt. Da es in unserem Modell der Pneumokokkenmeningitis regelhaft zu einer begleitenden Pneumonie kommt, hatten wir die Möglichkeit, die Leukozytenmigration in ein anderes Organsystem bei unseren Versuchstieren zu untersuchen.
 - 5b) Ausgehend von einer ZNS-spezifischen Situation stellte sich die Frage, inwieweit sich die Proteinexpression und Aktivität von Mediatoren der Leukozytenrekrutierung im Hirngewebe der einzelnen Versuchsgruppen unterscheiden.

Die experimentellen Untersuchungen wurden an einem Mausmodell mit Beobachtungszeiträumen von 4 und 24 Stunden durchgeführt; die Meningitis wurde durch die intrazisternale Injektion von Pneumokokken induziert. Wir verwendeten dazu die mastzelldefizienten WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} (kurz W/W^v) Mäuse, die dazu gehörigen Wildtypiere und mastzellrekonstituierte W/W^v-Mäuse, die uns freundlicherweise von Dr. L. Hültner (GSF, München) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Messparameter umfassten neben klinischem Status, intrakraniellen Druck, Bluthirnschrankenstörung, Liquorzellzahl sowie Bakterientiter in Kleinhirnhomogenat und Blut. An Hirnschnitten und Hirnhomogenat sowie am Lungengewebe wurden verschiedene histochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.8 sowie 3.10 bis 3.14, Seite 32 und 33 bis 36).

3 Material und Methoden

3.1 Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob NF- κ B eine Rolle in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis spielt und ob ein pharmakologischer Eingriff in die Regulierung dieses Transkriptionsfaktors eine therapeutische Strategie sein könnte. Daher wurde ein Tiermodell gewählt, bei dem sowohl Pathophysiologie als auch Klinik in einem fortgeschrittenen Stadium der experimentellen Pneumokokkenmeningitis untersucht werden kann.

Das Modell basiert auf einem von Pfister et al. entwickelten, gut etablierten Rattenmodell der Frühphase der experimentellen bakteriellen Meningitis (Pfister et al. 1990). Dieses Modell wurde von Koedel und Pfister (1997) zu einem Modell für ein fortgeschrittenes Stadium der Meningitis weiterentwickelt. Aufgrund der größeren Nähe zur klinischen Situation, in der eine Therapie meist auch erst im fortgeschrittenen Stadium erfolgt, ist dieser Versuchsansatz besser zur Untersuchung möglicher adjuvanter Therapien geeignet.

3.2 Versuchsaufbau

Die Experimente wurden an erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten (Charles River Deutschland, Sulzfeld) mit einem Gewicht zwischen 300 und 350 g durchgeführt.

Zur Induktion einer Meningitis wurden den Tieren unter Kurzzeit-Halothan-Narkose (Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland) 150 μ l einer Pneumokokkensuspension transkutan in die *Cisterna magna* injiziert. Die Suspension enthielt 10^7 KBE *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3/ml. Danach wurden die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht, wo sie aufwachen durften und mit Standardfutter und Wasser *ad libitum* versorgt waren.

24 Stunden nach Infektion wurden die Tiere klinisch beurteilt. Die klinische Bewertung setzte sich aus folgenden Kriterien zusammen: a) Gewichtsverlust ($> 5\%/d = 1$ Punkt); b) Wasseraufnahme (< 20 ml = 1 Punkt); c) Futteraufnahme (< 12 g/d = 1 Punkt); d) Auftreten von Tremor und Piloerektion (jeweils 1 Punkt); e) Vigilanz (von wach = 0 Punkte bis zu komatös = 4 Punkte); f) Motorik (Balancieren auf Balken zunehmenden Durchmessers: auf dünnstem Balken balancieren = 0 Punkte bis zu kein Balancieren möglich = 3 Punkte); g) motorische

Aktivität (Nestbau aus Papier („paper crunching“) = 0 - 2 Punkte); h) mittlerer arterieller Blutdruck (MABP < 80 mmHg = 1 Punkt und i) Körpertemperatur (> 37.5 °C = 1 Punkt). Die Punktzahl in der klinischen Bewertung liegt somit zwischen 0 Punkten bei gesunden und 16 Punkten bei schwer erkrankten Tieren.

Die Narkose erfolgte unter Kurzzeitbetäubung mit Halothan durch intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Thiopental-Natrium (Trapanal®, Byk Gulden, Konstanz, Deutschland). Die Narkosetiefe wurde regelmäßig durch Reaktion auf Schmerzreize (Muskelzucken, Blutdruckanstieg) kontrolliert und bei Bedarf wurde Thiopental nachinjiziert.

Zur mechanischen Ventilation wurden die Tiere tracheotomiert und ein Polyäthylenschlauch (PE 240) als endotrachealer Tubus gelegt. Beatmet wurden die Tiere durch einen frequenz- und volumenverstellbaren Kleintierventilator (Modell AP-10, Effenberger, Pfaffing, Deutschland), der die Tiere mit sauerstoffangereicherter Raumluft versorgte und Anschluss für den Zustrom anderer Gase (z. B. CO₂) besitzt.

In die linke *Arteria femoralis* wurde zur kontinuierlichen Blutdruckmessung und für Blutgas- und Hämatokritanalysen ein Polyäthylenschlauch (PE 50) gelegt und mit einem Druckabnehmer (DT-XX Ohmeda (Singapore) Pte Ltd, Singapur) verbunden.

Ebenso wurde die linke *Vena femoralis* kanüliert um Evans-Blau und Noradrenalin infundieren zu können. Beide Gefäße wurden während der gesamten Versuchszeit mit physiologischer Kochsalzlösung gespült (1 ml/h; Infusomat ED2, Braun Melsungen, Deutschland).

Für die weitere Präparation wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen fixiert und das *Os occipitale* und die *Ossa parietalia* nach Lokalanästhesie mit Lidocainhydrochlorid (Xylocain® 1%, Astra, Wedel, Deutschland) freipräpariert. Zur Messung des intrakraniellen Druckes sowie zur Entnahme von Liquorproben wurde ein Katheter durch ein median im *Os occipitale* gelegenes Bohrloch in die *Cisterna magna* eingeführt, mit Sekundenkleber fixiert und dann mit Zweikomponentenklebstoff (Paladur®, Kulzer, Wehrheim, Deutschland) dauerhaft befestigt.

Für die Platzierung der Laserdopplersonde zur Messung des regionalen zerebralen Blutflusses wurde eine 2 x 3 mm große Kraniotomie des Parietalknochens über der rechten Hemisphäre unter Belassung der Dura durchgeführt (Koedel und Pfister 1997). Die Laserdopplersonde (Modell BPM 403 a, Vasamedics, St. Paul, Mn, USA) wurde mittels eines Mikromanipulators über einer Stelle ohne größere sichtbare piaie Gefäße positioniert.

Am Ende des Experimentes wurden die Tiere mit Thiopental in eine tiefe Narkose versetzt und nach Eröffnung des Brustkorbes transkardial mit 100 ml eisgekühlter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und Heparin-Natrium (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutsch-

land) 10 IU/ml PBS perfundiert. Der Perfusionsdruck wurde mittels eines Druckabnehmers überwacht.

Nach Perfusion wurden die Gehirne entnommen und sofort in Einbettmedium (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

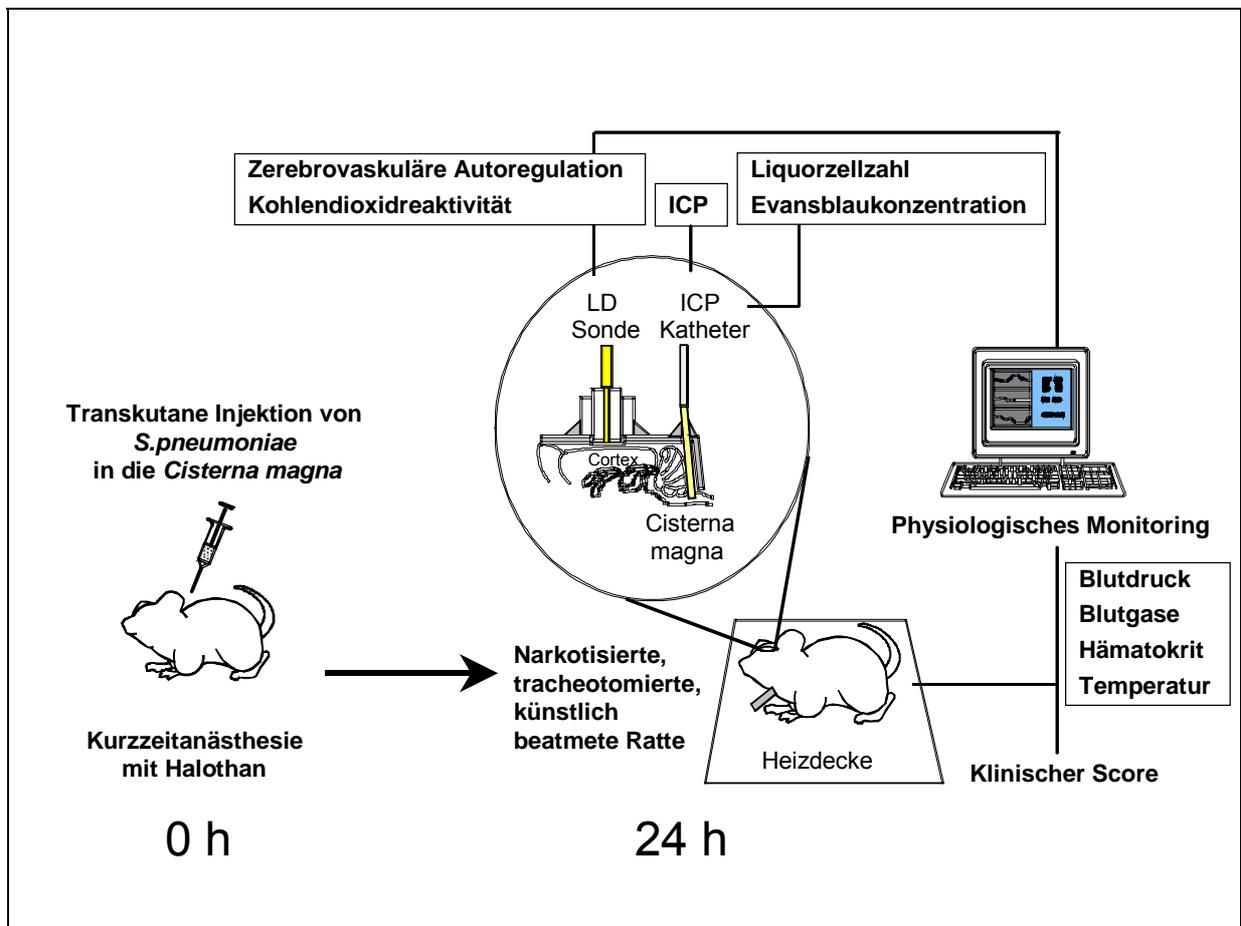


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Rattenmodells der Pneumokokkenmeningitis

Abkürzungen: ICP intrakranieller Druck, LD Laserdopplersonde

3.3 Messverfahren

3.3.1 Vitalparameter

Die Körpertemperatur wurde mit einer rektalen Temperatursonde kontinuierlich gemessen und mittels eines Heizkissens zwischen 37,0 °C und 38,0 °C gehalten.

Die Beatmungssituation wurde durch stündliche arterielle Blutgasanalysen (pH, pO₂, pCO₂, Basenüberschuss) überwacht (278 Blood Gas System, Bayer Diagnostics, Fernwald, Deutschland).

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde wie oben beschrieben fortlaufend über einen Druckwandler registriert.

3.3.2 Intrakranieller Druck

Die Messung des intrakraniellen Druckes (ICP) erfolgte kontinuierlich über den in der *Cisterna magna* liegenden Katheter mittels eines Druckwandlers (DT-XX Ohmeda (Singapore) Pte Ltd, Singapur).

3.3.3 Messung des regionalen zerebralen Blutflusses

Zur Messung des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF) in der kapillären Mikrozirkulation wurde die Laser-Doppler-Blutflussmethode angewandt. Sie basiert auf dem Dopplereffekt bewegter Teilchen, z. B. Blutzellen. Der auf die Hirnoberfläche geleitete Strahl eines 5 mW Diodenlasers dringt in das Gewebe ein und erfasst ein Volumen von ca. 1 mm³. Falls er auf bewegte Zellen trifft, so erfährt das reflektierte Licht eine zur Geschwindigkeit proportionale Frequenzverschiebung gemäß des Dopplereffektes. Das reflektierte Licht wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und analysiert. Das Signal entspricht der Durchschnittsgeschwindigkeit in dem vorgegebenen konstanten Volumen. Da Blutvolumenverschiebung pro Zeit dem Blutfluss entspricht, kann man mit dieser Methode den Nettoblutfluss der Mikrozirkulation in dem betrachteten Bereich messen. Allerdings liefert diese Methode nur relative Werte, d. h. prozentuale Abweichungen von einem stabilen Ausgangswert, der gleich 100 % gesetzt wurde (Dirnagl et al. 1989).

Die Daten über rCBF, Vitalparameter und Hirndruck wurden über ein PC-System mit dem Prozessdatenerfassungsprogramm Asyst 2.1 (Asyst program, MacMillan Software, New York, USA) aufgezeichnet.

3.3.4 Messung der Kohlendioxidreaktivität der zerebralen Gefäße

Um die CO₂-Reaktivität der zerebralen Gefäße zu messen, wurde bei den Versuchstieren eine fünfminütige Hyperkapnie durch Beatmung mit einem Gasgemisch aus 10 % CO₂, 21 % O₂ und 69 % N₂ erzeugt. Vor und fünf Minuten nach Beginn der Hyperkapnie wurden arterielle Blutgase und pH bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wurden überdies rCBF, ICP und MABP kontinuierlich registriert. Als intakt wurde die Gefäßfunktion bei einem Anstieg des rCBF um mehr als 2 % pro mmHg Zunahme des arteriellen CO₂-Partialdruckes gewertet (Jones et al. 1989; Sha et al. 1995).

$$\text{CO}_2\text{-Reaktivität} = \Delta\text{rCBF}[\%]/\Delta\text{PaCO}_2[\text{mmHg}]$$

3.3.5 Autoregulationskapazität der zerebralen Gefäße

Die Kapazität der zerebralen Gefäße zur Autoregulation wurde durch eine Erhöhung des MABP mittels intravenöser Infusion von Noradrenalin (10 µg/ml physiologischer Kochsalzlösung) getestet. Der MABP wurde dazu innerhalb von fünf bis zehn Minuten um 30 mmHg gegenüber dem Ausgangswert angehoben und auf diesem Wert konstant gehalten. Nach fünf Minuten wurde der Wert des rCBF aufgezeichnet. Die Autoregulationskapazität wurde als prozentualer Anstieg des rCBF pro mmHg MABP-Anstieg ausgedrückt.

$$\text{Autoregulationskapazität} = \Delta\text{rCBF}[\%]/\Delta\text{MABP}[\text{mmHg}]$$

3.3.6 Bestimmung der Bluthirnschrankenpermeabilität im Rattenmodell

Das Ausmaß der Bluthirnschrankenpermeabilität wurde mit Hilfe von Evans-Blau bestimmt. Evans-Blau ist ein Azofarbstoff, der *in vivo* an Albumin bindet und somit die intakte Bluthirnschranke nicht überwinden kann (Uyama et al. 1988).

Den Versuchstieren wurde dazu 1 ml Evans-Blau-Lösung (1%ig (wt/vol) in physiologischer Kochsalzlösung) intravenös verabreicht. Eine Stunde später wurde über den intrazisternalen Katheter *Liquor cerebrospinalis* gewonnen, danach wurden die Tiere wie oben beschrieben perfundiert und ihre Gehirne entnommen.

Der Liquor wurde bei 1000xg 10 Minuten lang zentrifugiert und danach die Evans-Blau Konzentration spektrophotometrisch (Ultrospec III, Pharmacia, Deutschland) durch Absorptionsmessung bei 620 nm bestimmt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von Evans-Blau in PBS benützt; dabei lag die Nachweisgrenze bei 0.2 µg/ml (Paul et al. 1998).

Zusätzlich wurden Hirnschnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Evans-Blau-Extravasation hin untersucht. Bei Anregung im grünen Wellenlängenspektrum (Exzitationsfilter 545 nm, Referenzfilter 590 nm) fluoresziert Evans-Blau rot. Die Aufzeichnung der Schnitte erfolgte mit einem schwarzweiß Variocam Videosystem (PCO CDD Imaging, Kehlheim, Deutschland) (Kastenbauer et al. 1999a).

3.3.7 Zellzahlbestimmung aus Liquor

Die Liquorzellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl CSF mit 10 µl 96%iger Essigsäure einige Minuten lang inkubiert, um eventuell vorhandene Erythrozyten zu lysieren und die Leukozyten zu fixieren. Mit dieser Suspension wurde die Zählkammer befüllt und die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zellzahl pro Mikroliter errechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl [n/}\mu\text{l]} = (\text{Z} \times \text{V}) / \text{K}$$

mit Z: ausgezählte Zellzahl in der Kammer

V: Verdünnungsfaktor (= 1,5)

K: Kammervolumen (= 1,25 µl)

3.3.8 Messung der IL-6 Konzentration im Liquor

Die Messung von IL-6 im Liquor erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Kit (Quantikine® M Murine, rat IL-6, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Da die Konzentration in den Liquorproben unverdünnt außerhalb des Messbereichs lag, wurden die Proben gemäß der Angaben des Herstellers 1:10 verdünnt.

3.4 Experimentelle Gruppen der NF- κ B-Studie in vivo

Folgende Gruppen wurden über einen Versuchszeitraum von 24 Stunden untersucht:

- Gruppe 1: unbehandelte Tiere, denen 150 μ l PBS intrazisternal injiziert wurde (Kontrollen; n=10)
- Gruppe 2: unbehandelte Tiere, denen 15×10^4 KBE lebende *S. pneumoniae* Serotyp 3 intrazisternal injiziert wurden (unbehandelte infizierte Tiere; n=10)
- Gruppe 3: wie Gruppe 2, aber 6 und 18 Stunden nach Infektion wurde diesen Tieren 20 mg/kg Körpergewicht ALLN (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) intraperitoneal injiziert (behandelte infizierte Tiere; n=6)
- Gruppe 4: wie Gruppe 2, aber 6 und 18 Stunden nach Infektion wurde diesen Tieren 20 mg/kg Körpergewicht BAY 11-7085 (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland) intraperitoneal injiziert (behandelte infizierte Tiere; n=3)

Die pharmakologischen Substanzen ALLN und BAY 11-7085 greifen beide in die NF- κ B-Aktivierung ein.

Das Peptidalldehyd ALLN ist ein Calpaininhibitor. Calpaine sind kalziumabhängige Proteasen des Ubiquitin-Proteasomen-Komplexes. Calpaininhibitoren hemmen die chymotrypsinartige und die caseinolytische Aktivität des Ubiquitin-Proteasomen-Komplexes und in geringerem Maße auch die trypsinartige Aktivität und die Peptidoglutamyl-Peptid-Bindungs-Hydrolyse (Milligan et al. 1996). Bei Aktivierung und nukleärer Translokation von NF- κ B ist

Proteolyse notwendig: (a) bei der Degradierung von I κ B und (b) bei der Abspaltung der NF- κ B Untereinheit p50 aus seinem Vorläuferprotein p105. In Zellkulturexperimenten (Schow und Joly 1997) konnte gezeigt werden, dass ALLN sowohl eine LPS-induzierte I κ B-Degradierung inhibieren kann als auch dass unter ALLN p105 intrazellulär akkumuliert (Milligan et al. 1996).

BAY 11-7085 inhibiert ebenfalls die Aktivierung von NF- κ B. Diese Wirkung beruht vor allem auf einer irreversiblen Hemmung der Zytokin-induzierbaren Phosphorylierung von I κ B- α ; die konstitutive I κ B- α -Phosphorylierung wird von BAY 11-7085 nicht beeinflusst (Pierce et al. 1997).

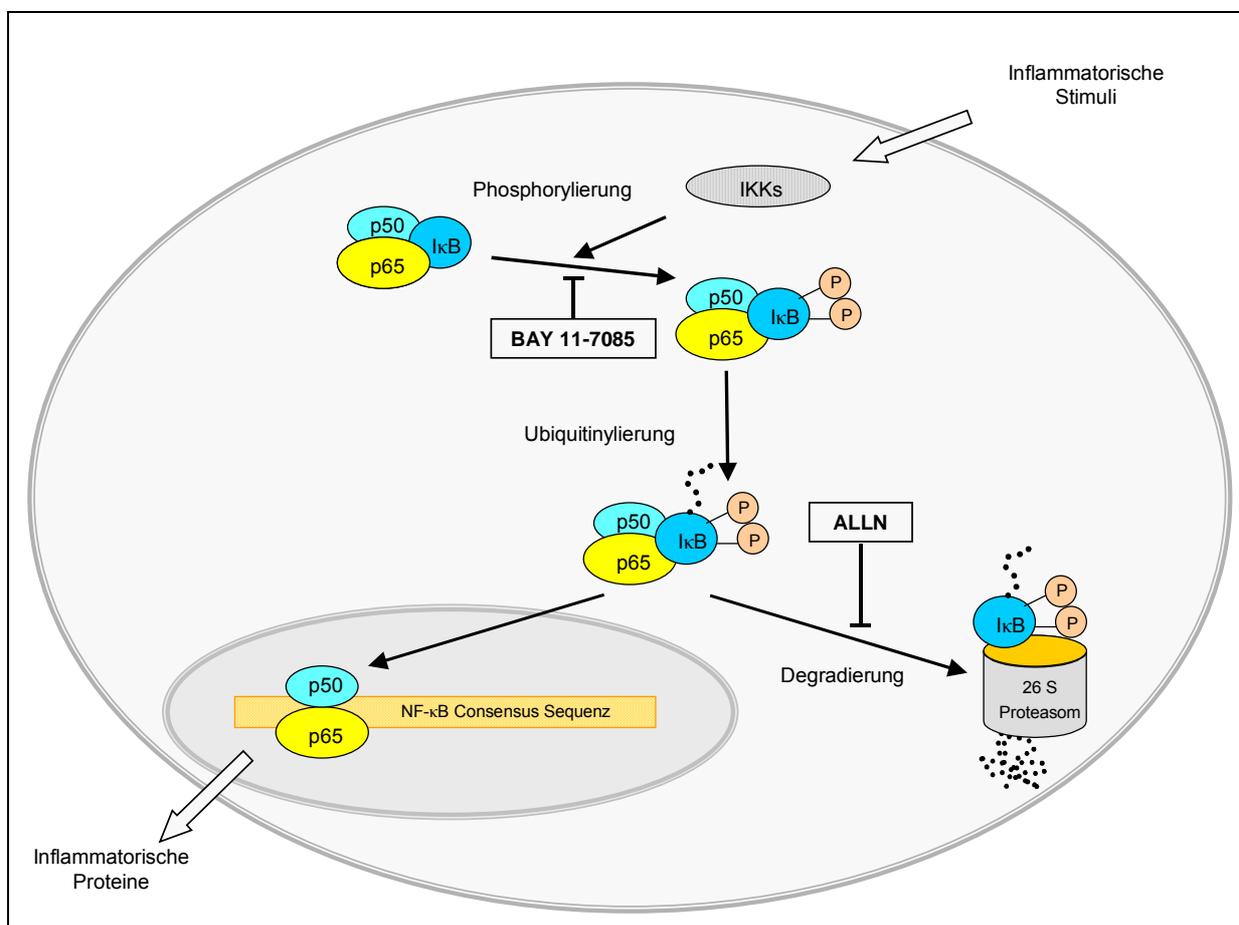


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch ALLN und BAY 11-7085. BAY 11-7085 hemmt die Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B und ALLN die Degradierung von I κ B. Durch beides wird indirekt die nukleäre Translokation von p50/p65 verhindert. IKK, I κ B-Kinase-Komplex.

3.5 Immunologische Verfahren zum Nachweis von aktiviertem NF- κ B im Hirngewebe

3.5.1 Verwendeter Antikörper

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde ein monoklonaler Antikörper (IgG 3) aus der Maus verwendet, der gegen ein Epitop, das die nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) der NF- κ B-Untereinheit p65 (Lys-Arg-Lys-Arg) enthält, gerichtet ist. Eine Bindung an die NLS kann sich erst nach Lösung des Inhibitorproteins I κ B vom Heterodimer p50/p65 ausbilden. Dieser Antikörper ist somit spezifisch für die aktivierte Form des Transkriptionsfaktors. Er ist geeignet, das Aktivierungsmuster von NF- κ B in Gewebeschnitten nachzuweisen und die Effektivität einer pharmakologischen Hemmung der NF- κ B-Aktivierung zu überprüfen (Kaltschmidt et al. 1995).

3.5.2 Immunhistochemie

Um die Aktivierungsmuster von NF- κ B im Gehirn beurteilen zu können, wurden 10 μ m Gefrierschnitte immunhistochemisch untersucht.

Zur Fixierung wurden die Schnitte 20 Minuten lang bei -20 °C in 100%igem Ethanol inkubiert und dann folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in 0,3 % methanolischem Wasserstoffperoxid um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Anschließend wurden die Zellmembranen mittels 20-minütiger Inkubation in 0,3%igem Triton X-100 (gelöst in 0,1 M PBS mit 10 % Ziegen Serum) bei RT durchlässig gemacht und die Schnitte dann über Nacht bei 4 °C mit einer 1:100 Verdünnung (in 0,1M PBS mit 10 % Ziegen Serum) des oben beschriebenen Antikörpers gegen die NLS von NF- κ B p65 inkubiert. Die spezifische Bindung des Antikörpers wurde mit einem kommerziell erhältlichen Reagenzienatz (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) nach Anweisung des Herstellers sichtbar gemacht. Kurz zusammengefasst: als Sekundärantikörper wurde ein gegen Maus-IgG gerichteter Schafantikörper in einer Verdünnung von 1:200 verwendet, der in einem weiteren Schritt zur Signalverstärkung mit einem Avidin-Biotin-Komplex gekoppelt wurde. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (Vector) verwendet, das nach Umsetzen durch die Peroxidase ein braunes Reaktionsprodukt ergibt. Die Reaktion wurde durch Waschen der Schnitte in Leitungswasser gestoppt. Zwischen allen anderen Schritten wurden die Schnitte gründlich mit 0,1 M PBS (pH 7,4) gewaschen.

Zuletzt wurden die Schnitte 30 - 60 Sekunden lang mit Hämalaun (Mayer's Hämalaun : destilliertem Wasser, 1:1) gegengefärbt und dann in Leitungswasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Gelatine eingedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden mit einer an ein Zeiss Axiovertmikroskop gekoppelten JVC 3-chip Farbvideokamera aufgenommen.

3.5.3 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse wurde an 30 µm Gefrierschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden 10 Minuten lang in Lysepuffer (10 mM Hepes, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2% DDT und folgenden Proteaseinhibitoren: Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) auf Eis inkubiert, dann im Ultraschallbad homogenisiert und darauf bei 14 000 Upm 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurden die Überstände abgenommen und ihr Proteingehalt mittels Nanoquant Assay (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden durch Verdünnen mit Lysepuffer auf einen Proteingehalt von 1 µg/µl eingestellt, 1:1 mit einem Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol) verdünnt und 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Dann wurden die Proben mit einem Proteingehalt von jeweils 10 µg in einem 4 – 12%igen Tris-Glycin Gel (Novex, Frankfurt, Deutschland) bei U = 125 V und I = 40-60 A innerhalb von 90 Minuten in einem Laufpuffer (Novex, Frankfurt, Deutschland unter Zusatz von 0,1% SDS) aufgetrennt. Die Proben wurden in Transferpuffer (Novex, Frankfurt, Deutschland unter Zusatz von 20 % Methanol) von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran überführt (U = 25 V, I = 100-120 A, t = 60 min) und die Proteine durch Trocknen unter UV-Licht auf der Membran fixiert. Nach Waschen in PBS-Tween (123 mM NaCl, 3,2 mM KH₂PO₄, 8,3 mM Na₂HPO₄, 0,1 Tween 20) wurden die Membranen eine Stunde lang zum Blockieren unspezifischer Bindungen in PBS mit 5 % Magermilchpulver gelegt und dann über Nacht mit dem oben beschriebenen monoklonalen Mäuseantikörper gegen die NLS von NF-κB p65 in einer Verdünnung von 1:1000 (in PBS-Tween mit 0,5 % Milchpulver) inkubiert. Dann wurden die Membranen 30 Minuten in PBS-Tween gewaschen und darauf mit einem peroxidase-konjugierten Anti-Maus-IgG Antikörper aus Schaf (Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland) in einer 1:2000 Verdünnung eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte ein 30-minütiger Waschschrift. Immunreaktives Protein wurde mittels verstärkter Chemilumineszenz (Amersham) nachgewiesen.

3.6 Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis

3.6.1 Versuchsaufbau

Zuerst wurden die Tiere einer klinischen Eingangsuntersuchung unterzogen (Beschreibung siehe **Tabelle 1**).

Zur Induktion einer Meningitis wurden den Tieren unter Kurzzeit-Halothan-Narkose (Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland) 15 µl einer Pneumokokkensuspension transkutan in die *Cisterna magna* injiziert. Die Suspension enthielt $0,5 \times 10^7$ koloniebildende Einheiten *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3/ml. Danach kamen die Tiere in Einzelkäfige, wo sie aufwachen durften und mit Standardfutter und Wasser *ad libitum* versorgt wurden. Vier beziehungsweise vierundzwanzig Stunden nach Infektion wurden die Tiere klinisch evaluiert und die Befunde mit einem klinischen Scoresystem bewertet (siehe **Tabelle 1**).

Dann wurden die Tiere mit 100 mg/kg KG Ketamin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und 10 mg/kg KG Xylazin narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde durch Reaktion auf Schmerzreiz (Muskelzucken) kontrolliert und bei Bedarf Narkotikum nachinjiziert.

Für die weitere Präparation wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Das *Os occipitale* wurde nach Lokalanästhesie mit Lidocainhydrochlorid (Xylocain® 1%, Astra, Wedel, Deutschland) freipräpariert. Ein Katheter, bestehend aus einer Stahlkanüle und einem Polyäthylenschlauch (PE 50), wurde durch ein median im *Os occipitale* gelegenes Bohrloch in die *Cisterna magna* eingeführt und, sobald er mit Liquor gefüllt war, wieder entnommen, der Liquor asserviert und die Zellzahl wie unter 3.3.7 beschrieben daraus bestimmt. Dann wurde ein neuer Katheter eingeführt und mit Sekundenkleber fixiert, die entnommene Liquormenge wurde durch PBS ersetzt und 90 Sekunden danach der intrakranielle Druck gemessen (siehe 3.3.2). Am Ende des Experimentes wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin in eine tiefe Narkose versetzt und nach Eröffnung des Brustkorbes wurde zuerst kardial Blut zur Hämatokritbestimmung entnommen und dann wurden die Tiere transkardial mit 15 ml eisgekühlter PBS und Heparin-Natrium (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 10 IU/ml PBS perfundiert.

Nach Perfusion wurden Gehirn, Lungen, Milz und Niere entnommen und sofort bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Tabelle 1 Das klinische Scoresystem umfasst 20 Punkte, von 0 = Gesundheit bis 20 = Tod im Beobachtungszeitraum.

Untersuchung		Bewertung [Punkte]			
		0	1	2	3
1	Gewichtsverlust	< 6%	6 - 12%	> 12%	
2	Körpertemperatur	> 36°C	34 – 36°C	< 34°C	
3	Auftreten von Tremor	nein	ja		
4	Auftreten von Piloerektion	nein	ja		
5	Auftreten von Anfällen	nein	ja		
6	Vigilanz	wach	lethargisch		
7	Spontane motorische Aktivität (5 min im Käfig). Modifiziert nach Garcia et al. 1995	Maus nähert sich mindestens 3 Seiten des Käfigs	Bewegt sich, erreicht aber nur < 3 Seiten	Bewegt sich kaum	Keine Bewegung
8	Erfolgreiches Balancieren auf Balken zunehmenden Durchmessers	4,5 mm	9 mm	13,5 mm	Kein Balancieren möglich
9	Posturale Reflexe (Reaktion während Maus am Schwanz in die Luft gehalten wird). Modifiziert nach Bederson et al. 1986	Extremitäten symmetrisch extendiert	Flexion des Rumpfes	Kreiseln	Keine motorische Aktivität
10	Mechanorezeption (Reaktion der Maus auf Stimulus mit stumpfem Stab). Modifiziert nach Garcia et al. 1995	Prompte Kopfwendung beidseits	Langsame Reaktion beidseits	Keine Reaktion	
11	Tod im Beobachtungszeitraum	+ 1 Punkt			
Maximale Punktzahl					20 Punkte

3.6.2 Versuchstiere

Für die Untersuchung wurden WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W^v} (kurz W/W^v) Mäuse und die dazu gehörigen Wildtypiere verwendet, die uns freundlicherweise von Dr. L. Hültner (GSF, München) zur Verfügung gestellt wurden. W/W^v Mäuse sind gut zur Untersuchung der Mastzellfunktion *in vivo* geeignet. Neben der Mastzelldefizienz zeigen diese Tiere allerdings auch eine schwere makrozytäre Anämie sowie Defekte in der Keimzell- und Melanozytengnese. Mastzellvorläufer benötigen die Expression von *c-kit*, einem transmembranären Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, als Stammzellfaktor (SCF)-Rezeptor. SCF ist ein zentraler Migrations-, Proliferations-, Ausreifungs- und Überlebensfaktor und wird in zahlreichen Geweben u. a. im Knochenmark exprimiert, wo sich Mastzellen in der Regel entwickeln. W/W^v Mäuse sind eine Kreuzung zweier Stämme, die zwei verschiedene natürlich vorkommende Mutationen des *c-kit*-Lokus tragen. Durch die Kreuzung der Stämme WB/Re-*kit*^{W/+} und C57BL/*kit*^{W^v/+} erhält man 25 % mastzelldefiziente Tiere (W/W^v) und 50 % Wildtypiere (+/+) mit intakten *c-kit* Loci, die als mastzellkompetente Kontrolltiere verwendet werden können. Es ist möglich W/W^v Mäusen Wildtyp-Knochenmark zu transplantieren und damit die Mastzellpopulation selektiv zu rekonstituieren (Kitamura et al. 2001). Dazu werden Knochenmarkszellen vor der Transplantation *in vitro* z. B. durch IL-3 oder SCF zu Mastzellvorläufern, sogenannten BMDCs (*bone marrow derived mast cells*), differenziert.

Die Mastzellrestitution wurde von Dr. L. Hültner und Frau U. Bamberg (GSF, München), wie in den Arbeiten von Hültner et al. 1989 und Egger et al. 1995 beschrieben, durchgeführt. Die Differenzierung der Knochenmarkszellen erfolgte mit rekombinantem murinem IL-3. Die Versuche wurden 14 Wochen nach der Mastzelltransplantation durchgeführt.

3.7 Versuchsgruppen der Mastzellstudie

Die Gruppen 1 - 4 wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden beobachtet.

Gruppe 1: unbehandelte Tiere, die 15 µl PBS intrazisternal erhielten (Kontrollen; n=7)

Gruppe 2: C57BL/6J-*Kit*^W +/+ Mäuse, die 15 µl Pneumokokkensuspension mit 0,5x10⁷ KBE/ml intrazisternal erhielten (infizierte Wildtypiere; n=13)

Gruppe 3: WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse, die 15 µl Pneumokokkensuspension mit 0,5x10⁷ KBE/ml intrazisternal erhielten (infizierte mastzelldefiziente Tiere; n=16)

Gruppe 4: mit BMMC rekonstituierte WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse, die 15 µl Pneumokokkensuspension mit 0,5x10⁷ KBE/ml intrazisternal erhielten (infizierte mastzellrekonstituierte Tiere; n=5)

Die Gruppen 5 und 6 wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden beobachtet.

Gruppe 5: C57BL/6J-*Kit*^W +/+ Mäuse, die 15 µl Pneumokokkensuspension mit 0,5x10⁷ KBE/ml intrazisternal erhielten (infizierte Wildtypiere; n=6)

Gruppe 6: WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse, die 15 µl Pneumokokkensuspension mit 0,5x10⁷ KBE/ml intrazisternal erhielten (infizierte mastzelldefiziente Tiere; n=6)

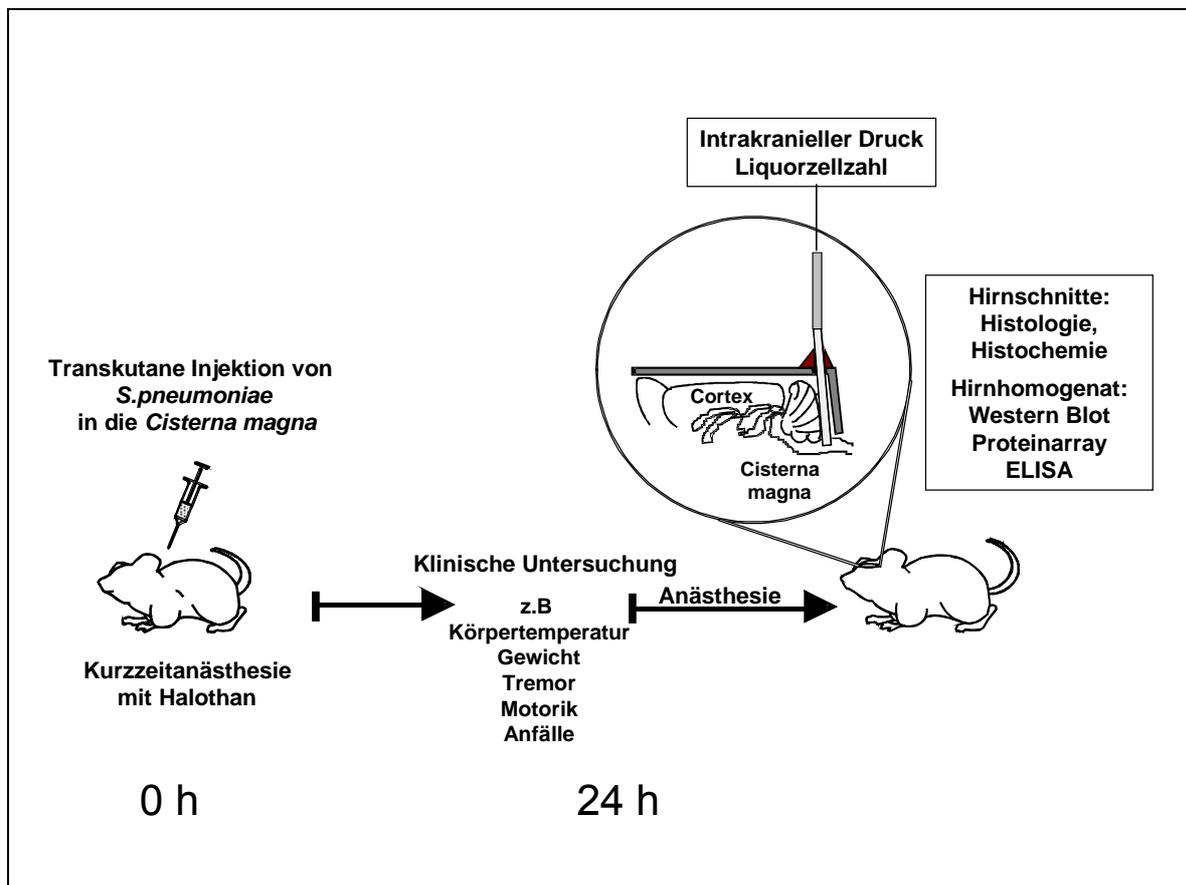


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Mausmodells der Pneumokokkenmeningitis

3.8 Mastzellfärbungen

3.8.1 Giemsa-Färbung

Zur Auszählung der Mastzellen im Hirngewebe wurden 10 µm dicke Hirnschnitte in einer Azureosinmethylenblaulösung nach Giemsa (MERCK, Darmstadt) gefärbt. Dazu wurden luftgetrocknete Schnitte in 100%igem Methanol 10 Minuten bei -20 °C fixiert und danach 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden sie 20 Minuten in Giemsalösung (mit WEISEpuffer, pH 7,2, 1:10 verdünnt) gefärbt und in WEISEpuffer, pH 7,2, gewaschen.

Pro Versuchstier wurden 6 Hirnschnitte hinsichtlich Mastzellanzahl und -morphologie lichtmikroskopisch untersucht.

3.8.2 Chloracetatesterasefärbung

In Mastzellen enthaltene Chymase kann Esterbindungen schnell hydrolysieren. Mittels Naphthol AS-D Chloracetat als Substrat und Pararosanilin, einem Diazoniumsalz, kann diese Esteraseaktivität sichtbar gemacht werden. Dazu wurden 10 µm dicke Hirnschnitte 20 Minuten bei -20 °C fixiert und dann 30 min bei Raumtemperatur in folgender Lösung inkubiert: 0,2 ml 4%iges saures Pararosanilin, 0,2 ml 4%iges wässriges Natriumnitrit, 60 ml 0,07 molarer Phosphatpuffer, pH 6,5, und 20 mg Naphthol AS-D Chloracetat gelöst in 2 ml N-Dimethylformamid. Dann wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült, getrocknet und mit Gelatine eingedeckelt.

Als Positivkontrollen für die Färbungen wurden Hautschnitte verwendet, da Haut zu den Organen mit der höchsten Mastzellichte gehört.

3.9 Bestimmung der Bluthirnschrankenpermeabilität im Mausmodell

Zur Bestimmung der Bluthirnschrankenintegrität wurden Hirnhomogenate hinsichtlich der Infiltration von Albumin mittels ELISA untersucht. Dieses in großen Mengen vorliegende Serumprotein kann die intakte Bluthirnschranke nicht überwinden.

Für den ELISA wurden MaxiSorb Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit einem polyklonalen für Mausalbumin spezifischen Antikörper aus dem Kaninchen (Acris, Bad Nauheim, Deutschland) beschichtet. Dazu wurden 50 µl der in Beschichtungspuffer (0,05 M Natriumcarbonat) auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml verdünnten Antikörperlösung pro Vertiefung aufgetragen und die Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mehrmals mit Waschpuffer (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 8,0) gewaschen und dann für 30 Minuten mit Blockungspuffer (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % bovines Serumalbumin [BSA]) inkubiert. Mausproteinextrakte (Aufbereitung siehe 3.5.3) wurden in Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ und einer Proteaseinhibitorenmischung aus Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) verdünnt. Dann wurden 0,5 µg Mausproteinextrakt in die jeweilige Vertiefung transferiert und die Platten 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das gebundene Albumin wurde mittels eines polyklonalen peroxidasekonjugierten Antikörpers gegen Mausalbumin aus der Ziege (Bethyl, Montgomery, USA) detektiert. Dazu wurden 50 µl der in Probenkonjugatpuffer (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20, pH 8,0) auf eine Konzentration von 0,1 µg/ml verdünnten Antikörperlösung pro Vertiefung aufgetragen und die Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Enzymsubstratreagenz (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurde hinzugefügt und es folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die colorimetrische Reaktion wurde durch Zusatz von 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

3.10 Messung der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe

Als Marker der Leukozyteninfiltration in die Lunge wurde die Myeloperoxidase(MPO)aktivität des Gewebes mit der Methode nach Cuzzocrea gemessen (Cuzzocrea et al. 1997).

Die Gewebeproben wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, mittels eines Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG, Staufen) homogenisiert, dann wurden die Proben mit 13500 Upm 1 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, mit 0,5 % Hexadecyltriammoniumbromid resuspendiert. Dann folgten drei Friertauzyklen, wobei die Proben im Ultraschallbad aufgetaut wurden und danach 15 Minuten bei 13500 Upm zentrifugiert wurden. Die MPOaktivität wurde bestimmt, indem 33 µl Überstand zu 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, mit 0,167 mg/ml o-Dianisidin-Dihydrochlorid und

0,0125 % Wasserstoffperoxid gegeben wurde. Die Absorptionsveränderung wurde bei 460 nm über drei Minuten bei Raumtemperatur aufgezeichnet. Die Daten wurden in Units/g Feuchtwicht angegeben. Eine Unit entspricht dem Abbau von einem μmol Peroxid pro Minute bei Raumtemperatur.

3.11 Bestimmung des Zytokinexpressionsprofils im Hirnhomogenat

Zur Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils im Hirnhomogenat wurde ein mausspezifischer Zytokinantikörperarray mit 32 Zyto- und Chemokinen sowie Wachstumsfaktoren verwendet (Array 2.1, RayBiotech Inc., Atlanta, USA). Detaillierte Informationen über diesen Zytokinantikörperarray einschließlich Antikörperliste, Sensitivitätsangaben und Versuchsprotokoll können auf der Internetseite des Herstellers eingesehen werden (www.raybiotech.com).

Kurz zusammengefasst wurden pro Versuchstier 400 μm Hirngewebe in 80 μl Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 sowie folgende Proteaseinhibitoren: Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) inkubiert, wie in 3.5.3 beschrieben aufbereitet, und der Proteingehalt wurde bestimmt. Die Proben der einzelnen Versuchsgruppen wurden gepoolt. Pro Membran wurden 3000 μg Protein verdünnt in Lysepuffer nach Herstellerangaben aufgebracht. Der Nachweis der Zytokinantikörperkomplexe erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz; der Röntgenfilm wurde eine Minute lang belichtet. Zur Auswertung wurden die Filme digitalisiert und die optischen Dichtewerte der Signale mit Hilfe des Programms TINA 2.08e (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet. Die optischen Dichtewerte der einzelnen Punkte wurden als Prozentsatz der durchschnittlichen optischen Dichte der Positivkontrollen angegeben (*arbitrary units*).

3.12 Messung der IL-1 β - und IL-6 -Konzentration im Maushirnhomogenat mittels ELISA

Die Messung von IL-1 β - und IL-6-Konzentration im Maushirnhomogenat erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Quantikine® M Murine, mouse IL-1 β bzw. mouse IL-6, R&D Wiesbaden-Nordenstadt). Gefrorene Hirnschnitte wurden dazu in einem Probenpuffer (10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM Kaliumchlorid und folgenden Proteaseinhibito-

ren: Phenylmethylsulfonylfluorid, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A) 10 Minuten auf Eis inkubiert, dann im Ultraschallbad homogenisiert und mit 14000 Upm 15 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mittels Nanoquant Assay (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Pro Messung wurden 50 µl Überstand eingesetzt. Die IL-6-Konzentration wurde an gepoolten Proben untersucht und für die IL-1 β -Messung wurden neben gepoolten Proben auch Einzelproben eingesetzt. Die immunreaktiven IL-1 β - und IL-6 Konzentrationen wurden in pg/mg Hirnprotein angegeben.

3.13 Bestimmung der MMP-9-Aktivität im Maushirnhomogenat

Die Gelatinaseaktivität der Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 im Hirnhomogenat wurde mittels Zymographie bestimmt. Dazu wurden 30 µm Gefrierschnitte 15 Minuten bei 4 °C in 35 µl Lysepuffer (50 mM Tris, 15 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,02 % NaN₃, 0,05 % BRIJ-35, pH 7,6) inkubiert, im Ultraschallbad homogenisiert und 15 Minuten lang bei 60 °C erhitzt. Dann wurden die Proben 15 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand asserviert und dessen Proteingehalt bestimmt und abgeglichen (siehe 3.5.3). Dann wurden die Proben auf ein Acrylamidgel mit 10 % SDS (*sodium dodecyl sulfate*) aufgetragen und die Proteine bei U = 125 V, A = 60 mA über 100 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden in destilliertem Wasser mit 2 % Triton X 60 Minuten lang gewaschen, 24 Stunden bei 37 °C in Trispuffer (50 mM Tris, 1 µM ZnCl₂, 0,01 % Natriumazide, pH 7,5) inkubiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur in 20 %iger Trichloressigsäure fixiert. Die Gele wurden in einer wässrigen Lösung mit 0,4 % Coomassieblau, 10 % Essigsäure und 35 % Ethanol über 60 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und mit 10 % Essigsäure und 35 % Ethanol, 1:1, entfärbt. Die Konservierung erfolgte in 70 %igem Ethanol mit 4 % Glycerin über Nacht.

Die gelatinolytische Aktivität wird als durchsichtige Bande auf blauem Grund sichtbar. Zellkulturmedium der Leukämiezellreihe NB4 wurde als MMP-9 Standard verwendet.

Zur Auswertung wurden die Gele digitalisiert und die optische Dichte der Bande mittels eines Bildanalysesystems (VisitronSystems, Puchheim, Deutschland) bestimmt. Die relative MMP-9-Aktivität ist in optischer Dichte (OD) pro OD des NB 4-Standard dargestellt.

3.14 C-kit Proteinnachweis im Maushirnhomogenat

Die Western Blot Analyse wurde weitgehend wie unter 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden Tris-Bis-Gele und Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen mit dem entsprechenden Puffersystem verwendet (Novex, Frankfurt, Deutschland); eine Fixierung der Proteine mittels UV-Licht entfällt bei PVDF-Membranen. Als primärer Antikörper wurde der polyklonale anti-c-kit-Antikörper aus dem Kaninchen (sc-168, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) verwendet; er reagiert mit einem Peptid aus dem carboxyterminalen Anteil von c-kit der Spezies Maus, Ratte und Mensch. Er wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

3.15 Bestimmung der Bakterientiter im Maushirnhomogenat und in Blutproben

Zur Bestimmung der bakteriellen Titer wurden die Kleinhirne entnommen und in steriler PBS homogenisiert. Die Homogenate sowie Blutproben wurden in steriler PBS seriell verdünnt, auf Blutagarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet.

3.16 Herstellung von Hirnschnitten

Die Gefrierschnitte wurden in einem Kryostat (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) bei einer Kammertemperatur von -20 °C und einer Objekttemperatur von -17 °C angefertigt. Die Gehirne wurden zu keinem Zeitpunkt aufgetaut.

Vor dem Schneiden wurde, wenn vorhanden, das Einbettmedium von den tiefgefrorenen Hirnen entfernt und sie wurden auf einem Schneidetisch mit der Haube nach unten aufgeblockt, um die Meningen über den Hemisphären beim Schneiden zu schonen. Für die Immunhistochemie wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte aus verschiedenen Hirnregionen angefertigt. Für die Western Blot Analysen wurden 30 µm Gefrierschnitte aus der Region Bregma in Reaktionsgefäße abgefüllt, für ELISA mindestens 1500 µm und für PCR mindestens 750 µm aus allen Hirnregionen gepoolt. Hirnschnitte wurden bei -80 °C aufbewahrt.

3.17 Bakteriensuspension

Die Präparation der lebenden bekapselten *S. pneumoniae* Serotyp 3 wurde vom bakteriologischen Labor des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München durchgeführt. Dort wurde für uns eine Suspension mit einer Konzentration von 10^7 kolonienbildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, die in den Experimenten im Rattenmodell unverändert und im Mausmodell mit steriler PBS 1:1 verdünnt verwendet wurde.

3.18 Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Studie verwendeten Reagenzien und Substanzen von Sigma Chemicals (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

3.19 Statistische Methoden

Soweit in den Anmerkungen nicht anders angegeben, wurden die erhobenen Daten mittels einseitiger Varianzanalyse und Zweistichproben t-Test verglichen und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3.20 Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

4.1.1 Anstieg der Aktivität von NF- κ B im Rattenhirn während einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Gefrierschnitte aus Hirngewebe nicht infizierter und infizierter Ratten wurden mit einem gegen die nukleäre Lokalisierungssequenz der NF- κ B-Untereinheit p65 gerichteten Antikörper gefärbt. Dieses Epitop ist in der zytoplasmatischen, inaktiven Form von NF- κ B für den Antikörper nicht zugänglich.

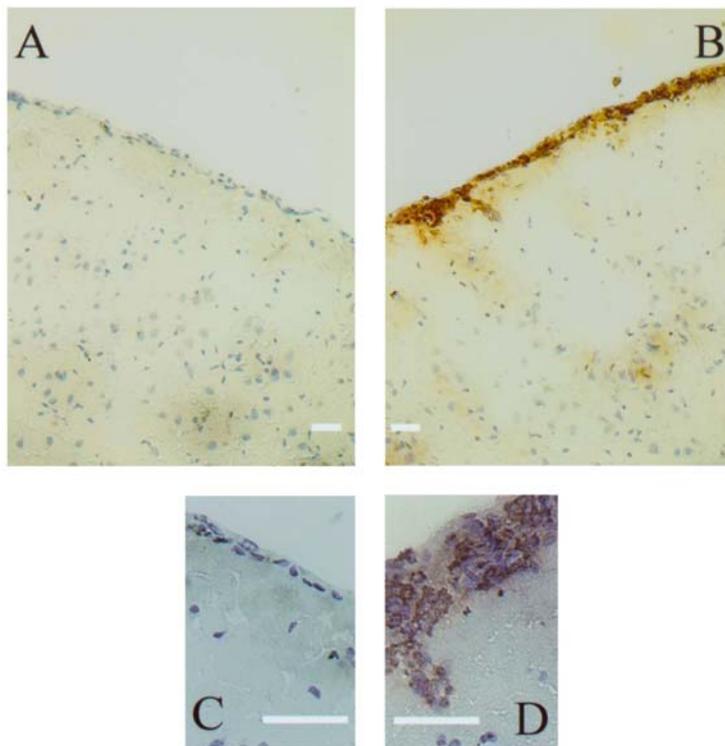


Abbildung 7

Immunhistochemie von Rattenhirngewebe mit einem gegen die nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) der NF- κ B-Untereinheit p65 gerichteten Antikörper. Eine Bindung an die NLS kann sich erst nach Lösung des Inhibitorproteins I κ B vom Heterodimer p50/p65 ausbilden. Nach 24 Stunden zeigt sich eine deutliche Färbung für p65 im meningealen entzündlichen Infiltrat der mit Pneumokokken infizierten Ratten (B, D), aber nicht bei den Kontrolltieren (A, C). Referenzbalken: 100 μ m.

In mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Ratten zeigte sich eine intensive Anfärbung der Leptomeningen, entlang penetrierender kortikaler Gefäße und in der Umgebung der Hirnventrikel. Die stärkste Antikörperbindung war um die meningealen Blutgefäße und in der Nähe der Entzündungszellen im Subarachnoidalraum nachzuweisen. Im Hirngewebe nicht infizierter Tiere und in Färbungen ohne primärem Antikörper ließ sich in den oben angeführten Hirnregionen keine Immunreaktivität beobachten. Allerdings zeigten

hippokampale Neurone auch bei nichtinfizierten Tieren eine Immunfärbung für p65. Subzellulär erfolgte die stärkste Anfärbung in den Zellkernen (Abbildung 7; Abbildung 8).

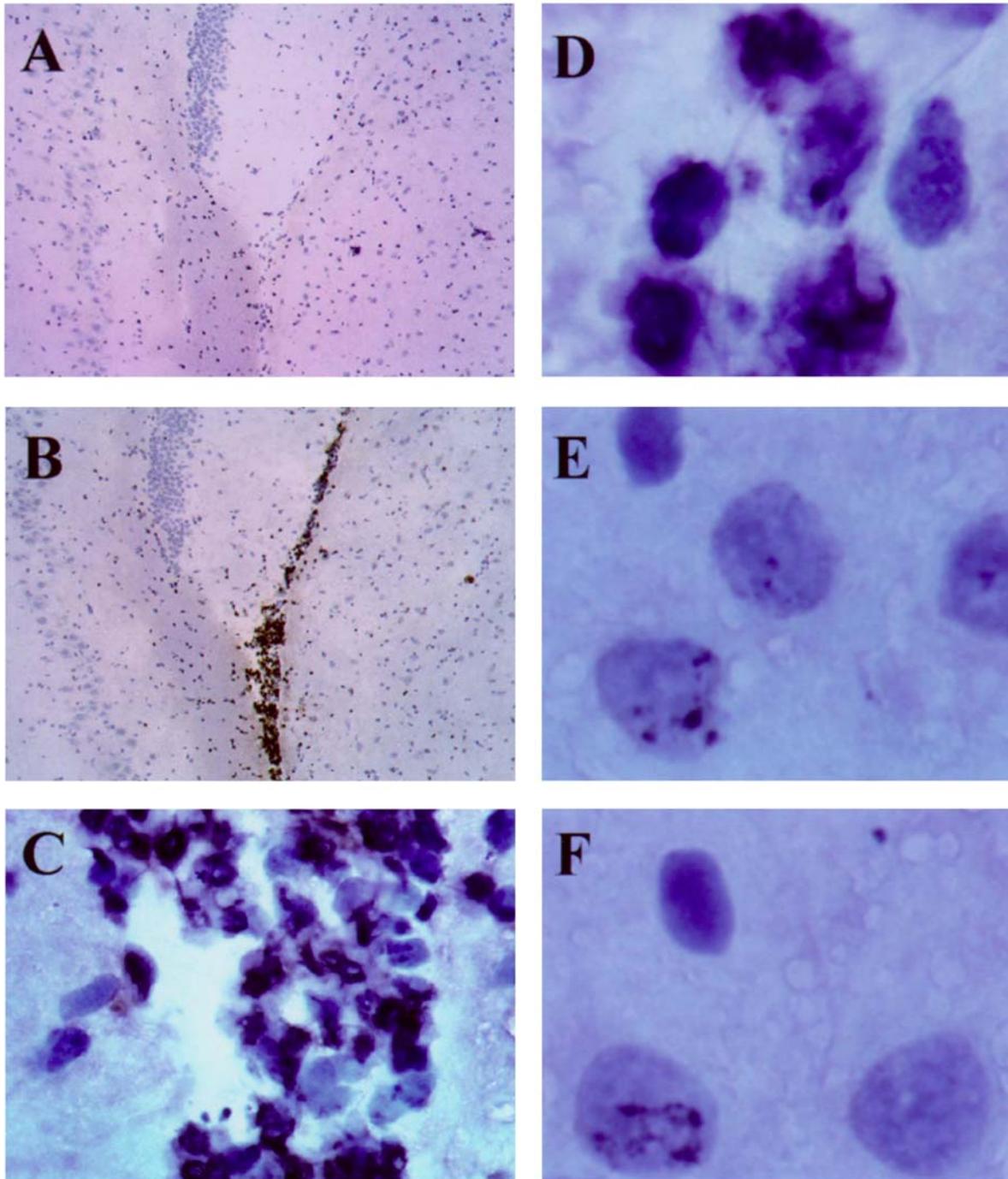


Abbildung 8 Immunhistochemie (vergleiche Abbildung 7). Intraventrikulär zeigt sich 24 Stunden nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* eine kräftige nukleäre Anfärbung der Entzündungszellen für p65 (B,C,D), bei den PBS-injizierten Tieren zeigt sich hier keine Anfärbung. In einigen hippocampalen Neuronen zeigte sich auch eine Immunfärbung für p65 (E, F). Hier stellt sich aber kein Unterschied zwischen Kontrolltieren (F) und infizierten Ratten (E) dar.

In Western Blot Analysen homogenisiertem Hirngewebe infizierter, unbehandelter Tiere mit oben beschriebenen Antikörper zeigte sich eine deutliche Bande bei 65 kD, die freies p65 repräsentieren kann. In Kontrollen war diese Bande nicht nachweisbar. Ebenso wenig zeigte sich diese Bande im Hirnhomogenat infizierter, mit ALLN oder BAY 11-7085 behandelte Tiere. Dieses Ergebnis unterstützt frühere Studien, die beide Substanzen als potente Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung beschreiben (Milligan et al. 1996; Pierce et al. 1997).

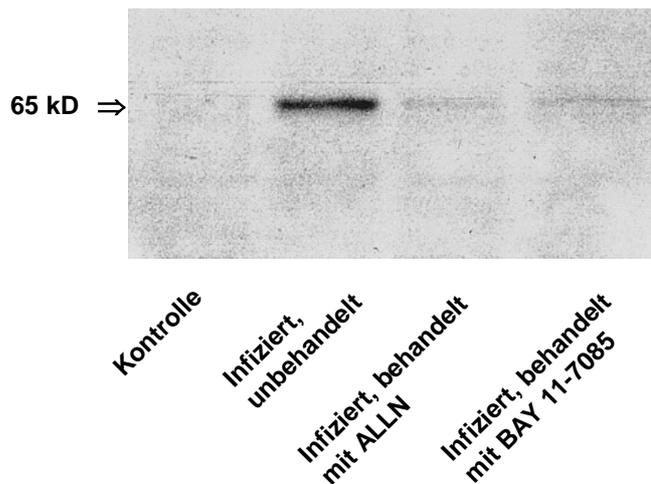


Abbildung 9

Western Blot Analyse aus homogenisiertem Hirngewebe (repräsentative Beispiele). Im Gewebe von infizierten, nicht behandelten Ratten zeigt sich im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine deutliche Bande freien p65. Im Hirngewebe von infizierten, mit ALLN oder BAY 11-7085 behandelten Tieren wurde keine Immunreaktivität gegen p65 nachgewiesen.

4.1.2 Beeinflussung der meningitisassoziierten klinischen Symptome durch pharmakologischen Eingriff in die NF- κ B-Aktivierung

Die klinische Untersuchung an Pneumokokkenmeningitis erkrankter, unbehandelter Ratten zeigte in allen Ratten eine vergleichbare Ausprägung der Symptomatik und des Krankheitsgrades. Die Ratten waren benommen und in ihren motorischen Funktionen (nächtlicher Nestbau, Balkenbalanceversuch) stark eingeschränkt, sie vernachlässigten die Fellpflege und zeigten Piloerektion. Die Futter- und Wasseraufnahme war auf ein Minimum reduziert und der Gewichtsverlust in der Regel größer als 5 %.

Durch die Behandlung mit den beiden Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung – ALLN und BAY 11-7085 – konnte der klinische Score der Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren mit Pneumokokkenmeningitis signifikant verbessert werden (**Abbildung 10**).

PBS-injizierte Kontrolltiere zeigten keinerlei klinische Krankheitszeichen während des Beobachtungszeitraumes.

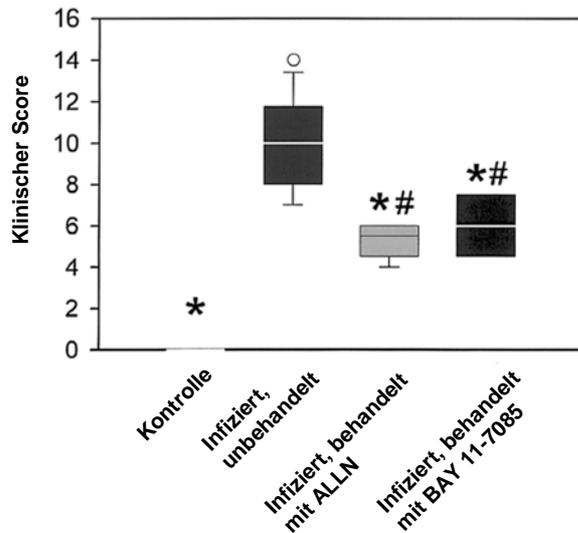


Abbildung 10

Positive Auswirkung der NF- κ B-Inhibition auf die klinischen Symptome von Ratten mit Pneumokokkenmeningitis. Sowohl die Therapie mit ALLN als auch mit BAY 11-7085 führte zu einem signifikant milderen Krankheitsverlauf gemessen an einer Reduzierung des klinischen Scores gegenüber infizierten unbehandelten Tieren. Die Kontrolltiere hatten einen klinischen Score von 0 Punkten, was Gesundheit entspricht. *P < 0,05 vs. unbehandelten infizierten Tieren. #P < 0,05 vs. Kontrollen, unter Verwendung einseitiger Varianzanalyse und Scheffes Test.

4.1.3 Auswirkung der NF- κ B-Aktivierung auf die meningitisassoziierten intrakraniellen und systemischen Komplikationen

4.1.3.1 Intrakranieller Druck

Die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* induzierte in allen infizierten Ratten einen signifikanten Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) gegenüber PBS-injizierten Kontrolltieren. Die Behandlung mit BAY 11-7085 sowie ALLN führte zu einer signifikanten Attenuierung dieses Druckanstieges. Bei mit ALLN therapierten Tieren war der ICP noch signifikant gegenüber den PBS-injizierten Tieren erhöht, bei mit BAY 11-7085 behandelten Ratten war der ICP zwar noch tendenziell, aber nicht signifikant erhöht (siehe **Tabelle 2**, Seite 44).

4.1.3.2 Bluthirnschrankenpermeabilität

Da das vasogene Ödem die Hauptursache des Hirndruckanstiegs bei der bakteriellen Meningitis darstellt, untersuchten wir die Bluthirnschrankenpermeabilität mittels Evans-Blau-Extravasationsmethode. In Kontrolltieren waren die Evans-Blau-Konzentrationen im Liquor als Zeichen einer intakten Bluthirnschranke unter der Nachweisgrenze. 24 Stunden nach intrazisternaler Inokulation von Pneumokokken ließen sich bei unbehandelten Ratten als Zeichen einer ausgeprägten Bluthirnschrankenstörung stark erhöhte Evans-Blau-Konzentrationen im Liquor und eine Extravasation von Evans-Blau am Hirnschnitt nachweisen. Durch die

Therapie mit ALLN und BAY 11-7085 konnte die Bluthirnschrankenpermeabilität signifikant gesenkt werden (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 11**)

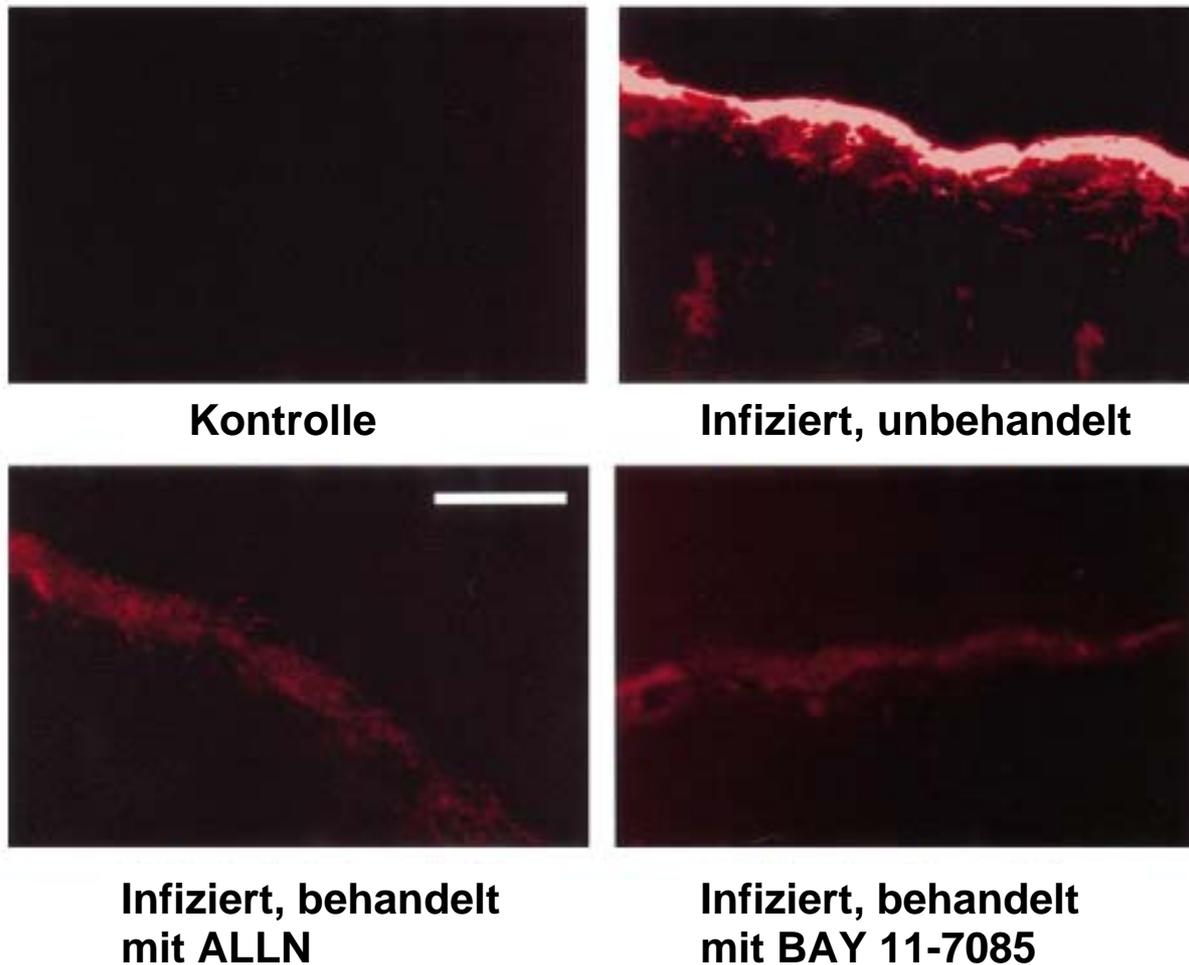


Abbildung 11 Bestimmung der Bluthirnschrankenpermeabilität mit der Evans-Blau-(EB) Extravasationsmethode und grüner Fluoreszenzmikroskopie. Bei allen infizierten Ratten zeigt sich eine EB-Extravasation in den Subarachnoidalraum und das Hirnparenchym, jedoch lässt sich eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals bei den mit ALLN oder BAY 11-7085 behandelten Tieren beobachten. Referenzbalken, 100µm.

4.1.3.3 Zerebrale Autoregulation

In Kontrolltieren blieb der rCBF nach Erhöhung des MABP durch intravenöse Infusion von Noradrenalin weitgehend konstant. In unbehandelten, infizierten Ratten dagegen erfolgte ein dramatischer Anstieg des rCBF unter Noradrenalin-induzierter Hypertension, der auf einen Verlust der zerebralen Autoregulation hinweist. Die Behandlung infizierter Tiere sowohl mit ALLN als auch mit BAY 11-7085 konnten die Störung der zerebrovaskulären Autoregulation signifikant vermindern (siehe **Abbildung 12**).

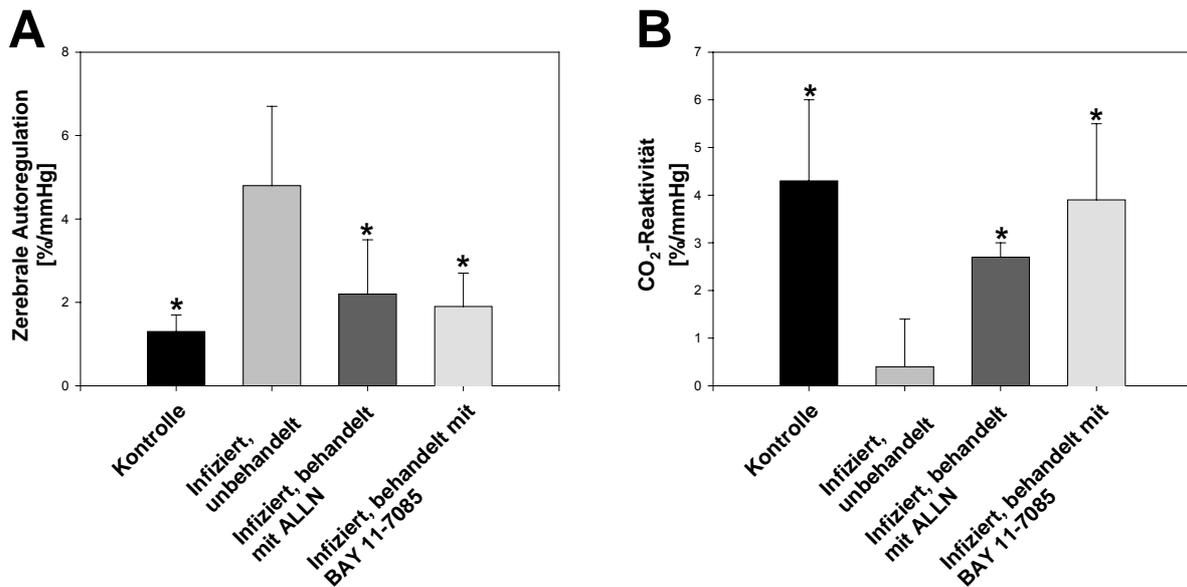


Abbildung 12 Auswirkungen der NF- κ B-Aktivierung auf zerebrovaskuläre meningitisassoziierte Komplikationen. Die zerebrale Autoregulation (A) ist als prozentualer Anstieg des CBF pro mmHg Anstieg des MABP angegeben. Die CO₂-Reaktivität der zerebralen Gefäße (B) als prozentualer Anstieg des CBF pro mmHg Anstieg des CO₂-Partialdruckes. *P < 0,05 vs. infizierte, nichtbehandelte Ratten unter Verwendung einseitiger Varianzanalyse und Scheffes Test. Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. ALLN, N-Acetyl-Leuciny-Leuciny-Norleucinal; CBF, zerebraler Blutfluss; MABP, mittlerer arterieller Blutdruck.

4.1.3.4 Kohlendioxidreaktivität der zerebralen Gefäße

Bei den Kontrolltieren stieg der regionale Blutfluss pro Erhöhung des PaCO₂ um 1 mmHg um $4,3 \pm 1,7$ % an, dieser Anstieg weist auf eine intakte CO₂-Reaktivität der zerebralen Gefäße hin. Bei infizierten Ratten war die Antwort auf einen PaCO₂-Anstieg vierundzwanzig Stunden nach Pneumokokkeninfektion mit $0,4 \pm 1,0$ % erheblich reduziert. Dieser durch *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufene Verlust der Reaktivität der zerebralen Gefäße auf Hyperkapnie konnte durch die beiden Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung signifikant abgemildert werden (siehe **Abbildung 12**).

4.1.3.5 Mittlerer arterieller Blutdruck

Nicht infizierte Ratten waren mit einem mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) von 120 ± 10 mmHg normoton. Die intrazisternale Inokulation von Pneumokokken führte im Be-

obachtungszeitraum zu einem signifikanten Blutdruckabfall (MABP 68 ± 20 mmHg) im Sinne eines septischen Krankheitsbildes. Bei den mit ALLN beziehungsweise BAY 11-7095 therapierten Ratten lagen die MABP-Werte bei 87 ± 23 bzw. 83 ± 27 mmHg und damit über den Werten der unbehandelten infizierten Tieren, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (siehe **Tabelle 2**).

Tabelle 2 **Auswirkungen einer NF- κ B-Aktivierung auf meningitisassoziierte intrakranielle und systemische Komplikationen.**

Versuchsgruppe (n)	Intrakranieller Druck [mmHg]	Evans-Blau-Liquorkonzentration [μ g/ml]	MABP [mmHg]
Kontrollen (6)	$2,5 \pm 1,2^a$	$< 0,2$	120 ± 10
Infiziert, nicht behandelt (10)	$16,3 \pm 5,0$	$7,5 \pm 6,1$	68 ± 20^b
Infiziert, mit ALLN behandelt (6)	$8,8 \pm 2,9^{a,b}$	$1,3 \pm 1,7^a$	87 ± 27^b
Infiziert, mit BAY 11-7085 behandelt (3)	$5,3 \pm 3,5^a$	$0,7 \pm 0,8^a$	83 ± 23^b

Anmerkung: Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. ALLN, N-Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal; MABP, mittlerer arterieller Blutdruck.

^a $P < 0,05$ vs. infizierte, nicht behandelte Ratten.

^b $P < 0,05$ vs. PBS-injizierte Kontrolltiere.

Unter Verwendung von einseitiger Varianzanalyse und Scheffes Test.

4.1.4 Auswirkung eines pharmakologischen Eingriffs in die NF- κ B-Aktivierung auf die Entzündungsantwort des Wirtes

4.1.4.1 Liquorzellzahl

Die Pneumokokkeninfektion führte bei unbehandelten Ratten zur Einwanderung von Leukozyten in den Subarachnoidalraum. Durch die Behandlung mit ALLN beziehungsweise BAY 11-7085 wurde die Leukozyteninfiltration signifikant reduziert (siehe **Tabelle 3**).

4.1.4.2 IL-6 Konzentration im *Liquor cerebrospinalis*

Da NF- κ B ein Transkriptionsfaktor für Gene proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 ist (Baeuerle und Henkel 1994; Barnes und Karin 1997) und verschiedene klinische sowie experimentelle Studien einen starken Anstieg der IL-6-Liquorkonzentration bei der Pneumokokkenmeningitis zeigen konnten (Koedel et al. 1996), untersuchten wir auch die Auswirkung der NF- κ B-Inhibierung auf die Konzentrationen von IL-6 im Liquor. Die Pneumokokkeninfektion führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Liquorkonzentration. Die mit ALLN therapierten Tiere hatten signifikant niedrigere IL-6-Werte im Liquor (siehe **Tabelle 3**).

Diese Daten weisen darauf hin, dass der positive klinische Effekt auf eine dramatische Reduktion der Entzündungsantwort des Wirts zurückzuführen ist.

Tabelle 3 **Auswirkung der NF- κ B-Hemmung auf die Entzündungsantwort des Wirtsorganismus**

Versuchsgruppe (<i>n</i>)	Liquorzellzahl [Zellen/ μ l]	IL-6-Liquorkonzentration [pg/ml]
Kontrollen (6)	39 \pm 45 ^a	267 \pm 168 ^a
Infiziert, nicht behandelt (10)	7463 \pm 4364	5291 \pm 1455
Infiziert, mit ALLN behandelt (6)	1563 \pm 1386 ^{a,b}	1013 \pm 932 ^a
Infiziert, mit BAY 11-7085 behandelt (3)	1415 \pm 816 ^{a,b}	ND

Anmerkung: **Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. ALLN, N-Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal;**

^a P < 0,05 vs. infizierte, nicht behandelte Ratten.

^b P < 0,05 vs. PBS-injizierte Kontrolltiere.

Unter Verwendung von einseitiger Varianzanalyse und Scheffes Test.

4.2 Die Rolle der Mastzelle in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

4.2.1 Nachweis von Mastzellaktivierung im Hirngewebe während experimenteller Pneumokokkenmeningitis

Im ruhenden Zustand sind Mastzellen prallgefüllt mit Granula. Die Degranulierung ist ein Marker für die Aktivierung der Mastzellen.

In der Färbung nach Giemsa ließen sich sowohl vier als auch 24 Stunden nach Infektion mit Pneumokokken degranulierte Mastzellen im Hirngewebe nachweisen. Zudem war die Anzahl der Mastzellen im Hirngewebe infizierter Tiere signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrolltieren, was auf vollständige Degranulierung hinweist ($1,1 \pm 0,5$ Mastzellen/Schnitt bei Kontrollen vs. $0,27 \pm 0,29$ Mastzellen/Schnitt bei infizierten Tieren; $p < 0,005$).

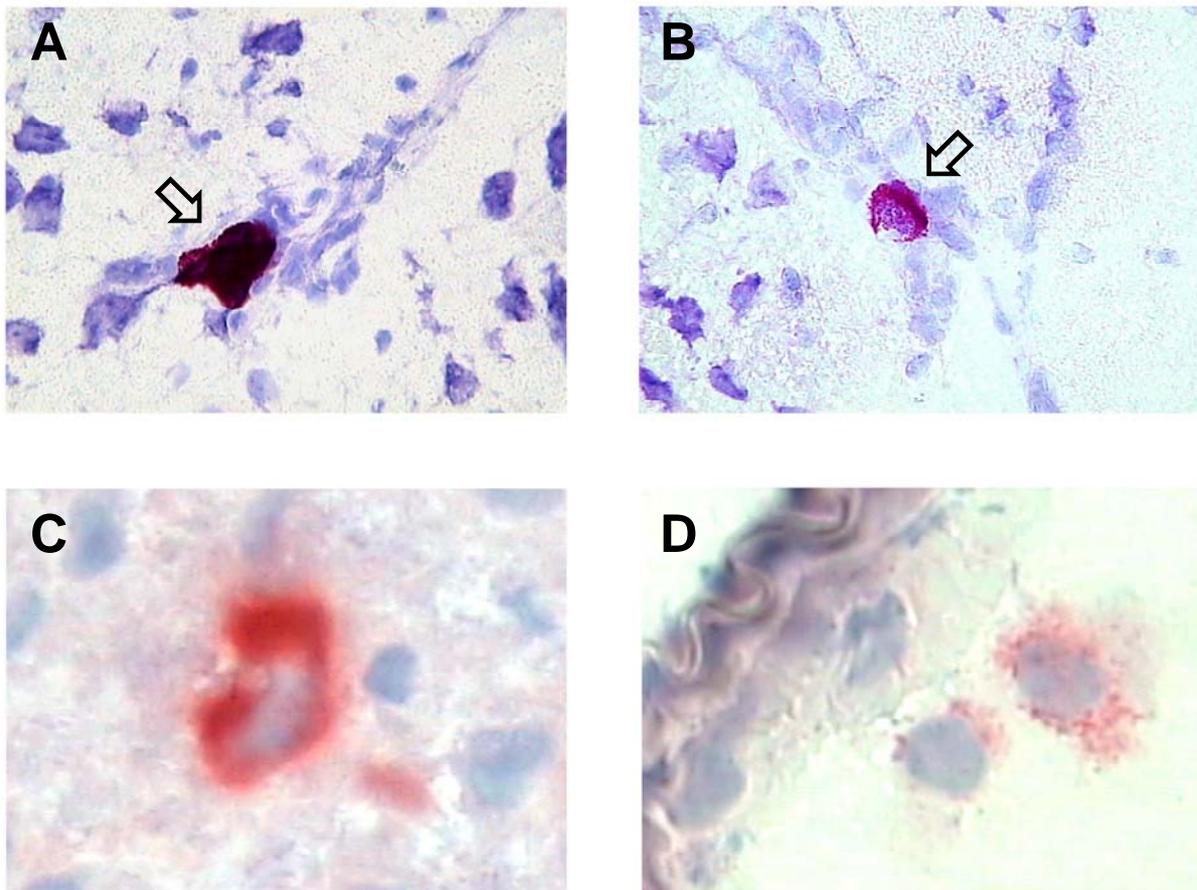


Abbildung 13 Giemsa- (A;B) und Chloracetatesterasefärbung (C;D) zur Mastzelldarstellung an Hirnschnitten von Wildtypmäusen. A und C zeigen prall mit Granula gefüllte Mastzellen im Hirnparenchym von Kontrolltieren, während B und D teilweise degranulierte Mastzellen 24 Stunden nach Pneumokokkeninfektion zeigen.

Mastzellen waren hauptsächlich meningeal, perivaskulär und periventriculär lokalisiert. Bei mastzelldefizienten Tieren waren keine Mastzellen im Hirngewebe nachweisbar (0 Mastzellen/Schnitt). Bei mastzellrekonstituierten Tieren ließen sich vereinzelt Mastzellen im Hirngewebe nachweisen ($0,1 \pm 0,09$ Mastzellen/Schnitt).

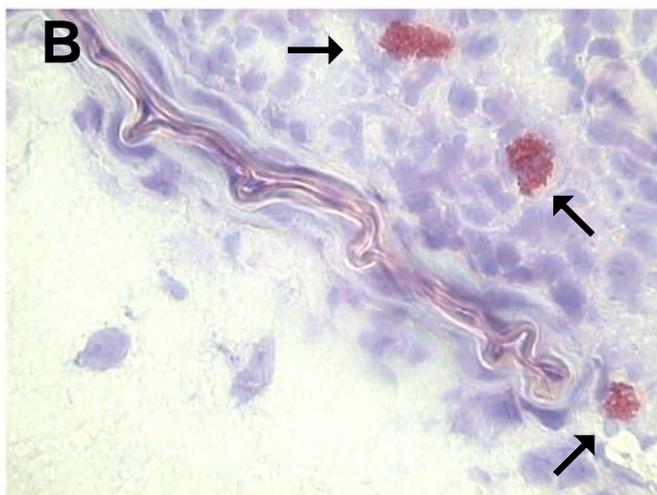
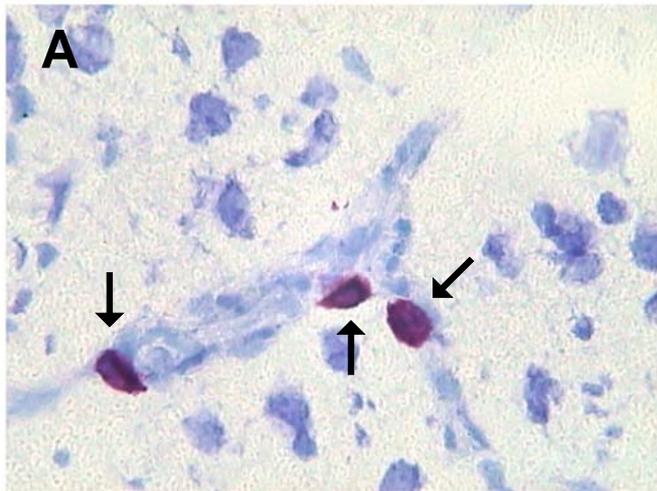


Abbildung 14

Darstellung der typischen Lokalisationen von Mastzellen im ZNS: (A) perivaskulär; (B) im Plexus choroideus und (C) meningeal. Auch hier zeigt sich eine Degranulierung der Mastzellen bei den an Meningitis erkrankten Tieren (B;C) verglichen mit dem Kontrolltier (A). Giemsa-färbung.

4.2.2 Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf den klinischen Status

In der klinischen Untersuchung zeigte sich bei allen Wildtyptieren 24 Stunden nach Infektion eine ähnlich schwere Ausprägung der Krankheit hinsichtlich Gewichtsverlust, Wachheitsgrad, Fellzustand und Störung der motorischen Funktionen. Die Krankheit verlief bei den mastzelldefizienten WBB6F1/J-*Kit^W/Kit^{W-v}* (kurz W/W^v) Mäusen signifikant milder. Mastzellrekonstituierte W/W^v Mäuse dahingegen zeigten einen den Wildtyptieren vergleichbar schlechten klinischen Verlauf (siehe **Abbildung 15**).

Die PBS-injizierten Kontrolltiere zeigten während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Krankheitssymptome. In den Versuchsgruppen, die vier Stunden nach intrazisternaler Pneumokokkengabe untersucht wurden, zeigten sich diskrete Krankheitssymptome. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen Wildtyptieren und W/W^v-Tieren jedoch nicht.

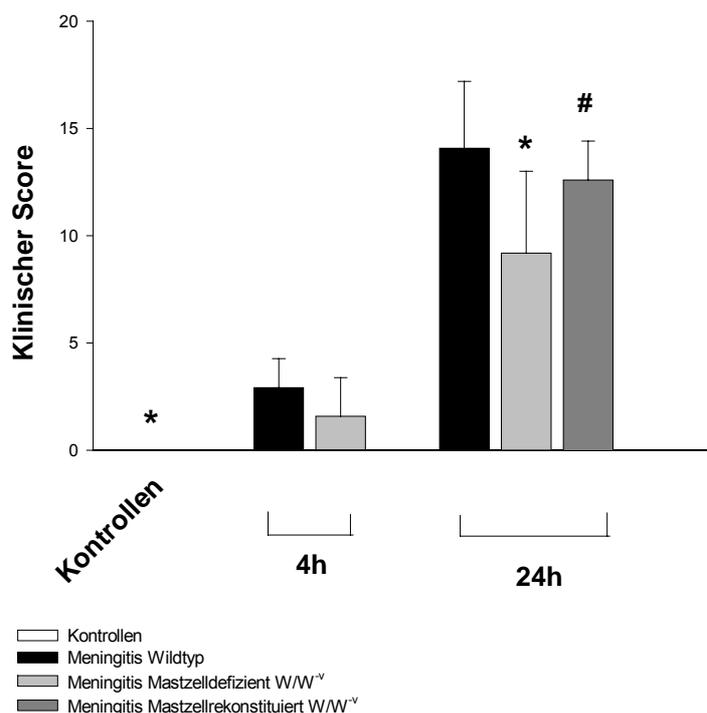


Abbildung 15

Positive Effekte der Mastzelldefizienz auf den klinischen Zustand der Mäuse mit Pneumokokkenmeningitis. Die Mastzelldefizienz war mit einem signifikant milderem Krankheitsverlauf gegenüber Wildtyptieren und mastzellrekonstituierten W/W^v-Mäusen assoziiert. Kontrolltiere hatten einen klinischen Score von 0 Punkten (Gesundheit). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. * $p < 0,001$ verglichen mit infizierten Wildtyptieren. # $p < 0,05$ verglichen mit infizierten mastzelldefizienten W/W^v Tieren nach einseitiger Varianzanalyse und t-Test.

4.2.3 Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf meningitisassoziierte zentralnervöse Komplikationen

Da meningitisassoziierte ZNS-Komplikationen eine häufige Ursache für einen schweren klinischen Verlauf darstellen, untersuchten wir die Auswirkung von Mastzelldefizienz auf den Anstieg des intrakraniellen Druckes und die Bluthirnschrankenpermeabilität.

Im Rahmen der Meningitis kam es bei allen Versuchstieren zu einem signifikanten Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP). Die mastzelldefizienten W/W^v Mäuse hatten 24 Stunden nach Infektion signifikant niedrigere ICP-Werte als die infizierten Wildtyptiere. Mastzellrekonstituierte W/W^v Mäuse zeigten ebenfalls höhere Druckwerte als W/W^v Mäuse, der Unterschied war aufgrund der relativ niedrigen Fallzahl jedoch nicht signifikant.

Da das vasogene Ödem die Hauptursache des meningitisassoziierten ICP-Anstiegs darstellt, untersuchten wir die Immunogenität für das Serumprotein Albumin mittels ELISA im Hirnhomogenat als Marker für die Bluthirnschrankenstörung. Im Hirnhomogenat der PBS-injizierten Tieren waren nur geringe Mengen von Albumin nachweisbar, während die Injektion von Pneumokokken zu einer starken Extravasation von Albumin führte. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyptieren und W/W^v Mäusen (siehe **Abbildung 16**).

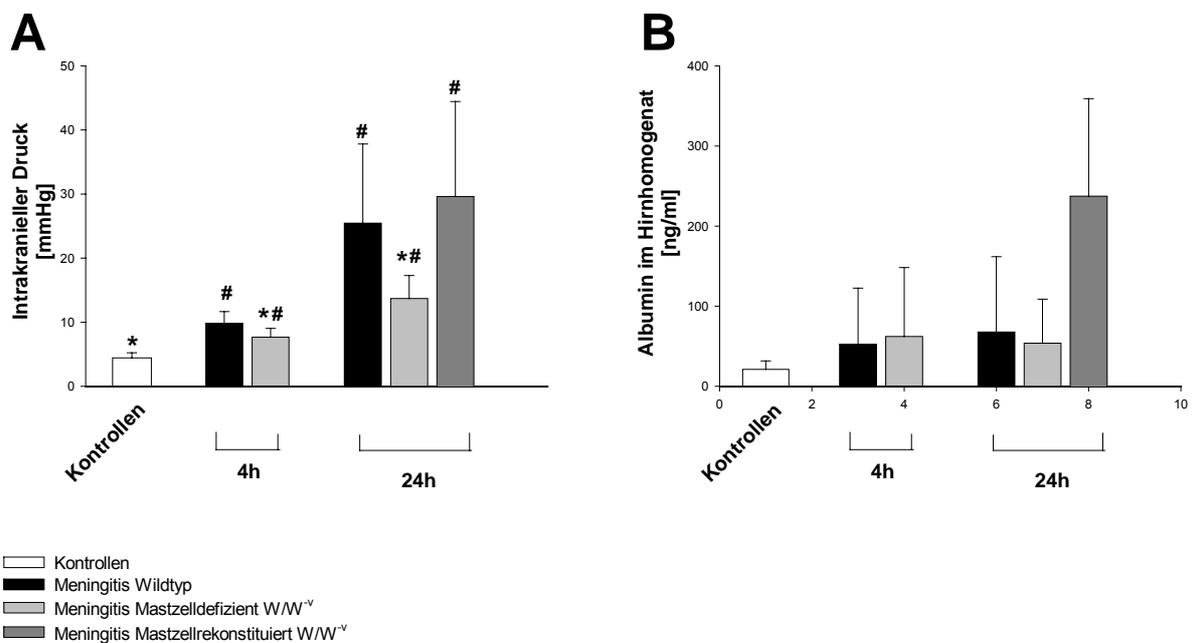


Abbildung 16 Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf meningitisassoziierte zentralnervöse Komplikationen. Die Pneumokokkeninfektion verursachte einen Anstieg des intrakraniellen Drucks (A) und der Bluthirnschrankenpermeabilität, gezeigt durch einen Albuminanstieg im Hirngewebe (B). Die infizierten mastzelldefizienten W/W^v Mäuse hatten einen signifikant geringeren ICP-Anstieg als die infizierten Wildtyptiere. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. * $p < 0,05$ verglichen mit infizierten Wildtyptieren. # $p < 0,05$ verglichen mit Kontrolltieren nach einseitiger Varianzanalyse und t-Test.

4.2.4 Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf bakterielle Titer in ZNS und Blut

Um zu untersuchen, ob der günstigere klinische Verlauf mit einer Veränderung des bakteriellen Wachstums *in vivo* assoziiert ist, bestimmten wir die bakteriellen Titer nach Infektion. Im Kleinhirn war die Anzahl der Pneumokokkenkolonien bei mastzelldefizienten W/W^{-v} Mäusen niedriger als bei Wildtyptieren (siehe **Abbildung 17**).

Im Blut zeigten sich 24 Stunden nach Infektion keine signifikanten Unterschiede zwischen mastzelldefizienten W/W^{-v} Mäusen ($7,49 \pm 0,77$ log KBE/ml) und Wildtyptieren ($8,12 \pm 0,74$ log KBE/ml) hinsichtlich des bakteriellen Wachstums.

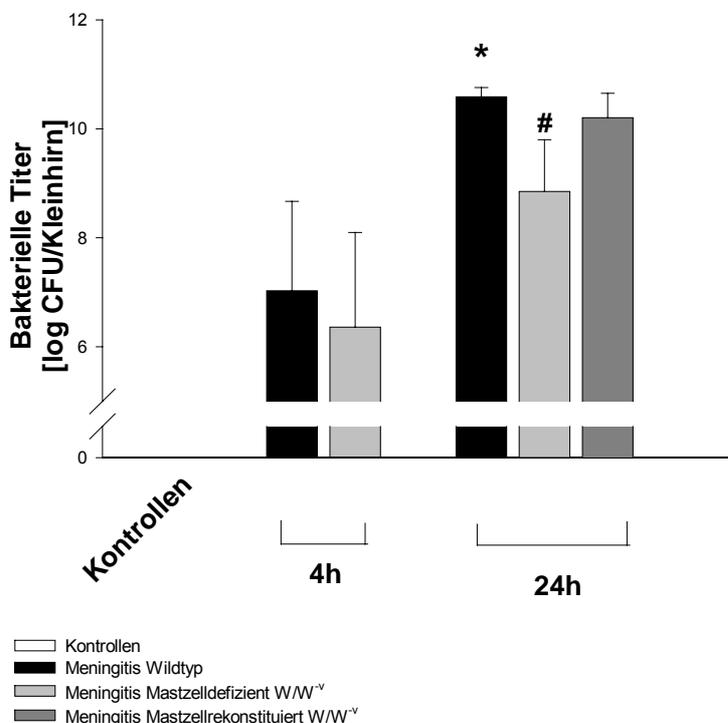


Abbildung 17

Bakterielle Titer im Kleinhirn während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis. 24 Stunden nach Infektion waren bei mastzelldefizienten W/W^{-v} Mäusen signifikant weniger Kolonien von *Streptococcus pneumoniae* im Kleinhirn nachzuweisen als bei Wildtyptieren. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. * $p < 0,0005$ verglichen mit Kontrolltieren. # $p < 0,01$ verglichen mit infizierten Wildtyptieren nach einseitiger Varianzanalyse und t-Test. KBE, koloniebildende Einheiten.

4.2.5 Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf die wirtseigene Abwehrreaktion

Die Pneumokokkeninfektion führte bei allen Versuchstieren zu einer massiven Einwanderung von Leukozyten in den Subarachnoidalraum. Mastzelldefiziente W/W^{-v} Mäuse hatten sowohl nach 4 als auch nach 24 Stunden signifikant höhere Liquorzellzahlen als infizierte Wildtyptiere und mastzellrekonstituierte W/W^{-v} Mäuse (siehe **Abbildung 18**).

PBS-injizierte Kontrolltiere zeigten eine Reizpleozytose von 240 ± 48 Zellen / μ l.

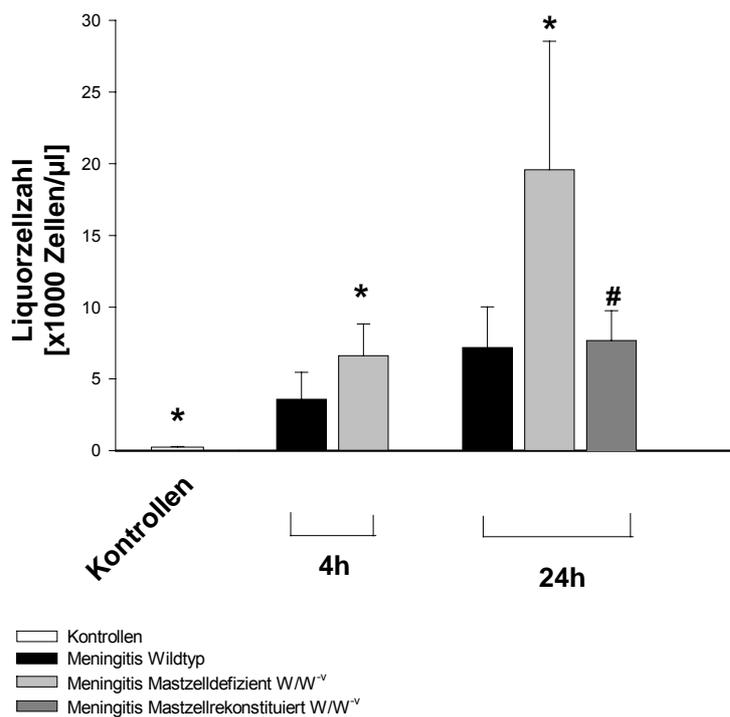


Abbildung 18

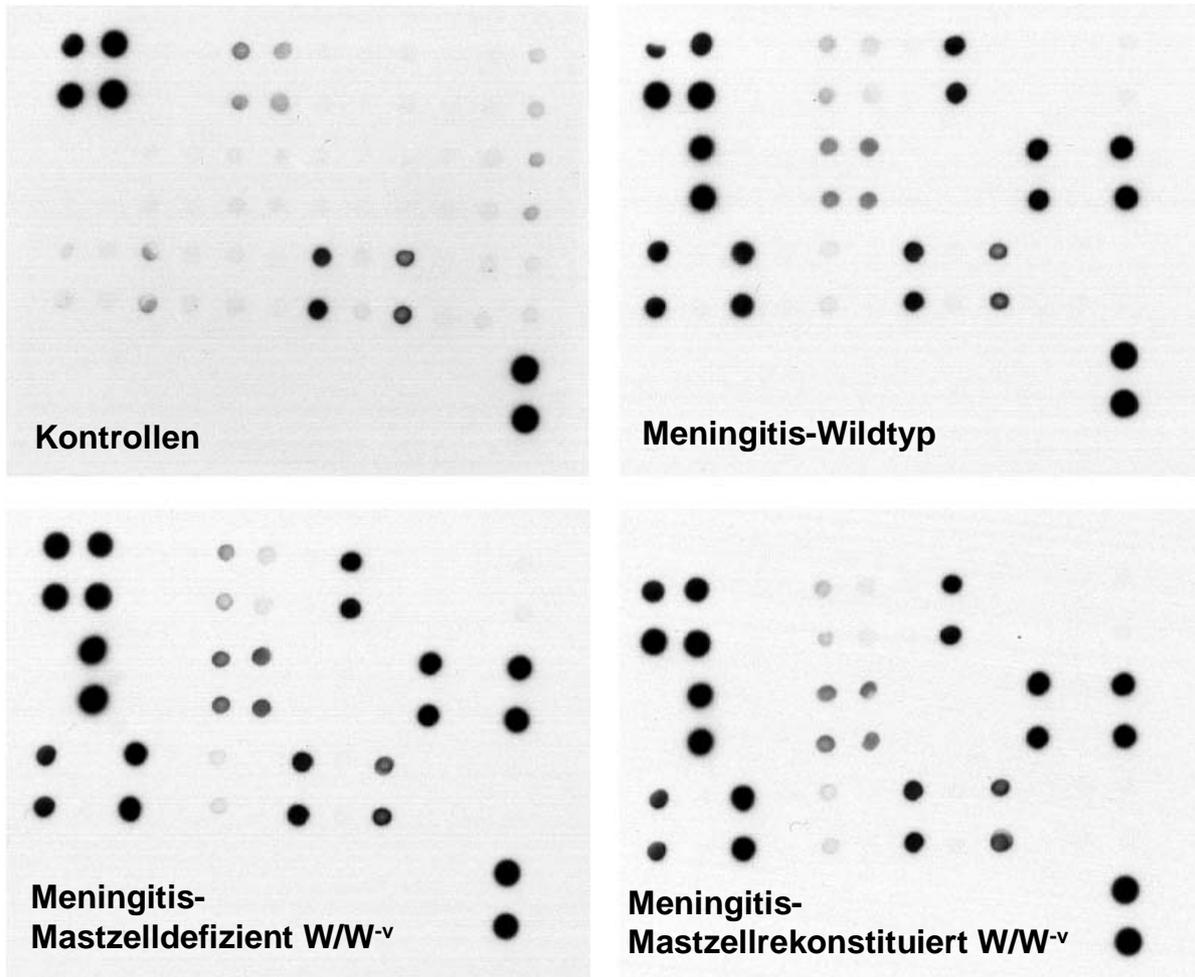
Massive Liquorpleozytose aller infizierten Tiere 4 und 24 Stunden nach Pneumokokkeninjektion. Mastzelldefiziente W/W^v Mäuse hatten signifikant höhere Liquorzellzahlen verglichen mit infizierten Wildtyptieren und mastzellrekonstituierten W/W^v Mäusen. *p < 0,05 verglichen mit infizierten Wildtyptieren. #p < 0,0005 verglichen mit infizierten mastzell-defizienten W/W^v Tieren nach einseitiger Varianzanalyse und t-Test. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben

Um die pneumokokkeninduzierte Entzündungsantwort und den Einfluss der Mastzelle darauf weiter zu charakterisieren, untersuchten wir die Proteinexpressionsprofile verschiedener meningitisrelevanter Zyto- und Chemokine mittels Proteinarray bzw. ELISA aus Hirnhomogenat. Die Pneumokokkeninokulation führte nach 24 Stunden zu einem massiven Anstieg von Zyto- und Chemokinen der Akutphase im Hirngewebe infizierter Tiere gegenüber Kontrolltieren. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Versuchstieren. Insbesondere ergaben sich keine Unterschiede zwischen infizierten Mäusen in der Proteinexpression der stark neutrophilenchemotaktischen Chemokine MIP-(*macrophage inflammatory protein*)-2 und KC (*keratinocyte-derived cytokine*), funktionelle Homologe des menschlichen IL-8 in der Maus. TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) und sTNFrI (*soluble tumor necrosis factor α receptor I*) waren bei Kontrolltieren und infizierten Mäusen gleichermaßen erhöht (siehe **Abbildung 19**).

Da IL-1 β , ein in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis zentrales Zytokin (Ramilo et al. 1990; Saukkonen et al. 1990; Koedel et al. 2002b), nicht auf dem Chip des Proteinarray enthalten war, führten wir einen IL-1 β -ELISA durch. Die IL-1 β -Konzentrationen im Hirngewebe waren bei allen infizierten Mäusen 24 Stunden nach Pneumokokkeninokulation massiv gegenüber den Kontrolltieren erhöht (Wildtypiere 562 pg/mg; mastzelldefiziente W/W^v Mäuse 765 pg/mg; mastzellrekonstituierte W/W^v Mäuse 1007 pg/mg vs. Kontrolltiere

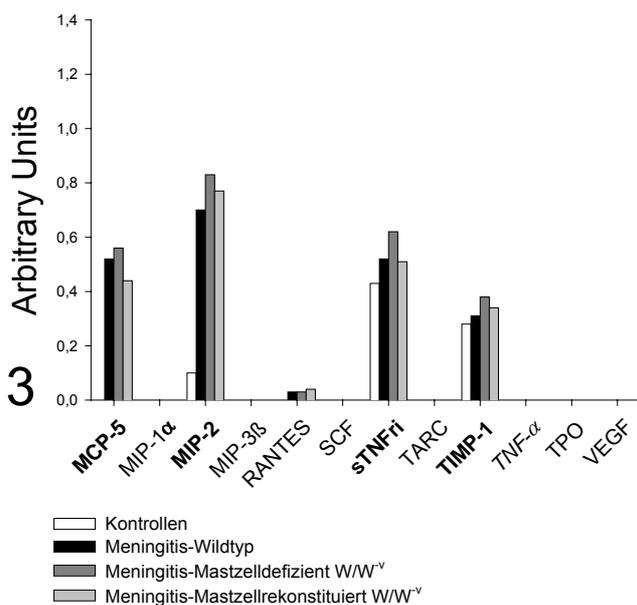
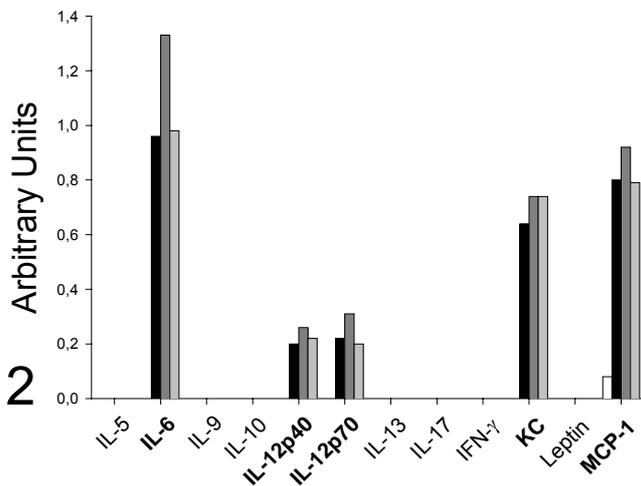
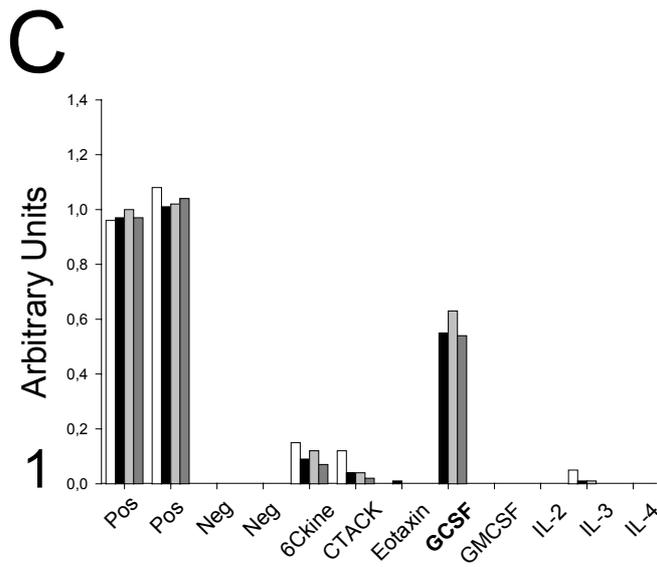
0 pg/mg. Da die Proben der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt verwendet wurden, sind die Werte ohne Standardabweichung angegeben).

A



B

Pos	Pos	Neg	Neg	6Ckine	CTACK	Eotaxin	GCSF	GM-CSF	IL-2	IL-3	IL-4
Pos	Pos	Neg	Neg	6Ckine	CTACK	Eotaxin	GCSF	GM-CSF	IL-2	IL-3	IL-4
IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40	IL-12p70	IL-13	IL-17	IFN-	KC	Leptin	MCP-1
IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40	IL-12p70	IL-13	IL-17	IFN-	KC	Leptin	MCP-1
MCP-5	MIP-1a	MIP-2	MIP-3 beta	RANTES	SCF	sTNFri	TARC	TIMP-1	TNF- α	Tpo	VEGF
MCP-5	MIP-1a	MIP-2	MIP-3 beta	RANTES	SCF	sTNFri	TARC	TIMP-1	TNF- α	Tpo	VEGF
											Pos
											Pos



□ Kontrollen
 ■ Meningitis-Wildtyp
 ■ Meningitis-Mastzelldefizient W/W^v
 ■ Meningitis-Mastzellrekonstituiert W/W^v

Abbildung 19

Proteinarray aus Maushirnhomogenat zur Charakterisierung der wirtseigenen Immunantwort auf *Streptococcus pneumoniae*.

24 Stunden nach Pneumokokkeninokulation ließ sich eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression von IL-6, KC, MCP-1, MCP-5, MIP-2, GCSF, IL12p40 und IL-12p70 nachweisen, allerdings ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtyptieren und W/W^v Mäusen hinsichtlich der Expression dieser Mediatoren.

(A) zeigt die Arraymembranen, (B) die Membranbelegung und (C 1-3) die optische Dichte der Signale auf der Membran, wobei die Dichte der Positivkontrolle einer *Arbitrary Unit* entspricht.

Anmerkung

IL, Interleukin; KC, keratinocyte-derived cytokine; MCP, macrophage chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; sTNF α I, soluble tumor necrosis factor α receptor I; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; GCSF, granulocyte colony stimulating factor; Pos, Positivkontrolle; Neg, Negativkontrolle.

Hohe Liquorspiegel von MMP-9 sind ein potentieller Risikofaktor für einen schweren Krankheitsverlauf bei bakterieller Meningitis (Leppert et al. 2000).

Mastzellen können MMP-9 nach Stimulation mit Peptidoglykan grampositiver Bakterien ausschütten oder es mittels mastzellspezifischer Proteasen, den β -Chymasen, aktivieren (Ikeda und Funaba 2003). Daher untersuchten wir die MMP-9-Aktivität im Hirnhomogenat der verschiedenen Versuchsgruppen mittels Zymographie (siehe **Abbildung 20**). 24 Stunden nach Pneumokokkeninokulation zeigt sich ein Anstieg der MMP-9-Aktivität bei allen infizierten Mäusen gegenüber Kontrolltieren (W/W^v $0,82 \pm 0,61$ OD/OD NB 4; Wildtyp $0,19 \pm 0,23$ OD/OD NB 4; $W/W^v + BMMC$ $0,66 \pm 0,5$ OD/OD NB 4 vs. Kontrollen $0,02 \pm 0,02$ OD/OD NB 4; * $p < 0,05$ für W/W^v und $W/W^v + BMMC$ - Tiere verglichen mit Kontrolltieren nach t-Test und einseitiger Varianzanalyse).

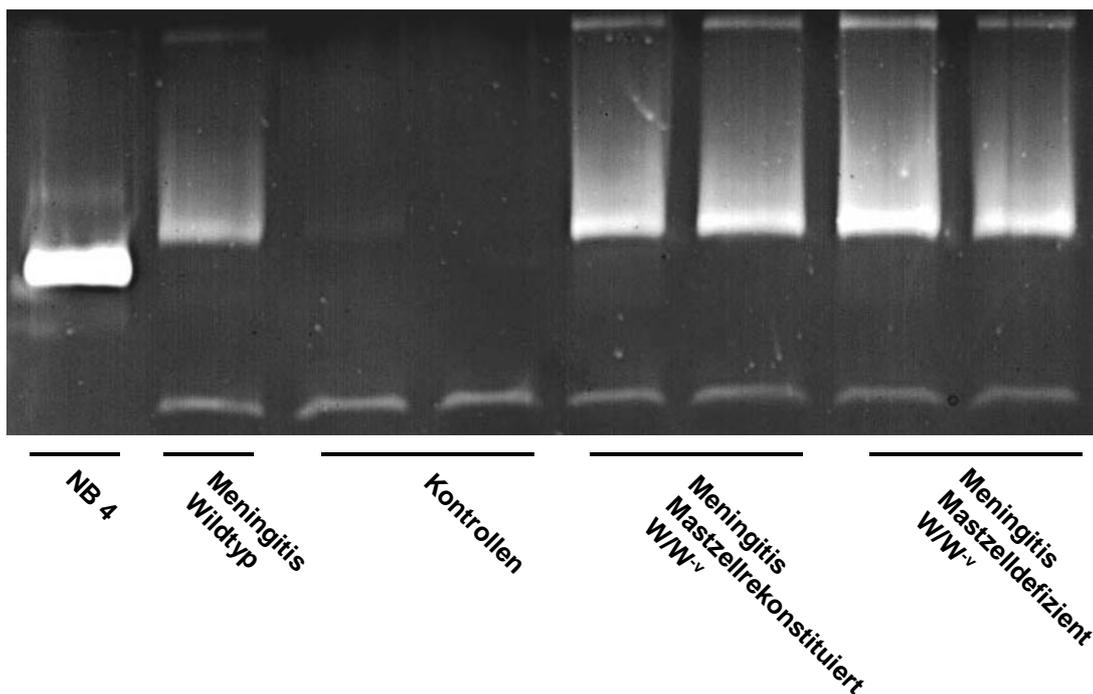


Abbildung 20 Bestimmung der MMP9-Aktivität im Hirnhomogenat mittels Zymographie (repräsentative Beispiele). 24 Stunden nach Pneumokokkeninokulation zeigt sich ein Anstieg der MMP-9 Aktivität bei allen infizierten Mäusen.

4.2.6 Auswirkung der Mastzelldefizienz und -rekonstitution auf meningitisassoziierte systemische Komplikationen

Da es im Zusammenhang mit einer Pneumokokkenmeningitis zu einer hämatogenen Keim- aussaat kommen kann, können systemische Komplikationen, im besonderen der septische Schock und die Pneumonie, zu einem ungünstigen Krankheitsverlauf führen (Pfister et al. 1993; Kastenbauer und Pfister 2003).

Als Marker für pneumonische Infiltrate untersuchten wir die Leukozyteneinwanderung in das Lungengewebe mittels eines Myeloperoxidase (MPO)-Assays. Bei infizierten Wildtypmäusen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MPO-Aktivität gegenüber Kontrolltieren, was für die Ausbildung eines Infiltrates spricht. Im Lungengewebe mastzelldefizienter W/W^v Mäuse war keine Erhöhung der MPO-Aktivität nachzuweisen. Bei den mastzellrekonstituierten W/W^v Mäusen war die MPO-Aktivität gegenüber den Kontrolltieren erhöht, jedoch nicht signifikant (siehe **Abbildung 21**).

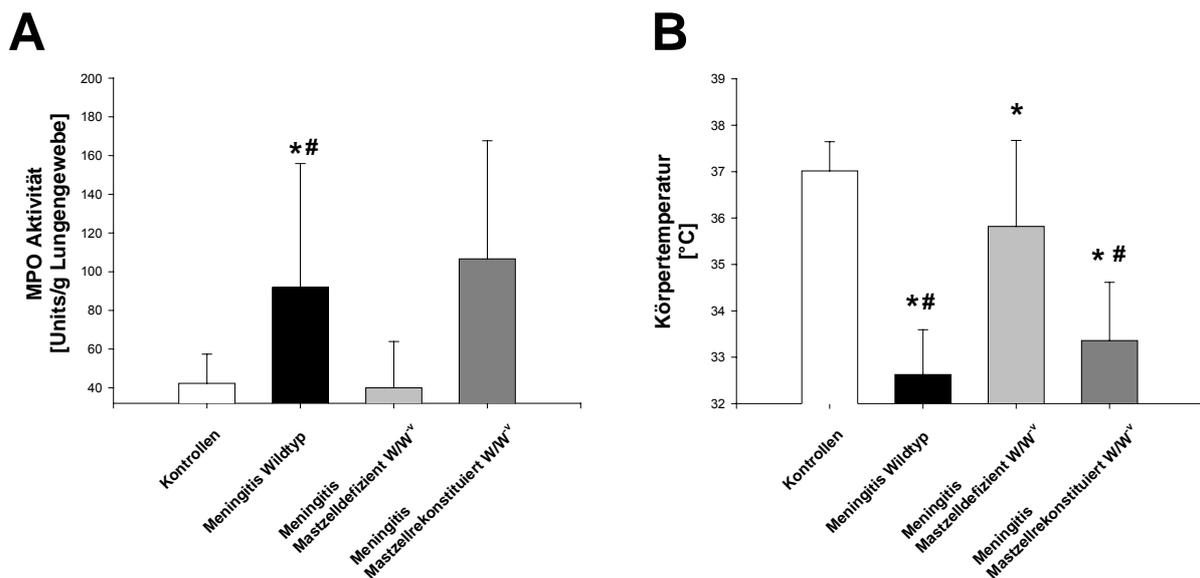


Abbildung 21 Auswirkung von Mastzelldefizienz auf meningitisassoziierte systemische Komplikationen. Die Pneumokokkeninfektion verursachte nach 24 Stunden (A) einen signifikanten Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe als Hinweis auf pneumonische Infiltrate sowie (B) einen am ehesten septisch bedingten Abfall der Körpertemperatur. Bei mastzelldefizienten W/W^v Mäusen waren diese systemischen Komplikationen signifikant geringer ausgeprägt. * $p < 0,05$ verglichen mit Kontrollen; # $p < 0,01$ verglichen mit infizierten mastzelldefizienten W/W^v Mäusen nach einseitiger Varianzanalyse und t-Test. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Bei allen mit *Streptococcus pneumoniae* intrazisternal infizierten Mäusen kam es zu einem ausgeprägten, am ehesten septisch bedingten Abfall der Körpertemperatur im Vergleich zu

den Kontrolltieren, allerdings war dieser bei mastzelldefizienten W/W^{-v} Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als bei Wildtyp- und mastzellrekonstituierten Mäusen (siehe **Abbildung 21**).

4.2.7 Auswirkung der Mastzellrekonstitution auf die Blutbildung

Mastzelldefiziente W/W^{-v} Mäuse leiden an einer Störung der Erythropoese und daher an Anämie. Durch die Transplantation von Mastzellen wird die Erythropoese nicht wesentlich beeinflusst. Um dies zu verifizieren, bestimmten wir den Hämatokrit der Mäuse. Mastzelldefiziente und – rekonstituierte W/W^{-v} Mäuse hatten einen gleichermaßen signifikant erniedrigten Hämatokrit gegenüber allen Wildtyptieren (**Tabelle 4**).

Tabelle 4 Bestimmung des Hämatokrit zum Ausschluss einer Auswirkung der Mastzellrekonstitution auf die Erythropoese.

Versuchsgruppe (n)	Hämatokrit [%]
Kontrollen (7)	43 ± 1
Wildtyp, infiziert, 24 h (13)	43 ± 3
Mastzelldefizient W/W ^{-v} , Infiziert, 24 h (16)	35 ± 2 ^a
Mastzellrekonstituiert W/W ^{-v} , Infiziert, 24 h (5)	33 ± 4 ^a

^a p < 0,005 verglichen mit Wildtypkontrollen und infizierten Wildtyptieren nach einseitiger Varianzanalyse und t-Test.

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

4.2.8 Auswirkung der experimentellen Pneumokokkenmeningitis auf die c-kit- und SCF-Proteinexpression

Ob die defekte Expression des Stammzellfaktor(SCF)-Rezeptors c-kit einen über die Mastzelldefizienz hinausgehenden Einfluss auf die wirtseigene Immunantwort besitzt, ist bisher unbekannt. Der Effekt der Mastzelldefizienz bei meningitisrelevanten Faktoren wie z. B. dem ICP wurde durch die Mastzellrekonstitution nur teilweise aufgehoben. Zudem wollten wir sichergehen, dass die massiven Effekte auf die Neutrophilenrekrutierung – auch bei Reversibilität durch Mastzelltransplantation – nicht zumindest teilweise auf die Mutation des SCF-Rezeptors c-kit zurückzuführen sind. Daher untersuchten wir die c-kit Proteinexpression

im Hirngewebe mittels Western Blot und die Expression von SCF mittels des unter 4.2.5 aufgeführten Proteinassays, um mastzellunabhängige Effekte der gestörten c-kit Expression im Rahmen einer Pneumokokkeninfektion auszuschließen.

Es zeigten sich keine meningitisinduzierten Veränderungen der Proteinexpression von c-kit (siehe **Abbildung 22**) und SCF (siehe **Abbildung 19**).

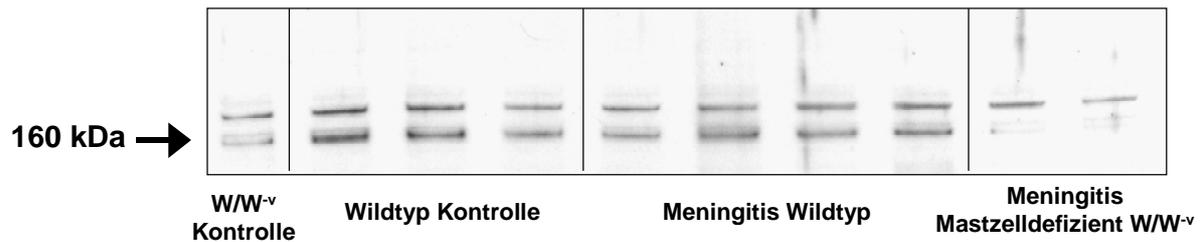


Abbildung 22 Western Blot Analyse von Hirnhomogenaten. Die Pneumokokkeninfektion führte zu keiner Veränderung der c-kit Proteinexpression. Der Antikörper gegen das carboxyterminale Ende von c-kit (160 kDa) weist im Vergleich zu Wildtyptieren bei W/W^{-v} Mäusen im Zytosol deutlich geringere Mengen c-kit nach.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Diese Studie konnte zeigen, dass während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis NF- κ B im Gehirn der Versuchstiere aktiviert wird. Durch pharmakologischen Eingriff in die NF- κ B-Aktivierung konnte der klinische Zustand der infizierten Tiere deutlich verbessert werden. Parallel dazu traten weniger meningitisassoziierte intrakranielle Symptome und Komplikationen auf: Liquorpleozytose, Liquorzytokinspiegel, Bluthirnschrankenpermeabilität, Anstieg des ICP und Störung der zerebrovaskulären Autoregulation und CO₂-Reaktivität konnten signifikant gesenkt werden.

5.1.1 NF- κ B-Expression und -Aktivierung im ZNS während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

NF- κ B wird im Körper ubiquitär exprimiert und reguliert die Expression zahlreicher Gene, die zumeist inflammatorische Proteine kodieren (Baeuerle und Henkel 1994). Im ZNS findet man NF- κ B in einer Vielzahl von Zellen, einschließlich Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Endothelzellen (O'Neill und Kaltschmidt 1997; Bereta et al. 1995). Neben einer Beteiligung von NF- κ B an neuronaler Plastizität und Neurodegeneration kodieren die NF- κ B-Zielgene auch im Gehirn vor allem Proteine mit inflammatorischer Aktivität. NF- κ B findet man im Gehirn hauptsächlich als induzierbare zytoplasmatische Form (Kaltschmidt et al. 1993). Sowohl im Gehirn als auch in Granulozyten - Zellen, die den Hauptanteil des Infiltrates bei einer akuten Pneumokokkenmeningitis bilden - liegt NF- κ B zum überwiegenden Teil als p50/p65 Dimer vor (Kaltschmidt et al. 1994b; McDonald et al. 1997). Die carboxyterminale Domäne von p65 enthält eine starke transkriptionelle Transaktivierungsregion, während p50 zwar an DNA binden kann, aber keine transaktivierende Eigenschaften besitzt. Überexpression von p50 kann die Expression NF- κ B abhängiger Gene sogar erniedrigen (Karin und Ben Neriah 2000).

Für die Initiierung der Genexpression ist die zytoplasmatische Dissoziation des NF- κ B-I κ B-Komplexes, die Degradierung von I κ B und die nukleäre Translokation von NF- κ B und seine Bindung an spezifische DNA Motive notwendig (Kieran et al. 1990; Nolan et al. 1991).

Kaltschmidt et al. (1994a; 1995) konnten zeigen, dass der immunhistochemische Nachweis von freiem p65 eine geeignete Methode ist, um räumliche und zeitliche Aktivierungsmuster von NF- κ B an Zellen und Gewebeschnitten nachzuweisen. Sie benutzten dazu einen Antikörper gegen die nukleäre Lokalisierungssequenz von p65 (Kaltschmidt et al. 1994a; 1995).

Wir konnten mittels Western Blot Analyse in Hirnhomogenaten von Ratten 24 Stunden nach Infektion mit Pneumokokken freies p65 nachweisen, nicht aber bei Kontrolltieren. Das unterstützt das Konzept eines meningitisassoziierten Anstiegs der NF- κ B-Aktivität. In immunhistochemischer Färbung von Hirnschnitten fand sich die stärkste Anfärbung für freies p65 im entzündlichen Infiltrat. Die Aktivierung von NF- κ B während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis scheint vorwiegend in Zellen des Immunsystems, besonders in Granulozyten, lokalisiert zu sein.

Wodurch wird NF- κ B während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis aktiviert? Vorstellbar sind folgende Mechanismen: **(I)** die direkte Aktivierung durch lebende Pneumokokken oder Pneumokokkenzellwandbestandteile, **(II)** durch von Pneumokokken sezernierte Substanzen oder **(III)** indirekt durch die Reaktion des wirtseigenen Immunsystems auf den Erreger.

(I) In murinen Makrophagen und THP-1 Makrophagen (aber nicht in murinen 70Z/3 prä-B-Zellen und U937 humanen Monozyten) konnte ein deutlicher Anstieg der NF- κ B Aktivität nach Stimulation mit *S. pneumoniae* oder Pneumokokkenzellwandbestandteilen beobachtet werden (Spellerberg et al. 1996). Kürzlich berichteten Yoshimura et al. (1999), dass es in einer klonalen CHO Zelllinie, die TLR-2 und CD 14 exprimiert, nach Exposition mit hitzeinaktivierten Pneumokokken zu einer nukleären Translokation von NF- κ B kommt, nicht aber in CHO Zellen, die TLR2 nicht exprimieren. Koedel et al. (2003) fanden mittels eines NF- κ B-Reporterassays in HEK293 Zellen, dass sowohl TLR-2 als auch TLR-4 eine pneumokokkeninduzierte NF- κ B-Aktivierung vermitteln. Diese Befunde identifizieren TLR-2 und TLR-4 als mögliche Rezeptoren für den pneumokokkeninduzierten Anstieg der NF- κ B-Aktivität. Allerdings zeigten sich in Experimenten an Makrophagen genveränderter Mäuse (TLR-2 defiziente TLR-2^{-/-}/TLR-4^{+/+}-Mäuse, Mäuse mit funktioneller TLR-4 Defizienz (TLR-4^{d/d}) und doppelt defiziente TLR-2^{-/-}/TLR-4^{d/d}-Mäuse) keine Unterschiede hinsichtlich der TNF- α -Produktion, dessen Gen unter transkriptioneller Kontrolle von NF- κ B steht. Diese Befunde weisen darauf hin, dass weitere Mustererkennungsrezeptoren – allein oder in Kombination - an der NF- κ B vermittelten Immunantwort auf *S. pneumoniae* beteiligt sind (Koedel et al. 2003).

(II) *S. pneumoniae* kann erhebliche Mengen an Wasserstoffperoxid produzieren (Duane et al. 1993), einem Trigger der NF- κ B-Aktivierung (Li und Karin 1999), so dass die H₂O₂-vermittelte NF- κ B-Aktivierung einen weiteren direkten Aktivierungsweg von NF- κ B durch *Streptococcus pneumoniae* darstellen könnte. Allerdings ist die H₂O₂-vermittelte NF- κ B-Aktivierung stark Zelltyp-abhängig und daher ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um den Hauptaktivierungsweg handelt (Meyer et al. 1993).

(III) Andere mögliche Kandidaten der NF- κ B-Induktion während der bakteriellen Meningitis sind wirtseigene Faktoren, vor allem proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Barnes und Karin 1997).

Klinische und experimentelle Studien fanden erhöhte Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β in Liquorproben von Patienten und Versuchstieren mit bakterieller Meningitis (Mustafa et al. 1989; Saukkonen et al. 1990). Diese potenten NF- κ B-Aktivatoren stehen allerdings selbst unter der transkriptionellen Kontrolle von NF- κ B. Vorstellbar ist eine parakrine Verstärkung der NF- κ B-Aktivierung.

ROS Produktion konnte sowohl an Hirnschnitten von Rattenjungen, bei denen eine Meningitis durch Streptokokken der Gruppe B induziert worden war, mittels der Manganese/Diaminobenzidine Methode nachgewiesen werden (Leib et al. 1996) als auch *in vivo* mittels Lucigenin-verstärkter Chemolumineszenz in einem Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis (Dirnagl et al. 1993). Überdies kann *S. pneumoniae* die ROS Produktion in Phagozyten und zerebromikrovaskulären Endothelzellen induzieren (Koedel und Pfister 1999c). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass NF- κ B in verschiedenen Zelltypen, darunter auch Zellen des Immunsystems, als Sensor für oxidativen Stress fungiert (Mercurio und Manning 1999; Li und Karin 1999; Karin et al. 2001; Storz et al. 2004). Allerdings stellten kürzlich erschienene Studien fest, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung zu einer Steigerung der ROS-Produktion führen kann (Hayakawa et al. 2003) und ROS nur fraglich eine zentrale Funktion in der NF- κ B-Aktivierung besitzen (Sakon et al. 2003). Alle diese Daten stammen aus Zellkultur - beziehungsweise aus zellfreien Experimenten. In einem Rattenmodell der Alveolitis konnte gezeigt werden, dass das Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein die NF- κ B-Aktivierung hemmen konnte (Blackwell et al. 1996).

Insgesamt scheint das Zusammenspiel von bakteriellen und wirtseigenen Faktoren zu einer überschießenden und langanhaltenden NF- κ B-Aktivierung bei der bakteriellen Meningitis zu führen.

5.1.2 NF- κ B als Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie

Die NF- κ B-Aktivierung führt zur koordinierten Expression zahlreicher Gene, die Proteine kodieren, welche an der Mediatorsynthese, Verstärkung und Aufrechterhaltung der Entzündungsantwort beteiligt sind, was letztendlich zu Gewebeschädigung und Organdysfunktion führen kann (Barnes und Karin 1997; Christman et al. 1998). Böhler et al. (1997) fanden hohe NF- κ B-Aktivitäten in mononukleären Blutzellen von Sepsispatienten, die mit der Sterblichkeit korrelierten. Ähnliche Zusammenhänge zwischen einem Anstieg der NF- κ B-Aktivität in Immunzellen sowie Schwere bzw. Verlauf bei entzündlichen Erkrankungen konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen (Paterson et al. 2000; Arnalich et al. 2000; Foulds et al. 2001). Folglich ist NF- κ B ein offensichtlicher Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie. Unter anderem greifen folgende pharmakologische Substanzen in die NF- κ B-Aktivierung ein: Glukokortikoide, Antioxidantien (z. B. Pyrrolidindithiocarbamat), verschiedene nichtsteroidale antiinflammatorische Substanzen (z. B. Aspirin und Natriumsalizylat) sowie Proteasom- und Calpaininhibitoren (z. B. ALLN und MG132) (Barnes und Karin 1997; Cuzzocrea et al. 2003; Lee und Burckart 1998; Karin et al. 2004).

5.1.2.1 Die Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung ALLN und BAY 11-7085

Wir verwendeten Vertreter aus zwei Substanzklassen von NF- κ B-Inhibitoren, die zum damaligen Zeitpunkt als sehr spezifisch galten: BAY 11-7085, einen Inhibitor der I κ B-Phosphorylierung (Hara et al. 1997), und ALLN, das in den proteosomalen I κ B-Abbau eingreift (Milligan et al. 1996; Schow und Joly 1997). Beide blockieren somit die Dissoziation des NF- κ B-I κ B-Komplexes. Mittels Western Blot Analysen konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit ALLN sowie mit BAY 11-7085 den meningitisassoziierten Anstieg der NF- κ B-Aktivität hemmte. Die Reduktion der NF- κ B-Aktivität wurde von einer Besserung des klinischen Status und einer deutlichen Abschwächung der meningitisassoziierten zentralnervösen Komplikationen sowie der meningealen Entzündung (z. B. einer Reduktion von Liquorpleozytose und IL-6-Liquorkonzentration) begleitet.

Die Behandlung sowohl mit ALLN als auch mit BAY 11-7085 hatte auch in anderen experimentellen Untersuchungen eine positive Auswirkung. Zum Beispiel konnten Pierce et al.

(1997) zeigen, dass BAY 11-7085 in einem Modell des Carageenin-induzierten Pfotenödems in der Ratte die Ödembildung dosisabhängig reduzierte und in einem Arthritismodell die Gelenkschwellung hemmte. In einem Rattenmodell zum Reperfusionsschaden des Darmes war BAY 11-7095 auch adjuvant zu α -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) wirksam und reduzierte Gewebeschaden und Leukozyteninfiltration (Zou et al. 2003). ALLN konnte Kreislauf- und Multiorganversagen sowie die Induktion von iNOS und COX-2 bei Ratten mit endotoxischem Schock signifikant abmildern (Ruetten und Thiemermann 1997) und bei Schock durch Verbrennung konnten der Myokardschaden und die TNF- α -Sekretion durch ALLN deutlich verringert werden (Maass et al. 2002). Zudem konnte ALLN die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α in einem murinen Sepsismodell hemmen (Schow und Joly 1997). In allen diesen Studien führten die Autoren den antiinflammatorischen Effekt von ALLN und BAY 11-7085 auf die hemmende Wirkung dieser Substanzen auf die NF- κ B-Aktivierung zurück. Die zentrale Rolle von NF- κ B für Entzündungsmechanismen und Gewebeerstörung wird durch die positive Auswirkung molekularer Therapieansätze unter Verwendung von p65 Antisense-Oligonukleotiden sowie von I κ B-Gentransfer in Modellen der Sepsis, der rheumatoiden Arthritis und der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weiter gestärkt (Bohrer et al. 1997; Neurath et al. 1996; Neurath und Pettersson 1997). Zahlreiche Studien konnten auch durch die Hemmung von I κ B-Kinasen (IKK) sowohl bei Tumorerkrankungen als auch bei entzündlichen Krankheiten positive Auswirkungen erzielen (Hideshima et al. 2002; Roshak et al. 2002). So konnte z. B. die Therapie mit dem oral verfügbaren IKK-Inhibitor BMS 345541 sowohl Entzündungsaktivität als auch Gelenkdestruktion in einem Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis signifikant reduzieren (McIntyre et al. 2003). Eine ausführliche Übersichtsarbeit von Karin et al. über Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung, insbesondere über IKK-Inhibitoren, ist 2004 erschienen.

5.1.2.2 Eingriffe in die NF- κ B-Aktivierung bei der bakteriellen Meningitis

Während der letzten Jahre wurden zahlreiche pharmakologische Wirkstoffe, die mit der NF- κ B-Aktivierung interagieren, in Zellkulturexperimenten, *in vivo* Modellen und klinischen Studien zur bakteriellen Meningitis untersucht. Darunter waren Steroide, Aspirin, Antikörper gegen TNF- α , IL-1 β und IL-10, Caspase-1-Inhibitoren sowie Antioxidantien (Koedel und

Pfister 1997; Leib et al. 1996; Diab et al. 1999; Koedel et al. 1996; de Gans und van De 2002; Tauber et al. 1985; Koedel et al. 1994; Bogdan et al. 1997; Koedel et al. 2002b).

Zum Beispiel konnte die Gabe von Dexamethason im Kaninchenmodell der Pneumokokkenmeningitis die Entwicklung eines Hirnödems, den Anstieg der Liquorlaktatspiegel sowie den Anstieg des ICP vollständig verhindern (Täuber et al. 1985). Auch in der klinischen Anwendung führt Dexamethason zu einem besseren Outcome der an bakterieller Meningitis erkrankten Patienten (de Gans und van De Beek 2002).

Die systemische Gabe von IL-10 konnte eine Reihe von mit der experimentellen Pneumokokkenmeningitis assoziierten Vorgängen abmildern, darunter den Anstieg im Wassergehalt des Gehirnes, den Anstieg des ICP und die Liquorpleozytose (Koedel et al. 1996).

Die Caspase-1-Blockade oder Depletion in Ratte beziehungsweise Maus führte zu einer Reduktion der wirtseigenen Entzündungsreaktion auf Pneumokokken und parallel dazu zu einer Verringerung der intrakraniellen Komplikationen und einem besseren klinischen Ergebnis (Koedel et al. 2002b).

Auch die Gabe des Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein reduzierte Hirnödembildung, Anstieg des ICP und meningeale Entzündung 24 Stunden nach Pneumokokkeninjektion (Koedel und Pfister 1997). Und die Therapie mit dem Radikalfänger α -Phenyltertbutylnitron konnte in einem Modell der Meningitis durch Streptokokken der Gruppe B den meningitisassoziierten neuronalen Schaden signifikant senken (Leib et al. 1996).

Die Beobachtung, dass diese verschiedenartigen pharmakologischen Substanzen gleichermaßen einen positive Effekt auf den Verlauf der bakteriellen Meningitis haben, könnte zumindest teilweise auf ihrer, die NF- κ B-Aktivierung hemmenden Wirkung, beruhen: Der therapeutische Effekt von Glukokortikoiden lässt sich auf die Inhibierung der Genexpression von Entzündungsmediatoren zurückführen (Barnes und Adcock 1993), von denen viele sowohl NF- κ B aktivieren können als auch unter der transkriptionellen Kontrolle dieses Faktors stehen. Die daraus resultierende positive Verstärkung einer Inflammation kann z. B. durch die steroidvermittelte Induktion der *de novo*-Synthese des NF- κ B-Inhibitors I κ B durchbrochen werden (Auphan et al. 1995; Scheinman et al. 1995a). Ein anderer Mechanismus ist die direkte Bindung aktivierter Glukokortikoidrezeptoren an p65, wodurch die DNA-Bindung von NF- κ B und die folgende Transkriptionsinitiierung verhindert werden (Scheinman et al. 1995b; Unlap und Jope 1997; Nissen und Yamamoto 2000).

Ein Hauptteil der antiinflammatorischen Wirkung des Zytokins IL-10 wird vermutlich über die Hemmung der NF- κ B-Aktivität vermittelt, was zum einen auf die Inhibierung von I κ B-Kinasen und zum anderen auf eine Hochregulierung von p50 zurückzuführen ist. Letzteres

führt zur Verdrängung von p50/p65 Heterodimeren aus der DNA-Bindung durch p50/p50 Homodimere, die keine Transaktivierungsdomäne besitzen (Wang et al. 1995)}.

Antioxidantien wurden als NF- κ B-Inhibitoren in verschiedensten *in vitro* und *in vivo* Experimenten untersucht, da die ROS-Bildung als wichtiges Bindeglied zwischen zahlreichen Stimuli und der Aktivierung von NF- κ B gelten (Schreck et al. 1991; Schmidt et al. 1996).

5.1.2.3 Probleme der NF- κ B-Inhibierung

Alles in allem kann die Regulierung und Kontrolle der NF- κ B-Aktivierung eine wirkungsvolle therapeutische Strategie sein, um die Gewebeschädigung durch eine überschießende Entzündungsantwort zu reduzieren. Jedoch birgt eine vollständige und dauerhafte Blockade der NF- κ B-Aktivierung verschiedene Gefahren. NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle im Immunsystem und für das Überleben von Zellen. Zum Beispiel führt die Deletion des Genlokus von p65 zu embryonaler Letalität begleitet von einer massiven Leberdegeneration ausgelöst durch Apoptose (Beg et al. 1995). Mäuse, denen die p50-Untereinheit von NF- κ B fehlt, entwickeln sich zwar scheinbar normal, zeigen aber multifokale Defekte des Immunsystems, die unter anderem B-Lymphozyten und die angeborene Immunantwort betreffen (Sha et al. 1995), allerdings sind p50-defiziente Mäuse resistent gegenüber MOG (Myelinoligodendrozytenglykoprotein)-induzierter experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis und ischämischer Hirnschädigung (Hilliard et al. 1999; Schneider et al. 1999). Kastenbauer et al. (2004) konnten zeigen, dass p50 bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis notwendig für Pneumokokkeneradikation und Kontrolle der Entzündungsreaktion ist, so dass mögliche adjuvante Therapien der bakteriellen Meningitis möglichst nicht mit Expression oder nukleärer Translokation von p50 interferieren sollten. Zudem konnte kürzlich in einem Rattenmodell des Carageenin-induzierten Pfotenödems gezeigt werden, dass die Hemmung von NF- κ B während des Entzündungsrückgangs über eine Hemmung der Leukozytenapoptose zu einer Verlängerung der Entzündungsantwort führt (Lawrence et al. 2001).

Neben diesen tierexperimentellen Befunden lässt sich auch anhand genetisch bedingter Erkrankungen, die mit gestörter NF- κ B-Aktivierung einhergehen, zeigen, dass die Funktion von NF- κ B nicht redundant ist. Die beiden X-chromosomalen Erkrankungen EDA-ID (hypo- oder anhidrotische ektodermale Dysplasien und Immundefizienz) und IP (*incontinentia pigmenti*) führen über eine Mutationen des Genlokus für IKK- γ zu reduzierter (EDA-ID) beziehungsweise vollständig defekter (IP) NF- κ B-Aktivierung (Doffinger et al. 2001; Zonana et al. 2000;

Smahi et al. 2000). Männliche Träger der IP-Mutation versterben *in utero* an einem apoptotisch bedingten Leberversagen, wohingegen heterozygot betroffene Frauen nur vorübergehend erkranken, da die betroffenen Zellen der Haut aufgrund fehlender konstitutiver NF- κ B-Aktivierung an Apoptose zugrunde gehen, eine Immunschwäche besteht in der Regel nicht (Zonana et al. 2000; Smahi et al. 2000). Bei Patienten mit EDA-ID tritt neben einer Entwicklungsstörung von Drüsen, Haaren und Zähnen eine schwere Immundefizienz vor allem gegenüber bakteriellen Infektionen auf (Doffinger et al. 2001). Eine Grundaktivität von NF- κ B ist offensichtlich notwendig, um die Zellen vor Apoptose zu schützen, während die komplette Aktivierung für eine funktionierende Abwehr notwendig ist (Senftleben 2003). Dies sollte man bedenken, wenn man therapeutisch in die NF- κ B-Aktivierung eingreift.

Der bereits in der Therapie des multiplen Myeloms eingesetzte Proteasomeninhibitor Bortezomib ist verhältnismäßig gut verträglich. An Nebenwirkungen tritt dosisabhängig neben Knochenmarksdepression und gastrointestinalen Beschwerden eine reversible Polyneuropathie auf.

Eine adjuvante Therapie mit Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung bei bakterieller Meningitis wäre vor allem während der ersten Tage der Erkrankung sinnvoll. Da es sich damit nur um einen kurzzeitigen Eingriff in das NF- κ B-System handelt, spielen die oben angeführten Probleme wahrscheinlich nur eine geringe Rolle. Die Dosierung eines Inhibitors sollte so gewählt werden, dass eine vollständige Blockade der NF- κ B-Aktivierung, und damit die Apoptoseinduktion in verschiedenen Geweben vermieden wird.

Zusammenfassend sprechen unsere Daten dafür, dass die Aktivierung von NF- κ B eine wichtige Rolle in der Entwicklung von meningealer Entzündungsreaktion und zentralnervösen Komplikationen im Akutstadium der experimentellen Pneumokokkenmeningitis spielt.

5.2 Die Rolle der Mastzelle in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Mastzellen sind vor allem für ihre Beteiligung an allergischen Reaktionen wie der IgE-vermittelten Hypersensitivität oder Autoimmunerkrankungen bekannt. Ihre physiologische Rolle allerdings ist weiterhin ein Diskussionsgegenstand. In experimentellen Studien zu bakterieller Pneumonie und Peritonitis konnte gezeigt werden, dass Mastzellen die Neutrophilenrekrutierung und Erregereradikation, vor allem mittels in Granula gespeichertem TNF- α , effektiv modulieren (Malaviya et al. 1996; Echtenacher et al. 1996). Dass Mastzellen eine wichtige Rolle in der Abwehr bakterieller Erreger spielen, konnte in weiteren Untersuchungen untermauert werden: so ist z. B. neben TNF- α auch von Mastzellen sezerniertes Leukotrien B₄ und C₄ an der Abwehr bakterieller Infektionen beteiligt, so sind Mastzellen für die effektive Bakterieneradikation bei experimenteller Cystitis wichtig und sie sind an der Lymphknotenschwellung im Rahmen von Infektionen beteiligt (Malaviya und Abraham 2000; Malaviya et al. 2004; McLachlan et al. 2003). Die Funktion der Mastzellen im Bereich der neuroinfektiologischen Erkrankungen ist dagegen weitgehend unbekannt. Lediglich *post mortem* Untersuchungen zu Parasitosen wie der Neurozystizerkose konnten eine Anhäufung von Mastzellen im Hirngewebe nachweisen (Masliniska et al. 2001).

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass Mastzellen während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis aktiviert werden und den klinischen Verlauf, die meningitisassoziierten zentralnervösen und systemischen Komplikationen sowie die wirteigene Entzündungsreaktion im Verlauf der Erkrankung beeinflussen, allerdings sind zahlreiche Fragen bezüglich der Effektormechanismen weiterhin offen.

5.2.1 Mastzellspezifische Erregererkennung und Mastzellaktivierung

Als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems können Mastzellen eine Vielzahl von Keimen erkennen und binden. Mastzellen besitzen zwei Grundmechanismen der mikrobiellen Erkennung: opsoninabhängig und –unabhängig. Die opsoninunabhängige Interaktion über spezifische Rezeptoren ist bisher am besten für Enterobakterien charakterisiert. Enterobakterien, die FimH, ein mannosebindendes Lektin, besitzen, werden über das Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Molekül CD48 von Mastzellen gebunden (Malaviya et al. 1994a; Malaviya et al. 1994b). Über diese Bindung können die Bakterien von der Mastzelle phagozytiert

werden, sie induziert aber auch eine Mastzellaktivierung und führt damit zur Degranulierung der Zellen. Bislang liegen noch keine Untersuchungen zu einer direkten Interaktion von Mastzellen mit *Streptococcus pneumoniae* vor. Kürzlich erschienene Studien konnten zeigen, dass Peptidoglykan (PGN), ein Zellwandbestandteil grampositiver Keime, über Toll-like-Rezeptor-2, einem Mustererkennungsrezeptor, Mastzellen *in vitro* und *in vivo* stimulieren kann, was zur Ausschüttung zahlreicher Zytokine führt (Supajatura et al. 2002; Varadaradjalou et al. 2003; McCurdy et al. 2003). Da hitzeinaktivierte Pneumokokken in Fibroblasten, die TLR-2 exprimieren, zu einer NF- κ B-Aktivierung führten, könnte dies einen potentiellen Mechanismus der direkten Mastzellstimulierung während einer Pneumokokkenmeningitis darstellen (Yoshimura et al. 1999). Oponierte Erreger können von Mastzellen über Immunglobulinrezeptoren für IgG (Fc γ R) und IgE (Fc ϵ R) oder Komplementrezeptoren für C3b erkannt werden (Katz et al. 1992; Metzger 1991; Sher 1976). Die komplement-vermittelte Oponierung der bekapselten Pneumokokken ist ein wichtiger Abwehrmechanismus bei systemischen Pneumokokkeninfektionen (Alonso, V et al. 1995; Brown et al. 2002a).

Neben der direkten Stimulation durch Bakterien können auch meningitisassoziierte Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , TNF- α , MIP-1 α , MIP-2 und Substanz P eine Mastzellaktivierung triggern (Alam et al. 1994; Yano et al. 1989; Brzezinska-Blaszczyk und Pietrzak 1997; Galli et al. 1999).

Im Gegensatz zu der sekundenschnellen, für den Wirt schädlichen, anaphylaktischen Reaktion, die durch die schnelle Vernetzung der IgE-Rezeptoren und anschließende Fusion der Granula ausgelöst wird, ist die bakterien- oder zytokininduzierte Mastzelldegranulierung wahrscheinlich ein gradueller Prozess. Er dauert bei *in vitro* Untersuchungen mit *Escherichia coli* mehr als eine Stunde (Malaviya et al. 1994a), *in vivo* Untersuchungen liegen nicht vor.

Wir fanden im Gehirn nicht infizierter Mäuse stark granulierte Mastzellen; der Großteil der Mastzellen war perivaskulär, periventriculär und meningeal zu sehen, also an Orten, an denen sich die Entzündungsreaktion während einer Pneumokokkenmeningitis vorwiegend abspielt. Vier und vierundzwanzig Stunden nach Inokulation mit *Streptococcus pneumoniae* fanden sich fast ausschließlich spärlich granulierte Mastzellen in den genannten Hirnregionen und zudem eine signifikant erniedrigte Mastzellgesamtzahl. Die geringere Anzahl von sichtbaren Mastzellen führen wir auf die Schwierigkeit zurück, vollständig degranulierte Mastzellen lichtmikroskopisch nachzuweisen, da die gängigen Mastzellfärbungen die Mastzellgranula anfärben. Wir gehen daher von einer vollständigen Degranulierung dieser Zellen aus.

Damit konnten wir erstmals zeigen, dass es bei einer bakteriellen ZNS-Infektion zu einer Mastzellaktivierung im Gehirn kommt. Wir gehen davon aus, dass die Aktivierung der Mast-

zellen sowohl direkt durch Bakterien oder deren Zellwandbestandteile als auch durch meningitisassoziierte Entzündungsmediatoren erfolgt.

5.2.2 Funktionelle Bedeutung der Mastzellen in Erregerabwehr und Neuroinflammation

Bei den bisher im Mausmodell an mastzelldefizienten WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} (kurz W/W^v) Mäusen untersuchten Infektionen führte die Mastzelldefizienz zu einem signifikant schwereren Krankheitsverlauf. So konnten Malaviya (1996) und Echternachter (1996) unabhängig voneinander zeigen, dass Mastzellen eine kritische Rolle in der Abwehr gramnegativer Bakterien spielen. In dem Caecum-Ligations- und Punktions-(CLP) Modell der bakteriellen Peritonitis starben 80 % der mastzelldefizienten W/W^v Tiere, während die Krankheit weder bei Wildtyptieren noch bei mastzellrekonstituierten Tieren letal verlief, was belegt, dass die beobachteten Unterschiede durch Mastzellen und nicht aufgrund anderer durch die c-kit Mutation bedingter Veränderungen ausgelöst wurde. In der Peritonealflüssigkeit von W/W^v Mäusen fanden sich fünfmal weniger Neutrophile und signifikant höhere bakterielle Titer als bei Wildtyptieren und mastzellrekonstituierten Mäusen. Echternachter (1996) konnte zudem zeigen, dass das in Mastzellen gespeichert vorliegende TNF- α entscheidend für Neutrophilenrekrutierung und Pathogeneliminierung ist. Untersuchungen zur pulmonalen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* oder zur enterobakteriellen Cystitis konnten diese entscheidende Rolle der Mastzellen im Rahmen der angeborenen Immunantwort weiter erhärten (Malaviya et al. 1996; Malaviya et al. 2004).

Zur Funktion der Mastzelle bei bakteriellen Infektionen des ZNS liegen bisher keine Untersuchungen vor, aber in Studien zur Multiplen Sklerose (MS) und der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) konnte eine funktionelle Beteiligung von Mastzellen an der Neuroinflammation nachgewiesen werden (Brenner et al. 1994; Rozniecki et al. 1995; Secor et al. 2000). Secor et al. (2000) konnten zeigen, dass bei W/W^v Mäusen nach MOG-Injektion EAE-Symptome später und weniger schwer auftreten. Die Mastzellrestitution stellte die typische EAE Empfänglichkeit wieder her. Man geht davon aus, dass die Mastzellaktivierung während der EAE über den Fc γ R erfolgt und dass die Mastzelle aufgrund der Menge und Vielfältigkeit von Entzündungsmediatoren in ihren Granula verschiedenste Abwehrwege aktiviert und somit zu einer Verstärkung der Immunantwort, insbesondere der Th1-vermittelten Reaktionen, führt. Mastzellen sollen vor allem an Bluthirnschrankenstörung, Neutrophilen-

und T-Zellrekrutierung sowie am Gewebeumbau im ZNS beteiligt sein (Secor et al. 2000; Brown et al. 2002b; Benoist und Mathis 2002).

Die Annahme, dass diese Effekte durch Mastzellen des ZNS bedingt sind, wurde kürzlich durch eine Studie, in der die Gewebeverteilung von mit grünfluoreszierendem Protein markierten Mastzellen nach Rekonstitution untersucht wurde, in Frage gestellt (Brown et al. 2002b). Die Mastzellrekonstitution führte, wie in der oben angeführten Studie, zu einem dem Wildtyp vergleichbaren EAE-Verlauf bei W/W^v Mäusen, allerdings ließen sich zu diesem Zeitpunkt (10 Wochen nach Mastzelltransplantation) keine Mastzellen im ZNS nachweisen. Diesen Befunden stehen neben anderen tierexperimentellen Studien (Secor et al. 2000), die Mastzellen nach Transplantation im ZNS nachweisen konnten, auch die Befunde klinischer Studien entgegen, die unter anderem zeigen konnten, dass Genexpressionsprofile einen unerwartet hohen Anteil mastzellspezifischer Gentranskripte in MS-Läsionen zeigten (Lock et al. 2002) und sich im Liquor von MS-Patienten signifikant erhöhte Tryptasespiegel nachweisen ließen (Rozniecki et al. 1995). Diese mastzellspezifische Protease wird nur nach Zellaktivierung freigesetzt, der Nachweis im Liquor spricht für eine lokale Mastzellaktivierung. Wir konnten nach Mastzelltransplantation Mastzellen im ZNS nachweisen, die wie bei infizierten Wildtypieren Zeichen der Degranulierung aufwiesen. Daher gehen wir von einer Aktivierung und funktionellen Beteiligung dieser Mastzellen aus.

5.2.3 Funktionelle Bedeutung der Mastzellen während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Man geht davon aus, dass der klinische Verlauf der bakteriellen Meningitis vor allem durch meningitisassoziierte zentralnervöse Komplikationen wie Anstieg des intrakraniellen Drucks, Hirnödem und Gefäßkomplikationen bestimmt wird, doch auch systemische Komplikationen sind an einem ungünstigen Krankheitsverlauf beteiligt (Pfister et al. 1993; Kastenbauer und Pfister 2003).

In der vorliegenden Studie zur experimentellen Pneumokokkenmeningitis war der klinische Verlauf bei mastzelldefizienten W/W^v Mäusen signifikant günstiger verglichen mit Wildtypieren und mastzellrekonstituierten W/W^v +BMMC Mäusen.

5.2.3.1 Systemische Komplikationen

Da *Streptococcus pneumoniae* vom ZNS aus hämatogen in die peripheren Organe streuen kann, können internistische Komplikationen, im besonderen schwere Sepsis und Pneumonie, zu einem ungünstigen Verlauf der Pneumokokkenmeningitis führen (Pfister et al. 1993; Kastenbauer und Pfister 2003; Scheld et al. 1980). Aufgrund folgender Beobachtungen gehen wir davon aus, dass eine Reduktion der systemischen Komplikationen an dem günstigeren klinischen Verlauf bei W/W^v Mäusen beteiligt ist: (i) mastzelldefiziente Tiere hatten weniger respiratorische Probleme (Atemgeräusche, Sekretbildung); (ii) Wildtyp- und W/W^v +BMMC Mäusen hatten einen signifikanten Anstieg des spezifischen Neutrophilenmarkers Myeloperoxidase im Lungengewebe als Hinweis auf pulmonale Infiltrate, W/W^v Mäuse unterscheiden sich nicht von Kontrollen; (iii) bei infizierten Wildtyp- und W/W^v +BMMC Mäusen kam es zu einer ausgeprägten Hypothermie, einem Indikator einer septischen Symptomatik, während W/W^v Mäuse nach 24 Stunden nur leicht erniedrigte Temperaturen hatten.

Im Gegensatz zu unseren Befunden war die Mastzelldefizienz in den *in vivo* Studien zu Peritonitis, Pneumonie und Cystitis (vgl. 5.2.2) mit einem schlechteren klinischen Verlauf, dort anhand der Mortalität bestimmt, assoziiert. Allerdings handelte es sich um Infektionen Gramnegativer Erreger mit einem Fokus außerhalb des ZNS. Doch konnte kürzlich erstmals im CLP-Sepsismodell gezeigt werden, dass mit Mastzell-Dipeptidyl-Peptidase I (DPPI) ein Mastzellprodukt entscheidend an der Mortalität der septischen Peritonitis beteiligt ist (Mallen-St Clair et al. 2004). Mit Hilfe von $DPPI^{-}/IL-6^{-}$ -Doppel-*knockout*-Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass der Überlebensvorteil der $DPPI^{-}$ -Mäuse durch höhere IL-6-Spiegel bedingt war (Mallen-St Clair et al. 2004). IL-6 ist, wie aus Studien an $IL-6^{-}$ Mäusen bekannt ist, wichtig für Überleben und erfolgreiche Abwehr bei Pneumokokkenpneumonie (van der Poll et al. 1997). Untersuchungen zur Bedeutung von DPPI bei Infektionen durch *Streptococcus pneumoniae* liegen bisher noch nicht vor. Der Mangel an Mastzell-DPPI stellt somit eine potentielle Ursache für die geringere Ausprägung von Sepsis und Pneumonie bei mastzelldefizienten Mäusen im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis dar.

Hinsichtlich der Körpertemperatur weisen verschiedene Studien darauf hin, dass Histamin – im besonderen das aus Mastzellen – in die Temperaturregulation eingreift. So führt intraventrikulär injiziertes Histamin bereits in geringen Dosen zu einem dramatischen Abfall der Körpertemperatur (Chen et al. 1999), möglicherweise über hypothalamische Histaminrezeptoren (Sakata et al. 1997). Und in einem Modell der IgE-abhängigen systemischen Anaphylaxie konnte gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu Wildtyptieren bei histamindefizienten (HDC

[Histamindecarboxylase]^{-/-}) Mäusen sowie mastzelldefizienten W/W^v Mäusen gleichermaßen nicht zu einem Temperaturabfall während der Anaphylaxie kommt (Makabe-Kobayashi et al. 2002). Über die Rolle von Histamin bei septischen Krankheitsverläufen liegen keine Daten vor.

5.2.3.2 Zentralnervöse Komplikationen

Entsprechend der klinischen Besserung zeigte die Untersuchung der ZNS-Komplikationen bei W/W^v Mäusen einen deutlich geringeren Anstieg des ICP als bei Wildtyp- und W/W^v+BMMC Mäusen. Überraschenderweise wurde die Reduktion des ICP nicht von einer Reduktion der Bluthirnschrankenpermeabilität und des dadurch bedingten vasogenen Ödems begleitet. Das vasogene Ödem gilt als Hauptursache der ICP-Erhöhung bei bakterieller Meningitis, allerdings stellen zytotoxisches und interstitielles Ödem, Liquorabflußstörungen und Zunahme des zerebralen Blutvolumens weitere wichtige Ursachen dar (Quagliarello und Scheld 1992; Scheld et al. 1980; Tureen et al. 1990). Mastzellen sind die Hauptquelle des vasoaktiven Mediators Histamin. Histamin führte *in vitro* zu einer Erweiterung intrazerebraler Widerstandsgefäße der Ratte und in einem Hyperthermiemodell konnte die Steigerung des zerebralen Blutflusses durch H₂ (Histaminrezeptor-2)-Antagonisten gehemmt werden (Dacey, Jr. und Bassett 1987; Patnaik et al. 2000). Durch eine histaminvermittelte Störung der Gefäßregulation im ZNS könnten Mastzellen an der Steigerung des intrakraniellen Druckes während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis beteiligt sein.

Mastzellen besitzen mit Chymase, Tryptase und Cathepsin G Mediatoren, die direkt und über Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (Rozniecki et al. 1995; Armao et al. 1997), durch Degradierung der Basalmembran an der Steigerung der BBB-Permeabilität im Rahmen der bakteriellen Meningitis beteiligt sein könnten. Allerdings werden im Rahmen der bakteriellen Meningitis massiv Substanzen, die die BBB-Permeabilität erhöhen, auch von anderen Zellen, wie zum Beispiel Neutrophilen und Endothelzellen, ausgeschüttet (Paul et al. 1998; Koedel et al. 1995; Kastenbauer et al. 1999a). So dass Mastzellen zwar bei weniger fulminant verlaufenden Entzündungen wie zum Beispiel der MS messbar zur BBB-Störung beitragen (Rozniecki et al. 1995), aber keine signifikante Auswirkung auf die Bluthirnschranke im Rahmen der massiven Inflammation bei bakterieller Meningitis haben. Passend zu den fehlenden Unterschieden hinsichtlich der BBB-Störung fanden wir im Hirngewebe infizierter Mäuse auch

keine signifikanten Unterschiede in der MMP-9 Aktivität, einem wichtigen Faktor der BBB-Schädigung während der bakteriellen Meningitis (Paul et al. 1998; Leppert et al. 2000).

5.2.4 Bedeutung der Mastzelle für die wirtseigene Immunreaktion bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis

Die intrazisternale Pneumokokkeninjektion führte bei allen infizierten Tieren zu einer ausgeprägten Liquorpleozytose, jedoch fanden sich bei mastzelldefizienten Tieren bereits nach 4 Stunden nahezu doppelt so hohe Liquorzellzahlen und nach 24 Stunden dreifach höhere Werte im Vergleich zu Wildtyptieren. Da nach Mastzelltransplantation die Liquorzellzahl wieder auf dem Niveau der Wildtyptiere lag, gehen wir davon aus, dass dieser Effekt mastzellbedingt ist und Mastzellen somit bei der Pneumokokkenmeningitis möglicherweise inhibitorisch auf die Leukozytenrekrutierung in das ZNS wirken.

An der Neutrophilenrekrutierung bei bakterieller Meningitis sind verschiedenste Mediatoren direkt oder indirekt beteiligt, von denen viele von Mastzellen produziert oder aktiviert werden können. Um Unterschiede in der Proteinexpression zentraler Faktoren zu erkennen, führten wir einen Proteinarray an Hirnhomogenat durch. Es zeigte sich aber, dass die als die effektivsten neutrophilenchemotaktischen Mediatoren bei der murinen bakteriellen Meningitis geltenden CXC-Chemokine MIP-2 und KC bei allen infizierten Tiere gleichermaßen erhöht waren (Koedel et al. 2001; Koedel et al. 2004). MIP-2 und KC sind funktionelle Homologe der Maus von humanem IL-8 und GRO (*growth-related oncogene*). Auch in der Proteinexpression der für das Neutrophilenüberleben und die Neutrophilenrekrutierung wichtigen Zytokine GCSF (*granulocyte stimulating factor*), IL-6 und IL-1 β (IL-1 β gemessen mittels ELISA) ergaben sich keine Unterschiede.

Um sicherzugehen, dass die massiven Effekte auf die Neutrophilenrekrutierung – auch bei Reversibilität durch Mastzelltransplantation – nicht zumindest teilweise auf die Mutation des SCF-Rezeptors c-kit zurückzuführen sind, untersuchten wir die Expression von c-kit und SCF im Hirnhomogenat nach Pneumokokkeninfektion; dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, so dass wir diese Faktoren als Ursache ausschließen konnten.

Diese Befunde sind aus verschiedenen Gründen überraschend:

(i) Es ist ungewöhnlich, dass es im Rahmen der bakteriellen Meningitis zu einer massiven Erhöhung der Liquorpleozytose kommt, ohne dass andere zentrale Faktoren der Entzündungsantwort wie IL-1 β oder MIP-2 und KC messbar verändert sind. In zahlreichen Untersuchungen zur experimentellen Pneumokokkenmeningitis gingen diese Parameter Hand in Hand (Winkler et al.; Koedel et al. 2001). Mastzellen könnten zu lokal begrenzten Veränderungen der Zytokinkonzentration führen, die durch unsere Meßmethoden nicht erfasst werden. Zu untersuchen bleibt, ob andere Faktoren der Neutrophilenrekrutierung betroffen sind. Möglicherweise gibt es Unterschiede in der Integrin- oder Selektinexpression. Allerdings zeigte eine kürzlich erschienene Studie, dass Überstände von mit *Pseudomonas aeruginosa* stimulierten Mastzellen zu einer starken Expression von ICAM-1 und E-Selektin in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) führte (Lin et al. 2002), was eher auf eine Förderung der Neutrophilenmigration durch Mastzellen als auf eine Hemmung hindeutet.

(ii) Bisher liegen keinerlei Untersuchungen vor, die einen hemmenden Einfluss von Mastzellen auf die Leukozytenrekrutierung beschreiben. Im Gegenteil wurden in den unter 5.2.2 aufgeführten Untersuchungen extrakranieller gramnegativer Infektionen, Mastzellen – vor allem mittels ihrer frühen und massiven TNF- α -Ausschüttung - als essentieller Faktor der Neutrophilenrekrutierung identifiziert (Malaviya et al. 1996; Echtenacher et al. 1996). Auch in Modellen zu T-Zell-vermittelten Entzündungen wurde die Auswirkung der Mastzellen auf die Neutrophilenrekrutierung untersucht (Biedermann et al. 2000; Schramm et al. 2002; Takeshita et al. 2003). So war in einem Modell der THCB induzierten Kontaktallergie die Neutrophileninfiltration bei mastzelldefizienten W/W-Mäusen signifikant geringer und die Mastzellrekonstitution führte wieder zum Ausgangszustand. Die Autoren gehen davon aus, dass von Mastzellen produziertes MIP-2 und TNF- α für diese Befunde ursächlich sind (Biedermann et al. 2000), während in einem Modell der Zymosan-induzierten Pleuritis bei vergleichbaren Befunden Leukotrien B₄ als Bindeglied beschrieben wurde (Takeshita et al. 2003). Alle genannten Studien untersuchen allerdings Entzündungen außerhalb des ZNS. Da wir im Rahmen der Untersuchung der systemischen Komplikationen (siehe 5.2.3.1) bei mastzelldefizienten Tieren mit einer signifikant geringeren Neutrophileninfiltration in das Lungengewebe diesen Studien vergleichbare Befunde erhoben, gehen wir davon aus, dass Mastzellen in ZNS und Peripherie verschiedene Rollen für die Neutrophilenrekrutierung spielen. An Komplementfaktor C3- und C4-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die mastzellabhängige Neutrophilenrekrutierung bei der CLP-Peritonitis komplementabhängig ist (Prodeus et al. 1997). Bestimmte Formen der Mastzellaktivierung, wie die IgE-vermittelte

Hypersensitivität sind immunglobulinabhängig (Krishnaswamy et al. 2001). Immunglobuline und Komplement sind im Liquor Gesunder so gut wie nicht vorhanden (Simberkoff et al. 1980; Stahel et al. 1997). Nach Infektion steigen die Komplement- und Immunglobulinkonzentrationen zwar an, jedoch bleiben sie unter den Konzentrationen, die eine ausreichende Opsonierung gewährleisten (Simberkoff et al. 1980). Diese Besonderheiten des Liquorraumes könnten zu den Funktionsunterschieden beitragen und dazu führen, dass andere Mastzelleffekte in den Vordergrund treten. Mastzellen sind die einzigen Zellen des Körpers, die Heparin speichern können, und eine Hauptquelle endogenen Heparins; dies gilt auch für die Mastzellen des ZNS (Tyrell et al. 1995; Kiernan 1976; Edvinsson et al. 1977). Es konnte gezeigt werden, dass therapeutisch appliziertes Heparin Auswirkung auf die Neutrophilenrekrutierung besitzt (Tyrell et al. 1995; Springer 1994). Weber et al. (1997) konnten dies auch für Heparin im Rahmen der experimentellen Meningitis bestätigen, wo die Applikation von Heparin das Rollen der Neutrophilen in pialen Gefäßen hemmte und entzündliche Veränderungen milderte. Zur Wirkung endogener Heparine liegen bisher noch keine Untersuchungen vor. Heparin aus Mastzellen könnte aber ein möglicher Inhibitor der Neutrophilenrekrutierung im Rahmen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis sein. Auch Histamin, das ebenfalls hauptsächlich von Mastzellen sezerniert wird, ist ein möglicher Inhibitor. In einer Studie zur experimentellen Peritonitis durch *E.coli*. waren in der Peritonealflüssigkeit von histamindefizienten $HDC^{-/-}$ Mäusen rund 3-fach höhere Neutrophilenzahlen nachweisbar als bei Wildtyptieren. Zudem kam es bei den $HDC^{-/-}$ Tieren auch zu einer schnelleren Pathogeneliminierung (Hori et al. 2002).

In zahlreichen experimentellen Studien zur bakteriellen Meningitis geht eine Reduktion der ZNS-Komplikationen mit einer Reduktion der Liquorpleozytose einher (Koedel et al. 2002b/c), so dass das Auseinanderweichen dieser Parameter bei mastzelldefizienten Tieren erstaunt. Jedoch konnten Täuber et al. (1988) keine Unterschiede zwischen neutropenischen Kaninchen und Wildtyptieren hinsichtlich der Ausprägung von ZNS-Komplikationen feststellen. Zudem fand man auch bei iNOS und IL-6-defizienten Mäusen bei einer erhöhten Liquorzellzahl eine Reduktion der intrakraniellen Komplikationen während der Pneumokokkenmeningitis (Winkler et al. 2001; Paul et al. 2003). Kastenbauer und Pfister (2003) zeigten in einer klinischen Studie zur Pneumokokkenmeningitis, dass ZNS-Komplikationen mit niedrigen Liquorzellzahlen assoziiert sind. So dass wir davon ausgehen, dass Liquorzellzahl und Auftreten zentralnervöser Komplikationen bei Pneumokokkenmeningitis nicht direkt miteinander korrelieren.

Die bakteriellen Titer waren bei mastzelldefizienten W/W^v Tieren im Kleinhirn um den Faktor 4 niedriger (was bei geringer interindividuellen Streuung signifikant war), die Werte der mastzellrekonstituierten W/W^v+MC Mäuse mit doppelt so hohen Titern dazwischen. Wir gehen nicht davon aus, dass diese Befunde auf eine mastzellbedingte Störung der Pathogeneliminierung hinweisen. Erstens da die Mastzellrestitution nicht zu einer signifikanten Veränderung führte und zweitens, da in Studien zur Rolle von TLR-2 und MyD88 bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis, die eine Störung der Bakterieneliminierung zeigen konnten, die Titer um den Faktor 50 differierten (Koedel et al. 2003; Koedel et al. 2004). W/W^v Mäuse hatten eine so massiv höhere Liquorpleozytose verglichen mit mastzellsuffizienten Tieren, dass man sich die niedrigeren bakteriellen Titer bei W/W^v Mäusen auch durch vermehrte Phagozytose erklären könnte, obwohl Pneumokokken des Serotyps 3 besonders resistent gegenüber Phagozytose sind (Jarva et al. 2002; Hostetter 1986).

Insgesamt sprechen unsere Befunde dafür, dass Mastzellen in die Pathophysiologie der experimentellen Pneumokokkenmeningitis eingreifen. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass zerebrale Mastzellen im Rahmen einer bakteriellen Infektion aktiviert werden. Mastzellen bzw. ihre Produkte sind an einem schweren klinischen Krankheitsverlauf beteiligt und tragen zur Entwicklung meningitisassoziierter intrakranieller und systemischer Komplikationen bei. Interessanterweise scheinen Mastzellen zudem einen inhibitorischen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung in das ZNS zu haben.

6 Zusammenfassung

Trotz wirksamer Antibiotikatherapie, Immunmodulation durch Steroide und spezialisierter intensivmedizinischer Behandlung ist die Prognose der Pneumokokkenmeningitis weiterhin ungünstig. Aufgrund zentralnervöser und systemischer Komplikationen versterben weiterhin 15 bis 35 Prozent der Erkrankten und ein Drittel der überlebenden Patienten leidet an bleibenden neurologischen Schäden. Für die Entwicklung neuer adjuvanter Behandlungsstrategien ist die Kenntnis der Pathophysiologie von zentraler Bedeutung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch Untersuchung pathophysiologischer Abläufe während der Pneumokokkenmeningitis mögliche Angriffspunkte für neue adjuvante Therapien zu identifizieren.

Es wurden Mechanismen der Immuninduktion (am Beispiel der Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B) und der Immunregulation (am Beispiel der Bedeutung von Mastzellen) bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis untersucht.

6.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

NF- κ B ist ein zentraler Transkriptionsfaktor entzündlicher Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von NF- κ B im Gehirn bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis untersucht. Anschließend wurde die Auswirkung zweier verschiedener Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung auf zentralnervöse Komplikationen und klinische Symptome in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium betrachtet: zum einen die des Calpaininhibitors ALLN, der in die I κ B-Proteinolyse eingreift, und zum anderen von BAY 11-7085, einem Inhibitor der I κ B-Phosphorylierung.

Die Untersuchungen wurden in folgendem Tiermodell durchgeführt: Männliche Wistar-Ratten wurden nach einer klinischen Eingangsuntersuchung mit *S. pneumoniae* intrazisternal infiziert und nach 6 sowie 18 Stunden erhielten die Tiere jeweils einen der beiden NF- κ B-Inhibitoren (beziehungsweise phosphatgepufferte Saline bei Kontrollen). 24 Stunden nach Infektion wurden die Tiere anhand eines klinischen Score-Systems untersucht, anschließend narkotisiert und beatmet. Blutdruck, Temperatur und intrakranieller Druck wurden kontinuierlich überwacht und regelmäßig wurden Blutgasanalysen durchgeführt. Die Messung des ze-

rebralen Blutflusses wurde mittels Laserdopplersonde über einem Knochenfenster durchgeführt, ferner wurden Autoregulation und CO₂-Reaktivität der zerebralen Gefäße bestimmt. Zur Quantifizierung der Bluthirnschrankenstörung wurde der Farbstoff Evans-Blau intravasal injiziert und eine Stunde danach wurde Liquor zur Bestimmung von Evans-Blau-Konzentration, Zellzahl und IL-6-Konzentration gewonnen. Nach transkardialer Perfusion wurden die Gehirne für histologische und molekularbiologische Untersuchungen entnommen.

Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Pneumokokkenmeningitis war mit einem Anstieg der NF- κ B-Aktivität assoziiert, bestimmt mittels Immunhistochemie und Western Blot Analyse an Hirngewebe von Ratten 24 Stunden nach Infektion.
2. Die Behandlung mit den Inhibitoren der NF- κ B-Aktivierung ALLN und BAY 11-7085 führte zu einem signifikant besseren klinischen Score von behandelten gegenüber unbehandelten Tieren.
3. Dieser günstige Effekt auf die klinische Symptomatik wurde von einer signifikanten Reduktion der Bluthirnschrankenstörung, des Anstiegs des intrakraniellen Druckes, der Störung von zerebrovaskulärer CO₂-Reaktivität und Autoregulation sowie der Liquorpleozytose und der IL-6-Liquorkonzentration begleitet.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass die NF- κ B-Aktivierung eine zentrale Rolle in der Entstehung der meningealen Entzündung und der ZNS-Komplikationen während des Akutstadiums der bakteriellen Meningitis spielt.

6.2 Die Bedeutung der Mastzelle in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Mastzellen, seit langem bekannt als Effektorzellen allergischer Reaktionen, wurden aufgrund des weiten Spektrums ihrer Mediatoren in letzter Zeit auch hinsichtlich ihrer Rolle in der angeborenen Immunantwort untersucht. In einigen Modellen zeigte sich eine wichtige Rolle für Mastzellen in der Abwehr bakterieller Erreger. Die definitive Funktion von Mastzellen bei bakteriellen Infektionen des Zentralnervensystems ist unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Mastzelle in der Pathophysiologie der experimentellen Pneumokokkenmeningitis charakterisiert werden. Dazu wurde folgendes Mausmodell eingesetzt:

Die Meningitis wurde bei den Versuchstieren nach Erhebung eines klinischen Scores durch eine transkutane Injektion von *S. pneumoniae* in die *Cisterna magna* induziert. 4 oder 24 Stunden nach Infektion erfolgte eine weitere klinische Beurteilung. Danach wurden die Tiere narkotisiert. Es wurde ein Katheter zur Bestimmung des intrakraniellen Druckes und der Liquorzellzahl in die *Cisterna magna* eingebracht. Nach Entnahme von Blutproben wurden die Tiere transkardial perfundiert und Gehirn und Lungen entnommen. Es wurden bakterielle Titer in Gehirn und Blut bestimmt und die Organe für histologische und molekularbiologische Untersuchungen aufgearbeitet.

Für die Experimente wurden mastzelldefiziente WBB6F1/J-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} (kurz W/W^v) Mäuse und die dazu gehörigen Wildtypiere verwendet. Da diese Tiere aufgrund der gestörten Expression des Stammzellfaktor-Rezeptors c-kit an über die Mastzelldefizienz hinausgehenden Defekten leiden, wurde zum sicheren Nachweis eines Mastzelleffektes die Mastzellpopulation in einer Versuchsgruppe selektiv rekonstituiert.

Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei der Pneumokokkenmeningitis kam es zu einer Aktivierung und Degranulierung von Mastzellen im Gehirn.
2. Die Pneumokokkenmeningitis verlief bei mastzelldefizienten Mäusen klinisch signifikant milder als bei Wildtypmäusen und mastzellrekonstituierten Tieren.
3. Diese positive Auswirkung der Mastzelldefizienz auf die Klinik wurde von einer Reduktion systemischer und zentralnervöser Komplikationen wie Pneumonie und septischer Symptomatik sowie Anstieg des intrakraniellen Drucks begleitet. Unterschiede hinsichtlich des vasogenen Hirnödems, bestimmt mittels Albumin-ELISA ergaben sich nicht.
4. Allerdings führte die Mastzelldefizienz zu einer massiven Zunahme der Liquorpleozytose, die nicht von relevanten Unterschieden der pneumokokkeninduzierten Entzündungsantwort oder der bakteriellen Vermehrung begleitet war: für die Zytokin- und Chemokinproteinexpression ergaben sich in Proteinarray- und ELISA-Untersuchungen an Hirngewebe keine signifikanten Unterschiede zu mastzellkompetenten Tieren.
5. Für eine Beteiligung von c-kit und SCF an den beschriebenen Effekten ergaben sich keine Anhaltspunkte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass Mastzellen eine signifikante Rolle bei der Pneumokokkenmeningitis im Mausmodell spielen. Sie sind beteiligt an der Entstehung von systemischen und zentralnervösen Komplikationen und damit an einem schweren klinischen Krankheitsverlauf. Erstaunlich ist, dass Mastzellen im Rahmen der experimentellen Pneumokokkenmeningitis einen inhibitorischen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung in das ZNS besitzen. Dies ist umso überraschender, als sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mastzelldefizienten und –kompetenten Tieren hinsichtlich zentraler bekannter Mediatoren der wirtseigenen Immunreaktion bei bakterieller Meningitis wie z. B. der Zytokine IL-1 β und IL-6, der Chemokine MIP-2 und KC oder der Matrixmetalloproteinase MMP-9 im Hirngewebe nachweisen ließen. Diese Mediatoren können von Mastzellen sezerniert oder durch ihre Produkte aktiviert werden; allerdings kommt es im Rahmen der Pneumokokkenmeningitis zu einer überschießenden Produktion dieser Substanzen durch andere Zellen wie Neutrophile oder Endothelzellen, so dass diese Mastzellprodukte möglicherweise eine untergeordnete oder nur lokalbegrenzte und damit schwer messbare Rolle spielen.

7 **Ausblick**

Ein pharmakologischer Eingriff in die NF- κ B-Aktivierung ist bei Pneumokokkenmeningitis nicht nur aus pathophysiologischer Sicht interessant, sondern auch eine Option für eine adjuvante Therapie zur Reduktion der meningitisassoziierten ZNS-Schädigung. In unserem Labor ist bereits ein Langzeitmodell zur Untersuchung des Hörschadens bei Meningitis etabliert (Klein et al. 2003), das man z. B. um einen Morris-Water-Maze-Test zur Untersuchung des räumlichen Lernens erweitern könnte, um die funktionelle Bedeutung der meningitisassoziierten ZNS-Schädigung und ihre Modulation durch adjuvante Therapien noch genauer einschätzen zu können. Bei einem Langzeitversuchsansatz wäre auch die Verwendung neuer, noch spezifischerer Inhibitoren interessant (vgl. Abschnitt 5.1.2).

Für die weitere Charakterisierung von NF- κ B in der Immunantwort auf bakterielle Keime im ZNS bieten sich Untersuchungen im Mausmodell an. Mittlerweile besteht die Möglichkeit Mäuse mit einem gewebespezifischen Gendefekt für p65 zu generieren (vollständig p65-defiziente Tiere sterben bereits im Embryonalstadium). Mit Hilfe derart veränderter Tiere ließe sich z. B. der Beitrag von Astrozyten oder Endothelzellen für die Immunaktivierung gezielt untersuchen.

Die Klärung der Rolle von Mastzellen bei Pneumokokkenmeningitis erfordert noch die Beantwortung mehrerer Fragen.

Eine wichtige Frage ist ob, und wenn ja, mit welchem Resultat, Mastzellen aus Maus oder Mensch mit *Streptococcus pneumoniae in vitro* interagieren. Denn in den letzten Jahren wurde zunehmend deutlicher, dass Mastzellen auf unterschiedliche Stimuli ganz verschieden reagieren. Zum Beispiel führt eine TLR-4 vermittelte Aktivierung durch LPS nicht unbedingt zur Degranulierung, sondern eher zur Produktion von Zyto- und Chemokinen, während es bei Stimulierung über TLR-2 durch Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien zusätzlich auch zur Degranulierung kommt (Leal-Berumen et al. 1994; Supajatura et al. 2002; Varadaradjalou et al. 2003). Werden Fc-Rezeptoren über B-Zell-Superantigene, wie z. B. *S. aureus-derived protein A*, aktiviert, kommt es zu einer vollständigen Degranulierung (Genovese et al. 2000). Und auf spezielle Stimuli sezernieren Mastzellen gezielt; so schütten humane Mastzellen z. B. nach Stimulation mit IL-1 β IL-6 aus (Kandere-Grzybowska et al. 2003). Über Pneumokokken oder ihre Zellwandbestandteile als Stimulus liegen bisher noch keine Daten vor.

Vielleicht würden derartige *in vitro* Untersuchungen weitere interessante Angriffspunkte liefern, um die in dieser Studie beobachteten Effekte der Mastzelldefizienz bei

Pneumokokkenmeningitis besser einordnen zu können. Das verwendete Mausmodell bietet die elegante Möglichkeit, die Rekonstitution mit Mastzellen aus anderen genetisch veränderten Mäusen durchzuführen und dadurch die funktional entscheidenden Mastzellmediatoren zu identifizieren.

Neben möglichen Kandidaten aus in vitro Untersuchungen ist aus unserer Sicht auch IL-6 interessant, da bei IL-6-defizienten Mäusen massiv erhöhte Liquorzellzahlen ebenfalls mit einer Reduktion meningitisassoziierter Komplikationen einherging (vgl. Abschnitt 5.2.4)

Zudem könnten Untersuchungen an heparindefizienten (NDST-2 [N-Deacetylase/N-Sulphotransferase-2]^{-/-}) Mäusen den inhibitorischen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung erhellen (vgl. Abschnitt 5.2.4). Auch histamindefiziente HDC^{-/-} Mäuse könnten zur Leukozytenrekrutierung und darüber hinaus zur Temperaturregulation Hinweise liefern (vgl. Abschnitt 5.2.3.1 und 5.2.4). Eine Rekonstitution mit Mastzellen dieser Tiere ist leider nur eingeschränkt aussagekräftig, da diese morphologisch und biochemisch abnorme Mastzellen entwickeln (Forsberg et al. 1999).

8 Literaturverzeichnis

Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. *J Immunol* (1994) 152 (3) : 1298-1303

Alonso D, V, Dekker BA, Verheul AF, Feldman RG, Verhoef J, Snippe H. Anti-polysaccharide immunoglobulin isotype levels and opsonic activity of antisera: relationships with protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Infect Dis* (1995) 172 (2) : 562-565

Armao D, Kornfeld M, Estrada EY, Grossetete M, Rosenberg GA. Neutral proteases and disruption of the blood-brain barrier in rat. *Brain Res* (1997) 767 (2) : 259-264

Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Jimenez M, Madero R, Renart J, Vazquez JJ, Montiel C. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* (2000) 68 (4) : 1942-1945

Auburtin M, Porcher R, Bruneel F, Scanvic A, Trouillet JL, Bedos JP, Regnier B, Wolff M. Pneumococcal Meningitis in the Intensive Care Unit. Prognostic factors of clinical outcome in a series of 80 cases. *Am J Respir Crit Care Med* (2002) 165 (5) : 713-717

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis [see comments]. *Science* (1995) 270 (5234) : 286-290

Baeuerle PA und Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* (1996) 87 (1) : 13-20

Baeuerle PA und Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* (1994) 12 141-179

Baldwin ASJ. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* (1996) 14 649-683

Barnes PJ und Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* (1993) 14 (12) : 436-441

Barnes PJ und Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* (1997) 336 (15) : 1066-1071

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* (1986) 17 (3) : 472-476

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* (1995) 376 (6536) : 167-170

Benoist C und Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* (2002) 415 (6917) : 875-878

Bereta J, Cohen MC, Bereta M. Stimulatory effect of ouabain on VCAM-1 and iNOS expression in murine endothelial cells: involvement of NF-kappa B. *FEBS Lett* (1995) 377 (1) : 21-25

Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R, Maier K, Sander CA, Kollias G, Kunkel SL, Hultner L, Rocken M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* (2000) 192 (10) : 1441-1452

Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* (1996) 157 (4) : 1630-1637

Bogdan I, Leib SL, Bergeron M, Chow L, Tauber MG. Tumor necrosis factor-alpha contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis* (1997) 176 (3) : 693-697

Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N. Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* (1984) 41 (10) : 1045-1049

Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* (1997) 100 (5) : 972-985

Brenner T, Soffer D, Shalit M, Levi-Schaffer F. Mast cells in experimental allergic encephalomyelitis: characterization, distribution in the CNS and in vitro activation by myelin basic protein and neuropeptides. *J Neurol Sci* (1994) 122 (2) : 210-213

Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002a) 99 (26) : 16969-16974

Brown M, Tanzola M, Robbie-Ryan M. Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course. *Mol Immunol* (2002b) 38 (16-18) : 1373-

Brzezinska-Blaszczyk E und Pietrzak A. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates human adenoidal and cutaneous mast cells to histamine secretion. *Immunol Lett* (1997) 59 (3) : 139-143

Buster BL, Weintrob AC, Townsend GC, Scheld WM. Potential role of nitric oxide in the pathophysiology of experimental bacterial meningitis in rats. *Infect Immun* (1995) 63 (10) : 3835-3839

Cairns H, Russell DS: Cerebral arteriitis and phlebitis in pneumococcal meningitis. *J Patho Bacteriol* (1946) 58 : 649-665

Chen Z, Sugimoto Y, Kamei C. Effects of intracerebroventricular injection of alpha-fluoromethylhistidine on radial maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* (1999) 64 (3) : 513-518

Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy [see comments]. *Intensive Care Med* (1998) 24 (11) : 1131-1138

Cuzzocrea S, Rossi A, Pisano B, Di Paola R, Genovese T, Patel NS, Cuzzocrea E, Ianaro A, Sautebin L, Fulia F, Chatterjee PK, Caputi AP, Thiemermann C. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of organ failure induced by zymosan in mice. *Intensive Care Med* (2003) 29 (11) : 2016-2025

Cuzzocrea S, Tailor A, Zingarelli B, Salzman AL, Flower RJ, Szabo C, Perretti M. Lipocortin 1 protects against splanchnic artery occlusion and reperfusion injury by affecting neutrophil migration. *J Immunol* (1997) 159 (10) : 5089-5097

Dacey RG und Sande MA. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* (1974) 6 (4) : 437-441

Dacey RG, Jr. und Bassett JE. Histaminergic vasodilation of intracerebral arterioles in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (1987) 7 (3) : 327-331

de Gans J und van De Beek BD. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* (2002) 347 (20) : 1549-1556

Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Hojberg B, Lindquist L, Wretling B, Bakhiat M, Link H. Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* (1999) 67 (5) : 2590-2601

Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* (1989) 9 (5) : 589-596

Dirnagl U, Koedel U, Pfister HW, Villringer A, Schleinkofer L, Einhaupl KM. Detection of brain free oxygen radical generated photons in vivo: preliminary results. *Adv Exp Med Biol* (1993) 333 : 203-212

Dodge PR, Swartz MN. Bacterial meningitis – a review of selected aspects II. Special neurologic problems, postmeningitic complications and clinicopathological correlations. *N Engl J Med* (1965) 272 : 954-960

Doffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwick S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Headon DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E, Kalhoff H, Abinun M, Munnich A, Israel A, Courtois G, Casanova JL. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* (2001) 27 (3) : 277-285

Dropp JJ. Mast cells in mammalian brain. *Acta Anat (Basel)* (1976) 94 (1) : 1-21

Dropp JJ. Mast cells in the human brain. *Acta Anat (Basel)* (1979) 105 (4) : 505-513

Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* (1993) 61 (10) : 4392-4397

Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VSJ, Swartz MN. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes [see comments]. *N Engl J Med* (1993) 328 (1) : 21-28

Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* (1996) 381 (6577) : 75-77

Edvinsson L, Cervos-Navarro J, Larsson LI, Owman C, Ronnberg AL. Regional distribution of mast cells containing histamine, dopamine, or 5-hydroxytryptamine in the mammalian brain. *Neurology* (1977) 27 (9) : 878-883

Egger D, Geuenich S, Denzlinger C, Schmitt E, Mailhammer R, Ehrenreich H, Dormer P, Hultner L. IL-4 renders mast cells functionally responsive to endothelin-1. *J Immunol* (1995) 154 (4) : 1830-1837

Fishman RA. Brain edema. *N Engl J Med* (1975) 293 (14) : 706-711

Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellen L. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* (1999) 400 (6746) : 773-776

Foulds S, Galustian C, Mansfield AO, Schachter M. Transcription factor NF kappa B expression and postsurgical organ dysfunction. *Ann Surg* (2001) 233 (1) : 70-78

Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* (1999) 11 (1) : 53-59

Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* (1995) 26 (4) : 627-634

Genovese A, Bouvet JP, Florio G, Lamparter-Schummert B, Bjorck L, Marone G. Bacterial immunoglobulin superantigen proteins A and L activate human heart mast cells by interacting with immunoglobulin E. *Infect Immun* (2000) 68 (10) : 5517-5524

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* (1998) 16:225-60. 225-260

Grimm S und Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* (1993) 290 (Pt 2) : 297-308

Hanisch UK, Prinz M, Angstwurm K, Hausler KG, Kann O, Kettenmann H, Weber JR. The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur J Immunol* (2001) 31 (7) : 2104-2115

Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94 (5) : 2007-2012

Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M, Kikugawa K. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* (2003) 22 (13) : 3356-3366

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* (2002) 277 (19) : 16639-16647

Hilliard B, Samoilova EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* (1999) 163 (5) : 2937-2943

Hori Y, Nihei Y, Kurokawa Y, Kuramasu A, Makabe-Kobayashi Y, Terui T, Doi H, Satomi S, Sakurai E, Nagy A, Watanabe T, Ohtsu H. Accelerated clearance of *Escherichia coli* in experimental peritonitis of histamine-deficient mice. *J Immunol* (2002) 169 (4) : 1978-1983

Hostetter MK. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J Infect Dis* (1986) 153 (4) : 682-693

Hultner L, Moeller J, Schmitt E, Jager G, Reisbach G, Ring J, Dormer P. Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J Immunol* (1989) 142 (10) : 3440-3446

Ichiyama T, Isumi H, Yoshitomi T, Nishikawa M, Matsubara T, Furukawa S. NF-kappaB activation in cerebrospinal fluid cells from patients with meningitis. *Neurol Res* (2002) 24 (7) : 709-712

Ikeda T und Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol Lett* (2003) 88 (1) : 21-26

Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* (2000) 28 (9) : 1317-1327

Jarva H, Janulczyk R, Hellwege J, Zipfel PF, Bjorck L, Meri S. *Streptococcus pneumoniae* Evades Complement Attack and Opsonophagocytosis by Expressing the pspC Locus-Encoded Hic Protein That Binds to Short Consensus Repeats 8-11 of Factor H. *J Immunol JID - 2985117R* (2002) 168 (4) : 1886-1894

Ji Y, Akerboom TP, Sies H, Thomas JA. S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch Biochem Biophys* (1999) 362 (1) : 67-78

Jones SC, Bose B, Furlan AJ, Friel HT, Easley KA, Meredith MP, Little JR. CO₂ reactivity and heterogeneity of cerebral blood flow in ischemic, border zone, and normal cortex. *Am J Physiol* (1989) 257 (2 Pt 2) : H473-H482

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech Dev* (1993) 43 (2-3) : 135-147

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Henkel T, Stockinger H, Baeuerle PA. Selective recognition of the activated form of transcription factor NF-kappa B by a monoclonal antibody. *Biol Chem Hoppe Seyler* (1995) 376 (1) : 9-16

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Lannes-Vieira J, Kreutzberg GW, Wekerle H, Baeuerle PA, Gehrman J. Transcription factor NF-kappa B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (1994a) 55 (1) : 99-106

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol* (1994b) 14 (6) : 3981-3992

Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D, Donelan J, Poplawski S, Boucher W, Athanassiou A, Theoharides TC. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol* (2003) 171 (9) : 4830-4836

Karin M und Ben Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* (2000) 18:621-63. 621-663

Karin M, Takahashi T, Kapahi P, Delhase M, Chen Y, Makris C, Rothwarf D, Baud V, Natoli G, Guido F, Li N. Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors* (2001) 15 (2-4) : 87-89

Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* (2004) 3 (1) : 17-26

Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology* (2002) 58 (2) : 186-191

Kastenbauer S, Koedel U, Pfister HW. Role of peroxynitrite as a mediator of pathophysiological alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* (1999) 180 (4) : 1164-1170

Kastenbauer S und Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* (2003) 126 (Pt 5) : 1015-1025

Kastenbauer S, Koedel U, Weih F, Ziegler-Heitbrock L, Pfister HW. Protective role of NF- κ B1 (p50) in experimental pneumococcal meningitis. *Eur J Pharmacol* (2004) 498 : 315-318

Katz HR, Raizman MB, Gartner CS, Scott HC, Benson AC, Austen KF. Secretory granule mediator release and generation of oxidative metabolites of arachidonic acid via Fc-IgG receptor bridging in mouse mast cells. *J Immunol* (1992) 148 (3) : 868-871

Kieran M, Blank V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, Le Bail O, Urban MB, Kourilsky P, Baeuerle PA, Israel A. The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* (1990) 62 (5) : 1007-1018

Kiernan JA. A comparative survey of the mast cells of the mammalian brain. *J Anat* (1976) 121 (2) : 303-311

Kitamura Y, Morii E, Ogihara H, Jippo T, Ito A. Mutant mice: a useful tool for studying the development of mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* (2001) 124 (1-3) : 16-19

Klein M, Koedel U, Pfister HW, Kastenbauer S. Meningitis-associated hearing loss: protection by adjunctive antioxidant therapy. *Ann Neurol* (2003) 54 (4) : 451-458

Koedel U, Angele B, Rupprecht T, Wagner H, Roggenkamp A, Pfister HW, Kirschning CJ. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* (2003) 170 (1) : 438-444

Koedel U, Bernatowicz A, Frei K, Fontana A, Pfister HW. Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* (1996) 157 (11) : 5185-5191

Koedel U, Bernatowicz A, Paul R, Frei K, Fontana A, Pfister HW. Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* (1995) 37 (3) : 313-323

Koedel U, Paul R, Winkler F, Kastenbauer S, Huang PL, Pfister HW. Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* (2001) 60 (11) : 1041-1050

Koedel U und Pfister HW. Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci Lett* (1997) 225 (1) : 33-36

Koedel U und Pfister HW. Models of experimental bacterial meningitis. Role and limitations. *Infect Dis Clin North Am* (1999a) 13 (3) : 549-77, vi

Koedel U und Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol* (1999b) 9 (1) : 57-67

Koedel U und Pfister HW. Superoxide production by primary rat cerebral endothelial cells in response to pneumococci. *J Neuroimmunol* (1999c) 96 (2) : 190-200

Koedel U, Pfister HW, Tomasz A. Methylprednisolone attenuates inflammation, increase of brain water content and intracranial pressure, but does not influence cerebral blood flow changes in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Res* (1994) 644 (1) : 25-31

Koedel U, Rupprecht T, Angele B, Heesemann J, Wagner H, Pfister HW, Kirschning CJ. MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain* (2004) .

Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* (2002a) 2 (12) : 721-736

Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Flavell RA, Pfister HW. Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. *Ann Neurol* (2002b) 51 (3) : 319-329

- Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Pfister HW. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* (2002c) 22 (1) : 39-49
- Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, Bieber J, Chi DS. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* (2001) 6 : D1109-27
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* (2001) 7 (12) : 1291-1297
- Leal-Berumen I, Conlon P, Marshall JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* (1994) 152 (11) : 5468-5476
- Lee JI und Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* (1998) 38 (11) : 981-993
- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* (1996) 98 (11) : 2632-2639
- Leib SL, Leppert D, Clements J, Täuber MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun* (2000) 68 (2) : 615-620
- Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Hollander GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis* (2000) 31 (1) : 80-84
- Li N und Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J* (1999) 13 (10) : 1137-1143
- Li Q und Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* (2002) 2 (10) : 725-734

Lin TJ, Garduno R, Boudreau RT, Issekutz AC. *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *J Immunol* (2002) 169 (8) : 4522-4530

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* (2002) 8 (5) : 500-508

Maass DL, Hybki DP, White J, Horton JW. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. *Shock* (2002) 17 (4) : 293-299

Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, Shirato K, Nagy A, Ujike A, Takai T, Watanabe T, Ohtsu H. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* (2002) 110 (2) : 298-303

Malaviya R und Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* (2000) 67 (6) : 841-846

Malaviya R und Abraham SN. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev* (2001) 179:16-24. 16-24

Malaviya R, Ikeda T, Abraham SN, Malaviya R. Contribution of mast cells to bacterial clearance and their proliferation during experimental cystitis induced by type 1 fimbriated *E. coli*. *Immunol Lett* (2004) 91 (2-3) : 103-111

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* (1996) 381 (6577) : 77-80

Malaviya R, Ross E, Jakschik BA, Abraham SN. Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. *J Clin Invest* (1994a) 93 (4) : 1645-1653

Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, Abraham SN. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* (1994b) 152 (4) : 1907-1914

Mallen-St Clair J, Pham CT, Villalta SA, Caughey GH, Wolters PJ. Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis. *J Clin Invest* (2004) 113 (4) : 628-634

Masliniska D, Damska M, Kaliszek A, Maslinski S. Accumulation, distribution and phenotype heterogeneity of mast cells (MC) in human brains with neurocysticercosis. *Folia Neuro-pathol* (2001) 39 (1) : 7-13

McCurdy JD, Olynich TJ, Maher LH, Marshall JS. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* (2003) 170 (4) : 1625-1629

McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* (1997) 89 (9) : 3421-3433

McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Dambach DM, Pattoli MA, Lu P, Zhou XD, Qiu Y, Zusi FC, Burke JR. A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* (2003) 48 (9) : 2652-2659

McLachlan JB, Hart JP, Pizzo SV, Shelburne CP, Staats HF, Gunn MD, Abraham SN. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol* (2003) 4 (12) : 1199-1205

Mekori YA und Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* (2000) 173:131-40. 131-140

Mercurio F und Manning AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* (1999) 18 (45) : 6163-6171

Metzger H. The high affinity receptor for IgE on mast cells. *Clin Exp Allergy* (1991) 21 (3) : 269-279

Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* (1993) 12 (5) : 2005-2015

Milligan SA, Owens MW, Grisham MB. Inhibition of IkappaB-alpha and IkappaB-beta proteolysis by calpain inhibitor I blocks nitric oxide synthesis. *Arch Biochem Biophys* (1996) 335 (2) : 388-395

Mustafa MM, Lebel MH, Ramilo O, Olsen KD, Reisch JS, Beutler B, McCracken GHJ. Correlation of interleukin-1 beta and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis. *J Pediatr* (1989) 115 (2) : 208-213

Neurath MF und Pettersson S. Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* (1997) 198 (1-3) : 91-98

Neurath MF, Pettersson S, Meyer zBK, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* (1996) 2 (9) : 998-1004

Nissen RM und Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* (2000) 14 (18) : 2314-2329

Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P, Baltimore D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* (1991) 64 (5) : 961-969

O'Neill LA und Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function [see comments]. *Trends Neurosci* (1997) 20 (6) : 252-258

Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la RG, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* (1999) 18 (16) : 4446-4454

Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, Webster NR. Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die. *Crit Care Med* (2000) 28 (4) : 1047-1051

Patnaik R, Mohanty S, Sharma HS. Blockade of histamine H2 receptors attenuate blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow disturbances, edema formation and cell reactions

following hyperthermic brain injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl* (2000) 76:535-9. 535-539

Paul R, Koedel U, Winkler F, Kieseier BC, Fontana A, Kopf M, Hartung HP, Pfister HW. Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain* (2003) 126 (Pt 8) : 1873-1882

Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M, Pfister HW. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol* (1998) 44 (4) : 592-600

Paulson OB, Brodersen P, Hansen EL, Kristensen HS. Regional cerebral blood flow, cerebral metabolic rate of oxygen, and cerebrospinal fluid acid-base variables in patients with acute meningitis and with acute encephalitis. *Acta Med Scand* (1974) 196 (3) : 191-198

Pfister HW. [Complicated purulent meningitis in the adult: persisting high mortality caused by vasculitis and intracranial pressure]. *Nervenarzt* (1989) 60 (5) : 249-254

Pfister HW, Borasio GD, Dirnagl U, Bauer M, Einhaupl KM. Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology* (1992) 42 (8) : 1497-1504

Pfister HW, Feiden W, Einhaupl KM. Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* (1993) 50 (6) : 575-581

Pfister HW, Koedel U, Haberl RL, Dirnagl U, Feiden W, Ruckdeschel G, Einhaupl KM. Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* (1990) 10 (6) : 914-922

Pfister HW, Kumpfel T, Koedel U. Involvement of substance P in pial arteriolar vasodilatation during pneumococcal meningitis in the rat. *Neuroreport* (1995) 6 (9) : 1301-1305

Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* (1997) 272 (34) : 21096-21103

Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* (1997) 390 (6656) : 172-175

Quagliarello V und Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* (1992) 327 (12) : 864-872

Quagliarello VJ, Long WJ, Scheld WM. Morphologic alterations of the blood-brain barrier with experimental meningitis in the rat. Temporal sequence and role of encapsulation. *J Clin Invest* (1986) 77 (4) : 1084-1095

Ramilo O, Saez-Llorens X, Mertsola J, Jafari H, Olsen KD, Hansen EJ, Yoshinaga M, Ohkawara S, Nariuchi H, McCracken GHJ. Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. *J Exp Med* (1990) 172 (2) : 497-507

Ries S, Schminke U, Fassbender K, Daffertshofer M, Steinke W, Hennerici M. Cerebrovascular involvement in the acute phase of bacterial meningitis. *J Neurol* (1997) 244 (1) : 51-55

Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, Damaske B, Stefonek K, Barnes B, Patterson J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* (2001) 285 (13) : 1729-1735

Rodriguez AF, Kaplan SL, Hawkins EP, Mason EO, Jr. Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model. *J Infect Dis* (1991) 164 (6) : 1207-1209

Roshak AK, Callahan JF, Blake SM. Small-molecule inhibitors of NF-kappaB for the treatment of inflammatory joint disease. *Curr Opin Pharmacol* (2002) 2 (3) : 316-321

Rozniecki JJ, Hauser SL, Stein M, Lincoln R, Theoharides TC. Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* (1995) 37 (1) : 63-66

Ruetten H und Thiemermann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* (1997) 121 (4) : 695-704

Sakata T, Yoshimatsu H, Kurokawa M. Thermoregulation modulated by hypothalamic histamine in rats. *Inflamm Res* (1997) 46 Suppl 1:S35-6. S35-S36

Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* (2003) 22 (15) : 3898-3909

Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* (1990) 171 (2) : 439-448

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* (1995a) 270 (5234) : 283-286

Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin ASJ. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* (1995b) 15 (2) : 943-953

Scheld WM, Dacey RG, Winn HR, Welsh JE, Jane JA, Sande MA. Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. Alterations with penicillin and methylprednisolone. *J Clin Invest* (1980) 66 (2) : 243-253

Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA. Identification of hydrogen peroxide as the relevant messenger in the activation pathway of transcription factor NF-kappaB. *Adv Exp Med Biol* (1996) 387:63-8 63-68

Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med* (1999) 5 (5) : 554-559

Schow SR und Joly A. N-acetyl-leuciny-leuciny-norleucinal inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and prevents TNF and IL-6 synthesis in vivo. *Cell Immunol* (1997) 175 (2) : 199-202

Schramm R, Schaefer T, Menger MD, Thorlacius H. Acute mast cell-dependent neutrophil recruitment in the skin is mediated by KC and LFA-1: inhibitory mechanisms of dexamethasone. *J Leukoc Biol* (2002) 72 (6) : 1122-1132

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* (1991) 10 (8) : 2247-2258

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* (1997) 337 (14) : 970-976

Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB, Weber JR. Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes. *Glia* (1998) 22 (3) : 295-305

Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med* (2000) 191 (5) : 813-822

Sen R und Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* (1986) 46 (5) : 705-716

Senftleben U. NF-kappaB in critical diseases: a bad guy? *Intensive Care Med* (2003) 29 (11) : 1873-1876

Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* (1995) 80 (2) : 321-330

Sher A. Complement-dependent adherence of mast cells to schistosomula. *Nature* (1976) 263 (5575) : 334-336

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* (1994) 10:405-55. 405-455

Simberkoff MS, Moldover NH, Rahal J, Jr. Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. A regional host defense deficiency. *J Lab Clin Med* (1980) 95 (3) : 362-372

Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, Israel A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P, Wiemann S, Poustka A, Esposito T, Bardaro T, Gianfrancesco F, Ciccodicola A, D'Urso M, Woffendin H, Jakins T, Donnai D, Stewart H, Kenwrick SJ, Aradhya S, Yamagata T, Levy M, Lewis RA, Nelson DL. Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* (2000) 405 (6785) : 466-472

Spanaus KS, Nadal D, Pfister HW, Seebach J, Widmer U, Frei K, Gloor S, Fontana A. C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J Immunol* (1997) 158 (4) : 1956-1964

Spellerberg B, Rosenow C, Sha W, Tuomanen EI. Pneumococcal cell wall activates NF-kappa B in human monocytes: aspects distinct from endotoxin. *Microb Pathog* (1996) 20 (5) : 309-317

Sprenger H, Rosler A, Tonn P, Braune HJ, Huffmann G, Gemsa D. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* (1996) 80 (2) : 155-161

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* (1994) 76 (2) : 301-314

Stahel PF, Nadal D, Pfister HW, Paradisis PM, Barnum SR. Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet* (1997) 349 (9069) : 1886-1887

Storz P, Doppler H, Toker A. Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* (2004) 24 (7) : 2614-2626

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* (2002) 109 (10) : 1351-1359

Tak PP und Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 7802877 (2001) 107 (1) : 7-11

Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* (2003) 307 (3) : 1072-1078

Tanzola MB, Robbie-Ryan M, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *J Immunol* (2003) 171 (8) : 4385-4391

Täuber MG, Borschberg U, Sande MA. Influence of granulocytes on brain edema, intracranial pressure, and cerebrospinal fluid concentrations of lactate and protein in experimental meningitis. *J Infect Dis* (1988) 157 (3) : 456-464

Täuber MG, Khayam-Bashi H, Sande MA. Effects of ampicillin and corticosteroids on brain water content, cerebrospinal fluid pressure, and cerebrospinal fluid lactate levels in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* (1985) 151 (3) : 528-534

Täuber MG und Moser B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis* (1999) 28 (1) : 1-11

Täuber MG und Sande MA. Pathogenesis of bacterial meningitis: contributions by experimental models in rabbits. *Infection* (1984) 12 Suppl 1 S3-10

Täuber MG und Zwahlen A. Animal models for meningitis. *Methods Enzymol* (1994) 235 93-106

Theoharides TC. Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sci* (1990) 46 (9) : 607-617

Tripoli CJ. Bacterial meningitis: a comparative study of various therapeutic measures. *JAMA* (1936) : 106-171

- Tuomanen EI. Molecular and cellular mechanisms of pneumococcal meningitis. *Ann N Y Acad Sci* (1996) 797:42-52 42-52
- Tureen JH, Dworkin RJ, Kennedy SL, Sachdeva M, Sande MA. Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits. *J Clin Invest* (1990) 85 (2) : 577-581
- Tyrell DJ, Kilfeather S, Page CP. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends Pharmacol Sci* (1995) 16 (6) : 198-204
- Unlap MT und Jope RS. Dexamethasone attenuates NF-kappa B DNA binding activity without inducing I kappa B levels in rat brain in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* (1997) 45 (1) : 83-89
- Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab* (1988) 8 (2) : 282-284
- van De Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* (2004) 351 (18) : 1849-1859
- van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* (1997) 176 (2) : 439-444
- van Furth AM, Roord JJ, van Furth R. Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect Immun* (1996) 64 (12) : 4883-4890
- Varadaradjalou S, Feger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol* (2003) 33 (4) : 899-906
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* (1995) 270 (16) : 9558-9563

Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Freyer D, Burger W, Busch C, Einhaupl KM, Dirnagl U. Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* (1997) 17 (11) : 1221-1229

World Health Organization. Causes of annual death worldwide. WHO (1998)

Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW. Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis* 2001 Jun 15 ;183 (12):1749 -59 183 (12) : 1749-1759

Yano H, Wershil BK, Arizono N, Galli SJ. Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. *J Clin Invest* (1989) 84 (4) : 1276-1286

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* (1999) 163 (1) : 1-5

Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, Ferguson BM. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet* (2000) 67 (6) : 1555-1562

Zou L, Sato N, Attuwaybi BO, Kone BC. Delayed administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone or combined therapy with BAY 11-7085 protects against gut ischemia-reperfusion injury. *Shock* (2003) 20 (5) : 469-475

Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJ, Roord JJ, van Furth AM. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *J Infect Dis* (2001) 183 (7) : 1143-1146

9 Danksagung

Herrn PD Dr. Uwe Ködel danke ich herzlich für die exzellente Betreuung. Als feste Instanz im Labor mit langjähriger Erfahrung gab er unzählige wertvolle Anregungen und hatte immer ein offenes Ohr für Fragen. Zentral für die Durchführung dieser Arbeit war auch seine geduldige, praktische und moralische Unterstützung bei den Tierexperimenten.

Ein großer Dank geht auch an Frau Barbara Angele, die sich viel Zeit genommen hat, mich in die Geheimnisse einer technischen Assistentin einzuweisen. Danke dafür, dass sie mir nicht nur bei methodischen Problemen immer behilflich war und natürlich auch danke für ihre kulinarische Unterstützung.

Mit Frau Barbara Angele und Herrn PD Dr. Uwe Ködel im Hintergrund konnte man gut selbstständig arbeiten, da im Falle von Problemen immer Hilfe zur Stelle war.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.-W. Pfister bedanke ich mich herzlich dafür, dass ich die vorliegende Arbeit in seinem Neuroinfektiologischen Labor durchführen konnte. Natürlich auch ein großes Dankeschön an alle weiteren Laborkolleginnen und -kollegen für die vielfältigen bereitwilligen Hilfen, das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit im Labor.

Des weiteren vielen Dank an Frau PD Dr. B. Grabein und Frau Meindok für die mikrobiologische Zusammenarbeit und an Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Möglichkeit an dem Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ teilnehmen zu können.

Herrn Dr. L. Hültner und Frau U. Bamberg von der GSF München danke ich dafür, dass sie uns unbürokratisch die Mäuse für das „Mastzellprojekt“ zur Verfügung gestellt haben und es uns ersparten die aufwendige Mastzellrekonstitution selbst zu etablieren.

Vielen Dank an Andreas, der mich immer bei Laune gehalten hat, und ganz besonders auch an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mir jegliche Unterstützung gewährten.

10 Lebenslauf

Zur Person

<i>Name</i>	Irene Bayerlein
<i>Geburtsdatum</i>	20. Juli 1972
<i>Geburtsort</i>	Rosenheim

Schulausbildung

<i>1979-1983</i>	Grundschule Aschau im Chiemgau
<i>1983-1992</i>	Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien am Chiemsee

Studium

<i>1992-1993</i>	Studium generale an der Universidad de Salamanca, Spanien
<i>1993-1994</i>	Architektur an der Technischen Universität München
<i>1994-1995</i>	Rechtswissenschaften an der Universität Passau
<i>1995-2001</i>	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München

Berufstätigkeit

<i>2001-2003</i>	Ärztin im Praktikum in der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München
<i>Seit 2003</i>	Assistenzärztin in der neurologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching